Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

DNA-Methylierung des Neuropeptid Y-Genpromotors im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Brunn

aus Kaiserslautern

Gutachter:

1. Prof. Dr. A. Plagemann
2. Prof. Dr. E. Beinder
3. Prof. Dr. J. Dötsch

Datum der Promotion: 19.03.2010

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung..... 3

1.1 Übergewicht und Adipositas..... 3
1.2 Funktionelle Teratologie und das Modell der kleinen Würfe..... 5
1.3 Steuerung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht im Hypothalamus durch Neuropeptid Y und dessen Fehlregulierung..... 6
1.4 Epigenetik und DNA-Methylierung..... 8
1.5 Detektion von DNA-Methylierung..... 11
1.6 Der NPY-Promotor..... 11
1.7 Fragestellung..... 12

2 Material und Methoden..... 14

2.1 Tiermaterial und Tierhaltung..... 14
2.2 Experimentalansatz..... 14
2.3 Bestimmung von Körpermasse und Körperlänge..... 14
2.4 Tötung, Blutentnahme und Bestimmung der Blutglukosekonzentration.....15
2.5 Bestimmung des Körperfetts..... 15
2.6 Bestimmung von Insulin und Leptin im Plasma..... 16
2.7 Gewinnung von DNA und RNA aus dem Hypothalamus.....17
2.8 Methylierungsanalyse..... 18
2.9 Bestimmung der mRNA-Expression durch RT-PCR..... 29
2.10 Statistik..... 31

3 Ergebnisse..... 32

3.1 Körpermasse, Körpergröße, Körperfett und Stoffwechselparameter..... 32
3.2 Methylierungsstatus des NPY-Promotors..... 35
3.3 Expression der NPY-mRNA..... 42
3.4 Korrelationen zwischen Methylierungsstatus und Expression von NPY.....42

4 Diskussion 43

4.1 Der Phänotyp neonatal in kleinen Würfen überernährter Ratten..... 43
4.2 Methylierungsstatus des NPY-Promotors und Expression der NPY-mRNA im Hypothalamus neonatal in kleinen Würfen überernährter Ratten..... 43
4.3 Die Methode der Bisulfitbehandlung mit anschließender Klonierung und Sequenzierung..... 45
4.4 Kritische Aspekte zum untersuchten Gewebe..... 46
4.5 Hypomethylierung des NPY-Promotors..... 49
4.6 Konzepte zur Leptin- und Insulinresistenz im Hypothalamus unter dem Aspekt der perinatalen Programmierung..... 53
4.7 Zur möglichen Rolle der Blutglukose bei der DNA-Methylierung..... 57

5 Zusammenfassung..... 64

Literaturverzeichnis.....66

Danksagung.....81

Eigene Veröffentlichungen 82

Abkürzungsverzeichnis..... 83

1 Einleitung

1.1 Übergewicht und Adipositas

Übergewicht und Adipositas stellen eine dramatisch schnell wachsende Herausforderung für die betroffenen Individuen, die Gesellschaft sowie das Gesundheitswesen dar. Übergewicht im Erwachsenenalter beginnt per WHO-Definition ab einem Body Mass Index (BMI = Körpergewicht in kg im Verhältnis zum Quadrat der Körpergröße in m) von 25 kg/m^2, von Adipositas spricht man ab einem BMI von 30 kg/m^2 [World Health Organisation 2000].

Die Brisanz des krankhaft erhöhten Körpergewichts liegt in der Bedeutung für Morbidität und Mortalität: Adipositas geht mit einem stark erhöhten Risiko für Typ-2-Diabetes, Hypertonie und Dyslipidämie einher; das gemeinsame Vorliegen dieser vier Störungen wird als Metabolisches Syndrom bezeichnet [Alberti et al. 2006]. Die „Nurses Health Study“ zeigte, daß 30-55jährige Frauen mit einem BMI von ≥ 35,0 kg/m^2 ein um den Faktor 93,2 erhöhtes relatives Risiko für Typ-2-Diabetes als gleichaltrige Frauen mit einem BMI von ≤ 22,0 kg/m^2 haben [Colditz et al. 1995]. Die Prävalenz der Hypertonie war bei Teilnehmern des „National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III“ bei einem BMI ≥ 40 kg/m^2 im Vergleich zu Normalgewichtigen 4,6-fach (Männer unter 55 Jahren) bzw. 5,5-fach (Frauen unter 55 Jahren) erhöht [Must et al. 1999]. Adipositas hat ebenso einen unmittelbaren Effekt auf die Lebenserwartung: Adipöse, herzgesunde und nichtrauchende Teilnehmer der „Framingham Heart Study“ hatten im Alter von 40 Jahren eine um 6-7 Jahre kürzere Lebenserwartung als die normalgewichtige Vergleichsgruppe [Peeters et al. 2003].

Wegen des stark gehäuften Auftretens erhöhter BMI-Werte wird zunehmend von einer Epidemie von Übergewicht und Adipositas gesprochen. In den USA ist diese Entwicklung besonders dramatisch. Zwischen 1999/2000 und 2003/2004 nahm dort bei erwachsenen Männern die Adipositasprävalenz von 27,5% auf 31,1% zu. 2003/2004 hatten 66,3% der erwachsenen Gesamtbevölkerung einen BMI >25 kg/m^2 [Odgen et al. 2006]. In Deutschland war im Zeitraum von 1985 bis 2002 eine Zunahme der Adipositasprävalenz von 16,2% auf 22,5% bei Männern und von 16,2% auf 23,5% bei

Frauen zu verzeichnen [Helmert u. Strube 2004].

Im Rahmen des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheitssurveys 2003-2006 wurden auch für unter 18jährige repräsentative Daten zur Verbreitung des Problems erhoben, die ähnlich alarmierend sind. Demnach sind 15% aller 3-17jährigen übergewichtig und 6,3% von Adipositas betroffen [Kurth u. Schaffrath Rosario 2007].

Diese Zahlen sind insofern von großer Bedeutung, als in dieser Altersgruppe erhöhte BMI-Werte mit Adipositas im adulten Alter positiv korreliert sind, wie in der „Bogalusa Heart Study“ an über 2600 Kindern gezeigt werden konnte [Freedman et al. 2005]. Das Folgeproblem wird in der „Fels Longitudinal Study“ deutlich, in der abnorm erhöhte BMI-Werte bei Kindern und Jugendlichen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten des Metabolischen Syndroms im Erwachsenenalter einhergehen [Sun et al. 2008]. Übergewichtige und adipöse Kinder und Jugendliche tragen somit das große Risiko der Persistenz ihrer Krankheit sowie der subsequenten Komorbiditäten. Hieraus wird deutlich, daß in der Erkennung und Behandlung und erst recht in der Prävention von Übergewicht und Adipositas im Kinder- und Jugendalter ein zentraler Ansatzpunkt bei der Bekämpfung der „Epidemie“ liegt.

Eine zielgerichtete Primärprävention ist daher von größter Bedeutung und kann nur in genauer Kenntnis der Ätiologie erfolgen. Bezüglich dieser werden überwiegend Lebensstilfaktoren wie körperliche Inaktivität und ungünstige Ernährungsweise diskutiert [Prugger u. Keil 2007]. Keith et al. führen ins Feld, daß Lebensstilfaktoren allein keine ausreichende Erklärung für die rasante Zunahme der Adipositas darstellen können und betonen die Rolle des intrauterinen Stoffwechselmilieus sowie der Ernährung in der frühen Entwicklung [Keith et al. 2006].

In diesem Zusammenhang gibt es eine Reihe von Studien, die eine Assoziation zwischen der neonatalen Ernährung und der Disposition zu Übergewicht und Adipositas aufzeigen. Schon 1977 stellten Dörner und Mohnike an 500 Kindern heraus, daß die Gewichtszunahme in den ersten drei Lebensmonaten mit dem späteren Übergewichtsrisiko positiv korreliert [Dörner u. Mohnike 1977]. Stettler und Kollegen konnten diese Befunde später an ca. 20.000 Probanden bestätigen, indem sie eine positive Assoziation der Gewichtszunahme in den ersten 4 Lebensmonaten mit dem

Adipositasrisiko im Kindes- [Stettler et al. 2002] sowie Erwachsenenalter fanden [Stettler et al. 2005].

Diese epidemiologisch-klinischen Befunde belegen einen Zusammenhang zwischen der Ernährung in der Neonatalzeit und dem Risiko, subsequent Übergewicht und Adipositas zu entwickeln. Im Folgenden wird dazu ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes ätiologisches Konzept sowie ein Experimentalmodell zu dessen Validierung vorgestellt.

1.2 Funktionelle Teratologie und das Modell der kleinen Würfe

Funktionelle Teratologie

Ausgangspunkt der funktionellen Teratologie ist die Beobachtung, daß Umwelteinflüße während der Prä- und Neonatalperiode zu Beeinträchtigungen und anhaltenden Krankheitsdispositionen führen können.

Darauf fußt die Hypothese von Dörner, nach der während kritischer Entwicklungsphasen Hormone, Metaboliten und Neurotransmitter konzentrationsabhängig die Differenzierung und Reifung sowie die funktionelle „Programmierung“ ihrer eigenen, lebenslangen zentralnervösen Regler determinieren. In unphysiologischen Konzentrationen auftretend können sie als „funktionelle Teratogene“ zur Fehlorganisation und subsequenter Fehlfunktion neuroendokriner Regelsysteme führen, was die Disposition zu Krankheiten mit sich trägt [Dörner 1976].

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich insbesondere mit den Auswirkungen einer solchen „Fehlprogrammierung“ neuroendokriner Systeme durch ein alteriertes intrauterines oder neonatales Milieu auf die Langzeitregulation von Körpergewicht und Stoffwechsel [Plagemann 2004], [Plagemann 2005b]. So konnte z.B. gezeigt werden, daß Nachkommen von Ratten mit Gestationsdiabetes oder Ratten, bei denen postnatal eine Insulingabe erfolgte, Malformationen in hypothalamischen Kerngebieten aufweisen und im adulten Alter Übergewicht, Bluthochdruck sowie eine diabetogene Stoffwechsellage entwickeln [Harder et al. 1998], [Plagemann 2005a].

Das Modell der kleinen Würfe

Ein gut charakterisiertes Tiermodell an der Ratte für den Einfluß der neonatalen Ernährung auf das Adipositasrisiko ist das Modell der „kleinen Würfe/Nester“ (KW). Das Prinzip besteht dabei in der Induktion von neonataler Überernährung durch die Reduktion der primären Wurfgröße von 10-12 Tieren auf 3 Neugeborene pro Nest, was zu einer Erhöhung der aufgenommenen Milchmenge führt [Babicky et al. 1973]. Die in KW aufgezogenen Ratten sind schon im juvenilen Alter adipös [Faust et al. 1980]. Dieser Zustand persistiert bis in das adulte Alter [Basset u. Craig 1988] und ist mit Hyperinsulinämie, gestörter Glukosetoleranz, erhöhtem Blutdruck, erhöhten Blutfetten sowie Hyperphagie assoziiert [Plagemann 2005a]. Die besondere Rolle der Hyperphagie in diesem Tiermodell wird auch von Oscai und McGarr hervorgehoben, für die die neonatal aufgenommene -und bei kleinen Würfen gesteigerte- Nahrungsmenge eine Determinante der Nahrungsaufnahme im späteren Leben darstellt [Oscai u. McGarr 1978].

Somit ist die Induktion des Phänotyps der „kleinen Würfe/Nester“ ein Modell für eine neonatal erworbene, permanente „Fehlprogrammierung“ von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht.

1.3 Steuerung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht im Hypothalamus durch Neuropeptid Y und dessen Fehlregulierung

Nahrungsaufnahme und Körpergewicht werden mittels verschiedenster zentral vermittelter Signale gesteuert. So wird z.B. der Stimulus zum Beenden einer Mahlzeit durch aus dem Gastrointestinaltrakt abgegebene Peptidhormone wie z.B. Cholezystokinin beeinflußt [Schwartz u. Moran 1994], während das Hormon Leptin ein Indikator für den Zustand der Langzeit-Energiespeicher ist [Schwartz et al. 2000]. Periphere Metaboliten wie z.B. die Blutglukose haben einen direkten Einfluß auf „Glukose-sensitive Neuronen“ [Levin et al. 2006]. Die Summe dieser Informationen bildet den „Input“ für das zentralnervöse Regelsystem, das vor allem aus der Achse Hypothalamus-Hirnstamm besteht [Übersicht bei: Grill u. Kaplan 2002]. Der „Output“ findet in Form orexigener (die Nahrungsaufnahme steigernde) und anorexigener (die Nahrungsaufnahme vermindernde) Neuropeptide statt, die in verschiedene neurale

Zentren projizieren und maßgeblich im Nucleus tractus solitarius gemeinsam mit nervalen Afferenzen aus der Peripherie integriert werden [Morton et al. 2005].

Der Hypothalamus der Ratte teilt sich in mehrere neuronale Kerngebiete auf. Die für den hier beschriebenen Zusammenhang entscheidenden und am umfassendsten beschriebenen sind der Nucleus arcuatus hypothalami (ARC) sowie der Nucleus paraventricularis (PVN).

Das potenteste orexigene Neuropeptid des ZNS ist Neuropeptid Y (NPY), welches aus 36 Aminosäuren besteht. Das kodierende NPY-Gen ist 7,2 kb lang und umfasst 4 Exons [Larhammar et al. 1987]. NPY wird unter anderem im ARC synthetisiert und entfaltet seine orexigene Wirkung über axonale Projektionen an den NPY-Rezeptoren Y_1 [Larsen et al. 1993] und Y_5 [Gerald et al. 1996] im PVN [Bai et al. 1985]. Die chronische NPY-Injektion in den PVN der Ratte führt zu Hyperphagie und Adipositas [Stanley et al. 1986], die chronische intracerebroventrikuläre Gabe zu Hyperphagie und erhöhter Lipogenese [Zarjevski et al. 1993]. Erhöhte Insulin- und Leptinkonzentrationen führen physiologischerweise zu einer verminderten Expression von NPY mit konsekutiver Hypophagie und Gewichtsabnahme, während Nahrungsentzug und niedrige Insulin- und Leptinspiegel zu erhöhten NPY-Konzentrationen führen [Schwartz et al. 1992], [Ahima et al. 1999], [Lambert et al. 1994].

Das Gegengewicht zu den orexigenen bilden die anorexigenen Peptide, deren prominentester Vertreter das aus der Vorstufe Proopiomelanocortin (POMC) gebildete alpha-Melanozytenstimulierende Hormon (α-MSH) ist. Dies wird, ebenso wie NPY, im ARC synthetisiert und im PVN als Agonist des Melanocortin-4-Rezeptors (MC-4) ausgeschüttet [Schwartz et al. 2000].

Über die Rolle der Fehlregulation von NPY im Hypothalamus der Ratte bei der „Fehlprogrammierung“ von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht im Modell der „kleinen Würfe“ geben eine Reihe von Studien Aufschluß. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß bei neonatal überernährten Ratten die NPY-Expression im ARC trotz hoher Leptin- und Insulinspiegel nicht erniedrigt war. Die relative Dichte NPY-immunopositiver Neuronen dieser Tiere war sogar erhöht [Plagemann et al. 1999a]. Lopez und Kollegen fanden eine Erhöhung der NPY-mRNA-Expression im ARC neonatal überernährter

Ratten [Lopez et al. 2005]. In elektrophysiologischen Untersuchungen an ARC-Neuronen inhibiert die Gabe von Leptin oder Insulin bei normal ernährten Ratten die neuronale Feuerungsrate. Bei neonatal überernährten Tieren jedoch zeigte sich eine unveränderte neuronale Aktivität nach Gabe von Leptin [Davidowa u. Plagemann 2000] und Insulin [Davidowa u. Plagemann 2007].

Zusammenfassend läßt sich postulieren, daß im NPYergen System der Achse ARC-PVN durch die experimentell induzierte neonatale Überernährung eine „Fehlprogrammierung“ stattfindet, die vor allem durch eine unphysiologische Antwort auf Leptin und Insulin zu einer dauerhaften Veränderung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht führen könnte.

Was könnte als molekularbiologisches Korrelat dieser persistierenden Alterationen in Frage kommen? Ein in der Literatur häufig diskutierter potentieller Mechanismus ist die epigenetische Modulation der Genexpression [McMillen u. Robinson 2005]. Für den Zusammenhang zwischen neonataler Ernährung und Krankheit im adulten Alter wird dabei insbesondere die mögliche Rolle der DNA-Methylierung hervorgehoben [Waterland u. Garza 1999]. Entscheidende Argumente dafür sind die Tatsache, daß DNA-Methylierung umweltabhängig induzierbar ist, daß sie zu dauerhaften Veränderung der Genexpression führen kann, und daß damit eine einmalige Veränderung im Methylierungsstatus – wie in diesem Fall während der kritischen Neonatalperiode – zu permanenten funktionellen Alterationen führen kann [Plagemann 2005b].

1.4 Epigenetik und DNA-Methylierung

Der Begriff Epigenetik bezeichnet im weiteren Sinne die Interaktion von Genen und deren Umwelt [Waddington 1942] und beschreibt im engeren Sinne die durch Mitose oder Meiose vererbbare Modifikation der Genexpression ohne Veränderung an der DNA-Sequenz [Bird 2002]. Vermittelt wird Epigenetik durch Veränderung der Chromatinstruktur mittels Histon-Modifikation [Kadonaga 1998] und/oder die Methylierung von DNA [Razin 1998].

Bei der Methylierung von DNA wird eine Methylgruppe kovalent an Position 5 des

Cytosin-Rings gebunden, was dann als 5-Methylcytosin bezeichnet wird. Dieses Phänomen tritt vor allem in CpG-Dinukleotiden auf, die bei Wirbeltieren insgesamt zu 60-90% methyliert vorliegen und gehäuft in Clustern, sogenannten CpG-Inseln, vorkommen. CpG-Inseln liegen meist im Promotorbereich von Genen und sind im Vergleich zu CpGs der Gesamt-DNA weniger methyliert [Bird 1986].

Methylierung findet entweder *de novo* statt oder wird bei der Replikation weitergegeben. Beides wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt, die S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methyldonor verwenden [Bestor 2000].

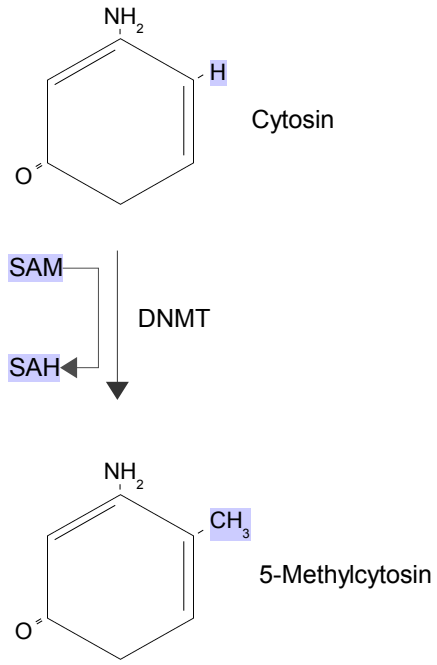

Abbildung 1: Prinzip der Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin durch Methyltransferasen (DNMT), bei der eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) unter Bildung von S-Adenosyl-Homocystein (SAH) an die C5-Position von Cytosin abgegeben wird.

Methylierte Cytosine nehmen Einfluß auf die Transkription des stromabwärts gelegenen Gens. Dies erklärt sich durch die verminderte Bindung von Transkriptionsfaktoren, die zum einen durch die Anwesenheit der Methylgruppe selbst und zum anderen durch die Anlagerung 5-Methylcytosin-bindender Proteine vermittelt wird [Bird 2002].

Dementsprechend führt Hypermethylierung in Assoziierung mit Histondeacetylierung und Veränderung der Chromatinstruktur zu verminderter Genexpression [Razin 1998], während Hypomethylierung eine verstärkte Promotoraktivität zur Folge hat [Bird 2002].

Ein Großteil der Erkenntnisse auf diesem Gebiet stammt aus der onkologischen Forschung. Dabei ist ein häufig beschriebenes Phänomen die Hypermethylierung im Bereich von Tumorsuppressorgenen und, damit verbunden, deren Minderexpression mit sukzessivem Tumorwachstum [Feinberg u. Tycko 2004].

Ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie die neonatale Ernährung die Expression eines Gens mittels DNA-Methylierung beeinflußt, ist eine Studie an als „ viable yellow agouti" (A^{vy}) bezeichneten Mäusen. Diese Tiere tragen ein CpG-haltiges Transposon im Agouti-Gen und haben eine gelbe Fellfarbe. Nachkommen von Müttern, deren Nahrung mit Methyldonoren (Folsäure, Vitamin B12, Cholin, Betain) angereichert wurde, wiesen anhand der Verdunklung der Fellfarbe erkennbare phänotypische Unterschiede auf, die mit dem Methylierungsstatus des A^{vy}-Allels korrelierten und bis ins adulte Alter persistierten [Waterland u. Jirtle 2003]. Ebenso konnten Weaver und Kollegen zeigen, daß das mütterliche Verhalten bei Ratten im hippocampalen Glucocorticoid-Rezeptor-Promotor der Nachkommen zur Veränderung der DNA-Methylierung, der Transkriptionsfaktorbindung von Nerve Growth Factor-Inducible Protein A (NGFI-A) und der Genexpression führt. Nachkommen, die von ihren Müttern vermehrt Pflege und körperliche Zuwendung erfuhren, zeigten Hypermethylierung im Bereich des Glucocorticoid-Rezeptor-Promotors und subsequent eine verminderte Streßantwort der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse [Weaver et al. 2004]. Die perikonzeptionelle Restriktion von Methyldonoren (Vitamin B12, Folsäure, Methionin) bei Schafen führte bei deren Nachkommen zu erhöhtem Körpergewicht, Insulinresistenz und der Hypomethylierung mehrerer Genloci [Sinclair et al. 2007]. Eine aktuelle Studie zeigt, wie die Ernährung von Bienenlarven über die DNA-Methylierung deren soziales Schicksal bestimmt: Wird einer Larve im Bienenstock das „Gelee Royale" gefüttert, führt dies zur Änderung des Methylierungsstatus und dazu, daß sich aus der Larve eine Königin anstatt einer Arbeiterin entwickelt. Die experimentelle Manipulation der Methylierung durch das Ausschalten einer Methyltransferase hat den gleichen Effekt wie die Fütterung von „Gelee Royale" [Kucharski et al. 2008].

Diese Beispiele machen deutlich, daß die DNA-Methylierung einen epigenetischen Mechanismus darstellt, über den Umweltfaktoren wie Ernährung oder Verhalten dauerhaft bestimmte Funktionseinheiten von Individuen programmieren können.

1.5 Detektion von DNA-Methylierung

Prinzipiell gibt es zwei Herangehensweisen zum Nachweis von 5-Methylcytosin in definierten Genombereichen. Dies ist zum einen der Einsatz methylierungssensitiver Restriktionsenzyme wie z.B. Hpa II [Singer et al. 1979]. Diese schneiden die DNA an bestimmten Sequenzen, nicht jedoch, wenn 5-Methylcytosin anstatt Cytosin vorliegt. Mittels anschließender PCR und Quantifizierung durch Elektrophorese kann somit eine Aussage über den Methylierungsgrad getroffen werden [Kafri et al. 1992]. Da sich nicht alle der im Genom vorhandenen Cytosine innerhalb der von Restriktionsenzymen erkennbaren Stellen befinden, ist deren Einsatz begrenzt.

Mittels Bisulfitmodifikation zum anderen wird jedes in der DNA-Sequenz vorhandene Cytosin chemisch in Uracil umgewandelt. Da 5-Methylcytosin indes nicht modifiziert wird, kann es gezielt nachgewiesen werden. Dazu wird eine subsequente Einzelstrang-PCR mit anschließender Sequenzierung durchgeführt [Frommer et al. 1992]. Diese Methode gestattet einen sensitiven und sequenzunabhängigen Nachweis von DNA-Methylierung.

1.6 Der NPY-Promotor

Der NPY-Promotor der Ratte liegt im langen Arm von Chromosom 4; für den humanen NPY-Promotor, der eine 85%ige Homologie zum Promotor der Ratte aufweist [Larhammar et al. 1987], ist der Beginn an der Nukleotidposition -1071 der 5'-Region von Exon 1 beschrieben [Minth u. Dixon 1990]. Im NPY-Promotor der Ratte befindet sich eine 645 bp umfassende CpG-Insel mit einem CG-Gehalt von 64,8% [Takai u. Jones 2003], [Gardiner-Garden u. Frommer 1994]. Minth beschrieb für das humane NPY einen „minimalen Promotor“ zwischen den Nukleotidpositionen -246 und -51, in dem sich die für die Expression notwendige Sequenz befindet [Minth u. Dixon 1990]. Diese beinhaltet die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Aktivator-Protein 1 (AP1), Aktivator-Protein 2 (AP2), Aktivator-Protein 2α (AP2α), Spezifisches Protein 1

(SP1), Nerve Growth Factor-Response Element (NGF-RE) und Nerve Growth Factor-Inducible Protein A (NGFI-A), die alle auch für den NPY-Promotor der Ratte beschrieben sind [Higuchi et al. 1992], [Li et al. 2000]. Ein Teil des NGF-RE stellt möglicherweise eine Bindungsstelle des cAMP-Responsive-Elements (CRE) dar [Higuchi et al. 1992].

Für die meisten dieser Transkriptionsfaktoren ist interessanterweise ein funktioneller Zusammenhang mit der Cytosin-Methylierung der jeweiligen Bindungsstelle beschrieben. So führt Methylierung im Bereich der AP-2-Bindungsstelle zu verminderter Bindung sowie verminderter Genexpression [Comb u. Goodman 1990]. Bei NGFI-A führt Demethylierung zu einer vermehrten Bindung von NGFI-A an seine Bindungsstelle [Weaver et al. 2004]. Cytosin-Methylierung kann im Bereich der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors SP1 selbst dessen Bindung nicht beeinflußen [Harrington et al. 1988], jedoch führt Hypermethylierung im Umfeld der Bindungsstelle zu verminderter Bindung mit konsekutiv reduzierter Genexpression [Zhu et al. 2003].

Die beschriebene CpG-Insel sowie die Regulierbarkeit der Transkriptionsfaktorbindungsstellen lassen vermuten, daß der NPY-Promotor potentiell durch DNA-Methylierung epigenetisch alteriert werden könnte.

1.7 Fragestellung

Das in unserer Arbeitsgruppe an der Ratte etablierte Tiermodell der kleinen Würfe/Nester ist ein Modell für die perinatale Programmierung von Übergewicht und Metabolischem Syndrom. Das wichtigste orexigene hypothalamische Peptid ist NPY. Bisherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, daß im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten die Konzentration von NPY, die Dichte NPY-exprimierender Neuronen sowie die neuronale Feuerungsrate im Sinne einer hypothalamischen Resistenz gegenüber Leptin und Insulin verändert sind.

Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß die durch DNA-Methylierung vermittelte epigenetische Regulation von Genpromotoren einen Weg darstellt, durch den Umweltfaktoren wie Ernährung die Expression von Genen dauerhaft verändern können. Der Promotor von NPY erfüllt theoretische Voraussetzungen, die ihn für eine

Regulation durch DNA-Methylierung disponieren könnten.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

1. Führt neonatale Überernährung zu einer veränderten Methylierung im NPY-Promotor?

2. Besteht ggf. ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad des NPY-Promotors und der Expression der NPY-mRNA?

3. Gibt es eine Beziehung zwischen peripheren Stoffwechselparametern und dem Methylierungsstatus im Promotor von NPY?

2 Material und Methoden

2.1 Tiermaterial und Tierhaltung

Es wurden Wistar-Ratten verwendet, die aus einer institutseigenen Nachzucht von Versuchstieren der Kolonie Charles River (CRL: WI, Sulzfeld, Deutschland) stammen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen in einem inversen Lichtrhythmus (12:12 h; Dunkelperiode von 6 bis 18 Uhr) und bei einer klimatisierten Raumtemperatur von 22-26°C gehalten. Freier Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletdiät (Kode 1000, Altromin, Lage, Deutschland; Energiegehalt: 3,5 kcal/g) war gewährleistet. Alle Tierversuche wurden durch die zuständige Landesbehörde genehmigt (G 0093/02; LAGESO Berlin).

2.2 Experimentalansatz

Im Alter von drei Monaten wurden 13 weibliche Wistar-Ratten mit gleichaltrigen Männchen angepaart. Die so gezeugten Nachkommen wurden an ihrem ersten Lebenstag randomisiert auf die Muttertiere verteilt. Zur Induktion neonataler Überernährung wurde am dritten Lebenstag bei acht Muttertieren die primäre Wurfgröße auf drei Neugeborene pro Mutter reduziert (Versuchsgruppe; kleine Würfe; KW). In der Kontrollgruppe wurden die Tiere in einer normalen Wurfgröße von 12 Neugeborenen pro Mutter (n = 5) aufgezogen (Kontrollgruppe; normale Würfe; NW). Am 21. Lebenstag wurden von all diesen nun abgestillten Nachkommen jeweils acht männliche Tiere aus kleinen und aus normalen Würfen randomisiert für die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen ausgewählt.

2.3 Bestimmung von Körpermasse und Körperlänge

Die Körpermassen der Tiere wurden am 1., 2., 7., 14. und 21. Lebenstag mit Hilfe einer elektronischen Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) registriert. Am 21. Lebenstag erfolgte die Bestimmung der Körperlänge (Nasoanalabstand, ohne Schwanz) bei vollständiger Relaxation durch Äthernarkose. Das relative Körpergewicht

wurde als Quotient aus Körpermasse und Körpergewicht berechnet.

2.4 Tötung, Blutentnahme und Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die schnelle und streßfreie Tötung der Tiere erfolgte am 21. Lebenstag mittels einer Guillotine. Die Gesamtgehirne wurden zügig entnommen, auf Trockeneis gebracht und anschließend bis zur Präparation bei -70 °C gelagert. Das bei der Dekapitation gewonnene Trunkalblut wurde zur Bestimmung der Blutglukose durch die Glukoseoxidase-Peroxidase-Methode [Barham u. Trinder 1972] unter Verwendung des Testbestecks LCN 400 und des Laborsystems LP 400 (beides Dr. Lange GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Der Meßbereich der Methode betrug 0-27,8 mmol/l, der Variationskoeffizient lag bei < 3,0%.

2.5 Bestimmung des Körperfetts

Aus den Kadavern der getöteten Tiere wurde initial der Magen-Darmtrakt entnommen um sicherzustellen, daß der Energiegehalt des Kotes oder Futterreste nicht in die Bestimmung der Körperzusammensetzung mit einflossen [Schmidt et al. 2000]. Anschließend wurde das Gewicht des Kadavers und damit die Feuchtmasse bestimmt. Die Masse des zuvor entnommenen Trunkalblutes wurde ebenfalls durch Wiegen bestimmt und zur Feuchtmasse addiert. Die Tierkörper wurden sodann in einem Trockenschrank bei 75 °C getrocknet. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz wurden die mumifizierten Tierkörper gewogen und anschließend in Filterpapier verpackt. Durch stumpfen Druck wurden die Tierkörper in der Papierhülle zerkleinert und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur (Merck, Eurolab, Frankfurt) einer 24-stündigen Chloroform-Extraktion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unterzogen. Die vollständig entfetteten Körperfragmente wurden von dem Filterpapier befreit und in Aluminiumschalen im Trockenschrank bei 75 °C getrocknet. Das Endgewicht stellt die fettfreie Trockenmasse dar. Aus der Differenz des Trockengewichts und der fettfreien Trockenmasse wurde anschließend der absolute Fettgehalt bestimmt. Aus dem absoluten Fettgehalt ergibt sich, bezogen auf die Feuchtmasse, der Körperfettanteil in %.

2.6 Bestimmung von Insulin und Leptin im Plasma

2.6.1 Insulin

Die Bestimmung der Plasmakonzentration von Insulin fand unter Verwendung eines Radioimmunoassays der Firma Adaltes (Freiburg, Deutschland) statt. Zu 50 µl des Standards (2,66 - 340,8 mIE/l) bzw. der unbekannten Probe wurden je 50 µl Antiinsulin-Antikörper und Tracer (^{125}I-markiertes Insulin) gegeben, gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl Diluent sowie 500 µl Präzipitationsreagens (20% Polyethylenglykol PEG 6000 in Phosphatpuffer) hinzugefügt, gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 25minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 3000 g wurde der Überstand abpipettiert und anschließend die Radioaktivität des Präzipitates für 2 min im Gammacounter (Gamma Master 1277; Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm RIA-CALC (Pharmacia). Als Standard diente Ratteninsulin (Novo Nordisk Biolabs, Kopenhagen, Dänemark) mit einer biologischen Potenz von 21,3 mIE/mg. Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 4,5 - 7,4% im Konzentrationsbereich 9,1 - 94,2 mIE/l (n = 10). Die Kreuzreaktivität mit humanem Proinsulin betrug 14%, mit Schweine- und Rinderproinsulin 1,3% und jene mit C-Peptid < 0,0002%.

2.6.2 Leptin

Die Bestimmung der Leptinkonzentration im Serum erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassays (Linco, St. Charles, USA). Zu 50 µl des Standards (0,5 - 50 ng/l) bzw. der unbekannten Probe wurden je 50 µl Antileptin-Antikörper (Meerschwein) gegeben, gemischt und über Nacht inkubiert. Nach Zugabe des Tracers (^{125}I-markiertes Leptin) wurde erneut gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Präzipitationsreagenz (Anti-Meerschwein-IgG der Ziege) hinzugefügt, gemischt und 20 min bei 4 °C inkubiert, bevor sie 25 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Nach Abpipettieren des Überstands wurde die Radioaktivität des Präzipitates für 2 min im Gammacounter (Gamma Master 1277; Pharmacia, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm RIA-CALC (Pharmacia). Als Standard fand rekombinantes

Rattenleptin (Linco) Verwendung. Im Konzentrationsbereich von 1,6 - 11,6 ng/ml (n = 5) betrug der Intraassayvariationskoeffizient 2,4 - 4,6%.

2.7 Gewinnung von DNA und RNA aus dem Hypothalamus

2.7.1 Präparation und Homogenisierung

Die Präparation der Hypothalami erfolgte bei -20 °C in einem Cryostat. Das Gehirn wurde auf der Konvexität so platziert, daß die basalen Strukturen oben lagen. Mit Hilfe eines Stereomikroskops erfolgte die anterotransversale Schnittführung durch das kaudale Chiasma opticum, die posterotransversale vor den Corpora mamillaria. Durch vertikale Schnitte durch den Sulcus perihypothalamicus und horizontale Schnitte unterhalb der Comissura anterior wurde der Hypothalamus en bloc reseziert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml RNAlater (Ambion, Wiesbaden, Deutschland) überführt. Aus diesem Reaktionsgefäß wurde der Hypothalamus entnommen und in einen Mörser gegeben. Es wurde dann 1 ml Trizol (GIBCO BRL - Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben und mit dem Pistel fein zerrieben. Dieses Homogenat wurde anschließend in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, der Mörser mit 0,5 ml Trizol gespült und dies ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach 10 min folgte die Zugabe von 0,3 ml Chloroform, worauf das Homogenat zweimal geschwenkt und 15 s lang gemischt wurde. Nach weiteren 5 min wurden die Proben bei 12000 g für eine Dauer von 15 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS; Heraeus, Langenselbold, Deutschland). Dadurch bildeten sich im Reaktionsgefäß mehrere Phasen. Die obere, farblose Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen und für die RNA-Präparation weiter verwendet (siehe Kapitel 2.9.1 „Extraktion der RNA“), die restliche farblose Phase mit einer 100 µl-Pipette vollständig entfernt und verworfen [Chomczynski 1993].

2.7.2 Extraktion der DNA

Zu der verbleibenden Phenol- und Interphase wurden nun 0,75 ml DNA-Extraktionspuffer (Guanidinthiocyanat 4M, Tris 1M, Tri-Natriumcitrat 50 mM) hinzugegeben und das Ganze 15 s lang gemischt. Dies wurde nach 10 min erneut bei 12000 g über 15 min zentrifugiert. Die obere, farblose und jetzt DNA-enthaltende Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß

überführt. Dazu wurden 0,6 ml Isopropanol gegeben, gemischt und eine Inkubation bei Raumtemperatur über 60 min vorgenommen. Nach 15 min Zentrifugation bei 12000 g bildete sich ein Pellet, von dem der flüssige Überstand vorsichtig mit der Pipette entfernt wurde. Daraufhin wurden zur weiteren Reinigung 1,5 ml 75%iges Ethanol dazugegeben, 5 min gewartet und 10 min lang bei 8000 g zentrifugiert. Nachdem das Ethanol vorsichtig mit der Pipette entnommen war, wurde das Pellet 10 bis 20 min bis zur vollständigen Trockenheit an der Luft getrocknet und anschließend mit 100 µl Natronlauge (8 mmol/l) versetzt, gemischt und kurz zentrifugiert. Um den für den späteren Verdau mit Rsa I notwendigen pH-Wert von 7,8 zu erreichen, wurden nach einer Inkubation von 10 min bei 55 °C im Thermoblock 11,7 µl HEPES (0,1 mol/l) hinzugegeben, leicht gemischt und kurz zentrifugiert.

2.7.3 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der DNA

Zur Bestimmung von Qualität und Quantität der gewonnenen DNA wurde am Spektralphotometer (GeneQuant pro; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) die optische Dichte (Extinktion) bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Die DNA-Konzentration und der Reinheitsgrad wurden mit folgender Formel berechnet:

DNA-Konzentration (µg/ml): $(OD_{260} \times 47{,}5 \times 100) \times 1000^{-1}$

Reinheitsgrad: $(OD_{260} \times 50) \times (OD_{280} \times 40)^{-1}$

Der den Reinheitsgrad beschreibende Quotient sollte stets größer als 1,6 sein, da sonst eine Kontamination durch Proteine anzunehmen war [Harder et al. 2004]. Bei einem kleineren Wert wurde die Aufreinigung wiederholt.

2.8 Methylierungsanalyse

Die in diesem Kapitel beschriebenen Schritte bildeten den Fokus der Gesamtuntersuchung und basieren auf dem von Frommer eingeführten [Frommer et al. 1992] und später modifizierten [Olek et al. 1996] Prinzip von Bisulfitmodifikation und subsequenter PCR. Um die Vielzahl der Einzelschritte zu illustrieren und überschaubar zu machen, sei hier vorab ein Schema präsentiert (s. Abb. 2).

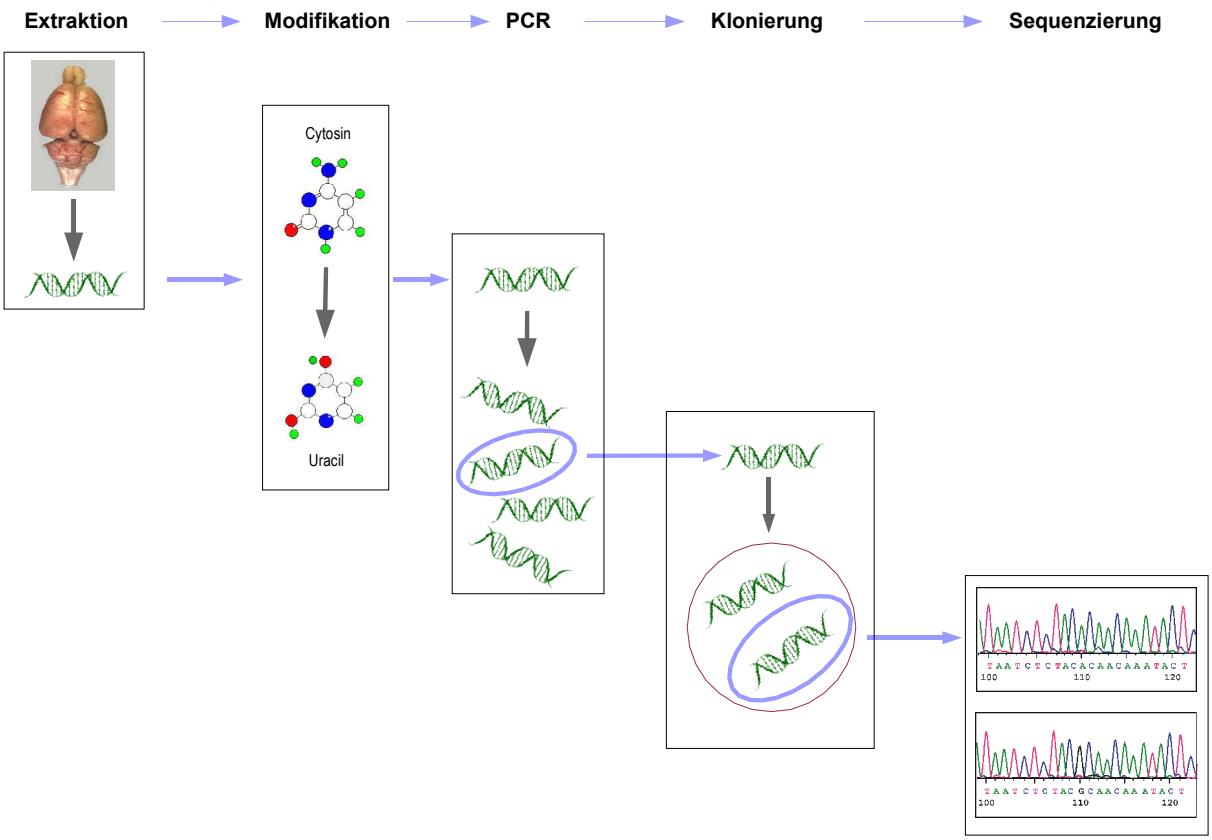

Abbildung 2: Schema der Einzelschritte der Methylierungsanalyse. Nach der Extraktion der DNA wird diese mittels Bisulfitbehandlung derart modifiziert, daß Cytosin zu Uracil umgewandelt wird. Methyliertes Cytosin ist von dieser Modifikation nicht betroffen und kann im letzten Schritt, der Sequenzierung, eindeutig identifiziert werden. Zuvor wird an der modifizierten DNA eine PCR und eine subsequente Klonierung durchgeführt.

