



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Metabolische Phänotypisierung von adipösen Mäusen mit
STAT5-Mangel im Adipozyten“

verfasst von / submitted by

Theresia Wagner

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020/ Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn

DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei meinem großartigen Betreuer, Herrn ao. Univ.-Prof. Dr. Clemens Fürnsinn bedanken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und der neben der Betreuung meiner Arbeit mein Interesse für die Forschung geweckt hat. Vielen Dank für deine fachliche, sowie persönliche Unterstützung und deine unermüdliche Motivation.

Außerdem gebührt mein Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich nicht nur moralisch begleitet haben, sondern mir durch ihren Rückhalt die Möglichkeit und Kraft gaben, mein Studium erfolgreich abzuschließen.

Auch möchte ich mich bei meinem Verlobten, Anton Rab, für seine unglaubliche Unterstützung bedanken. Er war mir zu jeder Zeit eine emotionale Stütze und hatte immer ein offenes Ohr für mich.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	v
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	vii
ZUSAMMENFASSUNG	ix
ABSTRACT	x
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	xi
1. EINLEITUNG	1
1.1. Fettgewebe	1
1.2. Leber	2
1.3. Diabetes Mellitus	2
1.4. Insulin- und Glukosetransporter.....	5
1.5. Glukose-6-Phosphat.....	6
1.6. Fettstoffwechsel	7
1.7. Der JAK-STAT Signalweg	7
1.8. STAT5 und seine Funktionen	9
1.9. STAT5-knock out im Adipozyten.....	9
2. ZIELSETZUNG	11
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1. Mäuse	12
3.1.1. Haltung	12
3.1.2. Futter	12
3.1.3. Ethik	13
3.2. Versuchsablauf.....	13
3.3. Messungen in Vivo	14
3.3.1. Körpergewicht.....	14
3.3.2. Körperzusammensetzung (Echo MR)	14
3.3.3. Nüchternblutglukose	15
3.3.4. Blutketonkörper	15
3.3.5. Glukosetoleranztest (IPGTT)	15
3.3.6. Insulintoleranztest (ITT)	15
3.3.7. Tötung mit Blut- und Gewebeentnahme.....	16
3.4. Analytik.....	17
3.4.1. Plasmainsulin	17
3.4.2. Triglyzeride in Geweben	17
3.4.3. Statistik.....	17

4.	ERGEBNISSE	18
4.1.	Effekte eines STAT5-Mangels im Fettgewebe bei Adipositas	18
4.1.1.	Körpergewicht und Körperzusammensetzung.....	18
4.1.2.	Blutglukose	21
4.2.	Kalorienrestriktion von adipösen Mäusen mit STAT5-Mangel im Fettgewebe	22
4.2.1.	Körpergewicht und Körperzusammensetzung.....	22
4.2.2.	Blutglukose	26
4.2.3.	Fettpolster- und Lebergewicht.....	30
4.2.4.	Plasmainsulin.....	31
4.2.5.	Plasma- und Lebertriglyzeride	32
5.	SCHLUSSFOLGERUNG	34
6.	DISKUSSION UND AUSBLICK	37
7.	QUELLENVERZEICHNIS	38

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Rolle von Insulin und Glukagon bei der Regelung der Blutglukosekonzentration	4
Abbildung 2: Insulin	5
Abbildung 3: JAK-STAT Signalweg	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	14
Abbildung 5: Versuchsprotokoll	16
Abbildung 6: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf das Körpergewicht	19
Abbildung 7: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die Körperzusammensetzung	20
Abbildung 8: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die relative Fettmasse.....	21
Abbildung 9: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die Nüchternblutglukose .	22
Abbildung 10: Effekte von Kalorienrestriktion bei Mäusen mit STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Körpergewicht	23
Abbildung 11: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Körperzusammensetzung.....	24
Abbildung 12: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Magermasse	25
Abbildung 13: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Nüchternblutglukose	26
Abbildung 14: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Glukosetoleranz.....	27
Abbildung 15: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Insulintoleranz	28
Abbildung 16: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Blutketone.....	29
Abbildung 17: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Gewicht des epididymalen Fettpolsters und der Leber	30
Abbildung 18: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Plasmainsulin	31
Abbildung 19: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Plasmatriglyzeride	32
Abbildung 20: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Lebertriglyzeride	33

ZUSAMMENFASSUNG

Dem Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription- (Jak-Stat) Signalweg wird eine Bedeutung im Fettstoffwechsel, insbesondere in der Physiologie und Pathophysiologie der Speicherung und Mobilisierung von Triglyzeriden (TG) zugeschrieben. Allerdings ist bisher noch nicht geklärt welche Rolle das STAT5-Protein in Fettzellen genau spielt.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Bedeutung des STAT5-Proteins auf den Fettstoffwechsel bei Adipositas zu untersuchen. Hierfür wurden Mäuse mit Knock-Out (KO) des STAT5-codierenden Gens in den reifen Adipozyten verwendet und mit Mäusen verglichen, welche diesen Gendefekt nicht aufwiesen (WT). Zur Induktion von Adipositas hatten die Tiere über 52 Tage freien Zugang zu fettreichem Futter (HFD). Danach wurde ein Teil der Mäuse eingeschränkt gefüttert, sodass sie wieder an Gewicht verloren. Körpergewicht, Körperfett, diverse Blutparameter, Insulintoleranz und Glukosetoleranz wurden kontinuierlich dokumentiert.

Im Vergleich zu einer vorangehenden Studie an mageren, gesunden Mäusen zeigte sich in den adipösen Tieren nur ein sehr moderater Einfluss des STAT5-Mangels in den Adipozyten. So wiesen die KO-Mäuse eine etwas gesteigerte Speicherung von Körperfett und eine etwas deutlichere Gewichtszunahme auf. Für Plasmatriglyzeride und Glukosehomöostase waren jedoch keine Unterschiede feststellbar. Sowohl unter freiem Zugang zu Futter als auch nach einer Phase des Gewichtsverlusts durch reduzierte Fütterung, konnten für Nüchternblutglukose, Glukosetoleranz, Insulintoleranz und Insulinsensitivität (HOMA-Index) keine signifikanten Unterschiede zwischen KO- vs. WT-Mäusen gefunden werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie nur einen geringfügigen Einfluss des STAT5-Mangels in reifen Adipozyten auf den metabolischen Phänotyp adipöser Mäuse. Spekulationen, dass STAT5 ein lohnendes Target zur Intervention bei Adipositas assoziierten Stoffwechselstörungen sein könnte, werden durch diese Befunde nicht bestärkt.

ABSTRACT

The Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription (Jak-Stat) signaling pathway is supposed to play a role in lipid metabolism, particularly in the physiology and pathophysiology of triglyceride storage and mobilization. However, the exact role of the STAT5 protein in fat cells has not yet been clarified.

In the present thesis I investigated the role of the STAT5 protein on lipid metabolism in obesity. Mice with knock-out (KO) of the STAT5 coding gene in mature adipocytes were compared with mice without this gene defect (WT). For the induction of obesity, the animals had free access to high-fat diet (HFD) for 52 days. Afterwards, some of the mice were fed restrictedly so that they lost weight again. Body weight, body fat, various blood parameters, insulin tolerance and glucose tolerance were documented.

Compared to the findings of a previous study using lean, healthy mice, the results of the current thesis show only a very modest effect of STAT5 deficiency in adipocytes of obese animals. The KO mice showed slightly increased storage of body fat and slightly more weight gain. However, no differences were found for plasma triglycerides and glucose homeostasis. Both under free access to food and after weight loss due to reduced feeding, no significant differences between KO vs. WT mice were found for fasting blood glucose, glucose tolerance, insulin tolerance and insulin sensitivity (HOMA index).

Overall, the results of this study show only minor influence of STAT5 deficiency in mature adipocytes on the metabolic phenotype of obese mice. Speculations that STAT5 might be a promising target for intervention in obesity-related metabolic disorders are not supported by these findings.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- al **ad libitum**
- ATGL **Adipozyten-Triglyzerid-Lipase**
- BAT **Brown Adipose Tissue** = braunes Fettgewebe
- CD **Chow Diet** (herkömmliche, kohlenhydratreiche Diät)
- EPOr **Erythropoetinrezeptor**
- ER **Endoplasmatisches Retikulum**
- GHR **Growth Hormone Receptor** = Wachstumshormonrezeptor
- GLUT **Glukose Transporter**
- G6P **Glukose-6-Phosphat**
- HFD **High Fat Diet** = fettreiche Diät
- HSL **Hormon-sensitive-Lipase**
- IL-3R **Interleukin-3-Rezeptor**
- IPGTT **Intraperitonealer Glukosetoleranztest**
- ITT **Insulintoleranztest**
- JAK **Janus-Kinase**
- KO **Knock-Out Mäuse mit STAT5-Mangel im Adipozyten**
- mRNA **messenger ribonucleic acid** = Boten-Ribonukleinsäure
- n.s. **nicht signifikant**
- rf **restricted feeding** = eingeschränkte Fütterung
- STAT5 **Signal Transducer and Activator of Transcription (5)**
- STAT5^{Adipoq} **Knock-Out Mäuse mit STAT5-Mangel im Adipozyten**
- TG **Triglyzerid**
- vs. **versus** = im Vergleich zu
- WAT **White Adipose Tissue** = weißes Fettgewebe
- WT **Wild Type** = Wildtyp

1. EINLEITUNG

Studien zur Folge sterben weltweit mindestens 2,8 Millionen Menschen jährlich an den Folgen von Übergewicht und Fettleibigkeit.¹ Eine über das normale Maß hinausgehende Vermehrung des Körperfettes, wie im Falle von Übergewicht und Fettleibigkeit, kann außerdem zu zahlreichen Folgeerkrankungen wie beispielsweise Herz-Kreislaufkrankungen (Schlaganfall, Herzinsuffizienz, etc.), Gefäßkrankungen oder anderen metabolischen Störungen (Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, Störungen der Hämostase) führen.²

Grundsätzlich lassen sich drei Typen von Fettgewebe unterscheiden: weißes, braunes und beiges Fettgewebe. Das braune Fettgewebe (BAT) wird in Nagetieren und anderen kleinen Tieren als eigenständiges Organ angesehen und dient der Wärmeerzeugung und somit der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Auch im Menschen ist braunes Körperfett zu finden, allerdings nur in sehr geringen Mengen und in Form von einzelnen Zellen oder Zellgruppen, die ins weiße Fett (WAT) eingelagert sind.³

Beim menschlichen Fettgewebe handelt es sich zum allergrößten Teil um WAT, dessen übermäßige Akkumulation mit einer Insulinresistenz einhergeht und somit als Risikofaktor für die Entwicklung des Typ 2 Diabetes mellitus gilt.⁴ Neben der Akkumulation im WAT steigen bei Adipositas auch die im Blut zirkulierenden Lipide wie Triglyzeride (TG) und freie Fettsäuren, was neben anderen Faktoren ein Grund für Adipositas typische Störungen der Glukoseverwertung und für Insulinresistenz sein kann. Studien haben gezeigt, dass Fettzellen auch so genannte Zytokine freisetzen, was wiederum zum Verlust an Insulinsensitivität beitragen kann.⁵

1.1. Fettgewebe

Wie zuvor erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen Adipositas und diversen Stoffwechselerkrankungen. Das WAT spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase des gesamten Körpers. Liegt ein Energieüberschuss vor, so werden Fettsäuren in Form von TG in den Adipozyten gespeichert. Bei einem vorliegenden Energiemangel werden TG durch den Vorgang der Lipolyse hydrolysiert und somit dem Körper bereitgestellt. Kommt es zu einem

Ungleichgewicht von Lipidspeicherung und -mobilisierung, kann es zu dysfunktionalem WAT und einer gestörten Lipidverteilung kommen. Diese Vorgänge bilden die Grundlage für Adipositas und Lipodystrophie.⁶

1.2. Leber

Die Leber spielt eine wesentliche Rolle im Zusammenhang mit den Stoffwechselprozessen des Körpers. Sie ist für die Versorgung der Körperzellen mit Cholesterin sowie für die Synthese von Proteinen des Blutplasmas verantwortlich. Außerdem stellt sie, die für die Verdauung wichtige Gallensäure bereit. Die Leber dient dem Körper als ein großer Glukosespeicher und lagert diese in Form von Glykogen ein (bis zu 25% der Glykogenvorräte des Körpers). Liegt eine entsprechend hohe Konzentration von Substraten (zum Beispiel Glyzerin, Laktat, Alanin, usw.) vor, kann die Leber auch Glukoneogenese betreiben. Des Weiteren stellt die Leber die Hauptquelle für endogene Fettsäuren dar. Die Fettsäuren werden wie oben erwähnt zu TG verestert und zu einem großen Teil zum Fettgewebe transportiert und gespeichert. Im Hungerzustand werden von der Leber vermehrt Ketonkörper produziert, die als Energiequelle für das Gehirn und die Muskeln herangezogen werden können.⁷

1.3. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch erhöhte Blutglukose definiert und durch eine gestörte Insulinsekretion und/oder durch eine Insulinresistenz gekennzeichnet ist. Neben selteneren Sonderformen unterscheidet man grundsätzlich zwei Formen von Diabetes mellitus, die Typ 1 und Typ 2 Form. Während dem Typ 1 Diabetes ein absoluter Insulinmangel durch autoimmune Zerstörung der Insulin produzierenden Zellen zu Grunde liegt, entwickelt sich die Typ 2 Form durch eine verminderte Sensitivität der Zielzellen für Insulin.⁸

Die durch die Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate gelangen zu einem großen Teil als Glukose ins Blut und führen dort zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration. Das Hormon Insulin, welches in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird, ist der natürliche Regulator der Blutglukosekonzentration, indem es Körperzellen dazu anregt, die im Blut befindliche Glukose aufzunehmen.

