

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einführung.....	9
1.1 Übergewicht und das metabolische Syndrom	9
1.2 Vom Tierexperiment zur Hypothese der perinatalen Programmierung.....	11
1.3 Die Bedeutung des Hypothalamus im Regelkreis von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht.....	13
1.4 Die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus einer dauerhaft veränderten Genexpression	14
1.5 Das Proopiomelanocortin-Gen.....	18
1.6 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Tiermaterial und Tierhaltung	22
2.2 Experimentalmodell	22
2.3 Bestimmung von Körpermasse und Körperlänge	22
2.4 Tötung, Entnahme von Blut und Organen, Körperfettbestimmung.....	22
2.5 Bestimmung der Blutglukose und von Insulin und Leptin im Plasma.....	23
2.5.1 Blutglukose	23
2.5.2 Insulin	23
2.5.3 Leptin.....	24
2.6 Gewinnung von DNA und RNA aus dem Hypothalamus.....	24
2.6.1 Präparation und Homogenisierung des Hypothalamus.....	24
2.6.2 Extraktion der DNA.....	25
2.6.3 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der DNA.....	26
2.7 Methylierungsanalyse.....	26
2.7.1 Restriktionsverdau und Fällung der DNA	27
2.7.2 Modifizierung der DNA durch die Bisulfitbehandlung.....	27
2.7.2.1 Prinzip der Bisulfitreaktion	27
2.7.2.2 Durchführung der Bisulfitmodifikation	28
2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.7.3.1 Kontroll-PCR I.....	29
2.7.3.2 Kontroll-PCR II.....	30
2.7.3.3 Amplifikation der POMC-Promotorregion	31
2.7.3.4 Isolierung und Aufreinigung der DNA	32
2.7.4 Ligation und Klonierung der PCR-Produkte	32
2.7.4.1 Synthese von A-Überhängen.....	33
2.7.4.2 Ligation	33

2.7.4.3	Transformation und Klonierung.....	34
2.7.5	Extraktion und Kontrolle der Plasmide	34
2.7.5.1	Plasmidextraktion.....	34
2.7.5.2	Kontrolle durch Restriktionsspaltung.....	35
2.7.6	Sequenzierungsanalyse	35
2.7.6.1	Amplifikation des Plasmidinserts.....	36
2.7.6.2	Sequenzierungs-PCR.....	37
2.7.6.3	Analyse des PCR-Produkts	38
2.8	Bestimmung der mRNA-Expression durch RT-PCR.....	38
2.8.1	Extraktion der RNA	38
2.8.2	Synthese der cDNA	38
2.8.3	PCR.....	39
2.8.4	Auswertung.....	40
2.9	Morphometrische Untersuchungen des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC).....	40
2.9.1	Konventionelle und immunhistochemische Färbung der Gehirnschnitte.....	40
2.9.2	Neuromorphometrische Untersuchung des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC) ...	41
2.10	Statistik.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Biometrische Parameter	42
3.1.1	Körpergewicht, Körperlänge, Körperfettanteil.....	42
3.2	Stoffwechselfparameter	44
3.2.1	Blutglukose am 21. LT	44
3.2.2	Plasmainsulin am 21. LT	45
3.2.3	Insulin-Glukose-Ratio am 21. LT	46
3.2.4	Plasmaleptin am 21. LT	46
3.3	Expression der mRNA von POMC	47
3.4	Morphometrie des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC).....	49
3.5	Methylierungsstatus	50
3.5.1	Gruppenvergleiche.....	51
3.5.1.1	CpG-Stellen.....	51
3.5.1.2	3.5.1.2 Transkriptionsfaktoren	52
3.5.2	Korrelationen	56
3.5.2.1	Korrelation zwischen Promotormethylierung und Genexpression	56
3.5.2.2	Korrelation zwischen Promotormethylierung und biometrischen Parametern	58
3.5.2.3	Korrelation zwischen Promotormethylierung und Stoffwechselfparametern ...	58
4	Diskussion	60
4.1	Der Phänotyp neonatal überernährter Ratten	60
4.2	Die Fehlregulation des anorexigenen Neuropeptids POMC	61
4.3	Das Methylierungsmuster des hypothalamischen POMC-Promotors.....	62
4.3.1	Methylierungsalterationen innerhalb der Bindungsstelle von Nf-κB	64

4.3.2	Methylierungsalterationen stromaufwärts der Bindungsstelle von Sp1	67
4.3.3	Methylierungsalterationen innerhalb des nGRE	69
4.4	Mechanismen epigenetischer Programmierung durch Aufzucht in kleinen Würfeln ...	70
4.4.1	Epigenetische Programmierung durch Methylgruppendonatoren	71
4.4.2	Epigenetische Programmierung durch Hyperglykämie	73
4.4.3	Rolle der Methyltransferasen	74
4.4.4	Epigenetische Programmierung durch intrazelluläre Signalkaskaden.....	76
4.4.5	Epigenetische Programmierung durch Glukokortikoide	77
4.5	Limitierungen der Methodik	79
4.6	Ausblick	81
5	Zusammenfassung.....	83
	Literaturverzeichnis.....	86
	Publikationsliste	111
	Danksagung.....	112
	Erklärung.....	113

Abkürzungsverzeichnis

AgRP	Agouti Related Peptide (Neuropeptid)
AMPK	cAMP-aktivierte Proteinkinase (PKA)
α -MSH	alpha-melanozytenstimulierendes Hormon (Neuropeptid)
AP1	Activator Protein 1 (Transkriptionsfaktor)
AP2	Activator Protein 2 (Transkriptionsfaktor)
ARC	Nucleus arcuatus hypothalami (Hypothalamuskern)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
Brn 3.0	Transkriptionsfaktor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CART	Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (Neuropeptid)
CBP	CREB-Bindungsprotein
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon (Neuropeptid)
CREB	cAMP-Response Element-Binding (Transkriptionsfaktor)
CpG	Cytosine, auf welche direkt ein Guanin in der DNA-Basensequenz folgt
DNMT	DNA-Methyltransferase
E-Box	Transkriptionsfaktor, der an die DNA-Basensequenz CACGTG bindet
HAT	Histonazetyltransferase
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht

KL	Körperlänge
KW	Kleiner Wurf
LGA	Large for gestational age
LH	Nucleus lateralis hypothalami (Hypothalamuskern)
LT	Lebenstag
MRE	Metallothion-Response Element (Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors)
MBD	sowie MeCP: Methyl-CpG-Binding Domain Protein (Familie von Zellkernproteinen)
Nf- κ B	Nuklearfaktor- κ B (Transkriptionsfaktor)
nGRE	negative Glukokortikoid-Responsive Element (Bindungsstelle des Glukokortikoidrezeptors)
NPY	Neuropeptid Y (Neuropeptid)
NUR	Nuclear Receptor Subfamily (Familie von Transkriptionsfaktoren)
NW	Normaler Wurf
Ob-Rb	Leptinrezeptor-Isoform b
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCRH-RE	POMC-CRH-Responsive Element (Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors)
PI-3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PO-B	POMC-spezifischer Transkriptionsfaktor
POMC	Proopiomelanocortin (Neuropeptid)
PP1	Putative Pituitary POMC 1 (Transkriptionsfaktor)

Ptx1	Transkriptionsfaktor
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami (Hypothalamuskern)
SAH	S-Adenosylhomozystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transkriptionsfaktor)
Sp1	Signalprotein 1 (Transkriptionsfaktor)
THF	Tetrahydrofolsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
T-Box	Gruppe von Transkriptionsfaktoren
T-pit	Transkriptionsfaktor aus der T-Box-Familie
TRE	Thyroid Hormone Response Element (Bindungsstelle des Thyroidrezeptors)
VMN	Nucleus ventromedialis hypothalami (Hypothalamuskern)

1 Einführung

1.1 Übergewicht und das metabolische Syndrom

Übergewicht und Adipositas sind ein weltweites Gesundheitsproblem und haben in den letzten Jahren epidemische Ausmaße angenommen. In den USA stieg der Anteil adipöser Männer (mit einem Body-Mass-Index über 30 kg/m^2) von 27,5 Prozent im Jahr 1999 auf 31 Prozent im Jahr 2003. Die Prävalenz extremer Adipositas ($\text{BMI} \geq 40$) lag 2003 bei 2,8 Prozent in der männlichen Bevölkerung und bei 7 Prozent in der weiblichen. Beunruhigenderweise ist dieser Trend bereits im Kindesalter sichtbar: Zwischen 1999 und 2004 stieg der Anteil adipöser Kinder und Jugendlichen in den USA von knapp 14 auf 16 Prozent bei den Mädchen und auf über 18 Prozent bei den Jungen (Ogden et al. 2006). Auch in Deutschland herrscht ein vergleichbarer Zustand: In den letzten 20 Jahren stieg der Prozentsatz adipöser Männer und Frauen deutlich an. Zurzeit sind ungefähr 70 Prozent der deutschen Männer und 50 Prozent der Frauen übergewichtig oder adipös (Mensink et al. 2005). Allein in der Gruppe der fünf- bis siebenjährigen Kinder zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Übergewichtsprävalenz zwischen 1991 und 2000 von 10 auf 17,5 Prozent in den ostdeutschen Bundesländern und von knapp 15 auf über 22 Prozent in den westlichen (Apfelbacher et al. 2008). Nach Ergebnissen des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits-surveys (KiGGS) beträgt die Verbreitung von Adipositas bei den 3- bis 6-Jährigen knapp 3 Prozent und steigt über 6 Prozent bei den 7- bis 10-Jährigen bis auf knapp 9 Prozent bei den 14- bis 17-Jährigen (Kurth und Schaffrath Rosario 2007).

Bekanntermaßen ist eine Anzahl von Folgekrankheiten mit Übergewicht bzw. Adipositas assoziiert (Übersicht z.B. bei Bray und Bellanger 2006). So ist im Allgemeinen die Lebensdauer verkürzt und nimmt das Risiko einen plötzlichen Herztod oder Schlaganfall zu erleiden zu (Thompson et al. 1999). Adipositas ist der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes, eines arteriellen Hypertonus, einer Hypercholesterinämie, für Asthma und Arthritis (Mokdad et al. 2003). Des Weiteren ist das Risiko für Gallenblasenerkrankungen, Schlafapnoe und bestimmte Tumoren erhöht. An erster Stelle steht jedoch die Entwicklung eines metabolischen Syndroms, da bereits im Kindes- und Jugendalter Teile dieses Symptomenkomplexes bei adipösen Heranwachsenden nachzuweisen sind, wie unter anderem die regelmäßigen Veröffentlichungen von Ergebnissen des amerikanischen National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) zeigen (Johnson et al. 2009). Die WHO definiert das Metabolische Syndrom wie

folgt: Erstens muss eine Insulinresistenz vorliegen, entweder als manifester Diabetes mellitus Typ 2 oder als gestörte Glukosetoleranz oder erhöhte Fastenglukose. Zweitens müssen mindestens zwei der folgenden fünf Bedingungen vorliegen: Arterielle Hypertonie (≥ 140 mmHg systolisch oder ≥ 90 mmHg diastolisch), Plasmatriglyzeride ≥ 150 mg/dL ($\geq 1,7$ mmol/L) und/oder HDL-Cholesterol < 35 mg/dL ($< 0,9$ mmol/L) bei Männern bzw. < 39 mg/dL (1,0 mmol/L) bei Frauen, BMI > 30 kg/m² und/oder Taillen/Hüftumfang $> 0,9$ bei Männern bzw. $> 0,85$ bei Frauen, Albuminausscheidung ≥ 20 µg/min oder Albumin/Kreatinin ≥ 30 mg/g (Alberti et al. 1998).

Angesichts der erhöhten Prävalenzraten für Adipositas über alle Altersklassen hinweg ist es bemerkenswert, dass sich darüberhinaus das Geburtsgewicht der in den letzten zwanzig Jahren in den Industriestaaten geborenen Kinder stetig erhöht hat (Ananth und Wen 2002). LGA-Neugeborene (Large-for-gestational-age) haben ein signifikant erhöhtes Risiko bereits im Kindesalter ein metabolisches Syndrom zu entwickeln (Boney et al. 2005). Hinsichtlich der Eindämmung der Übergewichtsepidemie im Sinne einer Primärprävention ist es von besonderer Bedeutung die ursächlichen Faktoren für diese demographische Entwicklung zu finden. Da sich der Bevölkerungsquerschnitt innerhalb einer so kurzen Zeitspanne in Richtung eines übergewichtigen Phänotyps entwickelt hat, liegt die Vermutung nahe, dass die Ursache keine genetische sein kann, sondern vielmehr Umweltbedingungen hierfür verantwortlich sind. Da bereits Neugeborene betroffen sind, können nicht allein mangelnde physische Aktivität oder der übermäßige Genuss kalorienreicher und hochverarbeiteter Nahrungsmittel Grund für die dramatische Zunahme des kindlichen und adulten Übergewichts sein, wie teilweise diskutiert wird (z.B. Sothern 2004).

Bereits während der Schwangerschaft hat der metabolische Zustand der Mutter Einfluss auf die Entwicklung des kindlichen Körpergewichts. Assoziiert mit einem erhöhten Geburtsgewicht des Kindes sind nachgewiesenermaßen eine (präexistente) Adipositas der Mutter (Cedergren 2004), der mütterliche (Gestations-)Diabetes (Crowther et al. 2005, Günther et al. 2006, HAPO-Studie 2008), sowie die übermäßige Gewichtszunahme in der Schwangerschaft (Bergmann et al. 2003). Das erhöhte Geburtsgewicht wiederum korreliert mit dem späteren Gewicht der Kinder (Sorensen et al. 1997) und mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (Curhan et al. 1996, Harder et al. 2007).

Von ebenfalls großer Bedeutung scheint die Ernährung des Kindes in der Neonatalperiode zu sein. Eine hohe Gewichtszunahme in den ersten drei Lebensmonaten bzw. in der ersten Lebenswoche korreliert positiv mit dem Adipositasrisiko im Erwachsenenalter (Dörner et al. 1976, Stettler et al. 2005). Säuglinge, die mit Formulamilch ernährt werden, weisen am Ende des ersten Lebensjahres höhere Körpergewichte auf als gestillte Kinder (Dewey et al. 1993). Wie eine Metaanalyse unserer Arbeitsgruppe zeigt, führt Stillen zu einer Senkung des Übergewichtsrisikos im späteren Kindes- oder Erwachsenenalters um im Mittel 25 Prozent (Harder et al. 2005). Hierbei besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung in den ersten 9 Stillmonaten: Jeder Monat Muttermilchernährung reduziert das Übergewichtsrisiko um 4 Prozent. Auch die Gefahr der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen oder eines Diabetes mellitus wird durch Stillen positiv beeinflusst (Owen et al. 2006). Erste Ergebnisse des „European Childhood Obesity Projects“, einer randomisierten, doppelblinden Interventionsstudie an über eintausend Kindern in fünf europäischen Ländern, machen den höheren Proteingehalt der Formulaernährung gegenüber Muttermilch verantwortlich für die höhere Gewichtszunahme in den ersten zwei Lebensjahren von Kindern, die mit Flaschenmilch ernährt wurden (Koletzko et al. 2009).

1.2 Vom Tierexperiment zur Hypothese der perinatalen Programmierung

Die oben genannten klinisch-epidemiologischen Erkenntnisse gaben und geben Anlass zu tierexperimentellen Studien zum Einfluss der neonatalen Ernährung auf die Entwicklung von Übergewicht und des metabolischen Syndroms. Erfahrungen auch unserer Arbeitsgruppe liegen bezüglich des Tiermodells der „kleinen Würfe“ (KW) vor. In diesem Modell wird bei Ratten eine neonatale Überernährung induziert, indem die primäre Wurfgröße von 10-12 Tieren auf 3-4 Neugeborene pro Nest reduziert wird. Die Hyperphagie der Rattennachkommen persistiert bis ins adulte Alter (Oscari und McGarr 1978, Voits et al. 1996) und führt zu juveniler (Faust et al. 1980) und lebenslanger Adipositas (Plagemann et al. 1992, Waterland und Garza 2002). In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Ratten aus kleinen Würfen im Erwachsenenalter einen Symptomenkomplex aus gestörter Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Hypertriglyzeridämie und arteriellem Hypertonus entwickeln, der dem metabolischen Syndrom des Menschen ähnelt (Plagemann et al. 1999a). Bestätigt wurden diese Ergebnisse unter anderem von einer französischen Forschungsgruppe (Boullu-Ciocca et al. 2005).

Die neonatale Überernährung führte demnach zu einer dauerhaften „Fehlprägung“ der (neuroendokrinen) Regulation von Nahrungsaufnahme, Körpergewicht und Stoffwechsel. Für diese gesundheitlichen Langzeitauswirkungen der frühkindlichen Ernährung fand Lucas den Begriff der „ernährungsbedingten Programmierung“. Der Begriff der Programmierung beschreibt dabei einen Prozess, bei dem ein Stimulus oder Insult während einer kritischen Entwicklungsphase des Organismus eine signifikante lebenslange Auswirkung auf dessen Funktion bewirkt (Lucas 1991).

Abgesehen von der neonatalen Ernährung sind jedoch viele weitere Einflußfaktoren denkbar, die den Organismus dauerhaft programmieren und so zu Fehlfunktionen bzw. chronischen Erkrankungen führen können. In den internationalen Diskurs gelangte die Thematik durch die Arbeitsgruppe um Hales und Barker, welche einen Zusammenhang feststellten zwischen dem Risiko im späteren Leben ein metabolisches Syndrom, einen Typ-2-Diabetes oder eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln und einem niedrigen Geburtsgewicht als Folge pränataler Unterernährung (Hales und Barker 1992, Barker 1995). Sie setzten für Phänomene dieser Art den Terminus der „fetalen Programmierung“ durch (Hales und Barker 1992).