2.8.1 Restriktionsverdau und Fällung der DNA

Das Restriktionsenzym Rsa I spaltet hydrolytisch die Phosphodiesterbindung der Sequenz 5'...GT▼AC...3' (reverse: 3'...CA▼TG...5') und ermöglicht somit eine Zerlegung der DNA in Fragmente unterschiedlicher Größe, was eine Voraussetzung für die Durchführung der Bisulfitreaktion ist. Die Spaltung der chromosomalen DNA erfolgte während einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C im Thermoblock (TB1; Biometra, Göttingen, Deutschland). Ein Ansatz bestand aus folgender Zusammensetzung: 3 µg DNA, 3 µl Rsa I (10 U/µl, Promega, Mannheim, Deutschland), 3 µl 10fach-Puffer C (geliefert mit Rsa I) sowie das zu berechnende Volumen PCR-Wasser bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 30 µl pro Ansatz. Zur Kontrolle des Verdaus

wurden anschließend 1 µl Probenauftragspuffer (Promega) zu 3 µl des Restriktionsansatzes gegeben und die Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel parallel zu einem 1 kbp-Längenstandard und einer unverdauten Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Fällung der DNA aus dem Verdau wurde dieser mit 2,7 µl Natriumacetat (3 mol/l) sowie 59,4 µl 96%igem Ethanol versetzt, gemischt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Im Anschluß wurde die präzipitierte DNA über 30 min bei 4 °C und 12000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt, das verbleibende Pellet zur Waschung mit 70 %igem Ethanol versetzt und erneut für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes und Trocknen bei 37 °C für 20 min im Thermoblock konnte das Pellet in 16,7 µl PCR-Wasser resuspendiert und dem nächsten Schritt zugeführt werden.

2.8.2 Modifizierung der DNA durch die Bisulfitbehandlung

Zur Denaturierung wurde die gelöste DNA für 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt, danach sofort auf Eis abgekühlt, mit 8,3 ml 1N Natronlauge versetzt und 15 min lang bei 50 °C im Thermoblock erwärmt. Nach der Zugabe von 225 µl autoklavierter 2%iger Agarose (Typ VII-A, low melting point; Sigma, München, Deutschland) und vorsichtiger Mischung wurde die Temperatur weiter bei 50 °C gehalten. Aus diesem Mix wurden je 20 µl in 12 vorbereitete, tiefgekühlte, ölgefüllte (Mineralöl für die Molekularbiologie, Sigma) Reaktionsgefäße à 1,5 ml pipettiert, wobei sich Kugeln aus Agarose bildeten. Dies hatte eine Fixierung der DNA-Einzelstränge zum Ziel, was die Renaturierung während der folgenden Schritte verhindert [Olek et al. 1996]. In jedes Reaktionsgefäß wurden nun 400 µl Natriumbisulfitlösung (Natriumbisulfit 2,5 M, Hydrochinon 125 mM) gegeben und der Ansatz für 5 Stunden lichtgeschützt bei 50 °C im Thermoblock inkubiert. In dieser Phase wurde durch die Anwesenheit von Bisulfit jedes nicht methylierte Einzelstrang-Cytosin hydrolytisch zu Uracil desaminiert. Die 5'C-methylierten Einzelstrang-Cytosine waren vor dieser Modifikation geschützt und verblieben somit als Cytosin-Reste. Die Reaktion wurde durch Überführung der Agarosekugeln einer Probe in ein Falconröhrchen mit 1 ml TE-Puffer (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) pro Kugel beendet. Dort wurden die Kugeln für je 10 min unter sanftem Schütteln insgesamt dreimal gewaschen. Zur Desulphonierung wurden zweimal je 1 ml 0,2 M Natronlauge pro Agarosekugel zugegeben und je 15 min geschwenkt. Darauf folgte die Neutralisation durch Zugabe von 200 µl 1N HCL pro

Kugel und kurzem Schwenken. Dann wurde der Überstand abpipettiert und erneut zweimalig die beschriebene Waschung mittels TE-Puffer durchgeführt. Im Anschluß an diese wurden die Kugeln einmal mit 1 ml PCR-Wasser pro Kugel für 10 min gewaschen und dann dem nächsten Schritt zugeführt.

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zunächst wurde die Qualität der bisulfitmodifizierten DNA durch die Kontroll-PCR I und II gesichert. Erst danach fand die Amplifikation der NPY-Promotorregion statt.

Kontroll-PCR I

Um zu überprüfen, ob während der Bisulfitbehandlung tatsächlich eine Modifizierung der DNA stattfand, wurde eine PCR mit den Primern modActinf (5'-TGA TTA TAG TTT TTT TTT GTG TTT TG-3') und modActinr (5'-AAA ATA AAA AAT CAT TAC CTA ATA CC-3') für ein Fragment der Länge 178 bp außerhalb der NPY-Promotorregion durchgeführt. Diese Oligogonukleotide wurden so gewählt, daß sie nur an entsprechend der Bisulfitreaktion modifizierter DNA binden konnten (Herstellung: MWG-Biotech, Berlin, Deutschland). Zur Amplifikation wurde eine Taq-Polymerase (AmpliTaq; Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) benutzt. Jeder Reaktionsansatz bestand aus einer Agarosekugel, 13,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne $MgCl_2$ (Perkin Elmer), 2 µl $MgCl_2$ (Perkin Elmer), 1 µl dNTP-Mix à 10 mmol/l (Promega, Mannheim, Deutschland), jeweils 4 µl der o.g. Primer und 0,5 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler (Biometra) nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	52 °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 1: Temperatur- und Zeitschema Kontroll-PCR I

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 40 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit.

Kontroll-PCR II

Um sicherzustellen, daß sich nach der Bisulfitbehandlung keine unmodifizierte DNA mehr in der Probe befand, wurde eine PCR mit den Primern NPYf (5'-GGG GCT GTG TGG ACT GAC CCT CG-3') und NPYr (5'-GAT GTA GTG TCG CAG AGC GGA G-3') [Rizk et al. 1998] zur Amplifikation eines 146 bp langen, innerhalb des NPY-Genlokus gelegenen Fragmentes durchgeführt. Diese Oligonukleotide konnten nur an nicht-bisulfitmodifizierte DNA binden (Herstellung: TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland). Zur Amplifikation wurde die o.g. Taq-Polymerase sowie dieselben Reagenzien verwendet. Jeder Reaktionsansatz enthielt eine Agarosekugel, 19,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne MgCl2, 2 µl MgCl2, 1 µl dNTP-Mix, je 1 µl der o.g. Primer sowie 0,5 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	62 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2: Temperatur- und Zeitschema Kontroll-PCR II

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit. Zusätzlich wurde noch eine Positivkontrolle in Form von nicht-bisulfitbehandelten, genomische DNA enthaltenden Agarosekugeln mitgeführt um zu verifizieren, daß Primer und PCR-Bedingungen grundsätzlich eine Amplifikation erlaubten.

Amplifikation der NPY-Promotorregion

Um das zu untersuchende Fragment von einer Länge von 395 bp zu amplifizieren, wurden die Primer modNPYf (5'-TTT TTG TTT TAT TTT TTT TTT TGG TAG-3') und modNPYr (5'-TCC CAA TTA ATC CTA ACA CTC AC-3') ausgewählt. Diese Oligonukleotide banden spezifisch an bisulfitmodifizierte DNA und führten zur Amplifikation des leading strands. (Herstellung: MWG-Biotech, Berlin, Deutschland). Zur Amplifikation wurde die o.g. Taq-Polymerase sowie dieselben Reagenzien verwendet. Jeder Reaktionsansatz enthielt eine Agarosekugel mit DNA, 19,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne MgCl2, 2 µl MgCl2, 1 µl dNTP-Mix, je 1 µl der o.g. Primer sowie 0,5 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	54 °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 3: Temperatur- und Zeitschema Amplifikation NPY-Promotorregion

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 45 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit.

Kontrolle der PCR-Produkte

Zur präparativen Auftrennung und Beurteilung der Amplifikate wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese fand auf einem 2%igen, mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel statt. Es wurden je 30 µl eines PCR-Produkts mit 4 µl Probenauftragspuffer versetzt und parallel zu einem Längenstandard aufgetrennt, der eine eindeutige Zuordnung der Fragmente nach ihrer Größe gestattete. Im Anschluß

erfolgte die fotographische Dokumentation.

Isolierung und Aufreinigung der DNA

Die Amplifikate wurden auf dem Transilluminator in ihrer Elektrophorese-Bande lokalisiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Es erfolgte die Isolierung und Aufreinigung unter Benutzung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (QIAgen, Hilden, Deutschland) laut Angaben des Herstellers. Am Ende dieses Schrittes stand die gereinigte DNA in 30 µl PCR-Wasser zur Verfügung.

2.8.4 Ligation und Klonierung der PCR-Produkte

Für die Klonierung der PCR-Produkte wurde das „Topo TA Cloning Kit“ (Invitrogen) verwendet. Der enthaltene Vektor „pCR 2.1 TOPO“ trägt dabei sowohl das Gen für Ampicillin-Resistenz als auch das Gen für β-Galaktosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrates X-Gal, was zu einer sichtbaren Blaufärbung führt. Bei korrekter Ligation des PCR-Produkts in den Vektor ist der Promotor für das Gen β-Galaktosidase inaktiviert, das Gen für Ampicillin-Resistenz bleibt jedoch unberührt. Weiße Kolonien auf LB-Platten mit Ampicillin werden somit von Zellen gebildet, die einen Vektor enthalten und ampicillinresistent sind, in denen also das PCR-Produkt erfolgreich integriert worden ist. Blau gefärbte Kolonien zeigen eine inkorrekte Ligation oder fehlende Aufnahme des Plasmids in die Zellen an.

Synthese von A-Überhängen

Um die Ligationsfähigkeit des PCR-Produkts zu verbessern, fand zuerst die Synthese von A-Überhängen am 3'-Ende der DNA-Stränge statt. Dazu wurde ein Ansatz von 27 µl PCR-Produkt, 3,15 µl PCR-Wasser, 3,5 µl 10fach Puffer mit $MgCl_2$ (Perkin Elmer), 1 µl dATP (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 0,35 µl Taq-Polymerase bei einem Gesamtvolumen von 35 µl pipettiert und für 10 min bei 72 °C im Thermoblock inkubiert. Daran schloß sich sofort die Ligation an.

Ligation

Bei der Ligation wurden zwei DNA-Fragmente zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft, indem eine Topoisomerase die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterasebindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen katalysierte [Shuman 1994]. Dazu wurden 2 µl des PCR-Produkts, 2 µl steriles Wasser, 1 µl Salzlösung und 1 µl Vektor bei einem Gesamtvolumen von 6 µl angesetzt. Nach exakt 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Insertion gestoppt, indem der Ligationsansatz auf Eis abgekühlt wurde.

Transformation und Klonierung

Das Prinzip der Transformation chemisch kompetenter Zellen (E. coli) besteht in der durch Kalziumchlorid geförderten Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zelle. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes in eine E. coli enthaltende Ampulle des Kits pipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig gerührt. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz für 30 s auf 42 °C erwärmt und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Während dieses Hitzeschocks erfolgte die Aufnahme der Plasmide in die kompetenten E. coli-Zellen. Nach weiterer Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Ampullen für 1 Stunde bei 300 rpm horizontal geschüttelt. Zur Unterscheidung von rekombinanten und nicht-rekombinanten Klonen wurden Indikatorplatten hergestellt. Dazu wurden LG-Agar-Platten unter Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) gegossen, die mit 40 µl IPTG (100 mmol/l, Sigma) und 40 µl X-Gal (40 mg/ml, Sigma) beschichtet wurden. Die Transformanten wurden sodann auf den Selektionsplatten mittels eines Drigalskispatels vereinzelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Bestimmung transformierter Zellen über die Blau-Weiß-Färbung der Kolonien wurden 20 dieser mit je einer sterilen Pipettenspitze in je ein Falconröhrchen mit ampicillinhaltigem LB-Medium überführt. Diese Suspensionen wurden bei 200 rpm und 37 °C für 12-14 h bebrütet.

2.8.5 Extraktion und Kontrolle der Plasmide

Plasmidextraktion

Die Extraktion der Plasmide fand unter Verwendung des QIAprep Miniprep Kits (QIAgen) nach Vorschrift des Herstellers statt. Nach Sedimentation der Zellen wurden diese in einem ersten Schritt mit 250 µl Puffer P1 zur Destabilisierung der Bakterienzellwand resuspendiert. Zur vollständigen Lyse wurden 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und der Ansatz unter Drehen des Reaktionsgefäßes exakt 5 min inkubiert. Um eine Präzipitation der Proteine, RNA und chromosomalen DNA zu erreichen, wurden 350 µl des Neutralisationspuffers N3 hinzugegeben, die Komponenten gemischt und anschließend für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine QIAprep-Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die sich in der Säule befindende Plasmid-DNA mit 500 µl Puffer PB durch 1minütige Zentrifugation gewaschen. Dieser Reinigungsschritt wurde nach Verwerfen des Eluats mit 750 µl Puffer PE wiederholt und anschließend mit einer zweiten Zentrifugation vollständig entfernt. Dann konnte die DNA nach Zugabe von 50 µl PCR-Wasser auf die Säule bei Zentrifugation von 1 min eluiert werden [Birnboim u. Doly 1979].

Kontrolle durch Restriktionsspaltung

Durch Verdau der erhaltenen DNA mit Hilfe des Restriktionsenzyms BstX I wurde überprüft, ob das zu untersuchende Fragment tatsächlich als Insert im Plasmid enthalten war. Dazu wurde ein Ansatz aus 6 µl Plasmid-DNA, 2,4 µl PCR-Wasser, 1 µl Puffer D (Promega), 0,1 µl RSA (Promega) und 0,5 µl BstX I (10 U/µl, Promega) pipettiert und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dieser wurde anschließend auf einem 1,0%igem Agarosegel parallel zu einem 1 kbp-Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Ansätze, die das zu erwartende Fragmentmuster nicht aufwiesen, wurden verworfen; die positiven Plasmide konnten dem nächsten Schritt zugeführt werden.

2.8.6 Sequenzierungsanalyse

Bei der Durchführung der Bisulfitbehandlung und der anschließenden PCR wurden

unmethylierte Cytosinbasen der DNA in Thymidinbasen umgewandelt. Um diese Modifikation „sichtbar“ und auswertbar zu machen, wurde in einem letzten Schritt die DNA-Sequenzierung nach Sanger durchgeführt [Sanger et al. 1977].

Amplifikation des Plasmidinserts

Um eine für die Sequenzierungs-PCR ausreichende Konzentration der DNA zu erhalten, fand zunächst eine Amplifikation des Inserts mit den Custom-Primern pUC/M13 (MWG-Biotech, Berlin, Deutschland) der folgenden Sequenz statt:
- Forward-Primer: 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
- Reverse-Primer: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

Für die PCR mit einer Größe des Produkts von 616 bp wurde eine Taq-Polymerase benutzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,5 µl Plasmid-DNA, 39,2 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer mit $MgCl_2$, 1 µl dNTP-Mix, je 2 µl des Forward- und Reverse-Primers (5 µmol/l) sowie 0,3 µl der Taq-Polymerase. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler (PCR-Express; Thermo Hybaid, Ulm, Deutschland) nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	50 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 4: Temperatur- und Zeitschema Amplifikation des Inserts

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit. Das PCR-Produkt wurde anschließend unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (QIAgen) aufgereinigt. Dabei wurde das PCR-Produkt zusammen mit 250 µl Puffer PB auf eine QIAquick Säule gegeben und diese für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, dann 740 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und wieder für 1 min zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und die DNA nach Zugabe von 30 µl HPLC-Wasser unter 1minütiger

Zentrifugation eluiert. Im Anschluß wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

Sequenzierungs-PCR

In diesem Schritt fand die eigentliche Reaktion zur Sequenzanalyse statt, die auf dem Prinzip des Kettenabbruchs basierte. Dabei waren im PCR-Ansatz neben den regulären Didesoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Kettenabbruch-Didesoxynukleotide enthalten, die unterschiedlich lange Kettenabbruch-Fragmente entstehen ließen. Es kam das Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V. 2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) zur Verwendung, das dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Reaktionspuffer und Taq-Polymerase im vorgefertigten Verhältnis enthielt. Als Primer wurde pUC/M13-Forward (s.o.) eingesetzt. Ein Ansatz bestand aus 4 µl Big Dye, 1 µl Primer (5 µmol/l), 100-200 ng PCR-Produkt und dem Volumen an HPLC-Wasser, das zum Erreichen von 20 µl Gesamtvolumen erforderlich war. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	90 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	10 s
Annealing	50 °C	10 s
Elongation	60 °C	4 min

Tabelle 5: Temperatur- und Zeitschema Sequenzierungs-PCR

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit. Zur Aufreinigung wurde das PCR-Produkt zusammen mit 52 µl HPLC-Wasser und 128 µl 96%igem Ethanol in ein Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Dies wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 min bei 13000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands und Zugabe von 200 µl 70%igen Ethanols wurden die Proben erneut für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zum vollständigen Verdampfen des Ethanols für 1 min bei 90 °C getrocknet. Daraufhin konnte die DNA in 16 µl HPLC-Wasser aufgenommen

und zur weiteren Verwendung in Mikrotiterplatten überführt werden.

Analyse des PCR-Produkts

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde vollautomatisch unter Verwendung des Kapillar-Elektrophorese-Sequenzierers ABI Prism 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems) im Institut für Medizinische Genetik der Charité sequenziert. Die Daten wurden anschließend mit der Software SeqMan II (DNASTAR, Konstanz, Deutschland) ausgewertet.

2.9 Bestimmung der mRNA-Expression durch RT-PCR

2.9.1 Extraktion der RNA

Die -wie am Ende des Kapitels 2.7.1 „Präparation und Homogenisierung“ beschrieben- nach Zentrifugation gewonnene obere, farblose Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß zu 0,75 ml Isopropanol gegeben und gemischt. Nach 90minütiger Inkubation der Proben erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 g. Der Überstand wurde abgegoßen und eventuelle Resttropfen mit der Pipette entfernt, sodaß ein Pellet im Reaktionsgefäß zurückblieb. Nach Zugabe von 1,5 ml 75%igen Ethanols wurden die Proben 10 min bei 7500 g zentrifugiert. Das Ethanol wurde wieder vorsichtig abgegossen, abpipettiert und anschließend bei 35 °C für 10 min trocknen gelassen. Danach konnte das Pellet in 120 µl DEPC-Wasser aufgenommen und gemischt und im Anschluß die RNA-Konzentration der Proben photometrisch bestimmt werden [Chomczynski 1993].

2.9.2 Synthese der cDNA

Alle für die Herstellung der cDNA erforderlichen Komponenten - bis auf RNasin (Promega) und Single-Stranded DNA Binding Protein (2200 µg/ml, Promega) - waren Bestandteil des Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (GIBCO BRL). Zuerst wurden 3 µg RNA, 1,5 µl Random hexamers, 0,5 µl RNasin und DEPC-Wasser bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 14 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Dies wurde 10 min bei 70 °C inkubiert, anschließend 1 min auf Eis gelagert und kurz

zentrifugiert. Danach wurden in das Reaktionsgefäß 2 µl 10fach RT-Puffer, 2 µl $MgCl_2$, 1 µl dNTP-Mix sowie 2 µl DTT zugegeben, gemischt und 5 min bei 25 °C inkubiert. Als Letztes erfolgte die Zugabe von 0,5 µl Single-Stranded DNA Binding Protein und 1,5 µl der Superscript II Reversen Transkriptase. Dieser Ansatz wurde im Thermoblock wie folgt inkubiert: 10 min bei 25 °C, dann 50 min bei 42 °C, anschließend 15 min bei 70 ° C. Durch Hinzugeben von 1 µl Rnase H und Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde die verbliebene RNA entfernt.

2.9.3 PCR

Die semiquantitative PCR wurde mit den Primern NPYf (5'-GGG GCT GTG TGG ACT GAC CCT CG-3') und NPYr (5'-GAT GTA GTG TCG CAG AGC GGA G-3') [Rizk et al. 1998] durchgeführt, die ein Produkt der Länge 146 bp amplifizierten. Als Standard diente das Housekeeping-Gen Actin mit den Primern ActinF (5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3') und ActinR (5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3') mit einer Produktlänge von 764 bp. Ein Ansatz enthielt 15,3 µl PCR-Wasser, 1 µl cDNA, 2 µl 10fach Puffer (Tris-HCL 100 mM bei pH 8,3, KCl 500 mM, $MgCl_2$ 15 mM, 0,01% Gelatine), 0,4 µl dNTP-Mix à 10 mmol/l (Promega), je 0,2 µl der NPY-Primer (10 µmol/l), je 0,4 µl der Actin-Primer (10 µmol/l) und 0,1 µl Taq-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer). Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler nach folgendem (durch Variation von Temperatur und Zeitdauer optimierten) Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	***Temperatur***	***Zeit***
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	62 °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 6: Temperatur- und Zeitschema semiquantitative PCR

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 30 Zyklen wiederholt. Zum Ausschluß von Kontaminationen lief in jedem Ansatz eine statt DNA Wasser enthaltende Negativprobe mit.

