

**Charakterisierung einer
Knockout-Maus für LRIG2**

von Silja Isabella Helena Zettler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Charakterisierung einer
Knockout-Maus für LRIG2

von Silja Isabella Helena Zettler

aus München

München 2019

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff

Angefertigt am:

Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mentor: Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Tag der Promotion: 25. Februar 2019

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	LRIG-Familie	2
1.1.	Proteinstruktur	2
1.2.	Funktion	3
1.3.	LRIG2-KO Mäuse.....	6
2.	Ösophagus	6
3.	Harnblase	7
4.	Fettgewebe	8
4.1.	Weißes Fettgewebe	9
4.2.	Braunes Fettgewebe	9
4.3.	Beiges Fettgewebe	10
II.	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	13
1.	Tiere	13
1.1.	Allgemeine Haltungsbedingungen	13
1.2.	LRIG2-KO Mäuse.....	13
2.	Material	14
2.1.	Geräte	14
2.2.	Verbrauchsmaterialien	17
2.3.	Chemikalien	19
2.4.	Enzyme	20
2.5.	Reagenzien	21
2.6.	Medikamente	22
2.7.	Software	22
3.	Methoden	24
3.1.	DNA Extraktion aus tierischem Gewebe mittels Wizard Kit.....	24
3.2.	Polymerase-Kettenreaktion.....	25
3.2.1.	PCR Protokoll	25
3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.4.	Die Genexpression auf RNA Ebene.....	27
3.4.1.	RNA Extraktion aus tierischem Gewebe	27
3.4.2.	cDNA-Synthese aus tierischem Gewebe	27

3.4.3.	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	28
3.4.4.	Quantitative Echtzeit-PCR	29
3.5.	Analysen zur LRIG2-KO Maus	29
3.5.1.	Methoden zur Blutentnahme und Sektion	29
3.5.2.	Messung von klinischen Blutparametern.....	30
3.5.3.	Histologische Analysen	30
3.5.3.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	31
3.5.3.2.	Quantitativ-stereologische Analysen	32
3.5.3.3.	Bestimmung der Adipozytenanschnittsfläche im abdominalen Fettgewebe	33
3.5.4.	Proteinanalysen	33
3.5.4.1.	Proteinisolation aus Mäusegewebe.....	33
3.5.4.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
3.5.4.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.5.4.4.	Proteintransfer	36
3.5.4.5.	Detektion von Antigenen	37
3.5.4.6.	Densitometrische Auswertung	39
3.5.5.	Messungen der Futter- und Wasseraufnahme und des Kotabsatzes	39
3.5.6.	Bestimmung der Rohnährstoffe in Futter und Wasser	40
3.5.7.	Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit.....	40
3.5.8.	Messung des pH-Werts im Kot	40
3.5.9.	Messung der Körperoberflächentemperatur mittels Wärmebildkamera	41
3.5.10.	Thermoregulationstest	41
3.5.11.	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	41
3.5.12.	Futterbreistudie	42
3.5.13.	Diätetisches Adipositasmodell	42
3.6.	Zellkultur	43
3.6.1.	Isolierung von stromalen, vaskulären Gewebe (SVF)	43
3.6.2.	Differenzierung von murinen Präadipozyten	43
3.7.	Statistik	45

III.	ERGEBNISSE	47
1.	Charakterisierung der LRIG2-KO Maus.....	47
1.1.	Generierung einer LRIG2-KO Maus.....	47
1.2.	Genexpressionsanalysen auf mRNA Ebene	47
1.3.	Wachstumsrate	49
1.4.	Körpergröße.....	50
1.5.	Einfluss der Körpergröße auf das Körpergewicht.....	50
1.6.	Organgewichte	51
2.	Megaösophagus.....	53
2.1.	Ösophagusgewicht.....	53
2.2.	Morphologische Analysen	54
2.3.	Expressionsanalysen	55
2.4.	Aspirationsanalysen	55
3.	Harnblasenanalysen	56
3.1.	Harnblasengewicht.....	56
3.2.	Morphologische Analysen	57
3.3.	Western Blot Analysen.....	58
4.	Fettdepots.....	60
4.1.	Gewicht der Fettdepots	60
4.2.	Morphologische Analysen der abdominalen Fettdepots.....	61
4.3.	Futteraufnahme.....	62
4.4.	Futter- und Wasseraufnahme, Kotabsatz und scheinbare Verdaulichkeit	63
4.5.	Großes Blutbild	64
4.6.	Plasmaanalysen.....	65
4.7.	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	66
4.8.	Analyse der Körperoberflächentemperatur	66
4.9.	Western Blot Analysen.....	68
5.	Diätetisches Adipositasmodell	69
5.1.	Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme	69
5.2.	Gewichte der Fettdepots	71
5.3.	Morphologische Analysen der abdominalen Fettdepots.....	72
5.4.	Futteraufnahme und Kotabsatz	73

5.5.	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	74
5.6.	Western Blot Analysen.....	74
5.7.	Analysen der Lipideinlagerung von Adipozyten	77
IV.	DISKUSSION.....	79
1.	Überblick.....	79
2.	Veränderungen des Ösophagus.....	80
3.	Veränderungen der Harnblase	81
4.	Veränderungen des weißen Fettgewebes	83
V.	ZUSAMMENFASSUNG	87
VI.	SUMMARY	89
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
VIII.	DANKSAGUNG	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
A	Ampere
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ACTH	Adrenocorticotropin
AKT	Proteinkinase-B
AP2	Adipocyte Protein 2
As	antisense
BASO	basophile Granulozyten
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	knochenmorphogenetische Protein
BSA	bovine Serumalbumin
Cbl	<i>casitas blineage</i> Lymphom
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein
CLS	<i>crown-like</i> Struktur
cm ³	Kubikzentimeter
cDNA	komplementäre DNA
CT	<i>threshold cycle</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's moditied eagle's medium</i>
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR/ ERBB	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFRvIII	onkogene EGFR
EtOH	Ethanol
EO	eosinophile Granulozyten
FBS	fetales bovine Serum
FFPE	formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FLCN	<i>folliculin</i>
g	Gramm
GE	Bruttoenergie
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
HB	Harnblase
HCL	Salzsäure
HDL	<i>high-density</i> Lipoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	fettreiche Diät
H ₂ O	Wasser
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
Ig-like	<i>immunoglobulin-like</i>
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
KD	Kontrolldiät
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
KRL	Kopf-Rumpf-Länge

L	Liter
LDH	Lactat Dehydrogenase
LDL	<i>low-density</i> Lipoprotein
LRIG	<i>leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains</i>
LRR	<i>leucine-rich repeats</i>
LYMPH	Lymphozyten
M	molare Masse
mM	Millimolar
MET	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
METRNL	<i>Meteorin like, glial cell differentiation</i> Regulator
Mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
Mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
N	Normalität
NaOH	Natriumhydroxid
NEFA	nicht veresterte freie Fettsäuren
NEUT	neutrophile Granulozyten
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
NfE	stickstofffreie Extraktionsstoffe
nM	Nanomolar
NRG4	Neuregulin 4
PPARG	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ
PCNA	Proliferatin-Cell-Nuclear Antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFRA	<i>platelet-derived growth factor receptor-α</i>
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PLIN2	Adipophilin
PLT	Thrombozyten

Pref-1	Präadipozytenfaktor-1
px ²	Quadratpixel
RBC	rote Blutkörperchen
RET	Ret Protoonkogen
Rfe	Rohfett
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rp	Rohprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RT	Raumtemperatur
s	sense
S6	ribosomal Protein S6
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
STAT3	<i>signal transducers and activators of transcription 3</i>
Std.	Stunde
STH	Somatotropin
sV	scheinbare Verdaulichkeit
SVF	stromales vaskuläres Gewebe
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween
TG	Triglyzeride
TP	total Protein
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TS	Trockensubstanz
TSH	Thyreotropin
TUBAA	α-Tubulin
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheit
UCP1	Thermogenin 1
V	absolutes Volumen

Vv	Volumendichte
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
VEGFA	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor α
WBC	weiße Blutkörperchen
x g	Erdbeschleunigung

I. EINLEITUNG

Die *leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains* (LRIG) Proteine gehören zu den Membranproteinen. Membranproteine sind häufig an biologischen Prozessen wie etwa der Zelladhäsion, Signaltransduktion, Transport und enzymatischer Aktivität beteiligt¹. Bisher ist noch wenig über die physiologische Funktion der LRIG-Proteine bekannt^{2,3}.

Die LRIG-Familie besteht aus drei Mitglieder: LRIG1, LRIG2 und LRIG3. Das LRIG2-Protein unterscheidet sich stärker von den anderen beiden LRIG-Proteinen. Es zeigt Strukturunterschiede in der extrazellulären Domäne⁴ und kann häufig als positiver Regulator von verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen fungieren⁵. LRIG1⁴ hingegen ist ein negativer Regulator von diversen Rezeptor-Tyrosinkinasen, während LRIG3⁶ sowohl als positiver, als auch als negativer Regulator agieren kann. Das LRIG2-Protein konnte in fast allen Organen und Geweben nachgewiesen werden⁷. Zum einen wirkt LRIG2 als Onkoprotein^{8,9}, wie z.B. im Gliom, und zum andern besitzt es eine gegensätzliche Funktion als Tumorsuppressor im Melanom der Haut¹⁰. Darüber hinaus ist in der Literatur über die Funktion von LRIG2 bislang wenig bekannt.

Um die Bedeutung von LRIG2 weiter aufklären zu können, wurden im Genzentrum Knockout-Mäuse für LRIG2 erstellt. Während unserer Studie wurde allerdings eine LRIG2-KO Mauslinie von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht¹¹. Die von uns generierten LRIG2-KO Mäuse zeigten Veränderungen im Ösophagus, der Harnblase und im Fettgewebe. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Veränderungen im weißen Fettgewebe: weißes Fettgewebe speichert Lipide¹² und ist ein endokrines Gewebe¹³. Das Verständnis über die Wirkung von LRIG2 schafft eine wissenschaftliche Basis zur Aufklärung von humanen Erkrankungen, auf welcher dann passende Therapien entwickelt werden können.

1. LRIG-Familie

Drei Mitglieder der LRIG-Familie wurden bisher in Wirbeltieren entdeckt: LRIG1^{14,15}, LRIG2^{7,16} und LRIG3¹⁶. Auch einige wirbellose Tiere (z.B. Fliegen und Würmer) besitzen ein *Lrig*-Gen¹⁷.

Das LRIG1-Protein wurde bereits 1996 in embryonalen Karzinomzellen als Membranglykoprotein entdeckt und sowohl den Immunglobulinen, als auch der *leucine-rich repeat* Subfamilie zugeordnet¹⁴. Erst fünf Jahre später wurde die humane Genstruktur auf Chromosom 3^{15,18} nachgewiesen. Das Membranprotein LRIG1 besitzt ein Molekulargewicht von 143 kDA¹⁹. Das humane *LRIG2*-Gen wurde 2004 auf Chromosom 1 gemappt und der LRIG-Familie aufgrund einer 47 % Übereinstimmung mit LRIG1 zugeordnet⁷. LRIG2 besitzt ein Molekulargewicht von 132 kDA⁷. Die *LRIG2*-mRNA ließ sich in fast allen humanen Organen und Geweben nachweisen⁷. Im gleichen Jahr wurde auch LRIG3 als bisher letztes Mitglied der LRIG-Familie zugeschrieben. Es befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 12^{16,20}. Die Anordnung der *Lrig* Gene in der Maus stimmt mit den syntänischen Regionen im humanen Genom überein¹⁶.

Die LRIG1- und LRIG3-Proteine wurden als Tumorsuppressoren identifiziert^{6,18}. Das LRIG2-Protein agiert als Tumorsuppressor⁵, kann aber in einigen Geweben auch als Onkoprotein^{8,9} auftreten.

1.1. Proteinstruktur

Die Proteinstruktur der LRIG-Proteine besitzt eine extrazelluläre Domäne, die mit einem Signalpeptid startet, gefolgt von 15 *leucine-rich repeats* (LRR), mit zwei cysteinreichen N-flankierenden Domänen und drei darauffolgenden *immunoglobulin-like* (Ig-like) Domänen (Abb. 1). Eine einfach durchlaufende, transmembrane Domäne verbindet die bereits beschriebene extrazelluläre Domäne mit dem intrazellulären, zytoplasmatischen Teil^{14,15}. Die extrazelluläre Domäne des LRIG2-Proteins unterscheidet sich von den Domänen der anderen beiden LRIG-Proteine. Die erste Cystein N-flankierende Domäne fehlt und die *immunoglobulin-like* Domänen sind bei LRIG2 verändert²¹. 51 % der LRR stimmen zwischen LRIG1 und LRIG2 überein, sowie 53 % zwischen LRIG1 und LRIG3. Die Ig-like Domänen von LRIG2 zu LRIG1 sind zu 64 % und von LRIG3 zu LRIG1 zu 72 % identisch. Der zytoplasmatische Teil variiert stark zwischen allen LRIG-Proteinen und verleiht ihnen unterschiedliche Fähigkeiten²¹. Diese

intrazelluläre Domäne ist bei allen drei Proteinen zu 48 % identisch. LRIG1 besitzt im zytoplasmatischen Teil eine *casitas blineage* Lymphom (Cbl-)Bindungsdomäne zur Rekrutierung von c-Cbl Proteinen²¹.

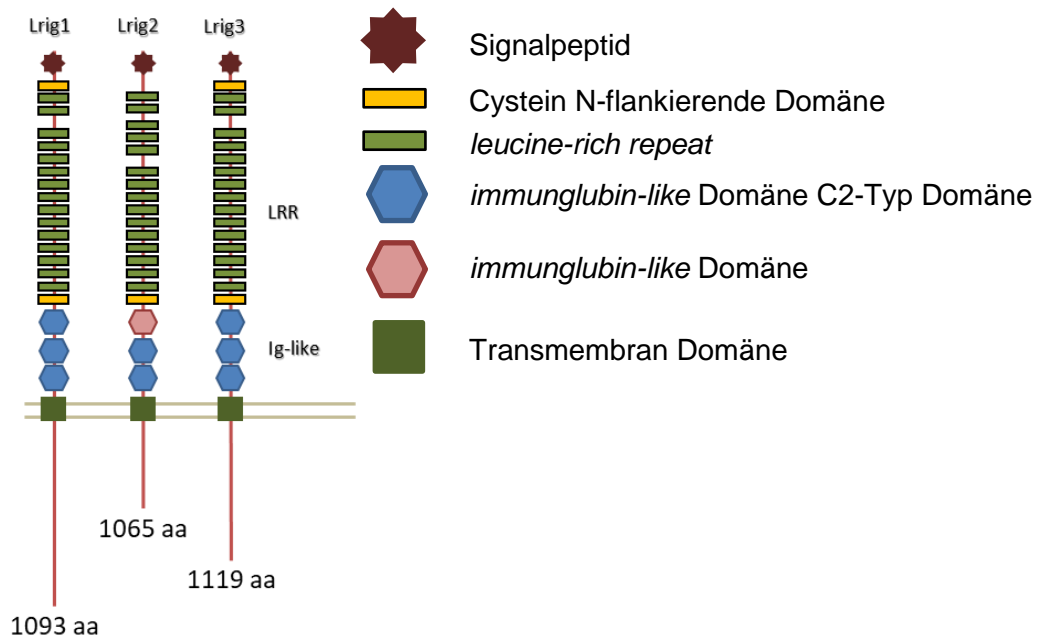


Abb. 1: Struktureller Aufbau von LRIG1, LRIG2 und LRIG3 mit Domänenbeschreibung.

1.2. Funktion

Die LRIG-Proteine sind Regulatoren verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen. Während das LRIG1-Protein^{4,22,23} ein negativer Regulator ist, agiert das LRIG2-Protein als positiver Regulator⁵. LRIG3 kann sowohl als positiver als auch als negativer Regulator^{6,24} der Rezeptor-Tyrosinkinasen auftreten (Abb. 2). Zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören unter anderem der *epidermal growth factor receptor* (EGFR/ERBB)^{4-6,22,23}, der onkogene EGFR (EGFRvIII)²⁵, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (MET)²⁶, das Ret Protoonkogen (RET)²⁷ und der *platelet-derived growth factor receptor- α* , (PDGFRA)¹¹. LRIG2 interagiert mit diesen Rezeptoren und verstärkt deren Ubiquitinierung und damit ihren Abbau^{22,23,25}. Die ERBB-Rezeptoren stellen eine Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen dar. Neben dem EGF-Rezeptor gehören noch ERBB2, ERBB3 und ERBB4 zur ERBB-Familie^{28,92,30}. LRIG1 und LRIG3 wirken entgegengesetzt auf die ERBB-Rezeptoren, wodurch eine funktionelle Konkurrenz entstehen könnte. LRIG3 bewirkt eine Begrenzung des LRIG1-vermittelten Abbaus der ERBB-Rezeptoren in der Zellmembran³¹.

LRIG1 fungiert als Marker von humanen, interfollikulären Stammzellen³², Darmkrypten „*Label retention cells*“³³ oder hepatozellulären Karzinomen³⁴. Ein Verlust von LRIG1 löst eine Hyperproliferation in den Stammzellen aus³². Im Darm wurde eine starke Expression von LRIG1 nachgewiesen, wobei LRIG1 als negativer Regulator der ERBB-Rezeptoren die Stammzellhomöostase steuert³⁵. LRIG1 wurde als Darmstammzellmarker mit tumorsuppressiven Eigenschaften identifiziert³⁶ und bestätigte hiermit die Vermutung, dass das LRIG1-Protein im Darm als Tumorsuppressor agiert^{6,8}. Ebenfalls wirkt LRIG1 in Schilddrüsentumoren als Tumorsuppressor, wo es onkogene RET Mutanten (RET2A und RET2B) negativ reguliert³⁷. LRIG1 ist auch ein negativer Regulator der ERBB-Rezeptoren in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs³⁸. LRIG1 reguliert den EGF-Rezeptor negativ, der daraufhin das Wachstum, die Migration und Invasion von Tumorzellen in der Harnblase hemmen kann³⁹. LRIG1 ist aufgrund seiner tumorsuppressiven Fähigkeiten ein wichtiges Zielprotein für die Tumorthherapie. Eine erhöhte Konzentration von LRIG1 und LRIG3 in Adenokarzinomen verbessert die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten⁴⁰. Dies lässt vermuten, dass LRIG3 ähnliche Tumorsuppressorfähigkeiten wie LRIG1 besitzt. In Glioblastomzellen wurde LRIG3 als Tumorsuppressor bestätigt⁶. In *Xenopus laevis* verbessert LRIG3 den Wnt-Signalweg und hemmt zugleich den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Signalweg⁴¹. Bisher ist nur wenig über die Funktion von LRIG2 bekannt. Allerdings wurde LRIG2 als Tumorsuppressor in Endometrium-Adenokarzinomen identifiziert. Seine stimulierende Regulierung der Phosphoinositid-3-Kinase-medierten (PI3K) / Proteinkinase-B (AKT) und EGFR verlieh LRIG2 eine antitumoröse Aktivität⁵. LRIG2 wirkt in Glioblastomzellen als Onkoprotein, es aktiviert die Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFRB⁸ und EGFR⁹ und beeinflusst die vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor α (VEGFA) Expression⁴². Eine weitere Funktion des LRIG2-Proteins ist, dass es die *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) vermittelte Rezeptor-Proteolyse in Neuronen negativ reguliert, indem es an Neogenin bindet. Wird LRIG2 ausgeschaltet, bewirkt dies eine Verbesserung bei der Regeneration des Sehnervs⁴³. LRIG2 wurde im Zusammenhang mit Schnabeldeformationen bei Hühnern gefunden und scheint hier eine Schlüsselfunktion bei dieser Erkrankung zu spielen⁴⁴. Die Entdeckung, dass 21 % der Patienten mit Urofacialen Syndrom eine Mutation des *LRIG2*-Gens aufweisen, zeigt, dass LRIG2 auch bei dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielt⁴⁵. Die LRIG-Proteine können je nach Gewebe- und Zellart entweder nukleär^{40,46}, perinukleär⁴⁷, zytoplasmatisch^{40,48} oder an der Zelloberfläche²³ lokalisiert sein.

Für jedes der drei Proteine wurden bereits Knockout-Mäuse erstellt. Bei ubiquitären LRIG1-KO Mäusen entstanden psoriasiforme Läsionen und epidermale Hyperplasien an Schwanz- und Gesichtspartien. Bei diesen Mäusen kam es zu einer Hyperproliferation der Keratinozyten durch eine verstärkte Aktivierung des EGF-Rezeptors, der durch LRIG1 negativ reguliert wird⁴⁹. Die LRIG2-KO Mäuse hingegen wiesen keine Hautveränderungen auf. Sie zeigten ein niedrigeres Körpergewicht zwischen der ersten bis zwölften Lebenswoche und eine erhöhte Mortalität bis zur achten Lebenswoche¹¹. LRIG3-KO Mäuse wiesen wiederum eine frühe Fusion bei der Kanalentwicklung im Innenohr auf, wodurch sich der Kanal verkürzt⁵⁰. Eine weitere Studie zeigte, dass die Mäuse kleiner waren und eine Herzmuskelhypertrophie mit Hypertension ausbildeten⁵¹. An LRIG1/LRIG2-Doppel-KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass LRIG1 zur Detektion von Schall und LRIG2 zur neuronalen Reaktion wichtig sind, weshalb die Mäuse einen schweren Hördefekt aufwiesen⁵². LRIG1/LRIG3-Doppel-KO Mäuse wiesen einen kleineren posterioren Kanal auf und eine bestehende Verbindung von Utriculus und Sacculus. Die Mortalität bei diesen Tieren war erhöht und sie starben bereits interuterin oder bei der Geburt⁵².

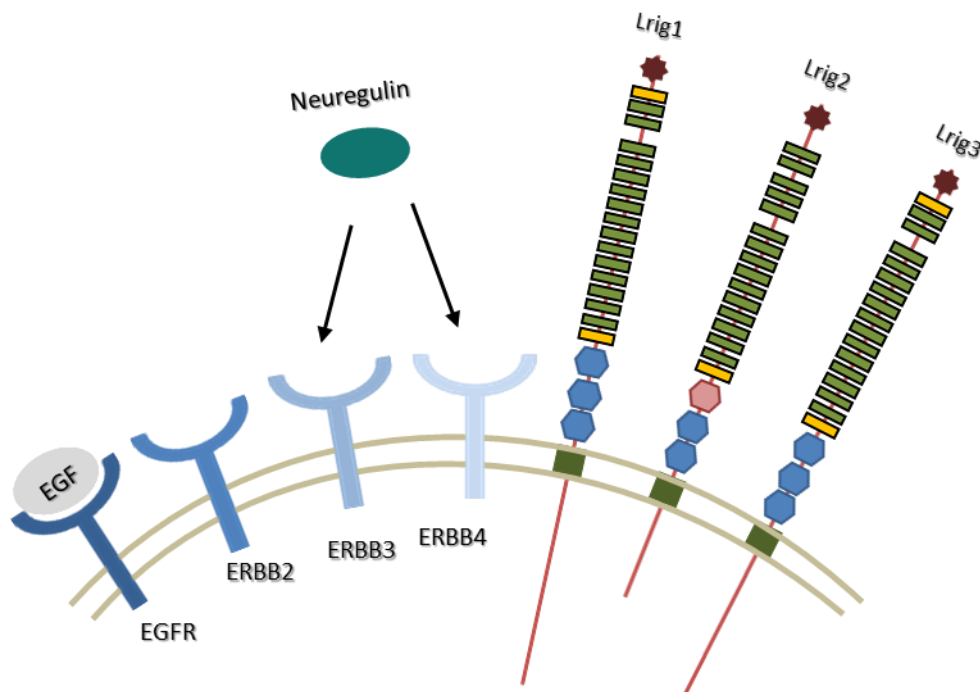


Abb. 2: Darstellung der ERBB-Rezeptoren und der LRIG1-3 Proteine.

1.3. LRIG2-KO Mäuse

2013 wurden LRIG2-KO Mäuse erstmalig beschrieben. Trotz eines anfangs einheitlichen Geburtsgewichtes war das Körpergewicht der LRIG2-KO Mäuse bereits nach fünf Tagen signifikant reduziert. Der Gewichtsunterschied relativierte sich allerdings bei diesen Tieren im Alter von zwölf bis 15 Wochen wieder. In den ersten acht Lebenswochen wiesen die LRIG2-KO Mäuse eine erhöhte Sterblichkeitsrate auf¹¹. Beim Menschen steht LRIG2 im Verdacht die Mortalität bei Oligodendrogliomen zu erhöhen⁴⁸, dies wurde nun in diesem Mausmodell untersucht. Die Kontrollmäuse entwickelten zu 100 % Oligodendrogliome und LRIG2-KO-Mäuse lediglich zu 77 %. Dieser Befund konstatiert *LRIG2* als Onkogen für das PDGF-induzierte Gliom¹¹.

2. Ösophagus

Der Ösophagus stellt als röhrenförmiges Organ die Passage zwischen Rachen und Magen dar. Am oberen und unteren Ende befindet sich ein Sphinkter. Der obere Sphinkter schützt vor Nahrungs- und Flüssigkeitsrückfluss sowie Lufteintritt in den Verdauungstrakt⁵³. Der untere Sphinkter verhindert den Rückfluss von Mageninhalt in den Ösophagus und öffnet den Mageneingang durch Relaxation über inhibitorische Innervation⁵⁴. Die Ösophaguswand ist aus mehrschichtigem Plattenepithel, Lamina muscularis mucosae, Tela submucosa, Tunica muscularis mit Stratum circulare und Stratum longitudinale und Tunica adventitia aufgebaut⁵⁵. Der Ösophagus setzt sich aus Hals-, Brust- und Bauchteil zusammen, mit einer im Halsteil quergestreiften und im Bauchteil glatten Muskulatur¹². Die quergestreifte Muskulatur wird vom unteren Motoneuron und die glatte Muskulatur von Neuronen des Nervus vagus innerviert⁵⁶. Zwischen den Muskelschichten befinden sich der Meissner- und Auerbach-Plexus, die mit dem zentralen Nervensystem verbunden sind¹². Erkrankungen des Ösophagus äußern sich durch Dysphagie, welche durch obstruktive Läsionen oder motorische Störungen hervorgerufen werden⁵⁷.

In der Literatur ist bisher kein Zusammenhang von LRIG2 mit der Erkrankung Megaösophagus bekannt. Ein Megaösophagus ist eine Erweiterung des Ösophagus durch Parese oder Paralyse der Muskulatur. Es kann das gesamte Organ oder nur Teile von der Paralyse betroffen sein¹². Die Erkrankung lässt sich in angeboren oder erworben unterteilen⁵⁸. Bei der kongenitalen Form sind meist juvenile Menschen bzw. Tiere betroffen, wobei der erworbene Megaösophagus durch Erkrankungen verursacht wird⁵⁹. Es existiert eine idiopathische Form, die

zusätzlich häufig eine Verlängerung des Ösophagus zeigt. Diese ist unbekannter Herkunft und nicht durch Medikamente zu heilen⁶⁰.

Im Jahre 1674 beschrieb Sir Thomas einen Patienten mit Ösophagusveränderungen gleich denen eines Megaösophagus als eine Achalasie⁶¹. Achalasie, zuerst als Kardiospasmus (Mikulicz, 1882) bezeichnet, beschreibt eine Hemmung der inhibitorischen Innervation des unteren Ösophagussphinkters und Verlust der Peristaltik des Ösophagus. Der Muskel kann sich nicht entspannen, wodurch die Nahrung nicht in den Magen gelangen kann⁶². Degenerative Veränderungen wurden auch im Schluckzentrum des Hirnstamms gefunden⁶³. Die Erkrankung lässt sich in eine primäre Form, bei der die Ursache unbekannt ist und eine sekundäre Form, die durch maligne Erkrankungen (Kardiokarzinome, paraneoplastisches Syndrom) verursacht wird, unterteilen⁶³. Ein Ratten-Modell, in dem 90 % der Tiere einen Megaösophagus aufweisen, wurde bereits entwickelt⁶⁴.

3. Harnblase

Die Harnblase speichert als Hohlorgan Urin und kann sich vollständig entleeren¹². Dafür muss die Kontraktion des glatten Detrusor Muskels den vorherrschenden Druckwiderstand überbrücken⁶⁵. Im Gegensatz zur Füllphase der Harnblase, in der der Detrusor Muskel relaxiert und der Urethra-Sphinkter kontrahiert ist. Ein Wechsel der Zustände tritt in der Entleerungsphase ein⁶⁶. Die Kontinenz und das Urinieren werden im Gehirn, Rückenmark und in peripheren Ganglien gesteuert. Die Verbindung stellen direkte und indirekte Nervenbahnen her⁶⁷⁻⁶⁹. Der Detrusor Muskel wird über die parasympathischen Fasern der Nervi pelvini erregt¹². Die Harnblasenwand ist aus Übergangsepithel, Lamina propria, Tela submucosa, Tunica muscularis mit dreischichtigem Detrusor Muskel und Tunica adventitia aufgebaut^{65,70}.

In der Literatur wurde eine biallelische Mutation im *LRIG2*-Gen beim Urofazialen Syndrom des Menschen beschrieben. Bei dieser Erkrankung kommt es in der Harnblase zu einer Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie mit Folge einer Inkontinenz⁴⁵.

4. Fettgewebe

Ein erhöhter Körperfettanteil wird meist durch genetische Disposition oder ungesunde Ernährung und Mangel an körperlicher Bewegung verursacht. Seltener können auch endokrine Erkrankungen oder Medikamente die Ursache darstellen⁷¹. Adipositas verursacht Gesundheitsschäden bei Menschen. 2003 wurden 35 % aller koronarer Herzerkrankungen mit Todesfolge der Erkrankung Adipositas zugeschrieben⁷². Eine 2017 durchgeführte Studie an Kindern und Jugendlichen von drei bis 17 Jahren zeigte, dass 15,4 % der Kinder in Deutschland an Übergewicht leiden⁷³. Der normale Körperfettanteil eines Menschen umfasst acht bis 28 % des Körpergewichts. Frauen haben einen höheren Körperfettanteil gegenüber Männern⁷⁴. Unter Adipositas leidende Menschen können bis zu 60 % ihres Körpergewichts an Fett einlagern^{75,76}.

In der Literatur ist bisher über das Vorkommen und die Funktion von LRIG2 im Fettgewebe nichts bekannt. Fettgewebe ist ein spezialisiertes retikuläres Bindegewebe und entwickelt sich aus embryonalen Mesenchymzellen¹². Retikulumzellen lagern Lipidtröpfchen ein und werden somit zu nicht teilungsfähigen Fettzellen⁵⁵. Die Adipogenese verläuft in drei Phasen. In der frühen Phase wird die Lipideinlagerung durch den Präadipozytenfaktor-1 (Pref-1) unterdrückt und in der intermediären Phase durch die Transkriptionsfaktoren *CCAAT/Enhancer-Binding-Proteine* (C/EBP) α , β und γ aktiviert. Die späte Phase wird durch die Expression der Differenzierungsmarker Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren γ (PPARG), Adipocyte Protein 2 (AP2) und Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) gekennzeichnet⁷⁷. Fettgewebe besteht nur zu 50 % aus Adipozyten⁷⁸. Daneben werden vaskuläre und nervale Anteile, Präadipozyten, Mastzellen, Fibroblasten, Makrophagen und mesenchymale Zellen dem Fettgewebe zugeordnet⁷⁹. Da sich das Gewebe ständig im Auf- (Lipogenese) und Abbau (Lipolyse) befindet, wird es gut vaskularisiert⁵⁵. Die Durchblutung erfolgt über Gefäße regionaler oder partieller Nervenleitbündel⁸⁰. Die nervale Versorgung im weißen Fettgewebe ist im Gegensatz zum braunen Fettgewebe schwächer^{81,82}. Bei Adulten ist kaum noch braunes Fettgewebe vorhanden, da nur das weiße Fett als Speicherfett und Strukturfett, sowie subkutanes Fett als Kälteschutz benötigt wird¹².

4.1. Weißes Fettgewebe

Univakuoläres Fettgewebe, als weißes Fettgewebe benannt, dient zur Einlagerung von Lipiden, die sich zu großen Fettvakuolen vereinen und das gesamte Zytoplasma der Fettzelle ausfüllen können⁵⁵. Es wird erst in der Fetalperiode und postnatal gebildet, wobei die Zellzahl nach diesem Stadium erhalten bleibt¹². Insulin und Prostaglandin E1 hemmen die Fettsäurefreisetzung und fördern somit die Speicherung. Noradrenalin, Adrenalin, Adrenocorticotropin (ACTH), Thyreotropin (TSH), Somatotropin (STH) und Glukagon fördern die Mobilisierung und somit die Fettsäurefreisetzung. Die Fettgewebiszunahme verläuft hauptsächlich über Fettzellvergrößerung⁵⁵. Es kommt zu einer Hypertrophie der Adipozyten bis das maximale Volumen erreicht ist, gefolgt von einer Hyperplasie des Fettgewebes^{83,84}. An diesem Mechanismus sind hauptsächlich parakrine und teilweise zirkulierende Faktoren beteiligt. Zu diesen gehören: Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1, transformierender Wachstumsfaktor- β , Tumornekrosefaktor- α , Makrophagenkolonie-Stimulationsfaktor, Angiotensin-2, Taxin-Lysophosphatidsäure, Leptin, Resistin⁸⁵.

Weißes Fettgewebe wurde 1994 durch die Entdeckung, Isolierung und Charakterisierung von Leptin als ein endokrines Organ beschrieben¹³. Bereits bekannt war die Produktion von Sexualhormonen und des Adipokins Adiposin im Fettgewebe. Es wurden weitere, exprimierte und sezernierte Adipokine, darunter auch Zytokine mit lokaler (autokriner/parakriner) und systemischer (endokriner) Wirkung gefunden^{86,87}. Adipokine des weißen Fettgewebes, mit endokriner Wirkung, sind an der Kontrolle des Glukose- und Fettstoffwechsels, der Blutkoagulation, des Blutdrucks und der Steroidhormonmodulation beteiligt^{86,87}. Die Energiespeicherung- und Freisetzung wird neben afferenten Signalen über Rezeptoren, die auf Signale von Hormonen und des Zentralnervensystems reagieren, reguliert. Diese Eigenschaften des Fettgewebes ermöglichen eine Beteiligung am Energiestoffwechsel der neuroendokrinen Funktion und der Immunfunktion⁸⁶.