Programmierung setzt ein plastisches und sensitives System voraus, das in einem umschriebenen Entwicklungsstadium in seiner künftigen Funktionsweise geprägt werden kann (Plagemann 2004). Das neuroendokrine System ist ein solch plastisches System, dessen Komponenten in der Fetal- und teilweise auch in der Neonatalzeit unreif sind. Insbesondere die Differenzierung des Gehirns ist zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen. Die Quantität von Hormonen und Neurotransmittern determiniert während dieses sensiblen Zeitfensters die Nervenzellreifung und die interneuronalen Verknüpfungen. Auf diese Weise werden Sollwerte generiert bzw. vorprogrammiert, mit deren Hilfe nach der Differenzierungsphase lebenslang innerhalb des Regelkreises von z.B. Nahrungsaufnahme und Energiebalance der homöostatische Istzustand abgeglichen und angepasst wird. Liegen Hormone während der kritischen Zeitfenster in anormalen Konzentrationen vor, so wird das Regelsystem fehlprogrammiert, was zu einer permanenten Fehlfunktion desselben führt. Für derartige Prozesse der Beeinflussung neuroendokriner Regelkreise durch „Teratogene“ wie beispielsweise unphysiologischen Hormonkonzentrationen prägte erstmals 1974 Dörner den Begriff der „funktionellen Teratogenese“ (Dörner 1974). Den Effekt dauerhafter Fehlfunktion eines Organismus durch Veränderungen des fetalen Milieus benannte er bereits damals als intrauterine Programmierung. Dörner begründete damit ein Konzept über

die Entstehung von Krankheitsdispositionen, welches in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts durch Barker zu internationalem Durchbruch fand und seitdem ein expandierendes Feld der Forschung darstellt.

1.3 Die Bedeutung des Hypothalamus im Regelkreis von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht

Die Energiebalance des Körpers wird durch ein neuroendokrines Rückkopplungsnetzwerk reguliert, welches prinzipiell aus den drei Komponenten Afferenz, zentralnervöses Steuerungssystem und Efferenz besteht. Afferente neuronale und hormonelle Signale wie z.B. Vagusaktivität, Insulin und Leptin werden im Magen-Darmtrakt, von Pankreas, Leber und Fettgewebe generiert und freigesetzt. Sie gelangen zum Hypothalamus, dem zentralen Steuerungsorgan aller vegetativen und der meisten endokrinen Prozesse des Organismus. Verschiedene Kerngebiete sind dort beteiligt an der Integration von peripheren Sättigungssignalen und von neuronalen Impulsen, die aus dem Hirnstamm, dem limbischen System aber auch aus höheren Kortexarealen stammen. Die Nervenzellen im Nucleus arcuatus hypothalami (ARC) tragen auf ihrer Zelloberfläche u. a. Insulin- und Leptinrezeptoren und produzieren Neuropeptide, welche die Nahrungsaufnahme stimulieren oder hemmen (also orexigen bzw. anorexigen wirken).

Auf diese Weise senkt das Fettgewebshormon Leptin zum Beispiel die Expression und Freisetzung von Neuropeptid Y (NPY) im ARC (Wang et al. 1997). NPY ist das stärkste bekannte orexigene Signal. NPY-produzierende Neurone projizieren in Kerngebiete, die als Sättigungs- bzw. Hungerzentren des Hypothalamus gelten, namentlich in den ventromedialen (VMH), lateralen (LH) und paraventriculären (PVN) Kern, und stimulieren dort Vorgänge, die zu erhöhtem Appetit und verstärkter Nahrungsaufnahme führen (Stanley et al. 1984).

Dem gegenüber stehen anorexigene Peptide wie CRH, CART und vor allem α -melanozytenstimulierendes Hormon (α -MSH, auch Melanocortin genannt). Letzteres ist ein Spaltprodukt von Proopiomelanocortin (POMC), welches ausschließlich in Neuronen des Nucleus arcuatus hypothalami synthetisiert wird (Finley et al. 1981, Smith und Funder 1988, Cone 2005). Leptin induziert im ARC die Synthese von POMC und die Freisetzung von α -MSH (Schwartz et al. 1997). Seine Wirkung entfaltet Melanocortin in paraventriculären und lateralen Kernen des Hypothalamus, indem durch Bindung an MC4-Rezeptoren die Nahrungsaufnahme inhibiert wird (Huszar et al. 1997).

Die Neurone des ARC, PVN und LH projizieren in den Nucleus tractus solitarius in der Medulla oblongata (Übersicht z.B. bei Blevins und Baskin 2010). Dort werden die orexigenen und anorexigenen Signale aus dem Hypothalamus übersetzt in die Aktivitätsmuster des autonomen Nervensystems, welches den efferenten Schenkel des Regelkreises der Energiebalance darstellt. Stimulation des Sympathikus führt zu erhöhtem Energieverbrauch durch Thermogenese und zur Induktion kataboler Stoffwechselfvorgänge wie der Lipolyse, wohingegen der Parasympathikus (N. Vagus) Verdauung und anabole Prozesse z. B. über vermehrte Insulinfreisetzung fördert, also eher zur Speicherung von Energie beiträgt.

Tiere, die aufgrund einer Aufzucht im kleinen Wurf neonatal überernährt wurden, weisen erhöhte Spiegel der Sättigungsparameter Insulin und Leptin auf (Plagemann et al. 1999a). Dies müsste physiologisch mit einer verminderten Expression des orexigenen Neuropeptid Y und einer erhöhten Expression des anorexigenen Proopiomelanocortins im Hypothalamus einhergehen. Im Widerspruch dazu konnte von unserer Arbeitsgruppe mittels RIA und Immunzytochemie gezeigt werden, dass sich die NPY-Expression bei neonatal überernährten Ratten nicht von der normalernährter Ratten unterscheidet (Plagemann et al. 1999b). Dies spricht für eine erworbene Resistenz der NPY-Neuronen gegenüber Leptin. Die physiologische Expression des Neuropeptids wurde durch die Hyperleptinämie während der Differenzierungsperiode sozusagen „fehlprogrammiert“. Im Folgenden soll daher ein molekularer Mechanismus näher beleuchtet werden, durch den eine Programmierung der Genexpression prinzipiell möglich wäre, die zu einer dauerhaften Prägung von Stoffwechselprozessen führen könnte.

1.4 Die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus einer dauerhaft veränderten Genexpression

Mehrere Komponenten sind an der Regulation der Genexpression beteiligt: Ubiquitäre Transkriptionsfaktoren werden benötigt, um die Bindung der RNA-Polymerase an den Genpromotor zu stabilisieren und durch ihre Funktion als Histonazetylasen oder -deazetylasen den Zugang zu den entsprechenden Genabschnitten zu ermöglichen bzw. zu verhindern (Übersicht z.B. bei Gill 2001). Des Weiteren finden sich genspezifische Regulatorproteine, welche als Aktivatoren oder Repressoren der Transkription wirken. Sie binden an spezifischen DNA-Sequenzen innerhalb des Promotors oder an sogenannten Enhancer-Sequenzen, die oft einige tausend Basenpaare entfernt von dem Gen liegen können, dessen Expression sie beeinflussen. Diese

Genregulatorproteine arbeiten zusammen, das heißt jedes einzelne ist dabei wichtig. Ihre verschiedenen Wirkungen summieren sich zum endgültigen Expressionsniveau des Gens auf. Die Aktivatoren/Repressoren selbst werden wiederum beeinflusst von den Bedingungen, die in der Zelle und letztlich im Körper herrschen. Ihre Freisetzung ist zum Beispiel abhängig von der Bindung eines Proteins an seinen Rezeptor, von der Öffnung eines Ionenkanals oder von einer enzymatischen Aktivität (Whiteside und Goodbourn 1993). Nur so kann gewährleistet werden, dass das richtige Gen in der richtigen Zelle zur rechten Zeit und in der benötigten Menge als Antwort auf bestimmte veränderte Umweltbedingungen transkribiert wird. Dieser prinzipielle Mechanismus der Genregulation wirkt kurzfristig und kann daher nicht erklären, wie es zu dauerhaften Veränderungen des Expressionszustandes von Genen kommt.

Somatische Mutationen der DNA-Sequenz können die Originalsequenz des Promotors in der Art verändern, dass Transkriptionsfaktoren, Aktivatoren oder Repressoren nicht mehr binden können und die Polymerase die RNA-Synthese nicht startet, vorzeitig abbricht oder aber auch gar nicht mehr stoppt. Solche Mutationen sind jedoch sehr selten und die meisten bleibenden Zustände veränderter Genexpression sind nicht bei Geburt schon vorhanden, sondern werden im Laufe des Lebens erst erworben, wie zum Beispiel bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen (Übersicht z.B. bei Velculescu 2008).

Es ist daher wahrscheinlich, dass dem Phänomen erworbener und dauerhaft veränderter Genexpression epigenetische Mechanismen zugrunde liegen. Der Begriff der Epigenetik wurde im Jahr 1942 von Waddington eingeführt. Die Epigenetik galt dem Studium der Interaktionen von Genen mit ihrer Umwelt und der Art und Weise, wie diese Wechselwirkungen den Phänotyp eines Organismus prägen (Waddington 1942). Seit den Neunzigerjahren beschreibt die Epigenetik Veränderungen der Genfunktion, welche vererbbar sind, aber nicht durch Änderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können (Russo et al. 1996).

Der bekannteste epigenetische Mechanismus ist die DNA-Methylierung, das heißt die kovalente Bindung einer 5'-Methylgruppe an das fünfte Kohlenstoffatom der Base Cytosin (Holliday 1987). 5'-Methylcytosin findet sich bei Wirbeltieren vorwiegend als sogenanntes CpG-Dinukleotid gepaart mit Guanin, mit welchem es über eine Phosphatgruppe verbunden ist. Diese CpG-Dinukleotide sind in weiten Genomteilen unterrepräsentiert. Diejenigen DNA-Abschnitte, in denen sie in größerer Häufigkeit auftreten, werden CpG-Inseln genannt (Larsen et al. 1992).

Nach der aktuellen Definition (Takai et al. 2002) muss eine CpG-Insel eine minimale Länge von 500 Basenpaaren und einen GC-Anteil von mindestens 55 Prozent haben sowie einen Quotienten von mindestens 0,6 von beobachteten zu erwarteten CpG-Dinukleotiden aufweisen. CpG-Inseln befinden sich zumeist am 5'-Ende von kodierenden Gensequenzen des Menschen, also genau dort, wo in den meisten Fällen der Promotor lokalisiert ist (Bird 1986) und Transkriptionsfaktoren bzw. regulatorische Proteine binden (Cuadrado et al. 2001). Die Mehrheit der CpG-Inseln im menschlichen Genom sind unmethyliert und bleiben es auch unabhängig vom Expressionzustand des dazugehörigen Gens (Antequera et al. 1990). Andere werden im Verlauf der Keimzell- oder frühen Embryonalentwicklung vollständig methyliert (Monk et al. 1987), was zu einer kompletten Stilllegung des Promotors und Gens führt. Auf diese Weise funktionieren das sogenannte „Genomische Imprinting“ (Reik und Surani 1989) und die Inaktivierung des X-Chromosoms (Monk und Grant 1990). Aber auch in adulten somatischen Zellen kann es zu einer fortschreitenden Methylierung von CpG-Inseln kommen, wie es zum Beispiel in bestimmten Geweben während des Alterungsprozesses (Ahuja und Issa 2000) oder in Kulturzelllinien (Jones et al. 1990) gezeigt werden konnte.

Es liegen inzwischen einige Belege dafür vor, dass eine erhöhte CpG-Methylierung eine verminderte Expression des nachgeschalteten Gens bewirkt (Andria et al. 1999, Weber et al. 2007, Deaton und Bird 2011). Vor allem In-vitro-Studien konnten zeigen, wie die Gentranskription gehemmt wird in Abhängigkeit von der Dichte und der Position methylierter CpG-Dinukleotide im Promotor (Boyes und Bird 1992). Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, auf welche Art und Weise diese Repression zustande kommt: Zum einen kann das Vorhandensein einer Methylgruppe innerhalb einer regulatorischen Gensequenz direkt die Bindung eines Transkriptionsfaktors oder eines anderen Aktivators verhindern. Für diese These spricht, dass viele Regulatorproteine bekannt sind, die an CpG-haltige DNA-Sequenzen binden, und dass einige von diesen nicht mehr binden können, wenn die CpG-Dinukleotide Methylgruppen tragen (z. B. STAT3: Chen et al. 2000, Takizawa et al. 2001; z. B. Nf-κB: Bednarik et al. 1991). Darüber hinaus wurde für den Transkriptionsaktivator Signalprotein 1 (Sp1) beschrieben, dass CpG-Methylierungen außerhalb der eigentlichen Bindungsstelle von Sp1 dessen Anlagerung an die DNA zu verhindern vermögen (Clark et al. 1997, Zhu et al. 2003). Eine andere Theorie erklärt die transkriptionshemmende Wirkung von CpG-Methylierungen mit dem Vorhandensein von sogenannten MBDs bzw. MeCPs, d. h. Methyl-CpG-bindenden Proteinen, welche an methylierte DNA binden und die Transkription behindern (Kudo 1998, Ng et al. 2000).

Welcher Mechanismus auch immer der veränderten Genexpression durch Methylierung zugrunde liegt, prinzipiell sind die während der Zelldifferenzierung entstehenden DNA-Methylierungsmuster gewebespezifisch, d.h. die CpG-Sequenzen von Genen ohne CpG-Insel werden in den meisten Geweben methyliert, während in exprimierenden Geweben dieselben CpG-Dinukleotide unmethyliert vorliegen (Newell-Price et al. 2001, Ohgane et al. 2008). Während der Embryonalzeit kommt es nach einer kompletten Demethylierung der chromosomalen DNA zur gewebespezifischen de novo Methylierung durch die DNA-Methyltransferase DNMT3 (Razin und Shemer 1995). Der auf diese Weise festgelegte Methylierungsstatus wird bei den folgenden Zellteilungen unter Vermittlung der DNMT1 auf die DNA der Tochterzellen übertragen und so aufrechterhalten (Bestor 2000). Wenn demnach während der Entwicklung des Organismus die Expression eines Gens durch CpG-Methylierung verändert wird, so vererbt sich dieses Methylierungs- und Expressionsmuster auf alle folgenden Zellgenerationen.

Die DNA-Methyltransferasen sind wie alle Enzyme von dem sie umgebenden Milieu abhängig und durch verschiedenste Stoffwechselmetabolite induzierbar, z. B. durch die Verfügbarkeit von Methylgruppen (Rees et al. 2000). So konnte bereits 1998 an der sogenannten „viable yellow“ Maus ($A^{vy/a}$) gezeigt werden, dass eine mit Methylgruppen angereicherte Ernährung von Mäusermüttern zu einer vermehrten DNA-Methylierung des Agouti-Genlocus bei den Nachkommen führte (Wolff et al. 1998). Die Methylierung betraf CpG-Stellen eines Transposons innerhalb des Agoutigens und beeinflusste den Phänotyp der Mäuse hinsichtlich Felltönung und Morbidität (Waterland und Jirtle 2003). Lillycrop und Kollegen führten eine aufschlussreiche Methylierungsstudie an Rattennachkommen durch, deren Mütter während der Trächtigkeit eine proteinreduzierte Ernährung erhalten hatten. Der Arbeitsgruppe gelang es, in der Leber der Rattenneonaten eine Reduktion der Promotormethylierung im Glukokortikoidrezeptorgen sowie eine erhöhte Glukokortikoidrezeptorexpression festzustellen. Des Weiteren fanden sie eine erniedrigte Expression der Methyltransferase DNMT 1 (Lillycrop et al. 2007). Eine andere Arbeitsgruppe konnte an Schafen zeigen, dass die Restriktion von Methylendonatoren wie Methionin, Vitamin B12 und Folsäure in der Nahrung der weiblichen Tiere während der Konzeption zu einem veränderten Methylierungsstatus bei den Nachkommen führte. Von den im fetalen Gewebe untersuchten 1400 CpG-Inseln wiesen 4 Prozent solche Methylierungsveränderungen auf. Die Nachkommen entwickelten darüber hinaus eine Adipositas, eine Insulinresistenz und einen arteriellen Hypertonus (Sinclair et al. 2007). Eine weitere aufsehenerregende Studie an Honigbienen gibt Einblicke, wie ernährungsabhängig - durch DNA-Methylierung - der Reproduktionsstatus

von Honigbienen gesteuert wird: Normalerweise entwickeln sich aus Bienenlarven nur dann reproduktionsfähige Königinnen, wenn sie mit sogenanntem „Gelee Royal“ gefüttert werden. Interessanterweise zeigt die DNA von Königinnen und Arbeiterinnen unterschiedliche Methylierungsmuster. Die Vermutung lag nahe, dass Methylierungsunterschiede den Phänotyp bedingen. Durch Ausschaltung der Expression der Methyltransferase DNMT3 in den Larven, gelang es der Arbeitsgruppe um Maleszka, ebenfalls reproduktionsfähige Königinnen heranzuziehen (Kucharski et al. 2008). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass in der nachfolgenden Methylierungsstudie signifikante Unterschiede in der Cytosinmethylierung zwischen Arbeiterinnen und Königinnen gefunden wurden - bei über 550 Genen aus den Gehirnen der Honigbiene (Lyko et al. 2010).

Dies sind eindrucksvolle Beispiele für den vermuteten Zusammenhang zwischen Ernährung, DNA-Methylierung und Genexpression. Es existieren darüber hinaus Hinweise, dass auch die Art des mütterlichen Verhaltens gegenüber den Nachkommen deren Genexpression direkt über veränderte CpG-Methylierung beeinflusst. So wiesen die Jungtiere von Rattenmüttern, die sich im Vergleich besonders intensiv um die Brutpflege kümmerten, eine signifikant erniedrigte CpG-Methylierung innerhalb der Bindungsstelle eines Transkriptionsfaktors des Glukokortikoidrezeptorgens im Hippocampus auf, was mit erhöhter Expression des Gens einherging (Weaver et al. 2004).