2.9.4 Auswertung

Die Amplifikate wurden auf einem 2%igen, Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel parallel zu einem Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses wurde in einem Gelscanner (Typhoon 8600, Amersham Pharmacia Biotech) hinsichtlich der Signalstärken der einzelnen Banden analysiert und anschließend mit Hilfe der Software Image Quant (Amersham) ausgewertet.

2.10 Statistik

Für Gruppenvergleiche wurden der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Zum Mittelwertvergleich wurde bei Normalverteilung ein ungepaarter t-Test nach Student durchgeführt. Bei Nichtnormalverteilung fand der U-Test nach Mann und Whitney Verwendung. Zusammenhänge zwischen Variablen wurden durch Rangkorrelation nach Spearman analysiert. Für sämtliche Verfahren wurde als Höchstgrenze der Irrtumswahrscheinlichkeit für signifikante Unterschiede 5% ($p < 0,05$) gewählt.

Zur Ermittlung des Methylierungsgrades je Tier wurde zuerst für jeden einzelnen Klon der prozentuale Anteil der methylierten Cytosine im untersuchten Promotorbereich bestimmt. Aus diesem Prozentsatz wurde anschließend mit allen Klonen eines Tieres ($n = 11 - 16$) der Mittelwert errechnet [Siegmund u. Laird 2002].

Alle statistischen Tests wurden mit Hilfe des Programms SPSS für Windows (SPSS Software, München, Deutschland) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpermasse, Körpergröße, Körperfett und Stoffwechselparameter

3.1.1 Entwicklung der Körpermassen

Die Körpermasse der Tiere aus der neonatal überernährten Experimentalgruppe war am 7., 14. und 21. LT signifikant größer als jene der normal ernährten Tiere (s. Abb. 3).

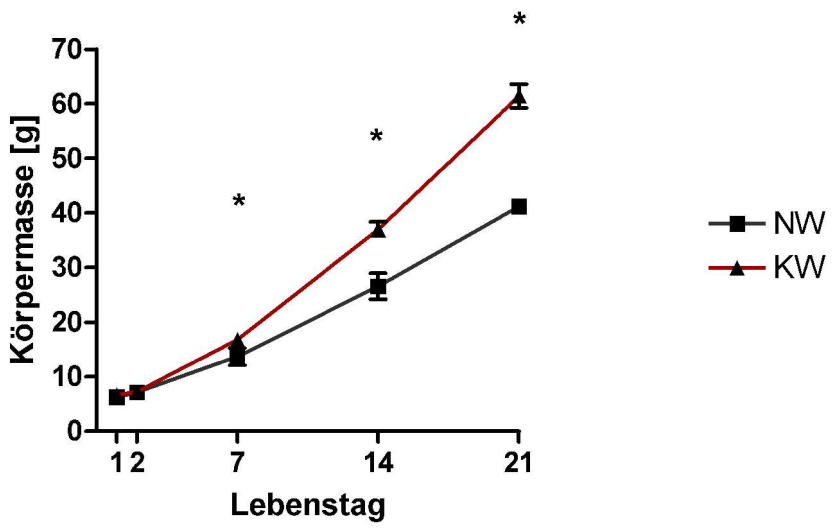

Abbildung 3: Körpermassenentwicklung von Tieren aus normalen Würfen (NW; graue Linie; n = 8) und kleinen Würfen (KW; rote Linie; n = 8). * $p < 0{,}001$ im t-Test; Werte als MW ± SD.

3.1.2 Körperlängen und relatives Körpergewicht am 21. Lebenstag

In den kleinen Würfen/Nestern waren am 21. LT sowohl die Körperlänge als auch das relative Körpergewicht (KG/KL) signifikant größer als in den normalen Würfen (s. Tab. 7).

	NW (n = 8)	***KW (n = 8)***	***t-Test***
Körperlänge (cm)	9,6 ± 0,32	10,6 ± 0,23	p < 0,001
KG/KL (g/cm)	4,3 ± 0,08	5,8 ± 0,31	p < 0,001

Tabelle 7: Körperlängen und relatives Körpergewicht (KG/KL) von Tieren aus normalen Würfen (NW) und kleinen Würfen (KW) am 21. LT als MW ± SD.

3.1.3 Stoffwechselparameter und Körperfettanteil am 21. Lebenstag

Am 21. LT war der Plasmaspiegel von Leptin in der Gruppe der neonatal überernährten Tiere signifikant höher als in der Gruppe der normal ernährten Tiere (s. Abb. 4).

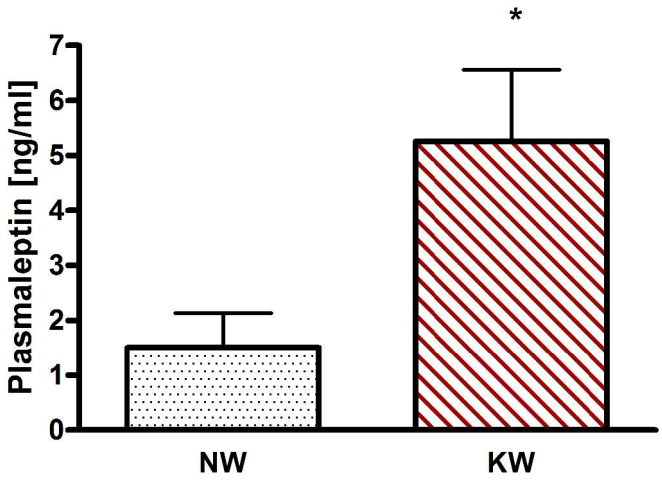

Abbildung 4: Plasmaleptinspiegel bei Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 8) und normale Würfen (NW; n = 8). * p < 0,001 im t-Test; Werte als MW ± SD.

Ebenso fand sich beim Plasmaspiegel von Insulin eine signifikante Erhöhung in der Experimental- im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 5).

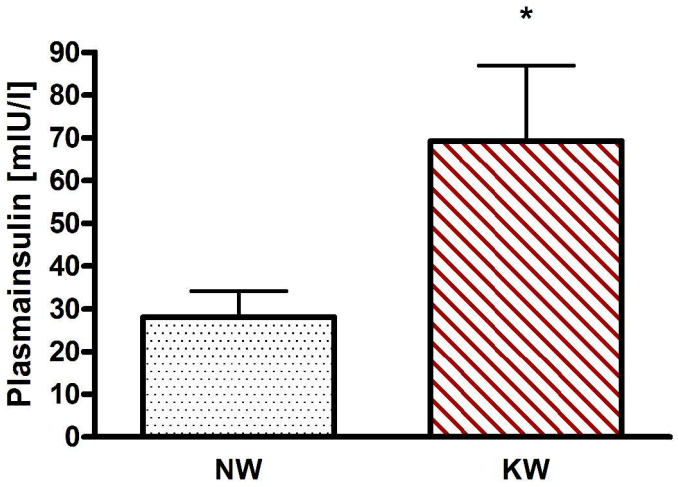

Abbildung 5: Plasmainsulinspiegel bei Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 8) und normalen Würfen (NW; n = 8). * p < 0,001 im t-Test; Werte als MW ± SD.

Neonatal überernährte Tiere wiesen ebenso eine signifikante Erhöhung der Blutglukose und des Körperfettanteils an der Gesamtkörpermasse auf. Ebenso fand sich eine signifikante Erhöhung des Insulin/Glukose-Quotienten als Ausdruck von Insulinresistenz (s. Tab. 8).

	NW (n = 8)	***KW (n = 8)***	***t-Test***
Blutglukose (mmol/l)	7,5 ± 0,77	8,3 ± 0,48	p < 0,05
Plasmainsulin/Blutglukose (IU/mol)	3,7 ± 0,26	8,3 ± 0,72	p < 0,001
Körperfettanteil (%)	7,2 ± 0,90	11,7 ± 1,60	p < 0,001

Tabelle 8: Blutglukose, Insulin/Glukose-Quotient und Körperfettanteil der Tiere aus normalen Würfen (NW) und kleinen Würfen (KW) am 21. LT als MW ± SD.

3.1.4 Korrelationen von relativem Körpergewicht und Stoffwechselparametern

Das relative Körpergewicht korrelierte am 21. LT signifikant positiv sowohl mit dem Plasmainsulin- ($r = 0,65$; $p = 0,006$; $n = 16$) als auch dem Plasmaleptinspiegel ($r = 0,80$; $p < 0,001$; $n = 16$) und mit der Blutglukose ($r = 0,51$; $p < 0,05$; $n = 16$).

3.2 Methylierungsstatus des NPY-Promotors

3.2.1 Charakterisierung des ausgewerteten Bereichs

Ausgewertet wurde eine Region, die den von Minth beschriebenen „minimalen Promotor“ [Minth u. Dixon 1990] einschließt und zwischen den Nukleotidpositionen -246 und -1 liegt. Diese Region liegt innerhalb einer 645 bp umfassenden CpG-Insel mit einem CG-Gehalt von 64,8% [Takai u. Jones 2003], [Gardiner-Garden u. Frommer 1994]. Der Bereich enthält 80 Cytosine, von denen 17 als CpG-Dinukleotide vorliegen.

Die für den untersuchten Promotorbereich der Ratte in der Literatur beschriebenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen für AP1, AP2, AP2alpha, SP1, NGF-RE und NGFI-A [Higuchi et al. 1992], [Li et al. 2000] wurden einzeln ausgewertet (s. Abb. 6).

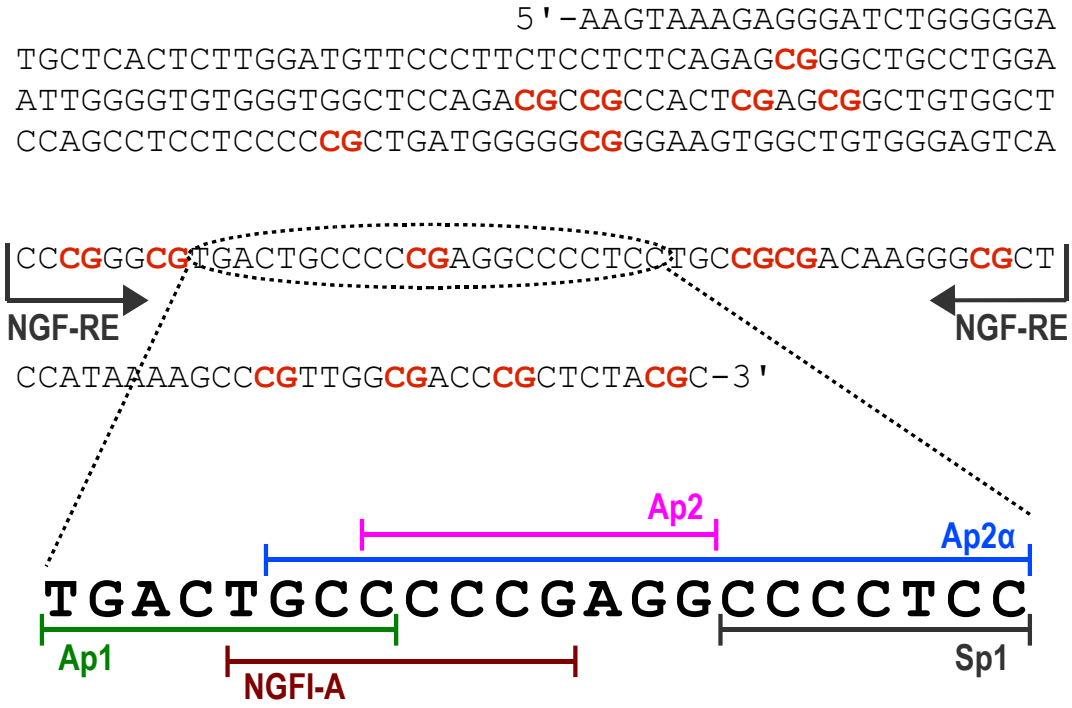

Abbildung 6: Sequenzausschnitt des NPY-Promotors der Ratte im Bereich -246 bis -1. Markierung der Transkriptionsfaktorebindungsstellen für Nerve Growth Factor-Response Element (NGF-RE), Activator Protein 1 (Ap1), Activator Protein 2 (Ap2), Activator Protein 2α (Ap2α), Nerve Growth Factor-Inducible Protein A (NGFI-A) und Spezifisches Protein 1 (Sp1). CpG-Dinukleotide sind rot hervorgehoben.

3.2.2 Methylierungsstatus im Gruppenvergleich

Jede Gruppe bestand aus 8 Tieren; pro Tier wurden 11-16 Klone untersucht und ausgewertet. In der untersuchten Promotorregion der Versuchsgruppe (KW) waren von 7560 möglichen Positionen (80 Cytosine bei insgesamt 108 Klonen) 23 Cytosine methyliert (s. Abb. 8), in der Kontrollgruppe (NW) von 7560 möglichen Positionen (80 Cytosine bei insgesamt 108 Klonen) 25 Cytosine (s. Abb. 7).

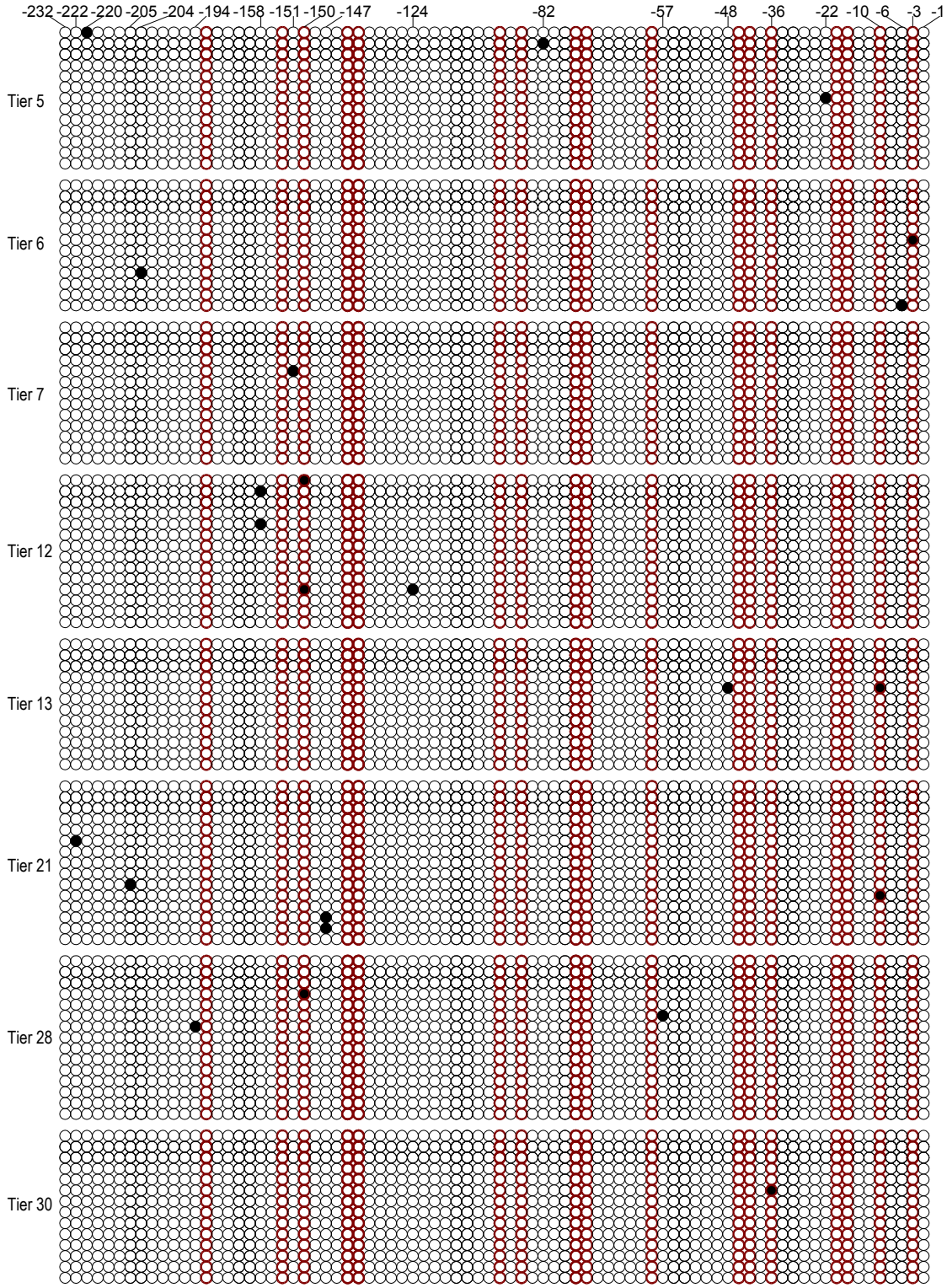

Abbildung 7: Methylierungsstatus des NPY-Promotors in der Kontrollgruppe (NW) im Sequenzbereich -246 bis -1. Leere Kreise entsprechen unmethyliertem Cytosin, schwarz gefüllte Kreise stellen 5-Methylcytosin dar. Eine Zeile repräsentiert einen Klon, ein Block enthält alle Klone eines einzelnen Tiers. Cytosine in CpGs sind als rote Kreise dargestellt.

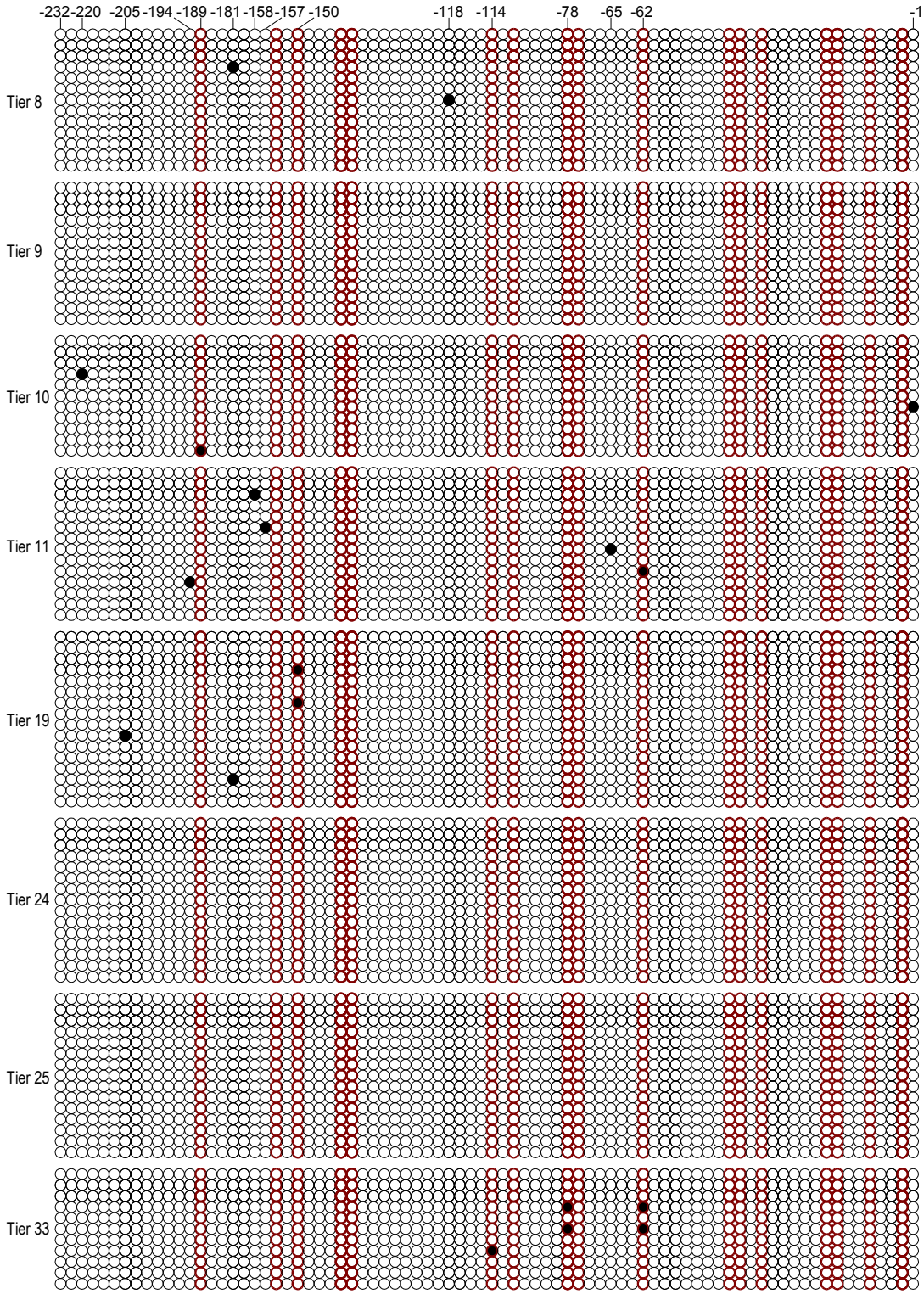

Abbildung 8: Methylierungsstatus des NPY-Promotors in der Gruppe der neonatal überernährten Tiere (KW) im Sequenzbereich -246 bis -1. Leere Kreise entsprechen unmethyliertem Cytosin, schwarz gefüllte Kreise stellen 5-Methylcytosin dar. Eine Zeile repräsentiert einen Klon, ein Block enthält alle Klone eines einzelnen Tiers. Cytosine in CpGs sind als rote Kreise dargestellt.