Diese wird dann unter Insulinstimulation in Form von Glykogen vorwiegend in den Zellen der Muskeln und der Leber gespeichert. Bei einem Insulinmangel oder einer Insulinresistenz kommt es somit zu einer verminderten Aufnahme der Glukose aus dem Blut und zu einer verminderten Speicherung in den Zellen. In weiterer Folge, resultiert daraus ein Anstieg der Blutglukosewerte.⁹

Ohne die richtige Behandlung käme es zu einer stark erhöhten Glukoneogenese der Leber, bei gleichzeitig verminderter Glukoseverwertung. Die Folge ist eine Hyperglykämie, die durch eine eingeschränkte Rückresorptionskapazität der Niere zur Glukosurie führen kann. Des Weiteren kommt es durch den vermehrten Abbau von Fettsäuren zu einer gesteigerten Bildung von sauren Ketonkörpern. Dies wird als metabolische Azidose bezeichnet und führt zu dem, für unbehandelten Diabetes charakteristischen Azetongeruch der Betroffenen.¹⁰

Anders als die Typ 1 Form, die nur mit einer exogenen Insulinzufuhr in Form von Arzneimitteln behandelt werden kann, lässt sich die Typ 2 Form in der frühen Phase oft durch eine Ernährungsumstellung und dem damit verbundenen Fettabbau behandeln. Später können orale Antidiabetika eingesetzt werden. Letztendlich kann aber auch hier eine Insulintherapie notwendig werden.¹¹

Einer der natürlichen Gegenspieler des Insulins ist das Glukagon, das bei niedriger Blutglukosekonzentration vermehrt von den α -Zellen des Pankreas sekretiert wird. Glukagon führt durch den Abbau von metabolischen Speichern und durch die Glukoseabgabe der Leber zu einem Anstieg der Blutglukose (Abbildung 1).⁹

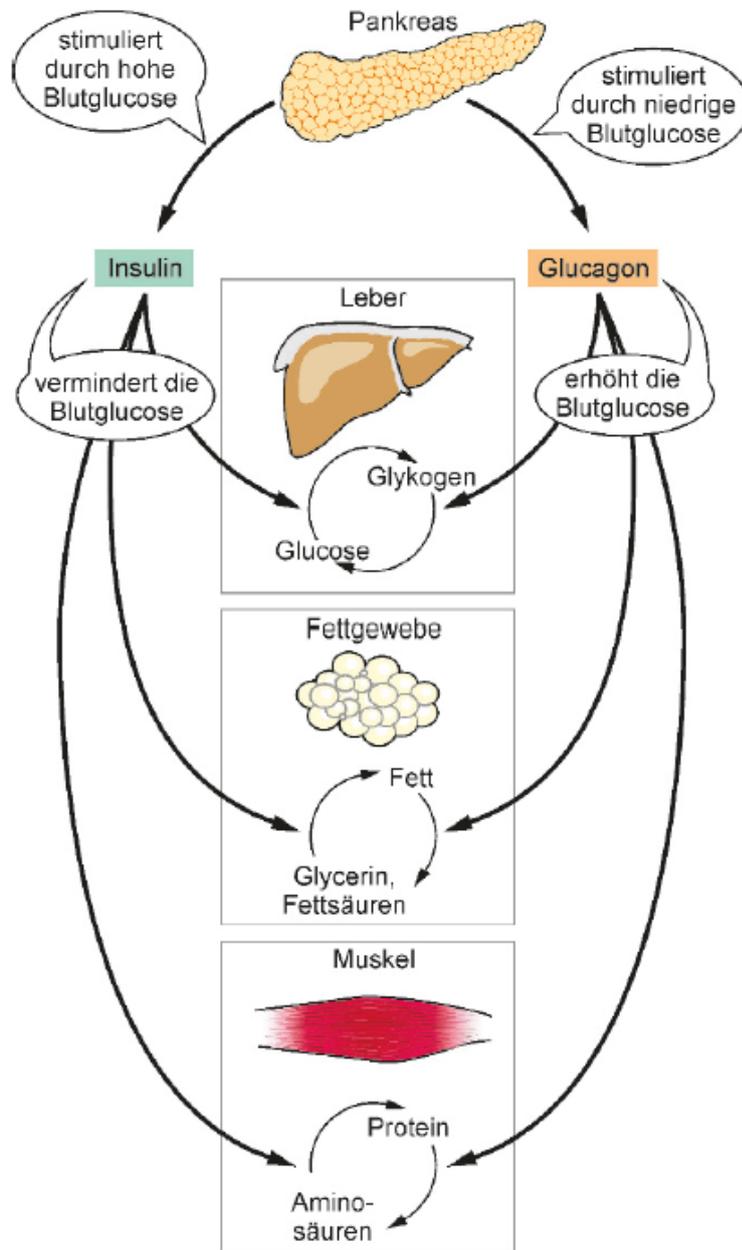


Abbildung 1: Die Rolle von Insulin und Glukagon bei der Regelung der Blutglukosekonzentration

Je nach Blutglukosekonzentration kommt es zur Stimulierung der Freisetzung von Insulin oder Glukagon durch die Bauchspeicheldrüse. - (Grafik aus⁹)

1.4. Insulin- und Glukosetransporter

Das Peptidhormon Insulin, welches 1921 von Frederick Grant Banting und Charles Herbert Best erstmals aus der Bauchspeicheldrüse isoliert wurde, besteht aus einer A- und einer B-Kette, die sich durch die Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden. Die A-Kette umfasst 21 Aminosäuren, während die B-Kette aus 30 Aminosäuren aufgebaut ist. Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und ergeben so ein Dipeptid (Abbildung 2).¹² Die Bildung des humanen Insulins startet bei der Translation der mRNA für ein sogenanntes Präproinsulin an den Ribosomen. Dieses besitzt ein Signalpeptid, welches bei der Translokation des Peptids ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) abgespalten wird. Dadurch entsteht ein einkettiges Protein, welches aus den drei Domänen A-B-C besteht und drei Disulfidbrücken enthält. Das Proinsulin wandert nun vom ER in den Golgi-Apparat, in welchem es in Vesikel verpackt wird. Hierbei wird das C-Peptid abgespalten und das "reife" Insulin (Dipeptid) entsteht.¹³

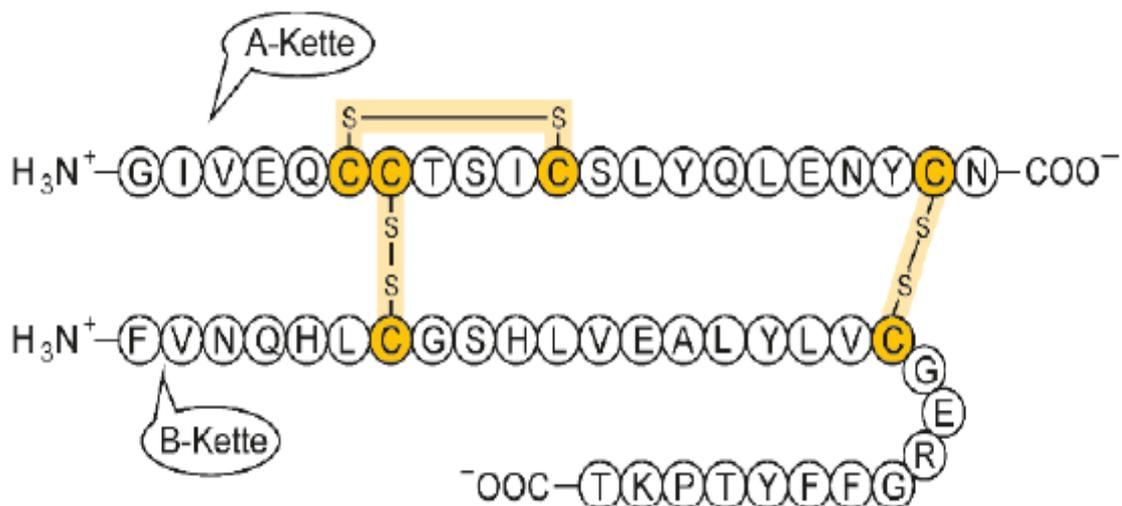


Abbildung 2: Insulin

Struktur des humanen Insulins mit den zwei Disulfidbrücken zwischen den beiden Ketten und jener innerhalb der A-Kette. - (Grafik aus ¹⁴)

Insulin hat neben der oben angesprochenen Funktion der Aufnahme und Speicherung von Glukose in Zellen auch noch weitere Aufgaben. Beispielsweise beeinflusst Insulin den Fettstoffwechsel indem es die Fettsäuresynthese in Fettgewebe und Leber, sowie die Bildung und Speicherung von TG in Fettgewebe und Leber stimuliert. Insulin wirkt somit der Lipolyse entgegen. Eine weitere Rolle

spielt Insulin bei der Proteinsynthese in einer Reihe von Geweben mit Auswirkungen auf die Transkription spezifischer mRNA sowie auf die Übersetzung von mRNA in Proteine in den Ribosomen. Glukose gelangt über Glukose-Transporter (GLUT)-Proteine ATP-unabhängig aus dem Blut in die Zellen. Man unterscheidet 5 Subtypen von GLUT, die sich in diversen Eigenschaften wie zum Beispiel maximale Glukose-transportkapazität und Insulinabhängigkeit unterscheiden. GLUT1 ist beispielsweise in praktisch allen Zelltypen zu finden und insulinunabhängig in der Lage, Glukose bei sehr geringen Blutglukosekonzentrationen in die Zelle zu transportieren. In Fett- und Muskelzellen ist GLUT4 der wichtigste GLUT. Der Glukosetransport mittels GLUT4 wird im Gegensatz zum Transport durch andere GLUT, durch das Hormon Insulin stark gesteigert.¹²

Die glukoseabhängige Insulinsekretion wird wie folgt ausgelöst: eine erhöhte Blutglukosekonzentration führt zur Insulinsekretion durch Freisetzung von Insulin aus den sekretorischen Granula der β -Zellen des Pankreas. Die erhöhte Glukosekonzentration im Blut führt dabei zu einer erhöhten Glukoseaufnahme über GLUT2 in die β -Zellen, wo das Enzym Glukokinase Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Durch Metabolisierung der Glukose wird sodann vermehrt ATP erzeugt. Infolge kommt es zur Schließung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle, das wiederum zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Daraufhin öffnen sich die spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration ansteigt. Dieser Anstieg ist schließlich das Signal, welches zur Freisetzung von Insulin aus den Granula führt.¹²

1.5. Glukose-6-Phosphat

Ein wichtiger metabolischer Knotenpunkt im Glukosestoffwechsel ist das bereits erwähnte G6P. Gelangt freie Glukose in die Zelle, so findet rasch eine Phosphorylierung zu G6P statt. G6P kann jedoch auch durch die Glykogenolyse beziehungsweise im Rahmen der Glukoneogenese aus Pyruvat gebildet werden. Ob das G6P in die Glykolyse, in die Glykogensynthese oder in die Glukoneogenese fließt, hängt unter anderem vom Zelltyp, von der Insulinstimulation, vom Substratangebot und vom Energiezustand der Zelle ab. Ist die Energieverfügbarkeit in der Zelle gering, so wird zwecks ATP-Produktion die Glykolyse angeworfen.

Ist der Energiezustand der Zelle hoch, so wird die Glykogensynthese angeregt und so Energiesubstrat für den späteren Gebrauch gespeichert.¹⁵

1.6. Fettstoffwechsel

Die Lipolyse spielt eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel von Menschen und Mäusen und wird durch sogenannte Lipasen katalysiert. Zwei für die Lipolyse essenzielle Lipasen sind die hormonsensitive Lipase (HSL) und die Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (ATGL).¹⁶

Verschiedene Hormone wie beispielsweise Glukagon führen zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, welche dann zu einer Aktivierung von HSL führt. Des Weiteren wird Perilipin, ein Protein, welches auf der Oberfläche der Lipidtropfen in den Adipozyten vorkommt, durch die Proteinkinase A aktiviert. Dieses Protein ist für den Zerfall der Lipidtropfen in wesentlich kleinere Tröpfchen verantwortlich und erhöht somit die Zugänglichkeit für HSL.¹⁷ Während HSL bevorzugt Diazylglycerole spaltet, greift ATGL vorrangig an TGs an und katalysiert deren Hydrolyse.¹⁸

1.7. Der JAK-STAT Signalweg

Der JAK-STAT (Janus Kinase-Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription) Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Kommunikation, unter anderem indem er die Wirkung einer Reihe von Hormonen auf die Zelle vermittelt. In der Fettzelle spielt dieser Signalweg beispielsweise bei der Anregung der Lipolyse durch das Wachstumshormon eine Rolle. Die Janus-Kinasen gehören zur Familie der Zytokinrezeptor-assoziierten Enzyme und leiten die Informationen mit Hilfe von STAT-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Kommt es also in der Zelle zur Bindung eines entsprechenden Liganden an seinen Rezeptor, so kommt es durch eine wechselseitige Phosphorylierung der JAKs zu deren Aktivierung. Nun binden die STAT-Proteine über ihre SH2-Domänen an die Phosphotyrosin-Ankerplätze des Rezeptors. Die STAT-Proteine werden nun durch die JAKs phosphoryliert und dimerisieren. Das gebildete Dimer kann vom Rezeptorkomplex dissoziieren und in den Zellkern translozieren. Dort angekommen regulieren die STAT-Proteine als Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen (Abbildung 3). Die funktionierende intrazelluläre Kommunikation ist für viele physiologische Vorgänge, beispielsweise

für das Knochen- und Längenwachstum oder die Reifung von Blutzellen von Bedeutung. Auch bei der Adipozytenentwicklung sowie für deren Funktion spielt der JAK-STAT Signalweg eine Rolle.¹⁹

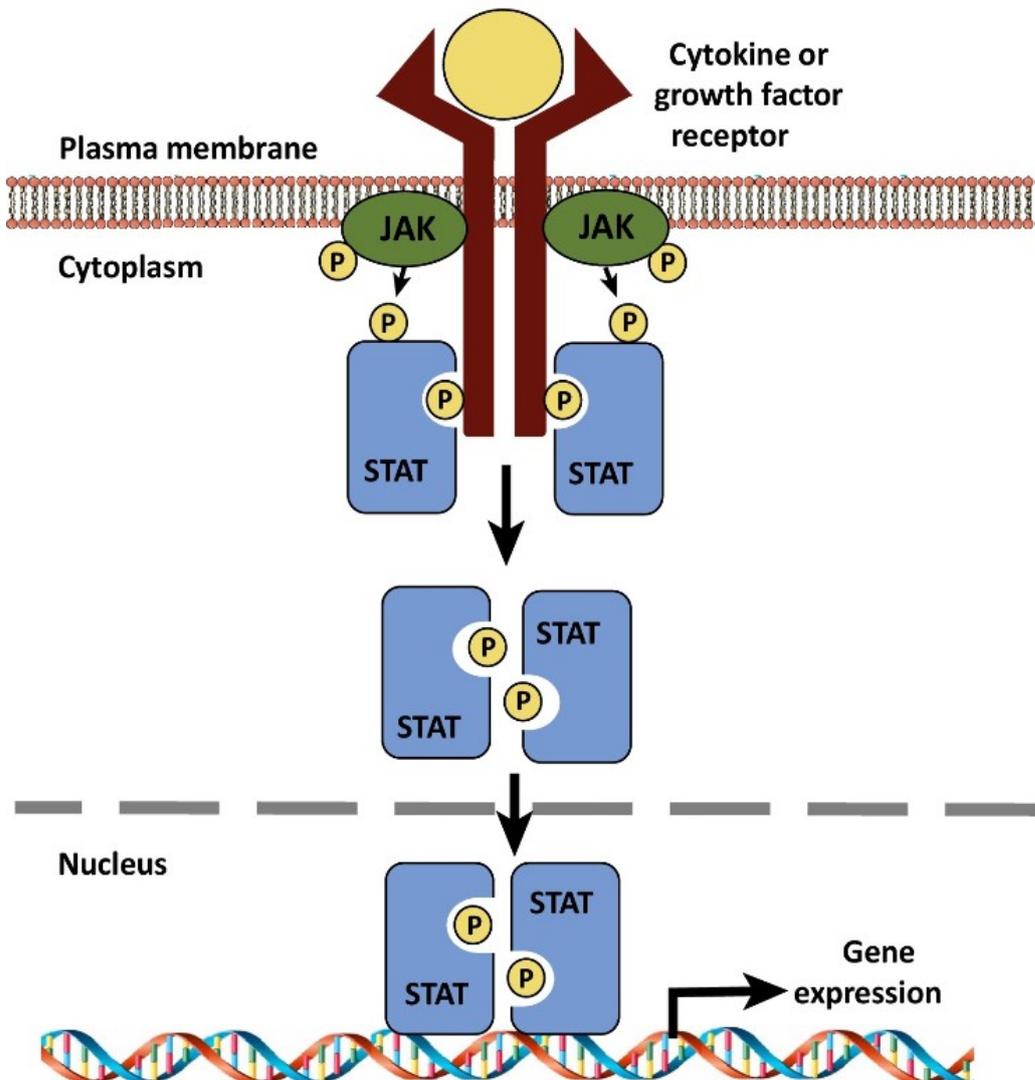


Abbildung 3: JAK-STAT Signalweg

Bindung eines Liganden an den Zytokin-/GF-Rezeptor mit anschließender Phosphorylierung der JAKs, Bindung der STAT-Proteine und deren Phosphorylierung, sowie Dimerisierung und anschließender Translokation der STAT-Proteine in den Zellkern, wo die Genexpression moduliert wird. - (Grafik aus²⁰)