Auf eine ähnliche Weise könnte auch neonatale Überernährung zu einem veränderten Methylierungszustand innerhalb der regulativen Regionen von Neuropeptiden führen. Nachdem unsere Arbeitsgruppe im Hypothalamus überernährter Ratten bereits den Genpromotor des stärksten orexigenen Neuropeptids NPY einer Methylierungsanalyse unterzogen hatte (Plagemann et al. 2009, Brunn 2010), interessierte uns nun dessen anorexigener Gegenspieler – das Proopiomelanocortin, kurz POMC.

1.5 Das Proopiomelanocortin-Gen

Wie beim Menschen ist auch bei der Ratte das Gen, welches für Proopiomelanocortin (POMC) codiert, ungefähr 6 Kilobasenpaare lang und besteht aus 3 Exons (Drouin et al. 1985). Eine TATA-Box befindet sich 30 Basenpaare (Bp) stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle (Cochet et al. 1982, Drouin et al. 1985). Der Promotor des POMC-Gens der Ratte ist 543 Bp lang und erstreckt sich von +63 bis -480 Bp (Therrien und Drouin 1991), wobei die Region von -

34 bis -480 bzw. -323 Bp als ausreichend bzw. notwendig für die gewebespezifische und hormonabhängige Expression des Neuropeptids angesehen wird (Jeannotte et al. 1987, Tsukada et al. 1994). Das POMC-Gen besitzt sowohl eine 5'-CpG-Insel, die den Transkriptionsstartpunkt umschließt, als auch eine 3'-CpG-Insel, die circa 5 Kilobasenpaare entfernt stromabwärts liegt (Gardiner-Garden und Frommer 1994). Der gewebespezifische Promotor des POMC-Gens liegt innerhalb der 5'-CpG-Insel. Diese hat eine Gesamtlänge von 1200 Bp, davon 400 Bp stromaufwärts von Exon 1 und 800 Bp stromabwärts.

Bereits 1990 wurde der Methylierungsgrad der 5'-Region des humanen POMC-Gens untersucht und dabei festgestellt, dass dieser sich gewebeabhängig stark unterscheidet (Lavender et al. 1991). Diese Ergebnisse wurden zehn Jahre später wieder aufgegriffen, als man begann CpG-Methylierung und Genexpression miteinander in Verbindung zu bringen. Es konnte gezeigt werden, dass die 5'-CpG-Insel des humanen POMC-Gens weitgehend bis vollständig demethyliert vorliegt in Geweben, welche POMC exprimieren. Dagegen sind in nicht-exprimierenden Geweben beinahe alle CpG-Stellen der 5'-Region methyliert (Newell-Price et al. 2001). Bereits eine geringe Methylierung der humanen POMC-Promoterregion führte in Transfektionsstudien mittels Luziferase-Reporter-Konstrukten zur Hemmung der Expression; die Inhibition war komplett, wenn alle CpG-Stellen der Promotorkonstrukte methyliert vorlagen (Newell-Price et al. 2001). In ACTH-produzierenden Tumoren des Thymus war die 5'-CpG-Insel des POMC-Gens hypomethyliert im Vergleich zu normalem Thymusgewebe. Diese Hypomethylierung speziell der Region von -417 Bp bis -260 Bp ging einher mit einer Überexpression des POMC-Peptids (Ye et al. 2005). Methylierungen innerhalb dieses distalen Promoterabschnittes scheinen also von besonderer Bedeutung für die Regulation der POMC-Expression zu sein.

Dies ist umso bedeutsamer, da nicht wenige Transkriptionsfaktoren bekannt sind, welche in diesem Bereich Bindungsstellen besitzen: Zum einen bindet STAT3 („Signal transducer and activator of transcription“) an eine Sequenz zwischen -399 bzw. -387 und -379 Bp im POMC-Promotor (Bousquet et al. 2000, Mynard et al. 2002 und 2004). STAT 3 ist ein starker Aktivator der POMC-Expression (Bousquet et al. 2000) und spielt eine essentielle Rolle bei der leptinvermittelten Regulation des Körpergewichts und der Energiebalance, wie an STAT3-knock-out Mäusen gezeigt werden konnte (Gao et al. 2004).

Des Weiteren befinden sich zwei GC-reiche Sequenzen im Promotor, eine bei -201 bis -192 Bp, die andere bei -146 bis -136 Bp. Diese GC-Boxen binden den ubiquitären Transkriptionsaktivator Sp1 (Liu et al. 1995). Durch den hohen Cytosingehalt ist das Auftreten von Methylierungen an diesen Stellen sehr wahrscheinlich. Eine andere Sequenz von -151 bis -141 Bp bindet den bekannten Genregulator Nuklearfaktor- κ B (Jin et al. 1994). Es ist bekannt, dass CpG-Methylierung innerhalb dieser Sequenz die Anheftung von Nf- κ B an die DNA verhindert (Bednarik et al. 1991).

Folgende Proteine sind ebenfalls beschrieben worden, die Bindungsstellen im POMC-Promotor besitzen und als Transkriptionsaktivatoren wirken: AP1 bindet bei +41/+47 Bp (Boutillier et al. 1995), AP2 bei -144/-133 bzw. -143/-135 Bp (Bishop et al. 1990 und 1993, Jin et al. 1994); Brn 3.0 bei -267/257 Bp (Gerrero et al. 1993), E-Box-bindende Elemente finden sich bei -391/-386, -376/-371, -232/-227 und bei -177/-172 Bp (Therrien und Drouin 1993), MRE und PCRH-RE binden bei -168/-163 bzw. -171/-160 Bp (Jin et al. 1994), Proteine der NUR-Familie wirken über die Sequenz -404/-383 (Bousquet et al. 2000, Mynard et al. 2002 und 2004), PO-B bindet zwischen TATA-Box und Cap-Stelle bei -15/-3 Bp (Riegel et al. 1990), Pitx1 bei -302/-297 Bp (Lamonerie et al. 1996, Lamolet et al. 2001), zwei PP1-Bindungsstellen existieren bei -262/-253 und bei -202/-193 Bp (Liu et al. 1995), eine T-Box-bindende Sequenz namens T-pit findet sich bei -316 bis -309 Bp (Lamolet et al. 2001), TRE bindet bei -321/-315 (Bishop et al. 1993).

Der einzige bekannte expressionshemmende Faktor des POMC-Gens ist nGRE, das negative glukokortikoidresponsive Element, dessen Bindungsstelle bei -71/-57 Bp liegt (Drouin et al. 1993). Damit alle diese beschriebenen genregulatorischen Elemente in eine Methylierungsanalyse miteingehen können, sollte sich der zu untersuchende Promotorbereich mindestens von -400 bis +47 Bp spannen.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Cytosinmethylierung im Promotor des anorexigenen Neuropeptids Proopiomelanocortin im Hypothalamus von neonatal normal ernährten Ratten verglichen werden mit derjenigen neonatal überernährter Ratten. Das hierfür zur Anwendung kommende Tiermodell der kleinen Würfe ist in unserer Arbeitsgruppe sehr gut etabliert und gab bereits aufschlussreiche Hinweise zur Unterstützung der Hypothese der perinatalen Programmierung von Erkrankungen wie Adipositas oder Diabetes. So zeigen überernährte Ratten Merkmale des metabolischen Syndroms und eine hypothalamische (d.h. zentrale) Insulin- und Leptinresistenz, die lebenslang persistiert.

Die Mechanismen, die zu dieser dauerhaften Prägung zentralnervöser und/oder endokriner Strukturen führen, werden zurzeit intensiv untersucht. Die Cytosinmethylierung von DNA-Abschnitten ist ein solcher Mechanismus, der zu einer dauerhaft veränderten („unprogrammierten“) Expression von Genen führt. POMC erfüllt gute Voraussetzungen für die Möglichkeit einer Regulation durch DNA-Methylierung: Sein Promotor liegt innerhalb einer CpG-Insel und beherbergt eine Vielzahl von Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren. Der Methylierungsgrad der CpG-Insel des POMC-Gens wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen in anderweitigen Zusammenhängen analysiert und zeigte sich dabei als variabel und vor allem als die Genexpression steuernd.

Zusammengenommen ergeben sich für die vorliegende Studie folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich ein Unterschied in der DNA-Methylierung des hypothalamischen POMC-Promotors feststellen zwischen neonatal überernährten und normal ernährten Ratten?
2. Finden sich innerhalb der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im POMC-Promotor Methylierungsunterschiede zwischen neonatal überernährten und normal ernährten Ratten?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad des POMC-Promotors und der Expression der POMC-mRNA?
4. Bestehen Beziehungen zwischen der DNA-Methylierung des POMC-Promotors und den peripheren Stoffwechselfparametern?

2 Material und Methoden

2.1 Tiermaterial und Tierhaltung

Es wurden Wistar-Ratten verwendet, die aus einer eigenen Nachzucht von Versuchstieren der Kolonie Charles River (CRL: WI) 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. Die Ernährung erfolgte ad libitum. Für alle Untersuchungen lag eine Tierversuchsgenehmigung der zuständigen Landesbehörde vor (LAGETSI Berlin, G 0093/02).

2.2 Experimentalmodell

Im Alter von drei Monaten erfolgte die Anpaarung von 13 weiblichen Wistar-Ratten mit gleichaltrigen Männchen. Die Nachkommen wurden an ihrem ersten Lebenstag randomisiert auf die Muttertiere verteilt. Um bei den Jungtieren eine Überernährung in der Neonatalperiode zu induzieren, wurde am dritten Lebenstag in acht Nestern die primäre Wurfgröße auf drei Neugeborene pro Mutter reduziert (Versuchsgruppe KW: kleiner Wurf). In der Kontrollgruppe wurden die Tiere in einer normalen Wurfgröße von 12 Neugeborenen pro Mutter ($n = 5$) aufgezogen (NW: normaler Wurf). Jeweils acht männliche Nachkommen aus beiden Gruppen wurden nach der Stillperiode am 21. Lebenstag randomisiert dem im Folgenden vorgestellten Prozedere unterzogen (Plagemann et al. 1999b).

2.3 Bestimmung von Körpermasse und Körperlänge

Die Körpermassen aller Nachkommen 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.

2.4 Tötung, Entnahme von Blut und Organen, Körperfettbestimmung

Durch Dekapitation mittels einer Guillotine wurde die rasche und stressfreie Tötung der 21 Tage alten Ratten ermöglicht. Das hierbei aufgefangene Trunkalblut wurde zuerst gewogen und dann

für die Bestimmung der Serumkonzentrationen der im Weiteren aufgeführten Metabolite bzw. Laborparameter benutzt. Daraufhin erfolgte die zügige Entnahme der Gehirne, welche auf Trockeneis bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Die Präparation der Hypothalami wird in Kapitel 2.6.1 ausgeführt. Nun wurde den Tieren der Magen-Darmtrakt entnommen und verworfen. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass der Magen-Darminhalt nicht in die Bestimmung der Körperzusammensetzung miteinflusst (Schmidt et al. 2000). Anschließend wurde der Kadaver gewogen. Aus dem Gewicht des Kadavers und des Trunkalbluts errechnete sich durch Addition die Feuchtmasse jedes Tieres. Nun erfolgte die Trocknung der Kadaver bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank. Während des Mumifizierungsprozesses wurden die Körper regelmäßig gewogen und nach Erreichen einer Gewichtskonstanz (entspricht der endgültigen Trockenmasse) einer Fettextraktion unterzogen. Hierzu wurden die Kadaver in Filterpapier verpackt, durch stumpfen Druck zerkleinert und in eine Soxhlet-Apparatur (Merck, Eurolab, Frankfurt) gebracht, welche mittels Chloroform (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) die Tierkörper innerhalb von 24 Stunden vollständig entfettete. Nach Entfernung des Filterpapiers wurden die Kadaverfragmente in Aluminiumschalen umgelagert, worauf sich ein erneuter Trocknungsprozess im Trockenschrank bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ anschloss. Durch Wiegen wurde endlich die fettfreie Trockenmasse bestimmt. Aus der Differenz von Trockenmasse und fettfreier Trockenmasse ergab sich rechnerisch der absolute Fettgehalt jedes Tieres. Der Körperfettanteil (in Prozent) wiederum errechnete sich für jedes Tier aus dem jeweiligen absoluten Fettgehalt bezogen auf die individuelle Feuchtmasse.

2.5 Bestimmung der Blutglukose und von Insulin und Leptin im Plasma

2.5.1 Blutglukose

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgte durch die Glukoseoxidase-Peroxidase-Methode (Barham und Trinder 1972) unter Verwendung des Testbestecks LCN 400 und des Autoanalysers LP 400 (beides Dr. Lange GmbH, Berlin, Deutschland). Der Messbereich der Methode betrug $0 - 27,8\text{ mmol/l}$, der Variationskoeffizient lag bei $< 3,0\%$.

2.5.2 Insulin

Die Bestimmung der Plasmakonzentration von Insulin fand unter Verwendung eines Radioimmunoassays der Firma Adaltes (Freiburg, Deutschland) statt. Zu $50\text{ }\mu\text{l}$ des Standards ($2,661 - 340,8\text{ mIE/l}$) bzw. der unbekannt Probe wurden je $50\text{ }\mu\text{l}$ Antiinsulin-Antikörper und

Tracer (125I-markiertes Insulin) gegeben, gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 50 µl Diluent sowie 500 µl Präzipitationsreagenz (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 Intraassayvariationskoeffizient betrug 4,5 - 7,4 % im Konzentrationsbereich 9,1 - 94,2 mIE/l (n = 10). Der Interassaykoeffizient lag bei 4,5 - 8,0 % innerhalb des Konzentrationsbereichs 8,8 - 95,2 mIE/l (n = 10). Die Kreuzreaktivität mit humanem Proinsulin betrug 14 %, mit Schweine- und Rinderproinsulin 1,3 % und jene mit C-Peptid < 0,0002 %.

2.5.3 Leptin

Die Bestimmung der Leptinkonzentration im Serum erfolgte mittels eines Radioimmunoassays (Linco, St. Charles, USA). Zu 50 µl des Standards (0,5 - 50 ng/l) bzw. der unbekannt Probe wurden je 50 µl Antileptin-Antikörper (Meerschwein) und Tracer (125I-markiertes Leptin) gegeben, 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 % und der Interassayvariationskoeffizient 4,8 - 5,7 %.

2.6 Gewinnung von DNA und RNA aus dem Hypothalamus

2.6.1 Präparation und Homogenisierung des Hypothalamus

Die Präparation der Hypothalami erfolgte bei -20 °C in einem Cryostat. Das Gehirn wurde auf der Konvexität so plaziert, dass die basalen Strukturen oben lagen. Mit Hilfe eines Stereomikro-

skops 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 Commissura anterior wurde der Hypothalamus en bloc reseziert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml RNAlater (Ambion, 2 Wiesbaden, Deutschland) überführt. Aus diesem Reaktionsgefäß wurde der Hypothalamus mit einer sterilen Kanüle 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 2.8.1: Extraktion der RNA), die restliche farblose Phase so vollständig wie möglich mit einer 100 µl-Pipette entfernt und verworfen (Chomczynski 1993).

2.6.2 Extraktion der DNA

Zu der verbleibenden Phenol- und Interphase wurden nun 0,75 ml DNA-Extraktionspuffer (Guanidinthiocyanat 4M, Tris 1M, Tri-Natriumcitrat 50mM) hinzugegeben und das Ganze 15 s gemischt. Nach 10 min wurde erneut bei 12000 g über 15 min zentrifugiert. Die obere, farblose und jetzt DNA-enhaltende Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig entnommen und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 0,6 ml Iso-propanol 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 wurde zur weiteren Reinigung 1,5 ml 75prozentiges Ethanol hinzugegeben, 5 min gewartet und 10 min lang bei 8000 g zentrifugiert. Nachdem das Ethanol vorsichtig mit der Pipette entnommen war, wurde das Pellet 10 - 20 min bis 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.

2.6.3 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der DNA

Zur Bestimmung von Qualität und Quantität der gewonnenen DNA wurde am Spektralfotometer (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 ($\mu\text{g/ml}$): $(\text{OD}_{260} \times 47,5 \times 100) \times 1000 - 1$ Reinheitsgrad: $(\text{OD}_{260} \times 50) \times (\text{OD}_{280} \times 40) - 1$. Der den Reinheitsgrad beschreibenden Quotient sollte stets größer als 1,6 sein, da sonst eine Kontamination durch Proteine anzunehmen war. Bei einem kleineren Wert wurde die Extraktion wiederholt.

2.7 Methylierungsanalyse

Um das Methylierungsmuster des POMC-Promotors zu untersuchen, musste die DNA-Sequenz in der Art verändert werden, dass zwischen einem methylierten und einem unmethylierten Cytosin unterschieden werden konnte. Die hierzu benutzte Methode basiert auf dem von Frommer eingeführten (Frommer et al. 1992) und später weiterentwickelten (Olek et al. 1996) Prinzip der Modifikation der DNA mittels Natriumbisulfit, darauffolgender PCR, Klonierung und Sequenzierung des PCR-Produkts (Übersicht der Einzelschritte s. Abb. 2.1).