Bei Analyse allein der Cytosine in CpG-Positionen fanden sich in der Versuchsgruppe (KW) von 1836 möglichen Positionen (17 Cytosine in CpGs bei 108 Klonen) 9 methyliert, im Vergleich zu 7 von 1836 möglichen Positionen (17 Cytosine in CpGs bei 108 Klonen) in der Kontrollgruppe (NW).

Der prozentuale Anteil an methylierten Cytosinen der beiden Gruppen, berechnet aus den prozentualen Mittelwerten zuerst aller Klone pro Tier und anschließend aller Tiere pro Gruppe, zeigte keinen signifikanten Unterschied. Dabei spielte es keine Rolle, ob sämtliche Cytosine oder nur solche in CpG-Positionen ausgewertet wurden (s. Tab. 9).

	NW (n = 8)	***KW (n = 8)***	***t-Test***
methylierte Cytosine (alle)	0,26 ± 0,13	0,23 ± 0,22	p = 0,73
methylierte Cytosine in CpGs	0,38 ± 0,27	0,55 ± 0,91	p = 0,63

Tabelle 9: Gruppenvergleich des Methylierungsstatus zwischen Tieren aus kleinen Würfen (KW) und normalen Würfen (NW) im gesamten Promotor. Angabe in % als MW ± SD.

Die maximale absolute Häufigkeit der Methylierung einer einzelnen Cytosinposition betrug 3, sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe. In der Summe aller Klone einer Gruppe war demnach keine der 80 Cytosinpositionen mehr als dreimal methyliert.

3.2.3 Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Beim Vergleich des prozentualen Anteils der methylierten Cytosine innerhalb der einzelnen Transkriptionsfaktorbindungsstellen, zuerst durch Bildung des Mittelwertes aller Klone pro Tier, dann aller Tiere pro Gruppe, zeigte sich in keiner Position im Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied (s. Tab. 10).

Bindungsstelle	***NW (n = 8)***	***KW (n = 8)***	***t-Test***
AP1	0 ± 0	0,30 ± 0,84	p = 0,33
AP2	0 ± 0	1,02 ± 1,9	p = 0,15
AP2alpha	0,08 ± 0,22	0,37 ± 0,69	p = 0,27
SP1	0,14 ± 0,39	0 ± 0	p = 0,33
NGF-RE	0,13 ± 0,17	0,29 ± 0,6	p = 0,48
NGFI-A	0 ± 0	0,82 ± 1,53	p = 0,15

Tabelle 10: Gruppenvergleich des Methylierungsgrades der Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Angabe in % als MW ± SD.

3.2.4 Beziehung zwischen Stoffwechselparametern und Methylierungsgrad

Blutglukose

Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Blutglukose und dem Methylierungsgrad aller Cytosine bei der gemeinsamen Analyse beider Gruppen ($r = 0,58$; $p < 0,05$; $n = 16$; s. Abb. 9).

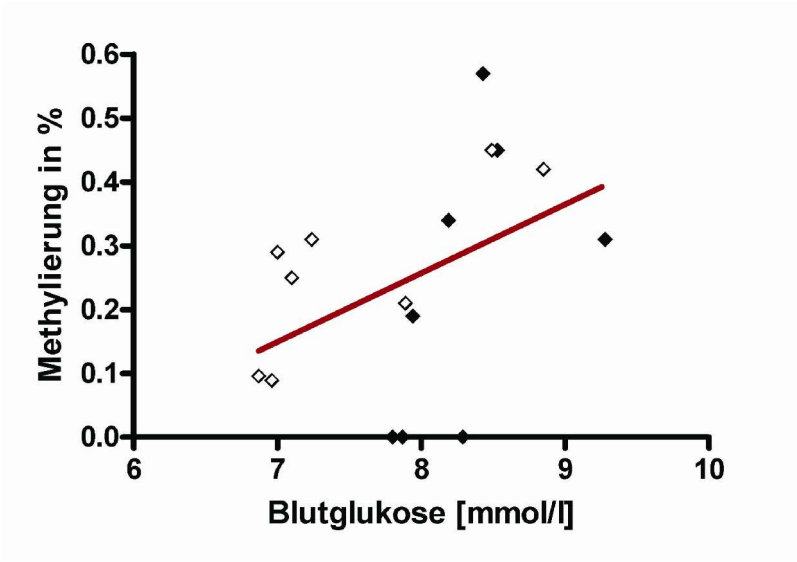

Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Blutglukose und Methylierungsgrad aller Cytosine für die Tiere aus normalen Würfen (NW; weiße Quadrate; n = 8) und kleinen Würfen (KW; schwarz gefüllte Quadrate; n = 8); r = 0,58; p < 0,05; n = 16 (Rangkorrelation nach Spearman).

Bei der Analyse der Cytosine in CpG-Positionen fand sich ebenfalls eine signifikante positive Korrelation zwischen der Blutglukose und dem Grad der Methylierung in beiden Gruppen (r = 0,49; p < 0,05; n = 16).

Andere Stoffwechselparameter

Für die Stoffwechselparameter Leptin und Insulin fanden sich in den Tieren beider Gruppen bei der Analyse sowohl aller Cytosinpositionen als auch der Cytosine in CpG-Positionen keine signifikanten Korrelationen zum Methylierungsgrad (s. Tab. 11).

Parameter	***Alle Cytosine***	***Cytosine in CpGs***
Leptin	r = -0,18 p = 0,50	r = -0,22 p = 0,41
Insulin	r = 0,42 p = 0,10	r = 0,41 p = 0,12

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Stoffwechselparametern und Methylierungsgrad für Tiere beider Gruppen (n = 16).

3.3 Expression der NPY-mRNA

Die in der RT-PCR bestimmte Expression der NPY-mRNA, bezogen auf die Expression des Housekeeping-Gens Actin, zeigte im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 10).

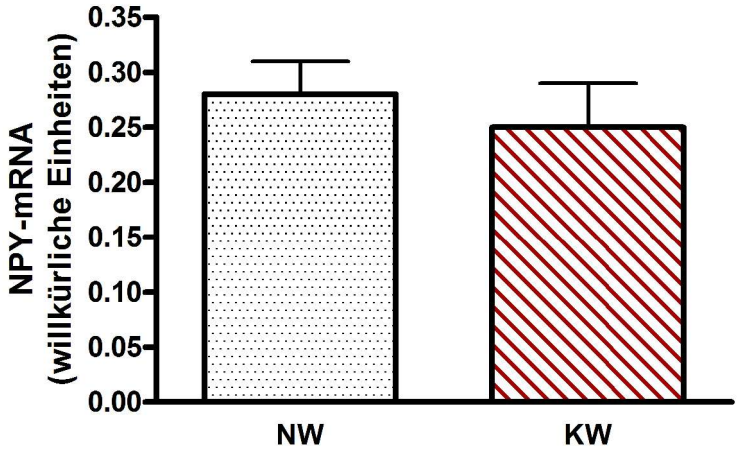

Abbildung 10: Expression der NPY-mRNA bei Tieren aus normalen Würfen (NW; n = 9) und kleinen Würfen (KW; n = 9). p = 0,07 im Mann-Whitney-U-Test; Werte als MW ± SD.

3.4 Korrelationen zwischen Methylierungsstatus und Expression von NPY

Zwischen dem Methylierungsgrad aller Cytosine des NPY-Promotors und der Expression der mRNA war bei Auswertung aller 16 Tiere kein signifikanter Zusammenhang zu erkennen, weder bei der Analyse aller Cytosine (r = -0,07; p = 0,81; n = 16) noch bei der Analyse der Cytosine in CpGs (r = -0,14; p = 0,61; n = 16).

4 Diskussion

4.1 Der Phänotyp neonatal in kleinen Würfen überernährter Ratten

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neonatal überernährten Ratten waren am 21. Lebenstag im Vergleich zur normal ernährten Kontrollgruppe deutlich hyperleptinämisch und hyperinsulinämisch und hatten ein erhöhtes absolutes sowie relatives Körpergewicht. Außerdem wiesen sie einen erhöhten Körperfettanteil und Blutglukosespiegel auf sowie eine Erhöhung des auf Insulinresistenz hindeutenden Insulin/Glukose-Quotienten. Die Reduzierung der Wurfgröße führt bei neonatal überernährten Tieren zu einer Erhöhung der aufgenommenen Milchmenge [Babicky et al. 1973] und subsequent zu juveniler Adipositas [Faust et al. 1980], die bis in das adulte Alter „persistiert“ [Basset u. Craig 1988]. Damit ließen sich frühere Experimente unserer und anderer Arbeitsgruppen reproduzieren, in denen im Experimentalmodell der kleinen Würfe/Nester pathophysiologische Veränderungen induziert wurden, die denen des Metabolischen Syndroms beim Menschen sehr nahe kommen [Plagemann et al. 1999a], [Plagemann et al. 1999c] [Plagemann et al. 1992], [Lopez et al. 2005].

Dies bestätigt die in der Einleitung vorgestellte Grundhypothese, daß Überernährung während eines kritischen Zeitfensters wie jenem der Neonatalperiode zu einer epigenetischen „Fehlprogrammierung“ des neuroendokrinen Systems für Nahrungsaufnahme und Körpergewicht führen kann, und daß den erhöhten Konzentrationen von Leptin und Insulin dabei wahrscheinlich eine entscheidende Rolle zukommt [Plagemann et al. 1999b], [Plagemann 2004].

4.2 Methylierungsstatus des NPY-Promotors und Expression der NPY-mRNA im Hypothalamus neonatal in kleinen Würfen überernährter Ratten

Die vorliegende Arbeit ist, nach dem aktuellen Stand der Literatur, die erste, die den Methylierungsstatus des NPY-Promotors im Allgemeinen und den Methylierungsgrad unter dem Einfluß neonataler Überernährung im Besonderen beschreibt. Wir fanden den NPY-Promotor – im Vergleich zum allgemeinen Methylierungsgrad von 3-6% bei

Vertebraten [Adams 1990] – grundsätzlich hypomethyliert und im Methylierungsstatus ohne Gruppenunterschied zwischen den neonatal überernährten und den normal ernährten Tieren. Desweiteren zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Methylierungsgrad und mRNA-Expression. Eine Rolle der DNA-Methylierung im NPY-Promotor als dauerhafter „Modulator“ der Expression von NPY und der damit verbundenen pathologisch veränderten Expressionsantwort auf Leptin und Insulin ließ sich demnach nicht finden.

Die mRNA-Expression von NPY zeigte keinen statistisch signifikanten Gruppenunterschied zwischen den überernährten und den normalgewichtigen Tieren. Diese fehlende Regulation des NPYergen Systems in der Versuchsgruppe ist bemerkenswert, denn erhöhte Leptin- und Insulinspiegel führen physiologischerweise zu einer verminderten Expression von NPY. Das konnten mehrere Studien belegen: So war nach 48stündiger Nahrungskarenz die NPY-mRNA-Expression im ARC von Ratten um 50% erhöht. Die subkutane Dauerinfusion von Leptin hob diesen Anstieg der Expression fast vollständig auf [Korner et al. 2001]. Auch die intracerebroventrikuläre Gabe von Leptin führte zu einer signifikante Reduktion der NPY-mRNA während der Nahrungskarenz [Schwartz et al. 1996a]. Die intracerebroventrikuläre Injektion von Insulin unterdrückte bei Ratten, die einer 72stündigen Nahrungskarenz ausgesetzt waren, den physiologischen Anstieg der NPY-mRNA-Expression im ARC vollständig [Schwartz et al. 1992].

Eine Fehlregulation des NPYergen Systems im Sinne einer fehlenden Expressionsunterdrückung durch Leptin und Insulin wird auch in anderen Arbeiten beschrieben. Nach 16tägiger intracerebroventrikulärer Infusion von Leptin war bei Ratten die hypothalamische Expression von NPY-mRNA nach anfänglicher Erniedrigung auf dem gleichen Niveau wie in der Kontrollgruppe, der statt Leptin ein Liquoräquivalent infundiert wurde [Sahu 2002]. Lopez und Mitarbeiter, die ebenso wie die vorliegende Arbeit das Rattenmodell der kleinen Würfe benutzten, fanden im ARC neonatal überernährter Ratten sogar eine Erhöhung der NPY-mRNA-Level [Lopez et al. 2005]. Eine Studie überprüfte den Effekt von Leptin auf Mäuse, bei denen durch eine fettreiche Diät Adipositas induziert wurde. Im ARC dieser Tiere blieb die Expression von NPY-mRNA bei peripherer Leptingabe unverändert, während sie bei normal ernährten Kontrolltieren um 50% abnahm [Enriori et al. 2007].

Die fehlende Regulation des NPYergen Systems im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten ist auch auf immunzytochemischer und elektrophysiologischer Ebene beschrieben worden. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, daß im ARC und PVN neonatal unterernährter Ratten, die hypoleptinämisch und hypoinsulinämisch waren, die Konzentration von NPY sowie die Zahl der NPY-exprimierenden Neuronen erhöht war; dies stellt die zu erwartende physiologische Reaktion dar, die im funktionell reifen NPYergen System von Tieren diesen Alters zu erwarten ist [Capuano et al. 1993]. Neonatal überernährte Tiere wiesen jedoch, verglichen mit der normal ernährten Kontrollgruppe, keine signifikante Veränderung der NPY-Konzentration und sogar einen erhöhten Anteil NPY-exprimierender Neuronen auf [Plagemann et al. 1999a]. Analog zu dieser „fehlerhaften“ Antwort auf Leptin und Insulin zeigten elektrophysiologische Untersuchen, daß im ARC neonatal überernährter Ratten die Unterdrückung der neuronalen Feuerungsrate, welche normalerweise durch Leptin und Insulin vermittelt wird, aufgehoben war [Davidowa u. Plagemann 2000], [Davidowa u. Plagemann 2007].

Zusammenfassend ist in der vorliegenden Arbeit eine Fehlregulation des dynamischen NPYergen Systems in Form der mRNA-Expression im Sinne einer Resistenz gegenüber Leptin und Insulin zu erkennen. Eine dauerhafte, epigenetische Modifikation des NPY-Promotors in Form der DNA-Methylierung scheint im Pathomechanismus dieser Resistenz jedoch keine Rolle zu spielen.

4.3 Die Methode der Bisulfitbehandlung mit anschließender Klonierung und Sequenzierung

Die Bisulfitkonversion und Sequenzanalyse der DNA aus den Rattenhypothalami wurde in Anlehnung an das Protokoll von Olek und Mitarbeitern [Olek et al. 1996] etabliert. Sie ist sehr sensitiv und gestattet eine direkte Aussage über den Methylierungsstatus einer definierten Zielregion, da methylierte Cytosine eines einzelnen DNA-Strangs exakt identifiziert werden können [Frommer et al. 1992]. Bisulfitsequenzierung ist ebenso die adäquate Methode, um sowohl CpG als auch non-CpG-Methylierung zu detektieren [Ramsahoye et al. 2000]. Ein Vergleich verschiedener Methoden zur Analyse bisulfitbehandelter DNA bestätigt, daß die Sequenzierung mit vorausgegangener Klonierung die höchst mögliche Auflösung aller untersuchten Cytosine bietet und damit

den Goldstandard darstellt [Clark et al. 2006].

Ein denkbarer systematischer Fehler der angewandten Methode besteht darin, daß die nichtmethylierten Cytosine möglicherweise nicht vollständig und/oder vollzählig zu Uracil umgewandelt wurden, wenngleich anhand der Literatur Konversionsraten von 99,5% - 99,7% zu erwarten sind [Grunau et al. 2001]. Dem wurde mit der konsequenten Durchführung der Kontroll-PCRs begegnet, die sich an das Prinzip der methylierungsspezifischen PCR [Herman et al. 1996] anlehnen: die Positivkontrolle (Kontroll-PCR I) verifizierte mittels methylierungsspezifischer Primer, daß an den Primerbindungsstellen die Konversion tatsächlich erfolgte; die Negativkontrolle (Kontroll-PCR II) mit Primern für nicht-modifizierte DNA zeigte, daß an den Primerbindungsstellen keine unmodifizierte DNA mehr detektierbar war.

Einen weiteren möglichen Fallstrick stellt „PCR-Bias“ dar. Dabei besteht der kritische Punkt in der Möglichkeit, daß initial methylierte bzw. unmethylierte Sequenzen während der PCR bevorzugt amplifiziert werden könnten, was anschließend zu einer verzerrten Messung des Methylierungsgrades führen kann [Warnecke et al. 1997]. Zur Vermeidung dieser Probleme schlagen Wojdacz und Kollegen 5 Kriterien zum Primerdesign vor [Wojdacz 2008]. Diese beinhalten unter anderem die optimale Position und Anzahl von CpGs im Primerbereich sowie die Schmelztemperatur und Sekundärstruktur der Primer. Diese Kriterien wurden bei der Durchführung dieser Arbeit erfüllt, womit das Risiko für PCR-Bias auf ein Minimum reduziert sein dürfte.

4.4 Kritische Aspekte zum untersuchten Gewebe

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese besagt, daß die neonatale Überernährung der Ratten zu einer Fehlregulation des hypothalamischen NPYergen Systems in der Form führt, daß anorexigene Stimuli wie Leptin und Insulin nicht mehr zu einer Down-Regulation des NPYergen Systems führen. Ein wichtiger Aktivitätsparameter des NPYergen Systems ist die Leptin- und Insulin-abhängige Expression der NPY-mRNA, und die DNA-Methylierung im Promotor stellt, wie eingangs postuliert, einen potentiellen Mechanismus zur dauerhaften Modulierung dieser Expression dar.

Da die hier eingesetzte Methodik zur Analyse von DNA und RNA eine Mindestmenge an Gewebe voraussetzte, wurden die Gesamthypothalami präpariert und untersucht. Im Hypothalamus finden sich naturgemäß neben Neuronen auch Gliazellen, und nicht alle Neuronen exprimieren NPY. Diese Tatsachen lassen in Bezug auf die Trennschärfe der Methode zwei kritische Einwände zu, die sich a) auf die Gesamtheit aller hypothalamischen Zellen und b) auf die unterschiedlichen hypothalamischen Kerngebiete beziehen.

Zu a): Im Nucleus suprachiasmaticus hypothalami 24 Tage alter Ratten betrug die Glia:Neuronen-Ratio 1:6 [Cambras et al. 2005]. Am 21. LT betrug der Prozentsatz NPY-exprimierender Neuronen an der Gesamtheit der Neuronen im ARC 39% bei normal ernährten und 45% bei neonatal überernährten Ratten [Plagemann et al. 1999a]. Der Hypothalamus ist wegen seiner unterschiedlichen Kerngebiete ein relativ heterogenes Gewebe; diese Daten geben daher nur einen ungefähren Anhalt für das bei der Auswertung NPYerger Neuronen möglicherweise zu erwartende „Hintergrundrauschen“ durch Gliazellen und Neuronen, die NPY nicht exprimieren.

Zu b): Im Hypothalamus der adulten, gesunden Ratte wird die NPY-mRNA fast ausschließlich von Neuronen des ARC und zu einem geringen Anteil von Neuronen im DMN exprimiert [Singer et al. 2000]. Neonatal überernährte Ratten hatten in einer Studie von Lopez und Mitarbeitern [Lopez et al. 2005] am 24. LT erhöhte NPY-mRNA-Level im ARC, jedoch nicht im DMN. Ernährungsinduzierte Adipositas im adulten Mausmodell führte zu einer erhöhten NPY-mRNA-Expression im DMN bei gleichzeitiger Reduktion im ARC [Guan et al. 1998].

Diese sich zum Teil widersprechenden Arbeiten machen deutlich, daß es in der mRNA-Expressionsantwort von NPY Unterschiede zwischen den untersuchten hypothalamischen Kerngebiete gibt. Das lässt die theoretische Annahme zu, daß bei der Expressionsmessung im Gesamthypothalamus die Regulation eines einzelnen Kerngebiets nicht sensitiv genug erfaßt wird und im Extremfall gegensinnige Regulationsantworten das Signal in der Summe nicht erfaßbar machen könnten. Demgegenüber stehen Studien, die eine eindeutig messbare mRNA-Veränderung im Gesamthypothalamus gezeigt haben: So ist die NPY-mRNA-Expression bei der adipösen, leptindefizienten ob/ob-Maus im Gesamthypothalamus im Vergleich zu

Kontrolltieren um den Faktor 3 erhöht [Wilding et al. 1993], bei der polygenetisch bedingten adipösen und hyperleptinämischen „New Zealand-mouse“ um den Faktor 2,3 [Rizk et al. 1998]. Eine 7tägige Leptininjektion führte bei gesunden adulten Mäusen zu einem Abfall der gesamthypothalamischen NPY-mRNA um 50% im Vergleich zu Kontrolltieren [Ahima u. Hileman 2000].

Im Hinblick auf die Trennschärfe der Methylierungsanalyse zeigt sich ein ähnliches Bild. Auf der einen Seite gibt eine einzelne Studie einen Hinweis darauf, daß bei der Ratte innerhalb des ZNS heterogene Methylierungsmuster auftreten können [Barresi et al. 1999]. Auf der anderen Seite wurde eine mögliche Heterogenität des Methylierungsmusters innerhalb eines Organs von keiner der maßgeblichen Studien auf dem Gebiet der epigenetischen Programmierung berücksichtigt [Waterland u. Jirtle 2003], [Weaver et al. 2004], [Sinclair et al. 2007], [Kucharski et al. 2008].