4.2. Braunes Fettgewebe

Pluri- oder multivakuoläres Fettgewebe wird aus strangförmig angeordneten Retikulumzellen gebildet und ihr Zytoplasma weist einen hohen Gehalt von Mitochondrien, Glukagon und Fettvakuolen auf⁵⁵. Es wird als braunes Fettgewebe bezeichnet und entsteht frühembryonal. Das braune Fett wird peri- und postnatal zur Energiebereitstellung und Wärmeproduktion benötigt und

macht fünf Prozent des Fettgewebes in neugeborenen Säugetieren aus¹². Braunes Fettgewebe erhält seine Funktion von dem in den Mitochondrien exprimierten Thermogenin 1 (UCP1)⁸⁸⁻⁹¹. Die Thermogenese in braune Adipozyten kann durch Noradrenalin Freisetzung aus sympathischen Fasern bei Kälteeinwirkung aktiviert werden⁹¹. Eine Signalkaskade erhöht die Transkription von thermogenen Genen (z.B. UCP1) in den braunen Adipozyten⁹². Bei längerer Kälteeinwirkung differenzieren sich vermehrt braune Vorläuferzellen in braunes Fettgewebe⁹³. Dies ist bei UCP1-KO Mäusen nicht möglich. Ihnen fehlt das funktionelle braune Fett, dennoch können die Mäuse in Kälte überleben⁹⁴. Eine erhöhte Umgebungstemperatur kann eine Umwandlung von braunen Adipozyten zu weißähnlichen, univakuolären Zellen bewirken. Dies wurde bei adipösen Menschen mit einer Dysfunktion und einem Entzündungszustand des weißen Fettgewebes in Verbindung gebracht. Die Umwandlung von braunen zu weißlich-braunen Adipozyten ist durch verschiedene Faktoren bedingt. Zu diesen gehören neben einer erhöhten Umgebungstemperatur auch Leptinrezeptormangel, Makrophagen bedingter β -adrenerge Signalmangel und Lipasenmangel, brauner Adipozytentot und *crown-like* Struktur (CLS) Formation⁹⁵.

4.3. Beiges Fettgewebe

Neben weißem und braunem Fett wird in der Literatur auch beiges Fett beschrieben^{96,97}. Es wird vermutet, dass es an der Regulation des Körpergewichts beteiligt ist⁹⁸⁻¹⁰⁰. Beiges Fettgewebe ähnelt in seiner Funktion dem braunen Fettgewebe und minimiert Stoffwechselerkrankungen und Fettleibigkeit in Mäusen⁹⁶. Unterschiede zum braunen Fett sind, dass sie nicht vom gleichen embryonalen Vorläufern abstammen, sie unterschiedliche Merkmale haben und unterschiedlich reguliert werden, sie unterschiedliche Gensignaturen exprimieren und beiges Fettgewebe thermogene Gene nur durch Agonisten der β -adrenergen Rezeptoren oder PPAR γ exprimiert und somit diese für ihre Entwicklung benötigt^{101,102}. Gemeinsamkeiten sind, dass braunes und beiges Fett zur Wärmeproduktion Glukose und Fette verbrennen. UCP1 erzeugt einen Protonengradienten in der Elektronentransportkette. Das Membranpotential der Mitochondrien wird gesenkt, wodurch die Substratoxidationsrate steigt und Wärme gebildet wird⁹¹. Beige Adipozyten entstehen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen im inguinalen und abdominalen Bereich¹⁰³. Es wird diskutiert, ob im inguinalen Fettgewebe aus reifen Adipozyten UCP1 + Zellen entstehen¹⁰⁴ oder „maskierte“ beige Adipozyten nach

Kälteeinwirkung bestehen bleiben und morphologisch den weißen Adipozyten ähneln¹⁰⁵. Dennoch scheint hauptsächlich eine durch Kälte oder β -adrenerge Agonisten induzierte beige Zellbildung aus beigen Vorläuferzellen abzulaufen¹⁰⁶.

Das braune und beige Fettgewebe steht im Verdacht, auch endokrine Funktionen zu besitzen. Diese Hypothese wird durch die Sekretion von Irisin und *Meteorin like, glial cell differentiation* Regulator (METRNL), sowie durch Absonderung und Induktion des knochenmorphogenetischen Proteins 8b (BMP8b) und FGF21 bei Kälteeinwirkung bestärkt^{107,108}. Außerdem wurde die Sekretion von Neuregulin 4 (NRG4), welches die Lipogenese in der Leber hemmt, entdeckt¹⁰⁹.

II. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. Tiere

1.1. Allgemeine Haltungsbedingungen

Sämtliche genetisch manipulierten Mäuse wurden in einer spezifiziert pathogenfreien Tierhaltung des Genzentrums mit Barriere untergebracht. Die Umgebungstemperatur lag bei 23 bis 24 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug 45 %. Ein 12 Std. Tag- / Nachtrhythmus wurde vorgegeben. Je nach Gruppengröße und Alter wurden die Tiere in Käfigen des Typ 2 long, Typ 3 niedrig / erhöht und Typ 4 mit Einstreu (LASbedding PG1, LASvendi, Soest, Deutschland) gehalten. Als Enrichment wurden den Tieren rote Plastikhäuser, Holzhöhlen und Räder angeboten. Den Mäusen stand *ad libitum* Wasser und das Haltungsfutter (extrudiertes Ratte/Maus-Haltungsfutter V1536-003, Ssniff, Soest, Deutschland), beziehungsweise für Zuchttiere das Zuchtfutter (extrudiertes Zuchtfutter V1126-003, Ssniff, Soest, Deutschland) zur Verfügung. Nach einem Monat wurden die Jungtiere von ihrer Mutter abgesetzt, nach ihrem Geschlecht getrennt und erhielten eine Ohrmarkierung zur Identifizierung. Ausgeschlossen waren Mäuse, bei denen bereits der Genotyp vor der 5. Lebenswoche bekannt sein musste. Bei diesen Tieren wurde die Kennzeichnung mittels Tätowierung an den Pfoten bereits in der 1. Lebenswoche durchgeführt. Zur Genotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie gewonnen. Die Tierhaltung erfolgte unter Beachtung der aktuellen Gesetzgebung auf Grundlage des Deutschen Tierschutzgesetzes, des Grundgesetzes und des Gentechnikgesetzes. Die Regierung von Oberbayern genehmigte den Tierversuchsantrag (55.2-1-54-2532-602-2012) zur Generierung der LRIG2-KO Mäuse. Alle weiteren Versuche an den Knockout-Mäusen wurden durch den Tierversuchsantrag (55.2-1-54-2532-24-2017) geregelt.

1.2. LRIG2-KO Mäuse

Die Stammzellen (IST12891G8) zur Generierung der LRIG2-KO Mäuse, wurden vom Texas A&M Institute for Genomic Medicine erworben. Diese enthalten eine Neomycin-Stopp-Kassette im Intron1 des *Lrig2*-Gens. Sie wurden im Genzentrum kultiviert und in C57BL/6N Blastozysten von Mäusen injiziert. Im Anschluss erfolgte die intrauterine Implantation der modifizierten Blastozysten in Leihmütter.

2. Material

2.1. Geräte

Accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Axiovert 135 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Benchtop 96 tube working rack	Stratagene, La Jolla, USA
Cryostat Microm HM-500 M	Microm, Heidelberg
Cryostorage System 2K	tac-lab, Taunusstein
DMIL inverses Phasenkontrastmikroskop	Leica, Wetzlar
Eismaschine	ZIGRA, Isernhagen
Fotoscanner Perfection V550 Photo	EPSON, Meerbusch
FreeStyle Precision Neo	Abbott, Wiesbaden
Grant SUB14 Wasserbad	Grant, Beaver PA, USA
Graphite Electroblotter I	Millipore, Billerica, USA
Heizbarer Kleintier-OP-Tisch	MEDAX, Neumünster
Histomaster Digital	Formafix, Düsseldorf
HM 315 Mikrotom	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Homogenisator ART	Micra Labortechnik, Müllheim
Hybridisierungsöfen	H. Sauer, Reutlingen
Inkubator	Heraeus Instruments, Hanau
Isoflurane Anesthesia Vaporizer	Datex-Ohmeda, Duisburg

Laborkühlschrank:

-86 °C Ultra-low Upright Cryo Freezer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
HFU B Serie -86 °C-Ultratiefkühlschränke	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Luftpolsterpipette	Gilson Products, Middleton, USA
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA process equipment, Staufen
Magnetrührer Color Squid	IKA process equipment, Staufen
Mikrowelle	Siemens, München
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio Rad, München
Mobiler Bunsenbrenner Fireboy plus	INTEGRA Biosciences, Biebertal
MS1 Minishaker	IKA process equipment, Staufen
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
OPTIMAX-Entwicklungsmaschine	MS Laborgeräte, Wiesloch
PowerPac 300 Electrophoresis	Bio Rad, München
PowerPac™ HC Power Supply	Bio Rad, München

PCR Geräte:

StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Biometra Uno Thermoblock	Biometra, Göttingen
Biometra TProfessional	Biometra, Göttingen
Biometra TRIO	Biometra, Göttingen
Gel iX Imager	Intas, Göttingen
Schüttler CH-4103	Infors, Bottmingen, Schweiz
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Sunrise microplate reader	Tecan, Männedorf, Schweiz

Sektionsbesteck:

Stumpfe Pinzette Aesculap, Tuttlingen

Bulldog Pinzette Aesculap, Tuttlingen

Feine Schere Aesculap, Tuttlingen

Durotip chirurgische Schere Aesculap, Tuttlingen

Temperaturmessgerät Testo, Lenzkirch

Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System Bio Rad, München

Ultraschallbad Sonorex super R4102H Bandelin, Berlin

Wasserbad:

Paraffin-Streckbad GFL, Burgwedel

Wasserbad für Bakteriologie GFL, Burgwedel

Waagen:

Analysenwaage Practum Sartorius, Göttingen

BP 4100 Waage Sartorius, Göttingen

Chyo Analysenwaage JL- 200 Sartorius, Göttingen

Balanza Chyo MJ 3000 Sartorius, Göttingen

Analysewaage Kern 770 KERN & SOHN, Balingen-Frommern

Präzisionswaage Kern 440-47N KERN & SOHN, Balingen-Frommern

Wärmebildkamera mobileIR E4 InfraTec GmbH, Dresden

Zentrifugen:

Centrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Biofuge fresco	Heraeus instrument, München
Table centrifuge with cooling (5417R)	Eppendorf, Hamburg
Universal 320 / 320R	Hettich, Tuttlingen
Microcentrifuge	VWR, Wien, Österreich
Zählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Operetta High-Content Imaging System	PerkinElmer, Krakau, Polen

2.2. Verbrauchsmaterialien

Alvito pH-Teststreifen	Macherey-Nagel, Düren
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Blutröhrchen	KABE, Numbrecht-Elsenroth
Centrifuge Tubes	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
CURIX Cassette	Agfa Healthcare, Düsseldorf
Deckgläschen	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Germering
Drucklaborflasche	Kavalier, Křížová, Tschechische Republik
Einbettkassetten	R. Laborbrinck, Edermünde
Einweg-Mikrotom-Klingen	Feather, OSAKA, Japan
Erlenmeyer Kolben	Kavalier, Křížová, Tschechische Republik
Estra Spritzen	Codan, Lensahn
Extra thick blot paper	Bio Rad, München

Extrudierte Haltungsfutter V1536-003	Ssniff, Soest, Deutschland
Extrudiertes Zuchtfutter V1126-003	Ssniff, Soest, Deutschland
Falcon™ Cell Strainers	Thermo Fischer scientific, Waltham, USA
Falcon 96, 48, 24, 16 Multiwell Platten	Corning, New York, USA
Fettfutterdiät für Ratten u. Mäuse D12492	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
FreeStyle Precision Teststreifen	Abbott, Wiesbaden

Handschuhe:

Nitril Handschuhe	Semperit, Wien, Österreich
Sempercare premium	Semperit, Wien, Österreich
Nitril Handschuhe	Ansell, Iselin, USA
Histokitt Nr.41025010	Hecht-Assistent, Sondheim v.d. Rhön
Immobilon-P Membran	Merck, Darmstadt
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen
Kanülen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
LASbedding PG1	LASvendi, Soest, Deutschland
Messzylinder	Brand, Wertheim
Micro haematocrit capillary	Brand, Wertheim
Multihuard™ Tips	Life Science Products, Colorado, USA
Objektträger Star Frost	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Germering
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Germering
Parafilm® M	Bemis, Oshkosh, USA

Plasmaröhrchen	KABE, Numbrecht-Elsenroth
Pipettenspitzen	LABsolute, Renningen
Quali-PCR-Tubes 0,2 ml	Kisker Biotech, Steinfurt
Rotilabo [®] -Faltenfilter, Typ 600P	Roth, Karlsruhe
SLGP033RS Millex-GP, 0,22 µm Filter	Merck, Darmstadt
Tigerino Canada Klumpstreu	Matina GmbH, München
Tissue-Tec Cryomold	Sakura, Staufen
Zuchtfutterpulver V1126-003	Ssniff, Soest, Deutschland

2.3. Chemikalien

30 % Acrylamide	Bio Rad, München
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Alpha-D(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
0,9 % NaCl Lösung	B. Braun, Melsungen
Bicinchoninic Acid solution	Sigma, Deisenhofen
Bromophenol Blue	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Complete [™] , Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Copper (II) sulfate solution	Sigma, Deisenhofen
Diethylether	Honeywell, USA
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Eosin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe

Hydrochloric acid 25 %	VWR Chemicals, Ismaning
KCL	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyde	Sigma, Deisenhofen
PhosSTOP EASYpack	Roche, Basel, Schweiz
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Temed	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
TWEEN	Sigma, Deisenhofen
Xylol	VWR Chemicals, Ismaning

2.4. Enzyme

DNase I	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
RNase	Roche, Basel, Schweiz
RNase Inhibitor	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

2.5. Reagenzien

AdipoRed™ Assay Reagent	Lonza, Basel, Schweiz
Anti-mouse IgG	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-rabbit IgG	Cell Signaling, Frankfurt
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Rehydration Solution	Promega, Mannheim
Dulbecco's modified eagle's medium	Sigma, Deisenhofen
Fetales Bovines Serum	Merck, Darmstadt
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
25 mM MgCl ₂	Qiagen, Hilden
Nuklein Lysis Solution	Promega, Mannheim
10x PCR Buffer	Qiagen, Hilden
Penicillin/Streptomycin	Merck, Darmstadt
Protein Precipitation Solution	Promega, Mannheim
 <u>Primer:</u>	
LRIG2 KO sense	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
LRIG2 KO antisense	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
V76 antisense	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
GAPDH forward	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
GAPDH reverse	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Random Hexamer Primer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
mLRIG2 s qPCR	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
mLRIG2 as qPCR	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
5x Q-Solution	Qiagen, Hilden
Tissue-Tec O.C.T. TM Compound	Sakura, Staufen
Western Blotting Detektionsreagenz	GE Healthcare, Freiburg

2.6. Medikamente

Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer AG, Leverkusen
Isoba (Isofluran)	Essex Tierarzneimittel, München
Ketamin 10 % 100 mg/ml Injektionslösung	bela-pharm, Vechta
Metacam 1,5 mg/ml	Böhringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Overgest® 300 I.E./ml	MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim
Rivanol® Salbe 2 mg/g	Dermapharm AG, Grünwald
PREGMAGON 200 IE/ml	IDT Biologika, Dessau-Roßlau
Proxylaz 20 mg/ml Injektionslösung	bela-pharm, Vechta

2.7. Software

EPSON Scan	SEIKO Epson corporation, Suwa, Japan
Graph Pad Prism 5.04	GradPad Software Inc., San Diego, USA

ImageJ	Oracle Corporation, Redwood City, USA
IRBIS® 3 Analyse Software	InfraTec GmbH, Dresden
LAS V4.5	Leica, Wetzlar
Microsoft Office	2010 Microsoft, Redmond, USA
Visiopharm integrator system	Visiopharm, Hoersholm, Denmark

3. Methoden

3.1. DNA Extraktion aus tierischem Gewebe mittels Wizard Kit

Die bei -80 °C konservierten murinen Schwanzbiopsien wurden aufgetaut und jeweils mit 620 µl Mastermix verdaut. Die Inkubation bei 56 °C erfolgte über Nacht.

Mastermix:

EDTA 0,5 M pH 8	20 µl
Nuclein Lysis Lösung	500 µl
Proteinase K (20 mg/ml)	17,5 µl

Am nächsten Morgen wurde die Ribonukleinsäure (RNA) mit 3 µl Ribonuklease (RNase) (4 mg/ml) zersetzt, die Proben 25-mal zum Mischen geschwenkt und für 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. auf Raumtemperatur (RT) heruntergekühlt.

Im nächsten Schritt folgte die Proteinfällung mittels Zugabe von 200 µl Protein Precipitation Lösung. Die Proben wurden 20 Sek. gevortext und 5 Min. auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sie für 5 Min. bei 4 °C und 130000 – 16000 x g zentrifugiert, um ein Proteinpellet zu erhalten. Der Überstand mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde in neue Probengefäße überführt, in welche 600 µl 100 % Isopropanollösung vorgelegt wurden. Die DNA wurde durch Vortexen ausgefällt und durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 16000 x g entstand ein DNA-Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA Pellet verblieb im Probengefäß.

Die DNA wurde mit 600 µl 70 % Ethanol (EtOH) durch 5-maliges Schwenken gewaschen und erneut für 2 Min. zentrifugiert. Nach Abschütten des ethanolhaltigen Überstandes lag die reine DNA vor. Diese wurde 20 Min. getrocknet und für 1 Std. mit 50 µl DNA-Rehydrationslösung bei 65 °C resuspendiert. Abhängig vom Probenvolumen erfolgte eine Verdünnung der gelösten DNA, um die optimale Konzentration für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu erhalten. Die genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

3.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA wurde bei 94 °C zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige DNA denaturiert. Anschließend erfolgte das Annealing durch die Bindung der Primer bei 55 °C bis 65 °C an die Einzelstränge. Im dritten Schritt, der Elongation, lagerte sich die DNA-Polymerase bei 72 °C an die DNA an und ein neuer komplementärer Strang aus Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) wurde aufgebaut. Über einen Zyklus mit 36 Schleifen wurde die Zielsequenz vermehrt.

3.2.1. PCR Protokoll

Taq DNA-Polymerase Kit:

10x Puffer	TRIS-HCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ , pH 8,7
Q-Solution	5x konzentriert
MgCl ₂	25 mM
dNTP (1 mM)	100 mM wässrige Lösung von dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Taq	5 U/μl, rekombinante 94 kDa DNA-Polymerase

Weitere Materialien:

PCR H ₂ O	autoklaviertes bidestilliertes Wasser	
Primer	LRIG2 KO sense	5`-AGC CAC CAT GTA GTT GCT GGG-3`
	LRIG2 KO antisense	5`-GGT AGG AGA TGG ATG CAA GTAG-3`
	V76 antisense	5`-CCA ATA AAC CCT CTT GCA GTT GC-3`

Ansatz des Mastermixes:

Je Probe	
10x Puffer	2 μl
dNTPs (1 mM)	2 μl
Q-Solution	4 μl
MgCl ₂	1,25 μl
Primer LRIG2 KO s	1 μl
Primer LRIG2 KO as	1 μl
Primer V76 as	1 μl
PCR-H ₂ O	7,65 μl
Taq	0,10 μl
Probe	1 μl

Temperaturzyklen:

1. Denaturierung	94 °C 5 Min.	} x36
2. Denaturierung	95 °C 1 Min.	
3. Annealing	62 °C 1 Min.	
4. Elongation	72 °C 1 Min.	
5. Elongation	72 °C 5 Min.	
6. Kühlen	4 °C unbegrenzt	

Proben und Reagenzien wurden bei 4 °C gelagert. Die Polymerase benötigte eine Lagertemperatur unter -20 °C. Für jede Probe wurden 20 µl Mastermix angesetzt. In die PCR-Reaktionsgefäße wurde jeweils 1 µl Probe vorgelegt und anschließend der Mastermix hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und in die PCR-Maschine (Biometra TProfesstional, Biometra, Göttingen) eingespannt. Hierbei durchliefen die Proben zur Vervielfältigung der gesuchten DNA-Sequenz den Temperaturzyklus 36-mal.

3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuresträngen genutzt. Die geladenen Moleküle wandern mittels Erzeugung eines elektrischen Feldes durch das porenhaltige Gel in Richtung Kathode. Je kleiner die Moleküle, desto schneller durchlaufen sie die Poren des Gels.

Materialien:

Ethidiumbromid	0,1 % Lösung in destilliertem Wasser
50x TAE Laufpuffer	242 g TRIS, 57,1 ml Eisessig, 100 ml EDTA 0,5 M pH 8,0, mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt
6x Loading Dye	30 % Glycerol, Bromphenolblau
Biozym LE Agarose	1,5 g zu 100 ml 1x TAE

Marker:

Bidestilliertes Wasser	570 µl
6x DNA Gel Loading Dye	120 µl
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	30 µl

Das Agarosegel wurde abhängig von der gesuchten Molekülgröße in unterschiedlichen Konzentrationen aus Agarose, 1x TRIS-Acetat-EDTA Puffer (TAE) und dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hergestellt. Zur Erzeugung

von Geltaschen wurde ein Kamm in das Gel eingesetzt. Nach 30 Min. war das Gel ausgehärtet, die Kammer wurde mit 1x TAE Laufpuffer befüllt und der Kamm entfernt. Eine Tasche wurde zur Größenbestimmung mit einem Marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) befüllt. In die restlichen Taschen wurden die Proben eingesetzt. Die Stromstärke der Kammer betrug zwischen 80 und 120 Volt, wobei die Auftrennung von der Kathode zur Anode erfolgte. Unter UV-Licht eines Imaging Systems (Royal Bio-Imaging System-Intas Gel iX Imager, Intas, Göttingen) wurden die zuvor in der PCR replizierten Sequenzen sichtbar und konnten ausgewertet werden.

3.4. Die Genexpression auf RNA Ebene

3.4.1. RNA Extraktion aus tierischem Gewebe

Zur Isolierung der RNA wurde das bei -80 °C gefrorene Gewebe zu 1 ml Trizol in einem 5 ml Probengefäß hinzugegeben und homogenisiert, bis eine trübe Lösung entstand. Nach jeder Probe wurde der Homogenisator (Homogenisator ART, Micra Labortechnik, Müllheim) zuerst mit bidestilliertem Wasser für 30 Sek. und dann mit 0,2 M Natriumhydroxid (NaOH-)Lösung für 30 Sek. gereinigt. Das Homogenisat ruhte für 5 Min. bei 4 °C und wurde dann in ein neues Probengefäß überführt. Zur Phasentrennung wurde 200 µl Chloroform hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Probe für 15 Sek. gevortext und für 15 Min. bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues, 1,5 ml Probengefäß überführt sowie mit 500 µl Isopropanol und 50 µl 3 M Natriumacetat invertiert. Bei einer Ruhephase von 10 Min. bei RT wurde die RNA gefällt und im Anschluss für 10 Min. bei 4 °C und 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA wurde mit 900 µl 75 % EtOH gewaschen, gevortext und für 5 Min. bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurde die RNA für 10 Min. getrocknet und in 50 µl bidestilliertem Wasser für 10 Min. bei 55 °C resuspendiert. Die RNA-Konzentration ließ sich mit Hilfe eines Spectrophotometers (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmen und die RNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.2. cDNA-Synthese aus tierischem Gewebe

Im ersten Schritt wurde 0,1 µg – 5 µg RNA mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser auf 8,5 µl verdünnt und mittels DNase I für 30 Min. bei 37 °C verdaut.

DNase I Verdaumix:

RNA	8,5 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
DNase I	1 µl

Auf Eis wurde 1 µl 50 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugegeben und das Enzym DNase I für 10 Min. bei 65 °C inaktiviert. Erneut auf Eis wurde 1 µl Primer (Random Hexamer Primer, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) hinzugefügt und für 5 Min. bei 65 °C inkubiert.

Transkriptionsmix:

dNTPs (10 mM)	2 µl
5x Reaktionspuffer	4 µl
Ribolock RNase Inhibitor	0,5 µl
Revert Aid Reverse Transkriptase	1 µl

Zur Transkription der vorverdauten RNA wurden 7,5 µl Transkriptionsmix hinzugefügt und für 10 Min. bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Temperatur für 1 Std. auf 42 °C erhöht. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurde die Probe für 10 Min. auf 70 °C erhitzt. Eine PCR zur Detektion der *Gapdh*-Sequenz wurde unter Abschnitt 3.2.1. durchgeführt, mit einer Annealing Temperatur von 58 °C. Diese überprüfte, ob in den Proben genügend und gleichmäßig konzentrierte, komplementäre DNA (cDNA) vorhanden war. Die synthetisierte cDNA ließ sich bei -20 °C lagern.

Primer:

GAPDH forward	5'-TCATCAACGGGAAGCCCATCAC-3'
GAPDH reverse	5'-AGACTCCACGACATACTCAGCACCG-3'

3.4.3. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR vereint zwei Methoden: die Reverse Transkription mit der PCR. Die Reverse Transkriptase schreibt die RNA in cDNA um, wodurch es möglich ist diese in der PCR zu amplifizieren. Mit der in DNA umgeschriebenen RNA wurde dann eine PCR, wie unter Abschnitt 3.2.1. beschrieben, durchgeführt.

Primer:

mLRIG2 s qPCR	5'-TTC ACC CCT GCC TGA CTT AT-3'
mLRIG2 as qPCR	5'-CAC CCT CTA ATG GGC AAG AG-3'

3.4.4. Quantitative Echtzeit-PCR

Diese Methode ist eine quantitative Bestimmung der *messenger RNA* (mRNA) mittels einer Fluoreszenzmessung in der quantitativen Phase. Eine Real-Time PCR-Maschine (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) bestimmte den *threshold cycle* (CT-)Wert zu Beginn der quantitativen Phase. Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Unterschied zur Hintergrundfluoreszenz sichtbar. Die Konzentration von *Lrig2* wurde anhand einer Standardreihe mit dem Plasmid pTRE-tight, welches die murine *Lrig2*-Sequenz enthält, berechnet. In die Funktion wurde der CT-Wert der Probe eingesetzt, um die Konzentration der mRNA zu berechnen.

Plasmid Verdünnungsreihe:

Verdünnung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Plasmid (mg/μl)	10	5	2,5	0,1	0,1 ²	0,1 ³	0,1 ⁴	0,1 ⁵	0,1 ⁶	0,1 ⁷	0,1 ⁸

Ansatz des Mastermixes:

Komponenten	Konzentration	Volumen
Reaktionspuffer	10x	2 μl
MgCl ₂	25 mM	1 μl
dNTPs	1 mM	2,5 μl
Primer	10 μM	1 μl
Primer	10 μM	1 μl
Q-Solution		1 μl
PCR H ₂ O		1 μl
SYBR Green	1/2000	1 μl
Hot Star Taq		1 μl
Probe		1 μl

3.5. Analysen zur LRIG2-KO Maus

3.5.1. Methoden zur Blutentnahme und Sektion

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluraninhalationsnarkose narkotisiert. Die Blutentnahme erfolgte mit einer Kapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillare, Brand, Wertheim) retro-orbital und die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Organe wurden entnommen, dabei Hohlorgane entleert und mit einem Zellstoff abgetupft. Die Organengewichte wurden mit einer Feinwaage (Analysewaage Kern 770, KERN & SOHN, Balingen-Frommer) gewogen und Organteilstücke wurden auf Trockeneis für DNA-, RNA- oder Proteinanalysen

kältefixiert und in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 24 Std. fixiert und anschließend in 70 % EtOH überführt.

Das Blut wurde direkt in EDTA Blutröhrchen (KABE, Numbrecht-Elsenroth) zur hämatologischen Untersuchung oder in Lithium-Heparin Plasmaröhrchen (KABE, Numbrecht-Elsenroth) gewonnen. Die Blutröhrchen wurden kurz geschwenkt, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Die Vollblutparameter wurden am Tag der Blutabnahme gemessen, damit ein natürlicher Zustand des Blutes erhalten bleibt. Die Plasmaröhrchen wurden 2-mal für 10 Min. bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände (reines Plasma) wurden in neue Probengefäße überführt, welche bei -80 °C gelagert wurden.

3.5.2. Messung von klinischen Blutparametern

Ein großes Blutbild und Blutplasmamaparameter wurden im Helmholtz Zentrum am Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie Hackerstraße 27, 85764 Oberschleißheim unter der Leitung von Frau Dr. med. vet. Brigit Rathkolb durchgeführt.

3.5.3. Histologische Analysen

Das in 4 % PFA fixierte Gewebe wurde in Histokassetten gesichert und im Autotechnikon (Histomaster Digital, Formafix, Düsseldorf) über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, anschließend in Xylol überführt und in Paraffin fixiert.

4 % PFA:

PFA	40 g
1x PBS	800 ml
5 M NaOH	250 µl

In einer Glasflasche wurden die Chemikalien eingewogen und im Anschluss in einem Wasserbad auf 50 °C erwärmt, wodurch nach 30 Min. eine klare Lösung entstand. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (HCl) auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde mit 1x PBS auf 1000 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Fixierungsstufen:

Destilliertes Wasser	30 Min.
70 % EtOH	90 Min.
70 % EtOH	90 Min.
96 % EtOH	90 Min.
96 % EtOH	90 Min.
100 % EtOH	60 Min.
100 % EtOH	60 Min.
Xylol	30 Min.
Xylol	30 Min.
Xylol	90 Min.
Paraffin	120 Min.
Paraffin	180 Min.

Nach Entnahme aus den Histokassetten wurden die Proben in heißes Paraffin eingebettet. Die Gewebelöcke wurden mit einem Mikrotom (HM 315 Mikrotom, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) in 3 µm dünne Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und diese über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die an den Objektträgern haftenden Scheiben ließen sich mittels Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung färben und anschließend beurteilen.

3.5.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zwei Farbstoffe färbten das Gewebe ein, sodass Veränderungen in der Gewebestruktur sichtbar wurden. Zum einen wurde Hämatoxylin genutzt, das saure (basophile) Strukturen (z.B. Zellkerne) blau färbt, zum anderen Eosin, welches basische (acidophilen) Strukturen (z.B. Mitochondrien, Kollagene) rot färbt.

Färbeprotokoll:

Entparaffinieren	2x Xylol	je 10 Min.
	Absteigende Alkoholreihe: 2x 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % EtOH	je 10 Sek.
Färben	Hämatoxylin	10 Min.
Wässern	salzhaltiges Wasser	5 Min.
Blockieren	0,5 % HCl-Alkohol-Gebrauchslösung	2-5 Sek.
Wässern	salzhaltiges Wasser	5 Min.
Färben	Eosin	1 Min.
Spülen	destilliertes Wasser	
Dehydrieren	Aufsteigende Alkoholreihe: 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2x 100 % EtOH	je 10 Sek.
	2x Xylol	5 Min.

Die fertigen Präparate wurden mit Mikroskopier-Einschlussmittel (Histokitt Nr.4102501, Hecht-Assistent, Sondheim v. d. Rhön) gedeckelt und mikroskopisch untersucht.

3.5.3.2. Quantitativ-stereologische Analysen

Die absoluten Volumina (V) von Ösophagus und Harnblase wurden aus dem Gewicht der Organe und ihrem spezifischen Gewicht ermittelt. Die spezifischen Organgewichte wurden mit der Submersionsmethode (Scherle 1970, Blutke und Wanke 2018-JoVE) bestimmt. Hierzu wurden die Organe nach Entnahme aus dem Tierkörper auf einem Zellstoff vorsichtig etwa 3 Sek. lang trockengetupft und auf einer Feinwaage (Analysewaage Kern 770, KERN & SOHN, Balingen-Frommer) auf 1/100 g genau gewogen. Anschließend wurde jeweils von einem Teilstück des Ösophagus und der Harnblase das Gewicht bestimmt. Dieses Stück wurde an einem Haken befestigt und in ein Gefäß mit Wasser auf einer Präzisionswaage (Präzisionswaage Kern 440-47N, KERN & SOHN, Balingen-Frommern) eingetaucht. Das verdrängte Wasservolumen ergab eine Gewichtszunahme auf der Waage. Das spezifische Gewicht wurde aus dem Gewicht des Teilstücks und des Gewebevolumens bestimmt. Aus 3 ermittelten Werten wurde ein Mittelwert gebildet und ergab ein spezifisches Gewicht des Ösophagus von $1,105 \text{ g/cm}^3$ und der Harnblase von $1,137 \text{ g/cm}^3$.

Die Organe wurden anschließend in äquidistante, planparallele Scheiben mit einer Dicke von etwa 5 mm geteilt, für 24 Std. in 4 % PFA fixiert und nach Abschnitt 3.5.3. in Paraffin eingebettet, wobei die Orientierung der einzelnen Gewebescheiben bezüglich ihrer Anschnittseiten beibehalten wurden. Das Gewebe wurde in $3 \mu\text{m}$ Scheiben geschnitten und nach dem Abschnitt 3.5.3.1. die HE-Färbung durchgeführt

An diesen Schnitten wurden die Volumendichten (V_v) der verschiedenen Wandschichten von Ösophagus (mehrschichtiges Plattenepithel, Lamina muscularis mucosae, Tela submucosa, Tunica muscularis mit Stratum circulare und Stratum longitudinale und Tunica adventitia) und Harnblase (Übergangsepithel, Lamina propria, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica adventitia) nach dem Prinzip von Delesse geschätzt. Pro Organ und Tier wurden hierzu 3 bis 4 Anschnitte des Ösophagus und der Harnblase untersucht. Unter Verwendung eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung und eines Okulares mit 10-facher Vergrößerung wurden pro Tier 3 bis 5 Gesichtsfelder (Ösophagus bzw. Harnblase) systematisch-zufällig ausgewählt. In diesen

Gesichtsfeldern wurden die Flächenanteile der verschiedenen Strukturen (Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muskularis) sowie der gesamten Gewebeanschnitte durch das Punktzählverfahren (Sterio, 1984; Howard und Reed, 2004/5) bestimmt. Hierzu wurde ein Punktraster über den Ösophagus mit 2000 Testpunkten und der Harnblase 648 Testpunkten verwendet. Pro Gesichtsfeld wurden 314 bis 463 Treffpunkten des Ösophagus und 409 bis 421 Treffpunkten der Harnblase ausgewertet. Die Punktzahl wurde aus dem Nomogramm bei Weidel (Weidel, 1979) entnommen, um einen Schätzwert bei gegebenem Vv mit einem akzeptablen wahrscheinlichen Schätzfehler zu erhalten.