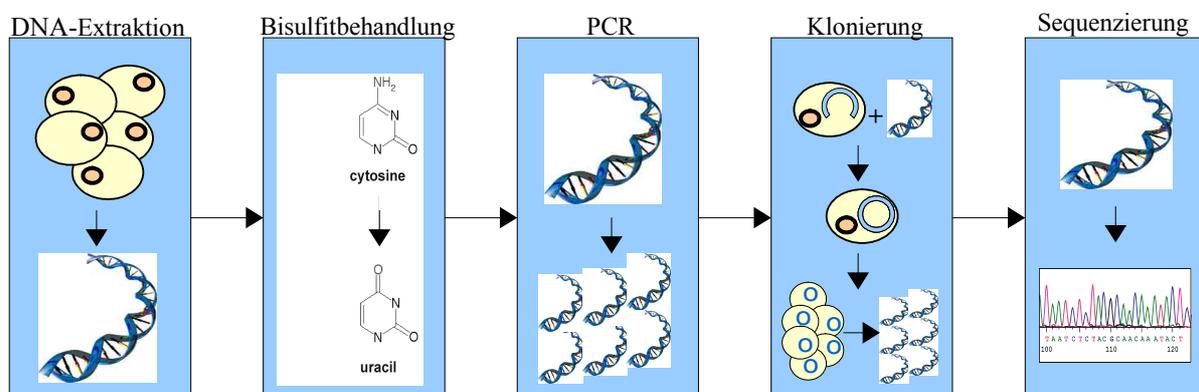


Abbildung 2.1:

Einzelschritte der Methylierungsanalyse: Erklärung siehe Text.

In fünf Einzelschritten wurde zunächst die genomische DNA aus den hypothalamischen Zellen extrahiert. Als zweites erfolgte die Modifikation der DNA mit Natriumbisulfit, so dass sämtliche unmethylierte Cytosinbasen in Uracil umgewandelt wurden. Im Anschluss wurde das gesuchte

Genfragment (hier der POMC-Promotor) per PCR vervielfältigt und in Bakterienzellen eingebaut, so dass genetisch identische Zellklone entstanden. Durch kulturelle Anzucht wurde die selektive Vermehrung derjenigen Klone gewährleistet, die das POMC-Promotorfragment trugen. Am Ende erfolgte die Extraktion des Promotorfragments aus den Zellklonen und die Sequenzierungs-PCR. Dabei wurde durch den Einbau farblich markierter Nukleotide die Sequenz optisch auswertbar gemacht.

2.7.1 Restriktionsverdau und Fällung der DNA

Um die DNA für die nachfolgende Bisulfitbehandlung leichter zugänglich zu machen, wurde diese zuerst mittels einer methylierungsinsensitiven Endonuklease in kleinere Fragmente zerlegt. Das Restriktionsenzym Rsa I, welches hydrolytisch die Phosphodiesterbindung der Sequenz 5'...GT▼AC...3' (reverse: 3'...CA▼TG...5') spaltet, fand hier Verwendung. Ein Ansatz bestand aus folgender Zusammensetzung: 1,2 µl DNA, 3 µl Rsa I (10 U/µl, Promega, Mannheim, Deutschland), 3 µl 10fach-Puffer C, 0,6 µl BSA-Lösung (beides mitgeliefert mit Rsa I) sowie das zu berechnende Volumen PCR-Wasser bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 30 µl pro Ansatz. Die Inkubationzeit betrug 4,5 Stunden bei 37 °C im Thermoblock (TB1; Biometra, Göttingen, Deutschland). Zur Kontrolle des Verdau wurden anschließend 1 µl Probenauftragspuffer (Promega) zu 3 µl des Restriktionsansatzes gegeben und die Fragmente auf einem einprozentigen 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 x 3 H₂O sowie 59,4 µl 96prozentigem 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 verbliebene Pellet zur Wäsche mit 70prozentigem 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.

2.7.2 Modifizierung der DNA durch die Bisulfitbehandlung

2.7.2.1 Prinzip der Bisulfitreaktion

Unmethylierte Cytosine werden hochselektiv bei der Reaktion mit Natriumbisulfit in Uracil umgewandelt. Trägt jedoch die Base Cytosin an Position C5 eine Methylgruppe, so verhindert dies

die Reaktion mit Natriumbisulfit. Methylierte Cytosine bleiben also unverändert und werden bei einer darauffolgenden Polymerasekettenreaktion als Cytosine erkannt und vervielfältigt, während die zu Uracil umgewandelten nichtmethylierten Cytosine von der Polymerase als Thymin gelesen und amplifiziert werden (s. Abb. 2.2). Damit das Natriumbisulfit seinen Wirkort erreichen kann, muss die DNA in Einzelsträngen vorliegen, also denaturiert werden. Um die Wiederanlagerung der Einzelstränge zu verhindern, wird die DNA in Agarose eingebettet (Olek et al. 1996). Dies ist umso sinnvoller, als dass es den Verlust von DNA-Material verhindert und so erlaubt mit geringsten DNA-Mengen zu arbeiten.

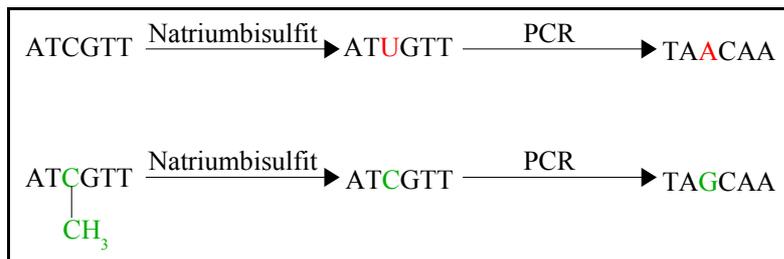


Abbildung 2.2:

Veränderung der Basensequenz durch Natriumbisulfitbehandlung und darauffolgender PCR: oben eine unmethylierte Cytosinbase, welche zu Uracil umgewandelt und von der Polymerase als Thymin erkannt wird, unten eine methylierte Cytosinbase, die nicht mit Bisulfit reagiert.

2.7.2.2 Durchführung der Bisulfitmodifikation

Die im vorherigen Schritt verdaute und gefällte DNA wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt. Danach wurde jede Probe mit 8,3 µl 1N Natronlauge versetzt und 15 min lang bei 50 °C im Thermoblock erwärmt. Nach Zugabe von 225 µl der vorher auf etwa 50 °C erhitzten Agarose (low melting point agarose; Sigma, München, Deutschland) und vorsichtiger Mischung wurde die Temperatur weiter bei 50 °C gehalten. Aus diesem Mix wurden je 20 µl in 11 auf -20 °C vorgekühlte und ölgefüllte (Mineralöl für die Molekularbiologie, Sigma) Reaktionsgefäße à 0,65 ml pipettiert, wobei sich Kugeln aus Agarose bildeten. In jedes Reaktionsgefäß wurden nun 400 µl Natriumbisulfitlösung (Natriumbisulfit 2,5 M, Hydrochinon 125 mM) gegeben und der Ansatz für 5 Stunden lichtdicht bei 50 °C im Thermoblock inkubiert. 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.

2.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die folgenden Schritte war es nötig, die Originalsequenz des POMC-Promoters der Ratte zu kennen, um die für die verschiedenen PCR-Reaktionsansätzen passenden Primer bestimmen zu können. Diese stammt aus einer Genomdatenbank und basiert auf Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um J. Drouin (Drouin et al. 1985).

2.7.3.1 Kontroll-PCR I

Zunächst wurde mittels PCR überprüft, ob die Modifikation der DNA durch die Bisulfitbehandlung erfolgreich war. Dazu wurden die Primer in der Art gewählt, dass sie nur an modifizierte DNA binden konnten (Herstellung: TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland): Die Oligonukleotide NPY-mod-F (5'-TTT TTG TTT TAT TTT TTT TTT TGG TAG-3') und NPY-mod-R (5'-TCC CAA TTA ATC CTA ACA CTC AC-3') führten zur Amplifikation eines 373 Basenpaare langen Fragmentes außerhalb der POMC-Promoterregion. Jeder Reaktionsansatz bestand aus einer Agarosekugel, die etwa 10 - 20 µl bisulfitmodifizierter DNA enthielt, je 19,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne MgCl₂ (Perkin Elmer), 2 µl MgCl₂ (Perkin Elmer), 1 µl dNTP-Mix à 10 mmol/l (Promega, Mannheim, Deutschland), jeweils 1 µl der o.g. Primer plus 0,5 µl einer Taq-Polymerase (AmpliTaq; Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im Thermocycler (PCR-Express; Thermo Hybaid, Ulm, Deutschland) nach folgendem optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	58 °C	1,5 min
Elongation	72 °C	2 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.1: 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.

2.7.3.2 Kontroll-PCR II

Um sicherzustellen, dass sich nach der Bisulfitbehandlung keine unmodifizierte DNA mehr in der Probe befand, wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, welche nur an die unveränderte Originalsequenz binden können. Folgende Oligonukleotide (Herstellung: MWG Biotech AG, Berlin, Deutschland) wurden zur Amplifikation eines 377 Basenpaare langen Fragments verwendet: AgRP-F (5'-GTT CCC AGG TCT AAG TCT GAA-3') und AgRP-R (5'-TGA AGA AGC GGC AGT AGC AC-3'). Es wurden dieselben Reagentien wie in Kontroll-PCR I benutzt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10-20 µl DNA, 16,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne MgCl₂, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTP-Mix, je 2,5 µl der o.g. Primer sowie 0,5 µl Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Amplifikation des Ansatzes wurde im PCRExpress Thermocycler nach folgendem optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	51 °C	0,45 min
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.2: 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. Die ebenfalls mitgelaufene Positivkontrolle, welche aus einer Agarosekugel mit unbehandelter DNA bestand, bewies die Funktionstüchtigkeit der genannten Primer und PCR-Bedingungen.

2.7.3.3 Amplifikation der POMC-Promotorregion

Nach der Bisulfitbehandlung waren die DNA-Stränge nicht mehr komplementär und mussten daher separat amplifiziert und analysiert werden. In der hier vorliegenden Untersuchung ging nur der Führungsstrang in die weitere Analyse ein. Das heißt, dass für die Amplifikations-PCR Primer gewählt wurden, die spezifisch an die bisulfitmodifizierte DNA des Führungsstranges banden: Die Primer (Herstellung: MWG Biotech, Berlin, Deutschland) POMC-mod-F3 (5'-GTT TTG GGT TGT TAT GAT TTT TGA T-3') und POMC-mod-R3 (5'-AAT CCC TAT CAC TCT TCT CTC TT-3') führten zur Synthese eines 540 Basenpaare langen Fragmentes. Es wurden die o.g. Taq-Polymerase sowie dieselben Reagentien verwendet. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10 - 20 µl DNA, 11,5 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer ohne MgCl₂, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTP-Mix, je 5 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 optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	58 °C	1,5 min
Elongation	72 °C	2 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.3: Temperatur- und Zeitschema der Amplifikation der POMC-Promotorregion

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. Zur präparativen Auftrennung und Beurteilung der Amplifikate wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese fand auf einem zweiprozentigen, mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel statt. Es wurden je 30 µl eines PCR-Produkts mit 4 µl Probenauftragspuffer versetzt und parallel zu einem Längensstandard aufgetrennt, der eine eindeutige Zuordnung der Fragmente nach ihrer Größe gestattete. Im Anschluss erfolgte die fotografische Dokumentation.

2.7.3.4 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.

2.7.4 Ligation und Klonierung der PCR-Produkte

Um eine Aussage über individuelle Chromosomen zu erlangen, folgte an dieser Stelle der Einbau des PCR-Produktes in eine Bakterienzelle, welche durch Zellteilung die selektive Vervielfältigung des DNA-Fragments bewirkte (Transformation). Dabei entstanden Zellklone, d.h. genomisch identische Organismen. 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 die Ampicillin-Resistenz als auch das Gen für die β -Galaktosidase. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrates X-Gal, welches zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Bei korrekter Insertion des PCR-Produkts in den Vektor ist der Promotor für das Gen β -Galaktosidase inaktiviert, d.h. X-Gal kann nicht hydrolysiert werden und die Bakterien bleiben weiß. Das Gen für die Ampicillin-Resistenz bleibt im Fall der korrekten Insertion unberührt. Weiße Kolonien auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten bestehen somit aus Bakterien, welche einen Vektor mit integriertem PCR-Produkt enthalten und ampicillinresistent sind. Blau gefärbte Kolonien zeigen eine inkorrekte Ligation oder fehlende Aufnahme des Plasmids in die Zellen an.

2.7.4.1 Synthese von A-Überhängen

Der Vektor „pCR 2.1 TOPO“, in den das PCR-Produkt eingebaut werden sollte, besitzt am 3'-Ende überhängende Desoxythymidine. Daher musste mittels einer Taq-Polymerase am 3'-Ende des PCR-Produkt ein überhängendes Desoxyadenosin synthetisiert werden. Dazu wurde ein Ansatz von 27 μ l PCR-Produkt, 3,15 μ l PCR-Wasser, 3,5 μ l 10fach Puffer mit MgCl₂ (Perkin Elmer), 1 μ l dATP (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und 0,35 μ l Taq-Polymerase bei einem Gesamtvolumen von 35 μ l pipettiert und für 10 min bei 72 °C im Thermoblock inkubiert. Daran schloss sich sofort die Ligation an.

2.7.4.2 Ligation

Bei der Ligation wurden die DNA-Fragmente des Vektors und des PCR-Produkts zu einem durchgehenden Doppelstrang, d.h. einem DNA-Plasmid, verknüpft, indem eine Topoisomerase die Ausbildung kovalenter Phosphodiesterasebindungen zwischen einer Hydroxylgruppe am 5'-Ende des PCR-Produktes und der Phosphatgruppe des Tyrosinrestes am 3'-Ende des Vektors katalysierte (Shuman 1994). Dazu wurden 2 μ l des PCR-Produkts, 2 μ l steriles Wasser, 1 μ l Salzlösung und 1 μ l Vektor bei einem Gesamtvolumen von 6 μ l angesetzt. Nach exakt 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Insertion gestoppt, indem die fertigen Plasmide enthaltenden Ansätze auf Eis abgekühlt wurden.

2.7.4.3 Transformation und Klonierung

Das Prinzip der Transformation besteht in der durch Kalziumchloride geförderten Aufnahme von Plasmid-DNA in eine chemisch kompetente Bakterienzelle (*E. coli*). Dazu wurden 2 µl des die Plasmide enthaltenden 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 h 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. Über die optische Identifizierung transformierter Zellen nach der Färbung wurden 20 der weißen Kolonien 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.

2.7.5 Extraktion und Kontrolle der Plasmide

2.7.5.1 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. Das Eluat wurde anschließend auf eine QIAprep-Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Die mobile Phase wurde verworfen und die sich in der Säule befindende Plasmid-DNA mit 500 µl Puffer PB gewaschen. Nach einminütiger Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und der Reinigungsschritt mit 750 µl Puffer PE wiederholt. Anschließend konnte die DNA nach Zugabe von 50 µl PCR-Wasser auf die Säule durch Zentrifugation von 1 min eluiert werden (Birnboim und Doly 1979).

2.7.5.2 Kontrolle durch Restriktionsspaltung

Durch Verdau der erhaltenen DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym 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 BSA-Lösung (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 einprozentigen 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.

2.7.6 Sequenzierungsanalyse

Insgesamt gingen 263 Plasmide, die die ausgewählte POMC-Promoterregion enthielten, in die Sequenzierungsanalyse ein, davon stammten 130 von Tieren aus normal großen Würfen (NW) und 133 von Tieren aus kleinen Würfen (KW). In diesem Schritt nun endlich, basierend auf der von Sanger entwickelten Methode, wurden die durch die Bisulfitbehandlung plus anschließender PCR vorgenommenen Modifikationen sichtbar und auswertbar gemacht (Sanger et al. 1977). Ursprünglich methylierte Cytosinbasen waren Cytosine geblieben und ließen sich im komplementären Strang als Guaninbasen identifizieren, während nichtmethylierte Cytosine durch die Modifikation nun als Thymin bzw. Adenin zu erkennen waren (s. Abb. 2.3).

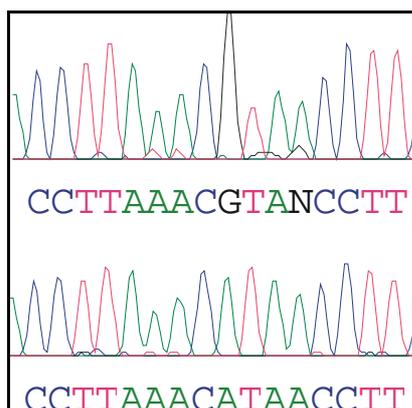


Abbildung 2.3:

Ausschnitt der POMC-Sequenz zweier Klone nach der Sequenzierungsanalyse: oben ist ein ursprünglich methyliertes Cytosin als G (Guaninbase) zu erkennen, unten befindet sich an derselben Stelle ein A (Adeninbase), d.h. ein ursprünglich nichtmethyliertes Cytosin.

2.7.6.1 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 762 Bp (540 Bp PCR-Produkt plus 222 Bp durch die plasmidspezifischen Primer) wurde eine Taq-Polymerase benutzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,5 µl Plasmid-DNA, 39,2 µl PCR-Wasser, 5 µl 10fach Puffer mit MgCl₂, 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 nach folgendem optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	50 °C	0,45 min
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.4: Temperatur- und Zeitschema der 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 einminütiger Zentrifugation eluiert. Im Anschluss wurde die Konzentration der DNA fotometrisch bestimmt.

2.7.6.2 Sequenzierungs-PCR

In diesem Schritt fand die eigentliche Reaktion zur Sequenzanalyse statt, die auf dem Prinzip des Kettenabbruchs basiert. Dabei waren im PCR-Ansatz neben den regulären Didesoxynukleotiden (dNTP) auch fluoreszenzmarkierte Kettenabbruch-Didesoxynukleotide (ddNTP) 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 optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	90 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	0,10 min
Annealing	50 °C	0,10 min
Elongation	60 °C	4 min

Tabelle 2.5: Temperatur- und Zeitschema der 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 96prozentigem 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 70prozentigem Ethanol wurden die Proben erneut für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet zum vollständigen Verdampfen des Ethanol

nols 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.