Um den genannten Problemen der etwaigen Heterogenität innerhalb des hypothalamischen Gewebes zu begegnen, wird in unserer Arbeitsgruppe aktuell die erstmals von Emmert-Buck beschriebene Methode der Lasermikrodissektion etabliert [Emmert-Buck et al. 1996]. Dabei werden aus angefärbten histologischen Schnitten unter mikroskopischer Sicht einzelne, definierte Zellen mit Hilfe eines Lasers isoliert. Patel und Kollegen führten an auf diese Weise gewonnenen Tumorzellen erfolgreich eine Methylierungsanalyse mittels Bisulfitsequenzierung durch [Patel et al. 2000]; die Gewinnung und das Weiterverarbeiten solch geringster DNA-Mengen stellt naturgemäß eine sehr hohe methodische Herausforderung dar, für Neuronen umso mehr als für kompakt gruppierte Tumorzellen.

Zusammenfassend ist die Präparation und Untersuchung des Gesamthypothalamus die zur Zeit am weitesten entwickelte Methode, die für die zu untersuchende Fragestellung die derzeit maximal erreichbare Präzision bietet. Die Untersuchung eines Gesamtorgans ist bei Arbeitsgruppen, die das Phänomen der fetalen Programmierung untersuchen, etablierte Praxis. Die funktionelle und konzeptionelle Plausibilität der Ergebnisse von Messungen der mRNA und Methylierung aus Gesamtorganen ist im Weiteren ein empirisches Argument dafür, daß die hier diskutierte Methode valide ist.

4.5 Hypomethylierung des NPY-Promotors

Der NPY-Promotor liegt innerhalb einer 645 bp umfassenden CpG-Insel mit einem CG-Gehalt von 64,8%. CpG-Inseln sind DNA-Regionen von mehr als 200 bp Länge, die einen CG-Gehalt von mehr als 50% und eine besonders hohe Rate von CpG-Dinukleotiden aufweisen. Sie finden sich gehäuft im 5'-Bereich von Housekeeping- und gewebespezifischen Genen und sind mit einer offenen Chromatinkonfiguration bei transkriptioneller Aktivität assoziiert [Larsen et al. 1992]. Eine Screeningstudie von fast 16000 humanen Promotoren kommt zu dem Schluß, daß autosomale promotorassoziierte CpG-Inseln mit *de novo* Methylierung und der subsequenten Unterdrückung der Genexpression assoziiert sind [Weber et al. 2007].

Die hier vorgelegte Arbeit zeigt, daß im NPY-Promotor des Hypothalamus normal ernährter Ratten 0,26% aller Cytosine respektive 0,23% bei neonatal überernährten Tieren methyliert sind. Für Cytosine in CpG-Positionen betrug die Methylierungsrate 0,38% bzw. 0,55%. Das ist ein sehr niedriger Prozentsatz, verglichen mit dem allgemeinen Methylierungsgrad bei Vertebraten von 3-6% [Adams 1990] und des ebenso in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Promotors des hypothalamischen POMC-Gens. Dort fand sich, unter Verwendung der gleichen Methodik, eine Rate an methylierten CpGs von 12,11% bei normal ernährten Tieren und 12,05% bei neonatal überernährten Tieren [Plagemann et al. 2009]. In diesem Zusammenhang kann der Promotor von NPY als grundsätzlich hypomethyliert bezeichnet werden. Gleichwohl ist ein Methylierungsgrad im Promillebereich – wie hier im NPY-Promotor ermittelt – durchaus plausibel. So wurde mit der gleichen Methodik im Promotor des hypothalamischen Östrogenrezeptors der Ratte ein Methylierungsgrad im Bereich zwischen 0,1% und 0,3% beschrieben; Variationen innerhalb dieses Bereichs gingen mit funktionell relevanten Bindungs- und Expressionsunterschieden einher [Champagne et al. 2006].

Es ist bekannt, daß methylierte Cytosine potentiell anfällig für Mutationen durch die spontane Desaminierung zu Thymidin sind. Cooper und Krawczak errechneten unter Einbezug experimenteller und klinischer Daten, daß die Mutationswahrscheinlichkeit eines methylierten Cytosins im Vergleich zu allen anderen Basen um den Faktor 33 bis 42 erhöht ist [Cooper u. Krawczak 1989]. Hieraus wird deutlich, daß Genombereiche

mit methylierten Cytosinen eine erheblich erhöhte Disposition für Mutationen – möglicherweise verbunden mit dem subsequenten Verlust der Expression – haben.

Der NPY-Promotor mit seiner CpG-Insel erfüllt prinzipiell die Voraussetzungen für DNA-Methylierung, liegt aber hypomethyliert vor. Kann dies als Schutzmechanismus vor Mutationen interpretiert werden? Und was wären dann aus Sicht von Biologie und Evolution die Gründe dafür, daß der Promotor von NPY nicht durch Methylierung moduliert wird?

NPY ist das stärkste orexigene Neuropeptid des Hypothalamus. Es ist Namensgeber und Protagonist der NPY-Peptid-Familie, zu der weiterhin als Hauptvertreter mit separaten Genloci die intestinalen Hormone Peptid YY und Pankreatisches Polypeptid gehören. Die enge Verwandtschaft macht Genduplikationen im Verlauf der Evolution sehr wahrscheinlich; dies wird dadurch bekräftigt, daß wirbellose Tiere nur ein einziges Gen aus der NPY-Familie besitzen [Conlon u. Larhammar 2005]. Mit einer Länge von 36 Aminosäuren ist NPY ein relativ großes Protein, und „kein anderes neuroendokrines Peptid vergleichbarer Größe ist ähnlich stark evolutionär konserviert“ [Larhammar 1996]. Die NPY-Aminosäuresequenzen von Säugetieren und Knorpelfischen sind zu 93% identisch. Zum Vergleich haben Corticotropin und Insulin über eine ähnlich lange evolutionäre Strecke (ca. 400 Millionen Jahre) nur einen Konservierungsgrad von 72% bzw. 71% [Blomqvist et al. 1992]. Der früheste Vertreter der Wirbeltiere, für den das Vorkommen von NPY im Gehirn beschrieben ist, ist *Lampetra fluviatilis* aus der Klasse der Rundmäuler, der sich vor ca. 450 Millionen Jahren vom Entwicklungsstamm der Vertebraten abzweigte. Von dessen Aminosäuresequenz unterscheiden sich jene von Ratte und Mensch (die zu 100% identisch sind) an nur 6 Positionen [Larhammar 1996]. Tensen und Kollegen fanden im Gehirn der Schnecke *Lymnaea stagnalis* ein NPY-Homolog [Tensen et al. 1998]. Der phylogenetische Divergenzzeitpunkt von *Lochotrochozoa*, von denen sich die Schnecken ableiten, und *Deuterostomia*, dem Überstamm der Wirbeltiere, liegt geschätzt 630-1200 Millionen Jahre zurück [Peterson et al. 2000].

Diese Erkenntnisse lassen nunmehr zwei Schlüsse zu: NPY ist ein „prominentes“ Peptid, das gut gegen Modifikation geschützt ist, und es ist ein phylogenetisch sehr alter neuronaler Botenstoff, der in einem komplexen und im Laufe der Evolution

gewachsenen Regelkreis eine elementare Rolle spielt. Somit ist es vorstellbar, daß eine epigenetische Modifizierbarkeit durch DNA-Methylierung ein zu großes Risiko für diesen Genpromotor und den Organismus darstellt. Das steht in Analogie zu den für das Überleben der Zelle essentiellen „Housekeeping Genes“. Diese haben häufig, ebenso wie NPY, unmethylierte CpG-Inseln im Promotorbereich [Bird et al. 1987]. Zur Sicherstellung der dauerhaften Expression dieser Gene sind deren CpG-Inseln nicht zur Methylierung disponiert, was für den Organismus von vitaler Bedeutung ist [Razin 1998].

Es liegt nahe zu vermuten, daß Organismen, die das dermaßen wichtige Peptid NPY nicht produzieren können, ein fatales Schicksal erleiden müßten. Erickson und Kollegen stellten gleichwohl fest, daß das Knockout-Mausmodell für NPY eine normale Nahrungsaufnahme und ein normales Körpergewicht aufweist [Erickson et al. 1996a]. In einem Doppel-Knockout von Leptin-Gen (die sog. ob/ob-Maus) und NPY-Gen hingegen waren der adipöse Phänotyp sowie die Nahrungsaufnahme im Vergleich zu ob/ob-Mäuse vermindert [Erickson et al. 1996b]. In Knockout-Mausmodellen der orexigen wirkenden Neuropeptide Agouti-Related Protein (AgRP) [Qian et al. 2002], Galanin [Wynick et al. 1998] und Melanin-Concentrating Hormone (MCH) [Shimada et al. 1998] führte einzig die Deletion des MCH-Gens zu Hypophagie und reduziertem Körpergewicht. Diese Erkenntnisse wirken auf den ersten Blick überraschend, denn wenn – wie oben postuliert – NPY wegen seiner großen Bedeutung vor Epi-Mutationen geschützt werden soll, müßte eine Genauslöschung doch schwerwiegende Folgen haben. Auf den zweiten Blick scheint es jedoch verständlich, daß das überlebenswichtige System zur Steuerung der Nahrungsaufnahme durch redundante und parallele Mechanismen wirkt, die sich im Falle einer Deletion fast vollständig wechselseitig kompensieren können. Dies ist bei den Knockout-Modellen von NPY, AgRP und Galanin der Fall: die für den Individualerhalt notwendige Nahrungsaufnahme ist sichergestellt.

Eine entscheidende Rolle beim Zustandekommen eines solchen Kompensationsnetzwerkes scheint die neuronale Plastizität während kritischer neonataler Zeitfenster zu spielen, die für das NPYerge System gut belegt ist. So führte die Ablation NPY/AgRP-koexprimierender Neuronen im ARC von Mäusen im Neugeborenenalter zu einer geringfügigen Reduktion des Körpergewichts bei

unverändertem Eßverhalten, während sie im adulten Alter das vollständige Sistieren der Nahrungsaufnahme hervorrief [Luquet et al. 2005]. Dies impliziert eindrücklich, daß das sich entwickelnde hypothalamische orexigene Netzwerk auf perinatale Störungen plastisch reagieren und damit die Nahrungsaufnahme sichern kann und macht deutlich, wie sehr Einflüße während dieses Zeitfensters das System langfristig prägen können. Desweiteren wird deutlich, daß Knockout-Modelle in diesem Kontext nur bedingt einsetzbar sind.

Die Analyse eines biologischen Systems wie jenem zur Steuerung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht kann nicht ohne Berücksichtigung der funktionellen Antagonisten erfolgen. Der wichtigste und meistdiskutierte Gegenspieler des NPYergen Systems im Hypothalamus sind Neuronen, die POMC exprimieren, ein Vorläuferpeptid, aus dem u.a. das anorexigen wirkende α-MSH hervorgeht. Dessen Expression wird, im Gegensatz zu NPY, durch Leptin [Cowley et al. 2001] und Insulin [Brown et al. 2006] stimuliert. Bindung an die Rezeptoren für alpha-MSH (MC3R und MC4R) führt zu verminderter Nahrungsaufnahme und Gewichtsverlust [Cummings u. Schwartz 2000].

Im Jahre 1998 wurde von Krude und Kollegen zum ersten Mal ein Gendefekt im humanen POMC-Gen beschrieben, der mit frühkindlicher Adipositas einhergeht [Krude et al. 1998]. Ebenso zeigte sich, daß die Deletion des POMC-Gens der Maus zu Adipositas führt, die durch Gabe eines alpha-MSH-Agonisten vermindert werden kann [Yaswen et al. 1999]. Gleichermaßen ist bekannt, daß die spezifische, progrediente Ablation hypothalamischer POMC-Neuronen der Maus Adipositas hervorruft [Xu et al. 2005]. Offensichtlich ist also, im Vergleich zu NPY und den anderen oben beschrieben orexigenen Neuropeptiden, die neuronale Vermittlung von Sättigung durch das POMCerge System weniger redundant organisiert und dadurch empfindlicher gegenüber Störungen und Modifikationen. Dies ist, wiederum vor einem evolutionsbiologischen Hintergrund, durchaus plausibel, da das Sättigungssignal für den Individualerhalt weniger vital bedeutend ist als die Vermittlung der Nahrungsaufnahme.

Eine epigenetische Modifizierbarkeit des humanen POMC-Gens haben Newell-Price und Kollegen belegt. Sie zeigten, daß der POMC-Promotor in POMC-exprimierendem

Gewebe stets unmethyliert ist, während er in nicht-exprimierendem Gewebe methyliert ist. *In vitro* führte die Methylierung des Promotors zu dosisabhängiger Unterdrückung der Expression [Newell-Price et al. 2001]. Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Studie zeigen im Promotor hypothalamischer POMC-Neuronen neonatal überernährter Ratten eine Hypermethylierung im Nachbarbereich der SP1-Bindungsstelle sowie innerhalb der NF-κB-Bindungsstelle. Der Methylierungsgrad in Nachbarschaft der SP1-Bindungsstelle ist mit einer verminderten Expressionsantwort der POMC-mRNA auf Leptin und Insulin assoziiert; in der Summe ist der Methylierungsgrad des POMC-Promotors um das 10-fache höher als der des NPY-Promotors [Plagemann et al. 2009].

Die in der vorgelegten Arbeit beschriebene Hypomethylierung des NPY-Promotors sowohl bei neonatal überernährten als auch bei normal ernährten Ratten sowie die beobachteten Veränderungen bei Methylierung und Expressionsantwort im POMC-Promotor implizieren, daß POMC im funktionellen Duo NPY/POMC das eigentliche, epigenetisch (fehl-)programmierte Stellglied im Pathomechanismus der neonatalen Überernährung sein könnte.

Insgesamt lassen die vorgenannten Ausführungen die Annahme zu, daß die Hypomethylierung des NPY-Promotors, die in dieser Arbeit sowohl in der Experimental- als auch der Kontrollgruppe zu finden war, Ausdruck eines „Schutzes“ des überlebenswichtigen NPY-Gens vor einer Modulation durch Methylierung ist. Eine epigenetische Modifikation durch DNA-Methylierung findet bei neonatal überernährten Ratten im methylierungsempfindlicheren POMC-Promotor statt.

4.6 Konzepte zur Leptin- und Insulinresistenz im Hypothalamus unter dem Aspekt der perinatalen Programmierung

In der hier vorgelegten Arbeit fand sich bei neonatal überernährten Ratten, die übergewichtig, hyperleptinämisch und hyperinsulinämisch waren, keine Down-Regulation der mRNA des wichtigsten orexigenen Neuropeptids, NPY. Diese erworbene, funktionelle Resistenz gegenüber Leptin und Insulin ließ sich nicht durch einen Unterschied im Methylierungsstatus des NPY-Promotors erklären. Im Folgenden werden aktuelle pathophysiologische Konzepte dieser Resistenz diskutiert, die vor

allem auf der Ebene der Signaltransduktion angesiedelt sind.

Blut-Hirn-Schranke

Insulin wird an der Blut-Hirn-Schranke durch ein Transportsystem mit Sättigungskinetik aus dem peripheren Blut aufgenommen [Banks 2006]. Ebenso wurde ein unidirektionales Transportsystem für die Aufnahme von Leptin aus dem peripheren Blut in das Gehirngewebe beschrieben. Dies ist im Plexus Choroideus, dem ARC und der Eminentia Mediana lokalisiert [Banks et al. 1996]. Bei hospitalisierten humanen Probanden zeigte sich, daß der Liquor/Serum-Quotient von Leptin bei adipösen Individuen erniedrigt ist, was als Hinweis für einen Resistenzmechanismus im Sinne eines verminderten Transportes gewertet wird [Schwartz et al. 1996b]. In einem Mausmodell, in dem durch eine fettreiche Diät Adipositas induziert wird, waren die Tiere nach 56 Tagen resistent gegenüber peripherer Leptingabe. Nach intrazerebroventrikulärer Leptininjektion kam es jedoch zu einer signifikanten Abnahme von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht [Van Heek et al. 1997]. Sowohl genetisch bedingt adipöse fa/fa Zucker Ratten als auch primär normalgewichtige FA/FA Ratten, bei denen Adipositas durch fettreiche Nahrung induziert wurde, wiesen einen herabgesetzten Leptintransport an der Blut-Hirn-Schranke und einen im Vergleich zu normal ernährten Tieren nicht erhöhten Leptinspiegel im Liquor auf [Burguera et al. 2000]. Bei einem Rattenstamm, der durch Erhöhung des Fettgehaltes der Nahrung Adipositas entwickelt, war die Transportrate des Leptinrezeptors 23 Wochen alter Tiere nach peripherer Leptininjektion gegenüber nicht adipösen Tieren signifikant erniedrigt [Levin et al. 2004]. Diese Studien legen alle nahe, daß ein Pathomechanismus der Leptinresistenz infolge Hyperleptinämie im Bereich der Blut-Hirn-Schranke liegt. Es ist jedoch bekannt, daß im Bereich der Eminentia Mediana die Axone der hypothalamischen Neuronen direkt und somit ohne Beteiligung der Blut-Hirn-Schranke mit dem peripheren Blut kommunizieren [Peruzzo et al. 2000], [Ganong 2000]. Diese direkte Kommunikation konnte auch spezifisch für leptinsensitive hypothalamische Neuronen nachgewiesen werden [Faouzi et al. 2007], bei denen eine leptinabhängige Leptinresistenz demnach auch unabhängig der Blut-Hirn-Schranke induziert werden könnte.

Expression von ObR

Erhöhte Leptin- und Insulinspiegel führen physiologischerweise zu einer verminderten

Expression von NPY [Schwartz et al. 1996a], [Schwartz et al. 1992]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten neonatal überernährten Ratten wiesen jedoch – trotz deutlicher Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie – keine Veränderung der NPY-Expression auf, was im Einklang mit der in früheren Studien beschrieben funktionellen Resistenz des NPYergen Systems steht [Davidowa u. Plagemann 2000], [Davidowa u. Plagemann 2007]. Ein gängiges Konzept zur Erklärung der Resistenz gegenüber Hormonen ist die (Down-)Regulation von Rezeptoren. Die im Signalweg des Hypothalamus dominante Form des Leptinrezeptors, Ob-Rb, ist somit Gegenstand zahlreicher Studien. Im Hypothalamus der adipösen, hyperleptinämischen „New Zealand obese mouse“ z.B. war die Expression von Ob-Rb-mRNA im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Tieren nicht verändert [Rizk et al. 1998]. Im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten dagegen fand unsere Arbeitsgruppe sowie Lopez und Kollegen eine Verminderung der Ob-Rb-mRNA [Schellong et al. 2006], [Lopez et al. 2005]. Interessanterweise führte auch die neonatale experimentelle Leptingabe zu einer verminderten Ob-Rb-mRNA-Expression, die mit Leptinresistenz einherging und bis ins adulte Alter persistierte [Toste et al. 2006]. Ob-Rb wird unmittelbar nach der Geburt nicht exprimiert und verzeichnet innerhalb der ersten drei neonatalen Wochen einen deutlichen Expressionsanstieg [Morash et al. 2003], also genau im Zeitraum der im Modell der kleinen Würfe induzierten neonatalen Überernährung mit konsekutiver Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie. Demnach könnte eine dauerhaft veränderte Expression der Ob-Rb-mRNA eine Rolle beim Zustandekommen der Leptinresistenz im hier verwendeten Experimentalmodell spielen.

IRS1-PI3K

Die Signalkaskade nach Bindung von Leptin an seinen Rezeptor findet entweder über STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) oder den IRS1 (Insulinrezeptor-Substrat 1)-PI3K(Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase)-Weg statt [Sahu 2003]. Im mediobasalen Hypothalamus der Ratte führte die systemische Leptingabe in vivo zur Aktivierung von PI3K. Bei intracerebroventrikulärer Injektion eines Inhibitors von PI3K kam es zur Aufhebung der anorexigenen Wirkung von ebenfalls intracerebroventrikulär verabreichtem Leptin [Niswender et al. 2001]. Die 16tägige zentrale Dauerinfusion von Leptin führte zu einer verminderten Aktivität von PI3K und einem nachgeschalteten Enzym bei erhaltenem STAT3-Signalweg [Sahu u. Metlakunta 2005]. Dies könnte ein Hinweis für eine Rolle des IRS1-PI3K-Wegs im

Pathomechanismus der hypothalamischen Leptinresistenz sein, wenn auch bisher ein Anhalt für die Persistenz der verminderten Aktivität aussteht.

SOCS3

SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3), dessen Expression durch Leptin stimuliert wird, hemmt seinerseits den Leptin-Signalweg [Bjorbaek et al. 1998]. Münzberg und Myers postulieren, daß die bei Adipositas beobachtete gesteigerte Aktivierung des Leptinrezeptor-STAT3-SOCS3-Signalwegs zur Feedback-Inhibierung durch SOCS3 führt [Munzberg u. Myers 2005]. Diese These wird in einer Arbeit von Enriori und Kollegen gestützt, in der sich zeigte, daß diätbedingt adipöse Mäuse einen erhöhten Basalspiegel an SOCS3 haben, der nach Leptingabe unverändert blieb [Enriori et al. 2007]. Im Gegensatz dazu war nach 16tägiger chronischer intracerebroventrikulärer Leptininfusion adulter Ratten der STAT3-Signalweg trotz vermehrt exprimierter SOCS3-mRNA konstant aktiviert [Pal u. Sahu 2003]. Ob SOCS3 am Pathomechanismus der Leptinresistenz beteiligt ist, ist damit nicht definitiv zu bewerten; die Möglichkeit scheint jedoch zu bestehen.