3.5.3.3. Bestimmung der Adipozytenanschnittsfläche im abdominalen Fettgewebe

Die nach Abschnitt 3.5.3. fixierten, in Paraffinblöcken eingebetteten und in 3 µm Scheiben geschnitten abdominalen Fettdepots wurden nach Abschnitt 3.5.3.1. HE-gefärbt. Pro Tier wurden 3 bis 4 Anschnitte des abdominalen Fettgewebes untersucht. Unter einer 200-fachen Vergrößerung wurden pro Tier 10 Gesichtsfelder systematisch-zufällig ausgewählt. In diesen wurden die Fettzellanschnittflächen und die Zellzahl mittels Software (LASV4.5, Leica, Basel, Schweiz) ausgemessen.

3.5.4. Proteinanalysen

3.5.4.1. Proteinisolation aus Mäusegewebe

Das bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde in bereits mit 400 bis 600 µl Proteinisolationspuffer befüllte 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben. Kleinere und schwer lösliche Gewebeproben (z.B. Fettgewebe, Ösophagus und Harnblase) wurden nur in 300 µl Proteinisolationspuffer gelöst. Nach jeder Probe wurde das Rührwerk des Homogenisators (Homogenisator ART, Micra Labortechnik, Müllheim) für 30 Sek. mit bidestilliertem Wasser, dann 30 Sek. mit 1x PBS gereinigt und kurz mit Proteinisolationspuffer benetzt. Das zuvor auf Eis in den Rundröhrchen aufgetaute Gewebe wurde bei 23500 rpm für jeweils 1 Min. homogenisiert. Die Proben wurden in Probengefäße überführt und für 5 Min. bei 95 °C erhitzt. Im Anschluss wurden sie auf Eis für 5 Min. abgekühlt und für weitere 5 Min. bei 4 °C, 17949 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein

neues Probengefäß überführt und das Pellet wurde verworfen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

5x Laemmli-Puffer:

1 M TRIS pH 6,8	65,5 ml
Glycerin	100 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2,0 ml
SDS	20 g
Bromphenolblau	0,2 g
Bidestilliertes Wasser	auffüllen auf 200 ml

Der Puffer wurde bei -20 °C gelagert.

Proteinisolationpuffer (Proteinextraktionspuffer nach Laemmli):

1 M TRIS pH 7,5	5 ml
Triton X-100	5 ml
5x Laemmli	50 ml
Bidestilliertes Wasser	190 ml

Dieser wurde bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung jeweils 1 Tablette Phosphatase- (PhosSTOP EASYpack, Roche, Basel, Schweiz) und Protease-Inhibitoren (Complete™, Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Schweiz) hinzugegeben.

3.5.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinmessung erfolgte mit einem ELISA Reader (Sunrise microplate reader, Tecan, Männedorf Schweiz) mittels Bicinchoninsäure-Messung (BCA). Eine Standardreihe mit bekannten Konzentrationen wurde mit bovinen Serumalbumin (BSA) (4 mg/ml) im Isolationpuffer angesetzt. Zur Messung wurden 40 µl 1x PBS in Probengefäße vorgegeben und 10 µl Probe oder Standard, sowie 200 µl Kupfersulfat (CuSO₄-) BCA-Lösung hinzugegeben. Die Probe und der Standard wurden gevortext und 110 µl wurden im Doppelansatz auf die 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte inkubierte für 30 Min. bei 37 °C im Wärmeschrank und im Anschluss wurde die Absorption bei 560 nm photometrisch gemessen. Eine Standardkurve wurde erstellt und die Proteinkonzentrationen ermittelt.

CuSO₄-BCA-Lösung je Probe:

CuSO ₄	4 µl
BCA	196 µl

3.5.4.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Moleküle lassen sich in einer SDS-PAGE nach ihren unterschiedlichen Molekülgrößen auftrennen. Zu 20 µg Probe wurden 5 % 2-Mercapthoethanol gegeben. Die Proben werden für 5 Min. bei 95 °C denaturiert, 10 Sek. bei 4 °C und 20817 x g zentrifugiert und auf Eis gelagert.

Mit einem Gelelektrophorese System (Mini-Protein® Tetra Cell System, Bio Rad, München) ließen sich Gele in verschiedenen Konzentrationen (8 %, 10 %, 15 %) herstellen. Je kleiner die Proteingröße, desto höherprozentig sollte das Gel sein, um eine gute Auftrennung zu bewirken. Das Trenngel wurde zwischen die eingespannte Glasvorrichtung gegossen und mit bidestilliertem Wasser überschichtet. Nach 45 Min. war das Gel vollständig polymerisiert und das bidestillierte Wasser konnte abgegossen werden.

Trenngel Puffer:

1,5 M TRIS	182,1 g
0,4 % SDS	4 g
HCl	pH 8,8 einstellen
Bidestilliertes Wasser	800 ml

Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) wurde in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf pH 8,8 eingestellt. Im Anschluss wurde SDS dazugeben, mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und durch einen Filter (Rotilabo®-Faltenfilter, Typ 600P, Roth, Karlsruhe) gefiltert.

Trenngel:

4 Mini Gele	8 %	10 %	15 %
Bidestilliertes Wasser	14,5 ml	12,5 ml	7,5 ml
Trenngel Lösung	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
30 % Acrylamide	8 ml	10 ml	15 ml
10 % Ammonium Persulfate	300 µl	300 µl	300 µl
Temed	20 µl	20 µl	20 µl

Zum Auftragen der Proben wurde ein Sammelgel erstellt. Dieses wurde im System auf das Trenngel aufgetragen und ein Kamm mit 10 bzw. 15 Taschen, je nach Probenanzahl, eingesetzt. Nach 30 Min. war das zweischichtige Gel vollständig polymerisiert und wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit SDS-PAGE Laufpuffer befüllt und der Kamm entfernt.

Sammelgel Puffer:

0,5 M TRIS	60,7 g
0,4 % SDS	4 g
HCl	pH 6,8 einstellen
Bidestilliertes Wasser	800 ml

Das abgewogene TRIS wurde in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf pH 6,8 eingestellt. SDS wurde hinzugegeben und mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde durch einen Filter (Rotilabo[®]-Faltenfilter, Typ 600P Roth, Karlsruhe) gefiltert.

Sammelgel:

Sammelgele	4x
Bidestilliertes Wasser	12,2 ml
Sammelgellösung	5,2 ml
30 % Acrylamide	2,6 ml
10 % Ammonium Persulfate	200 µl
Temed	20 µl

10x SDS-PAGE Laufpuffer:

TRIS	30,3 g
Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g
Bidestilliertes Wasser	auffüllen auf 1000 ml

Die Taschen des Gels wurden mit einem Standardmarker mit Bromphenolblau (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) und den Proben beladen. Ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 100 Volt wurde erzeugt, bis die Proben und der Marker das Sammelgel durchwandert hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 140 Volt erhöht, um die Auftrennung der Proteine zu beschleunigen.

3.5.4.4. Proteintransfer

Die Proteine wurden aus dem Gel auf eine Membran (Immobilon-P Membran, Merck, Darmstadt) geblottet. Zuvor wurde die Membran in Methanol für 15 Min. aktiviert und in Transferpuffer überführt. Membran und Filterpapiere (Filterpapierxy, Bio Rad, München) wurden an die Größe des Gels angepasst. In die Kammer des Blotters wurde ein mit Transferpuffer benetztes Filterpapier auf

die Anodenplatte gelegt. Darauf wurden die Membran, das Gel sowie ein erneut benetztes Filterpapier gestapelt. Die Kammer wurde mit einem Katodendeckel, der auf dem oberen Filterpapier auflag, geschlossen. Nach Einsatz in ein Transfersystem (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio Rad, München) wurde für 45 Min. eine Spannung von 25 Volt bei einer Stromstärke von 1,0 A erzeugt. Entlang des Stromflusses wanderten die Proteine aus dem Gel auf die Membran.

10x SDS-PAGE Transferpuffer:

TRIS	29,10 g
Glycin	14,60 g
SDS	1,85 g
Bidestilliertes Wasser	auffüllen auf 500 ml

Der Transferpuffer musste immer frisch aus 80 % 1x Transferpuffer und 20 % Methanol hergestellt werden.

Ob der Transfer erfolgreich war, ließ sich mittels Ponceau S-Färbung überprüfen. Die Membran wurde 10 Min. in der Ponceau S-Lösung geschwenkt und unter destilliertem Wasser gewaschen, bis rot angefärbte Proteinbanden sichtbar wurden. Die Membran wurde luftgetrocknet und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Ponceau S-Lösung:

Ponceau S	1 g
Bidestilliertes Wasser	400 ml
Eisessig	15 ml

Zur Herstellung einer Ponceau S-Färbung wurde 1 g Ponceau S-Pulver in 400 ml bidestilliertem Wasser gegeben. Im Anschluss wurden 15 ml Eisessig hinzu pipettiert und mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml Lösung aufgefüllt.

3.5.4.5. Detektion von Antigenen

Die getrocknete Membran wurde 1 Min. in Methanol aktiviert und 3-mal für 5 Min. in *Tris-buffered saline-Tween* (TBS-T) gewaschen. Danach wurde sie mit 5 % Milchlösung für 1 Std. bei RT geblockt und erneut 3-mal für 5 Min. in TBS-T gewaschen. Über Nacht inkubierte die Membran bei 4 °C in der Erstantikörper-Lösung. Am Folgetag wurde sie 3-mal für 5 Min. in TBS-T gewaschen und für 1 Std. bei RT in der Zweitantikörper-Lösung (2 µl in 5 ml 5 % Milch (1:2500)) inkubiert. Im Anschluss wurde sie 3-mal für 5 Min. gewaschen.

Die Membran wurde für 1 Min. im Detektionsreagenz (Western Blotting Detektionsreagenz, GE Healthcare, Freiburg) inkubiert, in Plastikfolie eingepackt und in eine Entwicklungskassette (CURIX Cassette, Agfa Healthcare, Düsseldorf) gelegt. In dieser ließ sich ein Hyperfilm (Amersham Hyperfilm EC, GE Healthcare, Freiburg) einlegen und belichten. Nach der Entwicklung wurden die Proteinbanden, an denen die Antikörper gebunden hatten, auf dem Film sichtbar.

10x TBS Puffer:

TRIS	30 g
NaCl	80 g
Bidestilliertes Wasser	auffüllen auf 1000 ml

TBS-T Puffer:

1X TBS	1000 ml
0,1 % TWEEN 20	1 ml

5 % Milch:

Milchpulver	5 g
TBS-T	auffüllen auf 100 ml

Erstantikörper:

Anti Adiponectin (#2789) Wirt: Kaninchen Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA

Anti Adipophilin Wirt: Meerschweinchen PROGEN (Heidelberg)
Verdünnung 1:2000 in 3 % BSA

Anti Caspase3 (#9662) Wirt: Kaninchen Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA

Anti GAPDH (#2118) Wirt: Kaninchen Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA

Anti ErBB3 (#12708) Wirt: Kaninchen Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA

Anti p-mTOR (#5536) / mTOR (#2983) Wirt: Kaninchen Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA

Anti PCNA (#13110) Wirt: Kaninchen	Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA	
Anti PPARG (#2435) Wirt: Kaninchen	Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:1000 in 3 % BSA	
Anti p-S6 (#4858) / S6 (#2217) Wirt: Kaninchen	Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:2000/ 1:1000 in 3 % BSA	
α -Tubulin (#2125) Wirt: Kaninchen	Cell Signaling (USA)
Verdünnung: 1:1000 in 3 % BSA	
UCP1 Antibody (NBP2-20796) Wirt: Kaninchen	Bio-Techne (Wiesbaden)
Verdünnung: 1:1000 in 3 % BSA	

Zweitantikörper:

Anti Kaninchen (#7074) Wirt: Ziege	Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:2500 in 5 % Milch in TBS-T	
Anti Maus IgG (#7076) Wirt: Pferd	Cell Signaling (USA)
Verdünnung 1:2500 in 5 % Milch in TBS-T	

3.5.4.6. Densitometrische Auswertung

Mit einer Software (ImageJ, Oracle Corporation, Redwood City, USA) wurde das densitometrische Signal der Proteinbanden gemessen. Zur Beurteilung des Expressionsunterschiedes wurde die aktive Proteinform auf die Inaktive, oder das Protein auf eine Ladekontrolle bezogen. Mittels Student's *t*-Test ließ sich eine Signifikanz nachweisen.

3.5.5. Messungen der Futter- und Wasseraufnahme und des Kotabsatzes

Die Mäuse wurden in Einzelkäfigen mit Klumpstreu (Tigerino Canada Natur-Granulat Klumpstreu, Matina GmbH, München, frei von Energie, Rohfett und Rohprotein) gehalten. Wasser und Haltungsfutter (extrudiertes Ratte/Maus-Haltungsfutter V1536-003, Ssniff, Soest, Deutschland) stand ihnen *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer Woche Eingewöhnungsphase wurde über 18 Tage täglich die aufgenommene Futter- und Wassermenge bestimmt. Außerdem wurde der Kot quantitativ gesammelt, soweit möglich von Einstreu befreit, gewogen und

bei -20 °C eingefroren. Die Mäuse wurden ebenfalls täglich gewogen.

Folgende Untersuchungen (Abschnitt 3.5.6. und 4.5.7.) wurden am Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik von Prof. Dr. Ellen Kienzle in der Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim unter der Leitung von Frau Linda Böswald durchgeführt.

3.5.6. Bestimmung der Rohnährstoffe in Futter und Wasser

Das Futter wurde im Trockenschrank bei 103 °C getrocknet bis zur Gewichtskonstanz (VDLUFA 2012) und fein gemahlen. Der Kot wurde gefriergetrocknet und anschließend fein gemahlen. In allen Proben wurde nach dem Mahlen nochmals die Trockensubstanz – wie oben beschrieben - bestimmt, um durch hygroskopische Effekte während des Mahlens aufgenommene Feuchtigkeit berücksichtigen zu können. Im Futter und im Kot wurde das Rohprotein (Rp) mittels Kjeldahlscher Stickstoffbestimmung, das Rohfett (Rfe) durch Soxhlet Analyse und die Bruttoenergie (GE) mit einem Bombenkalorimeter nach VDLUFA (2012) bestimmt¹¹⁰.

3.5.7. Berechnung der scheinbaren Verdaulichkeit

Die scheinbare Verdaulichkeit (sV(%)) der bestimmten Rohnährstoffe wurde folgendermaßen berechnet:

$$sV(\%) = \frac{F - K}{F} * 100$$

F = mit dem Futter aufgenommener Nährstoff

K = mit dem Kot ausgeschiedener Nährstoff

3.5.8. Messung des pH-Werts im Kot

Der pH-Wert wurde im Kot mit pH-Teststreifen (Alviti pH-Teststreifen, Macherey-Nagel, Düren) gemessen. Eine Menge von 0,02 g Kot wurde mit 2 ml bidestilliertem Wasser homogenisiert. Die pH-Teststreifen wurden mit den Kotlösungen benetzt und anhand der Farbumschlagstabelle ausgewertet.

3.5.9. Messung der Körperoberflächentemperatur mittels Wärmebildkamera

Die Wärmebildkamera (Wärmebildkamera mobileIR E4, InfraTec GmbH, Dresden) zeigte in einem Farbschema verschiedene Temperaturgrade im Körper der Mäuse. Untersucht wurden Neugeborene, kurz nach ihrer Geburt und adulte männliche und weibliche Mäuse. Vor der Bildaufnahme musste die Kamera auf die Körpergröße der Mäuse eingestellt werden. Das Farbschema „Regenbogen“ wurde ausgewählt, die Umgebungstemperatur auf 24 °C eingestellt und die Luftfeuchtigkeit auf 45 % festgelegt. Die Entfernung zu den Mäusekörpern betrug 21 cm. Ein Wärmebild pro Tier wurde dorsoventral aufgenommen und die Software (IRBIS® 3 Analyse Software, InfraTec GmbH, Dresden) bestimmte die durchschnittliche Körperoberflächentemperatur der Mäuse.

3.5.10. Thermoregulationstest

Die Normaltemperatur der Mäuse wurde mit einer rektalen Sonde des Temperaturmessgeräts (Temperaturmessgerät, Testo, Lenzkirch) gemessen. Zur Anregung der Wärmeproduktion im Körper schwammen die Mäuse für 2 Min. in 30 °C warmen Wasser und wurden einzeln in leere Plastik Käfige gesetzt. In einem 5 Min. Rhythmus bis zu 50 Min. wurden die Körpertemperaturen der Mäuse gemessen. Zu jedem Messzeitpunkt wurden die Mäuse gewogen, um den Verlauf der Wasserretention zu erfassen.

3.5.11. Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Die Mäuse fasteten in Einzelkäfigen und auf Hungergittern für 6 Std., Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Glukose wurde in isotonische Kochsalzlösung (180 mg/ml) gelöst und den Mäusen wurde 1,5 mg/g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert (Kanüle: Microlance 3 Kanülen 0,3 x 13 mm Gelb, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Zur Blutglukosemessung wurde ein 0,5 mm dickes Hautstück an der Schwanzspitze abgeschnitten und direkt nach der Injektion, sowie nach 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Min. ein Blutstropfen gewonnen. Ein einmaliger Schnitt ist ausreichend, um über den gesamten Zeitraum Blut für das Glukosemessgerät (FreeStyle Precision Neo, Abbott, Wiesbaden) zu erhalten.

3.5.12. Futterbreistudie

Drei Würfe mit insgesamt 4 männlichen LRIG2-KO Mäusen und 15 männlichen Geschwistertieren wurden ab der Geburt *ad libitum* mit einem Futterbrei (Zuchtfutterpulver V1126-003, Ssniff, Soest, Deutschland) zugefüttert. Ebenfalls stand ihnen das Haltungsfutter (extrudiertes Haltungsfutter, V1536-003, Ssniff, Soest, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Bis zum 29. Lebenstag wurden die Jungtiere täglich gewogen und im Folgemonat einmal wöchentlich. Zur Identifikation erhielten sie bereits am Tag ihrer Geburt Tätowierungen an den Pfoten. Am 7. Lebenstag wurde zur Genotypisierung eine Schwanzbiopsie entnommen.

3.5.13. Diätetisches Adipositasmodell

Eine Gruppe von 7 LRIG2-KO Weibchen und 8 Kontrollen wurden ab der 8. Lebenswoche jeweils in Einzelkäfigen separiert und erhielten für 16 Wochen eine fettreiche Diät (HFD) (Fettfutterdiät für Ratten u. Mäuse D12492, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Diät wurde bei 4 °C gelagert und jedes Tier erhielt pro Woche 50 g. Übriggebliebenes Fettfutter wurde verworfen und durch neues Fettfutter ersetzt. Einmal wöchentlich wurden die Mäuse und das übriggeblieben Fettfutter gewogen. Ab der 11. Woche in Einzelhaltung wurde das Einstreu durch Klumpstreu (Tigerino Canada Natur-Granulat Klumpstreu, Matina GmbH, München) ersetzt. Nach einer Woche Eingewöhnung wurden die Tiere, das Fettfutter und der produzierte Kot täglich für 16 Tage gewogen. Der frische Kot wurde bei -20°C gelagert. Am Ende des diätetischen Adipositasversuchs wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt und den Mäusen unter Isoflurannarkose Blut entnommen. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Fettdepots sowie Leber, Pankreas, Klein- und Großhirn, Musculus quadriceps femoris, Dünn- und Dickdarm entnommen.

3.6. Zellkultur

3.6.1. Isolierung von Stromalen, vaskulären Gewebe (SVF)

Zur Präparation von inguinalen Fettdepots wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das inguinale Fettgewebe direkt in eine 37 °C erwärmte 5 cm große Petrischale mit *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM)/F12 + 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) + 10 % fetales bovine Serum (FBS) (10 % FBS Medium) gesammelt. Unter einer sterilen Werkbank wurden die inguinalen Fettdepots in ein 25 ml Becherglas überführt und mit einer Schere (feine Schere, Aesculap, Tuttlingen) zerkleinert, bis eine homogene Masse entstand. Pro Probe wurde 4 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Puffer mit 1 ml Kollagenase Typ I (5000 U/ml) im Becherglas angesetzt und durch einen sterilen Filter (SLGP033RS Millex-GP, 0,22 µm Filter, Merck, Darmstadt) auf das zerkleinerte Gewebe getropft. Anschließend wurden die Proben in ein 15 ml Probengefäß überführt und in einem Schüttler (Schüttler CH-4103, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) für 75 Min. bei 37 °C und 115 rpm zum Verdau gebracht. Der Verdau wurde durch einen 100 µm Filter (100 µm Falcon™ Cell Strainers, Thermo Fischer scientific, Waltham, USA) in ein 50 ml Probengefäß gefiltert und der Filter wurde anschließend mit 10 ml 10 % FBS Medium gespült. Die Proben wurden für 10 Min. bei 300 x g zentrifugiert, danach wurde der Überstand bis auf 1 ml abpipettiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 10 % FBS Medium resuspendiert und durch einen 40 µm Filter (40 µm Falcon™ Cell Strainers, Thermo Fischer scientific, Waltham, USA) in ein neues 50 ml Probengefäß gefiltert. Der Filter wurde mit 10 ml 10 % FBS Medium gespült, die Probe wurde erneut für 10 Min. bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde in 1 ml 10 % FBS Medium resuspendiert und die Zellen wurden mittels einer Zählkammer (Zählkammer nach Neubauer, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) ausgezählt. Es wurden in einer 96-Well-Platte 1×10^4 Zellen pro Well pipettiert. Das Zellgemisch mit Präadipozyten heftete sich an die Plattenoberfläche und nach 2 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM/F12 + 1 % Pen/Strep + Medium mit 5 % FBS (5 % FBS Medium).

3.6.2. Differenzierung von murinen Präadipozyten

Das 5 % FBS Medium wurde alle 2 Tage erneuert, bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten. Die Differenzierung wurde durch das Einführungsmedium eingeleitet.

Dexamethasone Stock: 100 μ l der 10 mM Stock + 900 μ l 1x PBS

10 μ l der 1 mM Stock + 990 μ l 5 % FBS Medium

IBMX Stock: 5,56 mg IBMX + 1 ml 0,5 N KOH (25 mM)

Einführungsmedium:

17 nM Insulin	58,8 μ l
0,1 μ M Dexamethasone-Stock	100 μ l
250 μ M 3-Isobutyl-1-Methyxanthine (IBMX)	100 μ l
DMEM/F12 + 5 % FBS Medium	10 ml

Nach 48 Std. wurde das Einführungsmedium durch Insulinmedium ersetzt.

Insulinmedium:

17 nM Insulin	58,82 μ l
DMEM/F12 + 10 % FBS Medium	10 ml

Nach 48 Std. wurde das Insulinmedium entfernt und durch 10 % FBS Medium ausgetauscht. Jeden Tag wurden 70 % des Mediums durch frisches 10 % FBS Medium ersetzt. Sobald die Adipozyten stark mit Lipiden befüllt waren, wurden die Platten mit DAPI (DAPI, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und Adipored (AdipoRed™ Assay Reagent Lonza, Basel, Schweiz) gefärbt. Zuerst wurde das Medium verworfen, dann wurden die Zellen 30 Sek. in 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 μ l 2 % PFA in 1x PBS für 10 Min. fixiert und das 2 % PFA wurde schrittweise durch 200 μ l 0,02 % PBS-T in 1x PBS ersetzt. Das 1x PBS wurde abgeschüttet und die Zellen wurden durch 200 μ l 0,5 % Triton X-100 in 1x PBS nach 10 Min. permeabel und im Anschluss 2- bis 4-mal in 200 μ l 1x PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit 50 μ l DAPI-Färbelösung (200mg/ml in 1x PBS) für 15 Min. gefärbt. Die Färbereste wurden 2-mal mit 1x PBS abgewaschen und die Lipide wurden mit 5 μ l Adipored-Färbelösung für 10 Min. angefärbt und erneut wurden die Zellen 2-mal mit 1x PBS gewaschen. Die Wells wurden mit 200 μ l 1x PBS befüllt und die Zellanzahl, Lipidanzahl und Lipidfläche wurde mithilfe einer Operetta (Operetta High-Content Imaging System, PerkinElmer, Krakow) gemessen.

3.7. Statistik

Die Statistik wurde mit der Software (Graph Pad Prism 5.04 Software, GradPad Software, Inc. San Diego, USA) berechnet. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt und mittels Student's *t*-Test berechnet. Eine Signifikanz wird mit einem *P*-Wert von $P < 0,05$ angegeben. *P*-Werte wurden wie folgt dargestellt: *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ und #: $P < 0,1$, ##: $P < 0,01$.

III. ERGEBNISSE

1. Charakterisierung der LRIG2-KO Maus

1.1. Generierung einer LRIG2-KO Maus

Die LRIG2-KO Mauslinie wurde am Genzentrum durch Stammzellinjektion in Blastozysten generiert. Die vom *Texas A&M Institute for Genomic Medicine* erworbenen Knockout-Stammzellen (IST12891G8) mit dem Omnibank Vector 76 wurden dazu im Genzentrum kultiviert, in Blastozysten von C57BL/6N Inzuchtmäusen injiziert und anschließend in eine Leihmutter implantiert. Die entstandenen Chimären wurden mit C57BL/6N Inzuchtmäusen gekreuzt und die heterozygoten Mäuse untereinander verpaart, um LRIG2-KO Mäuse zu generieren. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR.

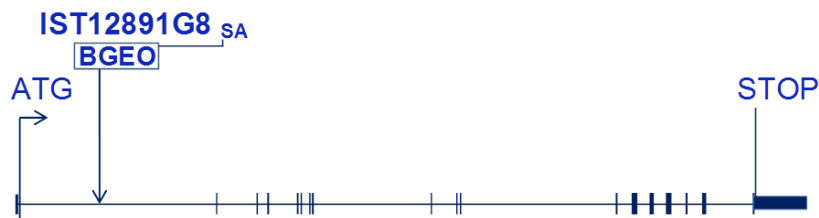


Abb. 3: Grafik des *Lrig2* Allels einer Knockout-Maus.

1.2. Genexpressionsanalysen auf mRNA Ebene

Der Verlust von *Lrig2* konnte auf mRNA Ebene mittels RT-PCR bestätigt werden. In der Knockout-Maus wurde keine *Lrig2* mRNA nachgewiesen, im Gegensatz zur Kontrollmaus, die in jedem Organ eine Expressionsbande zeigte. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) wurde in beiden Tieren exprimiert und bestätigte, dass in den Proben beider Tiere eine ausreichende Konzentration von cDNA verfügbar war.

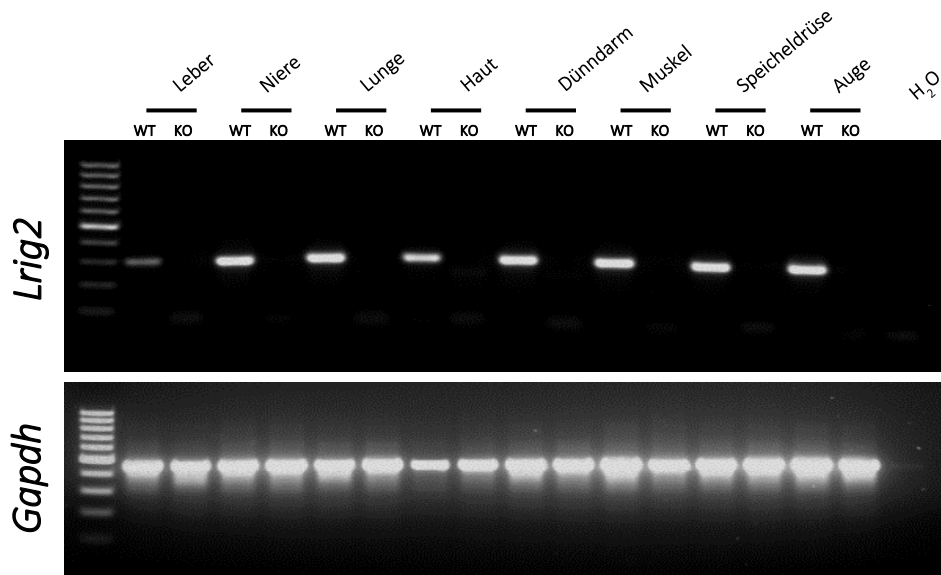


Abb. 4: In der RT-PCR war *Lrig2* nicht auf mRNA Ebene in den Knockout-Tieren nachweisbar. *Gapdh* diente als Ladekontrolle.

In einer Q-PCR wurde die Konzentration der *Lrig2* mRNA in unterschiedlichen Organen von Kontrollmäusen analysiert. Eine hohe Konzentration wurde in den Organen Ösophagus, Harnblase, Rückenmark, Gehirn und Dünndarm gemessen.

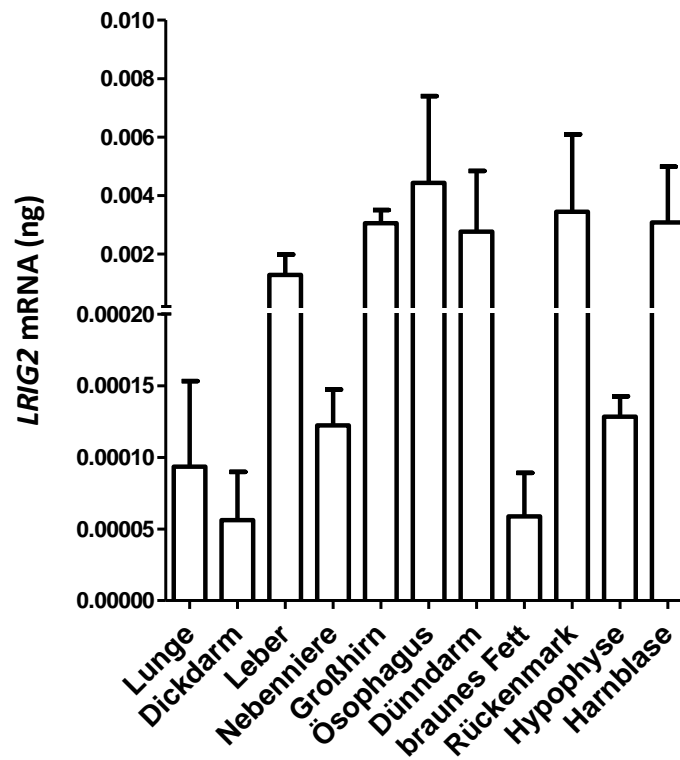


Abb. 5: Q-PCR Analyse von verschiedenen Organen.

Über einen Zeitraum von 8 Wochen wurde eine Kaplan-Meier-Kurve von weiblichen und männlichen LRIG2-KO Tieren erstellt. Die Sterblichkeitsrate der LRIG2-KO Mäuse ist um 30 % höher gegenüber den Geschwistern. 25 % der Knockouts starben innerhalb der ersten 24 Std. Häufig befand sich bereits aufgenommene Milch im Magen. Die Tiere waren vollständig entwickelt und es gab keine Auffälligkeiten gegenüber den Kontrolltieren.

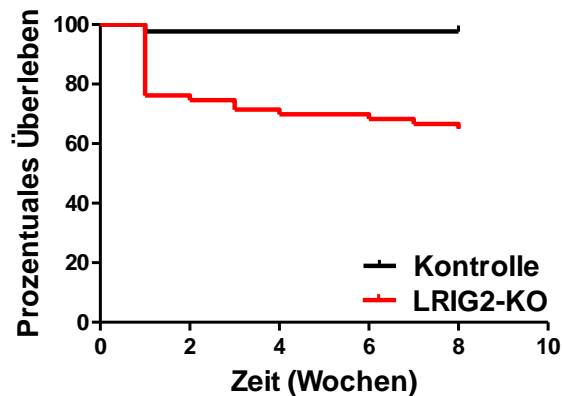
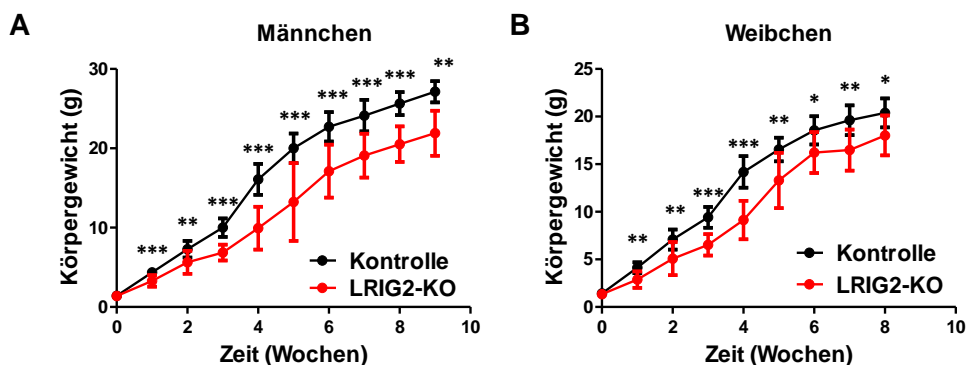


Abb. 6: Die Kaplan-Meier-Kurve vergleicht das Überleben von LRIG2-KO Mäusen mit dem ihrer Geschwister (n = 65 KOs, n = 129 Kontrollen).

1.3. Wachstumsrate

Die Tiere wurden am 1. Lebenstag und dann wöchentlich bis zur 8. Lebenswoche gewogen. Zum Zeitpunkt der Geburt wogen alle Mäuse gleich viel, doch bereits in der 1. Lebenswoche nahmen die LRIG2-KO Männchen und Weibchen weniger Körpergewicht im Verhältnis zu den Kontrollmäusen zu (Abb. 7A, B). Dieser Gewichtsunterschied von 25 % blieb über die gesamte Lebensdauer der Tiere erhalten (Abb. 7C). Die adulten Mäuse (ab 8 Wochen) nahmen kontinuierlich bis zum 5. Lebensmonat an Körpergewicht zu.