1.8. STAT5 und seine Funktionen

Die STAT-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren an zellulären Prozessen beteiligt sind, lassen sich in sieben verschiedene Subtypen einteilen: STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B und 6.²¹ STAT5A und STAT5B sind bezüglich der Aminosäuresequenz zu 90% homolog, obwohl sie nicht vom gleichen Gen kodiert werden. Der Zytokinrezeptor, Erythropoetinrezeptor (EPOR), Interleukin-3-Rezeptor (IL-3R) oder Wachstumshormonrezeptor (GHR) sind Beispiele für Rezeptoren, die in Wechselwirkung mit STAT5-Proteinen ihre Aufgaben erfüllen. Die Bedeutung der STAT5-Proteine wurde unter anderem in diversen Studien mit genmanipulierten Mäusen mit STAT5-Mangel veranschaulicht. So wurde beispielsweise anhand von Mäusen, denen STAT5 im reifen Adipozyten fehlt, eine wesentliche Rolle von STAT5 als Regulator der Funktionen des WAT nachgewiesen.²²

1.9. STAT5-knock out im Adipozyten

Eine Studie von Doris Kaltenecker et al.⁶ befasste sich bereits mit dem Thema des STAT5-Mangels in den reifen Fettzellen von Mäusen und den damit einhergehenden Folgen. Diese Untersuchung bildete die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

In der genannten Studie wurden Mäuse mit einem STAT5-Mangel im reifen Adipozyten (im Weiteren als KO-Tiere oder auch als STAT5^{Adipoq}-Mäuse bezeichnet) unter Verwendung des Adipoq-Cre Rekombinase Transgens generiert. Diese KO-Tiere wurden mit Tieren ohne jenen Mangel, in diversen Protokollen in vivo und in vitro verglichen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und mit einem kohlenhydratreichen Standardfutter ad libitum (al) gefüttert. Die Mäuse wurden regelmäßig gewogen, ihre Körperfettmasse gemessen, sowie Insulintoleranztests (ITT) und Glukosetoleranztests (IPGTT) durchgeführt.⁶

Die Studie zeigte, dass eine adipozytenspezifische Deletion des STAT5 zu höherem Körpergewicht und größerer Fettmasse führt. Die Insulinresistenz und die Glukoneogeneserate waren hingegen vermindert. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Glukosestoffwechsel durch eine Blockade der STAT5-Funktion im Adipozyten womöglich verbessert werden kann. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der Studie eine Verminderung der basalen Lipolyse bzw. der durch Fasten induzierten Lipidmobilisierung bei den Mäusen mit einem STAT5-Mangel in

den Adipozyten. Dies stand im Zusammenhang mit einer geringeren Expression der ATGL, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Lipolyse darstellt. Die reduzierte ATGL-Expression wiederum konnte durch Identifikation eines STAT5-Response-Elements im Pnpla2-Promotor erklärt werden, wobei Pnpla2 das ATGL kodierende Gen ist. Dies weist darauf hin, dass die ATGL transkriptionell durch STAT5 reguliert wird.⁶

Zusammengefasst wiesen die Ergebnisse somit auf eine wesentliche Rolle des STAT5 in der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase, insbesondere in der Regulation der Lipolyse im WAT, hin. Die resultierende Frage, ob STAT5 ein pharmakologisches Target zur Behandlung von Adipositas-assoziierten Stoffwechselstörungen sein könnte, lieferte somit eine Motivation für weiterführende Studien.

2. ZIELSETZUNG

Dass diverse Signalwege, im Besonderen der JAK-STAT-Signalweg, an der Physiologie und Pathophysiologie von Adipozyten beteiligt sind, bildete die Grundlage der hier bearbeiteten Fragestellung. Ausgangspunkt waren die Ergebnisse der Studie von Kaltenecker et al.⁶, die eine Gewichtszunahme, zugleich aber positive Auswirkungen eines STAT5-Mangels in den reifen Adipozyten auf Insulinsensitivität, Fettstoffwechsel und Glukosestoffwechsel von schlanken Mäusen beschrieben hatte.

In der vorliegenden Studie sollte an diesem Mausmodell - also KO-Mäusen mit STAT5-Mangel in reifen Adipozyten - untersucht werden, ob ähnliche Effekte auch unter Adipositas zu finden wären. Dies würde die STAT5-Blockade im Fettgewebe zu einem Mechanismus machen, über den adipositas-typische Stoffwechselprobleme womöglich reduziert werden könnten. Zu diesem Zweck sollten nunmehr KO-Mäuse, bei denen durch fettreiches Futter (HFD) Adipositas induziert wurde, bezüglich ihrer Stoffwechsellparameter phänotypisiert und mit Wildtyp (WT)-Mäusen verglichen werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Mäuse

Die bei der Versuchsreihe verwendeten männlichen Mäuse, welche in ihren reifen Adipozyten einen STAT5-Mangel aufwiesen (KO- oder STAT5^{Adipoq}-Mäuse), wurden wie schon in der Studie von Kaltenecker et al.⁶ an der Veterinärmedizinischen Universität Wien für diese Versuchsreihe genotypisiert und gezüchtet. Die verwendeten Mäuse der Kontrollgruppe ohne STAT5-Mangel in den Adipozyten wurden ebenfalls an der Veterinärmedizinischen Universität Wien gezüchtet und waren Brüder der KO-Mäuse aus den gleichen Würfen. Verwendet wurden insgesamt 36 männliche Mäuse, welche zu Versuchsbeginn im Mittel 94 Tage alt waren.

3.1.1. Haltung

Die Mäuse wurden in Gruppen zu viert bzw. zu fünft pro Käfig unter Standardbedingungen gehalten. Ein 12h Tag- 12h Nacht-Rhythmus und eine konstante Raumtemperatur waren Teil dieser Bedingungen. Die Käfige waren mit Einstreu auf Holzbasis (Kleintierstreu, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland) bestückt, welche wöchentlich gewechselt wurde. Der Gesundheitszustand und die Versorgung der Mäuse wurden täglich entweder von mir oder den Tierpflegern kontrolliert. Bei gesundheitlichen Problemen standen Tierärzte zur Beratung zur Verfügung.

3.1.2. Futter

Bis zum Start des Versuchs wurden die Tiere mit herkömmlicher kohlenhydratreicher "Chow Diet" ad libitum (al) gefüttert (Alleinfutter für Ratten und Mäuse sniff R/M-H, Soest, Deutschland). Während des Versuchs wurden die Tiere mit einem hochkalorischen Fettfutter (high fat diet = HFD; 60% Fettanteil; Diät #D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) gefüttert, welches häufig verwendet wird, um Übergewicht und Hyperglykämie bei experimentell verwendeten Nagetieren zu erzeugen.

3.1.3. Ethik

Die verwendeten Protokolle und durchgeführten Experimente, sowie die Haltung der Tiere entsprachen den nationalen und internationalen Richtlinien und Gesetzen. Alle verwendeten Protokolle wurden vom österreichischen Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft (BWF) geprüft und genehmigt (Bewilligung Nummer GZ: 66009/0159-II/3b/2013).

3.2. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf lässt sich, wie in Abbildung 4 ersichtlich, in zwei Phasen unterteilen. Bei 16 der Mäuse handelte es sich um den Wildtyp, während die restlichen 20 einen STAT5-Mangel im Fettgewebe aufwiesen. Alle Mäuse wurden in Phase 1 für 52 Tage ad libitum mit HFD versorgt. Es wurden Gewichtsmessungen durchgeführt, sowie Körperzusammensetzung und Nüchternblutglukose gemessen. Phase 2 beschreibt den Zeitraum von Tag 52 bis Tag 78. In diesem Zeitraum wurden die Tiere in vier Gruppen unterteilt, die sich wie folgt zusammensetzten:

- Mäuse mit STAT5-Mangel in den Adipozyten auf HFD ohne Futterlimit (in Folge auch als KO ad libitum bezeichnet; kurz KO al),
- Mäuse mit STAT5-Mangel in den Adipozyten auf HFD unter eingeschränkter Fütterung mit lediglich 1 g pro Tag und Maus (in Folge auch als KO restricted feeding bezeichnet; kurz KO rf),
- Kontrollmäuse auf HFD ohne Futterlimit (in Folge auch als WT ad libitum bezeichnet; kurz WT al),
- Kontrollmäuse auf HFD unter eingeschränkter Fütterung mit lediglich 1 g pro Tag und Maus (in Folge auch als WT restricted feeding bezeichnet; kurz WT rf).

Die Gruppeneinteilung, welche Tiere unter Kalorienrestriktion gefüttert wurden und welche wie gewohnt weiterfressen durften, erfolgte unter "Matching" auf Basis der Gewichts- und Glukosewerte, sowie ihrer zuvor ermittelten Körperzusammensetzung. Der Stichprobenumfang der jeweiligen Gruppe kann in Abbildung 4 nachgelesen werden.

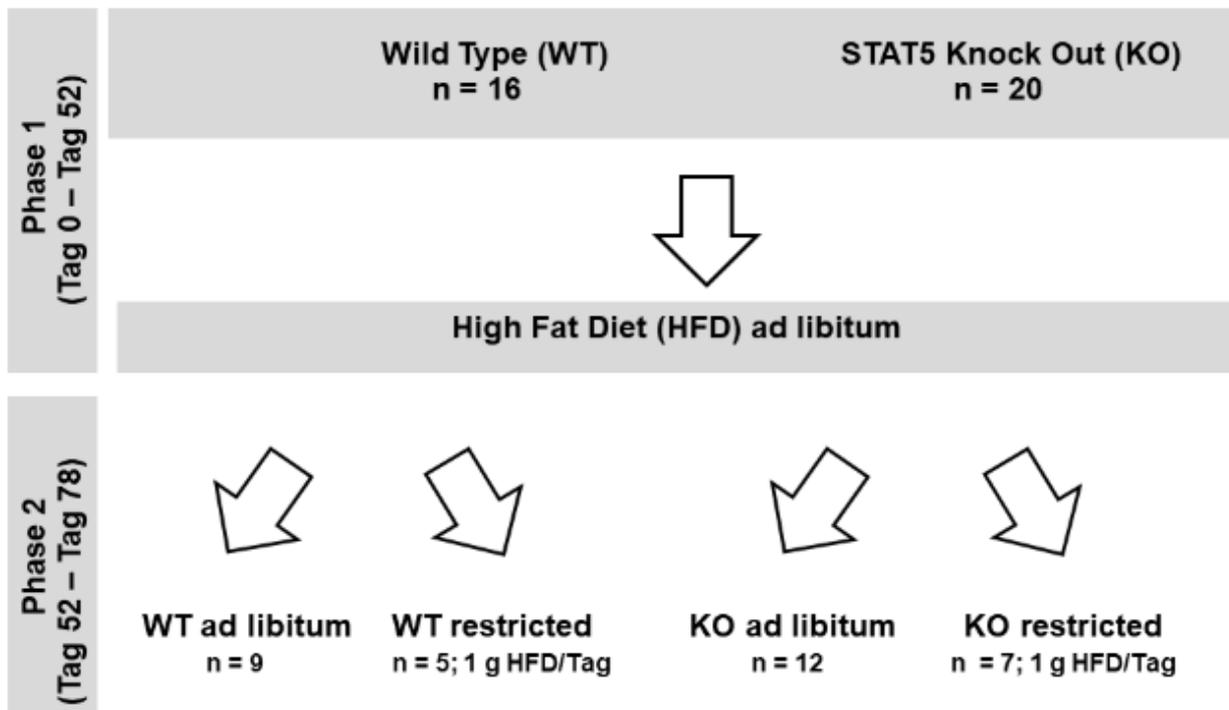


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Phase 1 umfasst die Fütterung aller Tiere mit High Fat Diet (HFD), während in Phase 2 ein Teil der Mäuse ad libitum gefüttert und der andere Teil unter Kalorienrestriktion (restricted) gehalten wurde (n=Anzahl der Mäuse).

3.3. Messungen in Vivo

Nachfolgende Messungen wurden an den Tieren vorgenommen, wobei der Zeitpunkt der Messungen aus Abbildung 5 abgelesen werden kann.

3.3.1. Körpergewicht

Die Mäuse wurden im Abstand von 3-4 Tagen unter Zuhilfenahme einer elektronischen Waage gewogen und ihre individuellen Gewichtsverläufe dokumentiert.

3.3.2. Körperzusammensetzung (Echo MR)

Um die Körperzusammensetzung (also Magermasse und Fettmasse) zu bestimmen, wurde eine nicht invasive Methode unter Einsatz eines "Body Composition Analyzers" EchoMRITM-100H (EchoMRI, Houston, TX, USA) verwendet.

3.3.3. Nüchternblutglukose

Zu den angeführten Zeitpunkten (Abbildung 5) wurde eine Blutglukosemessung durchgeführt, bei der den Mäusen nach vierstündigem Fasten eine geringe Menge Blut aus der Schwanzspitze entnommen und mit einem Glukosemessgerät ausgewertet wurde. Bei dem verwendeten Handmessgerät handelte es sich um ein „Nova StatStrip Glucometer“ (Nova Biomedical Corporation, Waltham, MA, USA), welches von der Firma Data Sciences (St.Paul, MN, USA) speziell zur Verwendung bei Labornagern adaptiert wurde.