2.7.6.3 Analyse des PCR-Produkts

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

2.8 Bestimmung der mRNA-Expression durch RT-PCR

2.8.1 Extraktion der RNA

Die am Ende der Präparation und Homogenisierung des Hypothalamus nach Zentrifugation gewonnene RNA-enhaltene Phase (siehe Kapitel 2.6.1) 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, so dass ein Pellet im Reaktionsgefäß zurückblieb. Nach Zugabe von 1,5 ml 75 prozentigem Ethanol wurden die Proben 8 min bei 7500 g zentrifugiert. Das Ethanol wurde wieder vorsichtig abgegossen, abpipettiert und anschließend für 5 - 10 min an der Luft getrocknet. Danach konnte das Pellet in 120 µl DEPC-Wasser aufgenommen, gemischt und im Anschluss die RNA-Konzentration der Proben fotometrisch bestimmt werden (Chomczynski 1993).

2.8.2 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 MgCl₂, 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.

2.8.3 PCR

Die semiquantitative PCR wurde mit den folgenden Primern durchgeführt (Herstellung: TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland): POMC-2,3F (5'-GAG ATT CTG CTA CAG TCG CTC-3') und POMC-2,3R (5'-TTG ATG ATG GCG TTC TTG AA-3') (Millington et al. 1999), die ein Produkt von 678 Bp Länge 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 PCRWasser, 1 µl cDNA, 2 µl 10fach Puffer (Tris-HCL 100 mM bei pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, 0,01 % Gelatine), 0,4 µl dNTP-Mix à 10 mmol/l (Promega), je 0,2 µl der POMC-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 optimierten Thermoprofil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Vordenaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	62 °C	0,45 min
Elongation	72 °C	1 min
Endelongation	72 °C	10 min

Tabelle 2.6: Temperatur- und Zeitschema der semiquantitativen 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.

2.8.4 Auswertung

Die Amplifikate wurden auf einem 2prozentigen, 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.

2.9 Morphometrische Untersuchungen des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC)

2.9.1 Konventionelle und immunhistochemische Färbung der Gehirnschnitte

Nach der raschen Dekapitation wurden randomisiert die Gesamtgehirne von fünf Ratten aus fünf normalen Würfeln und sechs Ratten aus sechs kleinen Würfeln zügig entnommen und in Bouinscher Lösung für 48 h fixiert. Nach 24-stündiger H₂O-Spülung durchliefen die Gehirne eine aufsteigende Alkoholreihe und wurden in Histoplast (Shandon, Frankfurt/Main, Deutschland) eingebettet und aufgeblockt. Anschließend wurden 5 µm-starke koronare Serienschnitte unter Erfassung des Hypothalamus in den Ebenen 24 - 32 angefertigt, korrespondierend zu den Bregmaleveln -1.40 bis -3.60 mm (Paxinos und Watson 1986). Diese wurden auf beschichtete Objektträger (1 % Gelatine; 0,02 % Cromalaun) aufgezogen und abwechselnd konventionell mit Kresylviolett 0,025 % (Nissl-positiv) oder immunhistochemisch für POMC unter Verwendung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex(ABC)-Methode gefärbt (Vectastain Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Für die Immunzytochemie erfolgte eine Vorbehandlung der Gehirnschnitte mit 0,3prozentigem Triton X-100 (Ferak, Berlin, Germany) zur Verbesserung der Antikörperpenetration. Um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren, folgte daraufhin die Inkubation der Schnitte in Methanol und 0,3prozentigem H₂O₂. Nach einer Spülung mit zweiprozentigem Pferdeserum (Vector) wurden die Schnitte für 48 h in einer Feuchtkammer bei 4 °C mit den entsprechenden Antikörpern für Ratten-POMC inkubiert (Konzentration 1:5000; Phoenix, Belmont, CA, USA). Nach Spülung wurden die Schnitte mit biotinyliertem Anti-Maus-IgG behandelt (1:500; Vector) und anschließend für 2 h mit ABC inkubiert. Nun wurden sie für 20 min einer Lösung aus 0,05prozentigem 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid exponiert (Sigma, St. Louis, MO, USA). Es folgte die Entwässerung und erneute Eindeckung mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Spezifität der immunhistochemischen Markierung wurde verifiziert durch die Abwesenheit der immunozytochemischen Reaktion in Schnitten, bei wel-

chen der Primärantikörper weggelassen oder durch Normalserum ersetzt worden war. Bei allen Tieren beinhalteten die gefärbten Schnitte die komplette kranio-kaudale Ausdehnung des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC).

2.9.2 Neuromorphometrische Untersuchung des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC)

Die Auswertung der mit Kresylviolett bzw. immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitte erfolgte mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems (KS 400 V.3.0, Zeiss, Jena, Germany), welches über eine Videokamera (DXC-390P, Sony, Japan) mit einem Lichtmikroskop mit Rasterbildschirm (Axioscope, Zeiss) verbunden war. Die Methode der computergestützten Mikroskopbildanalyse wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits häufig eingesetzt und ist ausführlich beschrieben und publiziert (Plagemann et al. 1999a und b). Auf diese Weise wurde bei 1700facher Endvergrößerung die Dichte immunopositiver POMC-Neurone innerhalb des ARC beider Gehirnhemisphären analysiert. Entsprechend den Kriterien wurden nur solche Neuronen erfasst, die einen Nukleolus und deutlich erkennbare Zellgrenzen aufwiesen. Dieser Part der Untersuchungen wurde durch immer die gleiche Person und verblindet durchgeführt.

2.10 Statistik

Für Gruppenvergleiche wurden der arithmetische Mittelwert (MW) und der Standardfehler (SEM) berechnet. Zum Mittelwertvergleich wurde bei Normalverteilung ein ungepaarter t-Test nach Student durchgeführt. 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 aus allen Klonen eines Tieres ($n = 15 - 18$) der Mittelwert errechnet (Siegmond und Laird 2002). Alle statistischen Tests wurden mit Hilfe der Programme SPSS für Windows (SPSS Software, München, Deutschland) sowie GraphPad Prism Version 4.03 für Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Parameter

3.1.1 Körpergewicht, Körperlänge, Körperfettanteil

Tiere, welche in kleinen Wurfen aufgezogen und damit neonatal überernährt wurden (Gruppe KW), hatten im Vergleich zu neonatal normal ernährten Tieren (Gruppe NW) erhöhte Körpergewichte. Bereits am siebten Lebenstag zeigte sich das mittlere Körpergewicht der KW-Tiere als signifikant erhöht gegenüber demjenigen gleichaltriger NW-Tiere (s. Abb. 3.1). Dieser Gewichtsunterschied verstärkte sich bis ins adulte Alter: Sowohl am vierzehnten als auch am einundzwanzigsten Lebenstag war das Körpergewicht neonatal überernährter Ratten statistisch signifikant höher als bei normal ernährten Tieren (s. Abb. 3.1.).

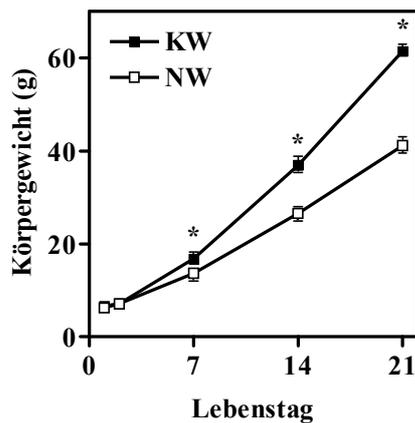


Abbildung 3.1:

Absolutes Körpergewicht von Tieren aus kleinen Wurfen (KW; n = 8) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 8) vom 1. - 21. Lebenstag: Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM); * p < 0,001 (Students t-Test).

Zudem zeigten die Ratten aus kleinen Wurfen am einundzwanzigsten Lebenstag eine statistisch signifikant größere Körperlänge als gleichaltrige Kontrolltiere (s. Tab. 3.1).

	Körperlänge in cm *
NW	9,6 ± 0,3
KW	10,6 ± 0,2

Tabelle 3.1:

Körperlängen am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Wurfen (KW; n = 8) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 8): Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM); * p < 0,001 (Students t-Test).

Auch das relative Körpergewicht, welches sich aus dem Quotienten von Körpergewicht und Körperlänge errechnet, war bei neonatal überernährten Tieren statistisch signifikant erhöht gegenüber Kontrolltieren (s. Abb. 3.2).

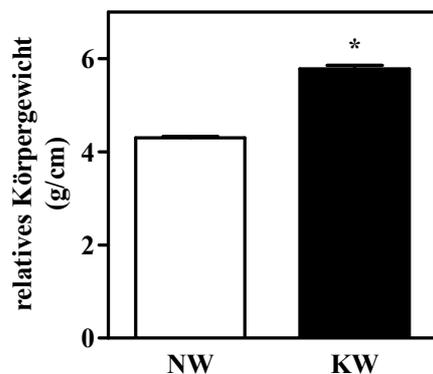


Abbildung 3.2:

Relatives Körpergewicht von Tieren aus kleinen Wurfen (KW; n = 8) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 8) am 21. Lebenstag: MW ± SEM; * p < 0,001 (Students t-Test).

Bei der Analyse der Körperzusammensetzung ergab sich ein signifikant erhöhter Körperfettanteil bei den Tieren aus kleinen Würfen gegenüber denen der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.3).

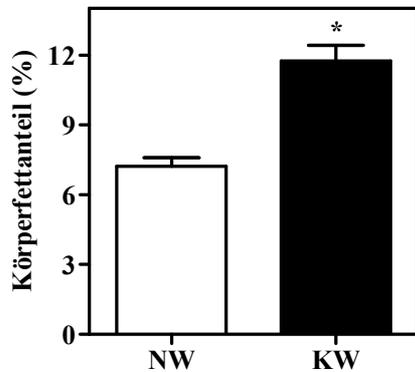


Abbildung 3.3:

Körperfettanteil am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 6) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 6): MW \pm SEM; * p < 0,001 (Students t-Test).

3.2 Stoffwechselfparameter

3.2.1 Blutglukose am 21. LT

Die in kleinen Würfen aufgezogenen und damit neonatal überernährten Ratten wiesen am einundzwanzigsten Lebenstag einen statistisch signifikant höheren basalen Blutglukosespiegel auf als normal ernährte Ratten der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.4).

Es bestand eine signifikant positive Korrelation zwischen den Blutglukosespiegeln und dem relativen Körpergewicht aller am einundzwanzigsten Lebenstag untersuchten Tiere ($r = 0,51$; $p < 0,05$; Rangkorrelation nach Spearman mit $n = 16$).

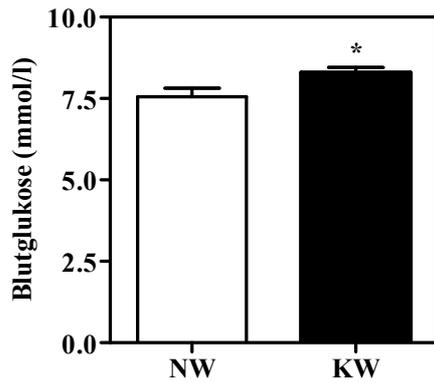


Abbildung 3.4:

Basale Blutglukosekonzentration am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 8) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 8): MW \pm SEM, * p < 0,05 (Students t-Test).

3.2.2 Plasmainsulin am 21. LT

Ratten aus kleinen Würfen wiesen statistisch signifikant höhere Insulinwerte auf als gleichaltrige neonatal normal ernährte Tiere (s. Abb. 3.5).

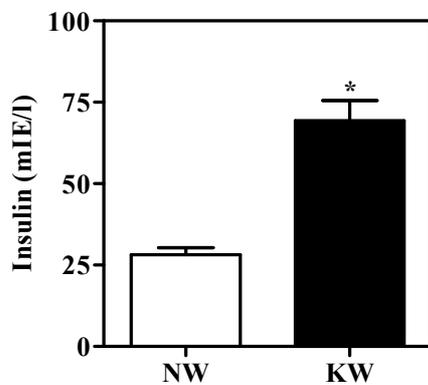


Abbildung 3.5:

Plasmainsulinkonzentration am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 8) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; n = 8): MW \pm SEM, * p < 0,001 (Students t-Test).

Zwischen den am einundzwanzigsten Lebenstag gemessenen Konzentrationen des Plasmainsulins und der Blutglukose aller untersuchten Tiere fand sich eine signifikant positive Korrelation ($r = 0,63$; $p < 0,01$; Rangkorrelation nach Spearman mit $n = 16$).

3.2.3 Insulin-Glukose-Ratio am 21. LT

Als ein Maß für die Insulinresistenz kann die Insulin-Glukose-Ratio herangezogen werden, welche durch Bildung eines Quotienten aus den Blutwerten von Insulin und Glukose berechnet wird (Guerrero-Romero und Rodriguez-Morán 2001, Harder et al. 2001).

Die Insulin-Glukose-Ratio zeigte sich bei den Tieren, die in kleinen Würfeln aufgezogen worden waren, signifikant erhöht gegenüber Kontrolltieren (s. Abb. 3.6).

Die Insulin-Glukose-Ratio korrelierte signifikant positiv mit den Körpergewichten ($r = 0,63$; $p < 0,01$), den relativen Körpergewichten ($r = 0,59$; $p < 0,05$) und den Leptinwerten ($r = 0,75$; $p < 0,001$) sowie den Insulinwerten ($r = 0,97$; $p < 0,001$; alles Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$) aller untersuchten Ratten.

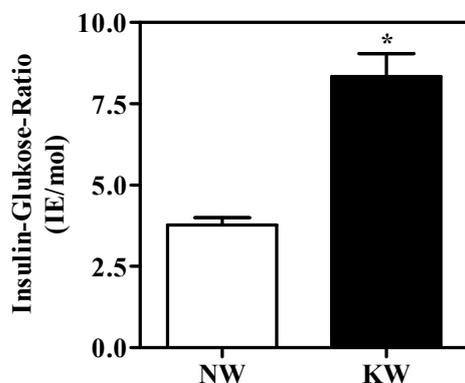


Abbildung 3.6:

Insulin-Glukose-Ratio am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Würfeln (KW; $n = 8$) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; $n = 8$); $MW \pm SEM$, * $p < 0,001$ (Students t-Test).

3.2.4 Plasmaleptin am 21. LT

Der Plasmaleptinspiegel lag bei Tieren, die in kleinen Würfeln aufgezogen wurden, signifikant höher als bei Tieren, die in normalen Wurfgrößen heranwuchsen (s. Abb. 3.7).

Die Plasmaleptinkonzentration aller sechzehn untersuchten Tiere korrelierte dabei signifikant positiv mit den Werten des Körpergewichts ($r = 0,75$; $p < 0,001$) und des relativen Körpergewichts ($r = 0,80$; $p < 0,001$) sowie mit der Plasmakonzentration von Insulin der 21 Tage alten Ratten ($r = 0,74$; $p = 0,001$; alles Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$).

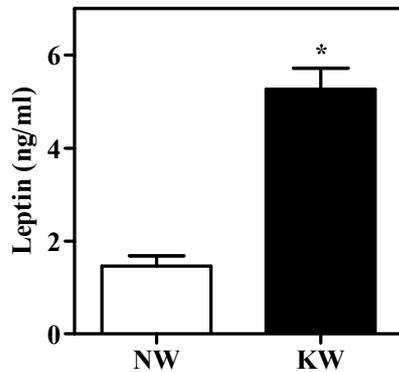


Abbildung 3.7:

Plasmakonzentration von Leptin am 21. Lebenstag von Tieren aus kleinen Würfen (KW; $n = 8$) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; $n = 8$): $MW \pm SEM$, * $p < 0,001$ (Students t-Test).

3.3 Expression der mRNA von POMC

In den Hypothalami fand sich am einundzwanzigsten Lebenstag kein signifikanter Unterschied des Gehaltes an POMC-mRNA zwischen den Tieren aus kleinen Würfen und denen der Kontrollgruppe (s. Tab. 3.2).

	POMC-mRNA in willkürlichen Einheiten *
NW	$0,64 \pm 0,03$
KW	$0,55 \pm 0,05$

Tabelle 3.2:

Absolute Menge von POMC-mRNA in den Hypothalami 21 Tage alter Tiere aus kleinen Würfen (KW; $n = 8$) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; $n = 8$): Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM); * $p = 0,13$ (Students t-Test).

Da die Expression von POMC abhängig ist von den im Blut zirkulierenden Sättigungssignalen, wurde ein Quotient gebildet zwischen der mRNA-Expression des Neuropeptids und den Serumwerten von Insulin bzw. Leptin. Dieser Quotient fiel bei Tieren aus kleinen Würfen statistisch signifikant niedriger aus als bei Kontrolltieren (s. Abb. 3.8). Das heißt, dass bei den neonatal überernährten Tieren die insulin- bzw. leptinbezogene POMC-Expression erniedrigt war trotz fehlenden Unterschieds im Absolutgehalt an POMC-mRNA.

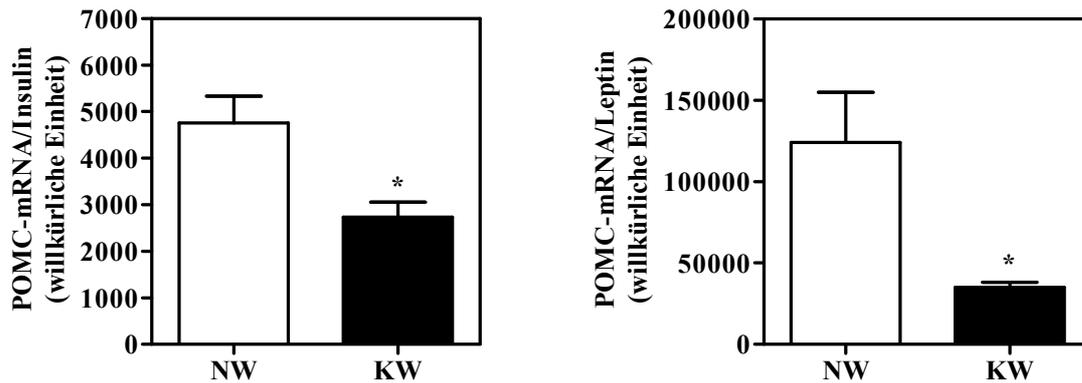


Abbildung 3.8:

Quotient zwischen der hypothalamischen Expression der POMC-mRNA (Absolutwerte) und den Serumwerten von Insulin (links; $r = 0,40$) und Leptin (rechts; $r = 0,38$) bei 21 Tage alten Tieren aus kleinen Würfen (KW; $n = 8$) versus Kontrolltieren (NW; $n = 8$): $MW \pm SEM$, * $p < 0,01$ (Students t-Test).