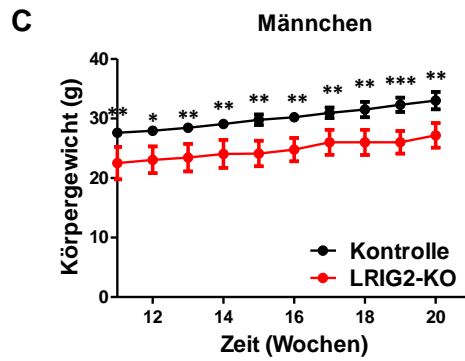


Abb. 7: Wachstumskurven der ersten 8 Lebenswochen (A) männlicher (n = 9 KOs, n = 28 Kontrollen) und (B) weiblicher LRIG2-KO Mäuse (n = 6 KOs, n = 16 Kontrollen). (C) Erweiterung der Wachstumskurve von männlichen LRIG2-KO Mäusen im adulten Zustand (n = 5). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; *: $P < 0,001$.**

1.4. Körpergröße

Die Körpergröße von juvenilen und adulten LRIG2-KO Tieren wurde über eine Messung der Kopf-Rumpf-Länge (KRL) bestimmt. Im Alter von 4 Wochen waren die Knockout-Mäuse bereits signifikant kleiner (Abb. 8A). Dieser Größenunterschied reduziert sich mit zunehmendem Alter von 10 auf 5 %, blieb jedoch signifikant (Abb. 8B).

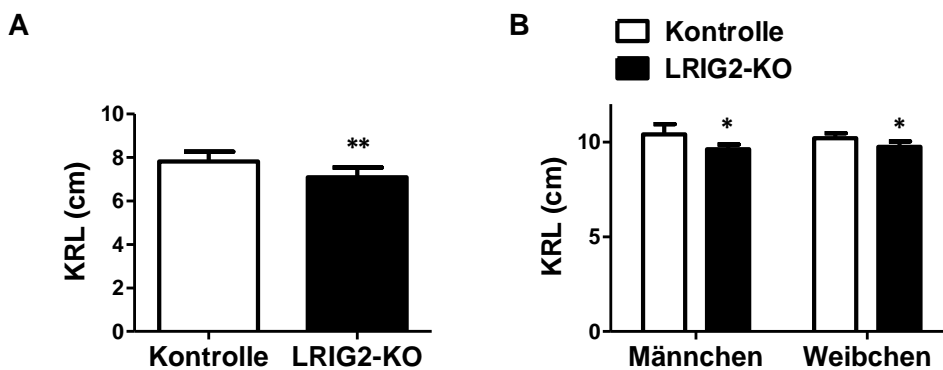


Abb. 8: Körpergröße von (A) 4 Wochen alten LRIG2-KO Weibchen (n = 8) und (B) 5 Monate alten männlichen und weiblichen LRIG2-KO Tieren (n = 4 KOs, n = 5 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

1.5. Einfluss der Körpergröße auf das Körpergewicht

Eine reduzierte Körpergröße steht nicht in Korrelation mit dem geringen Körpergewicht von 4 Wochen alten Knockout-Weibchen (Abb. 9A). Bei adulten Knockout-Mäusen nahm die Signifikanz zwischen Körpergewicht relativ zur Körpergröße im Vergleich zu den Juvenilen ab (Abb. 9B).

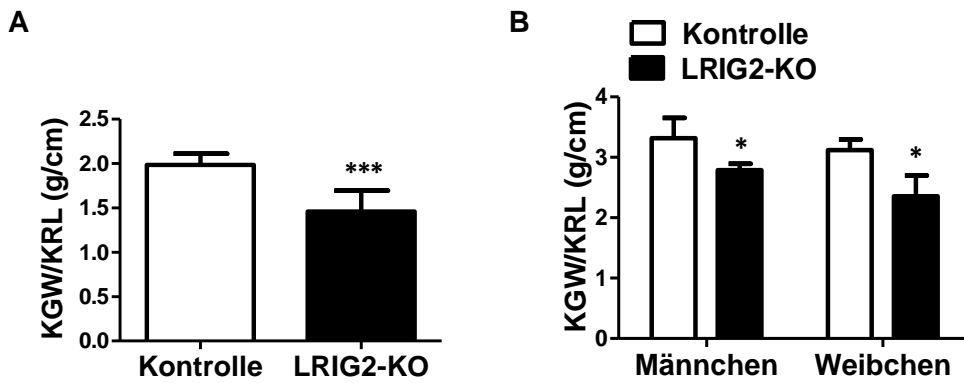
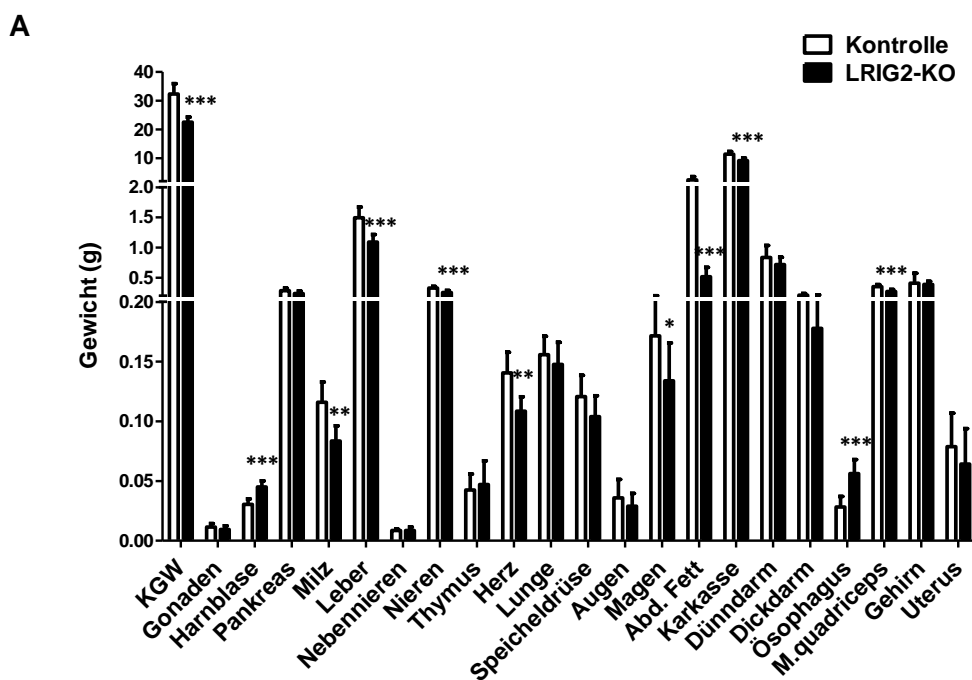


Abb. 9: KGW/KRL Graphen von (A) 4 Wochen alten weiblichen ($n = 8$), (B) 5 Monate alten adulten männlichen und 1 Jahr alten weiblichen Knockout-Mäusen verdeutlichen, dass LRIG2-KO Mäuse ein geringes Körpergewicht unabhängig von der Körpergröße gegenüber Kontrolltieren besitzen ($n = 4$ KOs, $n = 5$ Kontrollen). *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$.

1.6. Organgewichte

Milz, Leber, Niere, Herz, Magen und Musculus quadriceps waren in LRIG2-KO Mäusen gegenüber ihren Kontrollen signifikant im Gewicht reduziert (Abb. 10A), allerdings waren die Organgewichte relativ zum Körpergewicht unverändert (Abb. 10B). In LRIG2-KO Mäusen waren die Organgewichte von Ösophagus und Harnblase absolut und relativ erhöht, während das abdominale Fettgewebe als einziges Organgewicht absolut und relativ signifikant niedriger war (Abb. 10C, D). Zudem waren die Gewichte weitere Fettdepots absolut und relativ niedriger in LRIG2-KO Mäusen. Zu diesen zählten das testikuläre und subkutane Fettgewebe.



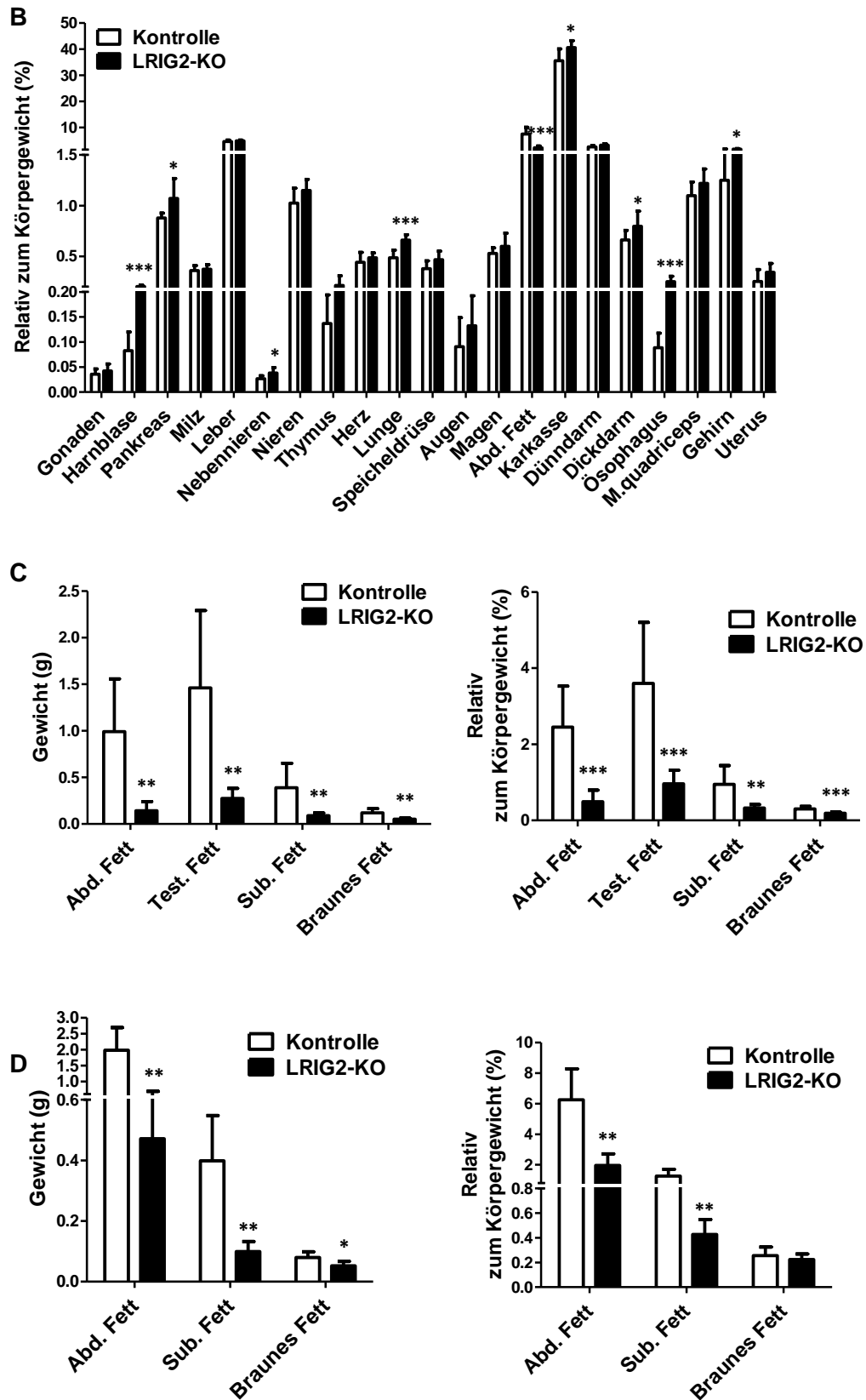


Abb. 10: Organspektrum mit (A) absoluter und (B) relativer Gewichtsbestimmung von 1 Jahr alten LRIG2-KO Weibchen (n = 8 KOs, n = 9 Kontrollen). Absolute und relative Organgewichte der Fettdepots von (C) 1 Jahr alten LRIG2-KO Männchen (n = 10 KOs, n = 9 Kontrollen) und (D) Weibchen im Alter von 9 Monaten (n = 4 KOs, n = 6 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

2. Megaösophagus

2.1. Ösophagusgewicht

In der Sektion waren eine Dilatation und Wandverdickung des Ösophagus im Brust- und Bauchteil erkennbar (Abb. 11A), wobei diese Veränderungen in LRIG2-KO Mäusen unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Kurz nach der Geburt ließ sich kein Gewichtsunterschied feststellen, auch die Dilatation und Verdickung im abdominalen Bereich waren noch nicht vorhanden (Abb. 11B). Das Ösophagusgewicht adulter LRIG2-KO Mäuse war absolut und relativ zum Körpergewicht erhöht (Abb. 11C). Bereits im Alter von 9 Wochen wurden in LRIG2-KO Mäusen Veränderungen sichtbar.

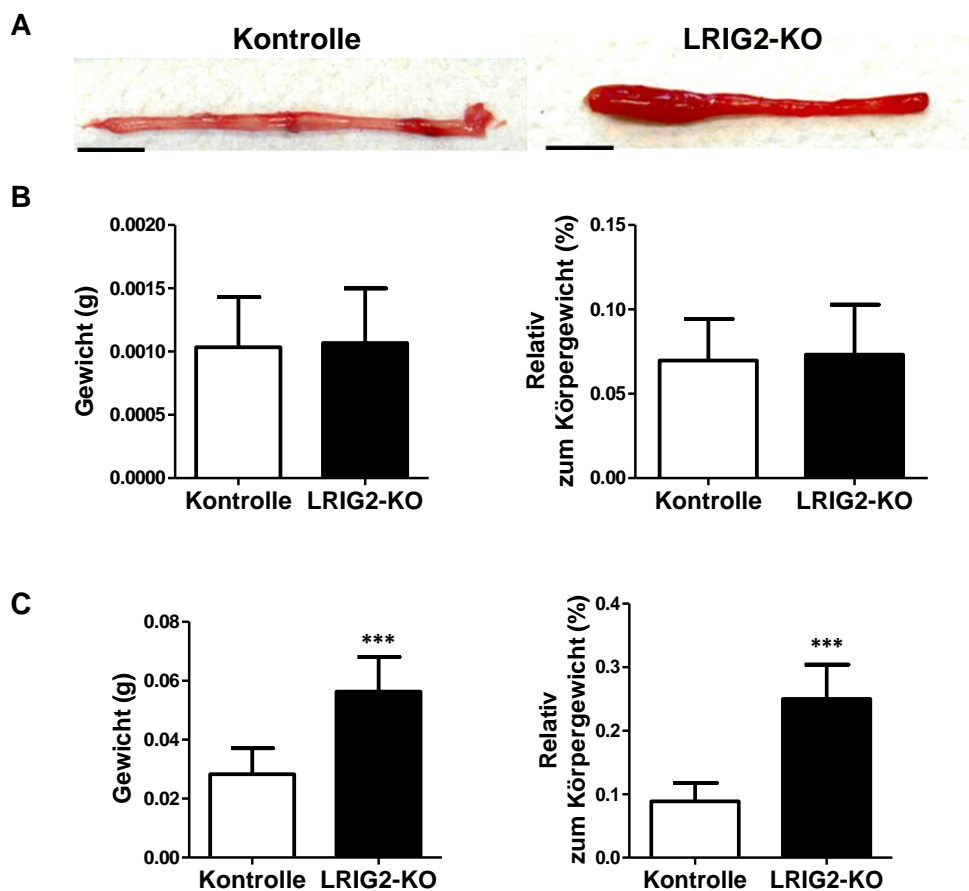


Abb. 11: (A) Fotografie des Megaösophagus eines einjährigen LRIG2-KO Männchen verglichen mit einem Kontrollmännchen. Maßstabsleiste präsentiert 0,5 cm. (B) Absolutes und relatives Ösophagusgewicht von Neugeborenen (n = 6) und (C) einjährigen Knockout-Weibchen (n = 8 KOs, n = 9 Kontrollen). ***: $P < 0,001$.

2.2. Morphologische Analysen

In der quantitativen-histologischen Analyse erschien die Tunica muscularis des Ösophagus der LRIG2-KO Mäuse gegenüber den Kontrolltieren verdickt, war aber pathologisch unauffällig (Abb. 12A). In der quantitativen-stereologischen Analyse waren Volumendichte (Vv) und absolute Volumen (V) der Tunica muscularis der LRIG2-KO Speiseröhre im Vergleich zur Kontrollspeiseröhre signifikant, um etwa 5 bis 10 % erhöht. Die anderen Wandschichten waren unverändert (Abb. 12B).

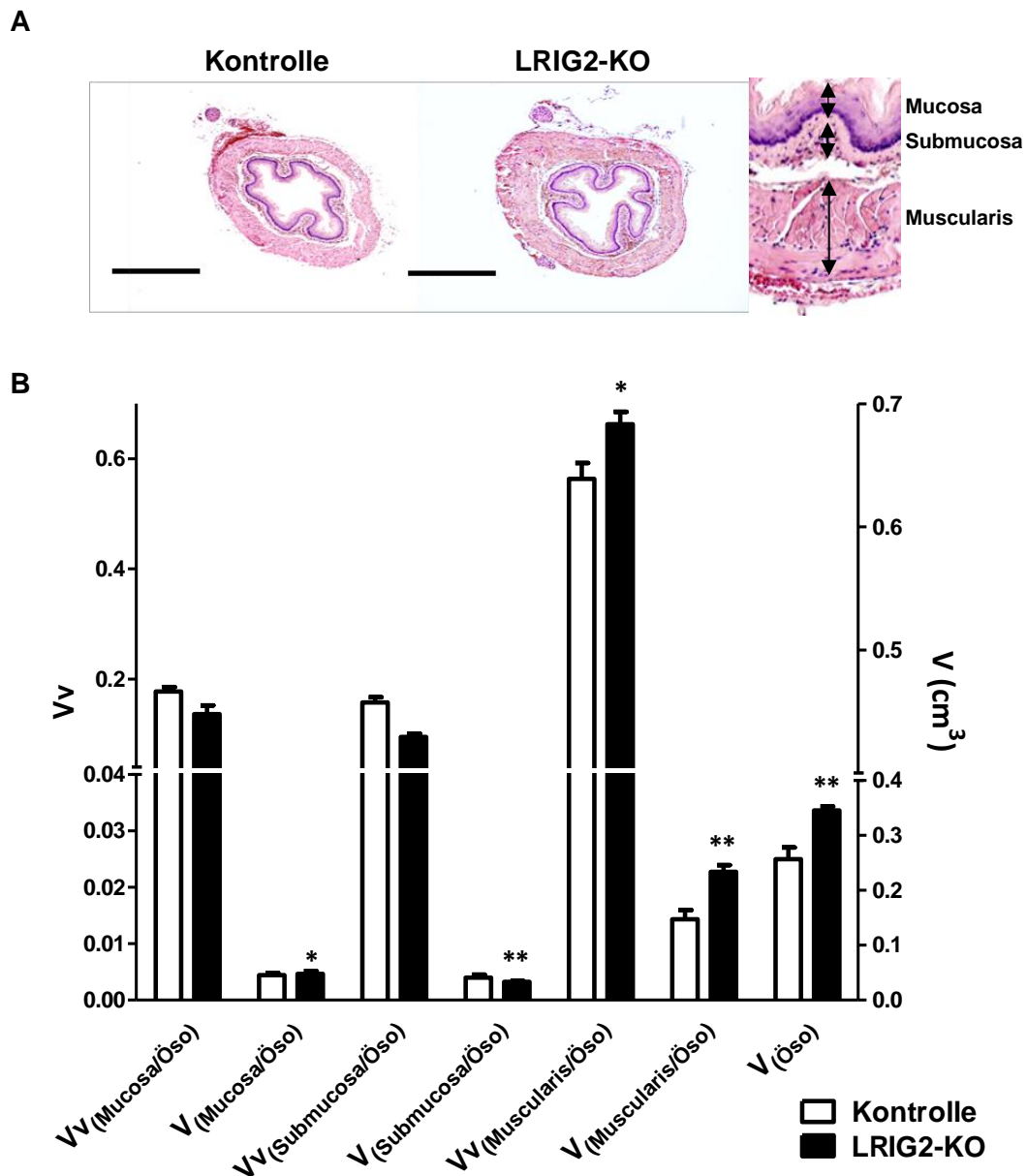


Abb. 12: (A) Repräsentative Histologie des Ösophagus eines 9 Monate alten LRIG2-KO Männchen und Darstellung des Wandaufbaus des Ösophagus. Maßstabsleiste präsentiert 500 μm . FFPE, HE-Färbung. (B) Quantitativ stereologische Auswertung der verschiedenen Schichten der Ösophaguswand (n = 4 KOs, n = 5 Kontrollen). *: P < 0,05; **: P < 0,01.

2.3. Expressionsanalysen

Der Proliferationsmarker Proliferatin-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA), sowie der Apoptosemarker Caspase3 waren in den Expressionsanalysen unauffällig.

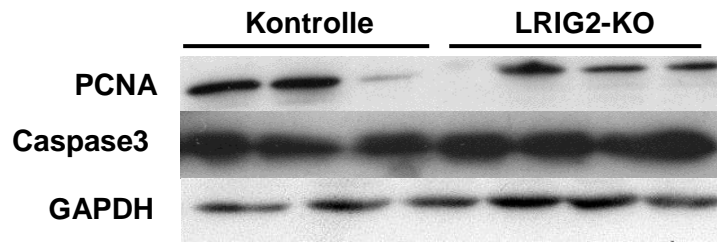


Abb. 13: Western Blot der Proteine PCNA und Caspase3 im Ösophagusgewebe von 11 Wochen alten LRIG2-KO Weibchen. Das Protein GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet.

2.4. Aspirationsanalysen

Der Ösophagus von neugeborenen LRIG2-KO Mäusen zeigte keine Gewichtsveränderung (Abb. 14A). Während der Sektion war der Magen mit Milch gefüllt. Sowohl das Lungengewicht als auch die Histologie waren unauffällig (Abb. 14B). Die 25 % höhere Sterblichkeitsrate in den ersten 24 Std. der LRIG2-KO Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte nicht aufgeklärt werden.

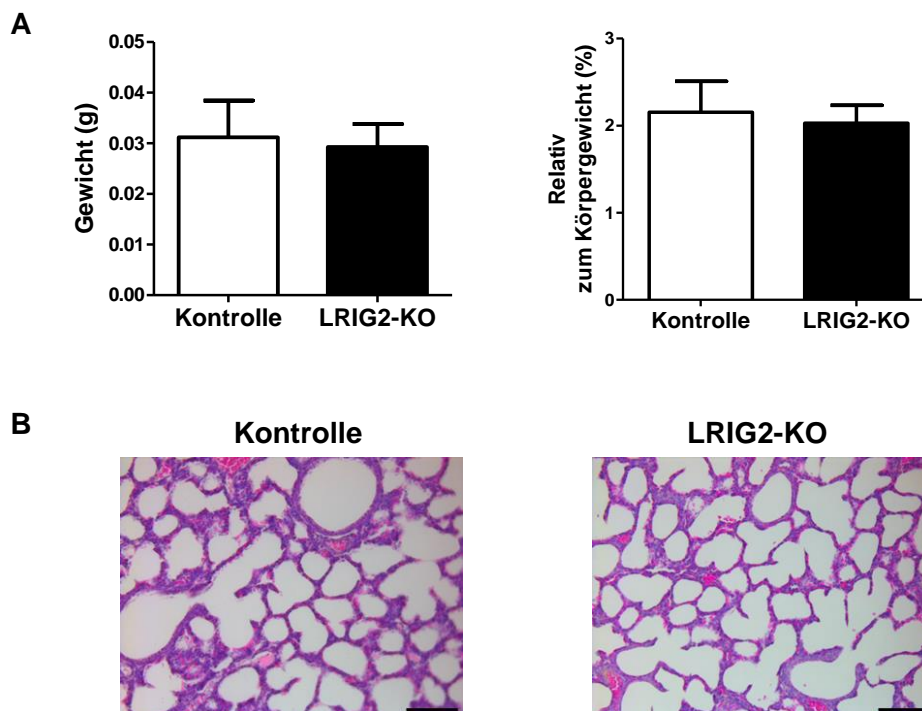


Abb. 14: (A) Absolutes und relatives Lungengewicht von neugeborenen LRIG2-KO Mäusen verglichen mit einer Kontrollgruppe. (B) HE-Färbung einer LRIG2-KO Lunge und Kontrolllunge von Neugeborenen (n = 8 KOs, n = 9 Kontrollen). Maßstableiste präsentiert 100 µm. FFPE, HE-Färbung.

3. Harnblasenanalysen

3.1. Harnblasengewicht

Die Harnblase der Knockout-Mäuse war zum Zeitpunkt der Sektion stark mit Urin gefüllt. Das Harnblasengewicht wurde nach vollständiger Entleerung bestimmt. Visuell waren keine Auffälligkeiten erkennbar (Abb. 15A). Das Harnblasengewicht von Neugeborenen zeigte noch keinen Unterschied (Abb. 15B). Die von adulten Mäusen erhobenen Harnblasengewichte waren absolut und relativ in LRIG2-KO Mäusen erhöht (Abb. 15C).

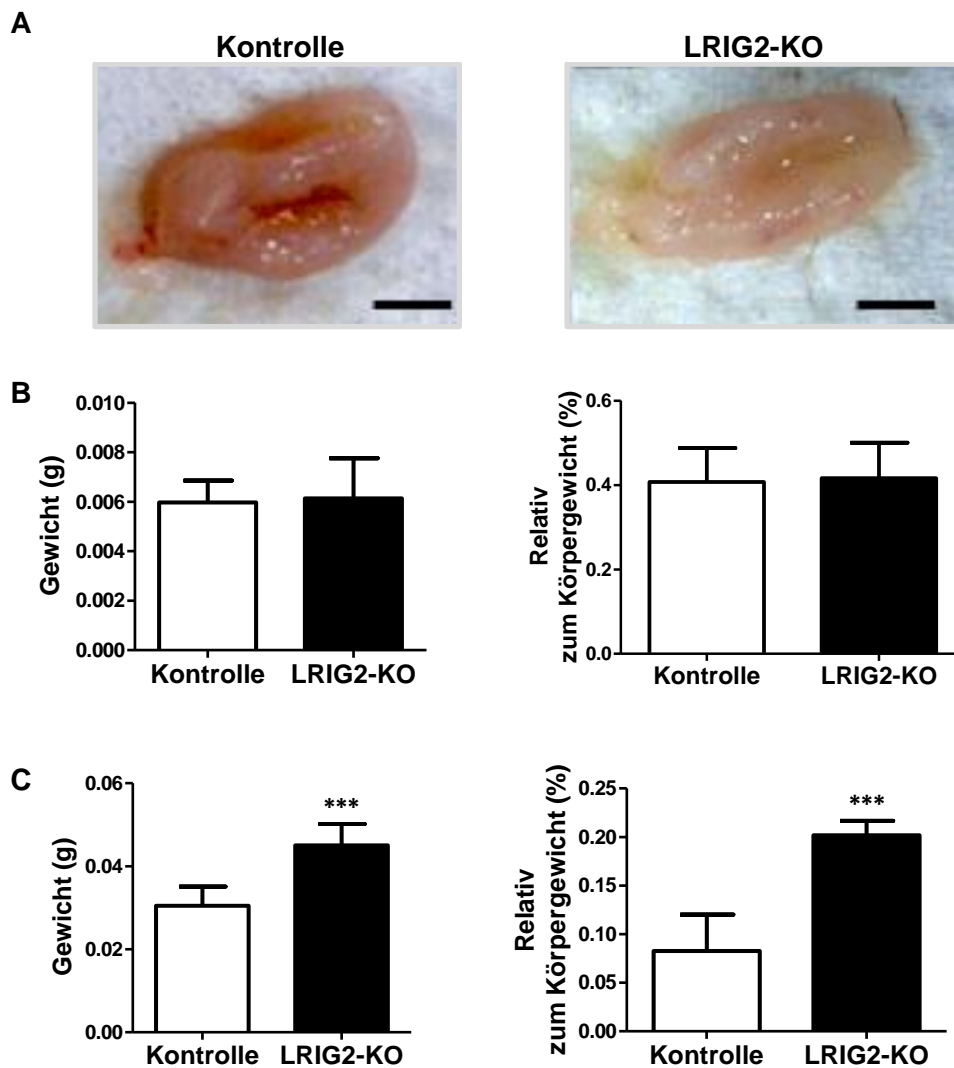


Abb. 15: (A) Fotografie der Harnblase eines einjährigen LRIG2-KO Männchens verglichen mit einer Kontrolle. Maßstabsleiste präsentiert 0,2 cm. Absolutes und relatives Gewicht der Harnblase von (B) Neugeborenen (n = 6) und (C) einjährigen LRIG2-KO Weibchen (n = 7 KO, n = 6 Kontrollen). ***: $P < 0,001$.

3.2. Morphologische Analysen

In der quantitativen-histologischen Analyse zeigten die Wandschichten der Harnblase der LRIG2-KO Mäuse keine Unterschiede zu den Kontrolltieren (Abb. 16A). In der quantitativen-stereologischen Analyse waren die Gesamtvolumina der Lamina mucosa, und der Tela submucosa der LRIG2-KO Mäuse signifikant erhöht verglichen mit den Kontrolltieren. Die Volumendichte war nicht verändert (Abb. 16B).

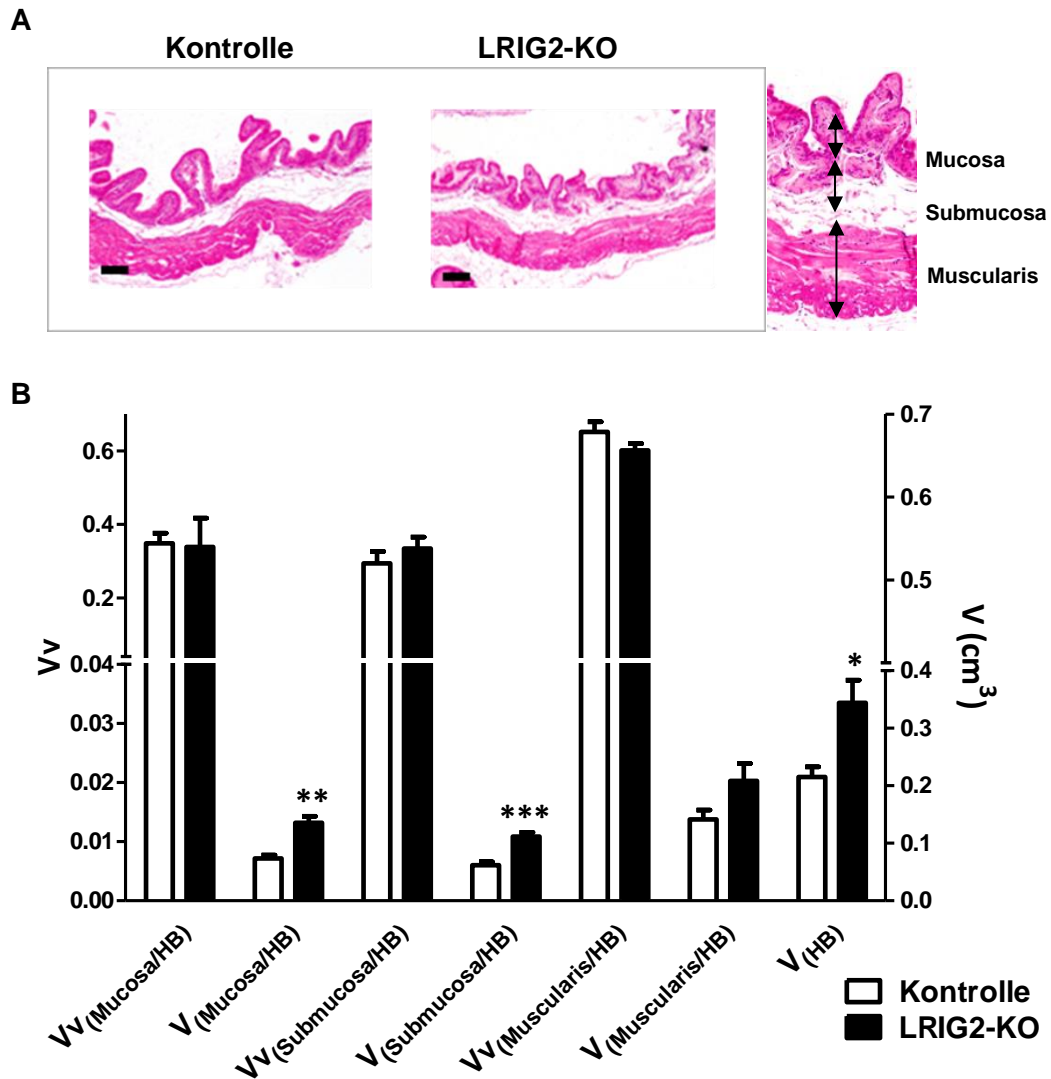
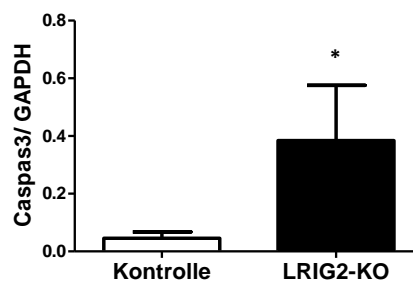
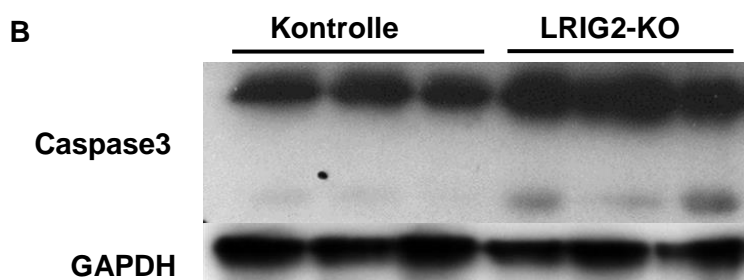
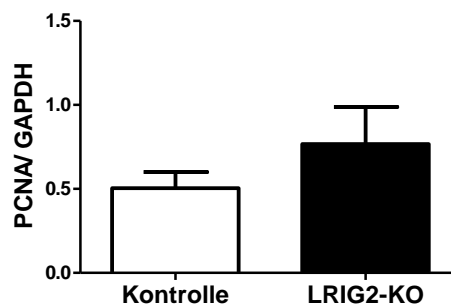
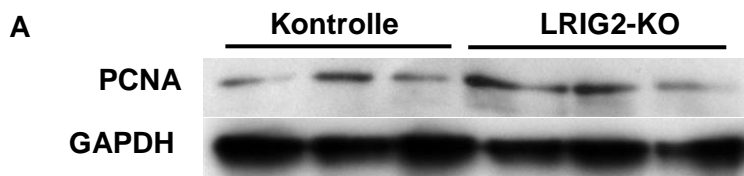


Abb. 16: (A) HE-Färbung der Harnblasenwand eines 9 Monate alten LRIG2-KO Männchens mit Darstellung des Blasenwandaufbaus. Maßstabsleiste präsentiert 100 μm . FFPE, HE-Färbung. (B) Quantitative stereologische Auswertung der verschiedenen Blasenwandschichten (n = 4 KOs, n = 5 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

3.3. Western Blot Analysen

In den Western Blot Analysen wurden speziell Stoffwechselwege zur Zellproliferation und Apoptose untersucht, um die biochemische Funktion von LRIG2 im Harnblasenwachstum aufzuklären. Ein Einfluss auf den Proliferationsmarker PCNA konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 17A). Cleaved Caspase3 wurde vermehrt in der Harnblase von Knockout-Mäusen exprimiert (Abb. 17B) Der Proteinkomplex *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Abb. 17C) und das ribosomale Protein S6 (S6) (Abb. 17D) zeigten in ihrer aktiven Form eine erhöhte Expression in den LRIG2-KO Harnblasen. Der mTOR Komplex reguliert über die Aktivierung der S6 Kinase die Zellproliferation. Diese aktiviert das S6 Protein, welches die Translation reguliert.