3.3.4. Blutketonkörper

Bei der Ketonkörpermessung, welche an Tag 78 bzw. 80 durchgeführt wurde, wurde den Mäusen, ähnlich der Glukosemessung, eine geringe Menge Blut aus der Schwanzspitze entnommen und mit einem dafür geeigneten Handmessgerät die Konzentration der β -Ketone gemessen (Free Style Precision Neo, Abbott, Abbott Park, IL, USA).

3.3.5. Glukosetoleranztest (IPGTT)

Nach einer Fastenzeit von etwa acht Stunden wurde wie oben beschrieben bei allen Mäusen eine Glukosemessung durchgeführt. Danach wurde den Mäusen eine zuvor auf das Körpergewicht berechnete Menge (1,5 g/kg; 4,5 μ l/g) einer Glukoselösung intraperitoneal injiziert. Der Zeitpunkt der Injektion wurde als Zeitpunkt 0 angenommen, danach wurden in den Abständen von 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten weitere Glukosemessungen durchgeführt und die erworbenen Daten dokumentiert.

3.3.6. Insulintoleranztest (ITT)

Die Vorgangsweise beim ITT war grundsätzlich die gleiche wie beim IPGTT, jedoch betrug die Fastenzeit vor dem Beginn lediglich vier Stunden. Dann wurde den Mäusen eine Insulinlösung (0,75 U/kg, 5 μ l/g) intraperitoneal zum Zeitpunkt 0 injiziert. Die Blutglukose wurde jeweils nach 15, 30, 45 und 60 Minuten bestimmt. Bei den eingeschränkt gefütterten (rf) und daher schlankeren Mausgruppen wurde auf Grund der bestehenden Gefahr einer lebensbedrohlichen Hypoglykämie nach 30 Minuten der ITT abgebrochen und eine 33-prozentige Glukoselösung intraperitoneal injiziert.

3.3.7. Tötung mit Blut- und Gewebeentnahme

Nach vierstündigem Fasten wurden die Mäuse mit einer hohen, inhalativen Dosis Isofluran in tiefe Narkose versetzt. Nach Prüfung des Zwischenzehenreflexes wurde der Brustkorb der Tiere geöffnet, mittels Herzpunktion eine größere Menge Blut (0,5 – 1,0 ml) entnommen und in vorgekühlte heparinisierte Röhrchen transferiert. Im Verlauf dieser Herzpunktion trat der Tod der narkotisierten Mäuse ein. Die Blutproben wurden für acht Minuten zentrifugiert und das dabei gewonnene Plasma für spätere analytische Tests bei -20°C gelagert. Sodann wurden von folgenden Geweben Proben entnommen:

- Leber
- Epididymales Fettgewebe
- Braunes Fettgewebe
- Herz
- Skelettmuskel (M. gastrocnemius)

Das Gewicht der Leber und des linken epididymalen Fettpolsters wurden bestimmt und die Gewebeproben in Cryo-Tubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Gewebeproben für etwaige spätere Analysen bei -80°C gelagert.

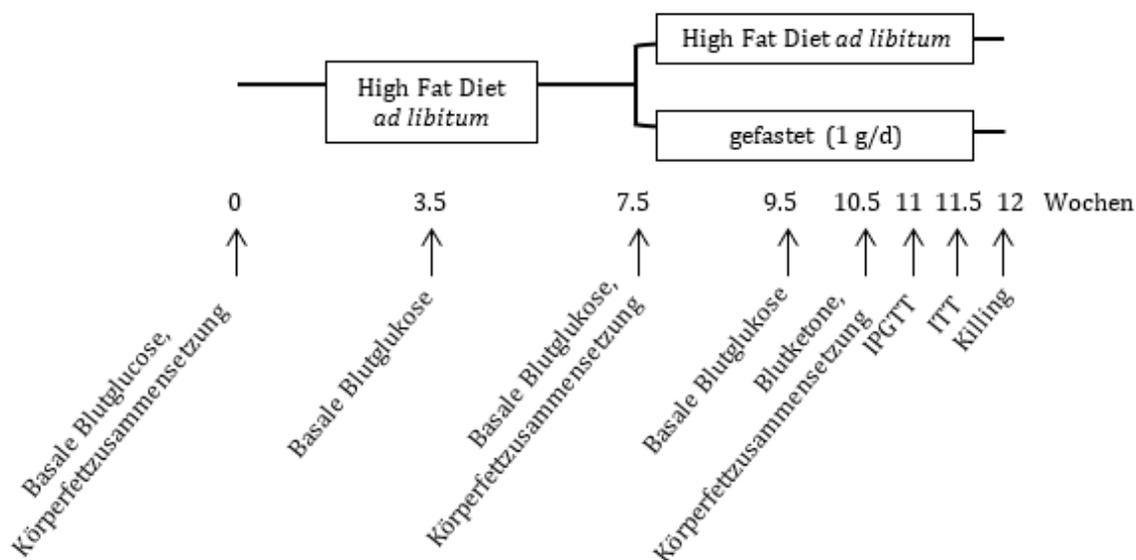


Abbildung 5: Versuchsprotokoll

Schematische Darstellung des Protokolls und der Zeitpunkte, zu denen metabolische Parameter gemessen wurden.

3.4. Analytik

3.4.1. Plasmainsulin

Zum Einsatz kam der "Ultrasensitive Mouse Insulin Elisa", eine Sandwich-Elisa Technik der Firma Mercodia, Uppsala, Schweden, welcher unter Zuhilfenahme der Herstelleranleitung durchgeführt wurde.

3.4.2. Triglyzeride in Geweben

Die Leber- und Muskeltriglyzeride wurden nach der Methode von Folch aus den Gewebeproben extrahiert.²³ Die Proben (ca. 50 mg Gewebe) wurden mit einer 3:1 Mischung aus Chloroform und Methanol in dafür vorgesehenen Tubes versetzt und für vier Stunden auf einem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe einer 0,1 M NaCl-Lösung wurden die Proben zentrifugiert und anschließend wurde die untere Phase (=organische Phase, enthält TG) vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Konzentration der TG mit einem TG-Kit von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) gemessen.

3.4.3. Statistik

Die Interpretation erfolgte im Sinne einer explorativen Datenanalyse. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert und Standardabweichungen vom Mittelwert (SEM) dargestellt. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wurde der Student's T-Test herangezogen, wobei für Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,05 eine statistische Signifikanz angenommen wurde.

4. ERGEBNISSE

In den beiden nachfolgenden Kapiteln 4.1. und 4.2. werden die Ergebnisse der beiden Studienphasen beschrieben.

4.1. Effekte eines STAT5-Mangels im Fettgewebe bei Adipositas

4.1.1. Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich, kam es zu unterschiedlichen Gewichtsverläufen der beiden Gruppen WT und KO. Am Beginn des Experiments war das Körpergewicht der KO-Mäuse ähnlich jenem der WT-Mäuse (KO, $27,4 \pm 0,7$; vs. WT, $26,7 \pm 0,9$ g; n.s.).

Bald nach Beginn der HFD-Fütterung zeichnete sich jedoch ein Trend zu stärkerer Gewichtszunahme der KO-Mäuse ab, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei der Gewichtszunahme erstmals am 21. Tag festgestellt werden konnte ($p=0,038$; Abbildung 6B). Im absoluten Körpergewicht erreichte der entsprechende Unterschied keine statistische Signifikanz, doch ein Trend war zu erkennen ($p=0,092$, Tag 21; Abbildung 6A). Auch im weiteren Verlauf der Phase 1 blieb der Unterschied in der Gewichtszunahme an der Grenze der statistischen Signifikanz ($<0,05$ von Tag 21 bis 45, danach $p<0,056$). Am Ende der Phase 1, in der alle Mäuse freien Zugang zu HFD hatten, lag das Körpergewicht der KO-Gruppe im Mittel um 3,2 g über dem der WT-Gruppe.

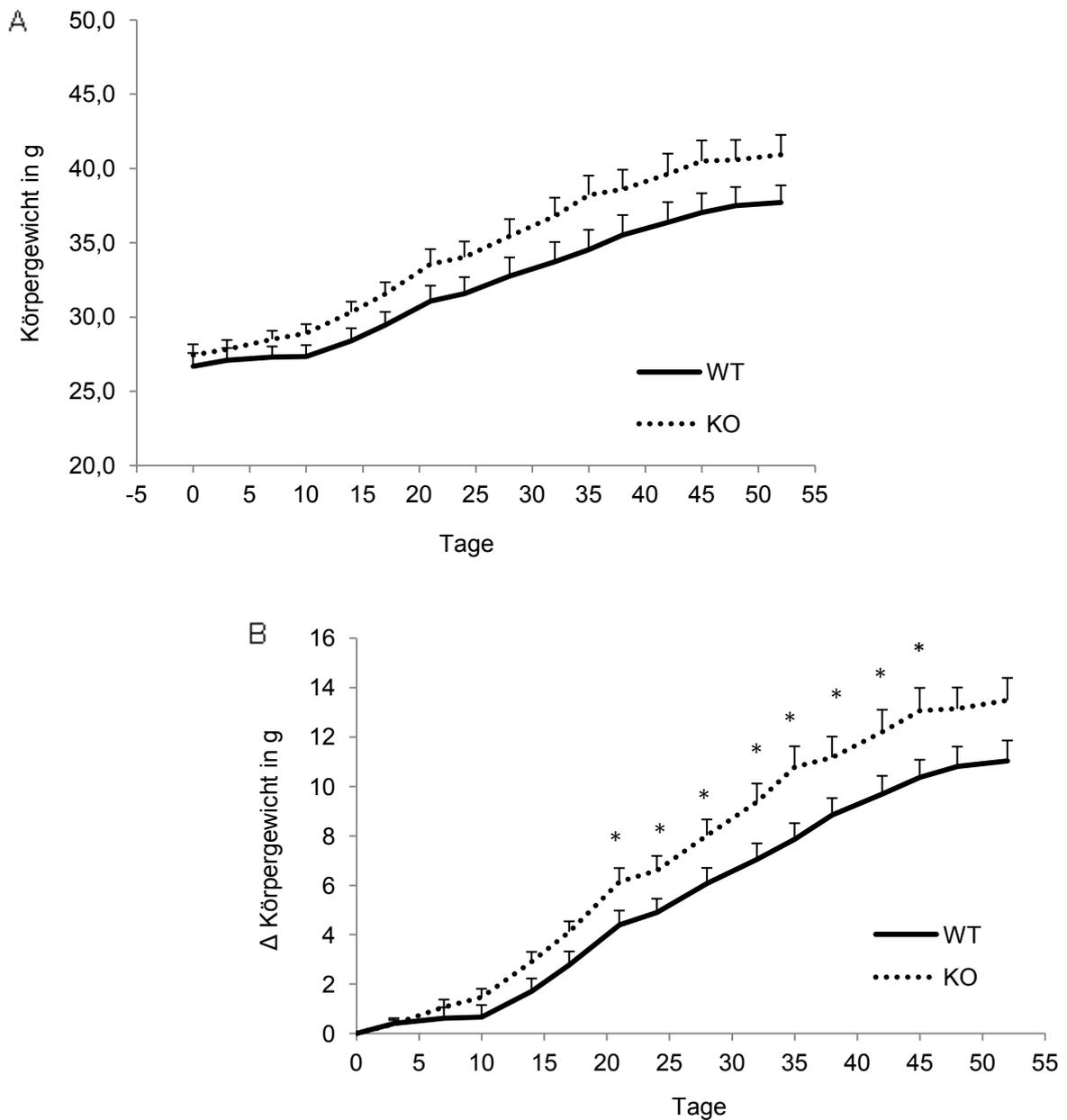


Abbildung 6: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf das Körpergewicht

Körpergewicht (A) und Gewichtszunahme (B) von Wildtypmäusen (WT, n=16) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=20) während 52 Tagen High Fat Diet ad libitum. Mittelwerte \pm SEM; *p<0,05 für WT vs. KO.

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung zeigte, dass das moderat höhere Körpergewicht der KO-Mäuse mit einem höheren Fettanteil als bei WT-Mäusen verbunden war. Vor Beginn der HFD-Fütterung war die Fettmasse der beiden Genotypen ähnlich (KO, $3,51 \pm 0,32$; vs. WT, $3,23 \pm 0,46$ g; $p=0,61$). Unter HFD nahm die Fettmasse der KO-Mäuse signifikant stärker zu als jene der WT-Mäuse (Abbildung 7B).

Am Ende der Phase 1 hatte die absolute Fettmasse unter HFD-Fütterung in allen Mäusen stark zugenommen und es konnte ein Trend zu höherer Fettmasse bei den KO- im Vergleich zu den WT-Tieren verzeichnet werden (Abbildung 7A).

Im Unterschied zur Fettmasse blieb die Magermasse über 52 Tage HFD-Fütterung nahezu konstant (Abbildung 7C&D). Zwischen WT- und KO-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Tag 0: $p=0,76$; Tag 52: $p=0,14$).