PTP1B

PTP1B (Protein Tyrosin Phosphatase 1B), exprimiert in hypothalamischen, leptinresponsiven Neuronen, ist ein negativer Regulator des STAT3-vermittelten Leptinsignalwegs [Zabolotny et al. 2002]. Mäuse, denen PTP1B fehlt, sind resistent gegenüber Diabetes und nahrungsinduzierter Adipositas; im Hypothalamus dieser Tiere besteht eine Hypersensitivität gegenüber Leptin [Cheng et al. 2002]. Eine gesteigerte Aktivität von PTP1B ist mit der altersbedingten Leptinresistenz von Ratten assoziiert [Morrison et al. 2007], was ein Hinweis für die Bedeutung dieses erst kürzlich beschriebenen Enzyms für den Pathomechanismus der Leptinresistenz sein könnte.

AMPK

AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) ist ein intrazellulärer Regulator der Energiebilanz, der bei erhöhtem AMP:ATP-Quotient die Produktion von ATP sowie die Glukoseaufnahme fördert und ATP-verbrauchende Prozesse hemmt [Long u. Zierath 2006]. Die intraperitoneale Leptininjektion führte zur Reduktion der AMPK-Aktivität im Hypothalamus von Ratten, und die Applikation eines pharmakologischen AMPK-Aktivators entweder in den 3. Hirnventrikel oder in den PVN führte zu einer Steigerung

der Nahrungsaufnahme [Andersson et al. 2004]. Bei Mäusen mit nahrungsinduzierter Adipositas ist die hypothalamische AMPK-Antwort auf Leptin vermindert [Martin et al. 2006]. Ein Defekt des AMPK-Systems in Antwort auf den Leptinsignalweg könnte somit eine Rolle im Pathomechanismus der zentralen Leptinresistenz spielen.

Zusammenfassend wurden hier die aktuellen Konzepte zu molekularen Ursachen zentraler Leptin- und Insulinresistenz umrissen. Es ist möglich, daß ihnen eine Rolle bei den durch die neonatale Überernährung hervorgerufenen dauerhaften Veränderungen wie Übergewicht, Leptin- und Insulinresistenz zukommt. Dies gilt insbesondere für Alterationen an der Blut-Hirn-Schranke, dem Leptinrezeptor, SOCS3 und AMPK. Im Kontext einer möglichen epigenetischen Modifikation der NPY-Expression durch DNA-Methylierung im Promotorbereich könnten die oben beschriebenen Phänomene zu einer Veränderung der Transkriptionsaktivität von NPY führen, was wiederum eine alterierte Disposition des Promotors für DNA-Methylierung zur Folge haben kann (siehe auch Diskussion weiter unten). Somit ergäbe sich das Bild einer komplexen Interaktion von Phänomenen auf der Ebene der Hormonspiegel von Leptin und Insulin, der Signaltransduktion, der Genaktivität von NPY sowie der epigenetischen Modifikation durch DNA-Methylierung.

4.7 Zur möglichen Rolle der Blutglukose bei der DNA-Methylierung

Sowohl in der Experimental- als auch in der Kontrollgruppe fand sich in der vorliegenden Arbeit eine positive, signifikante Korrelation zwischen der Blutglukose und dem Methylierungsgrad des NPY-Promotors. Aktuelle Daten unserer Arbeitsgruppe belegen eine derartige positive Korrelation auch für den POMC-Promotor [Plagemann et al. 2009] und den Insulinrezeptor-Promotor [Harder et al. 2009]. Das ist nach dem aktuellen Stand der Literatur die erste Beschreibung eines derartigen Zusammenhangs *in vivo*.

Die positive, gruppenübergreifende Korrelation zwischen Blutglukose und DNA-Methylierung findet sich sowohl im Promotor von NPY als auch im Promotor von POMC. Dies wirft die Frage auf, ob dem nicht ein globaler Mechanismus zugrunde liegen könnte, demzufolge eine hohe Glukosekonzentration zu gesteigerter DNA-Methylierung führt.

Anhalt dafür liefert folgende biochemische Überlegung (s. Abb. 11):

1. S-Adenosyl-Methionin (SAM) ist das Substrat der Methyltransferasen (s. Abb. 1). Die Kinetik der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) ist direkt abhängig von der SAM-Konzentration [Pradhan et al. 1999]. In Zellkulturen führte die Gabe von SAM zu vermehrter DNA-Methylierung im Promotor des Gens Presenilin 1 und zu dessen verminderter Expression [Scarpa et al. 2003]. Desweiteren zeigt eine Studie, daß SAM die aktive Demethylierung von DNA verhindert [Detich et al. 2003]. Hohe intrazelluläre SAM-Spiegel führen demnach zu vermehrter DNA-Methylierung.

2. Die Synthese von SAM wiederum erfolgt mit den Substraten ATP und Methionin durch die SAM-Synthetase, deren Geschwindigkeit von der ATP-Konzentration abhängig ist [Oden u. Clarke 1983]. Die Verfügbarkeit von SAM ist somit unmittelbar vom ATP-Angebot abhängig. Unabhängig von den SAM-abhängigen Methyltransferasen selbst ist das ATP-abhängige Enzym hSNF2H beschrieben worden, das direkt mit der Methyltransferase DNMT3B interagiert [Geiman et al. 2004].

3. Die hypothetische Kette der Einflußnahme Glukose → ATP → SAM → 5-Methylcytosin wird durch die Annahme geschlossen, daß im Verlauf der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung aus Glukose ATP gewonnen wird. Das wird durch Arbeiten belegt, in denen extrazelluläre Glukosegabe zur Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration führt, exemplarisch bei Eizellen [Downs 1995] und *vice versa* (Glukosedeprivation senkt die ATP-Konzentration) bei striatalen Zellen [Milusheva et al. 1996]. Zwei Arbeiten zeigten speziell für den Hypothalamus, daß extrazelluläre Glukose den intrazellulären ATP-Spiegel erhöht [Parton et al. 2007], [Fioramonti et al. 2007].

4. Schon 1965 ist für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ein direkter Einfluß der Glukosekonzentration auf den SAM-Spiegel beschrieben worden; einschränkend dabei ist jedoch, daß DNA-Methylierung in Hefen nicht stattfindet [Schlenk et al. 1965].

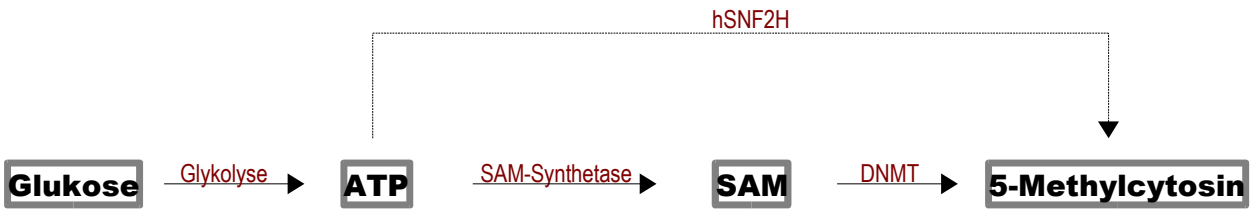

Abbildung 11: Schema der hypothetischen Einflußnahme von Glukose auf die DNA-Methylierung. Aus Glukose wird in der Glykolyse u.a. ATP gebildet, was eines der beiden Substrate zur Synthese von S-Adenosyl-Methionin (SAM) mittels der SAM-Synthetase ist. SAM wiederum ist das Substrat der DNA-Methyltransferase (DNMT), durch die aus Cytosin das 5-Methylcytosin wird. Das Enzym hSNF2H hat einen SAM-unabhängigen Einfluß auf die DNMT-vermittelte Methylierung.

Diese mechanistische These einer direkten Kausalität zwischen Blutglukose und Methylierung wird durch eine Arbeit an humanen Monozyten gestützt, die in einem stark glukosehaltigen Medium kultiviert wurden. Diese zeigten eine erhöhte Histon-Lysin-Methylierung [Miao et al. 2007], die durch die SAM-abhängige Histon-Methyltransferase vermittelt wird [Xiao et al. 2003]. Die definitive Rolle der Lysin-Methylierung für die Chromatinstruktur und Genexpression ist noch nicht geklärt [Miao et al. 2007], jedoch bestätigt die genannte Studie, daß Glukose dosisabhängig zu Methylierung führen kann.

Letztlich konnten Chiang und Kollegen vor kurzem zeigen, daß in Zelllinien des humanen hepatozellulären Karzinoms erhöhte Glukosekonzentration zu vermehrter DNMT-Aktivität mit subsequent erhöhter globaler DNA-Methylierung führte, die mit Hilfe der quantitativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen wurde [Chiang et al. 2009]. Auch wenn Tumorzelllinien nicht als generelles Abbild der Physiologie *in vivo* gelten können, ist dieser Befund doch eine deutliche Bekräftigung in Richtung der oben vorgeschlagenen Kette der Einflußnahme.

Wenn Blutglukose eine ungerichtete Wirkung auf die DNA-Methylierung hat, dann stellt sich anhand der Promotoren der funktionellen Gegenspieler NPY und POMC die Frage, wie daraus ein „gerichteter“ Effekt entstehen kann.

Im speziellen, hier beschriebenen Fall des Duos NPY/POMC sei auch auf das Kapitel 4.4 verwiesen, in dem dargelegt wird, warum NPY generell hypomethyliert sein dürfte. Bei einem „Schutz“ des NPY-Promotors vor Methylierung wären die zu erwartenden Folgen einer globalen, glukoseabhängigen Methylierung im NPY-Promotor gering, während sie beim nicht-hypomethylierten und „methylierungsempfänglichen“ POMC-Promotor möglicherweise stärker ausfallen.

Im Allgemeinen sind 3 Mechanismen denkbar, die möglicherweise nebeneinander einen spezifischen Effekt einer globalen glukoseabhängigen Methylierung herbeiführen könnten:

a) Zum einen ist bekannt, daß Blutglukose speziell im Hypothalamus nicht von allen Zellen im gleichen Maße aufgenommen und nicht auf dieselbe Art und Weise enzymatisch weiterverarbeitet wird. Es findet sich dort eine heterogene Gruppe von „Glukose-sensitiven Neuronen“, die Glukose nicht nur als Nährstoff, sondern auch als Signalmolekül zur Regulation ihres Membranpotentials und ihrer neuronalen Aktivität verwenden. Viele dieser Zellen exprimieren zur Verstoffwechslung von Glukose zu ATP nicht nur Hexokinase I, sondern auch die pankreatische Form Hexokinase IV, synonym Glukokinase genannt [Levin et al. 2006]. Die „Glukose-sensitiven Neuronen“ unterteilen sich in zwei Gruppen. Zum einen sind dies die „Glukose-inhibierten“, von denen NPY-positive Neuronen einen großen Teil ausmachen und bei denen ein ATP-abhängiger Chlorid-Kanal bei hoher Glukosekonzentration zur Hyperpolarisation führt [Fioramonti et al. 2007]. Zum andern sind es die oft POMC-exprimierenden „Glukose-exzitierten“, bei denen ein Glukose- und damit ATP-Anstieg zum Verschluß eines ATP-abhängigen Kalium-Kanals und damit zur Depolarisation führt [Parton et al. 2007]. Die meisten Neuronen bedienen sich des Transporters Glut3 zur Glukoseaufnahme [Levin et al. 2006]; zum ersten Mal wurde vor kurzem auch die Insulin- und Leptin-abhängige Expression von Glut4 an der neuronalen Plasmamembran demonstriert [Benomar et al. 2006]. Cai und Kollegen beschreiben, daß in hypothalamischen „Glukose-sensitiven Neuronen“ sogar alle vier Unterformen des Glukosetransporters vorkommen können [Cai et al. 2007]. Die Beispiele der differenzierten Transporter-, Enzym- und Ionenkanalausstattung zeigen, wie hohe externe Glukosekonzentrationen in unterschiedlichen Zellen distinkte Effekte hervorrufen können.

b) Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, daß ein „Targeting“ spezifischer Effekte auf der Ebene des Genoms stattfindet. Hinweise dafür liefert eine Arbeit, in welcher demonstriert wurde, daß DNA-bindende Proteine spezifische Sequenzen vor *de novo*-Methylierung schützen können [Han et al. 2001]. Umgekehrt konnten Di Croce und Kollegen belegen, daß in der Onkogenese bestimmte Proteine die Methyltransferasen zu spezifischen Zielsequenzen lenken können [Di Croce et al. 2002]. Ebenso zeigte sich, daß die *de novo*-Methyltransferase DNMT3a bestimmte CpG-Stellen bevorzugt methyliert und dies möglicherweise in Abhängigkeit flankierender Sequenzen tut [Oka et al. 2006]. Schließlich fanden Hattori et al. heraus, daß zum einen alle Methyltransferasen eine Präferenz für CpG-Inseln haben und zum anderen jede einzelne Methyltransferase sequenzspezifische Unterschiede in ihrer Methylierungsaktivität aufweist [Hattori et al. 2004]. Die vorgenannten Arbeiten haben zwar nicht den Zusammenhang zwischen Glukose und der DNA-Methylierung untersucht, jedoch zeigen sie auf, durch welche Mechanismen eine gesteigerte globale Methylierungsaktivität zu selektiven Effekten auf der Genomebene führen könnte.

c) Unabhängig von den vorgenannten Mechanismen ist bekannt, daß transkriptionell inaktive Genombereiche bevorzugt methyliert werden [Bird 2002]. Analog bedeutet dies, daß in transkriptionell aktiven Promotorbereichen durch die sterische Besetzung dieser Genomabschnitte ein Ansetzen der Methyltransferasen vermindert und somit *de novo*-Methylierung verhindert wird. Ein indirekter Beweis dafür liegt in der Tatsache, daß die Anwesenheit des Transkriptionsfaktorelements SP1 CpG-Inseln vor *de novo*-Methylierung schützt [Brandeis et al. 1994]. Demnach könnten bestimmte Genombreiche je nach transkriptioneller Aktivität zum Zeitpunkt einer *de novo*-Methylierung unterschiedliche Methylierungsmuster erwerben. Dies kann insebesondere dann von Bedeutung sein wenn – wie weiter oben diskutiert – Resistenzmechanismen gegenüber Leptin und Insulin auf Ebene der Signaltransduktion die Transkriptionsaktivität der „Zielgene“ NPY und POMC modifizieren.

Zusammenfassend läßt sich Folgendes sagen: der NPY-Promotor ist hypomethyliert und aus evolutionärer Sicht vor Methylierung geschützt, und trotzdem läßt sich eine deutliche Korrelation des Methylierungsstatus zur Blutglukose erkennen. Diese Korrelation könnte Ausdruck einer mechanistischen, positiven Einflußnahme der

Blutglukose auf die DNA-Methylierung sein. Durch Phänomene auf Ebene der Zelle oder des Genoms könnte dieser ungerichtete Einfluß zu distinkten und ggf. unphysiologischen Effekten führen.

Dies lenkt den Blick auf die mögliche funktionelle Konsequenz einer Hyperglykämie während kritischer Entwicklungsphasen wie der Neonatalzeit. Denn im Sinne der fetalen Programmierung könnte der Energielieferant Glukose via DNA-Methylierung zu einer dauerhaften epigenetische Modulation der Aktivität von hypothalamischen Genen führen und damit zu einer persistierenden Fehlprogrammierung des Regelzentrums für Nahrungsaufnahme und Körpergewicht beitragen.

Durch einen derartigen Einfluß auf die DNA-Methylierung wäre die neonatale Hyperglykämie im Sinne eines „intergenerativen Teufelskreises“ [Plagemann et al. 2009] ein erworbener und sich selbst perpetuierender Risikofaktor für Störungen aus dem Kreis des Metabolischen Syndroms. Denn wie schon von Dörner in der „epigenetischen Transmissionsregel“ [Dörner et al. 1987] beschrieben würde ein betroffenes weibliches Individuum bei Entwicklung von Diabetes (im Rahmen des Metabolischen Syndroms) seine Nachkommen während Schwangerschaft und Stillzeit wiederum einer hyperglykämischen Stoffwechsel- bzw. Nahrungssituation und dem konsekutiven Risiko einer erhöhten Disposition für Stoffwechselstörungen aussetzen – vorausgesetzt der Diabetes bleibt unbehandelt. Es sei in diesem Zusammenhang angemerkt, daß mehr als 10% aller Schwangeren in Deutschland von Diabetes während der Schwangerschaft betroffen sind, was Typ-1-, Typ-2- sowie Gestationsdiabetes einschließt [Kleinwechter 2000]. Dies illustriert die Dimension des Phänomens und das Potential für Behandlung (des Diabetes) und Primärprävention von Störungen aus dem Kreis des Metabolischen Syndroms.

Diese Arbeit kann nur ein kleiner Baustein für das Gesamtverständnis des Pathomechanismus der fetalen Programmierung sein; sie reiht sich jedoch kohärent in eine Kaskade von klinisch-epidemiologischen und experimentellen Befunden ein, die die Rolle neonataler Überernährung bei der Entstehung und intergenerativen Transmission von Übergewicht, Adipositas und dem damit verbundenen Metabolischen Syndrom betonen. In diesem Sinne soll sie dazu beitragen, die große Bedeutung von Maßnahmen der Primärprävention – wie der gezielten Vermeidung neonataler

Überernährung, aber auch der konsequenten Behandlung von Diabetes während der Schwangerschaft – hervorzuheben.

5 Zusammenfassung

Übergewicht und Adipositas stellen mit ihrem epidemischen Auftreten die Betroffenen und die Gesellschaft vor schnell wachsende Herausforderungen. Klinisch-epidemiologische Beobachtungen zeigen, daß die neonatale Gewichtszunahme mit Adipositas im Erwachsenenalter assoziiert ist. Zur Erforschung der Pathogenese dieses Phänomens existiert das gut etablierte Tiermodell der „kleinen Würfe“, in dem bei der Ratte durch neonatale Überernährung Hyperphagie, erhöhtes Körpergewicht und diabetogene Stoffwechselveränderungen hervorgerufen werden. Diese Veränderungen persistieren bis in das adulte Alter. Bei diesem Modell kann von einer neonatalen Fehlprogrammierung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht gesprochen werden.

Der potenteste orexigene hypothalamische Neurotransmitter ist Neuropeptid Y (NPY). Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine Fehlregulation des NPYergen Systems im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten im Sinne permanent erhöhter Aktivität und einer Resistenz gegenüber Leptin und Insulin. Ein möglicher Mechanismus einer derartigen persistierenden Fehlregulation könnte die neonatal erworbene, epigenetische Programmierung durch alterierte DNA-Methylierung sein. So ist exemplarisch gezeigt worden, daß das mütterliche Verhalten durch Veränderung der DNA-Methylierung im Promotor des Glucocorticoid-Rezeptors dessen Expression dauerhaft beeinflußte. Der NPY-Promotor könnte prinzipiell ebenso für DNA-Methylierung empfänglich sein, da er sowohl eine CpG-Insel als auch potentiell durch Methylierung modulierbare Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthält.

Die vorliegende Studie sollte somit die Arbeitshypothese überprüfen, ob eine veränderte DNA-Methylierung im hypothalamischen NPY-Promotor eine Rolle in der Pathogenese der durch Überernährung induzierten Fehlregulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht spielt, und ob sich eine Beziehung zur Expression der NPY-mRNA sowie zu peripheren Stoffwechselparametern zeigt.

Zur Untersuchung des Methylierungsstatus wurde die Methode der Bisulfitbehandlung mit subsequenter Klonierung und Sequenzierung als Goldstandard gewählt, die eine exakte Aussage über den Methylierungsgrad aller Cytosine der untersuchten Sequenz gestattet. Analysiert wurde die Sequenz zwischen den Nukleotidpositionen -246 und -1 mit einer Gesamtzahl von 7560 Cytosinpositionen bei insgesamt 108 Klonen. Die Expression der NPY-mRNA wurde mittels RT-PCR bestimmt.