Darüberhinaus zeigten sich signifikant inverse Korrelationen dieses Quotienten mit dem Körpergewicht (mRNA/Insulin: $r = -0,57$; $p < 0,05$; mRNA/Leptin: $r = -0,78$; $p < 0,001$) der untersuchten Ratten sowie mit deren Serumwerten von Glukose (s. Abb. 3.9) und Leptin (mRNA/Insulin: $r = -0,61$; $p < 0,05$) bzw. Insulin (mRNA/Leptin: $r = -0,81$; $p < 0,001$; alles Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$).

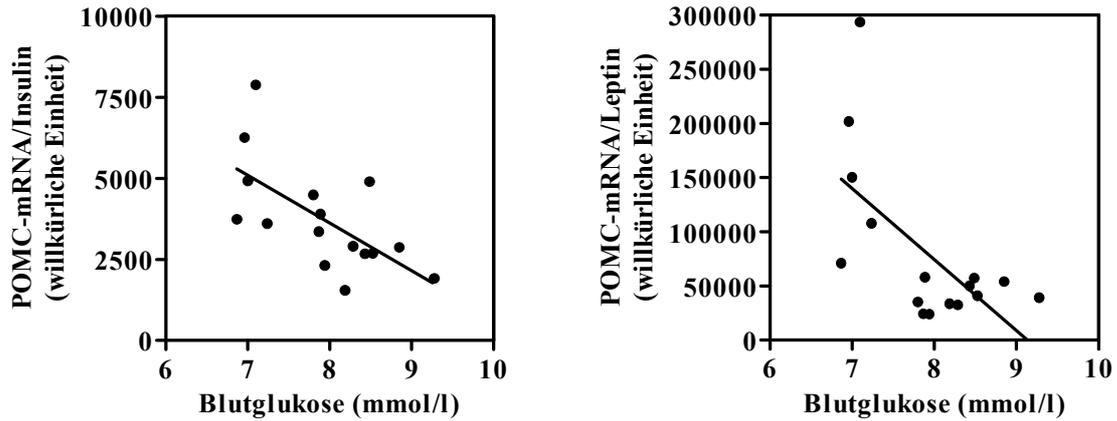


Abbildung 3.9:

Beziehung zwischen einem Quotienten, gebildet aus den Absolutwerten der hypothalamischen POMC-mRNA und den Serumwerten von Insulin bzw. Leptin, und der Konzentration der Plasmaglukose bei allen untersuchten Ratten (NW und KW: links $r = -0,67$; $p < 0,01$; rechts $r = -0,52$; $p < 0,05$; Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$).

3.4 Morphometrie des Nucleus arcuatus hypothalami (ARC)

In der Dichte POMC-immunopositiver Zellen im ARC fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren aus kleinen Würfen und Tieren der Kontrollgruppe (s. Tab. 3.3.).

	POMC-Zelldichte pro mm^3 *
NW	$361,8 \pm 37,1$
KW	$395,3 \pm 6,8$

Tabelle 3.3:

Dichte immunopositiver Zellen für POMC im Nucleus arcuatus hypothalami 21 Tage alter Tiere aus kleinen Würfen (KW; $n = 6$) im Vergleich zu Kontrolltieren (NW; $n = 5$): Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SEM); * $p = 0,42$ (Students t-Test).

3.5 Methylierungsstatus

Die in dieser Studie auf Methylierungen untersuchte Promotersequenz war 404 Basenpaare lang, beinhaltete 21 CpG-Stellen und deckte die Bindungsstellen von 16 verschiedenen Transkriptionsfaktoren ab, wie z.B. von STAT3, Sp1, Nf-κB und nGRE (s. Abb. 3.10).

-411	TCATTAGTGA TATTTACCTC <u>CAAATGCCAG</u> <u>GAAGGCAGAT</u> <u>GGACGCACAC</u>	>	NUR-Faktoren	<	<u>STAT 3</u>	<u>E-Box</u>
-361	AGGTAATTCC ACTCCATTCT GTAAGACCTC AGAACTAGGC <u>CTGCCTCACA</u>					<u>TRE</u> > T-pit
-311	CCAGGATGCT <u>AAGCCTCTGT</u> CCAGTCCTGA GTGGAGATCC AACAGCATCC	<	<u>Pitx 1</u>			<u>Brn 3.0</u> >
-261	<u>TTAATTAAGT</u> TCCTCCTGAC CAC <u>CGGGGCC</u> <u>AGGTGTGCGC</u> TTCAG <u>CGGGT</u>	PP1	<		<u>E-Box</u>	
-211	CTGTGCTAAC <u>GCCAGCCTCC</u> <u>GCACTTTCCA</u> GGCACATCTG CTGTG <u>CGCGC</u>	>	PP1	<	<u>Sp1</u>	<u>E-Box</u> >PCRH-RE/MRE
-161	AGCCCC <u>GACC</u> <u>GGAAGCCCC</u> <u>CCCTCCCGCG</u> <u>GCCCGCCGCC</u> CCCCTT <u>CGCG</u>	<	<u>Nf-κB</u>	>	Sp1	< Ap2
-111	TGGCC <u>GGGA</u> TT <u>CGCTTGT</u> <u>GCGTTGCAGA</u> AG <u>CGCTGCCA</u> <u>GGAAGGTCAC</u>					<u>nGRE</u>
-61	<u>GTCCAAGGCT</u> CACCCACCCA ACCCTGCAGG TATAAAAGAA GAG <u>AGAAGAG</u>					<u>PO-B</u>
-11	<u>TGACAGGGAC</u> CA -> Transkriptionsstart					

Abbildung 3.10:

Sequenz des untersuchten POMC-Promoterfragmentes: Rot markiert sind die CpG-Stellen. Durch Unterstreichung, Kursivschreibung oder durch Pfeile markiert sind die Bindungsstellen der folgenden Transkriptionfaktoren: Faktoren der NUR-Familie, STAT3, E-Box, TRE, T-pit, Pitx 1, Brn 3.0, PP1, Sp1, MRE, PCRH-RE, Nf-κB, AP 2, nGRE sowie PO-B.

3.5.1 Gruppenvergleiche

3.5.1.1 CpG-Stellen

In die Auswertung gingen zunächst alle 21 Cytosine in CpG-Position der betrachteten Sequenz ein. Es wurden die prozentualen Mittelwerte methylierter CpG-Stellen aller Klone (15 - 18 Klone pro Tier; 8 Tiere pro Gruppe) von Tieren aus kleinen Würfen gebildet und denen von Tieren aus normalen Würfen gegenüber gestellt. Es zeigte sich das in Grafik 3.11 wiedergegebene Bild eines komplexen Methylierungsmusters.

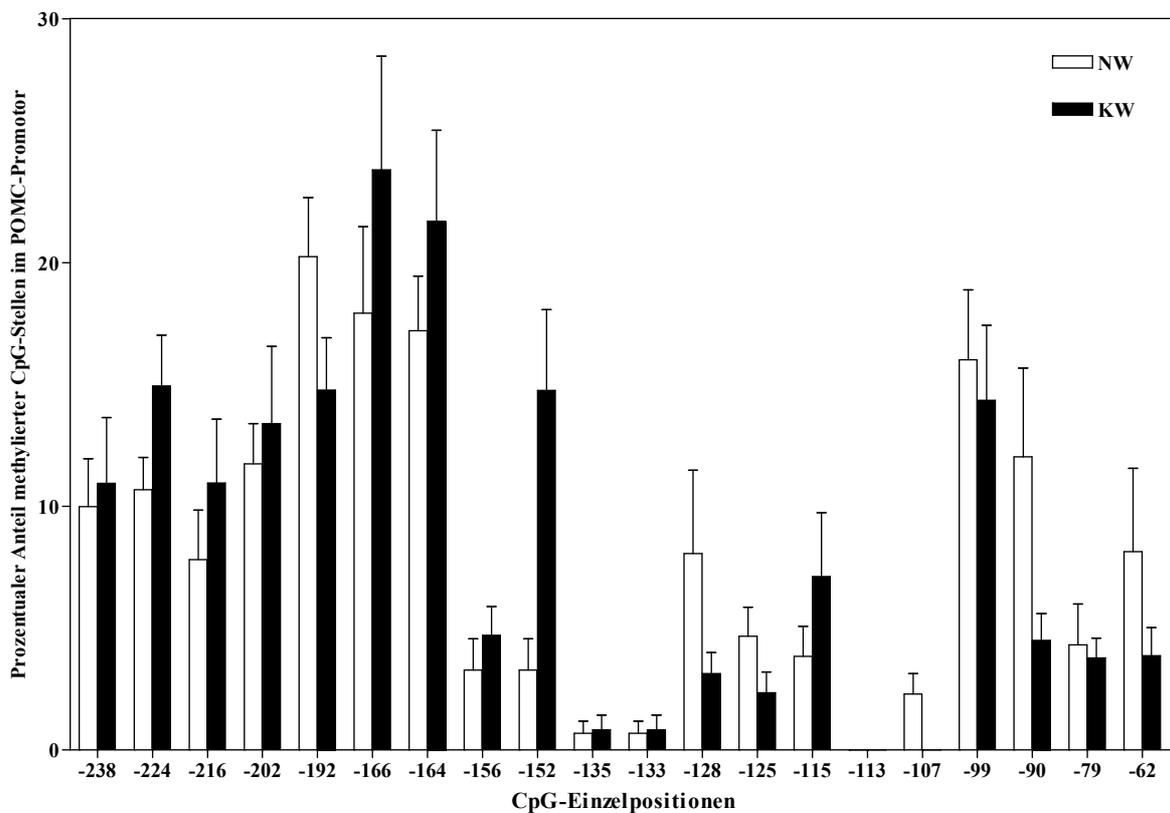


Abbildung 3.11:

Prozentualer Anteil von Cytosinmethylierungen an den einzelnen CpG-Stellen des POMC-Promotors bei Tieren aus kleinen Würfen (KW; n = 8) gegenüber Kontrolltieren (NW; n = 8). Ohne CpG-Stelle -368 zum Zwecke der optimalen Skalierung: hier NW $84,4 \pm 12,1$ vs. KW $84,2 \pm 7,3$. Angaben in Mittelwerte in Prozent (MW) \pm Standardfehler (SEM).

Die einzelnen CpG-Dinukleotide wiesen Methylierungsanteile zwischen minimal null und maximal 84 Prozent auf. Es bestand eine Tendenz zu einem höheren Methylierungsanteil der mehr stromaufwärts gelegenen CpG-Stellen (Nukleotid -152 bis -368) und zu einem niedrigeren Methylierungsanteil der weiter stromabwärts gelegenen CpG-Stellen (Nukleotid -135 bis -62).

Im Mittel lagen sowohl in der Versuchsgruppe (KW) als auch in der Kontrollgruppe (NW) ca. 12 Prozent aller CpG-Stellen im POMC-Promoter methyliert vor (NW $12,1 \pm 1,3$ % vs. KW $12,1 \pm 1,3$ % mit jeweils $n = 8$; Mittelwerte in Prozent \pm Standardfehler; Gruppenunterschied war nicht signifikant im Students t-Test). Das heißt, dass in der Gesamtmenge an CpG-Methylierungen des POMC-Promoters kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand.

3.5.1.2 3.5.1.2 Transkriptionsfaktoren

Es folgte nun die Überprüfung von Methylierungen innerhalb der einzelnen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im POMC-Promoter. Außer AP1 konnten alle bekannten genregulatorischen Elemente des POMC-Gens in die Analyse miteinbezogen werden.

Die Sequenzen der folgenden Transkriptionsfaktoren beinhalteten ein oder mehrere CpG-Dinukleotide und waren daher für Methylierungen besonders zugänglich: PP1 (bei Nukleotid -211), Sp1 (bei Nukleotid -201), PCRH-RE bzw. MRE, Nf- κ B, AP2 und nGRE (siehe Promotor-darstellung in Abb. 3.10). Auf diesen Transkriptionsfaktoren soll im Weiteren der Fokus liegen, da funktionelle Zusammenhänge zwischen der Methylierung von genregulatorischen Elementen und der Expression des nachgeschalteten Gens bislang vor allem für CpG-haltige Sequenzen beschrieben worden sind.

Bei den anderen bekannten Bindungsstellen innerhalb des POMC-Promotors (Brn 3.0, E-Box, NUR-RE, PO-B, PP1 262, Ptx1, T-pit und TRE, Sp1 bei Nukleotid -146 sowie STAT3) lagen die Cytosine nicht in CpG-Position. Für diese sei zusammenfassend gesagt, dass hier die non-CpG-Methylierung einen Anteil von unter einem Prozent zeigte und sich die Methylierungsmuster nicht zwischen Versuchs- und Kontrolltieren unterschieden (ohne Abbildung).

3.5.1.2.1 Nf-κB

Es fand sich ein signifikanter Gruppenunterschied des Gehalts an CpG-Methylierungen innerhalb der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors Nf-κB zwischen Tieren aus kleinen Würfen und Kontrolltieren. Interessanterweise zeigte sich ein erhöhter Methylierungsgrad bei denjenigen Tieren, welche in kleinen Würfen aufgezogen wurden (s. Abb. 3.12).

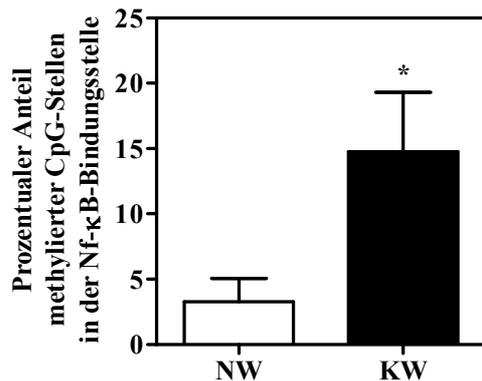


Abbildung 3.12:

Prozentualer Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Nf-κB-Bindungsstelle im POMC-Promoter von Tieren aus kleinen Würfen (KW, n = 8) und von Kontrolltieren (NW, n = 8): MW ± SEM, * p < 0,05 (Students t-Test).

3.5.1.2.2 Sp1

Innerhalb der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors Sp1 bei Nukleotid -201 zeigte sich ein auffälliger Gruppenunterschied im Gehalt an CpG-Methylierungen, welcher jedoch statistisch nicht signifikant war (NW: 26,1% ± 5,1 versus KW: 14,8% ± 2,9; r = 0,21; p = 0,07 mit n = 16 im Students t-Test). Die andere Bindungsstelle von Sp1 bei Nukleotid -146 beinhaltet kein CpG-Dinukleotid und wies auch keinerlei Methylierungen seiner non-CpG-Stellen auf.

Es ist möglich, dass Methylierungen innerhalb der Bindungssequenz von Sp1 keinen hemmenden Effekt auf die Fähigkeit von Sp1 zur Anlagerung an seine DNA-Sequenz haben (Harrington et al. 1988). Vielmehr sind es oftmals Methylierungen an Cytosinen, die stromaufwärts der eigentlichen Bindungsstelle liegen, die die Anlagerung von Sp1 verhindern (Clark et al. 1997, Zhu et al. 2003).

Es lag somit nahe, die CpG-Dinukleotide an den Positionen -156 und -152 stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle „146“ (bei Basenpaar -146) sowie das Dinukleotid -202 stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle „201“ (bei Basenpaar -201) auf veränderte Methylierungsmuster zu untersuchen.

Tatsächlich fanden sich mehr Methylierungen an den CpG-Stellen stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle „146“ (im folgenden Sp1 146 genannt) bei Tieren der Versuchsgruppe als bei denen der Kontrollgruppe, wobei der Gruppenunterschied statistisch signifikant war (s. Abb. 3.13).

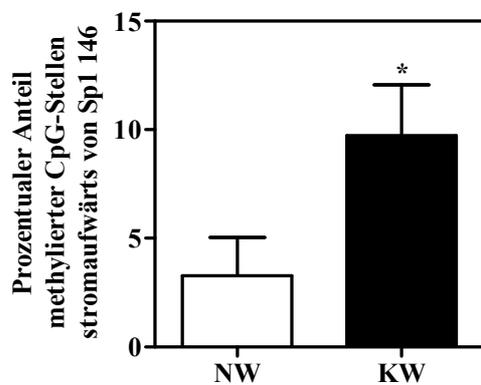


Abbildung 3.13:

Prozentualer Anteil methylierter CpG-Stellen stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle 146 bei Tieren aus kleinen Würfen (KW, n = 8) und der Kontrollgruppe (NW, n = 8): MW \pm SEM, * $p < 0,05$ (Students t-Test).

Dabei sei angemerkt, dass das CpG-Dinukleotid -152 stromaufwärts von Sp1 146 innerhalb der Nf- κ B-bindenden Sequenz lag (s. Abb. 3.10). Die Beobachtung veränderter Methylierung bei Cytosinen stromaufwärts einer transkriptionsfaktorenbindenden DNA-Sequenz ließ sich nicht treffen für die andere Sp1-Bindungsstelle bei Nukleotid -201.

3.5.1.2.3 nGRE

Zusammenfassend zeigten die CpG-Positionen der aktivierenden Transkriptionsfaktoren Nf- κ B und Sp1 146 bei Tieren aus kleinen Würfen einen erhöhten Gehalt an Cytosinmethylierungen. Im Gegensatz dazu präsentierte die Sequenz des einzig hemmenden Transkriptionsfaktors im POMC-Promotor namens nGRE (Riegel et al. 1990 und 1991) einen niedrigeren CpG-Methylierungsgrad bei Tieren aus kleinen Würfen, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war (s. Abb. 3.14).