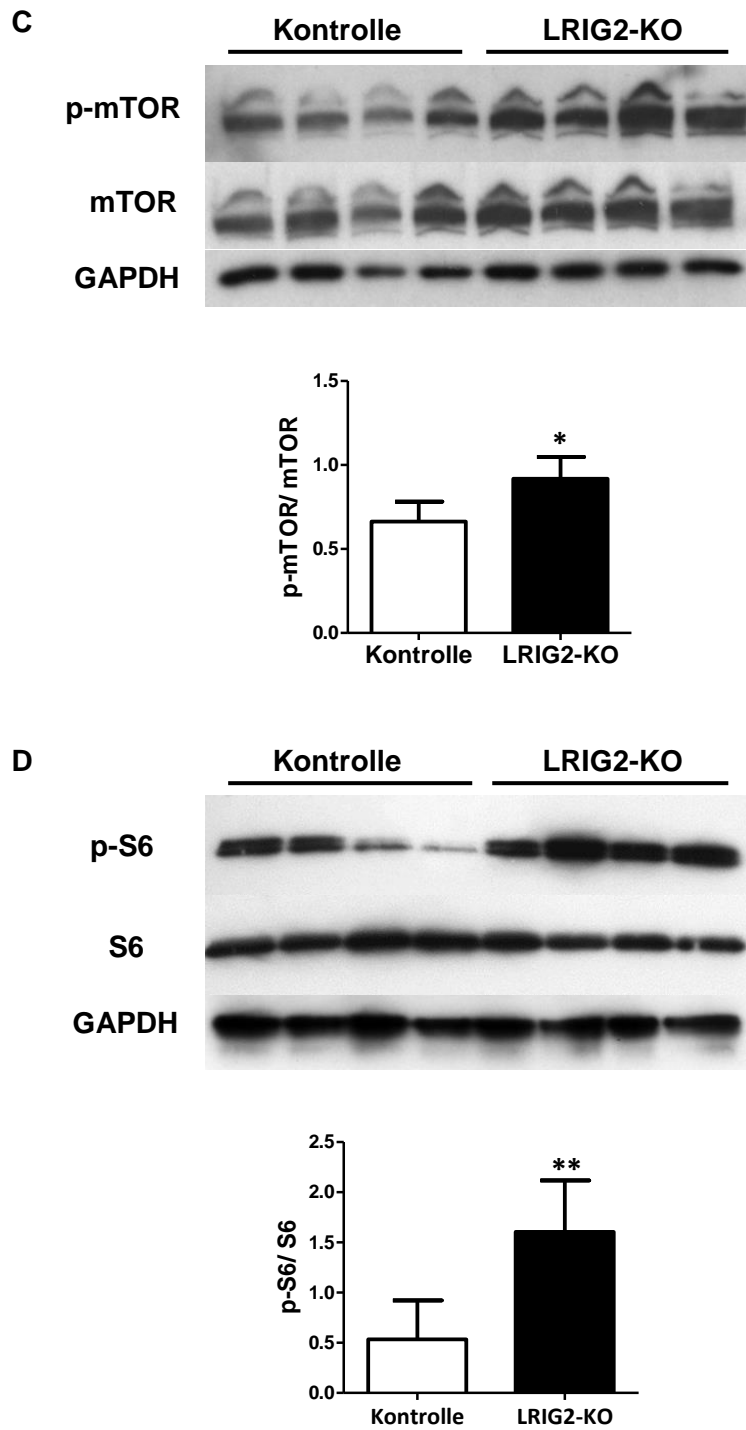


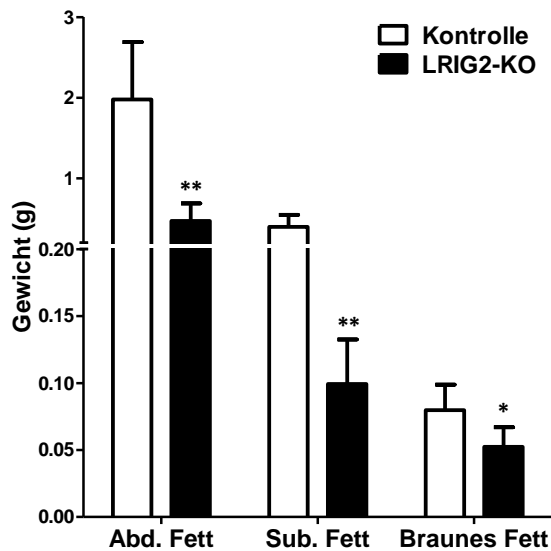
Abb. 17: Densitometrische Auswertungen der Western Blot Analysen der Proteine (A) PCNA, (B) Caspase3, (C) mTOR und (D) S6 von der Harnblase 11 Wochen alter LRIG2-KO Weibchen. GAPDH diente als Ladekontrolle. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4. Fettdepots

4.1. Gewicht der Fettdepots

Während der Sektion waren die abdominalen, subkutanen und testikulären Fettdepots die einzigen Gewebe, die in den LRIG2-KO Mäusen absolut und relativ zum Körpergewicht reduziert waren (Abb. 18). Sie wurden deshalb mit dem niedrigen Körpergewicht der Knockout-Tiere in Verbindung gebracht. Das für die Wärmebildung zuständige, braune Fett war in adulten Mäusen nur noch zwischen den Schulterblättern aufzufinden und im subkutanen Fettgewebe eingelagert.

A



B

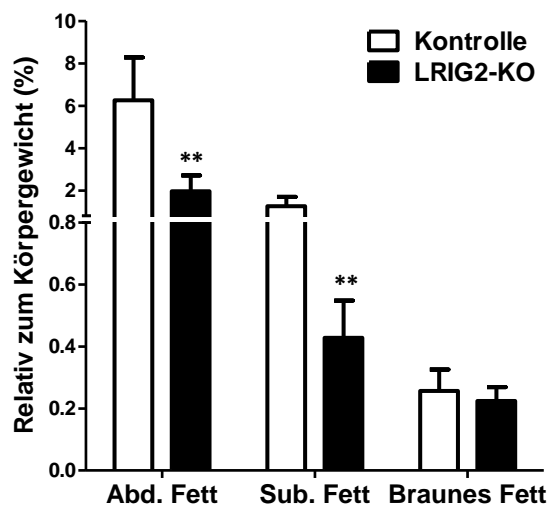


Abb. 18: (A) Absolutes und (B) relatives Gewicht der Fettdepots in 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchen (n = 4 KOs, n = 6 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4.2. Morphologische Analysen der abdominalen Fettdepots

In der Histologie erschienen die Adipozyten der Knockout-Mäuse hypotroph gegenüber dem Kontrollgewebe (Abb. 19A). Zusätzlich zeigten sich Areale mit multivakuolären Zellen. Eine morphometrische Auswertung ergab, dass die mittlere Fläche der Adipozytenanschnitte in LRIG2-KO Mäusen signifikant niedriger war (Abb. 19B).

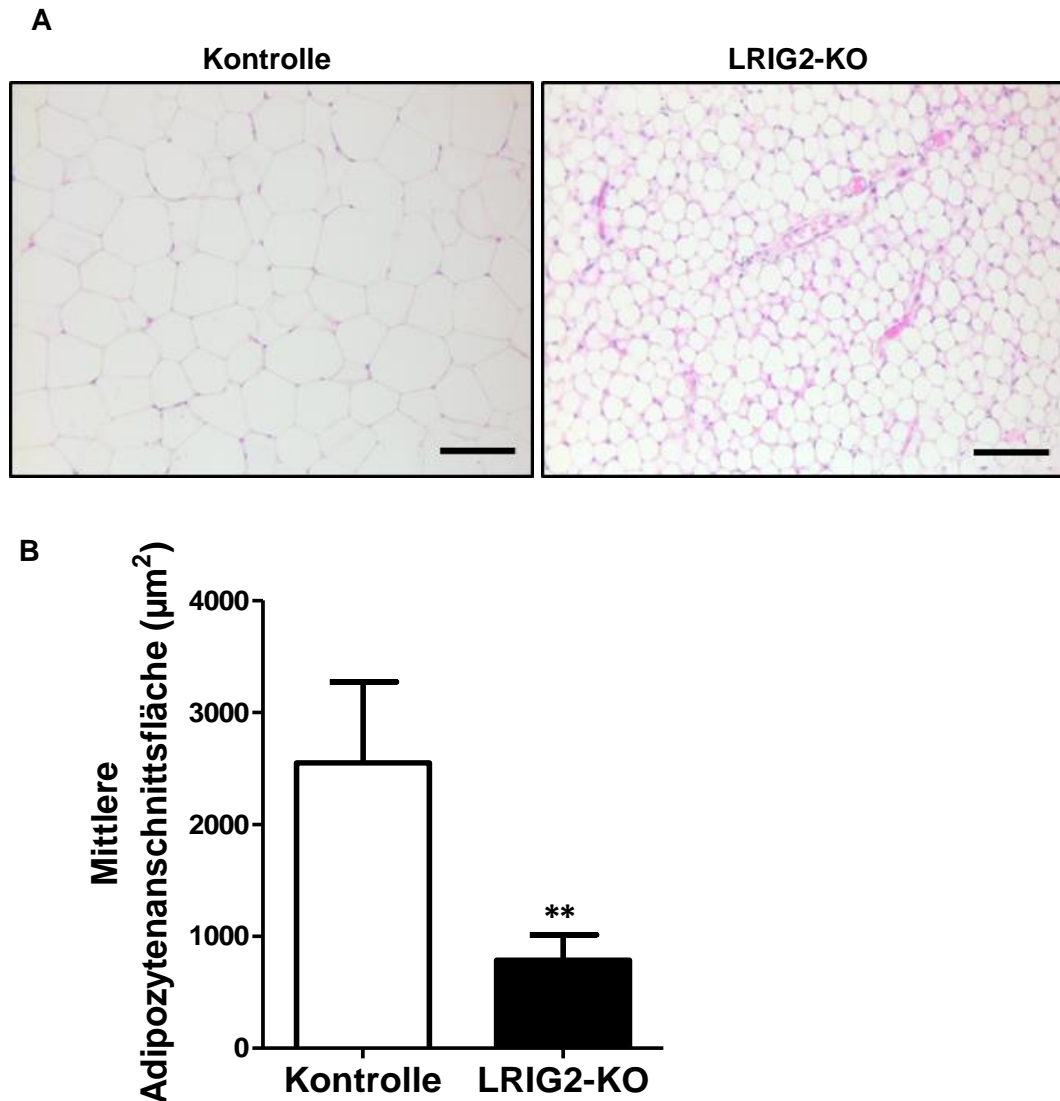


Abb. 19: (A) HE-Färbung der abdominalen Fettdepots eines 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchens. Maßstableiste präsentiert 100 μm . FFPE, HE-Färbung. (B) Mittlere Adipozytenanschnittsfläche der abdominalen Fettdepots von 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchen ($n = 4$ KOs, $n = 5$ Kontrollen). **: $P < 0,01$.

4.3. Futterraufnahme

Aufgrund der Speiseröhrenveränderungen der LRIG2-KO Mäuse wurden drei Würfe ab der Geburt mit Futterpulverbrei zugefüttert. Am Tag ihrer Geburt wogen die Mäuse gleich viel, doch mit zunehmendem Alter entstand ein signifikanter Gewichtsunterschied (Abb. 20A). Der geringe Körperfettanteil bei juvenilen LRIG2-KO Mäusen ist nicht auf eine erschwerte Futterraufnahme zurückzuführen. Adulte LRIG2-KO Mäuse hatten eine geringere Futterraufnahme, jedoch nahmen sie in Bezug auf ihr Körpergewicht mehr Nahrung auf als die Kontrolltiere (Abb. 20B, C).

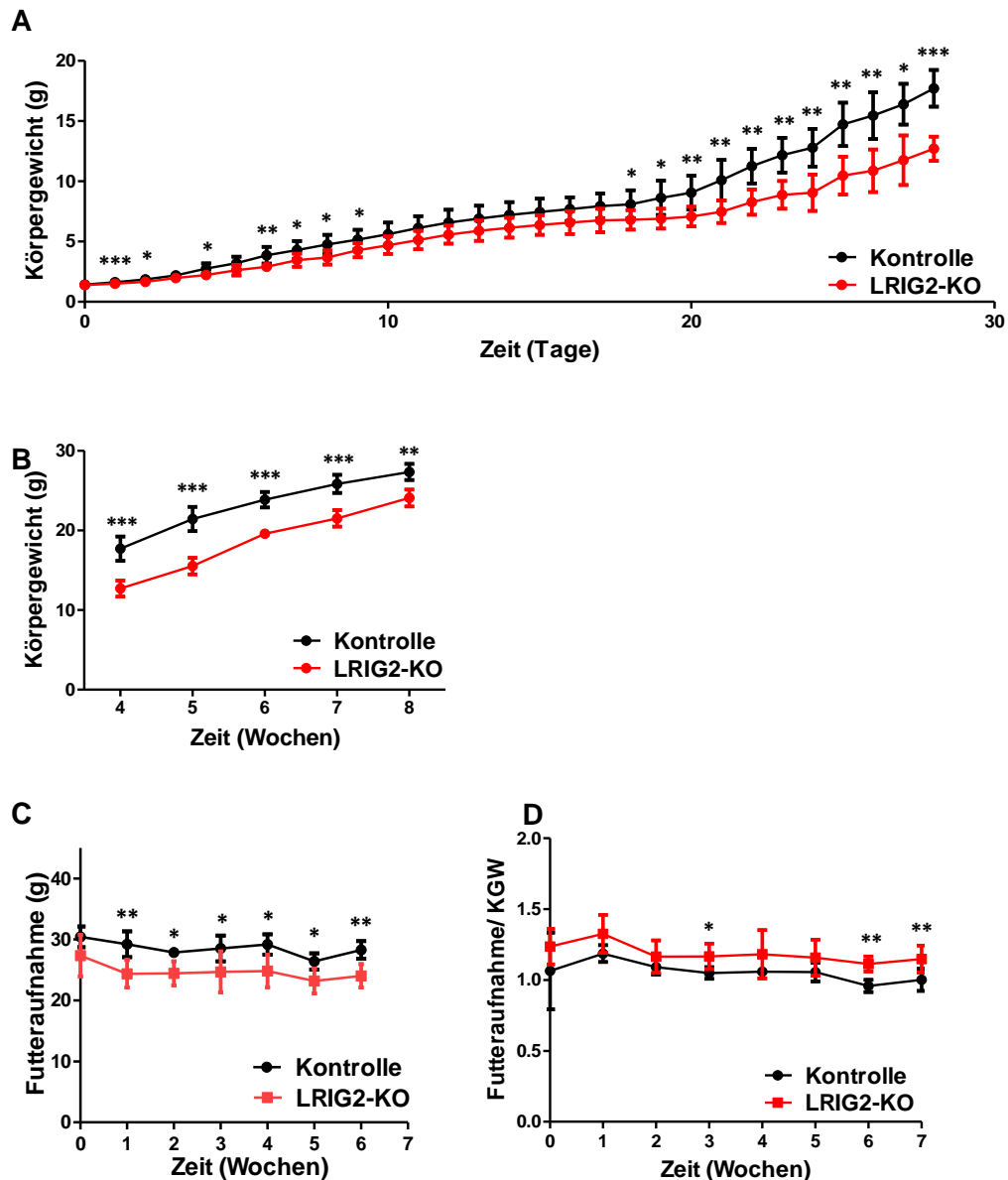


Abb. 20: (A) Körpergewicht Kurve der ersten 28 Lebenstage und (B) 4. bis 8. Lebenswoche von LRIG2-KO Männchen und Kontrolltieren mit zusätzlicher Futterbrei Zufütterung (n = 4 KO, n = 13 Kontrollen). (C) Futterraufnahme und (D) Futterraufnahme relativ zum Körpergewicht Graphen von 6 Monate alten LRIG2-KO Männchen (n = 5). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

4.4. Futter- und Wasseraufnahme, Kotabsatz und scheinbare Verdaulichkeit

Die tägliche Wasseraufnahme war zwischen Knockout-Mäusen und Kontrolltieren unverändert (Abb. 21A). Einjährige Knockout-Männchen verzeichneten keinen Unterschied im Kotabsatz relativ zur Futteraufnahme gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 21B). Die scheinbare Verdaulichkeit der Trockensubstanz (TS), des Rohproteins (Rp), des Rohfettes (Rfe) und der Bruttoenergie (GE) der LRIG2-KO Mäuse lag mit ca. 80 bis 90 % im Normalbereich (Abb. 21C).

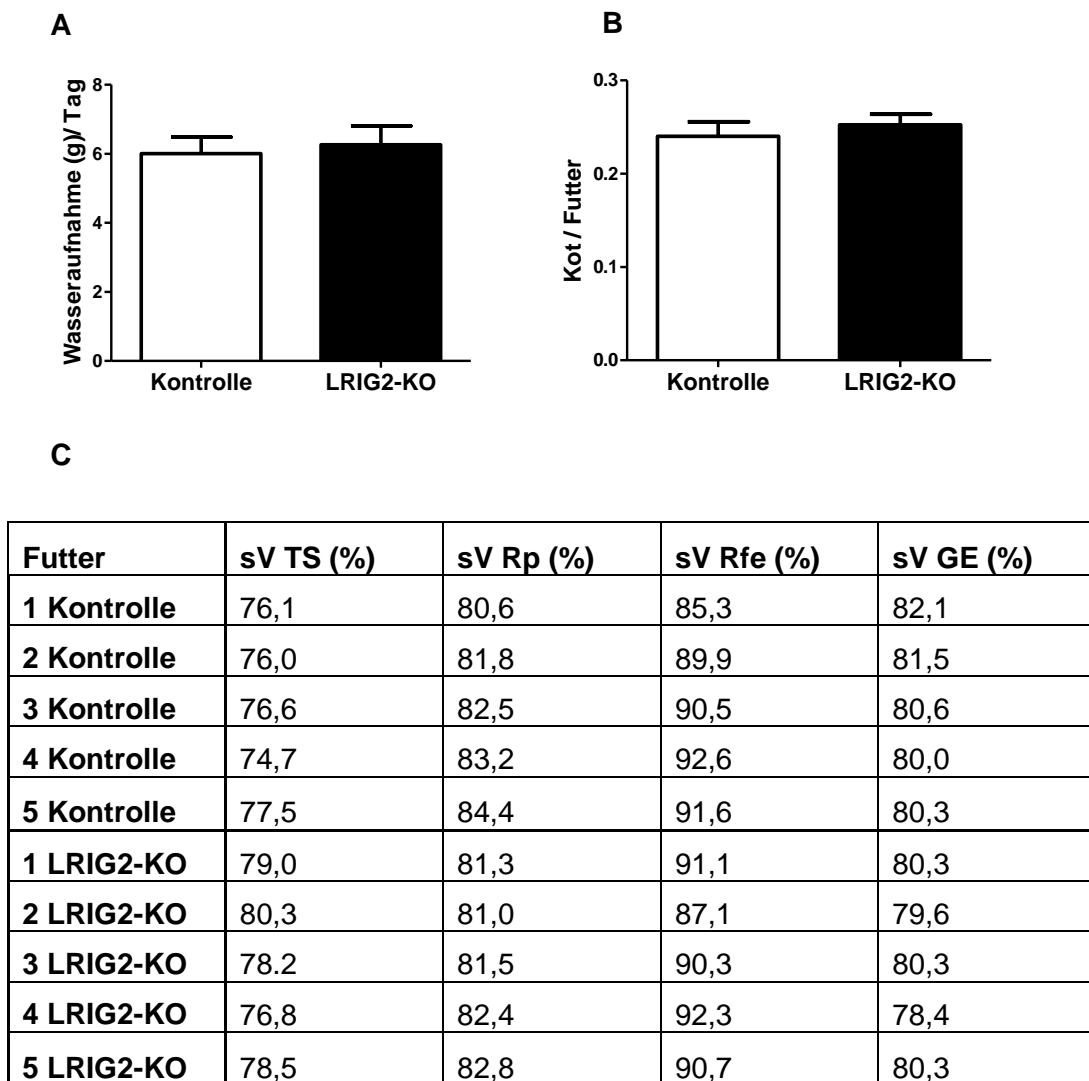


Abb. 21: (A) Wasseraufnahme von LRIG2-KO Männchen. (B) Graph der Kotproduktion relativ zur Futteraufnahme von einjährigen LRIG2-KO Männchen und Kontrollmäusen. (C) Scheinbare Verdaulichkeit von TS, Rp, Rfe und GE (n = 5). Die Futter- und Wasseraufnahme und der Kotabsatz wurden über 18 Tage ermittelt.

Der pH-Wert des Kots der LRIG2-KO Mäuse lag im Normalbereich (pH= 7).



Abb. 22: Fotografie zweier pH-Teststreifen nach Benetzung mit Kotproben einer einjährigen Knockout- und Kontrollmaus (n = 6). Zusätzliche Fotografie der pH-Werte Skala.

4.5. Großes Blutbild

Die roten Blutkörperchen (RBC) und weißen Blutkörperchen (WBC), sowie die Thrombozyten (PLT) zeigten keine Auffälligkeiten zwischen den beiden Mäusegruppen (Abb. 23A). Die Leukozytenzahl war ebenfalls unverändert (Abb. 23B).

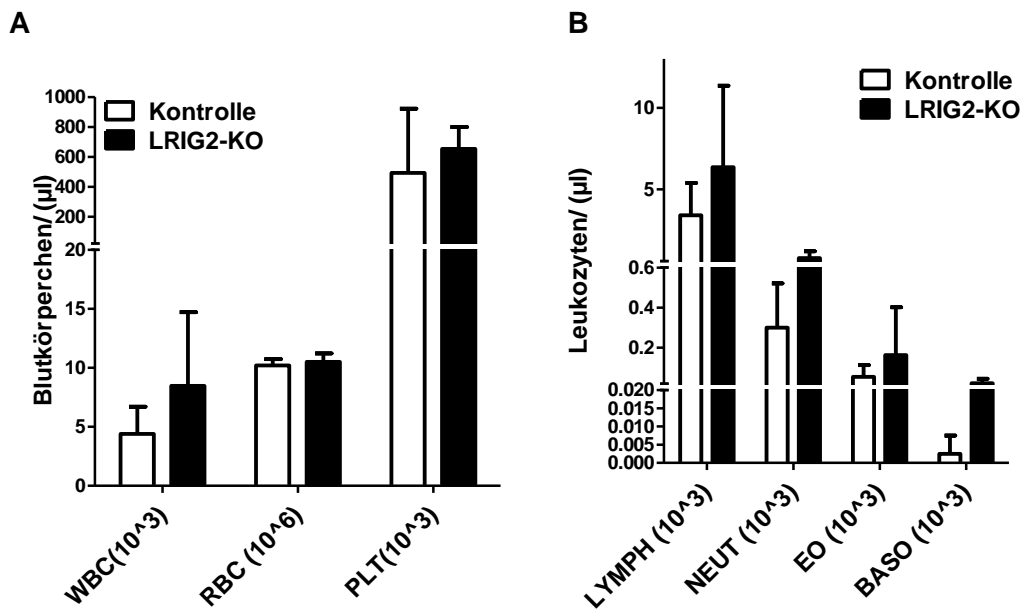


Abb. 23: (A) Graphen der Blutkörperchen und (B) der Leukozyten von 10 Wochen alten Knockout-Weibchen (n = 4).

4.6. Plasmaanalysen

Es wurden verschiedene Bestandteile des Blutplasmas von 9 Monate alten LRIG2-KO Mäusen untersucht. Die über die Nahrung aufgenommen und vom Körper selbst produzierten Fette, Cholesterin und Triglyzeride (TG), sowie freie Fettsäuren lagen im Normalbereich (Abb. 24A). Die Lactat Dehydrogenase (LDH) wie auch der Laktatwert wurden nicht beeinflusst (Abb. 24B, C). Die Verdauungsenzyme Lipase und α -Amylase lagen in ausreichender Konzentration vor. Alle analysierten Plasmawerte waren in LRIG2-KO Mäusen ebenfalls unauffällig.

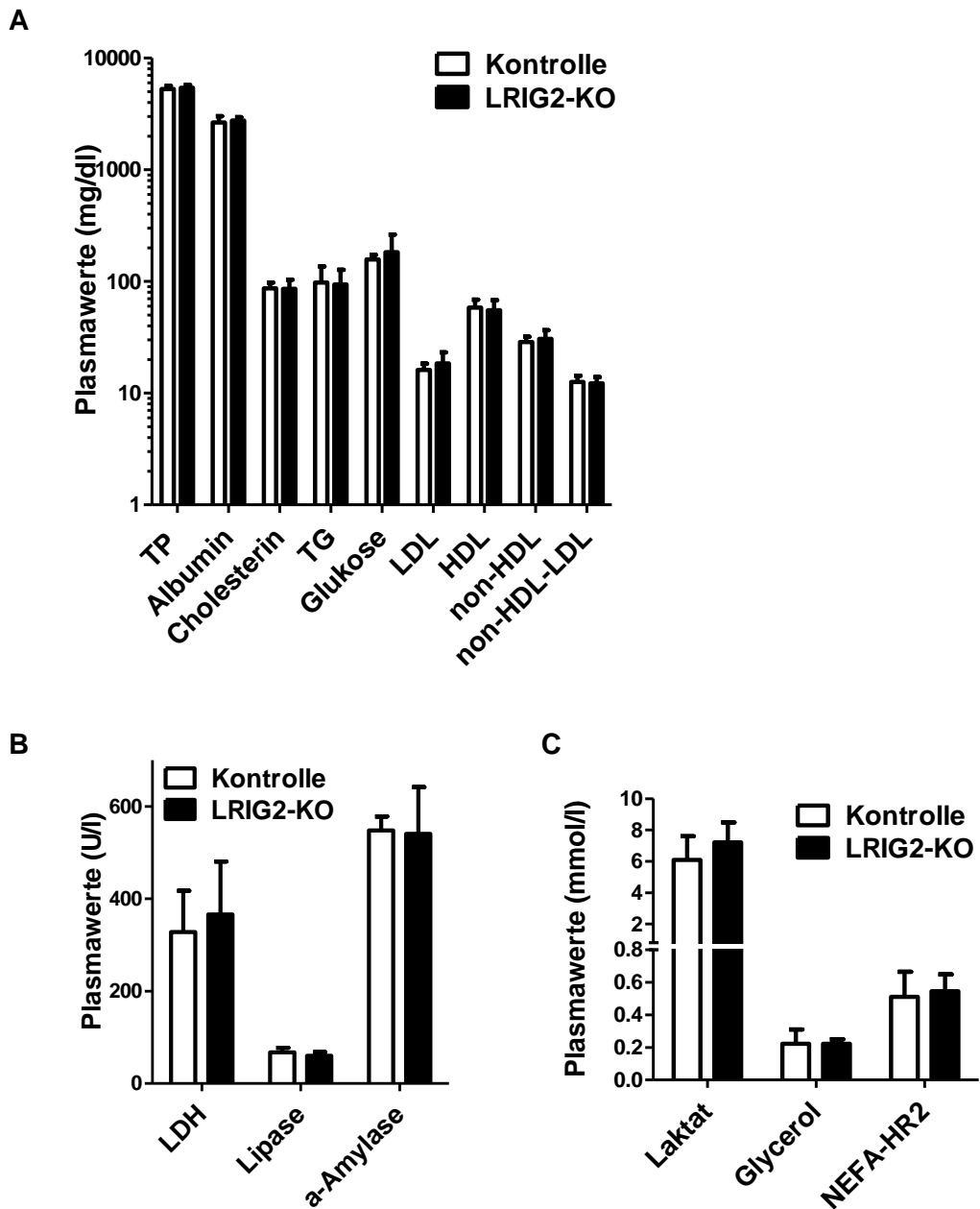


Abb. 24: Die drei Graphen zeigen verschiedene Plasmabestandteile von 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchen mit unterschiedlichen Einheiten (A) mg/dl; (B) U/l und (C) mmol/l (n = 4 KO, n = 6 Kontrollen).

4.7. Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Die Mäuse fasteten vor dem Versuch für 6 Std. LRIG2-KO Mäuse verhielten sich im Glukosetoleranztest gegenüber der Kontrollgruppe unauffällig.

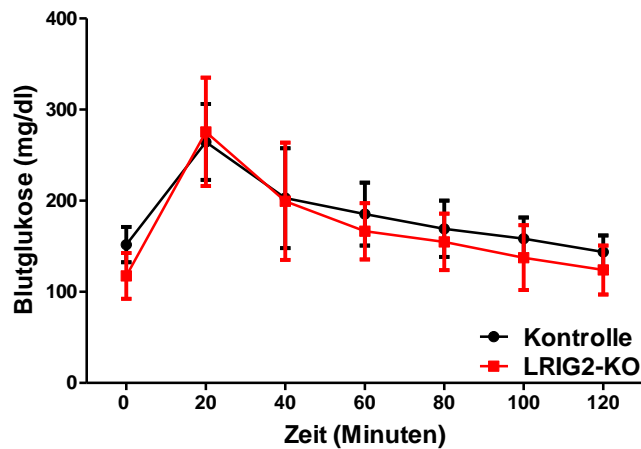


Abb. 25: Kurvenverlauf eines Glukosetoleranztests von 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchen (n = 4 KO, n = 6 Kontrollen).

4.8. Analyse der Körperoberflächentemperatur

Mit einer Wärmebildkamera wurde die Körperoberflächentemperatur von LRIG2-KO Mäusen gemessen. Ihre Körperoberflächentemperatur unterschied sich nicht von den Kontrolltieren (Abb. 26A). Die Neugeborenen wurden zuvor voneinander separiert, um die wirkliche Körperoberflächentemperatur der Mäuse ohne die Nestwärme zu bestimmen.

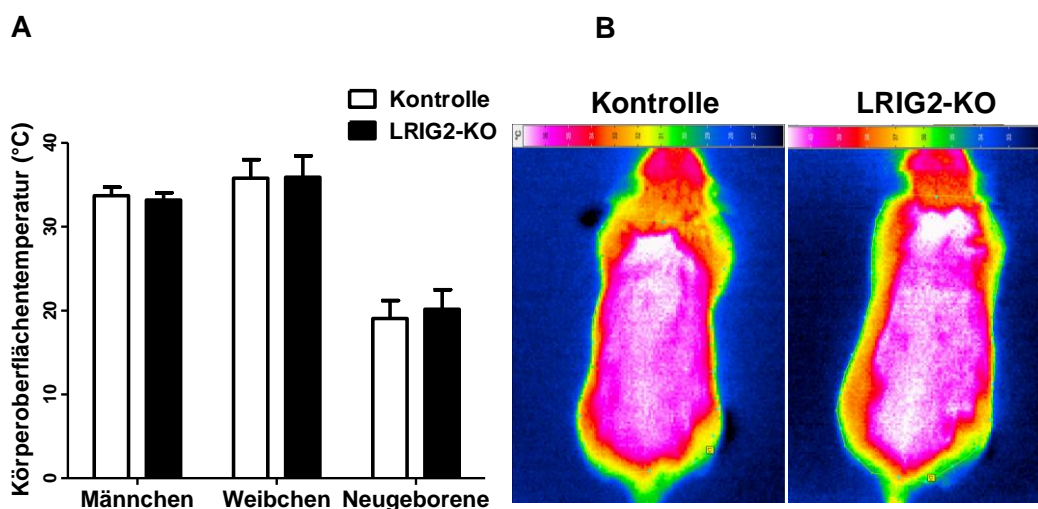


Abb. 26: (A) Graph der Körperoberflächentemperatur männlicher, weiblicher und neugeborener LRIG2-KO Mäuse. Adulte (n = 5), Neugeborene (n = 4). (B) Wärmebild einer Knockout-Maus verglichen mit einer Kontrolle.

Die Sensitivität der Wärmebildkamera war nicht ausreichend, um minimale Schwankungen der Körpertemperatur zu erfassen. Es wurde ein Thermoregulationstest durchgeführt (Abb. 27A). Die Körpertemperatur von LRIG2-KO Mäusen sank kurz nach dem Schwimmen stark ab und sie benötigten eine längere Zeit, um wieder den Normalwert zu erreichen (Abb. 27B). Die Körpertemperatur der Kontrollen sank nur leicht ab und stieg bis zum Versuchsende über ihren Normalwert hinaus. Nach 2 Std. hatten die Mäuse ihre Ausgangskörpertemperatur wieder erreicht. Die Wasserretention vom Fell der Tiere wurde über mehrmaliges Wiegen erfasst. Die Kontrolltiere trockneten schneller als die Knockout-Tiere (Abb. 27C). Das geringe Körpergewicht der LRIG2-KO Mäuse im Verhältnis zu ihrer Körperoberfläche ließ die Tiere schneller auskühlen.