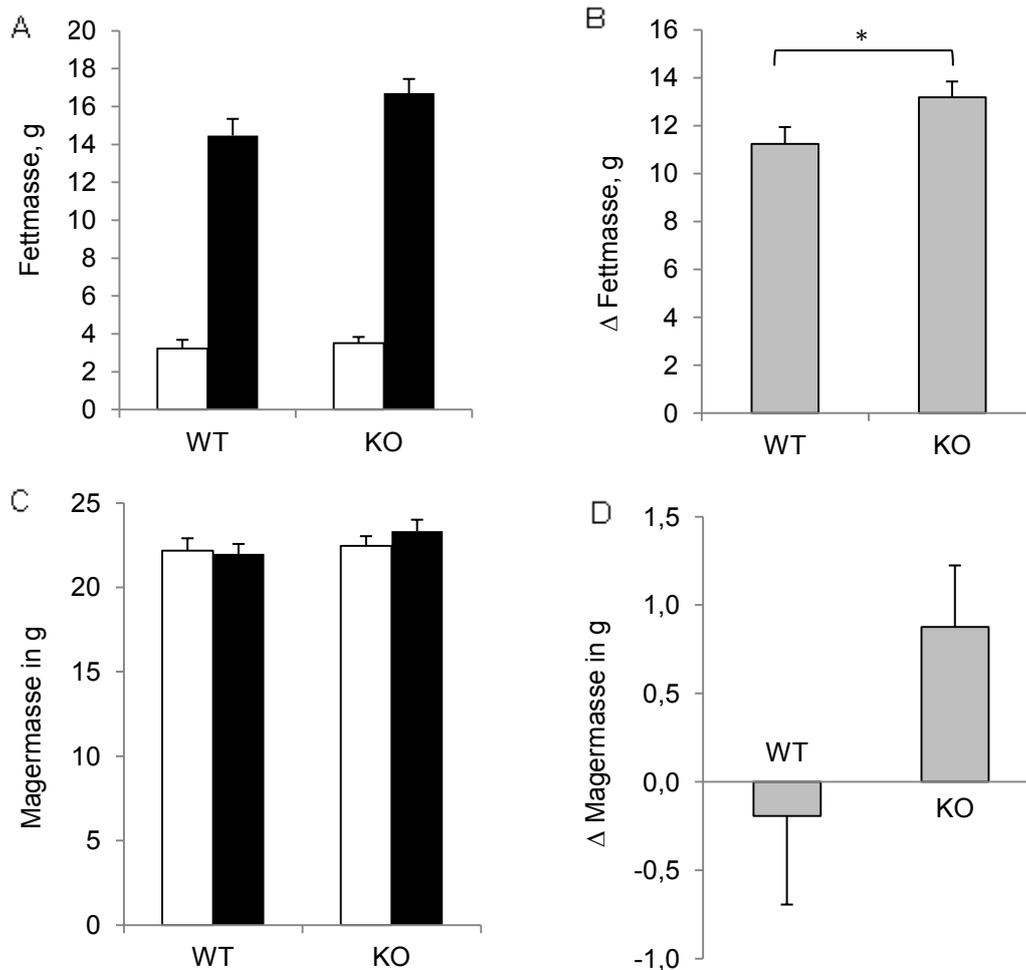


Abbildung 7: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die Körperzusammensetzung

Absolute Fettmasse (A) und deren Anstieg unter High Fat Diet (B), sowie absolute Magermasse (C) und deren Veränderung unter High Fat Diet (D) in Wildtypmäusen (WT, $n=16$) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, $n=20$) während 52 Tagen High Fat Diet ad libitum; (weiße Balken: Tag 0, schwarze Balken: Tag 52). Mittelwerte \pm SEM; * $p<0,05$ für WT vs. KO.

Bezüglich der relativen Fettmasse waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Abbildung 8).

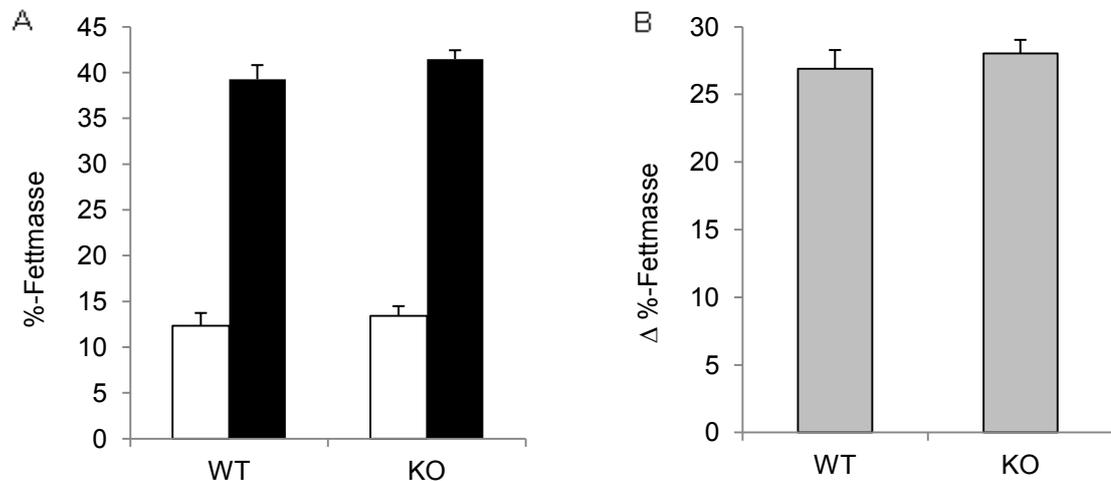


Abbildung 8: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die relative Fettmasse

Relative Fettmasse (A) und deren Anstieg unter High Fat Diet (B) von Wildtypmäusen (WT, n=16) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=20) während 52 Tagen High Fat Diet ad libitum (weiße Balken: Tag 0, schwarze Balken: Tag 52). Mittelwerte \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede für WT vs. KO.

4.1.2. Blutglukose

An den Tagen 0, 24 und 52 wurden Blutglukosemessungen durchgeführt. Die Nüchternblutglukose war am Tag 0 und am Tag 24 zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich (Abbildung 9). Die Nüchternblutglukose der WT-Gruppe lag am Tag 52 bei $179,4 \pm 10,5$ mg/dl, die Mäuse der KO-Gruppe zeigten einen Trend zu höheren Werten ($210,5 \pm 12,6$ mg/dl; $p=0,07$). Auch beim Anstieg zwischen Tag 0 bis Tag 52 war dieser Trend zu bemerken (WT: $+45,1 \pm 8,7$, KO: $+70,7 \pm 9,2$ mg/dl; $p=0,10$). Allerdings wurde bezüglich der Glykämie zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen nachgewiesen.

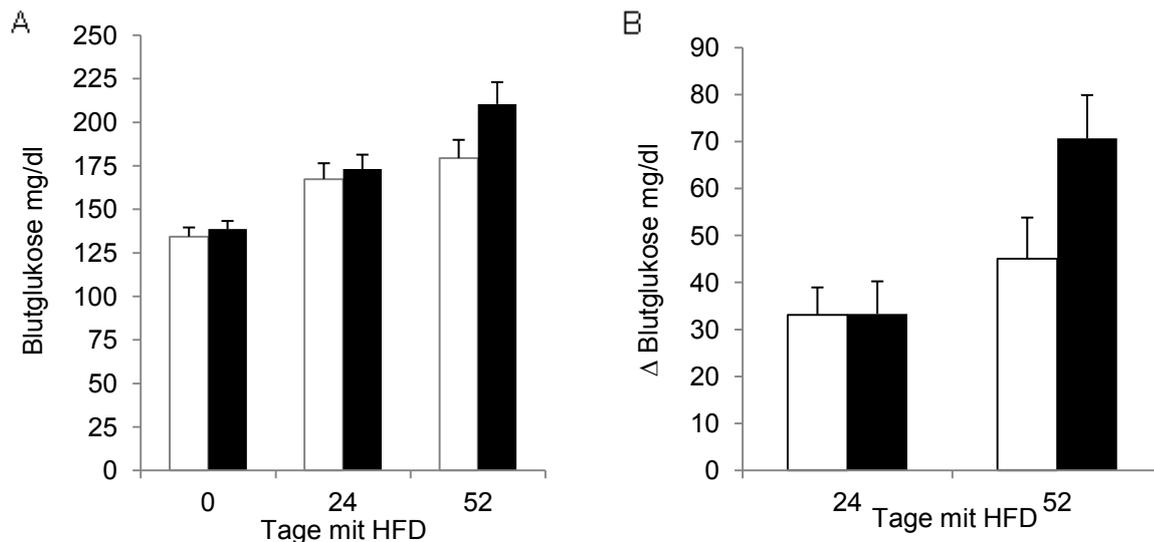


Abbildung 9: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten auf die Nüchternblutglukose

Blutglukose (A) und Veränderung der Blutglukose (B) von Wildtypmäusen (WT, n=16; weiße Balken) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=20; schwarze Balken) während 52 Tagen High Fat Diet (HFD) ad libitum. Mittelwerte \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede für WT vs. KO.

4.2. Kalorienrestriktion von adipösen Mäusen mit STAT5-Mangel im Fettgewebe

4.2.1. Körpergewicht und Körperzusammensetzung

In Phase 2 wurde ebenfalls eine regelmäßige Messung des Körpergewichts der Mäuse durchgeführt. In dieser Phase konnten keine Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen festgestellt werden. Während das Körpergewicht, der einer Futterrestriktion unterzogenen rf-Mäuse abnahm, stieg das Körpergewicht der nicht auf Diät gesetzten al-Gruppen weiterhin an. Im direkten Vergleich zwischen den beiden rf-Gruppen sowie zwischen den beiden al-Gruppen ergaben sich ähnliche Gewichtsverläufe (Abbildung 10A). Der aus der Phase 1 resultierende Trend zu etwas höheren Körpergewichten der KO- als WT-Mäuse mit freiem Zugang zu Futter bestand bis zum Ende der Phase 2 ($p < 0,07$). Bei beiden rf-Gruppen betrug die Gewichtsabnahme rund 9 g, die beiden al-Gruppen nahmen um rund 3 g zu (Effekt der reduzierten Fütterung für WT und KO jeweils $p < 0,0001$; (Abbildung 10B).

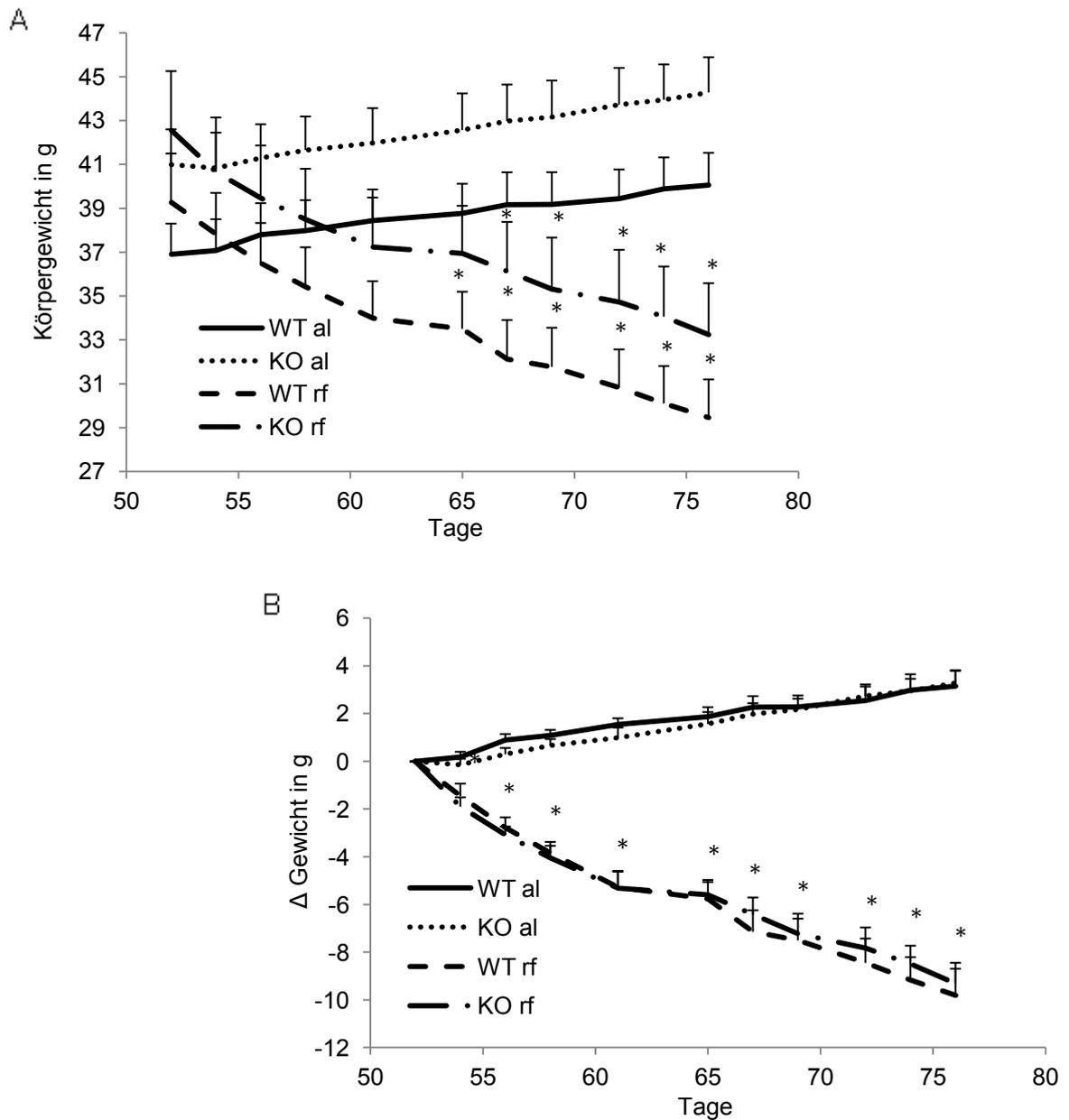


Abbildung 10: Effekte von Kalorienrestriktion bei Mäusen mit STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Körpergewicht

Körpergewicht (A) und Veränderung des Körpergewichts (B) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum von Wildtypmäusen (WT al, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO al, n=12), sowie von Mäusen mit eingeschränkter Fütterung während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ für rf gegen al; keine signifikanten Unterschiede für WT vs. KO.

Die Kalorienrestriktion reduzierte erwartungsgemäß Fett- und Magermasse. Der Vergleich der Genotypen zeigte bezüglich des Verlusts an Fett- und Magermasse jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 11).