Neonatal überernährte Ratten waren am 21. Lebenstag bei erhöhtem absolutem und

relativem Körpergewicht hyperleptinämisch und hyperinsulinämisch. Der hypothalamische NPY-Promotor dieser Tiere zeigte im Vergleich zur normalernährten Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied im Methylierungsstatus aller Cytosine (0,23% vs. 0,26%) sowie der Cytosine in CpG-Positionen (0,38% vs. 0,55%) und war insgesamt hypomethyliert. Die Expression der NPY-mRNA wies weder einen signifikanten Gruppenunterschied noch eine Assoziation zum Methylierungsgrad des NPY-Promotors auf. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die DNA-Methylierung im untersuchten Bereich des NPY-Promotors an der Fehlprogrammierung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht bei neonatal überernährten Ratten nicht beteiligt ist. Der NPY-Promotor ist sowohl in der Experimental- als auch der Kontrollgruppe hypomethyliert, was ein Hinweis dafür sein könnte, daß das evolutionär stark konservierte und überlebenswichtige NPY vor einer Regulation durch DNA-Methylierung geschützt ist. Die fehlende Down-Regulation der NPY-mRNA trotz Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie bekräftigt die Hypothese einer Resistenz des NPYergen Systems gegenüber Leptin und Insulin und ist konsistent mit der vorbeschriebenen fehlenden Down-Regulation bzw. Aktivitätssteigerung auf der Ebene des Peptids, der Neuronendichte und der Elektrophysiologie. Der Pathomechanismus dieser sich durch die Leptin- und Insulinresistenz manifestierenden Fehlprogrammierung von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht könnte möglicherweise im Bereich der Signaltransduktion und/oder durch DNA-Methylierung im Promotorbereich anderer, methylierungsempfindlicherer Neuropeptide stattfinden, die mit dem NPYergen System interagieren und dessen Aktivität beeinflussen.

Gruppenübergreifend fand sich eine positive signifikante Korrelation zwischen der Blutglukose und dem Methylierungsgrad im Promotor von NPY ($r = 0,58$; $p < 0,05$). Diese deutliche Korrelation könnte Ausdruck eines mechanistischen Einflußes der extrazellulären Glukosekonzentration auf die Methylierung von DNA sein und daher neue pathophysiologische Erklärungsansätze und Arbeitshypothesen bei hyperglykämischen Situationen erlauben.

Diese Arbeit bietet die Basis für weitere Untersuchungen von epigenetischen Veränderungen im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten. Der Untersuchung des Pathomechanismus der neonatal ernährungsabhängig erworbenen Disposition zu Übergewicht und Adipositas kommt eine eminente Bedeutung zu, denn nur durch genaue Kenntnis der Ätiologie können gezielte Maßnahmen zur Primärprävention dieser Epidemie etabliert werden.

Literaturverzeichnis

Adams RL. DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. Biochem J 1990;265:309-20.

Ahima RS, Hileman SM. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. Regul Pept 2000;92:1-7.

Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. Endocrinology 1999;140:4923-31.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. Diabet Med 2006;23:469-80.

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. J Biol Chem 2004;13:12005–8.

Babicky A, Ostadalova I, Parizek J, Kolar J, Bibr B. Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. Physiol Bohemoslov 1973;22:449-56.

Bai FL, Yamano M , Shiotani Y. An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. Brain Res 1985;331:172-5.

Banks WA. Blood–brain barrier and energy balance. Obesity 2006;14:234S-237S.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. Peptides 1996;17:305–11.

Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. Analyst 1972;97:142-5.

Barresi V, Condorelli DF, Giuffrida Stella AM. GFAP gene methylation in different neural cell types from rat brain. Int J Dev Neurosci 1999;17:821-8.

Basset DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. Am J Physiol 1988;64:1249-56.

Benomar Y, Naour N, Aubourg A, et al. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. Endocrinology 2006;147:2550–6.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet 2000;9:2395-402.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 2002;16:6-21.

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 1986;321:209-13.

Bird AP, Taggart MH, Nicholls RD, Higgs DR. Non-methylated CpG-rich islands at the human a-globin locus: implications for evolution of the a-globin pseudogene. EMBO J 1987;6:999-1004.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7:1513-23.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz D, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediatorof central leptin resistance. Mol Cell 1998;1:619-25.

Blomqvist AG, Soderberg C, Lundell I, Milner RJ, Larhammar D. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: Sequences of chicken, goldfish, and Torpedo marmorata DNA clones. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2350-4.

Brandeis M, Frank D, Keshet I, et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. Nature 1994;371:435-8.

Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. Physiol Behav 2006;89:687-91.

Burguera B, Couce ME, Curran GL, et al. Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood–brain barrier in rats. Diabetes 2000;49:1219–23.

Cai F, Gyulkhandanyan AV, Wheele MB, Belsham DD. Glucose regulates AMP-activated protein kinase activity and gene expression in clonal, hypothalamic neurons expressing proopiomelanocortin: additive effects of leptin or insulin. J Endocrinol 2007;192:605–14.

Cambras T, Lopez L, Arias JL, Diez-Noguera A. Quantitative changes in neuronal and glial cells in the suprachiasmatic nucleus as a function of the lighting conditions during weaning. Dev Brain Res 2005;157:27-33.

Capuano CA, Leibowitz SF, Barr GA. Effect of paraventricular injection of neuropeptide Y on milk and water intake of preweanling rats. Neuropeptides 1993;24:177-182.

Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. Endocrinology 2006;147:2909-15.

Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. Dev Cell 2002;2:497–503.

Chiang EP, Wang YC, Chen WW, Tang FY. Effects of insulin and glucose on cellular metabolic fluxes in homocysteine transsulfuration, remethylation, S-adenosylmethionine synthesis and global DNA methylation. J Clin Endocrinol Metab 2008;Epub ahead of print.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques 1993;15:532-4.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotechniques 1993;15:532-4.

Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. Nat Protoc 2006;1:2353-64.

Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. Ann Intern Med 1995;122:481-6.

Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. Nucl Acids Res 1990;18:3975-82.

Conlon JM, Larhammar D. The evolution of neuroendocrine peptides. Gen Comp Endocrinol 2005;142:53-9.

Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. Hum Genet 1989;83:181-88.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural networkin the arcuate nucleus. Nature 2001;411:480-4.

Cummings DE, Schwartz MW. Melanocortins and body weight: a tale of two receptors. Nat Genet 2000;26:8-9.

Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. Neuroreport 2007;18:521-4.

Davidowa H, Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. Neuroreport 2000;11:2795-8.

Detich N, Hamm S, Just G, Knox JD, Szyf M. The methyl donor S-Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA. J Biol Chem 2003;278:20812–20.

Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. Science 2002;295:1079-82.

Dörner G. Hormones and brain differentiation. Amsterdam: Elsevier, 1976; 256.

Dörner G, Mohnike A. Zur Bedeutung der perinatalen Überernährung für die Pathogenese der Fettsucht und des Diabetes mellitus. Dt Gesundh-Wesen 1977;32:2325-2328.

Dörner G, Plagemann A, Reinagel H. Familial diabetes aggregation in type I diabetics: gestational diabetes an apparent risk factor for increased diabetes susceptibility in the offspring. Exp Clin Endocrinol 1987;89:84-90.

Downs SM. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. Dev Biol 1995;167:502-12.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser Capture Microdissection. Science 1996;274:998-1001.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. Cell Metab 2007;5:181-94.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 1996a;381:415–21.

Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 1996b;274:1704-7.

Faouzi M, Leshan R, Björnholm M, Hennessey T, Jones J, Münzberg H. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. Endocrinology 2007;148:5414-23.

Faust IM, Johnson PR, Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. J Nutr 1980;110:2027–34.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer 2004;4:143-53.

Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Penicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus. Diabetes 2007;56:1219–27.

Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. The relation of childhood BMI to adult adiposity: the Bogalusa Heart Study. Pediatrics 2005;115:22-7.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:1827-31.

Ganong WF. Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000;27:422-7.

Gardiner-Garden M, Frommer M. Transcripts and CpG islands associated with the pro-opiomelanocortin gene and other neurally expressed genes. J Mol Endocrinol 1994;12:365-82.

Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. Biochem Biophys Res Comm 2004;318:544-55.

Gerald C, Walker MW, Criscione L, et al. A receptor subtype involved in neuropeptide Y-induced food intake. Nature 1996;382:168–71.

Grill HJ, Kaplan JM. The neuroanatomical axis for control of energy balance. Front Neuroendocrinol 2002;23:2-40.

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res 2001;29:e65.

Guan X-M, Yu H, Trumbauer M, Frazier E, Van der Ploeg LHT, Chen H. Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. NeuroReport 1998;9:3415–19.

Han L, Lin IG, Hsieh CL. Protein binding protects sites on stable episomes and in the chromosome from de novo methylation. Mol Cell Biol 2001;21:3416–24.

Harder A, Rosche M, Reuß DE, et al. Methylation analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) promoter in peripheral nerve sheath tumours. Eur J Cancer 2004;40:2820-8.

Harder T, Plagemann A, Rohde W, Dörner G. Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. Metabolism 1998;47:855-62.

Harder T, Roepke K, Ziska T, Harder A, Dudenhausen JW, Plagemann A. Acquired hypermethylation of the hypothalamic insulin receptor promoter in neonatally overfed rats. Z Geburtsh Neonatol ;213:S30 (abstract).

Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:2066-70.

Hattori N, Abe T, Suzuki M, et al. Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells. Genome Res 2004;14:1733-40.

Helmert U, Strube H. Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985-2002. Gesundheitswesen 2004;66:409-15.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9821-26.

Higuchi H, Nakano K, Miki N. Identification of NGF-response element in the rat neuropeptide Y gene and induction of the binding proteins. Biochem Biophys Res Commun 1992;189:1553-60.

Kadonaga JT. Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. Cell 1998;92:307-13.

Kafri T, Ariel M, Brandeis M, et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. Genes Dev 1992;6:705-14.

Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, et al.. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. Int J Obes 2006;30:1585–94.

Kleinwechter H. The government sponsored model project Gestational diabetes (GDM) Schleswig-Holstein: Prevalenceand foetal outcome in unselected women following the successful implementation of screening for GDM. Diabetologia 2000;43:A56.

Korner J, Savontaus E, Chua SCJ, Leibel RL, Wardlaw SL. Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus. J Neuroendocrinol 2001;13:959-66.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet 1998;19:155-7.

Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. Science 2008;319:1827-30.

Kurth BM, Schaffrath Rosario A. Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz 2007;50:736-43.

Lambert PD, Wilding JPH, Turton MD, Ghatei MA, Bloom SR. Effect of food deprivation and streptozotocin-induced diabeteson hypothalamic neuropeptide Y release as measured by a radioimmunoassay-linked microdialysis procedure. Brain Res 1994;656:135-40.

Larhammar D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. Regul Pept 1996;62:1-11.

Larhammar D, Ericsson A, Persson H. Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. PNAS 1987;84:2068-72.

Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. Genomics 1992;13:1095-1107.

Larsen PJ, Sheikh SP, Jakobsen CR, Schwartz TW, Mikkelsen JD. Regional distribution of putative NPY Y1 receptors and neurons expressing Y1 mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system. Eur J Neurosci 1993;5:1622–37.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Banks WA. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;286:R143–R150.

Levin BE, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA. Role of neuronal glucosensing in the regulation of energy homeostasis. Diabetes 2006;55:S122–30.

Li BS, Kramer PR, Zhao W, Ma W, Stenger DA, Zhang L. Molecular cloning, expression, and characterization of rat homolog of human AP-2alpha that stimulates neuropeptide Y transcription activity in response to nerve growth factor. Mol Endocrinol 2000;14:837-47.

Long YC, Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. J Clin Invest 2006;116:1776–83.

Lopez M, Seoane LM, Tovar S, et al. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. Diabetologia 2005;48:140-8.

Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. Science 2005;310:683-5.

Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB. Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. J Biol Chem 2006;281:18933–41.

McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. Physiol Rev 2005;85:571-633.

Miao F, Wu X, Zhang L, Yuan YC, Riggs AD, Natarajan R. Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. J Biol Chem 2007;282:13854–63.

Milusheva EA, Doda M, Baranyi M, Vizi ES. Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and [Ca2+]o-dependent and independent release of [3H] dopamine in rat striatal slices. Neurochem Int 1996;28:501-7.

Minth CD, Dixon JE. Expression of the human neuropeptide Y gene. J Biol Chem 1990;22:12933-39.

Morash BA, Imran A, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M. Leptin receptors are developmentally regulated in rat pituitary and hypothalamus. Mol Cell Endocrinol 2003;210:1-8.

Morrison CD, White CL, Wang Z, et al. Increased hypothalamic protein tyrosine phosphatase1B contributes to leptin resistance with age. Endocrinology 2007;148:433–40.

Morton GJ, Blevins JE, Williams DL, et al. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. J Clin Invest 2005;115:703-10.

Munzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. Nat Neurosci 2005;8:566-70.

Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. JAMA 1999;282:1523-9.

Newell-Price J, King P, Clark AJ. The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression. Mol Endocrinol 2001;15:338–48.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MGJr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. Nature 2001;413:794-5.

Oden KL, Clarke S. S-adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels. Biochemistry 1983;22:2978-86.

Odgen CL, Carroll MD, Curtin LR, et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA 2006;295:1549-55.

Oka M, Rodic N, Graddy J, Chang LJ, Terada N. CpG sites preferentially methylated by Dnmt3a in vivo. J Biol Chem 2006;15:9901–8.

Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res 1996;24:5064-6.

Oscai LB, McGarr JA. Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 1978;235:141-4.

Pal R, Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus during chronic central leptin infusion. Endocrinology 2003;144:3789–98.

Parton LE, Ye CP, Coppari R, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. Nature 2007;449:228-33.

Patel AC, Anna CH, Foley JF, et al. Hypermethylation of the p16 (Ink4a) promoter in B6C3F1 mouse primary lung adenocarcinomas and mouse lung cell lines. Carcinogenesis 2000;21:1691-1700.

Peeters A, Barendregt J, Willekens F, et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. Ann Intern Med 2003;138:24-32.

Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, et al. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. Exp Brain Res 2000;132:10-26.

Peterson KJ, Cameron RA, Davidson EH. Bilaterian origins: significance of new experimental observations. Dev Biol 2000;219:1-17.

Plagemann A. Fetale Programmierung und funktionelle Teratologie. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.). Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen. Berlin: Springer-Verlag 2005b:325-44.

Plagemann A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. Physiol Behav 2005a;86:661–8.

Plagemann A. 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. J Perinat Med 2004;32:297-305.

Plagemann A, Harder T, Brunn M, et al. Hypothalamic POMC promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. J Physiol 2009;Epub ahead of print:doi 10.1113/jphysiol.2009.176156.

Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. Brain Res 1999b;836:146-55.

Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. J Neuroendocrinol 1999a;11:541-6.

Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. Exp Clin Endocrinol 1992;99:154-8.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. J Biol Chem 1999;274:33002–10.

Prugger C, Keil U. Entwicklung der Adipositas in Deutschland - Größenordnung, Determinanten und Perspektiven. Dtsch Med Wochenschr 2007;132:892-7.

Qian S, Chen H, Weingarth D, et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. Mol Cell Biol 2002;22:5027–35.

Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:5237–42.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. EMBO J 1998;17:4905-8.

Rizk NM, Liu LS, Eckel J. Hypothalamic expression of neuropeptide-Y in the New Zealand obese mouse. Int J Obes Relat Metab Disord 1998;22:1172-7.

Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. Front Neuroendocrinol 2003;24:225-53.

Sahu A. Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin resistance in neuropeptide Y neurones. J Neuroendocrinol 2002;14:796–804.

Sahu A, Metlakunta AS. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase-3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. J Neuroendocrinol 2005;17:720–26.

Sanger F, Nicklein S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.

Scarpa S, Fuso A, D'anselmi F, Cavallaro RA. Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? FEBS Lett 2003;541:145-8.

Schellong K, Rodekamp E, Ziska T, et al. Malprogramming of the hypothalamic melanocortinergic system in neonatally overfed rats. Early Hum Dev 2006;82:555 (abstract).

Schlenk F, Zydek CR, Ehninger DJ, Dainko JL. The production of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-ethionine by yeast. Enzymologia 1965;29:283-98.

Schmidt I, Schoelch C, Ziska T, Schneider D, Simon E, Plagemann A. Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. Physiol Genomics 2000;3:113-20.

Schwartz GJ, Moran TH. CCK elicits and modulates vagal afferent activity arising from gastric and duodenal sites. Ann N Y Acad Sci 1994;713:121-8.

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. Nat Med 1996b;2:589-93.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus. J Clin Invest 1996a;98:1101-6.

Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. Endocrinology 1992;130:3608-16.

Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature 2000;404:661-71.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature 1998;396:670-4.

Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J Biol Chem 1994;269:32678-84.

Siegmund KD, Laird PW. Analysis of complex methylation data. Methods 2002;27:170-8.

Sinclair KD, Allegrucci C, Singh R, et al. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:19351-6.

Singer J, Roberts-Ems J, Riggs AD. Methylation of mouse liver DNA studied by means of the restiriction enzymes msp I and hpa II. Science 1979;203:1019-21.

Singer LK, Kuper J, Brogan RS, Smith MS, Grove KL. Novel expression of hypothalamic neuropeptide Y during postnatal development in the rat. NeuroReport 2000;11:1075-80.

Stanley B, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 1986;:1189-92.

Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, et al. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. Circulation 2005;111:1897-903.

Stettler N, Zemel BS, Kumanyka S, Stallings VA. Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study. Pediatrics 2002;109:194-9.

Sun SS, Liang R, Huang TT, et al. Childhood obesity predicts adult metabolic syndrome: the Fels Longitudinal Study. J Pediatr 2008;152:191-200.

Takai D, Jones PA. The CpG island searcher: a new WWW resource. In Silico Biol 2003;3:235-40.

Tensen CP, Cox KJA, Burke JF, et al. Molecular cloning and characterization of an invertebrate homologue of a neuropeptide Y receptor. Eur J Neurosci 1998;10:3409-16.

Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. Br J Nutr 2006;95:830-7.

Van Heek M, Compton DS, France CF, et al. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. J Clin Invest 1997;99:385–90.

Waddington C. The epigenotype. Endeavour 1;1942;18-20.

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. Nucl Acids Res 1997;25:4422-6.

Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. Am J Clin Nutr 1999;69:179–97.

Waterland RA, Jirtle RL. Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. Mol Cell Biol 2003;23:5293–300.

Weaver JCG, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat Neurosci 2004;7:847-54.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat Genet 2007;39:457-66.

Wilding JPH, Gilbey SG, Bailey CJ, et al. Increased neuropeptide Y messenger RNA and decreased neurotensin messenger RNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. Endocrinology 1993;132:1939-44.

Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. BMC Res Notes 2008;1:54.

World Health Organisation. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Genf, 2000.

Wynick D, Small CJ, Bacon A, et al. Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:12671–6.

Xiao B, Jing C, Wilson JR, et al. Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. Nature 2003;421:652-56.

Xu AW, Kaelin CB, Morton GJ, et al. Effects of hypothalamic neurodegenerationon energy balance. PLoS Biol 2005;3:e415.

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. Nat Med 1999;5:1066-70.

Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Dev Cell 2002;2:489–95.

Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular Neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. Endocrinology 1993;133:1753-58.

Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21Cip1 promoter. Mol Cell Biol 2003;23:4056-65.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Plagemann, Leiter der Arbeitsgruppe für Experimentelle Geburtsmedizin an der Klinik für Geburtsmedizin, CVK, Charité, für die freundliche Überlassung des Themas und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen.

Herrn Dr. T. Harder, stellvertretender Leiter der Arbeitsgruppe für Experimentelle Geburtsmedizin, möchte ich für die ausgezeichnete und geduldvolle Betreuung danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J.-W. Dudenhausen, Direktor der Kliniken für Geburtsmedizin der Charité, für seine freundliche Unterstützung.

Für die geduldvolle Einarbeitung in die Methoden der Molekularbiologie bin ich Herrn T. Ziska aus der Arbeitsgruppe für Experimentelle Geburtsmedizin und Frau Dr. A. Harder aus dem Institut für Neuropathologie der Charité sehr dankbar.

Frau Dr. E. Rodekamp danke ich herzlich für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der RT-PCR.

Ebenso möchte ich mich bei Frau U. Schramme und Frau K. Melchior für die wertvolle Unterstützung bei den Tierexperimenten bedanken.

Eigene Veröffentlichungen

Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. Hypothalamic POMC promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. J Physiol 2009;Epub ahead of print:doi 10.1113/jphysiol.2009.176156.

Zitierfähige Kongreßbeiträge

Roepke K, Brunn M, Ziska T, Harder A, Harder T, Rodekamp E, Dudenhausen JW, Plagemann A. Etablierung einer Methode zur Ermittlung des Methylierungsstatus von Neuropeptidpromotoren im Hypothalamus neugeborener Ratten. Z Geburtsh Neonatol 2005;209:S80.

Roepke K, Brunn M, Ziska T, Harder A, Harder T, Rodekamp E, Dudenhausen JW, Plagemann A. Etablierung einer Methode: Ermittlung des Methylierungsstatus von Neuropeptidpromotoren im Hypothalamus neugeborener Ratten. Diabetologie 1 2006:S164.

Abkürzungsverzeichnis

AgRP	Agouti-Related Protein
α-MSH	alpha-Melanozytenstimulierendes Hormon
AP1	Activator Protein 1
AP2	Activator Protein 2
ARC	Nucleus arcuatus hypothalami
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRE	cAMP-Responsive-Element
DMN	Nucleus dorsomedialis (hypothalami)
DNMT	DNA-Methyltransferase
IRS1	Insulinrezeptor-Substrat
LT	Lebenstag
MC-4	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin-Concentrating Hormone
NPY	Neuropeptid Y
NGFI-A	Nerve Growth Factor-Inducible Protein A
NGF-RE	Nerve Growth Factor-Response Element
PI3K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
POMC	Proopiomelanocortin
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PVN	Nucleus paraventrikularis (hypothalami)
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
SP1	Spezifisches Protein 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Matthias Brunn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „DNA-Methylierung des Neuropeptid Y-Genpromotors im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“