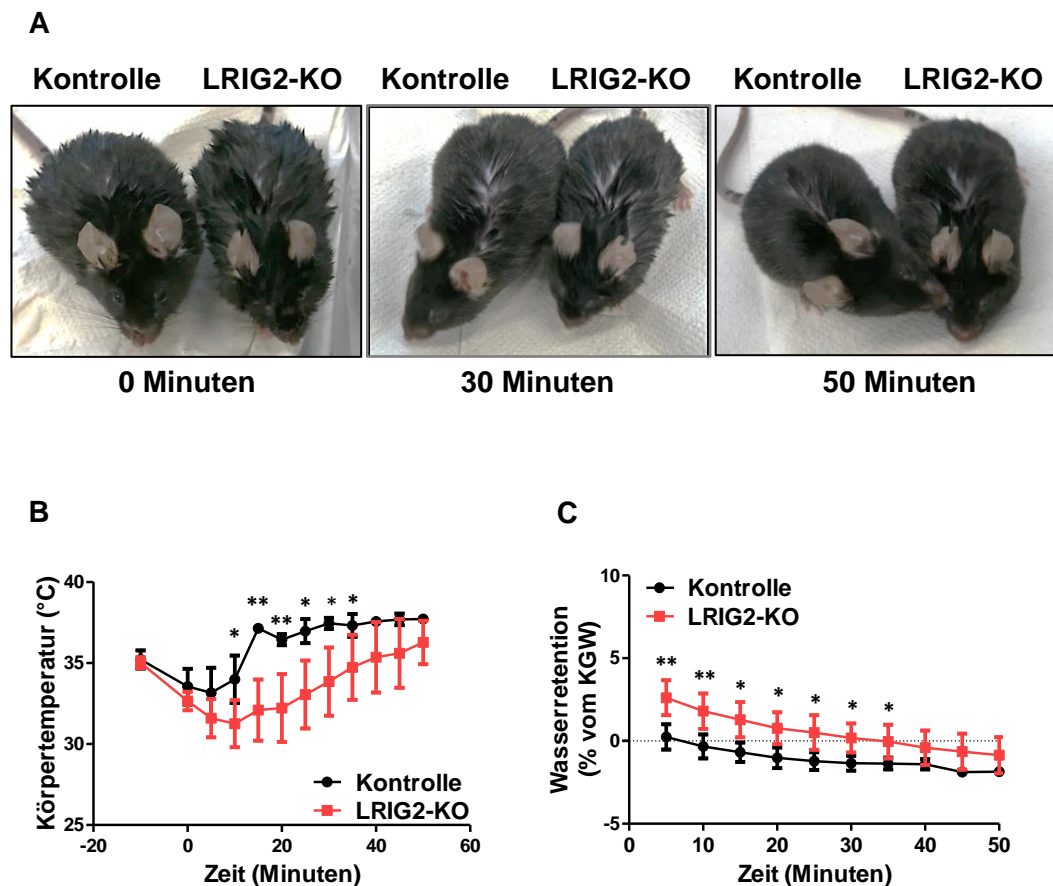


Abb. 27: (A) Repräsentative Photographien des Verlaufs des Thermoregulationstests. (B) Körpertemperaturverlauf von LRIG2-KO Männchen und Kontrolltieren nach 2-minütigem Schwimmen in 30 °C warmen Wasser. (C) Wasserretentionsgraph von LRIG2-KO Männchen (n = 5 KO, n = 4 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4.9. Western Blot Analysen

In der Expressionsanalyse von UCP1 zeigte sich eine erhöhte Expression im abdominalen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse. Dieses transmembrane Protein wird im braunen und beigen Fettgewebe zur Wärmeproduktion benötigt.

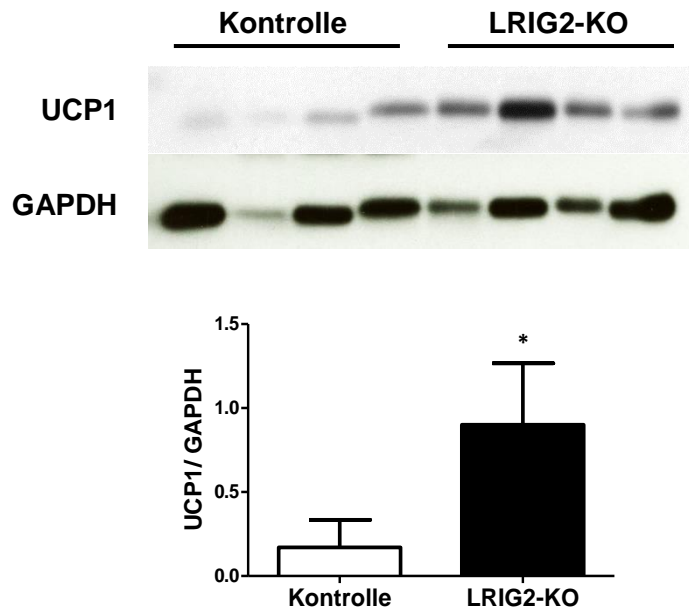


Abb. 28: Western Blot Analyse und densitometrische Auswertung von UCP1. Als Ladekontrolle wurde GAPDH gewählt. *: $P < 0,05$.

5. Diätetisches Adipositasmodell

Der durchgeführte diätetische Adipositasversuch führte zu einer Gewichtszunahme der LRIG2-KO Mäuse von ca. 5 g, wobei die Kontrolltiere ihr Körpergewicht um mehr als 14 g erhöhten. Die Kontrolltiere, verglichen mit den Knockout-Mäusen, nahmen somit die 3-fache Menge an Gewicht zu. Die erhöhte Gewichtszunahme der Kontrolltiere ließ sich bereits nach 6 Wochen fettreicher Diät (HFD) erkennen und stieg bis zum Ende des Versuchs an. Die Knockout-Mäuse hingegen entwickelten keine Adipositas und ihr Körpergewicht lag im Normalbereich.

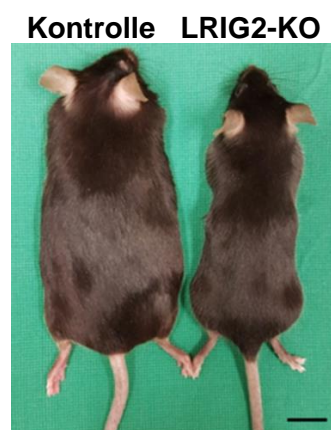


Abb. 29: Photographie einer Knockout und einer Kontrolle nach 16 Wochen HFD. Maßstableiste präsentiert 1 cm.

5.1. Körpergewichtsverlauf und Futteraufnahme

Zu Beginn der Diät nahmen die 8 Wochen alten LRIG2-KO Mäuse an Gewicht zu (Abb. 30A). Erst nach der 6. Woche HFD im Alter von 13 Wochen stagnierte die Zunahme des Körpergewichts der Knockout-Mäuse. Das Körpergewicht der Kontrolltiere stieg weiterhin an. Die Kontrolltiere erhöhten ihr Körpergewicht um fast 40 %, die LRIG2-KO Mäuse lediglich um 20 %. Die absolute Menge an aufgenommenem Futter der LRIG2-KO Mäuse war geringer als die der Kontrolltiere (Abb. 30B). Bezogen auf das Körpergewicht fraßen sie jedoch mehr (Abb. 30C). Somit stand die Futteraufnahme nicht im korrekten Verhältnis zur Körpergewichtszunahme der LRIG2-KO Mäuse. Ihre Gewichtszunahme müsste der Zunahme der Kontrolltiere entsprechen. Im Alter von 8 Wochen sind C57BL/6N Mäuse bereits adult. Eine unter der Charakterisierung aufgelistete Wiegestudie (Abb. 7C) präsentiert, dass auch die adulten Mäuse bis zu einem Alter von 5 Monaten ihr Körpergewicht noch erhöhen.

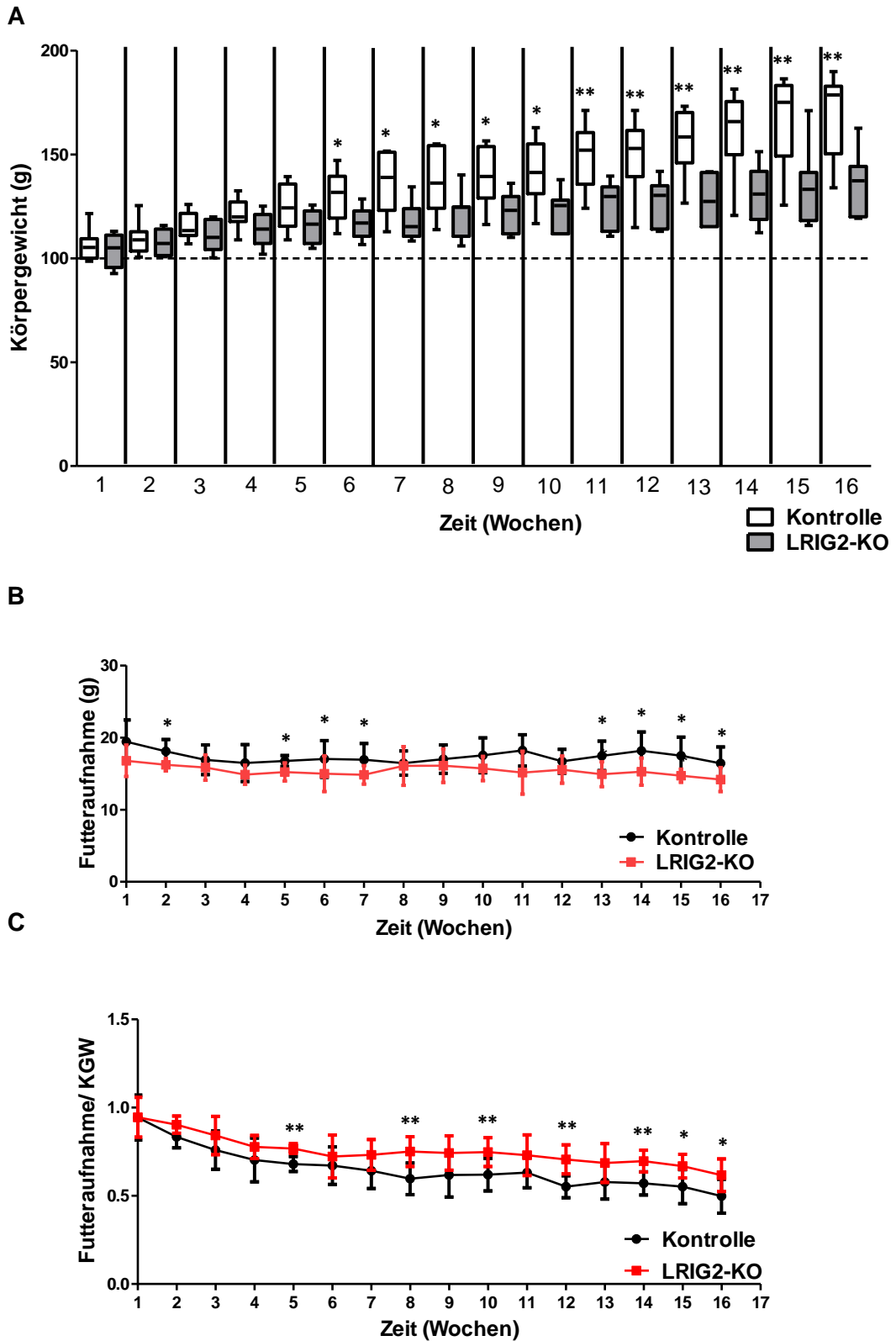
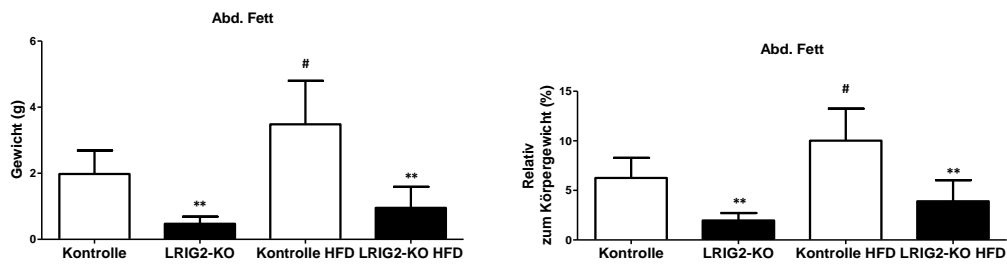


Abb. 30: (A) Relatives Körpergewicht der LRIG2-KO Weibchen verglichen mit den Kontrolltieren. (B) Futteraufnahme der Tiere im Wochenrhythmus bestimmt. (C) Futteraufnahme relativ zum Körpergewicht bei LRIG2-KO Weibchen. (n = 7 KOs, n = 8 Kontrollen) *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

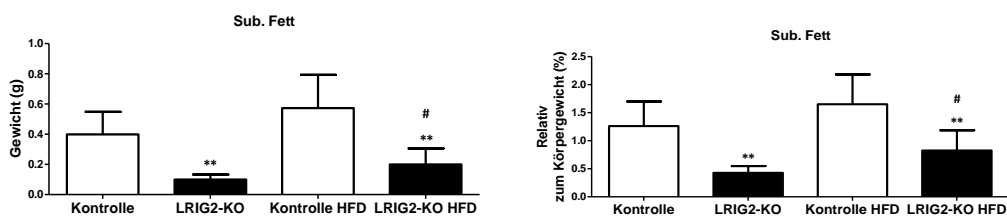
5.2. Gewichte der Fettdepots

Die Fettdepots der Mäuse mit HFD wurden mit den Mäusen verglichen, die nur die Kontrolldiät (KD) bekamen. Das Gewicht der abdominalen Fettdepots der Kontrolltiere war durch die HFD signifikant erhöht (Abb. 31A) und blieb bei den LRIG2-KO Mäusen unverändert. Die subkutanen Fettdepots der Knockout-Mäuse nahmen durch die HFD signifikant an Gewicht zu (Abb. 31B). Unverändert blieben die braunen Fettdepots in beiden Gruppen (Abb. 31C).

A



B



C

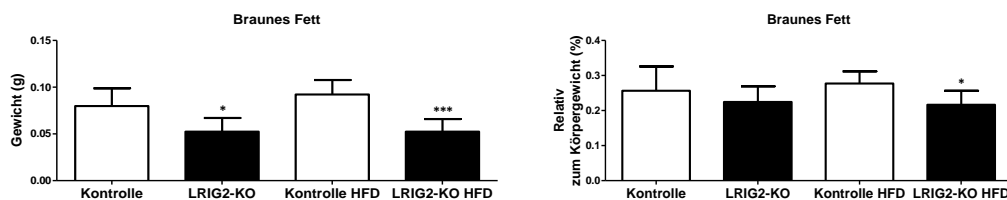


Abb. 31: Absolutes und relatives Gewicht der (A) abdominalen, (B) subkutanen und (C) braunen Fettdepots von 10 Wochen alten LRIG2-KO Weibchen mit KD (n = 4 KO, n = 6 Kontrollen) verglichen mit 6 Monate alten LRIG2-KO Weibchen mit HFD (n = 7 KO, n = 8 Kontrollen)
 *: P < 0,05; **: P < 0,01, ***: P < 0,001, #: P < 0,05.

5.3. Morphologische Analysen der abdominalen Fettdepots

Es wurde eine morphometrische Auswertung vom abdominalen Fettgewebe der Mäuse mit HFD durchgeführt. Die Daten wurden mit den bereits analysierten Fettgeweben der Mäuse mit KD verglichen (Abb. 19). In der Histologie erschienen die Adipozyten in LRIG2-KO Mäusen mit KD kleiner (Abb. 32A). Dieser Unterschied wurde durch eine HFD verstärkt. Die Größe der Adipozytenanschnittsfläche der LRIG2-KO Mäuse mit HFD erreichte nicht die Größe der Adipozytenanschnittsfläche von Kontrolltieren mit KD (Abb. 32 B). Die mittlere Adipozytenanschnittsfläche der LRIG2-KO Mäuse war sowohl mit KD als auch HFD signifikant kleiner. Die HFD führte zu einer Vergrößerung der Adipozytenanschnittsflächen in beiden Gruppen.

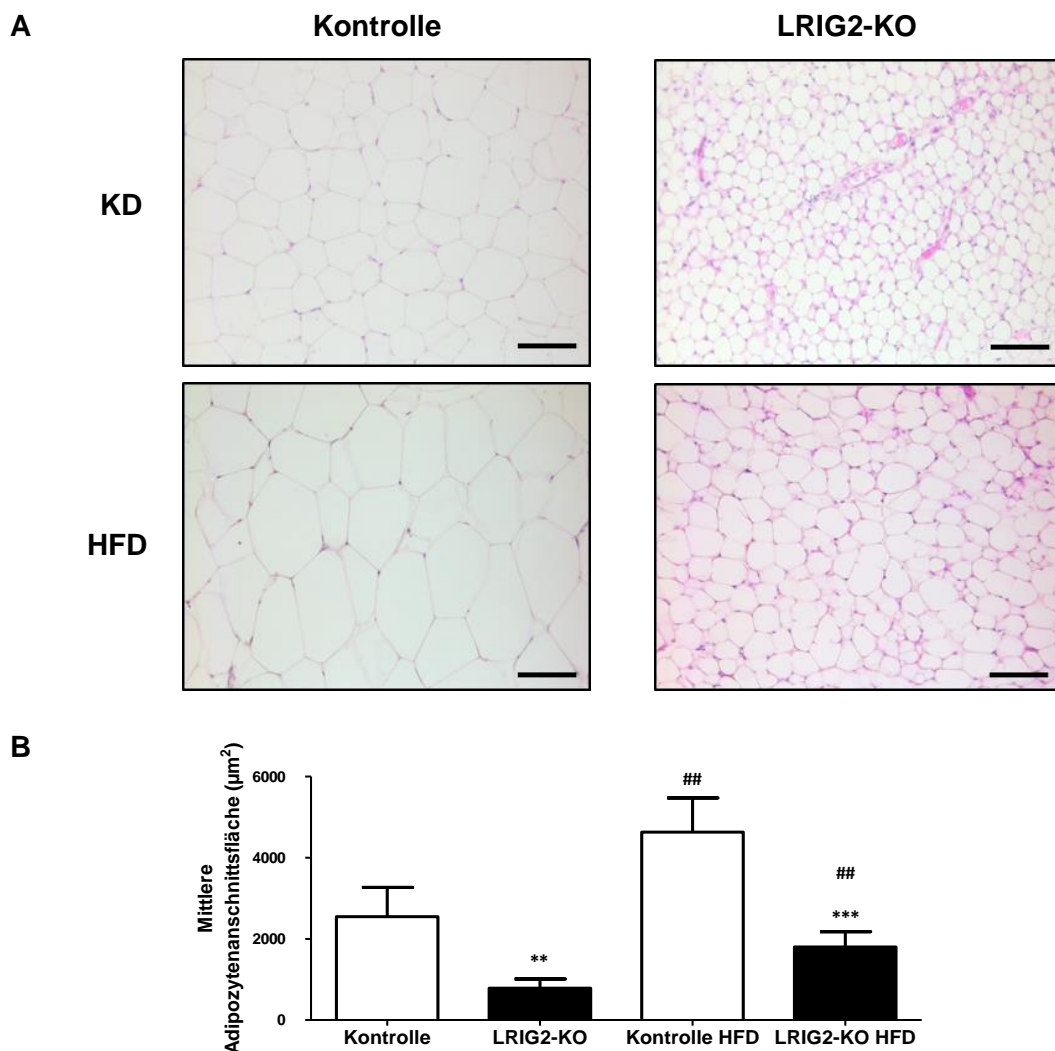


Abb. 32: (A) HE-Färbung der abdominalen Fettdepots von LRIG2-KO Weibchen mit KD und HFD. Maßstabsleiste präsentiert 100 µm. FFPE, HE-Färbung. (B) Mittlere Adipozytenanschnittsfläche der abdominalen Fettdepots von 9 Monate alten LRIG2-KO Weibchen mit KD (n = 4 KOs, n = 5 Kontrollen) und 6 Monate alten LRIG2-KO Weibchen mit HFD (n = 5 KOs, n = 6 Kontrollen). **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$. ##: $P < 0,01$.

5.4. Futteraufnahme und Kotabsatz

Der Kotabsatz relativ zur Futteraufnahme war bei LRIG2-KO Mäusen mit HFD gegenüber den Kontrolltieren unauffällig (Abb. 33A). Die scheinbaren Verdaulichkeiten von Trockensubstanz und Bruttoenergie waren mit 80 bis 90 % im Normalbereich (Abb. 33B).

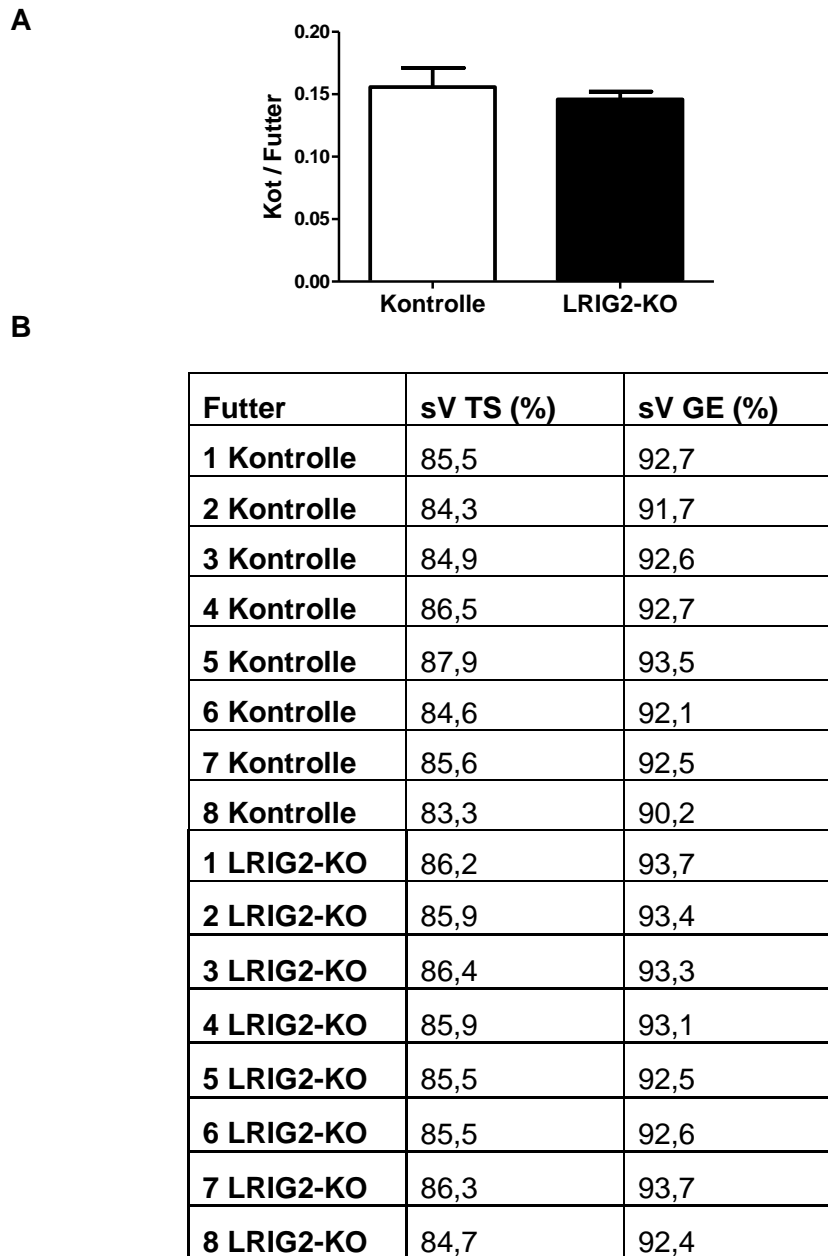


Abb. 33: (A) Graph des Kotabsatzes relativ zur Futteraufnahme von 6 Monate alten LRIG2-KO Weibchen mit HFD. (B) Scheinbare Verdaulichkeit der TS und der GE. Der Kot wurde über einen Zeitrahmen von 16 Tag während des diätetischen Adipositasmodells gesammelt.

5.5. Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Am Ende des diätetischen Adipositasversuches wurde ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Dieser verlief bei LRIG2-KO Mäusen unauffällig. Die Kontrolltiere zeigten eine verlangsamte Glukoseaufnahme und erreichten nach 2 Std. nicht ihren Blutglukoseausgangswert. Dies stellt ein Indiz für einen gestörten Glukosestoffwechsel dar.

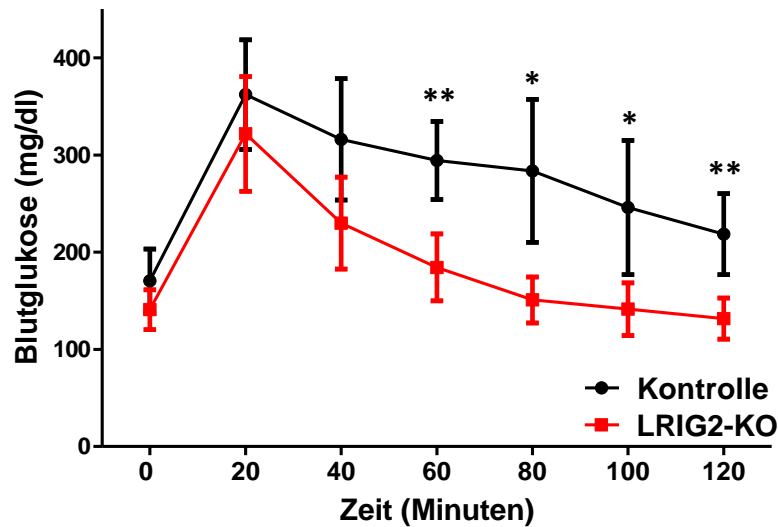
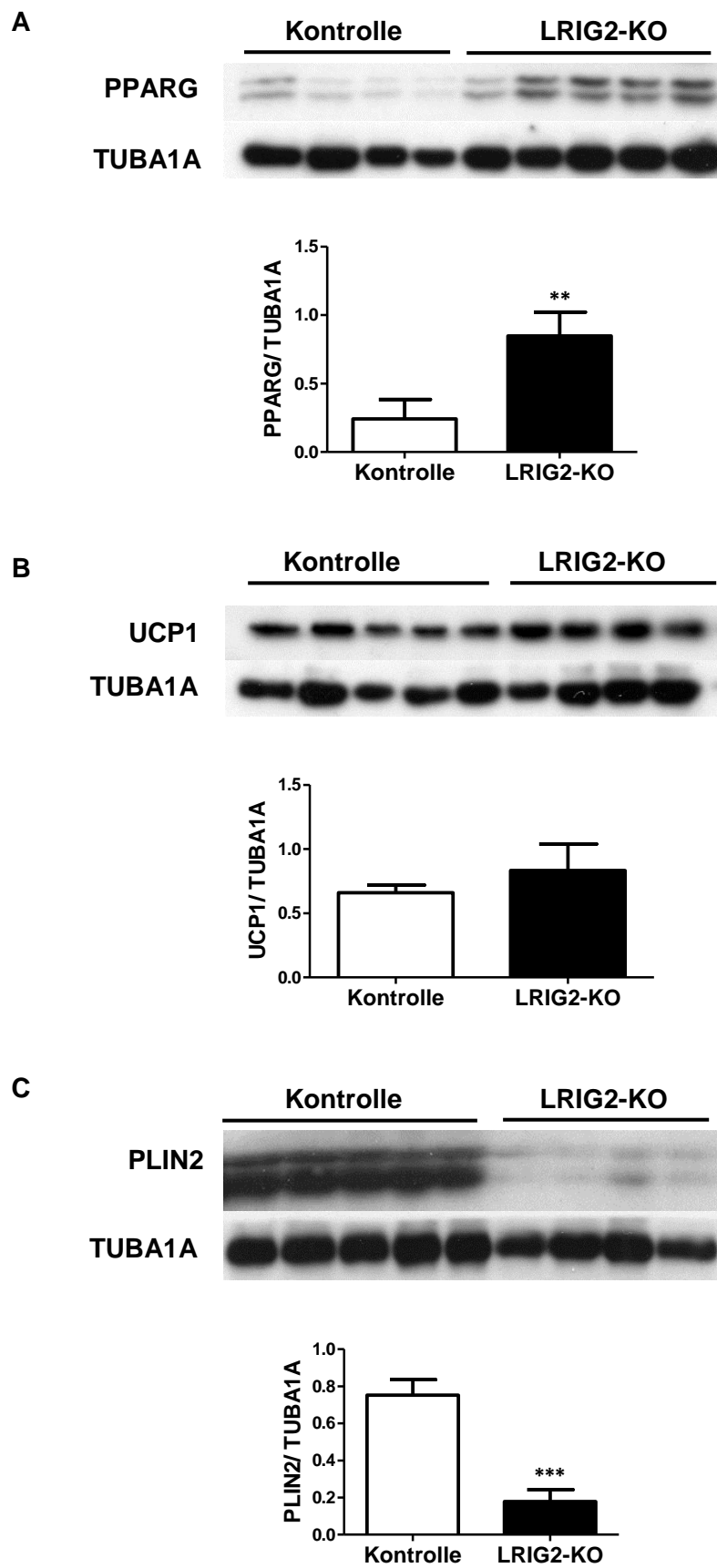


Abb. 34: Glukosetoleranztest von 6 Monate alten LRIG2-KO Weibchen nach 16-wöchiger Fettfutterdiät. (n = 7 KOs, n = 8 Kontrollen). *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

5.6. Western Blot Analysen

Die Expression von PPARG war im weißen Fettgewebe der Knockout-Mäuse erhöht (Abb. 35A). Es besitzt eine entzündungshemmende Wirkung und ist an der Differenzierung von Adipozyten und an der Bildung von beigem Fettgewebe beteiligt. Die UCP1 Expression der LRIG2-KO Mäuse unterschied sich nicht signifikant von den Kontrolltieren (Abb. 35B). Durch die HFD reduzierte sich die erhöhte UCP1 Expression vom abdominalen Fettgewebe der Knockout-Mäuse mit KD (Abb. 28). Das Protein Perilipin 2 (Adipophilin, PLIN2) zeigte in den Knockout-Mäusen fast keine Expressionsbande und war gegenüber den Kontrollen signifikant niedriger (Abb. 35C). Adipophilin reguliert die Lipidspeicherung und die Lipolyse. PLIN2 wird von unterschiedlichen Zellen, darunter Adipozyten exprimiert und befinden sich an der Oberfläche von Lipidtröpfchen. Eine erhöhte Expression von ERBB3 in den Knockout-Mäusen spricht für eine erhöhte Zellproliferation und eine reduzierte Zelldifferenzierung (Abb. 35D). Zu den Kontrolltieren war ein signifikanter Expressionsunterschied von Adiponektin im weißen Fettgewebe erkennbar. Die Adiponektin Synthese

wird abhängig von dem Lipidfüllstand der Fettzellen reguliert (Abb. 35E).



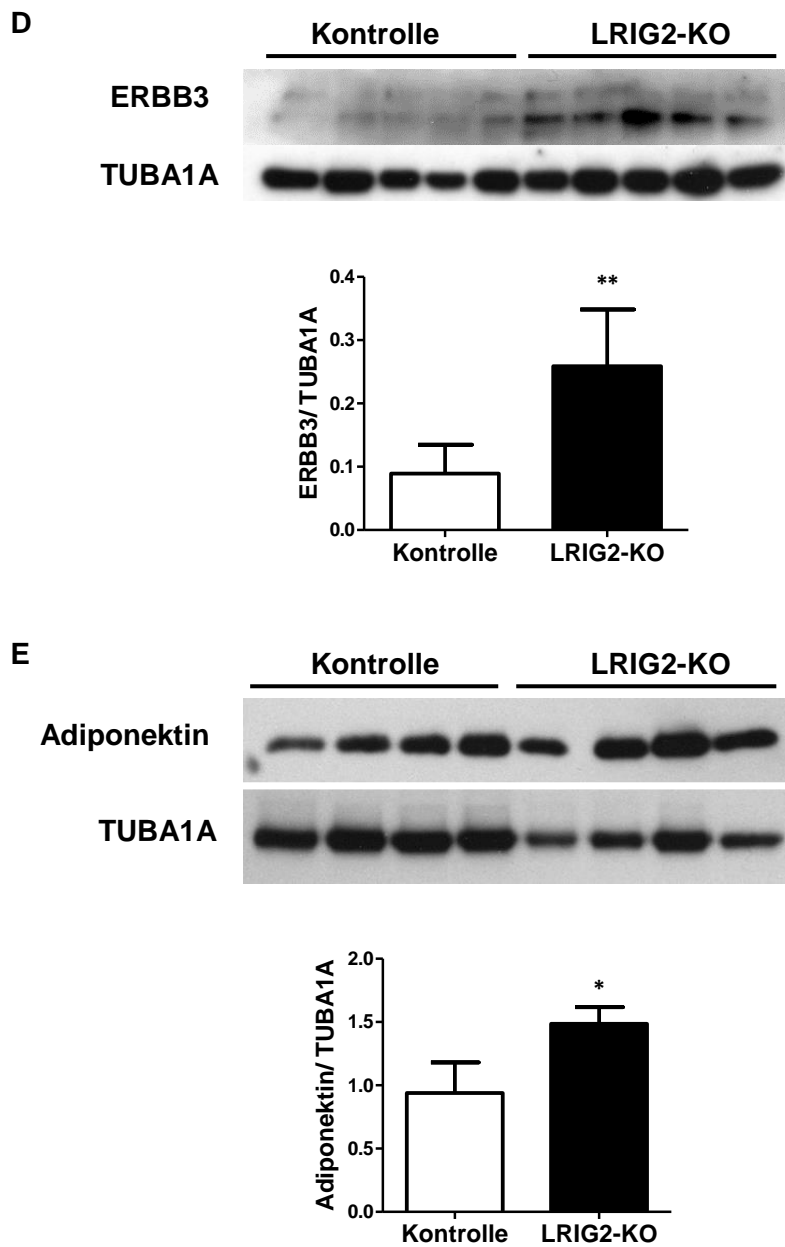


Abb. 35: Western Blot Analysen von (A) PPARG, (B) UCP1, (C) PLIN2, (D) ERBB3 und (E) Adiponektin mit densitometrischen Auswertungen. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin (TUBA1A) gewählt. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

5.7. Analysen der Lipideinlagerung von Adipozyten

Aus dem inguinalen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse wurden Präadipozyten gewonnen und zu Adipozyten differenziert, wodurch die Zellproliferation gestoppt wird und die Zellen beginnen, Lipide einzulagern (Abb. 36A). Bei LRIG2-KO Mäusen waren der Quotient aus Lipid- und Zellkernzahl, die Lipidgesamtfläche, sowie die mittlere Lipidgröße reduziert (Abb. 36B, C).