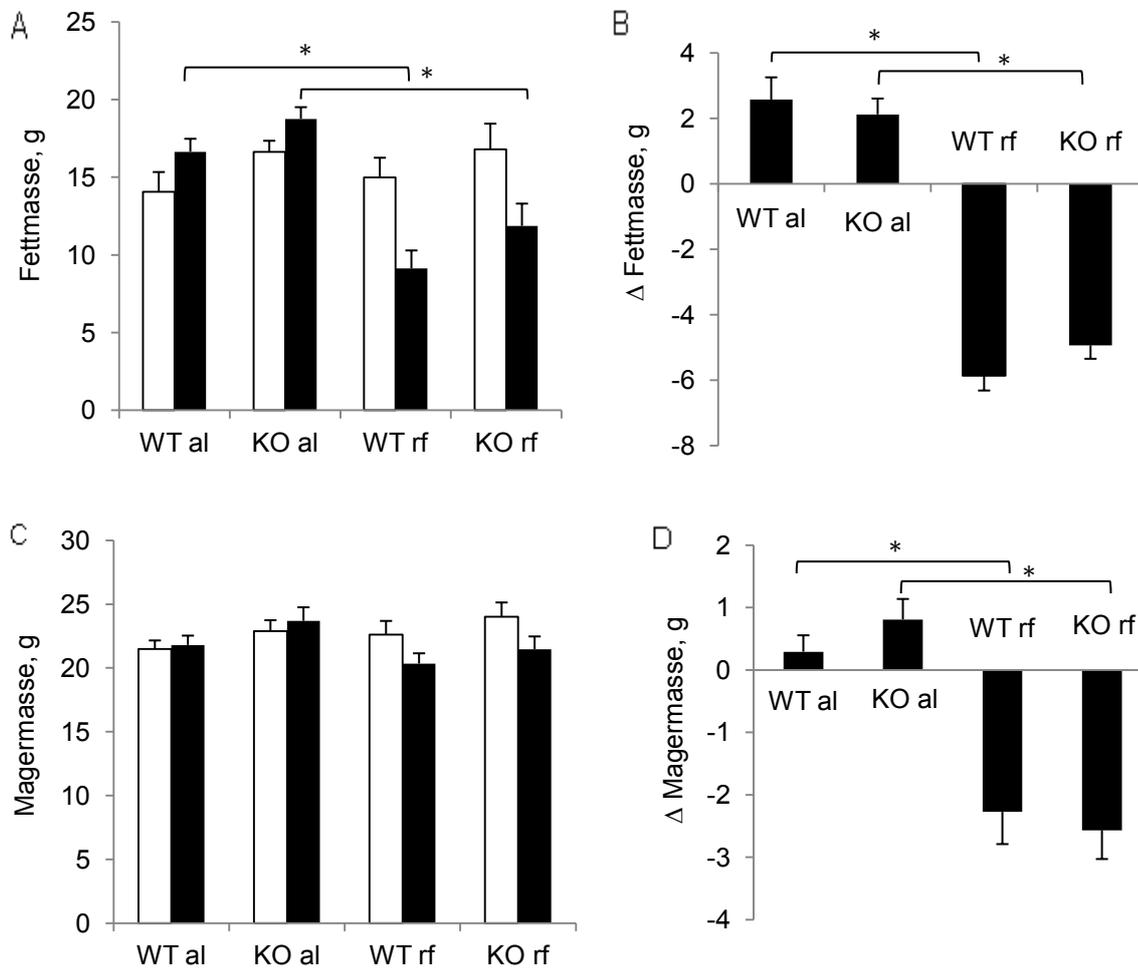


Abbildung 11: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Körperzusammensetzung

Absolute Fettmasse (A) und deren Veränderung (B), sowie absolute Magermasse (C) und deren Veränderung (D) von Wildtypmäusen (WT al, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO al, n=12) nach 72 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7) (A,C: weiße Balken: Tag 52, schwarze Balken: Tag 72). Mittelwerte \pm SEM; *p<0,05 für rf gegen al; keine signifikanten Unterschiede für WT vs. KO.

Parallel dazu kam es auch zu einer Reduktion der relativen Fettmasse (Abbildung 12). Die Abnahme des prozentualen Fettanteils unter Futterrestriktion war bei der WT-Gruppe allerdings signifikant deutlicher als bei der KO-Gruppe (WT rf: $-9,3 \pm 1,1$; vs. KO rf: $-4,9 \pm 0,4$ g; $p=0,035$).

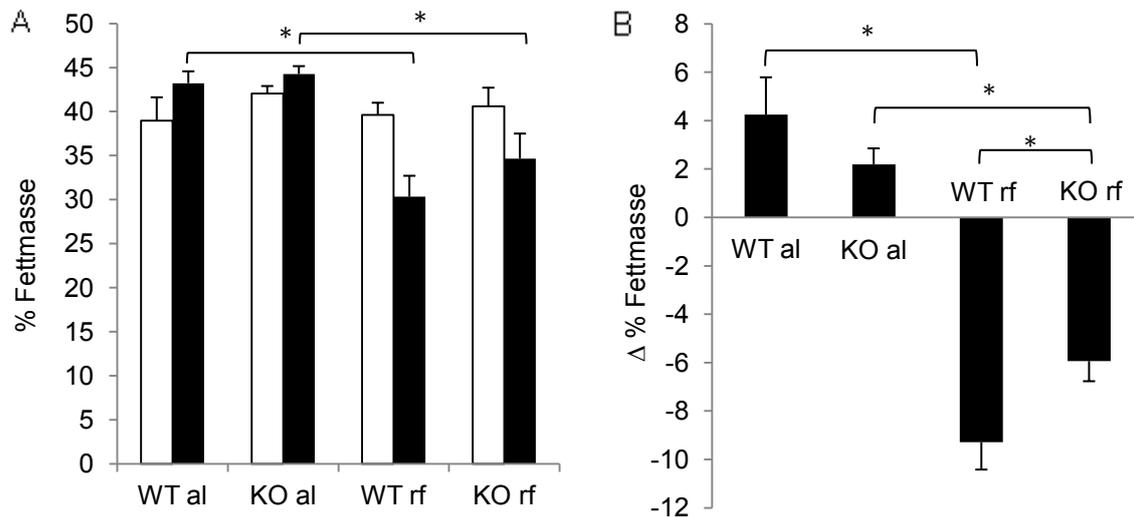


Abbildung 12: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Magermasse

Relative Fettmasse (A: weiße Balken: Tag 52, schwarze Balken: Tag 72) und deren Veränderung (B) von Wildtypmäusen (WT al, $n=9$) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO al, $n=12$) nach 72 Tagen High Fat Diet ad libitum, sowie von solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, $n=5$; bzw. KO rf, $n=7$); Mittelwerte \pm SEM; * $p<0,05$ für rf gegen al bzw. für WT rf vs. KO rf.

4.2.2. Blutglukose

Kalorienrestriktion und Gewichtsverlust der adipösen Mäuse führten erwartungsgemäß zu einem Abfall der Blutglukose (Abbildung 13). Die Nüchternblutglukosewerte der al-Mäuse waren daher letztendlich höher als jene der schlankeren rf-Mäuse. Der Genotyp hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Glykämie.

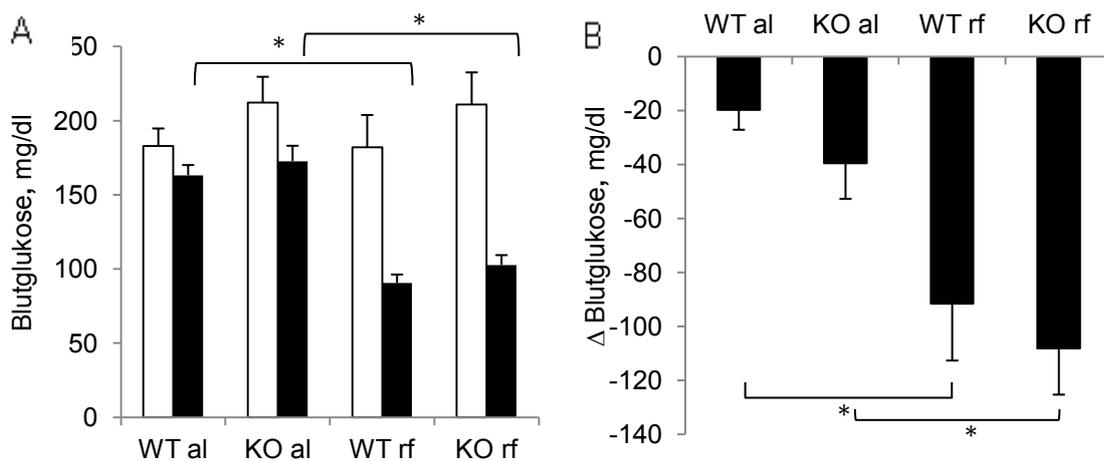


Abbildung 13: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Nüchternblutglukose

Blutglukosewerte (A: weiße Balken: Tag 52, schwarze Balken: Tag 66) und Veränderung der Blutglukose zwischen Tag 52 und Tag 66 (B) von Wildtypmäuse (WT, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

Der Glukosetoleranztest zeigte keinen Unterschied im Vergleich von WT vs. KO der rf-Mäuse, sowie im Vergleich von WT vs. KO der beiden al gefütterten Gruppen. Lediglich zu Beginn des Tests (0 Minuten) fiel zwischen den KO al- und den WT al-Mäusen ein Trend im Sinne geringerer Werte bei der KO al-Gruppe auf ($p < 0,08$). Die rf-Gruppen wiesen gegenüber den dazugehörigen al-Gruppen sowohl einen signifikant geringeren Blutglukosewert über die gesamte Dauer der Messung als auch eine signifikant geringere Fläche unter der Kurve auf (AUC).

Zusammengefasst lässt sich somit kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen bezüglich der Glukosetoleranz feststellen (Abbildung 14).

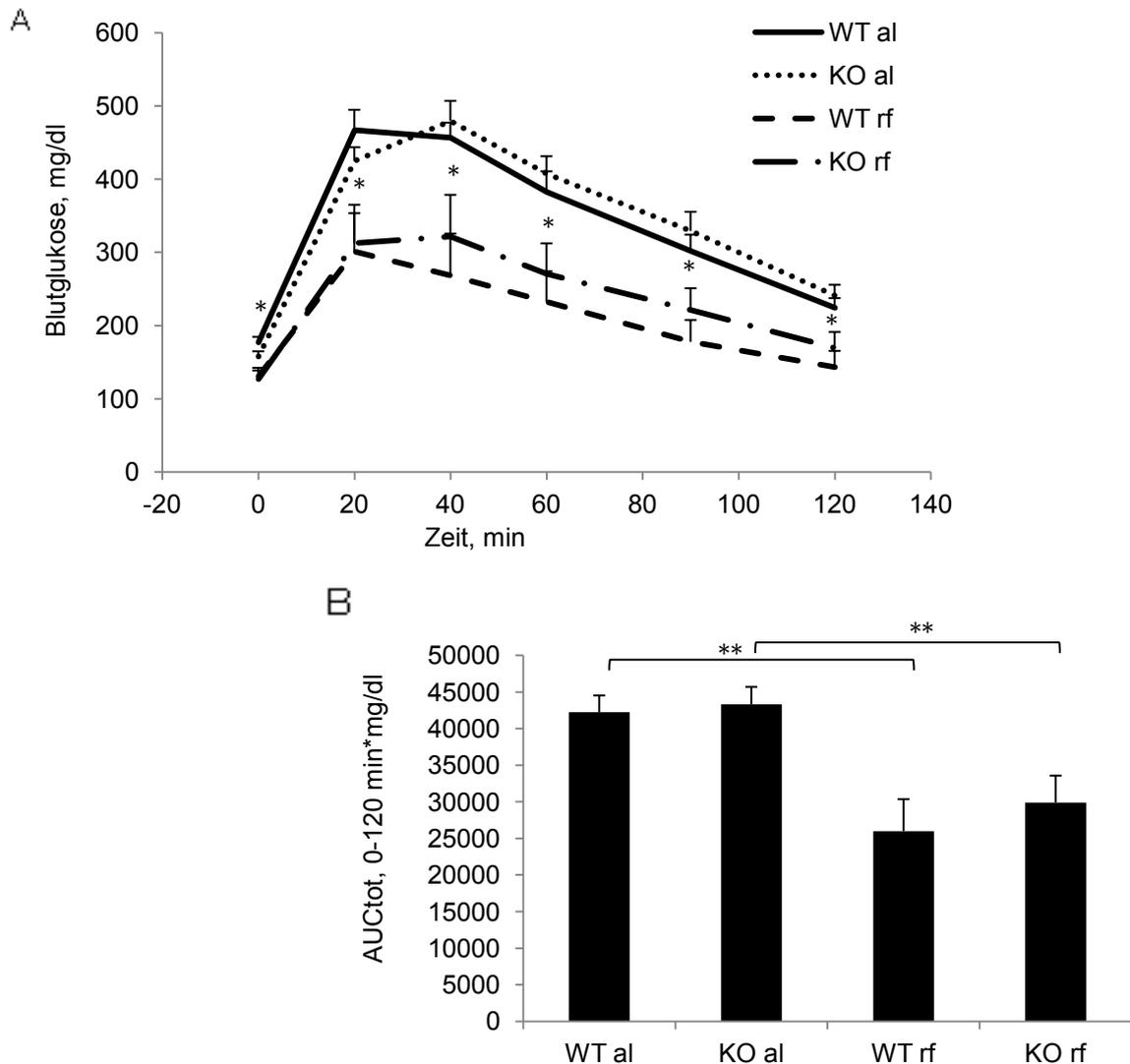


Abbildung 14: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Glukosetoleranz

Glukosetoleranztest (A) und korrespondierende Fläche unter der Blutglukosekurve (AUCtot) (B) von Wildtypmäusen (WT, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen nach eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; *p<0,05 bzw. **p<0,01 für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

Am Beginn des ITT zeigten die eingeschränkt gefütterten, schlankeren rf-Tiere deutlich niedrigere Glukosewerte als die al-Tiere. Ausgehend von diesen Werten zeigten alle Gruppen über die darauffolgenden 30 Minuten einen ähnlichen Abfall der Glykämie (Abbildung 15).

Die Mäuse der beiden unter Futterrestriktion gehaltenen Gruppen hatten bereits nach 30 Minuten lebensbedrohlich geringe Blutglukosekonzentrationen erreicht (WT rf: $59,3 \pm 3,6$ und KO rf: $49,1 \pm 5,2$ mg/dl; $p=0,13$). Der ITT wurde daher abgebrochen und den Tieren musste eine 33-prozentige Glukoselösung injiziert werden. Ein Einfluss des Genotyps auf die Insulintoleranz konnte nicht festgestellt werden.