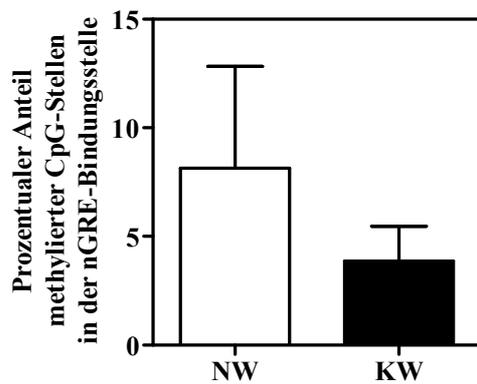


Abbildung 3.14:

Prozentualer Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Bindungsstelle nGRE bei Tieren aus kleinen Würfen (KW, n = 8) und der Kontrollgruppe (NW, n = 8): MW \pm SEM, Gruppenunterschied nicht signifikant im Students t-Test.

3.5.1.2.4 PP1, PCRH-RE/MRE und AP2

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über den Anteil methylierter CpG-Dinukleotide innerhalb der drei übrigen oben genannten funktionell bedeutsamen Bindungsstellen. Je nach Sequenz lagen zwischen null und maximal dreiundzwanzig Prozent aller CpG-Stellen einer Bindungssequenz methyliert vor (s. Tab. 3.4). Ein signifikanter Methylierungsunterschied zwischen Tieren aus kleinen Würfen und normalernährten Tieren bestand bei keiner dieser Bindungsstellen.

Transkriptionsfaktor	CpG-Dinukleotid(e)	Methylierung in Prozent (MW ± SEM) *	
		NW	KW
PP1 211	-202	11,7 ± 6,4	13,4 ± 12,3
PCRH-RE bzw. MRE	-166, -164	17,6 ± 10,2	22,8 ± 14,6
AP2	-135	0,7 ± 2,0	0,8 ± 2,4

Tabelle 3.4:

Prozentualer Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im POMC-Promoter. Zeichenerklärung: MW: Mittelwert in Prozent; SEM: Standardfehler; KW: Tiere aus kleinen Würfeln (n = 8); NW: Kontrolltiere (n = 8); * p > 0,05 bzw. nicht signifikant im Students t-Test.

3.5.2 Korrelationen

3.5.2.1 Korrelation zwischen Promotormethylierung und Genexpression

Da die Expression des anorexigenen Neuropeptids POMC in hohem Maße abhängig von den im Blut zirkulierenden Sättigungsparametern Insulin und Leptin ist, sollte die POMC-Expression nicht abgekoppelt von diesen betrachtet werden. Es wurde daher ein Quotient zwischen dem Gehalt an POMC-mRNA im Hypothalamus und den Serumwerten von Insulin respektive Leptin gebildet. Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen diesen Quotienten und dem Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Nf-κB-Bindungssequenz, welcher statistisch signifikant war für die insulinabhängige POMC-Expression (s. Abb. 3.15 oben). In gleicher Weise zeigte sich dieser Zusammenhang bei den CpG-Stellen stromaufwärts der Sp1-bindenden Sequenz 146: Die Methylierungen korrelierten statistisch signifikant negativ mit dem Quotienten aus POMC-mRNA und Leptin bzw. Plasmainsulin (s. Abb. 3.15 unten).

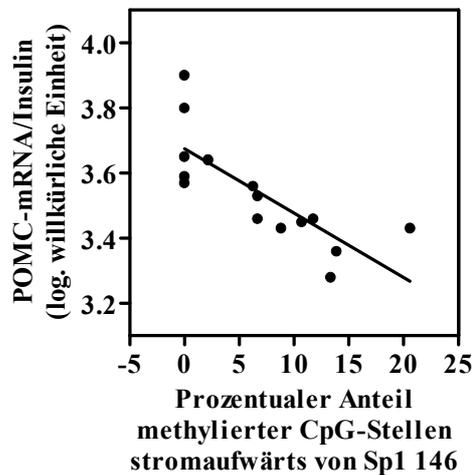
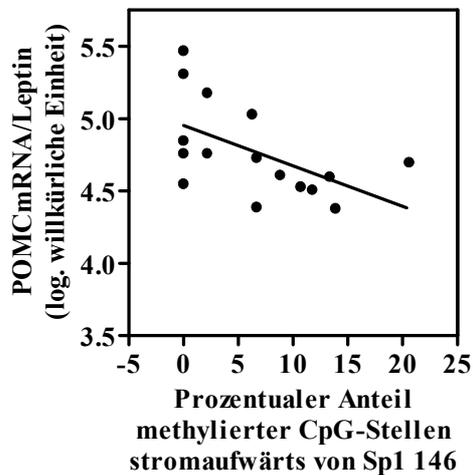
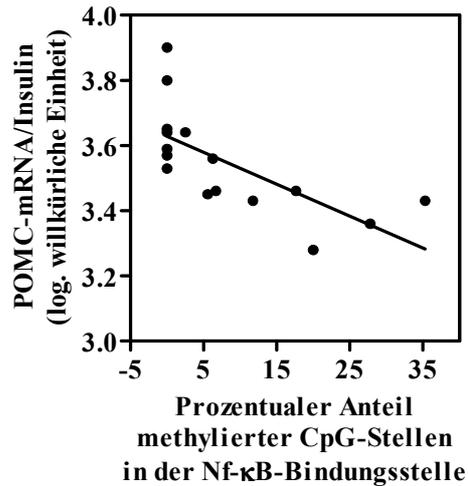
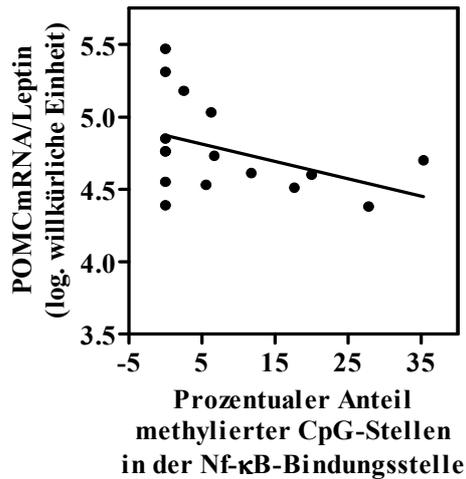


Abbildung 3.15:

Beziehung zwischen einem Quotienten, gebildet aus dem Gehalt an POMC-mRNA im Hypothalamus und den Plasmakonzentrationen von Leptin (links; $r = -0,45$; $p = 0,08$) bzw. Insulin (rechts; $r = -0,85$; $p < 0,001$), und dem prozentualen Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Bindungssequenz von Nf- κ B (oben) bzw. stromaufwärts von Sp1 146 (unten) im POMC-Promotor 21 Tage alter Ratten (NW und KW; Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$).

3.5.2.2 Korrelation zwischen Promotormethylierung und biometrischen Parametern

Es fanden sich statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen den Körpergewichten der untersuchten Ratten und dem Anteil methylierter CpG-Dinukleotide innerhalb der Nf- κ B-Bindungssequenz sowie stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle 146 ($r = 0,67$; $p < 0,05$; NW und KW; Rangkorrelation nach Spearman mit $n = 16$).

3.5.2.3 Korrelation zwischen Promotormethylierung und Stoffwechselfparametern

Des Weiteren wurde überprüft, ob ein Zusammenhang bestand zwischen den Stoffwechselfparametern der untersuchten Tiere und dem Methylierungsgrad des POMC-Promotors bzw. der einzelnen Bindungsstellen.

Dabei zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Blutglukosekonzentration und dem Anteil methylierter CpG-Stellen der gesamten untersuchten Promotorsequenz (s. Abb. 3.16).

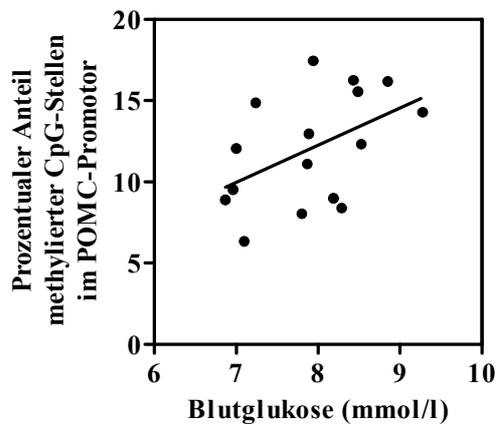


Abbildung 3.16:

Beziehung zwischen dem prozentualen Anteil methylierter CpG-Stellen im untersuchten POMC-Promotorfragment und der Konzentration der Plasmaglukose bei allen 16 untersuchten Ratten ($r = 0,52$; Rangkorrelationen nach Spearman mit $p < 0,05$; NW und KW).

Auch auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren fand sich dieser Zusammenhang: Der Anteil methylierter CpG-Stellen innerhalb der Nf- κ B-Bindungssequenz korrelierte ebenfalls signifikant positiv mit den Werten der Blutglukose aller untersuchten Tieren ($r = 0,51$; $p < 0,05$; alles Rangkorrelationen nach Spearman mit $n = 16$). Eine positive Korrelation zur Plasmaglukose, die statistisch jedoch nicht signifikant ist, fand sich darüber hinaus bei den CpG-Methylierungen stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle 146 ($r = 0,46$; $p = 0,07$).

Des Weiteren korrelierten die CpG-Methylierungen innerhalb der Nf- κ B-Bindungsstelle signifikant positiv mit den Plasmawerten von Insulin ($r = 0,53$; $p < 0,05$). Derselbe Zusammenhang zwischen Plasmainsulin und Methylierungen ließ sich stromaufwärts der Sp1-Sequenz 146 ausmachen ($r = 0,52$; $p < 0,05$).

Darüberhinaus zeigte die Insulin-Glukose-Ratio ebenfalls signifikant positive Korrelationen zu den Methylierungen innerhalb der Bindungsstellen von Nf- κ B ($r = 0,52$; $p < 0,05$) und stromaufwärts von Sp1 146 ($r = 0,50$; $p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Der Phänotyp neonatal überernährter Ratten

Der vorliegenden Studie lag die Frage zugrunde, ob neonatale Überernährung zu epigenetischen Veränderungen innerhalb des Promotors von Proopiomelanocortin führen könnte. Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsanordnung entsprechend dem „Modell der kleinen Würfe“ gewählt, um bei neugeborenen Ratten eine Überernährung und damit Übergewicht zu induzieren (Faust et al. 1980). In der Versuchsgruppe erfolgte am dritten Lebenstag eine Reduktion der primären Wurfgröße von ursprünglich im Durchschnitt zwölf Neugeborenen auf nur noch drei pro Mutter (Fiorotto et al. 1991, Plagemann et al. 1999a, Boullu-Ciocca et al. 2005). Die Muttertiere dieser Gruppe (sogenannter kleiner Wurf; Abkürzung KW) versorgten auf diese Weise während der gesamten Stillzeit ihre wenigen Jungtiere mit einer Menge Milch, die für zwölf Nachkommen vorgesehen worden war.

Das Überangebot an Nahrung führte zu einem raschen Anstieg des Körpergewichts und der Größe der Neonaten. Zum Zeitpunkt des Absetzens am 21. Lebenstag waren die Tiere, die in kleinen Würfen aufgezogen worden waren, signifikant schwerer als die Tiere der Kontrollgruppe, die das Nest mit zwölf Geschwistern geteilt hatten (normaler Wurf; Abkürzung NW). Insbesondere war der Körperfettanteil überernährter Tiere signifikant erhöht. Die Hyperphagie der neonatal überernährten Ratten persistiert lebenslang (Voits et al. 1996) und führt zu bleibender Adipositas (Plagemann et al. 1992, Waterland und Garza 2002). In Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Ratten aus kleinen Würfen im Erwachsenenalter einen Symptomenkomplex aus gestörter Glukosetoleranz, Insulinresistenz, Hypertriglyzeridämie und arteriellem Hypertonus entwickeln, der dem metabolischen Syndrom des Menschen ähnelt (Plagemann et al. 1999a). Dies wurde bestätigt durch eine andere Arbeitsgruppe, welche das gleiche Tiermodell benutzt (Boullu-Ciocca et al. 2005). Auch in der vorliegenden Studie präsentierten die übergewichtigen Jungtiere bereits eindeutige metabolische Veränderungen: Sie waren hyperglykämisch und hatten gegenüber den normalgewichtigen Vergleichstieren deutlich erhöhte Blutspiegel der Hormone Insulin und Leptin. Ein Indiz für das Vorliegen einer Insulinresistenz war die zweifach erhöhte Insulin-Glukose-Ratio bei den Tieren aus kleinen Würfen, welche wiederum positiv mit den Körpergewichten und den Leptinspiegeln korrelierte.

4.2 Die Fehlregulation des anorexigenen Neuropeptids POMC

Der Anstieg der Sättigungsparameter (Insulin, Leptin) im Blut sollte im Hypothalamus physiologisch zu einer Stimulation der Expression und Ausschüttung des Neuropeptids Proopiomelanocortin (POMC) führen, von welchem α -MSH abgespalten wird, das die weitere Nahrungsaufnahme stoppt (Brown et al. 2006). Tatsächlich ergab sich bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Messungen für die Tiere aus kleinen Würfen jedoch weder eine verstärkte Immunopositivität für POMC im Nucleus arcuatus hypothalami noch eine erhöhte Expression der mRNA von POMC im Hypothalamus. Darüberhinaus korrelierte die POMC-Expression nicht mit den zur selben Zeit im Blut herrschenden Spiegeln von Insulin oder Leptin.

Das lässt auf eine Störung des hormonellen Regelkreises von Hunger, Nahrungsaufnahme und Sättigung schließen. Es wurde ein Quotient gebildet aus den Werten der POMC-mRNA und den Serumkonzentrationen von Insulin bzw. Leptin. Nun zeigte sich bei den Versuchstieren eine signifikante Erniedrigung beider Quotienten gegenüber den Kontrolltieren. Das heißt, dass die leptin- bzw. insulinabhängige Expression des anorexigenen POMC herunterreguliert ist bei überernährten Ratten. Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Quotient aus POMC-mRNA und Leptin bzw. Insulin umso niedriger war, je schwerer die Tiere waren und je höher ihre Blutglukose, ihre Insulin- bzw. Leptinwerte waren (signifikant inverse Korrelationen). Die Ratten mit dem höchsten Gewicht und den höchsten Sättigungsparametern im Blut wiesen also die niedrigste Expression des die Nahrungsaufnahme hemmenden Neuropeptids auf. Dies steht im Gegensatz zum physiologischen Regelmechanismus und entspricht einer Fehlregulation oder auch bei Fortbestehen einer Fehlprogrammierung dieses hypothalamischen Sättigungssystems.

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden bereits die Auswirkungen der neonatalen Überernährung von Ratten auf das hypothalamische Neuropeptid Y (NPY) und auf Galanin untersucht, welche die Nahrungsaufnahme stimulieren und zu einer Körpergewichtszunahme führen. Physiologischerweise wird die Expression und Freisetzung von Neuropeptid Y und Galanin durch erhöhte Leptin- und Insulinspiegel gehemmt und damit die weitere Nahrungsaufnahme gestoppt (Kalra und Kalra 2003). Unsere Arbeitsgruppe stellte fest, dass bei adulten neonatal überernährten Ratten trotz der peripheren und intrahypothalamischen Hyperinsulinämie ein Anstieg und keine Reduktion von Galanin und Neuropeptid Y in Neuronen des Hypothalamus zu verzeichnen war (Plagemann et al. 1999a bzw. b, Lopez et al. 2005). Wei-

terhin zeigten Ratten, die in kleinen Würfen aufgezogen wurden, eine im Vergleich zu normal ernährten Ratten verminderte Inhibition der NPY-exprimierenden Neuronen in Nucleus arcuatus hypothalami durch Leptin und Insulin (Plagemann und Davidowa 2000 und 2007), was für eine erworbene Insulin- und Leptinresistenz dieser hypothalamischen Neurone spricht.

Innerhalb des Nucleus arcuatus tragen sowohl Neurone, die die orexigenen Neuropeptide NPY und AgRP co-exprimieren, als auch die POMC-exprimierenden Neurone den Leptinrezeptor und reagieren sensibel auf Veränderungen des Nahrungsangebots (Baskin et al. 1999). Dieser Kern scheint somit vielleicht der wichtigste Angriffspunkt für die im Blut zirkulierenden Stoffwechselformone zu sein und projiziert in weitere hypothalamische Kerngebiete, die Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase regeln (Blevins und Baskin 2010). Bei Nagetieren ist erst in der dritten postnatalen Woche die Entwicklung seiner Nervenzellprojektionen in die anderen Kerngebiete abgeschlossen (Grove et al. 2005). Diese ersten Lebenswochen sind ein wichtiges Zeitfenster, in dem sich ein hypothalamisches Regelsystem differenziert, welches das Körpergewicht und die Energiebalance im weiteren Leben zentral steuert. Metabolische Störungen wie Hyperinsulinämie oder Hyperleptinämie innerhalb dieser kritischen Periode führen zur Prägung der noch sensiblen neuronalen Pfade und könnten durch Programmierung der Expressionsmuster von Neuropeptidgenen zu lebenslangem Übergewicht führen (Plagemann 2004).

4.3 Das Methylierungsmuster des hypothalamischen POMC-Promotors

Die DNA-Methylierung ist der bekannteste epigenetische Mechanismus, welcher zu einer dauerhaften Prägung von Stoffwechselprozessen durch Programmierung der Genexpression führen kann (Waterland und Garza 1999). Bei Säugetieren finden sich Methylierungen vor allem an Cytosinen in Dinukleotidformation mit Guanosin, abgekürzt CpG. CpGs sind innerhalb der DNA unterrepräsentiert und finden sich gehäuft in sogenannten CpG-Inseln (Gardiner-Garden und Frommer 1987). Außerhalb von CpG-Inseln sind normalerweise 60 – 90 Prozent aller CpG-Dinukleotide methyliert (Bird 1986), während CpG-Inseln weitgehend unmethyliert vorliegen (Antequera und Bird 1993). Der Promotor des POMC-Gens liegt in einer CpG-Insel (Gardiner-Garden und Frommer 1994). Diese wurde in einer 2001 von Newell-Price und Kollegen veröffentlichten Publikation als vollständig demethyliert in verschiedenen humanen POMC-exprimierenden Geweben beschrieben. Bereits eine geringe Erhöhung des Methylierungsgrades der POMC-Promoterregion führte hier zur Hemmung der Expression (Newell-Price et al. 2001).