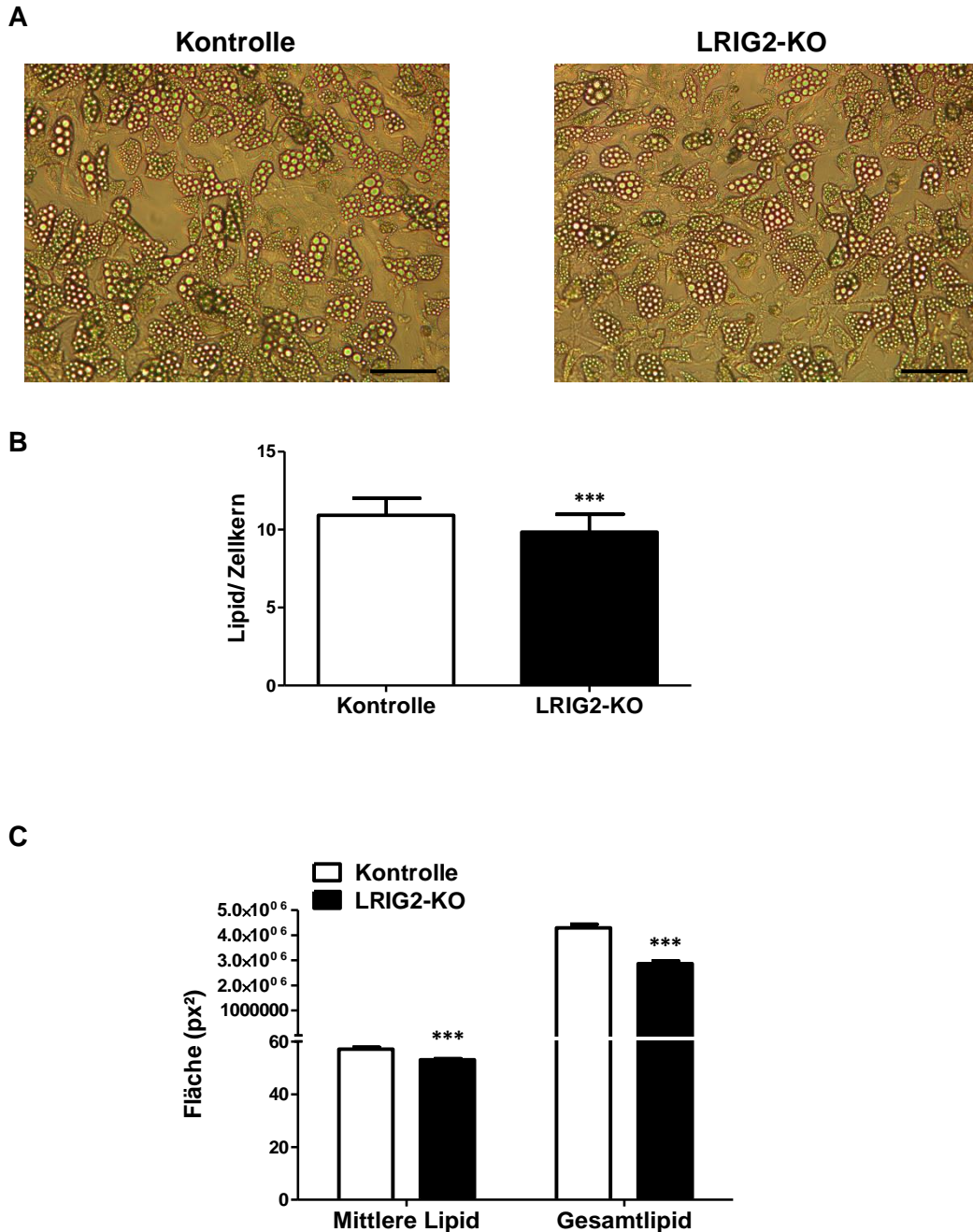


Abb. 36: (A) Lichtmikroskopische Morphologie der Adipozyten mit lipidhaltigen Vakuolen. Maßstabsleiste präsentiert 100 μm . Operetta Messungen (B) der Lipid-/ Zellkernzahl und (C) der mittleren Lipid- und Gesamtlipidfläche (n = 3). ***: P < 0,001

IV. DISKUSSION

1. Überblick

Mit unserer ubiquitären Knockout-Maus für LRIG2 soll die Bedeutung von LRIG2 in den verschiedenen Geweben aufgeklärt werden. Der Verlust von *Lrig2* wurde mittels RT-PCR auf mRNA Ebene bestätigt. In der Literatur ist bisher wenig über LRIG2 bekannt. Während unserer Studie wurde eine andere LRIG2-KO Mauslinie publiziert. Bei der anderen Mauslinie wurde Exon 12 deletiert, allerdings basiert die Linie auf einem Mischhintergrund aus den Inzuchtstämmen C57BL/6J und 129Sv/J. Im Gegensatz dazu basiert unsere LRIG2-KO Mauslinie auf nur einem Inzuchtstamm (C57BL/6N). Unser reiner Inzucht-Hintergrund kann auch den stärkeren Phänotyp bei unserer Mauslinie erklären.

Der Verlust von LRIG2 in den Knockout-Mäusen führte zu Veränderungen im Ösophagus und der Harnblase. Mittels Q-PCR konnte eine erhöhte *Lrig2* Konzentration in genau diesen Organen der Kontrolltiere nachgewiesen werden (Abb. 5). Zusätzlich zeigten die Mäuse einen reduzierten Körperfettanteil, dessen Ursache bisher noch unbekannt war.

Zur Charakterisierung der erstellten Knockout-Mäuse wurde die Mortalität ermittelt. 25 % der LRIG2-KO Mäuse starben innerhalb der ersten 24 Std. (Abb. 6). Die Ursache ist nach wie vor unbekannt und folgende Hypothese konnte ausgeschlossen werden: eine in adulten LRIG2-KO Mäusen entwickelte Speiseröhrenveränderung war bei den Neugeborenen nicht ersichtlich und die Lunge war histologisch unauffällig. Dementsprechend lag keine Aspirationspneumonie mit Todesfolge vor (Abb. 14). Die Neugeborenen waren vollständig entwickelt und unterschieden sich nicht von ihren Geschwistertieren. Verglichen mit den Kontrolltieren zeigten die LRIG2-KO Mäuse ab der ersten Lebenswoche ein signifikant (25 %) verringertes Körpergewicht. Dieser Gewichtsunterschied blieb bis zum Versuchsende (über 1 Jahr) erhalten (Abb. 7). Bei den LRIG2-KO Mäusen ließ sich zusätzlich ein reduziertes Körperwachstum von 5 bis 10 % im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten (Abb. 8). Dabei wurde jedoch keine direkte Korrelation mit dem verringerten Körpergewicht festgestellt (Abb. 9). Das reduzierte weiße Fettgewebe konnte als Ursache für das niedrigere Körpergewicht in LRIG2-KO Mäusen identifiziert werden. In adulten LRIG2-KO Mäusen ließ sich ein erhöhtes Ösophagus- und Harnblasengewicht messen. Die bereits veröffentlichte Knockout-Mauslinie für

LRIG2 beschrieb einen Gewichtsunterschied bis zur 12.-15. Lebenswoche und eine erhöhte Mortalität bis zur 8. Lebenswoche. Eine Analyse von Ösophagus, Harnblase und Fettgewebe wurde in dieser Studie nicht vorgenommen¹¹. Die publizierten Daten ähnelten unseren Befunden.

Die bei der Charakterisierung der LRIG2-KO Mäuse festgestellten Veränderungen der Speiseröhre, Harnblase und der weißen Fettdepots wurden in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

2. Veränderungen des Ösophagus

Der Ösophagus der LRIG2-KO Mäuse entwickelte in den ersten neun Lebenswochen eine Dilatation im Brust- und Bauchteil und eine Verdickung der Tunica muscularis, die in diesem Bereich aus longitudinaler und zirkulärer glatter Muskulatur aufgebaut ist⁵⁵ (Abb. 11). Eine Dilatation mit Parese oder Paralyse des Ösophagus, wird als Megaösophagus bezeichnet und kann in unterschiedlicher Weise ausgeprägt sein¹². Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Aufgabe LRIG2 in der glatten Muskulatur übernimmt. Allerdings könnte auch eine Veränderung der Innervation der glatten Muskulatur den Megaösophagus verursachen.

Die glatte Muskulatur der Tunica muscularis kann sich hypertrophisch oder hyperplastisch vermehrt haben (Abb. 12). Eine Hypertrophie entsteht durch eine erhöhte Beanspruchung der Muskulatur und/oder durch die Ausschüttung von Wachstumshormonen (Somatotropin) aus dem Hypothalamus^{111,112}. Dementgegen steht, dass LRIG2 die Zellproliferation in der glatten Muskulatur hemmen könnte und das Ausschalten dieses Proteins eine Muskelhyperplasie auslösen könnte.

Eine Dilatation des Ösophagus bei LRIG2-KO Mäusen könnte durch einen Defekt der afferenten Nervenbahnen¹¹³, eine Störung des enteralen Nervensystems der Ösophaguswand¹¹⁴ oder neuromuskuläre Veränderungen^{115,116} verursacht werden. Hierbei kann das periphere¹¹⁷ oder das autonome Nervensystem¹¹⁸ betroffen sein. Dysautonomie bewirkt eine Störung der parasympathischen Nerven, die den Ösophagus innervieren und wodurch ein Megaösophagus entstehen kann¹¹⁹. In LRIG2-KO Mäusen war neben dem Ösophagus auch die Harnblase dilatiert, deren glatte Wandmuskulatur und der Sphinkter ebenfalls vom Parasympathikus innerviert werden¹²⁰.

Eine Verdickung der Tunica muscularis steht im Widerspruch zu einer Muskelatrophie, verursacht durch Parese bei einer Megaösophaguserkrankung¹²¹. Die Ösophagusdilatation wird bei

LRIG2-KO Mäusen nicht durch eine Parese des Ösophagus verursacht. Bisher bekannte angeborene und erworbene Megaösophaguserkrankungen mit einer Hypomobilität können somit ausgeschlossen werden¹²². Weitere Ursachen einer Ösophagusdilatation, an deren Entwicklung der Verlust von LRIG2 beteiligt ist, wurden ausgeschlossen. Darunter eine Einengung des Ösophagus durch erworbene extraluminale Veränderungen¹¹⁴ und paraneoplastische oder gastrointestinale Erkrankungen⁵⁸.

Das Vorliegen einer Dilatation, die lediglich den distalen Ösophagusbereich betrifft, wie bei den LRIG2-KO Mäusen beobachtet, spricht für eine Störung der inhibitorischen Relaxation des distalen Ösophagus Sphinkters¹²³. Durch eine Ansammlung von Nahrung im distalen Ösophagus kommt es zur Dilatation in diesem Bereich. Dieses Krankheitsbild ist beim Menschen unter dem Namen Achalasie⁶² bekannt und kann eine Hypertrophie und/oder Hyperplasie der Längs- und Ringmuskulatur der glatten Muskeln der Speiseröhre zeigen¹²⁴⁻¹²⁶. Die Ösophagusveränderungen der LRIG2-KO Mäuse ähneln der Achalasie des Menschen, sowohl in der Lokalisation der Ösophagusdilatation, als auch in einer Verdickung der Tunica muscularis. Eine Verminderung, Degeneration, lokale Entzündungsreaktion oder ein Fehlen des Auerbach Plexus wurde bei LRIG2-KO Mäusen bisher nicht analysiert, diese könnten jedoch weitere Parallelen zur Achalasie des Menschen aufzeigen¹²⁷. Die Symptomatik Dysphagie mit Folge einer geringeren Futteraufnahme⁵⁷ wurde bei den LRIG2-KO Mäusen nicht beobachtet.

Zusammenfassend haben unsere Analysen gezeigt, dass LRIG2-KO Mäuse einen Megaösophagus entwickeln. Hierbei könnte die Erkrankung des autonomen Nervensystems eine wichtige Rolle einnehmen. Viele Parallelen konnten zu der beim Menschen beschriebenen Achalasie aufgezeigt werden. Unsere Ergebnisse implizieren, dass LRIG2 eine bedeutende Funktion in der Ösophagusmuskulatur und/oder ihrer Innervation einnimmt.

3. Veränderungen der Harnblase

Bei LRIG2-KO Mäusen wurde ein erhöhtes Harnblasengewicht, bedingt durch eine Größenzunahme des Organs festgestellt (Abb. 15). Gleichzeitig war das Volumendichteverhältnis der Wandschichten zueinander unverändert (Abb. 16). Es wurde eine erhöhte Phosphorylierung von mTOR und S6, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind, nachgewiesen. Der Apoptose Marker cleaved Caspase3 war ebenfalls erhöht (Abb. 17). Die Funktion von LRIG2 in der Harnblase sowie dessen Vorkommen in den verschiedenen

Blasenschichten konnte nicht aufgeklärt werden.

Eine vergrößerte Harnblase ohne Volumenveränderung der Muskulatur in LRIG2-KO Mäusen lässt ein Längenwachstum des Detrusor Muskels vermuten (Abb. 16). Zum einen könnte das Längenwachstum des Detrusor Muskels selbst die Dilatation verursacht haben, oder ein erhöhter Harnblaseninnendruck eine Dilatation bewirken. Der Verlust des LRIG2-Proteins könnte hier ebenso, wie bei der Speiseröhre, direkt in dem glatten Detrusor Muskel der Harnblase eine erhöhte Zellproliferation oder eine Störung der Harnblaseninnervation bewirken.

Eine Dilatation der Harnblase kann durch eine Harnblasenentleerungsstörung entstehen¹²⁸. Es kommt zu einer unvollständigen Harnblasenentleerung, bedingt durch eine gestörte Blasenkontraktilität, Blasenobstruktion oder Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie^{128,129}. Bisher konnte keine sichere Aussage über die Ursache der Blasendilatation bei LRIG2-KO Mäusen getroffen werden. Neben Veränderungen des Detrusor Muskels ist eine Innervationsstörung der Harnblase naheliegend und kann durch einen neuromuskulären Defekt entstehen¹³⁰. Die Urinabgabe bei LRIG2-KO Mäusen trat gehäuft und in kleinen Mengen auf und entspricht den Symptomen einer Überlaufsinkontinenz^{128,129}. Weitere Ursachen einer Harnblasendilatation konnten ausgeschlossen werden, darunter die Entwicklung von Harnsteinen¹³¹ sowie neoplastische Veränderungen der Harnblase¹³².

Die Harnblasenveränderungen in LRIG2-KO Mäusen stimmen in vielen Punkten mit dem beim Menschen beschriebenen Urofazialen Syndrom überein. Dieser Erkrankung liegt eine biallele Mutation des *LRIG2*-Gens zu Grunde, welche jedoch nicht mit einem Funktionsverlust des LRIG2-Proteins beschrieben ist⁴⁵. Bei LRIG2-KO Mäusen könnte die Blasendilatation ebenso wie beim Urofazialen Syndrom durch eine Detrusor-Sphinkter-Dyssynergie mit Folge eines Harnstaus entstehen^{133,134}. Zusätzlich konnten keine weiteren Veränderungen des Urofazialen Syndroms, darunter Harnwegsinfektionen, vesikoureteraler Reflux oder Hydronephrose in LRIG2-KO Mäusen festgestellt werden¹³⁴. Zwischen dem Urofazialen Syndrom der Harnblase und der Achalasie der Speiseröhren wurden einige Parallelen dokumentiert, darunter eine Verdickung des Muskels¹³⁵ und eine erhöhte Muskelaktivität^{45,136}. Dies führt zu der Annahme, dass LRIG2 eine Funktion im autonomen Nervensystem von Harnblase und Ösophagus erfüllt. Die Beteiligung von LRIG2 an der neuronalen Entwicklung der Harnblase bekräftigt die Vermutung⁴⁵.

Ebenfalls waren mTOR und S6 verstärkt in der Harnblase phosphoryliert (Abb. 17). Der mTOR Komplex 1 Signalweg reguliert S6, welches Zellwachstum und die Zellproliferation durch selektive Translation kontrolliert^{137,138}. Das S6 Protein ist ein Marker für neuronale Aktivität und spricht für eine Aktivierung der S6 Kinase¹³⁹. Diese konnte das Muskellängenwachstum bei einer passiven Dehnung des Soleus-Muskels fördern¹⁴⁰. Bei einer Blasenentleerungsstörung der LRIG2-KO Mäuse könnte die Druckerhöhung über eine erhöhte Aktivität der S6 Kinase das Detrusor Muskellängenwachstum anregen. Eine weitere Hypothese wäre, dass LRIG2 den mTOR Signalweg hemmt und durch Verlust von LRIG2 eine vermehrte Zellproliferation entsteht. Eine erhöhte Expression von cleaved Caspase3 in den Harnblasen von LRIG2-KO Mäusen steht der erhöhten Zellproliferation durch mTOR und S6 gegenüber. Als Regulator des programmierten Zelltods (Apoptose) markiert Caspase3 ein erhöhtes Zellsterben¹⁴¹. Allerdings lässt sich in Geweben mit erhöhter Zellproliferation ebenfalls häufig eine erhöhte Apoptoserate nachweisen¹⁴².

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust von LRIG2 eine Vergrößerung der Harnblase mit einer erhöhten Zellproliferation verursacht. Ein Wandlängenwachstum könnte für ein unverändertes Muskelvolumendichteverhältnis bei Größenzunahme der Harnblase verantwortlich sein.

4. Veränderungen des weißen Fettgewebes

Das weiße Fettgewebe erfüllt zwei wichtige Funktionen: Die Speicherung¹² von Lipiden und die Sekretion von Adipokinen (z.B. Leptin, Adiponin)⁸⁶. In LRIG2-KO Mäusen waren die subkutanen, testikulären und abdominalen, weißen Fettdepots signifikant verringert (Abb. 18). Gegenüber den Kontrolltieren zeigten sie keine veränderte Futteraufnahme, dennoch ein geringeres Körpergewicht (Abb. 7, 20). Im weißen Fettgewebe befanden sich Areale mit multivakuolären Adipozyten (Abb. 19). In einem diätetischen Adipositasmodell zeigten sie eine geringere Fetteinlagerung im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 31). Proteine der Zelldifferenzierung (PPARG), Wärmeproduktion (UCP1), Zellproliferation (ERBB3) und Hormone (Adiponektin) des Fettgewebes lagen bei LRIG2-KO Mäusen in einer erhöhten Konzentration vor. Hingegen war Adipophilin, ein Protein der Lipidspeicherung, kaum im weißen Fett vorhanden (Abb. 35). *In vitro* Analysen bestätigten eine Reduktion der Lipideinlagerung im weißen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse (Abb. 36). Es konnte gezeigt werden,

dass ein Verlust von LRIG2 eine reduzierte Einlagerung von Lipiden in weißem Fettgewebe bewirkt.

Als Ursache dieser geringen Fetteinlagerung konnte bereits eine verringerte Futteraufnahme ausgeschlossen werden (Abb. 20, 30). Die Kotproduktion und die scheinbare Verdaulichkeit im Kot waren unverändert (Abb. 21, 33). Analytierte Blutparameter, darunter Glukose, Triglyceride und ungesättigte Fettsäuren befanden sich im Normalbereich (Abb. 24). Dennoch ließ sich die Energie, in Form von Lipiden, auch nicht im weißen Fettgewebe der Knockout-Mäuse feststellen.

Ein erhöhter Stoffwechsel könnte die aufgenommene Energie verwerten und somit eine reduzierte Einlagerung von Lipiden bewirken. Hierbei produziert der Stoffwechsel Wärme¹⁴³. Eine Erhöhung der Körpertemperatur ließ sich bei den Knockout-Mäusen nicht feststellen (Abb. 26). Zusätzlich wurde eine niedrigere Körpertemperatur bei Kälteeinwirkung beobachtet (Abb. 27). Diese Reduzierung kann durch ein Energiedefizit mit verringerter Wärmeproduktion durch einen erhöhten Stoffwechsel entstehen¹⁴⁴. Die Körperoberflächentemperatur wurde mit einer Wärmebildkamera bestimmt, deren Sensitivität die minimalen Temperaturschwankungen nicht ausreichend erfasst haben könnte. Im Thermoregulationstest wurde die Körpertemperatur durch eine rektale Sonde bestimmt. Erhöhte Stressbedingungen können bei der Basaltemperaturbestimmung die Unterschiede zwischen den Körpertemperaturen der Tiere verschleiern. Eine sichere Methode minimale Temperaturschwankungen zu erkennen, wäre eine Erhebung der Körpertemperatur über einen gewissen Zeitrahmen. Dies ist mittels Stoffwechselkäfige möglich. Sie können unterschiedlichste Parameter, darunter die Körpertemperatur, den metabolischen Kohlenstoffdioxid und die Aktivität der Tiere über mehrere Tage erfassen¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Eine vermehrte Aktivität der LRIG2-KO Mäuse würde einen erhöhten Energieverbrauch bewirken und die Fettspeicherung reduzieren¹⁴⁸. Bisher konnte sowohl der erhöhte Stoffwechsel, als auch eine erhöhte Aktivität als Ursache der Fettveränderungen in LRIG2-KO Mäusen nicht ausgeschlossen werden.

Im abdominalen, weißen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse wurden Areale mit multivakuolären Adipozyten und eine erhöhte UCP1 Expression festgestellt (Abb. 19, 28). Diese führt zu der Annahme, dass sich beige Adipozyten im weißen Fettgewebe gebildet haben^{149,150}. Die beigen und weißen Fettzellen unterscheiden sich in ihrer Funktion. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe verstoffwechseln beige Fettzellen Lipide und Glukose zur Wärmebildung und

stellen keine Fettspeicher dar⁹¹. Eine erhöhte Wärmeproduktion ließ sich durch eine Erhöhung der Körpertemperatur in LRIG2-KO Mäusen bisher nicht feststellen. Weitere, sensitivere Analysen werden hierfür benötigt. Während einer HFD entwickelten LRIG2-KO Mäuse im Gegensatz zu den Kontrolltieren keine Adipositas (Abb. 29). Dies wird vermutlich über die erhöhte Energieverwertung durch UCP1 induzierte Wärmeproduktion der beigen Adipozyten erreicht^{91,96}. Dennoch vergrößerten sich die Adipozyten und die multivakuolären Regionen waren nur noch in geringen Maßen vorhanden oder vollständig verschwunden (Abb. 32). Zusätzlich ließ sich kein UCP1 Expressionsunterschied mehr nachweisen (Abb. 35B). Ausgelöst durch die HFD könnten sich die beigen Fettzellen in „maskierte“ beige Adipozyten, die morphologisch den weißen Adipozyten ähneln, umgewandelt haben. In diesen Adipozyten fehlt der Stimulus zur UCP1 Expression, wodurch die Wärmeproduktion eingestellt wird¹⁰⁵. Im abdominalen Fettgewebe der Knockout-Mäuse mit HFD wurden neben UCP1 noch weitere Proteine analysiert. Es zeigte sich eine erhöhte Konzentration des Proteins PPARG (Abb. 35A), welches auf eine gesteigerte Differenzierung der Adipozyten⁷⁷ und/oder eine gesteigerte Bildung von beigem Fettgewebe hinweist^{102,151}. Adipophilin hingegen wurde kaum im weißen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse nachgewiesen (Abb. 35C). Dies spricht für eine verminderte Akkumulation von Lipidtröpfchen¹⁵² und eine reduzierte Aufnahme von langkettigen Fettsäuren¹⁵³. Neben der geringen Lipidanreicherung lässt ein niedrigeres Adipophilin-Level, als Marker der Adipozytendifferenzierung¹⁵⁴, auf eine verminderte Differenzierung der Zellen schließen. Eine erhöhte Expression des inaktiven ERBB3 im abdominalen Fettgewebe der Knockouts spricht ebenso für eine reduzierte Zelldifferenzierung und zugleich für eine erhöhte Zellproliferation¹⁵⁵ (Abb. 35D). LRIG2 als direkter Regulator der ERBBs könnte wie LRIG1 die ERBBs destabilisieren und abbauen und damit die Zelle differenzieren^{24,156}. Es lag ein Expressionsunterschied von Adiponektin zwischen LRIG2-KO Mäusen und Kontrollmäusen vor (Abb. 35E). Eine geringe Expression in den Kontrolltieren könnte durch eine Dysregulation der Adipozytenfunktion, verursacht durch eine Vergrößerung des abdominalen Fettgewebes, entstehen¹⁵⁷. Dies würde eine Abnahme der Insulinsensitivität im Gewebe und eine Anreicherung von Entzündungsmediatoren in den Gefäßen bewirken¹⁵⁸.

Es entstand die Vermutung, dass LRIG2 an der Lipidspeicherung im Fettgewebe beteiligt sein könnte und somit eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt. Diese Annahme ließ sich mit einer *in vitro* Analyse bestärken. Für diese wurden Präadipozyten aus Knockout-Mäusen in der Zellkultur differenziert und unter

Insulingabe bildeten die Adipozyten Fettvakuolen (Abb. 36). Die Adipozyten der LRIG2-KO Mäuse unterscheiden sich gegenüber den Kontrollen durch eine reduzierte Fläche, sowie auch Anzahl an Lipidtröpfchen. Dies weist auf eine verminderte Aufnahme an Lipiden in die Adipozyten hin, sowie auf eine geringere Fusion der Lipidtröpfchen. Die *in vitro* Analyseergebnisse des inguinalen Fettgewebes stimmten mit den *in vivo* Veränderungen der LRIG2-KO Mäuse überein. Allerdings müssen zur Entschlüsselung der Funktion von LRIG2 in Adipozyten noch weitere *in vitro* Analysen durchgeführt werden.

In anderen Mausmodellen wurden bereits multivakuolären Adipozyten im weißen Fettgewebe beschrieben. Bei einem miR-155-KO Mausmodell zeigte sich eine erhöhte braune Adipozytendifferenzierung im braunen Fettgewebe und das inguinale weiße Fettgewebe wies eine sogenannten „Bräunung“ auf¹⁵⁹. Ähnliche Veränderungen zeigten sich in BMP4 transgenen Mäusen¹⁶⁰. Diese wiesen im braunen Fettgewebe eine erhöhte Anzahl von stromalen vaskulärem Gewebe (SVF-Zellen) und Adipozyten im subkutanen und braunen Fettgewebe auf. Das gonadale Fettgewebe war reduziert und im inguinalen und gonadalen Fettgewebe befanden sich multivakuoläre Zellen¹⁶⁰. In *folliculin* (FLCN) adipo-KO Mäusen bewirkte eine reduzierte Konzentration von FLCN im inguinalen Fettgewebe die Bildung von multivakuolären Fettzellen¹⁶¹. In den hier beschriebenen Mauslinien zeigte sich meist eine Fettveränderung im inguinalen Fettgewebe, nur bei der BMP4 transgenen Maus scheint auch das gonadale Fettgewebe betroffen. Hingegen ist in LRIG2-KO Mäusen der multivakuoläre Fettphänotyp am stärksten im abdominalen Fettgewebe ausgeprägt. Dennoch ähneln die multivakuolären Fettveränderungen in den genannten Mauslinien den Veränderungen unserer LRIG2-KO Mäuse.

Die Ergebnisse der Fettdepotanalysen zeigten, dass ein Verlust des LRIG2-Proteins zu einer verminderten Einlagerung von Lipiden in den Fettdepots führt. Ein erhöhter Stoffwechsel oder eine erhöhte Aktivität der Tiere konnten als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Die erzielten Proteinexpressionsanalysen sprechen für eine reduzierte Lipideinlagerung und eine geringere Zelldifferenzierung im weißen Fettgewebe der LRIG2-KO Mäuse. Dies lässt uns annehmen, dass das LRIG2-Protein am Lipidstoffwechsel beteiligt sein könnte. Der Nachweis einer geringeren Lipideinlagerung in der Primärzellkultur verstärkt diese Vermutung, zugleich könnte es die Bildung von beigen Adipozyten hemmen und ihre Differenzierung verhindern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung einer Knockout-Maus für LRIG2

In der vorliegenden Dissertation wurde eine Knockout-Mauslinie für das Protein LRIG2 generiert und charakterisiert. Der Verlust von LRIG2 führte in den Mäusen zu Veränderungen im Ösophagus, in der Harnblase und im weißen Fettgewebe. Diese Veränderungen lassen Rückschlüsse auf die Funktion von LRIG2 in diesen Organen und Geweben zu.

Das Protein LRIG2 ist ein Mitglied der LRIG-Familie. Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 132 kDA. LRIG2 wird in den einzelnen Organen und Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Bisher konnte in allen untersuchten Organen eine Expression von LRIG2 nachgewiesen werden. LRIG2 kann als positiver Regulator von verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen und in Tumoren sowohl als Tumorsuppressor wie auch als Onkoprotein agieren. LRIG2 unterscheidet sich von LRIG1 dadurch, dass dieses als negativer Regulator von Rezeptor-Tyrosinkinase identifiziert wurde. LRIG3 hingegen kann sowohl als positiver als auch negativer Regulator auftreten.

Die ubiquitären Knockout-Mäuse wurden über Stammzellinjektion in Blastozysten generiert. Der Verlust von *Lrig2* ließ sich auf RNA Ebene bestätigen. Verglichen mit den Kontrolltieren starben in den ersten 24 Std. 25 % der neugeborenen LRIG2-KO Mäuse. Die Knockout-Mäuse zeigten ab der ersten Lebenswoche ein verringertes Körpergewicht, das nicht mit der reduzierten Körpergröße korrelierte. Das geringe Körpergewicht ließ sich auf einen geringeren Körperfettanteil zurückführen. Die subkutanen, testikulären und abdominalen Fettgewebe waren absolut und relativ signifikant reduziert. Zusätzlich wurde ein erhöhtes Organgewicht bei der Speiseröhre und der Harnblase festgestellt.

Der Ösophagus von adulten LRIG2-KO Mäusen zeigte eine Dilatation und eine Verdickung der Tunica Muscularis im abdominalen Teil. Trotz Megaösophagus blieb die Nahrungsaufnahme unbeeinflusst. Es ließen sich Parallelen zu der Achalasie des Menschen zeigen. In neugeborenen Knockout-Mäusen war die Speiseröhre noch unverändert und die Trachea und Lunge zeigten auch keine Veränderungen. Eine Aspirationspneumonie, als Ursache für die erhöhte Mortalität in den ersten 24 Std., konnte ausgeschlossen werden.

Adulte LRIG2-KO Mäuse zeigten eine Vergrößerung der Harnblase mit gleichzeitiger, erhöhter Zellproliferation und Apoptose. Die

Harnblasenveränderungen zeigen Parallelen zum Urofazialen Syndrom des Menschen auf, bei dem häufig eine biallelische Mutation im *LRIG2*-Gen nachgewiesen wird.

Die weißen Fettdepots der *LRIG2*-KO Mäuse waren signifikant reduziert. Die Adipozytengröße war verringert und es fanden sich Areale mit multivakuolären Fettzellen. Eine erhöhte UCP1 Expression lag im abdominalen Fettgewebe der *LRIG2*-KO Mäuse vor, die mit Kontrolldiät gefüttert wurden. Es ließ sich eine reduzierte Lipideinlagerung dokumentieren. Als Ursache der Veränderungen im Fettgewebe konnten eine reduzierte Futteraufnahme und Verdaulichkeit im Darm ausgeschlossen werden. Ebenso waren Blut- und Plasmawerte ohne Befund. Ein Körpertemperaturunterschied konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Der Verlust des *LRIG2*-Proteins führt zur Entwicklung von beigen Adipozyten, die Lipide und Glukose zur Wärmeproduktion verstoffwechseln, wodurch die Mäuse vor Adipositas geschützt sind. Die erhöhte Mortalität neugeborener *LRIG2*-KO Mäuse während der ersten 24 Stunden könnte durch einen erhöhten Anteil an braunen / beigen Fettgewebe mit einem Anstieg des Energieverbrauchs erklärt werden. Das Protein könnte an der Lipidresorption in den Adipozyten oder an der Adipozytendifferenzierung beteiligt sein. Es könnte ebenfalls als Regulator der Zellproliferation agieren und somit einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung haben. Alle erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass *LRIG2* für die Fettspeicherung in Fettzellen, und für die Differenzierung von Adipozyten wichtig ist.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der Verlust von *LRIG2* zu Veränderungen im weißen Fettgewebe, Ösophagus und der Harnblase führt. Weitere Analysen wären allerdings notwendig, um die Funktion von *LRIG2* endgültig zu klären. Durch seine Wirkung auf die Lipideinlagerung und Zellproliferation rückt *LRIG2* stark in den Fokus der Adipositasforschung.

VI. SUMMARY

Characterization of a knockout mouse for LRIG2

In this doctoral thesis a knockout mouse line for LRIG2 was generated and characterized. The knockout mice show changes in the esophagus, urinary bladder and adipose tissue. Based on these changes conclusions are drawn concerning the function of LRIG2 in these organs.

The LRIG2 protein is a member of the LRIG family. This glycoprotein has a molecular weight of 132 kDa. LRIG2 is expressed in different levels in the individual organs and tissues. Hitherto an expression has been detected in all organs examined. LRIG2 can act as a positive regulator of the receptor tyrosine kinases and in tumors as a tumor suppressor as well as an oncoprotein. LRIG2 differs from LRIG1, which has been identified as a negative regulator of receptor tyrosine kinases. LRIG3 can act both as a positive as well a negative regulator.

The ubiquitous knockout mice were generated via stem cell injection into blastocysts. The loss of *Lrig2* was detected on the RNA level. Compared to control animals, 25 % of the newborn LRIG2-KO mice died in the first 24 hours. From the 1st week of life, the knockout mice showed a reduced body weight, which did not correlate with the reduced body size. The low body weight could be attributed to a lower body fat percentage. The subcutaneous, testicular and abdominal adipose tissues were absolutely and relatively significantly reduced. Additionally, an increased organ weight was found in case of the esophagus and the bladder.

The esophagus of adult LRIG2-KO mice was dilated and the tunica muscularis was thickened in the abdominal part. The megaesophagus did not affect the mice's food intake. There were parallels to achalasia in humans. In newborn knockout mice, the esophagus was unaffected, and neither trachea nor lungs showed any morphological changes. Hence, the increased mortality within the first 24 hours was not caused by an aspiration pneumonia.