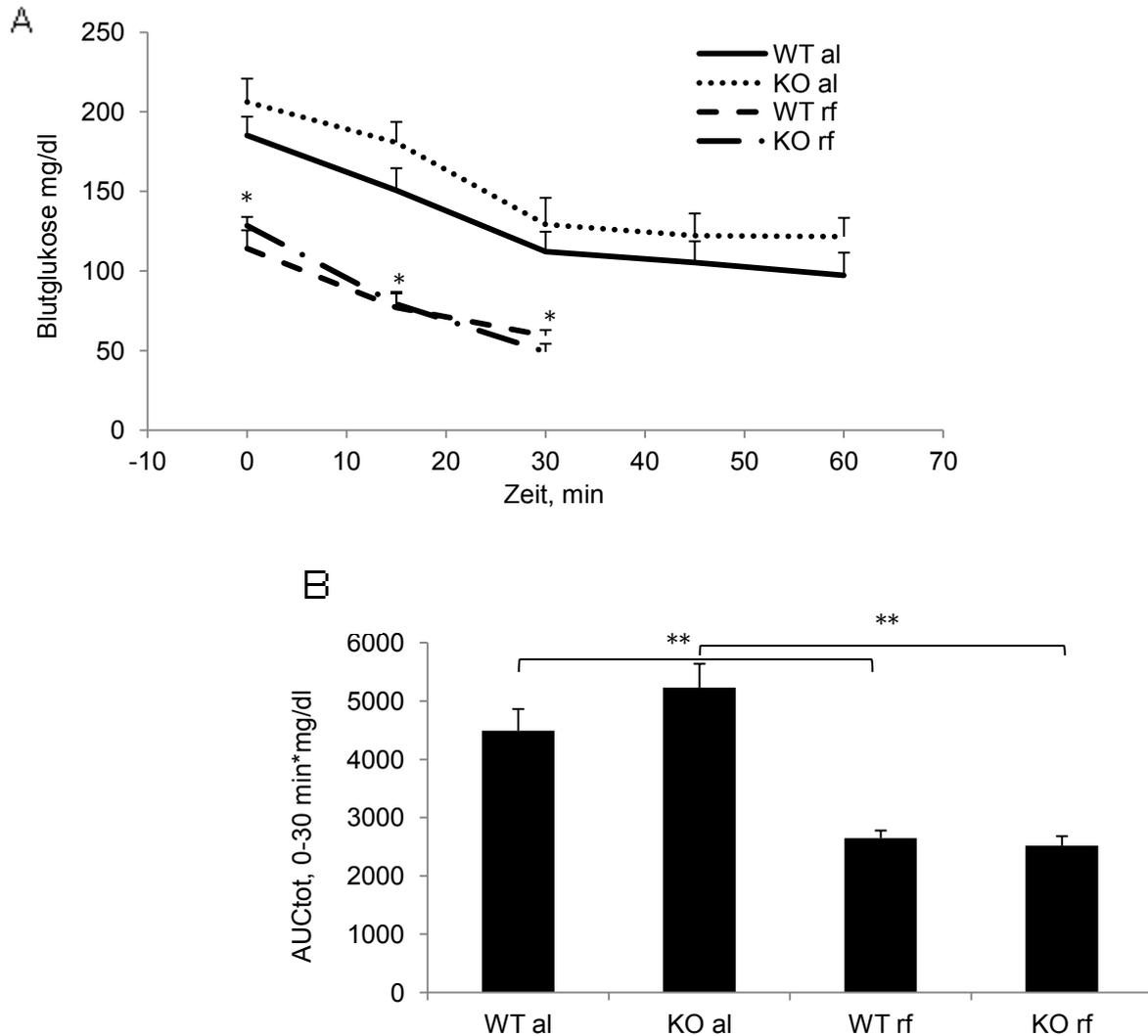


Abbildung 15: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Insulintoleranz

Blutglukose (A) und korrespondierende Fläche unter der Blutglukosekurve (AUCtot) (B) in Wildtypmäusen (WT, $n=9$) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, $n=12$) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen nach eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, $n=5$; bzw. KO rf, $n=7$). Mittelwerte \pm SEM; * $p<0,05$ bzw. ** $p<0,01$ für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

Gegen Ende der Phase 2 wurden außerdem die Blutketone gemessen. Die Kalorienrestriktion führte bei den WT-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Blutketone (WT al: $0,56 \pm 0,05$ vs. WT rf: $0,79 \pm 0,06$ mmol/l; $p=0,010$). Dieser Anstieg war bei den KO-Mäusen nicht zu finden (KO al: $0,60 \pm 0,04$ vs. KO rf: $0,68 \pm 0,06$; $p=0,28$). Der direkte Vergleich der Genotypen zeigte aber keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 16).

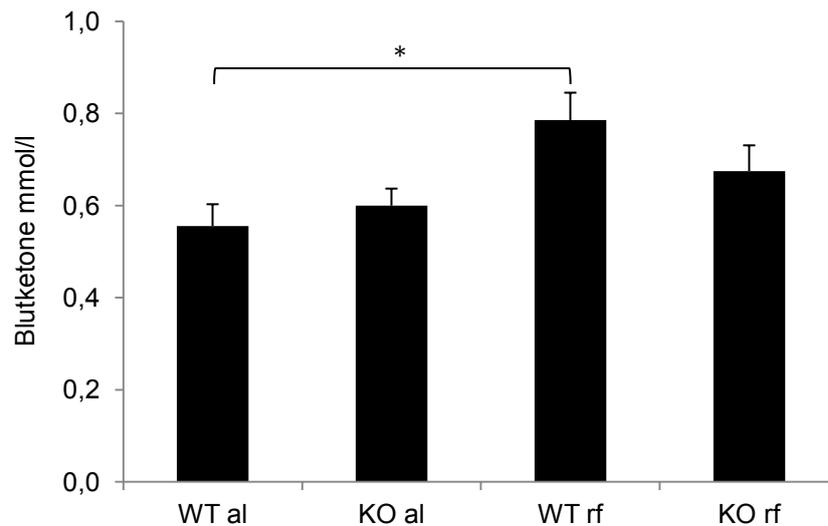


Abbildung 16: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Blutketone

Blutketone von Wildtypmäusen (WT, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; * $p<0.05$ für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

4.2.3. Fettpolster- und Lebergewicht

Am Tag 83 lagen die Gewichte des epididymalen Fettpolsters und der Leber der eingeschränkt gefütterten rf-Mäuse deutlich unter jenen der al-Tiere. Unterschiede zwischen den Genotypen (KO bzw. WT) bestanden jedoch nicht (Abbildung 17).

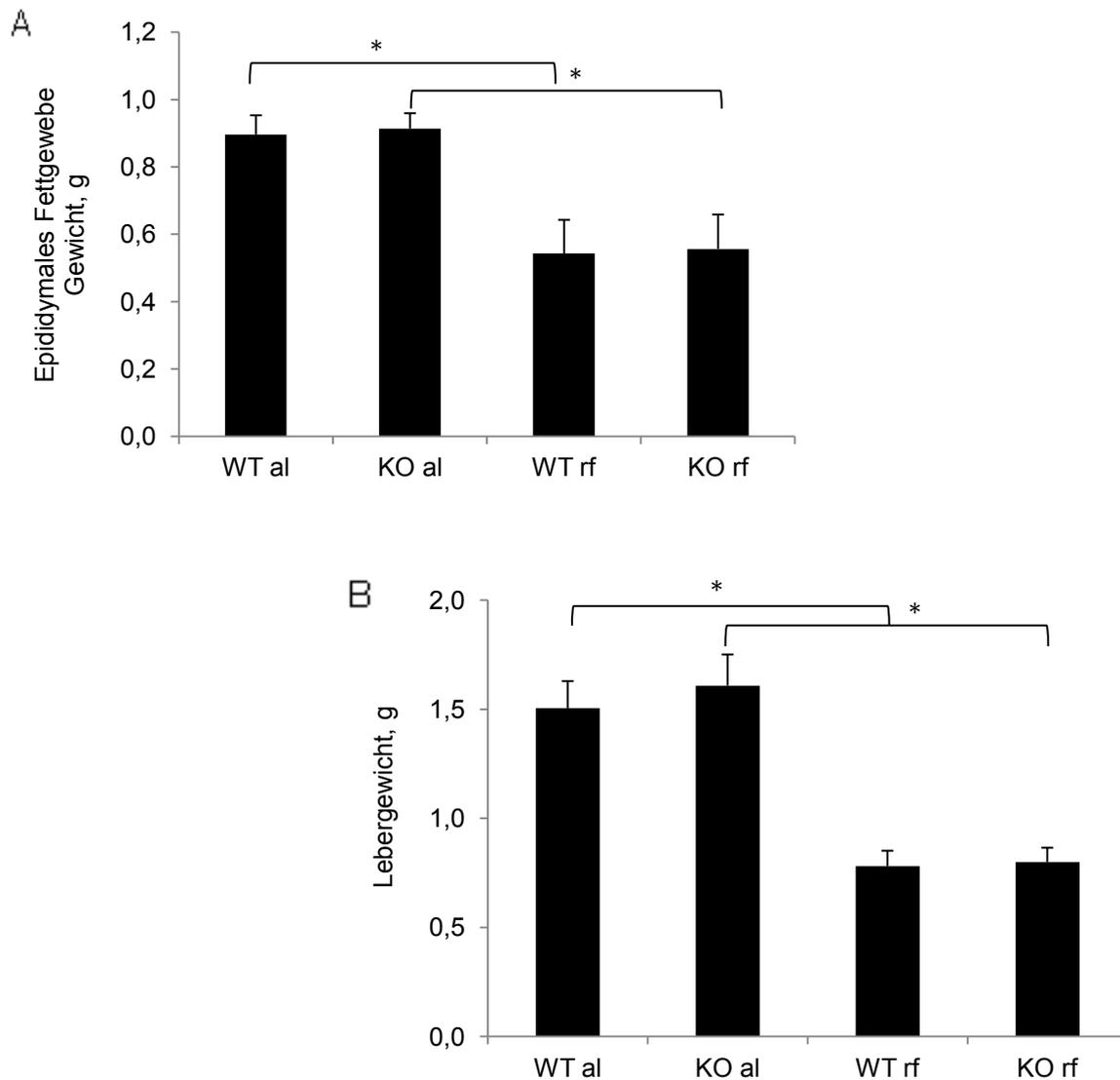


Abbildung 17: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Gewicht des epididymalen Fettpolsters und der Leber

Gewicht des epididymalen Fettpolsters (A) und der Leber (B) in Wildtypmäusen (WT=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte±SEM; n=5-12; *p<0.05 für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

4.2.4. Plasmainsulin

Das Plasmainsulin der al-Mäuse war, wie zu erwarten, höher als jenes der rf-Tiere (Abbildung 18). Die Unterschiede al vs. rf waren allerdings im Students t-Test nicht signifikant. Wie bei ausgeprägter Insulinresistenz typisch, zeigten die Insulin-konzentrationen der adipösen al-Mäuse eine starke Streuung und offenbar keine Normalverteilung. Zu diesem Zweck wurde auch ein "Rank Test" durchgeführt (Mann-Whitney-U), wobei in beiden Genotypen für al vs. rf signifikante Unterschiede gefunden wurden (jeweils $p < 0,05$).

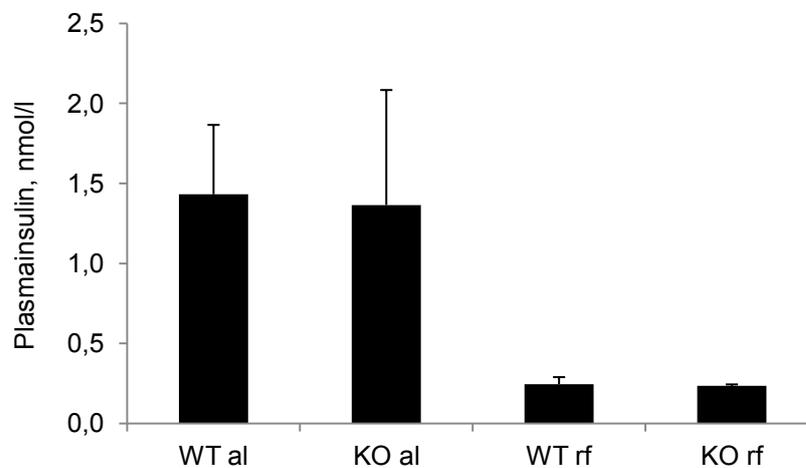


Abbildung 18: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf das Plasmainsulin

Plasmainsulin in Wildtypmäusen (WT, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, n=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; keine signifikanten Unterschiede mit Student's t Test.

4.2.5. Plasma- und Lebertriglyzeride

Die Plasmatriglyzeride waren zwischen den Genotypen unabhängig vom Ernährungsstatus gleich. Futterrestriktion senkte allerdings in WT- und in KO-Mäusen signifikant die Plasmatriglyzeride (WT al: $0,54 \pm 0,03$, vs. WT rf: $0,40 \pm 0,01$ g/l, $p=0,01$; KO al: $0,55 \pm 0,02$, vs. KO rf: $0,39 \pm 0,01$ g/l, $p=0,0002$; Abbildung 19).

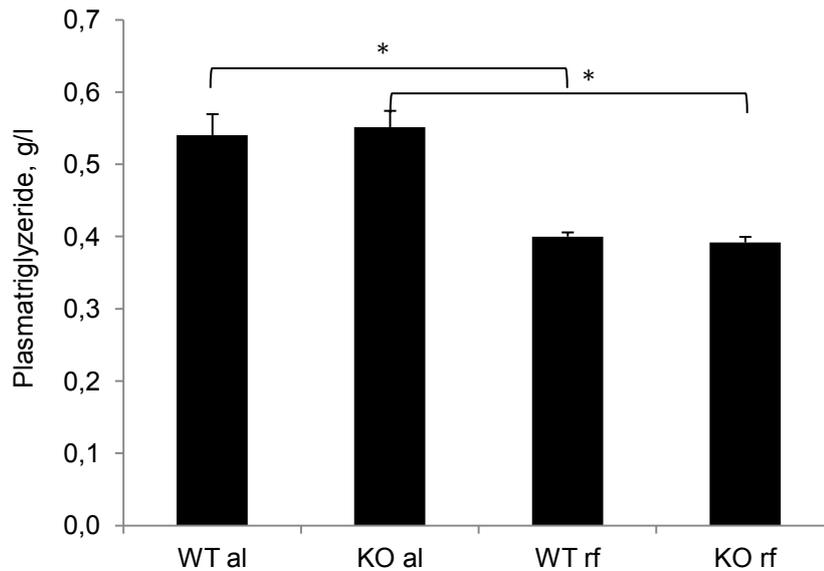


Abbildung 19: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Plasmatriglyzeride

Plasmatriglyzeride von Wildtypmäusen (WT, n=9) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO al, n=12) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, n=5; bzw. KO rf, n=7). Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

Wie die Plasmatriglyzeride zeigten auch die Lebertriglyzeride in beiden Genotypen einen signifikanten Unterschied zwischen jenen Mäusen ohne und mit Futterrestriktion gehaltenen Mäusen. Die Lebertriglyzeridkonzentration war jedoch zwischen WT- und KO-Mäusen nicht unterschiedlich (WT al: 54 ± 7 , vs. WT rf: 31 ± 7 mg/g, $p=0,03$; KO al: 60 ± 6 , vs. KO rf: 23 ± 3 mg/g, $p<0,0001$; Abbildung 20).

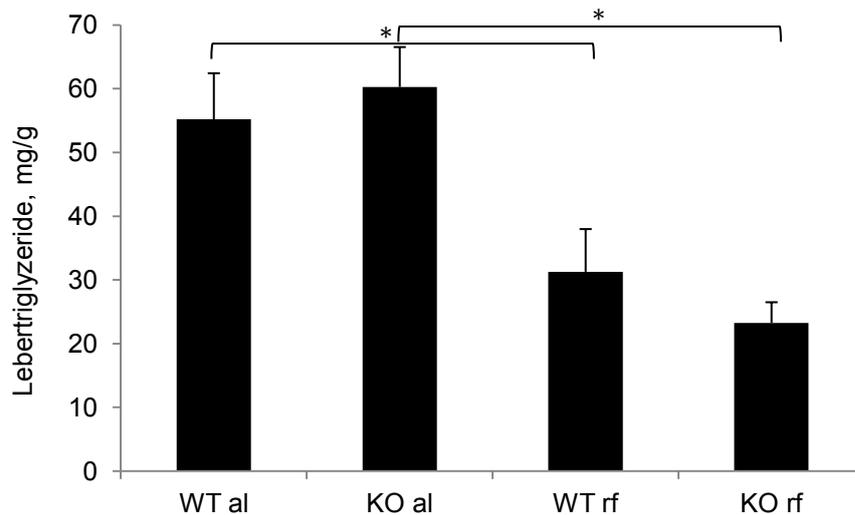


Abbildung 20: Einfluss von STAT5-Mangel in Adipozyten bei ad libitum oder eingeschränkt gefütterten Mäusen auf die Lebertriglyzeride

Lebertriglyzeride von Wildtypmäusen (WT, $n=9$) und Mäusen mit STAT5-Mangel in den Adipozyten (KO, $n=12$) nach 76 Tagen High Fat Diet ad libitum (al), sowie solchen Mäusen mit eingeschränkter Fütterung (rf) während der letzten 24 Tage (1 g High Fat Diet/Tag: WT rf, $n=5$; bzw. KO rf, $n=7$). Mittelwerte \pm SEM; * $p<0.05$ für rf gegen al; kein signifikanter Unterschied für WT vs. KO.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Mäuse mit einem Mangel an STAT5 in den Adipozyten im Vergleich zu Mäusen ohne entsprechenden Gendefekt unter Fütterung mit fett- und kalorienreicher Nahrung, zu einer erhöhten Gewichtszunahme und Fettansammlung neigen. Wenn die Unterschiede gegenüber WT-Mäusen auch eher moderat ausfielen, so bestätigen die Resultate dieser Arbeit doch im Grunde das Ergebnis der vorangegangenen Studie von Doris Kaltenecker et al.⁶, anhand derer an STAT5-defizitären Mäusen unter herkömmlicher, kohlenhydratreicher Diät gezeigt wurde, dass solche Tiere zu einer vermehrten Akkumulation von Körperfett neigen und die Mobilisierung von Lipiden aus dem Fettgewebe bei 48-stündigem Fasten massiv beeinträchtigt ist. Diese eingeschränkte Lipolyse wurde in der vorliegenden Arbeit nicht unter totalem Futterentzug für 48 h untersucht, sondern unter Gewichtsverlust durch hypokalorische Fütterung über mehrere Wochen. Auch hier kam die reduzierte Lipolyse durch einen geringeren Verlust an relativer Fettmasse in KO-Mäusen als in WT-Mäusen zum Ausdruck.

Darüber hinaus wurde von Doris Kaltenecker et al.⁶ an den mit herkömmlicher, kohlenhydratreicher Labornagernahrung gefütterten STAT5^{Adipoq}-Mäusen festgestellt, dass die gehemmte Lipolyse in den Adipozyten mit verbesserter Blutglukosehomöostase und reduzierten Plasmalipiden einherging. Ein Mechanismus, der für die verbesserten Stoffwechseleigenschaften trotz vermehrtem Körperfett bei den STAT5^{Adipoq}-Mäusen verantwortlich sein könnte, ist ein „Einfangen“ von Lipiden in den Adipozyten. So wird der Fluss von Lipiden zu Organen, die für die Regulation der Blutglukose wichtig sind - also Muskel, Leber und die endokrine Bauchspeicheldrüse - reduziert. Es ist bekannt, dass die Lipidexposition solcher Organe und die Ablagerung von Lipiden in diesen Organen (sogenanntes ektopes Fett) die Insulinsensitivität und die Glukosehomöostase beeinträchtigen kann. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Lipotoxizität.

Die Vermittler dieser Lipotoxizität dürften Insulin-desensibilisierende Lipidmetaboliten sein, die in den Zellen akkumulieren, wenn die betroffenen Gewebe hohen zirkulierenden Lipidkonzentrationen ausgesetzt sind.²⁴

Im Unterschied zu den Ergebnissen von kohlenhydratreich ernährten Mäusen konnten in der vorliegenden Studie an fettreich gefütterten Tieren jedoch keine metabolischen Vorteile eines STAT5-Mangels in den Adipozyten festgestellt werden. Blutglukose, Plasmalipide und Lebertriglyzeride wiesen sowohl bei uneingeschränkter Fütterung, als auch nach Gewichtsreduktion keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. Auch Glukose- und Insulintoleranz waren nicht unterschiedlich.

Unter kohlenhydratreicher Diät wurden bei WT- und KO-Mäusen zwar ähnliche Nüchternblutglukosewerte, bei den KO-Tieren allerdings niedrigere Insulinspiegel gemessen, was auf Insulinsensitivierung hinweist.⁶ Einher ging dies mit geringeren Glykogenspeichern in der Leber, was entweder auf eine erhöhte Glykogenolyse oder eine reduzierte Glykogensynthese der KO-Tiere zurückzuführen war. In der vorliegenden Studie konnten zwar auch ähnliche Konzentrationen der Nüchternblutglukose in den Gruppen nachgewiesen werden, allerdings wurde sowohl in der Phase der freien HFD-Fütterung, als auch in der anschließenden Phase der eingeschränkten Fütterung kein signifikanter Unterschied bei den Plasmainsulinwerten festgestellt. Dass bei HFD gefütterten STAT5^{Adipoq}-Mäusen auch nach strikter Nahrungseinschränkung und Gewichtsabnahme keine metabolische Verbesserung zu finden war, impliziert, dass der hohe Fettgehalt der Nahrung und nicht die große Körperfettmasse für den Unterschied zu den kohlenhydratreich ernährten Mäusen verantwortlich gewesen sein muss.

Bei kohlenhydratreicher Ernährung, also geringer Fettaufnahme, dürften somit die STAT5-defizienten Adipozyten ausreichend Lipide „einfangen“, um eine wirksame Senkung der zirkulierenden Lipidkonzentrationen und eine wirksame Reduktion ektoper Lipidakkumulation herbeizuführen, das zu einer Insulinsensitivierung führt.⁶ Die gewonnenen Ergebnisse von HFD-gefütterten Mäusen weisen jedoch darauf hin, dass es den STAT5-defizienten Adipozyten bei überschießender Lipidaufnahme nicht möglich war, eine ausreichend große Lipidmenge einzufangen, um den hohen alimentären Lipidanstrom zu kompensieren. Demzufolge konnten offenbar eine Lipotoxizität und die damit verbundenen Störungen der Insulinsensitivität und des Glukosestoffwechsels nicht verhindert werden.

Zusammengefasst bestätigt die vorliegende Studie somit zwar die, durch den STAT5- Mangel in den Adipozyten verursachte Hemmung der Lipolyse mit erhöhter Lipidspeicherung, allerdings scheint der regulatorische Einfluss von STAT5 auf den Lipidumsatz der Adipozyten zumindest bei Mäusen nicht ausreichend zu sein, um den metabolischen Folgen einer Adipositas und/oder eines hohen alimentären Lipidkonsums entgegen zu wirken.

6. DISKUSSION UND AUSBLICK

Die Ergebnisse von kohlenhydratreich gefütterten, schlanken Mäusen hatten Hoffnungen geweckt, dass STAT5 ein pharmakologisches Target sein könnte, über welches die metabolischen Folgen der Adipositas reduziert werden könnten. Insgesamt unterstützen die Resultate der vorliegenden Studie diese Spekulationen nicht, da die Blockade des STAT5-Signalweges in den Adipozyten bei adipösen Mäusen nicht die erhofften metabolischen Verbesserungen brachte.

Trotzdem sind weitere Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Rolle von STAT5 in Adipozyten sinnvoll, nicht zuletzt da die Ergebnisse von Mäusen nicht zwingend und uneingeschränkt auf menschliche Patienten übertragbar sind. Nachdem die Ergebnisse meiner Untersuchung darauf hinweisen, dass der Mangel an positiven Effekten auf den Glukose- und Fettstoffwechsel eher mit dem Fettgehalt der Diät als mit dem Übergewicht erklärbar sind (unter HFD war auch nach Gewichtsabnahme keine Verbesserung zu finden), lässt sich nicht ausschließen, dass eine STAT5-Blockade unter kohlenhydratreicher Diät, durchaus auch bei Adipositas, Stoffwechselstörungen entgegenwirkt. Das ließe sich in einem weiteren Anlauf an STAT5^{Adipoq}-Mäusen untersuchen.

Eine weitere Hürde, die auf dem Weg vom STAT5^{Adipoq}-Modell zu einer möglichen Nutzung von STAT5 als klinisches Target noch zu bewältigen wäre, ist allerdings die Beschränkung des STAT-Mangels im Mausmodell auf einen bestimmten Zelltyp. Die beschriebenen Effekte beruhen ja auf der Ausschaltung von STAT5 nur in reifen Adipozyten. Eine solche zellspezifische Intervention ist freilich mit einem konventionellen pharmakologischen Zugang – also z.B. mit einem STAT5-Blocker – nicht machbar. Inwieweit eine Blockade des STAT5-Signals in anderen Zellen und Organen problematische Nebenwirkungen erzeugen oder erwünschte Wirkungen aufheben könnte, bleibt also noch zu klären.

7. QUELLENVERZEICHNIS

- ¹ WHO Weltgesundheitsorganisation - Regionalbüro für Europa 2017, *Welt-Adipositas-Tag: Adipositas und ihre Folgen für die Gesellschaft*, abgerufen am 5. Jänner 2020, <http://www.euro.who.int/de/healthtopics/noncommunicable-diseases/obesity/news/news/2017/10/world-obesity-day-understanding-the-social-consequences-of-obesity>.
- ² Hauner, H, Moss, A, Berg, A, Bischoff, S, C, Colombo-Benkmann, M, Ellrott, T, Kanthak, U, Kunze, D, Stefan, N, Teufel, M, Wabitsch, M, & Wirth, A 2017, „Adipositas und Diabetes mellitus“, *Diabetologie*, vol. 12 no. 2, pp. 157-163, <https://doi.org/10.1055/s-0043-115965>.
- ³ Harms, M & Seale, P 2013, “Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential”, *Nature Medicine*, vol. 19, no. 10, pp. 1252-1263, <https://doi:10.1038/nm.3361>.
- ⁴ Romacho, T, Elsen, M, Röhrborn, D & Eckel, J 2014, “Adipose tissue and its role in organ crosstalk”, *Acta Physiologica*, vol. 210, no. 4, pp.733-753, <https://doi.org/10.1111/apha.12246>.
- ⁵ Hauner, H 2003, *Fettzelle als Ursache des Typ 2 Diabetes mellitus*, abgerufen am 20. Oktober 2019, https://www.diabetes-deutschland.de/archiv/archiv_2287.htm.
- ⁶ Kaltenecker, D, Mueller, KM, Benedikt, P, Feiler, U, Themanns, M, Schlederer, M, Kenner, L, Schweiger, M, Haemmerle, G & Moriggl, R 2017, „Adipocyte STAT5 deficiency promotes adiposity and impairs lipid mobilisation in mice“, *Diabetologia*, vol. 60, no. 2, pp. 296-305, <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4152-8>.
- ⁷ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 50.4 "Die Koordination des Stoffwechsels beruht auf einer Arbeitsteilung zwischen Organen", pp. 692-694.
- ⁸ Müller-Wieland, P & Kommission Labordiagnostik in der Diabetologie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) 2019, „Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus“, *Diabetologe*, vol. 15, no. 2, pp. 128-134, <https://doi.org/10.1007/s11428-019-0460-1>.
- ⁹ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 50.6 "Glucose ist die wichtigste Regelgröße bei Nahrungsaufnahme und Hunger", pp. 695-699.

- ¹⁰ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 50.9 "Störungen des Glucosestoffwechsels führen zu schwerwiegenden Erkrankungen", pp. 701-703.
- ¹¹ Österreichische Diabetes Gesellschaft 2016, Leitlinien für die Praxis 2016, MedMedia Verlag und Mediaservice Ges.m.b.H., abgerufen am 26. Jänner 2020, https://www.oedg.at/pdf/OEDG_Pocket_Guide_Diabetes_2016.pdf.
- ¹² Wilcox, G, 2005, „Insulin and insulin resistance“, *The Clinical biochemist. Reviews*, vol. 26, no. 2, pp. 19–39, abgerufen am 25. Mai 2020, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1204764/>.
- ¹³ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 31.4 " Insulin und Glucagon sichern die Glucosehomöostase", pp. 441-448.
- ¹⁴ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 5.3 " Polypeptide können nach ihrer Synthese modifiziert werden", pp. 70-72.
- ¹⁵ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 50.2 "Glucose-6-phosphat, Pyruvat und Acetyl-CoA markieren metabolische Knotenpunkte", pp. 690-691.
- ¹⁶ Kolter T & Hartmann-Schreier J 2007, „Lipolyse“, in Böckler F, Dill B, Dingerdissen U, Eisenbrand G, Faupel F, Fugmann B, Gamse T, Matissek R, Pohnert G & Sprenger G, RÖMPP [Online], Stuttgart, Georg Thieme Verlag, abgerufen am 29. März 2020, <https://roempp-thieme-de.uaccess.univie.ac.at/lexicon/RD-12-01278>.
- ¹⁷ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 45.2 "Lipasen hydrolysieren Triacylglycerine zu freien Fettsäuren", pp. 625-626.
- ¹⁸ Kolter T 2017, „Adipocyten-Triglycerid-Lipase“, in Böckler F, Dill B, Dingerdissen U, Eisenbrand G, Faupel F, Fugmann B, Gamse T, Matissek R, Pohnert G & Sprenger G, RÖMPP [Online], Stuttgart, Georg Thieme Verlag, abgerufen am 29. März 2020, <https://roempp-thieme-de.uaccess.univie.ac.at/lexicon/RD-01-05705>.
- ¹⁹ Müller-Esterl, W, Anderka, O, Brandt, U, Kerscher, S, Kieß, S & Ridinger, K 2018, *Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3. Auflage, Springer Spektrum, 2018. Kapitel 29.6 "Cytokine benutzen Tyrosin-Kinase-assoziierte Rezeptoren", pp. 404-406.

- ²⁰ Dodington, DW, Desai, HR & Woo, M 2018, „JAK/STAT – Emerging Players in Metabolism”, *Trends in Endocrinology & Metabolism: TEM*, vol. 29, no. 1, pp. 55-65, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.001>.
- ²¹ Mitchell, TJ & John, S 2005, “Signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling and T-cell lymphomas”, *Immunology*, vol. 114, no. 3, pp. 301-312, <https://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1365-2567.2005.02091.x>
- ²² Richard, AJ & Stephens, JM 2011, “Emerging roles of JAK-STAT signaling pathways in adipocytes”, *Trends in Endocrinology & Metabolism: TEM*, vol. 22, no. 8, pp. 325–332, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.03.007>.
- ²³ Folch, J, Lees, M & Sloane Stanley, GH 1957, „A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497-509.
- ²⁴ Samuel VT, Petersen KF & Shulman GI 2010, “Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism.”, *Lancet*, vol. 375 (9733), pp. 2267-2277, [http://doi:10.1016/S0140-6736\(10\)60408-4](http://doi:10.1016/S0140-6736(10)60408-4).