Adult LRIG2-KO mice displayed an enlargement of the urinary bladder with an increased cell proliferation and apoptosis. The bladder changes show parallels to the urofacial syndrome in humans, which can exhibit a biallelic mutation of the *LRIG2* gene.

The white fat depots of LRIG2-KO mice were significantly reduced. The adipocyte size was reduced and areas with multivacuolar fat cells were found. An increased

UCP1 expression was present in the abdominal adipose tissue of LRIG2-KO mice receiving control diet. Reduced lipid storage was recorded. A reduced feed intake and digestibility in the intestine could be excluded as a cause of the adipose tissue changes. The blood and plasma values were without pathological findings. Also, a change in body temperature could not be determined. The knockout of LRIG2 leads to the development of beige adipocytes, which metabolize lipids and glucose for heat production and thereby protect mice against obesity. The increased mortality of newborn LRIG2-KO mice during the first 24 hours might be explained by the increased proportion of brown / beige adipose tissue cells with an increase in energy consumption. Hereto, further investigations must be carried out. Up to now, no certain statement can be made about the occurrence and the function of LRIG2 in white adipose tissue. The protein might be involved in lipid absorption in the adipocytes or in adipocyte differentiation. It could act as a regulator of cell proliferation and influence the cell differentiation. All findings indicate that LRIG2 has a function in fat storage of adipocytes.

In summary, this doctoral thesis showed that LRIG2 plays an essential role in different cell tissues. Further analyses regarding white adipose tissue, smooth muscles and the nervous system must be obtained. Furthermore, in vitro analyses may confirm the hypothesis that LRIG2 is “key” for the lipid storage in adipocytes. Based on its effect on lipid storage and cell proliferation, LRIG2 is pivotal for obesity research.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 von Heijne, G. The membrane protein universe: what's out there and why bother? *Journal of internal medicine* **261**, 543-557 (2007).
- 2 Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* **28**, 235-242 (2000).
- 3 Koehler Lemann, J., Ulmschneider, M. B. & Gray, J. J. Computational modeling of membrane proteins. *Proteins* **83**, 1-24 (2015).
- 4 Goldoni, S., Iozzo, R. A., Kay, P., Campbell, S., McQuillan, A., Agnew, C., Zhu, J. X., Keene, D. R., Reed, C. C. & Iozzo, R. V. A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity. *Oncogene* **26**, 368-381 (2007).
- 5 Suh, D. S., Park, S. E., Jin, H., Lee, K. & Bae, J. LRIG2 is a growth suppressor of Hec-1A and Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells by regulating PI3K/AKT- and EGFR-mediated apoptosis and cell-cycle. *Oncogenesis* **7**, 3 (2018).
- 6 Guo, D., Yang, H., Guo, Y., Xiao, Q., Mao, F., Tan, Y., Wan, X., Wang, B. & Lei, T. LRIG3 modulates proliferation, apoptosis and invasion of glioblastoma cells as a potent tumor suppressor. *J Neurol Sci* **350**, 61-68 (2015).
- 7 Holmlund, C., Nilsson, J., Guo, D., Starefeldt, A., Golovleva, I., Henriksson, R. & Hedman, H. Characterization and tissue-specific expression of human LRIG2. *Gene* **332**, 35-43 (2004).
- 8 Xiao, Q., Dong, M., Cheng, F., Mao, F., Zong, W., Wu, K., Wang, H., Xie, R., Wang, B., Lei, T. & Guo, D. LRIG2 promotes the proliferation and cell cycle progression of glioblastoma cells in vitro and in vivo through enhancing PDGFRbeta signaling. *Int J Oncol* **53**, 1069-1082 (2018).

- 9 Mao, F., Wang, B., Xiao, Q., Cheng, F., Lei, T. & Guo, D. LRIG proteins in glioma: Functional roles, molecular mechanisms, and potential clinical implications. *J Neurol Sci* **383**, 56-60 (2017).
- 10 Chen, W., Zhang, J., Xu, H., Dai, J. & Zhang, X. The negative regulation of miR-149-5p in melanoma cell survival and apoptosis by targeting LRIG2. *Am J Transl Res* **9**, 4331-4340 (2017).
- 11 Rondahl, V., Holmlund, C., Karlsson, T., Wang, B., Faraz, M., Henriksson, R. & Hedman, H. Lrig2-deficient mice are protected against PDGFB-induced glioma. *PloS one* **8**, e73635 (2013).
- 12 Salomon, F., Geyer, H. & Gille, U. Anatomie für die Tiermedizin. 3 edn, Georg Thieme, 39, 284, 389 (2015).
- 13 Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
- 14 Suzuki, Y., Sato, N., Tohyama, M., Wanaka, A. & Takagi, T. cDNA cloning of a novel membrane glycoprotein that is expressed specifically in glial cells in the mouse brain. LIG-1, a protein with leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains. *The Journal of biological chemistry* **271**, 22522-22527 (1996).
- 15 Nilsson, J., Vallbo, C., Guo, D., Golovleva, I., Hallberg, B., Henriksson, R. & Hedman, H. Cloning, Characterization, and expression of human LIG1. *Biochem Biophys Res Commun* **284**, 1155-1161 (2001).
- 16 Guo, D., Holmlund, C., Henriksson, R. & Hedman, H. The LRIG gene family has three vertebrate paralogs widely expressed in human and mouse tissues and a homolog in Ascidiacea. *Genomics* **84**, 157-165 (2004).
- 17 Simion, C., Cedano-Prieto, M. E. & Sweeney, C. The LRIG family: enigmatic regulators of growth factor receptor signaling. *Endocr Relat Cancer* **21**, R431-443 (2014).

- 18 Hedman, H., Nilsson, J., Guo, D. & Henriksson, R. Is *LRIG1* a tumour suppressor gene at chromosome 3p14.3? *Acta Oncol* **41**, 352-354 (2002).
- 19 Nilsson, J., Starefeldt, A., Henriksson, R. & Hedman, H. LRIG1 protein in human cells and tissues. *Cell Tissue Res* **312**, 65-71 (2003).
- 20 Reifenberger, G., Ichimura, K., Reifenberger, J., Elkahlon, A. G., Meltzer, P. S. & Collins, V. P. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* **56**, 5141-5145 (1996).
- 21 Abaira, V. E., Satoh, T., Fekete, D. M. & Goodrich, L. V. Vertebrate Lrig3-ErbB interactions occur in vitro but are unlikely to play a role in Lrig3-dependent inner ear morphogenesis. *PLoS one* **5**, e8981 (2010).
- 22 Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G., Hedman, H., Wides, R. & Yarden, Y. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *The EMBO journal* **23**, 3270-3281 (2004).
- 23 Laederich, M. B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K. L., 3rd & Sweeney, C. The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* **279**, 47050-47056 (2004).
- 24 Simion, C., Cedano-Prieto, M. E. & Sweeney, C. The LRIG family: enigmatic regulators of growth factor receptor signaling. *Endocrine-related cancer* **21**, R431-R443 (2014).
- 25 Stutz, M. A., Shattuck, D. L., Laederich, M. B., Carraway, K. L., 3rd & Sweeney, C. LRIG1 negatively regulates the oncogenic EGF receptor mutant EGFRvIII. *Oncogene* **27**, 5741-5752 (2008).

- 26 Shattuck, D. L., Miller, J. K., Laederich, M., Funes, M., Petersen, H., Carraway, K. L., 3rd & Sweeney, C. LRIG1 is a novel negative regulator of the Met receptor and opposes Met and Her2 synergy. *Mol Cell Biol* **27**, 1934-1946 (2007).
- 27 Ledda, F., Bieraugel, O., Fard, S. S., Vilar, M. & Paratcha, G. Lrig1 is an endogenous inhibitor of Ret receptor tyrosine kinase activation, downstream signaling, and biological responses to GDNF. *J Neurosci* **28**, 39-49 (2008).
- 28 Burden, S. & Yarden, Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* **18**, 847-855 (1997).
- 29 Dammann, C. E., Nielsen, H. C. & Carraway, K. L., 3rd. Role of neuregulin-1 beta in the developing lung. *Am J Respir Crit Care Med* **167**, 1711-1716 (2003).
- 30 Carraway, K. L., Carraway, C. A. & Carraway, K. L., 3rd. Roles of ErbB-3 and ErbB-4 in the physiology and pathology of the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2**, 187-198 (1997).
- 31 Rafidi, H., Mercado, F., 3rd, Astudillo, M., Fry, W. H., Saldana, M., Carraway, K. L., 3rd & Sweeney, C. Leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein-1 (Lrig1) negative regulatory action toward ErbB receptor tyrosine kinases is opposed by leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing protein 3 (Lrig3). *The Journal of biological chemistry* **288**, 21593-21605 (2013).
- 32 Jensen, K. B., Collins, C. A., Nascimento, E., Tan, D. W., Frye, M., Itami, S. & Watt, F. M. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell* **4**, 427-439 (2009).
- 33 Kuruvilla, J. G., Ghaleb, A. M., Bialkowska, A. B., Nandan, M. O. & Yang, V. W. Role of Kruppel-like factor 5 in the maintenance of the stem cell niche in the intestinal crypt. *Stem Cell Transl Investig* **2**, e839 (2015).

- 34 Yang, B., Dai, C., Tan, R., Zhang, B., Meng, X., Ye, J., Wang, X., Wei, L., He, F. & Chen, Z. Lrig1 is a positive prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* **9**, 7071-7079 (2016).
- 35 Wong, V. W., Stange, D. E., Page, M. E., Buczacki, S., Wabik, A., Itami, S., van de Wetering, M., Poulsom, R., Wright, N. A., Trotter, M. W., Watt, F. M., Winton, D. J., Clevers, H. & Jensen, K. B. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nature cell biology* **14**, 401-408 (2012).
- 36 Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., Higginbotham, J. N., Juchheim, A., Prasad, N., Levy, S. E., Guo, Y., Shyr, Y., Aronow, B. J., Haigis, K. M., Franklin, J. L. & Coffey, R. J. The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell* **149**, 146-158 (2012).
- 37 Lindquist, D., Alsina, F. C., Herdenberg, C., Larsson, C., Hoppener, J., Wang, N., Paratcha, G., Tarjan, M., Tot, T., Henriksson, R. & Hedman, H. LRIG1 negatively regulates RET mutants and is downregulated in thyroid cancer. *Int J Oncol* **52**, 1189-1197 (2018).
- 38 Torigoe, H., Yamamoto, H., Sakaguchi, M., Youyi, C., Namba, K., Sato, H., Shien, K., Soh, J., Suzawa, K., Tomida, S., Tsukuda, K., Miyoshi, S. & Toyooka, S. Tumor-suppressive effect of LRIG1, a negative regulator of ErbB, in non-small cell lung cancer harboring mutant EGFR. *Carcinogenesis* **39**, 719-727 (2018).
- 39 Yang, W. M., Yan, Z. J., Ye, Z. Q. & Guo, D. S. *LRIG1*, a candidate tumour-suppressor gene in human bladder cancer cell line BIU87. *BJU Int* **98**, 898-902 (2006).
- 40 Muller, S., Lindquist, D., Kanter, L., Flores-Staino, C., Henriksson, R., Hedman, H. & Andersson, S. Expression of LRIG1 and LRIG3 correlates with human papillomavirus status and patient survival in cervical adenocarcinoma. *Int J Oncol* **42**, 247-252 (2013).

- 41 Zhao, H., Tanegashima, K., Ro, H. & Dawid, I. B. Lrig3 regulates neural crest formation in *Xenopus* by modulating Fgf and Wnt signaling pathways. *Development* **135**, 1283-1293 (2008).
- 42 Yang, H. K., Chen, H., Mao, F., Xiao, Q. G., Xie, R. F. & Lei, T. Downregulation of LRIG2 expression inhibits angiogenesis of glioma via EGFR/VEGF-A pathway. *Oncol Lett* **14**, 4021-4028 (2017).
- 43 van Erp, S., van den Heuvel, D. M. A., Fujita, Y., Robinson, R. A., Hellemons, A., Adolfs, Y., Van Battum, E. Y., Blokhuis, A. M., Kuijpers, M., Demmers, J. A. A., Hedman, H., Hoogenraad, C. C., Siebold, C., Yamashita, T. & Pasterkamp, R. J. Lrig2 Negatively Regulates Ectodomain Shedding of Axon Guidance Receptors by ADAM Proteases. *Dev Cell* **35**, 537-552 (2015).
- 44 Bai, H., Sun, Y., Liu, N., Liu, Y., Xue, F., Li, Y., Xu, S., Ni, A., Ye, J., Chen, Y. & Chen, J. Genome-wide detection of CNVs associated with beak deformity in chickens using high-density 600K SNP arrays. *Anim Genet* **49**, 226-236 (2018).
- 45 Stuart, H. M., Roberts, N. A., Burgu, B., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Bhaskar, S., Dickerson, J. E., Mermerkaya, M., Silay, M. S., Lewis, M. A., Olondriz, M. B., Gener, B., Beetz, C., Varga, R. E., Gulpinar, O., Suer, E., Soygur, T., Ozcakar, Z. B., Yalcinkaya, F., Kavaz, A., Bulum, B., Gucuk, A., Yue, W. W., Erdogan, F., Berry, A., Hanley, N. A., McKenzie, E. A., Hilton, E. N., Woolf, A. S. & Newman, W. G. LRIG2 mutations cause urofacial syndrome. *American journal of human genetics* **92**, 259-264 (2013).
- 46 Lindquist, D., Nasman, A., Tarjan, M., Henriksson, R., Tot, T., Dalianis, T. & Hedman, H. Expression of LRIG1 is associated with good prognosis and human papillomavirus status in oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* **110**, 1793-1800 (2014).
- 47 Guo, D., Nilsson, J., Haapasalo, H., Raheem, O., Bergenheim, T., Hedman, H. & Henriksson, R. Perinuclear leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domain proteins (LRIG1-3) as prognostic indicators in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol* **111**, 238-246 (2006).

- 48 Holmlund, C., Haapasalo, H., Yi, W., Raheem, O., Brannstrom, T., Bragge, H., Henriksson, R. & Hedman, H. Cytoplasmic LRIG2 expression is associated with poor oligodendroglioma patient survival. *Neuropathology* **29**, 242-247 (2009).
- 49 Suzuki, Y., Miura, H., Tanemura, A., Kobayashi, K., Kondoh, G., Sano, S., Ozawa, K., Inui, S., Nakata, A., Takagi, T., Tohyama, M., Yoshikawa, K. & Itami, S. Targeted disruption of *LIG-1* gene results in psoriasiform epidermal hyperplasia. *FEBS Lett* **521**, 67-71 (2002).
- 50 Abraira, V. E., Del Rio, T., Tucker, A. F., Slonimsky, J., Keirnes, H. L. & Goodrich, L. V. Cross-repressive interactions between *Lrig3* and *netrin 1* shape the architecture of the inner ear. *Development* **135**, 4091-4099 (2008).
- 51 Hellstrom, M., Ericsson, M., Johansson, B., Faraz, M., Anderson, F., Henriksson, R., Nilsson, S. K. & Hedman, H. Cardiac hypertrophy and decreased high-density lipoprotein cholesterol in *Lrig3*-deficient mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **310**, R1045-1052 (2016).
- 52 Del Rio, T., Nishitani, A. M., Yu, W. M. & Goodrich, L. V. In vivo analysis of *Lrig* genes reveals redundant and independent functions in the inner ear. *PLoS Genet* **9**, e1003824 (2013).
- 53 Sivarao, D. V. & Goyal, R. K. Functional anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. *Am J Med* **108 Suppl 4a**, 27s-37s (2000).
- 54 Farre, R. & Sifrim, D. Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorders. *Br J Pharmacol* **153**, 858-869 (2008).
- 55 Liebich, H. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. *Schattauer*, 77-79, 211-213 (2010).

- 56 Goyal, R. K. & Chaudhury, A. Physiology of normal esophageal motility. *J Clin Gastroenterol* **42**, 610-619 (2008).
- 57 Wolf, D. C. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Chapter 82 Dysphagia. *Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing* (1990).
- 58 Mace, S., Shelton, G. D. & Eddlestone, S. Megaesophagus. *Compendium (Yardley, PA)* **34**, E1 (2012).
- 59 Nelson, R. W. & Couto, C. G. Innere Medizin der Kleintiere. 2 edn. *Urban & Fischer in Elsevier*, 439-440 (2010).
- 60 Bull, P. N. SO-CALLED IDIOPATHIC DILATATION OF THE OESOPHAGUS: SYNONYMS: DILATATIO FUSIFORMIS OESOPHAGI, CARDIOSPASMUS, MEGAOESOPHAGUS FIVE CASES, OF WHICH FOUR HAVE BEEN TREATED BY MEANS OF OESOPHAGO-GASTROSTOMIA SUBDIAPHRAGMATICA. *Ann Surg* **81**, 59-93 (1925).
- 61 Cosentini, E. P., Wenzl, E. & Jakesz, R. Behandlung der Achalasie. *Wiener Klinische Wochenschrift* **116**, 296-304 (2004).
- 62 Ates, F. & Vaezi, M. F. The Pathogenesis and Management of Achalasia: Current Status and Future Directions. *Gut Liver* **9**, 449-463 (2015).
- 63 Greten, H., Rinninger, F. & Greten, T. Innere Medizin. 13 edn, *Georg Thieme*, 689 (2010).
- 64 Pang, J., Borjeson, T. M., Muthupalani, S., Ducore, R. M., Carr, C. A., Feng, Y., Sullivan, M. P., Cristofaro, V., Luo, J., Lindstrom, J. M. & Fox, J. G. Megaesophagus in a line of transgenic rats: a model of achalasia. *Vet Pathol* **51**, 1187-1200 (2014).
- 65 Fry, C. H. & Vahabi, B. The Role of the Mucosa in Normal and Abnormal Bladder Function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **119 Suppl 3**, 57-62 (2016).

- 66 Griffiths, D. J., Constantinou, C. E. & van Mastrigt, R. Urinary bladder function and its control in healthy females. *The American journal of physiology* **251**, R225-230 (1986).
- 67 Andersson, K. E. & Wein, A. J. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacol Rev* **56**, 581-631 (2004).
- 68 Beckel, J. M. & Holstege, G. Neurophysiology of the lower urinary tract. *Handb Exp Pharmacol*, 149-169 (2011).
- 69 de Groat, W. C. & Yoshimura, N. Anatomy and physiology of the lower urinary tract. *Handbook of clinical neurology* **130**, 61-108 (2015).
- 70 Lewis, S. A. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F867-874 (2000).
- 71 Hauner, H., Buchholz, G., Hamann, A., Husemann, B., Koletzko, B., Liebermeister, H., Wabitsch, M., Westenhöfer, J., Wirth, A. & Wolfram, G. Adipositas und Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel* **6**, 137 (2011).
- 72 Wirth, A. Adipositas-Fibel. *Springer-Verlag*, 2 (2012).
- 73 Schienkiewitz, A., Brettschneider, A.-K., Damerow, S. & Rosario, A. S. Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Jornal of Health Monitoring*, 16-19 (2018).
- 74 Pond, C. M. & Mattacks, C. A. The anatomy of adipose tissue in captive Macaca monkeys and its implications for human biology. *Folia Primatologica* **48**, 164-185 (1987).
- 75 Hausman, D. B., DiGirolamo, M., Bartness, T. J., Hausman, G. J. & Martin, R. J. The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* **2**, 239-254 (2001).

- 76 Prins, J. B. & O'Rahilly, S. Regulation of adipose cell number in man. *Clinical science* **92**, 3-11 (1997).
- 77 Hamm, J. K., el Jack, A. K., Pilch, P. F. & Farmer, S. R. Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake. *Annals of the New York Academy of Sciences* **892**, 134-145 (1999).
- 78 Bukowiecki, L., Collet, A. J., Follea, N., Guay, G. & Jahjah, L. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *The American journal of physiology* **242**, E353-359 (1982).
- 79 Cinti, S. The adipose organ. *Kurtis Milan*, 9-15 (1999).
- 80 Cinti, S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 9-15 (2005).
- 81 Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., Hara, M., Nawata, T., Katsuragi, I. & Yoshimatsu, H. Dual regulatory effects of orexins on sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Endocrinology* **146**, 2744-2748 (2005).
- 82 De Matteis, R., Ricquier, D. & Cinti, S. TH-, NPY-, SP-, and CGRP-immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study. *J Neurocytol* **27**, 877-886 (1998).
- 83 Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S. & Hirsch, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *The American journal of physiology* **235**, E279-286 (1978).
- 84 Bjorntorp, P. Adipose tissue distribution and function. *International journal of obesity* **15 Suppl 2**, 67-81 (1991).
- 85 Ahima, R. S. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **11**, 327-332 (2000).

- 86 Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 2548-2556 (2004).
- 87 Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* **92**, 347-355 (2004).
- 88 Cannon, B., Hedin, A. & Nedergaard, J. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett* **150**, 129-132 (1982).
- 89 Cinti, S., Zancanaro, C., Sbarbati, A., Cicolini, M., Vogel, P., Ricquier, D. & Fakan, S. Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. *Biol Cell* **67**, 359-362 (1989).
- 90 Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F. & Ricquier, D. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem* **23**, 791-801 (1991).
- 91 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359 (2004).
- 92 Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M. & Collins, S. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* **24**, 3057-3067 (2004).
- 93 Geloën, A., Collet, A. J., Guay, G. & Bukowiecki, L. J. Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation. *The American journal of physiology* **254**, C175-182 (1988).
- 94 Meyer, C. W., Willershauser, M., Jastroch, M., Rourke, B. C., Fromme, T., Oelkrug, R., Heldmaier, G. & Klingenspor, M. Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **299**, R1396-1406 (2010).

- 95 Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini, M. P., Kershaw, E. E., Barbatelli, G. & Haemmerle, G. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of lipid research*, jlr. M079665 (2018).
- 96 Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K. & Kozak, L. P. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *The Journal of clinical investigation* **102**, 412-420 (1998).
- 97 Ishibashi, J. & Seale, P. Medicine. Beige can be slimming. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 1113-1114 (2010).
- 98 Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M. & Kahn, C. R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* **360**, 1509-1517 (2009).
- 99 Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A. & Kolodny, G. M. Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell metabolism* **21**, 33-38 (2015).
- 100 Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y. & Tsujisaki, M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531 (2009).
- 101 Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* **19**, 1252 (2013).
- 102 Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M. & Kajimura, S. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell metabolism* **15**, 395-404 (2012).

- 103 Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., Sparks, C. A., Tang, Y., Li, H. & Guertin, D. A. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell metabolism* **16**, 348-362 (2012).
- 104 Lee, Y. H., Petkova, A. P., Konkar, A. A. & Granneman, J. G. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 286-299 (2015).
- 105 Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation. *Cell metabolism* **22**, 546-559 (2015).
- 106 Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. & Scherer, P. E. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* **19**, 1338-1344 (2013).
- 107 Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M. J., Morgan, D., Csikasz, R. I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., Lopez, M. & Vidal-Puig, A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871-885 (2012).
- 108 Lee, P., Linderman, J. D., Smith, S., Brychta, R. J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R. M., Werner, C. D., Phan, G. Q. & Kammula, U. S. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell metabolism* **19**, 302-309 (2014).
- 109 Wang, G. X., Zhao, X. Y., Meng, Z. X., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., Cozacov, Z., Zhou, D., Okunade, A. L., Su, X., Li, S., Bluher, M. & Lin, J. D. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat Med* **20**, 1436-1443 (2014).
- 110 VDLUFA. Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. *VDLZDA-Verlag* (2012).

- 111 Caicedo, D., Díaz, O., Devesa, P. & Devesa, J. Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System. *International journal of molecular sciences* **19**, 290 (2018).
- 112 Marcotte, G. R., West, D. W. & Baar, K. The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *Calcified tissue international* **96**, 196-210 (2015).
- 113 Washabau, R. J. Gastrointestinal motility disorders and gastrointestinal prokinetic therapy. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **33**, 1007-1028, vi (2003).
- 114 Grünbaum, E. & Schimke, E. Klinik der Hundekrankheiten. 3 edn, *Enke Verlag*, 471 (2006).
- 115 Shelton, G. D. Myasthenia gravis and disorders of neuromuscular transmission. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **32**, 189-206 (2002).
- 116 Evans, J., Levesque, D. & Shelton, G. D. Canine inflammatory myopathies: a clinicopathologic review of 200 cases. *Journal of veterinary internal medicine* **18**, 679-691 (2004).
- 117 Kohn, B. & Schwarz, G. Pratikum der Hundeklinik. 12 edn, *Enke Verlag*, 685-686 (2017).
- 118 Goldstein, D. S., Robertson, D., Esler, M., Straus, S. E. & Eisenhofer, G. Dysautonomias: clinical disorders of the autonomic nervous system. *Annals of internal medicine* **137**, 753-763 (2002).
- 119 J.M., S. *Gastroenterologie bei Hund und Katze: Klinik-Diagnostik-Therapie*. *Schlutersche Verlagsgesellschaft*, 152 (2010).
- 120 Glaus, T. What is your diagnosis? Key-Gaskell syndrome. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* **131**, 129-131 (1989).

- 121 Bodine, S. C. Disuse-induced muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 2200-2208 (2013).
- 122 Bexfield, N. H., Watson, P. J. & Herrtage, M. E. Esophageal dysmotility in young dogs. *Journal of veterinary internal medicine* **20**, 1314-1318 (2006).
- 123 Richards, W. G. & Sugarbaker, D. J. Neuronal control of esophageal function. *Chest surgery clinics of North America* **5**, 157-171 (1995).
- 124 Appel, S. *Über histologische Befunde am Speiseröhrengewebe bei der Achalasie (Sogenannter Kardiospasmus)*, *Imu*, 72 (1966).
- 125 West, R., Hirsch, D., Bartelsman, J., de Borst, J., Ferwerda, G., Tytgat, G. & Boeckxstaens, G. Long term results of pneumatic dilation in achalasia followed for more than 5 years. *The American journal of gastroenterology* **97**, 1346 (2002).
- 126 Devière, J., Dunham, F., Rickaert, F., Bourgeois, N. & Cremer, M. Endoscopic ultrasonography in achalasia. *Gastroenterology* **96**, 1210-1213 (1989).
- 127 Smith, B. The neurological lesion in achalasia of the cardia. *Gut* **11**, 388-391 (1970).
- 128 Hobsley, M. Arbeitsdiagnose-Neue Wege der chirurgischen Diagnose und Therapie. *Karger Publishers* 216-236 (1981).
- 129 Horgan, A., Prasad, B., Waldron, D. & O'sullivan, D. Acute urinary retention. Comparison of suprapubic and urethral catheterisation. *British journal of urology* **70**, 149-151 (1992).
- 130 de Groat, W. C. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* **50**, 36-52 (1997).
- 131 Hesse, A. Harnsteine. *Der Urologe A* **41**, 616-629 (2002).

- 132 Pubmed Health Glossary. *Bladder Disorder*, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0030018/>>
- 133 Stamatiou, K., Tyritzis, S., Karakos, C. & Skolarikos, A. Urofacial syndrome: a subset of neurogenic bladder dysfunction syndromes? *Urology* **78**, 911-913 (2011).
- 134 Tu, Y., Yang, P., Yang, J., Xu, Y., Xiong, F., Yu, Q., Gu, W., Pond, D., Mendelsohn, N., Lachmeijer, G. A., Zhang, S. & Wang, C. Y. Clinical and genetic characteristics for the Urofacial Syndrome (UFS). *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 1842-1848 (2014).
- 135 Wang, C. Y., Hawkins-Lee, B., Ochoa, B., Walker, R. D. & She, J. X. Homozygosity and linkage-disequilibrium mapping of the urofacial (Ochoa) syndrome gene to a 1-cM interval on chromosome 10q23-q24. *American journal of human genetics* **60**, 1461-1467 (1997).
- 136 Ochoa, B. Can a congenital dysfunctional bladder be diagnosed from a smile? The Ochoa syndrome updated. *Pediatr Nephrol* **19**, 6-12 (2004).
- 137 Krieg, J., Hofsteenge, J. & Thomas, G. Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *The Journal of biological chemistry* **263**, 11473-11477 (1988).
- 138 Thomas, G., Martin-Perez, J., Siegmann, M. & Otto, A. M. The effect of serum, EGF, PGF2 alpha and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* **30**, 235-242 (1982).
- 139 Biever, A., Valjent, E. & Puighermanal, E. Ribosomal protein S6 phosphorylation in the nervous system: from regulation to function. *Frontiers in molecular neuroscience* **8**, 75 (2015).
- 140 Van Dyke, J. M., Bain, J. L. & Riley, D. A. Stretch-activated signaling is modulated by stretch magnitude and contraction. *Muscle & nerve* **49**, 98-107 (2014).

- 141 Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* **6**, 99 (1999).
- 142 Guo, M. & Hay, B. A. Cell proliferation and apoptosis. *Current opinion in cell biology* **11**, 745-752 (1999).
- 143 Eisentraut, M. Temperaturschwankungen bei niederen Säugetieren. *Z. Säugetierk.* **21**, 49-52 (1956).
- 144 Alef, M. Geriatrie bei Hund und Katze. *Georg Thieme Verlag*, 40 (2003).
- 145 Park, E.-Y., Kim, M.-H., Kim, E.-H., Lee, E.-K., Park, I.-S., Yang, D.-C. & Jun, H.-S. Efficacy comparison of Korean ginseng and American ginseng on body temperature and metabolic parameters. *The American journal of Chinese medicine* **42**, 173-187 (2014).
- 146 Kiwull-Schöne, H., Kalhoff, H., Manz, F., Diekmann, L. & Kiwull, P. Minimal-invasive approach to study pulmonary, metabolic and renal responses to alimentary acid-base changes in conscious rabbits. *European journal of nutrition* **40**, 255-259 (2001).
- 147 Yoon, J.-A., Han, D.-H., Noh, J.-Y., Kim, M.-H., Son, G. H., Kim, K., Kim, C.-J., Pak, Y. K. & Cho, S. Meal time shift disturbs circadian rhythmicity along with metabolic and behavioral alterations in mice. *PloS one* **7**, e44053 (2012).
- 148 Moore, L. L., Gao, D., Bradlee, M. L., Cupples, L. A., Sundarajan-Ramamurti, A., Proctor, M. H., Hood, M. Y., Singer, M. R. & Ellison, R. C. Does early physical activity predict body fat change throughout childhood? *Preventive medicine* **37**, 10-17 (2003).
- 149 Klaus, S., Ely, M., Encke, D. & Heldmaier, G. Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. Dissociation of terminal differentiation and thermogenesis in brown adipocytes. *Journal of cell science* **108 (Pt 10)**, 3171-3180 (1995).

- 150 Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerback, S., Schrauwen, P. & Spiegelman, B. M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366-376 (2012).
- 151 Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 7153-7164 (2010).
- 152 Buechler, C., Ritter, M., Duong, C. Q., Orso, E., Kapinsky, M. & Schmitz, G. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1532**, 97-104 (2001).
- 153 Serrero, G., Frolov, A., Schroeder, F., Tanaka, K. & Gelhaar, L. Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in *Escherichia coli* and characterization of its fatty acid binding properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1488**, 245-254 (2000).
- 154 Jiang, H.-P. & Serrero, G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 7856-7860 (1992).
- 155 Dahlhoff, M., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Müller, U., Leonhardt, H., Zouboulis, C. C. & Schneider, M. R. EGFR/ERBB receptors differentially modulate sebaceous lipogenesis. *FEBS letters* **589**, 1376-1382 (2015).
- 156 Van Ho, A. T., Hayashi, S., Bröhl, D., Auradé, F., Rattenbach, R. & Relaix, F. Neural crest cell lineage restricts skeletal muscle progenitor cell differentiation through Neuregulin1-ErbB3 signaling. *Developmental cell* **21**, 273-287 (2011).

- 157 Matsuzawa, Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* **3**, 35-42 (2006).
- 158 Goldstein, B. J. & Scalia, R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 2563-2568 (2004).
- 159 Chen, Y., Siegel, F., Kipschull, S., Haas, B., Fröhlich, H., Meister, G. & Pfeifer, A. miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit. *Nature communications* **4**, 1769 (2013).
- 160 Qian, S.-W., Tang, Y., Li, X., Liu, Y., Zhang, Y.-Y., Huang, H.-Y., Xue, R.-D., Yu, H.-Y., Guo, L. & Gao, H.-D. BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, E798-E807 (2013).
- 161 Wada, S., Neinast, M., Jang, C., Ibrahim, Y. H., Lee, G., Babu, A., Li, J., Hoshino, A., Rowe, G. C. & Rhee, J. The tumor suppressor FLCN mediates an alternate mTOR pathway to regulate browning of adipose tissue. *Genes & development*, 2551-2564 (2016).

VIII. DANKSAGUNG

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Dr. Maik Dahloff, dessen Tür für mich immer offenstand. Vielen Dank für Deine Betreuung und wertvolle Unterstützung meiner Experimente und meiner Dissertation sowie für Deine Bereitschaft, gemeinsam neue Ideen weiterzuverfolgen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie im Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München meine Dissertation verfassen zu können. Vielen Dank für Ihre Richtungsweisung und wissenschaftlichen Hinweise.

Für die Pflege und Betreuung meiner Labormäuse danke ich Dr. Ingrid Renner-Müller und Petra Renner.

Des Weiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik, Frau Linda Böswald sowie des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht, Dr.med.vet. Birgit Rathkolb, bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf für die tatkräftige Unterstützung bedanken. Ein großer Dank gilt Max Marschall für seine Hilfe in der Endphase meiner Dissertation.

Meinen Mitdotorandinnen Kathrin und Christina danke ich für ihre guten Ratschläge bei der Laborarbeit und die schöne gemeinsame Zeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in meinem gesamten Leben, in all meinen Wünschen und Entscheidungen unterstützt haben. Durch Euer Vertrauen konnte ich über mich selbst hinauswachsen.

Ein herzlichster Dank geht an meine Großeltern, die mich zu Beginn meines Studiums bei sich aufgenommen haben und mir immer beistanden.

Lieber Dominik, ich bin Dir sehr dankbar für Deine liebevolle Unterstützung. Du hast mich immer bestärkt und mir den Rückhalt gegeben, den ich brauchte.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Freunden. Lieber Thu Phong, ich möchte dir für Deine Geduld und Unterstützung danken. Liebe Sarah, unsere gemeinsamen Pausen im Englischen Garten oder an der Isar haben mir immer wieder neue Kraft gegeben.