Um der Fehlregulation der Neuropeptidexpression bei überernährten Ratten auf den Grund zu gehen, wurde in der vorliegenden Studie der POMC-Promotor einer Methylierungsanalyse unterzogen. Es wurde die Methode der Natriumbisulfitbehandlung mit nachfolgender Sequenzierungs-PCR gewählt, um jede einzelne Cytosinmethylierung im Promotor sichtbar zu machen (Olek et al. 1996). So konnten auch Methylierungen innerhalb der einzelnen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren ausgewertet werden.

Bemerkenswerterweise fand sich in der vorliegenden Studie der POMC-Promotor nicht vollständig demethyliert vor, wie es nach Newell-Price für exprimierendes Gewebe eventuell zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr zeigte sich ein heterogenes Methylierungsmuster mit einem Methylierungsanteil zwischen null und 84 Prozent der einzelnen CpG-Dinukleotide des Promotors. Im Mittelwert erwiesen sich hier 12 Prozent der untersuchten CpG-Stellen als methyliert. Anzumerken sei, dass in der Arbeit von Newell-Price humanes Tumorgewebe als POMC-exprimierendes Gewebe herangezogen wurde. Es ist ein Charakteristikum von entarteten Zellen, dass sich die Methylierungsmuster ihrer DNA stark von normalem Gewebe unterscheiden (Ehrlich 2002). In der vorliegenden Studie wurde der gesamte Hypothalamus von neonatal überernährten und normal ernährten Ratten präpariert. Demnach wird hier zum ersten Mal das Methylierungsmuster des POMC-Promotors erstens im Hypothalamus und zweitens bei Ratten vorgestellt.

Interessanterweise unterschied sich der Gesamtanteil methylierter CpG-Stellen im betrachteten POMC-Promotor nicht zwischen überernährten Ratten aus kleinen Wurfen und Kontrolltieren. Die oben beschriebenen Expressionsunterschiede der mRNA von POMC zwischen diesen beiden Gruppen sowie die expressionshemmende Wirkung von DNA-Methylierung schienen also nicht auf den Gesamtgehalt der CpG-Methylierung innerhalb des Promotors zurückzuführen zu sein. Es ist jedoch nicht zwingend, dass die Genexpression zur Gesamtpromotormethylierung einen inversen Zusammenhang zeigt. Vielmehr sind es oft Methylierungen innerhalb der Bindungssequenzen von regulatorischen Proteinen, z. B. von STAT3 (Chen et al. 2000), die eine Wirkung auf die Transkription des nachgeschalteten Gens innehaben. Es sind eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren beschrieben, die innerhalb des POMC-Promotors binden, unter anderem auch STAT3 (Bousquet et al. 2000). Einige dieser Faktoren sind nachgewiesen expressionsrelevant für das POMC-Gen, wie z.B. Nf- κ B (Karalis et al. 2004) oder nGRE (Riegel et al. 1990 und 1991), andere sind rein putativ wie PP1 (Liu et al. 1995).

Alle bislang für POMC bekannten Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren konnten in der Sequenz des POMC-Promotors der Ratte identifiziert und exakt lokalisiert werden. Die POMC-Promotorsequenz stammte aus einer Genomdatenbank und basiert auf einer Veröffentlichung von Drouin und Kollegen (Drouin et al. 1985). Durch das Alignment von POMC-Sequenz und Bindungsstellen zeigte sich, dass lediglich folgende regulatorische Gensequenzen im POMC-Promotor ein oder mehrere CpG-Dinukleotid(e) beinhalten und daher methylierungssensitiv sind: AP2 (Hermann und Doerfler 1991, Bishop et al. 1990 und 1993, Jin et al. 1994), MRE bzw. PCRH-RE (Culotta und Hammer 1989, Jin et al. 1994), Nf-κB (Bednarik et al. 1991, Jin et al. 1994), nGRE (Saluz et al. 1986, Drouin et al. 1989, Riegel et al. 1990 und 1991), PP1 211 (Liu et al. 1995) sowie Sp1 (Liu et al. 1995, Liedtke et al. 2005).

Für diese Bindungsstellen fanden sich in der vorliegenden Studie recht unterschiedliche Ergebnisse des Methylierungsgrades. Zum Beispiel lag die CpG-Stelle der AP2-Sequenz beinahe immer demethyliert vor, während die Bindungssequenzen von MRE und Sp1 den höchsten Anteil an CpG-Methylierung von 23 bzw. 26 Prozent aufwiesen. Zusammengefasst war das Muster der CpG-Methylierungen des hypothalamischen POMC-Promotors nicht homogen und zeigte an drei regulatorischen Stellen spezifische Veränderungen bei neonatal überernährten Versuchstieren. So beobachteten wir bei Tieren aus kleinen Würfen einen signifikant erhöhten Anteil an CpG-Methylierungen bei den Bindungsstellen der aktivierenden Transkriptionsfaktoren Nf-κB sowie Sp1. Im Gegensatz dazu war bei denselben Tieren der Anteil an CpG-Methylierungen innerhalb der Bindungsstelle des inhibierend wirkenden Transkriptionsfaktors nGRE eher vermindert. Die CpG-Methylierungen der Sequenzen von AP2, MRE sowie PP1 wiesen dagegen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Im Folgenden werden die Methylierungsalterationen bei Tieren aus kleinen Würfen und die dazugehörigen Transkriptionsfaktoren im Detail diskutiert.

4.3.1 Methylierungsalterationen innerhalb der Bindungsstelle von Nf-κB

Neonatale Überernährung durch Aufzucht von Ratten in kleinen Würfen führte zu einer epigenetischen Modifikation der DNA-Sequenz, welche den Transkriptionsfaktor Nuklearfaktor kappaB (Nf-κB) bindet. Es fanden sich hier im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr CpG-Methylierungen.

Da Cytosinmethylierungen innerhalb der Nf- κ B-Erkennungssequenz die Bindung des Nf- κ B-Proteinkomplexes an die DNA hemmen (Bednarik et al. 1991), könnte Nf- κ B unter diesen Bedingungen seine transkriptionsaktivierende Wirkung auf das POMC-Gen nicht mehr oder nur in reduzierter Form entfalten. Dies könnte erklären, warum die Expression des anorexigenen POMC bei überernährten Tieren so gering ausfiel im Verhältnis zu deren hohen Insulin- und Leptinspiegeln. Im Folgenden sollen die bis dato bekannten Eigenschaften und Funktionen von Nf- κ B, sowie die (pathologischen) Prozesse, in die dieser Transkriptionsfaktor involviert ist, näher beleuchtet werden.

Nf- κ B gehört zur Familie der ubiquitär exprimierten Rel-Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von vielen verschiedenen Genen regulieren (Rushlow und Warrior 1992). Er besteht aus zwei Untereinheiten, befindet sich normalerweise im Zytoplasma und liegt dort durch die Assoziation mit einem inhibitorischen Protein namens I- κ B in einem inaktivierten Zustand vor (May und Gosh 1998). Es sind fünf verschiedene Proteine bekannt, aus denen der zytoplasmatische NF- κ B zusammengesetzt sein kann: RelA bzw. p65, RelB, c-Rel, p50 und p52, wobei die klassische Dimer-Kombination aus p65 und p50 besteht (May und Gosh 1998). Die Aktivierung von Nf- κ B erfolgt, wenn spezifische Signalmoleküle an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzen, die primär zur Aktivierung von Nf- κ B-induzierenden Kinasen wie NIK, IKK-1 und IKK-2 führen. Die zwei letztgenannten phosphorylieren Serinreste des inhibitorischen I- κ B, wodurch dieses ubiquityliert und in Proteosomen abgebaut wird. Auf diese Weise wird das p65/p50-Dimer freigesetzt (Zandi et al. 1997). Es transloziert in den Zellkern, bindet dort im Promotorbereich seiner Zielgene und initiiert deren Transkription.

Nf- κ B reguliert die Expression von über 150 Genen, die unter anderem bei Entzündungsreaktionen, bei der Immunantwort, der Proliferation, der Tumorgenese oder der Apoptose eine fundamentale Rolle spielen. Es sind aber auch genauso viele Stimuli bekannt, durch deren Wirkung die Nf- κ B-induzierenden Kinasen aktiviert werden, wie z. B. bakterielle und virale Antigene, Interleukine, TNF α und β , UV-Strahlung oder auch oxidativer Stress. Nf- κ B ist damit einer der am umfangreichsten untersuchten Transkriptionsfaktoren überhaupt (Übersicht z. B. bei Pahl 1999). Da Nf- κ B von so zentralen Immunmodulatoren wie TNF- α oder IL-1 oder -2 nicht nur aktiviert wird, sondern die Genexpression derselben Zytokine auch stimuliert, wird ihm eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Stresszuständen z. B. im Rahmen von schweren Krank-

heitsbildern wie akutem Lungenversagen (ARDS) (Schwartz et al. 1996) oder Tumorerkrankungen (Rayet et al. 1999) zugeschrieben.

Auch in zentralnervösen Synapsen und Neuronen konnte der Nuklearfaktor nachgewiesen werden. Er scheint Transmitterfunktionen inne zu haben und ist in Lernprozesse sowie in die Neuroprotektion bzw. -degeneration involviert (Übersicht bei Kaltschmidt et al. 2005). Hervorzuheben ist, dass die p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors in Neuronen des lateralen Hypothalamus von Ratten mit α -MSH co-lokalisiert ist (Joseph et al. 1996). De Souza und Mitarbeiter untersuchten 2005 die Wirkung einer 16wöchigen fettreichen Ernährung auf die Expression von Nf- κ B und anderen Genen speziell im Hypothalamus von Ratten. Sie fanden unter anderem die mRNA von Nf- κ B signifikant erhöht und konnten nachweisen, dass die Signalkaskade des Insulinrezeptors gestört war (De Souza et al. 2005). Dieses gleichzeitige Vorliegen von Insulinresistenz, Nf- κ B-Aktivierung und erhöhten proinflammatorischen Faktoren wurde bislang nicht nur in hypothalamischen Neuronen festgestellt sondern auch in Adipozyten (Ruan et al. 2002) und in Hepatozyten (Cai et al. 2005, Arkan et al. 2005). Die Beteiligung von Nf- κ B an der Manifestation des metabolischen Syndroms und der Insulinresistenz wird in der Literatur vielfach diskutiert (Übersicht z. B. bei Sonnenberg et al. 2004). Nahrungsaufnahme (Aljada et al. 2004), Hyperglykämie (Yerneni et al. 1999), Insulin (Bertrand et al. 1995), aber auch Leptin (Bouloumié et al. 1999) führen zu erhöhten Spiegeln von Nf- κ B in der Zelle, was TNF α (Drouet et al. 1991) und weitere inflammatorische Zytokine aktiviert. Es wird vermutet, dass der so in Gang gesetzte chronische Entzündungsprozess zu Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherosklerose führt. Diese Prozesse wurden jedoch vor allem in peripheren Geweben wie der Leber oder in Adipozyten beschrieben. Unabhängig davon konnte auch in einer kortikotropen, neuronalen Zelllinie gezeigt werden, dass Hyperglykämie zu einem großen Teil über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf- κ B die POMC-Genexpression stimuliert (Asaba et al. 2007). Darüber hinaus fand man spezifisch im Hypothalamus eine Aktivierung von Nf- κ B durch Leptin sowie eine durch Nf- κ B vermittelte Stimulierung der POMC-Transkription durch Leptin (Jang et al. 2010). Zusammengenommen weisen die genannten Studien auf eine wichtige Rolle von Nf- κ B bei der intrazellulären Signaltransduktion von Glukose, Insulin und insbesondere Leptin hin.

Übertragen auf die Situation bei den überernährten Ratten der vorliegenden Studie hieße dies zusammengefasst, dass die hohen Spiegel an Glukose, Leptin und Insulin bei Tieren aus kleinen Würfen auch in den hypothalamischen Zellen, die hier untersucht wurden, zu einer erhöhten

Bindungsaktivität von Nf- κ B-Proteinen geführt haben müssten und damit zu einer Steigerung der POMC-Expression. Da bei neonatal überernährten Tieren die Nf- κ B-Bindungsstelle im POMC-Promotor jedoch stärker als bei normal ernährten Ratten methyliert war, hätte NF- κ B hier nicht oder nur reduziert binden können und wäre in seiner Rolle als Aktivator weitgehend behindert gewesen. Dies könnte eine Ursache für die erniedrigte insulin- und leptinabhängige POMC-Expression bei neonatal überernährten Tieren sein. Hierfür spräche die nachgewiesene negative Korrelation zwischen den Methylierungen innerhalb der Nf- κ B-Bindungsstelle und dem Quotienten aus POMC-mRNA und Insulin (sowie tendenziell Leptin).

Sehr wahrscheinlich lag das Nf- κ B-Protein bei Tieren aus kleinen Würfen durch die Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie in hohem Maße aktiviert in hypothalamischen Zellen vor. Unter diesen Umständen hätte Nf- κ B verstärkt an allen seinen Zielgenen binden können, so auch TNF- α oder Interleukin-1. Ein erhöhter Spiegel dieser proinflammatorischen Mediatoren im Gewebe hätte wie oben erwähnt die Signalkaskade des Insulinrezeptors stören müssen und so eine Insulinresistenz der Zelle bewirkt. Folge wäre unter anderem die fehlende Stimulierung der durch Insulin aktivierten Transkription seiner Zielgene wie POMC. So hätte Nf- κ B auf zwei Weisen zur peripheren und zentralnervösen Insulinresistenz neonatal überernährter Tiere beigetragen: Einerseits durch Störung der Insulinsignalkaskade und andererseits durch methylierungsbedingte Reduktion der hypothalamischen POMC-Aktivierung. Einen Hinweis darauf gibt die positive Korrelation zwischen den Methylierungen innerhalb der Bindungsstelle von Nf- κ B und der Insulin-Glukose-Ratio als Maß der Insulinresistenz.

4.3.2 Methylierungsalterationen stromaufwärts der Bindungsstelle von Sp1

Nf- κ B ist nicht der einzige Transkriptionsfaktor, durch den Insulin oder Glukose die Genexpression regulieren. Insbesondere stimulieren Insulin und Glukose die Dephosphorylierung und damit die Aktivität des „Signalproteins 1“ (Pan et al. 2001). Sp1 scheint eine herausragende Rolle bei der Vermittlung der Insulinwirkung auf die Transkription zu haben, da die durch Insulin regulierten Gene wie das Leptinogen oder das Fettsäuresynthetasegen innerhalb ihrer insulinresponsiblen Promotorregionen GC-reiche Sequenzen beinhalten, welche diesen ubiquitären Transkriptionsfaktor binden (Übersicht bei Samson und Wong 2002). Sp1 besitzt innerhalb des POMC-Promotors zwei GC-reiche Bindungsstellen, die aktivierend auf die Genexpression wirken (Liu et al. 1995). Treten Methylierungen an Cytosinen innerhalb (Liedtke et al. 2005,

Douet et al. 2007) oder unmittelbar stromaufwärts (Zhu et al. 2003) dieser Sp1-Sequenzen auf, verhindert dies die Anlagerung des Sp1-Proteins an die DNA, so dass Sp1 nicht mehr als Transkriptionsaktivator fungieren kann. Darüber hinaus kann Sp1 aber auch mit hoher Affinität an Nf- κ B-Sequenzen binden und auf diese Weise die Gentranskription stimulieren (Hirano et al. 1998).

In der vorliegenden Studie konnte innerhalb der beiden Sp1-Sequenzen kein signifikanter Gruppenunterschied im prozentualen Anteil methylierter Cytosine festgestellt werden. Dagegen zeigte sich stromaufwärts der Sp1-Bindungsstelle, die der Nf- κ B-Sequenz direkt benachbart liegt (Sp1 146) bei neonatal überernährten Tieren eine signifikant höhere CpG-Methylierung.

Zusammengenommen legt dies nahe, dass der bei den überernährten Tieren durch die hohen Insulinspiegel stimulierte Transkriptionsfaktor Sp1 weder über seine eigene Bindungsstelle bei Nukleotid -146 noch über die Nf- κ B-Sequenz die POMC-Transkription zu stimulieren in der Lage gewesen wäre, da beide durch Methylierungen blockiert waren. Hierdurch könnte sich die bei den Ratten aus kleinen Wurfen verminderte POMC-Genexpression in Bezug zu Insulin erklären. Unterstützt wird diese Hypothese durch die hier nachgewiesene signifikant negative Korrelation zwischen den Methylierungen stromaufwärts von Sp1 146 und dem Quotienten aus POMC-mRNA und Insulin.

Interessanterweise fand sich wie bei Nf- κ B eine positive Korrelation zwischen den Methylierungen stromaufwärts der Bindungsstelle von Sp1 146 und der Insulin-Glukose-Ratio als Maß der Insulinresistenz. Es könnte demnach ein Zusammenhang existieren zwischen der peripheren bzw. zentralnervösen Insulinresistenz bei überernährten Ratten und der Ausbildung epigenetischer Alterationen in den Bindungsstellen von Sp1 und Nf- κ B. Dass diese epigenetischen Veränderungen innerhalb des POMC-Promotors spezifisch die insulin-responsiblen Transkriptionsfaktoren betreffen, könnte sich an den fehlenden Methylierungsunterschieden innerhalb der Bindungsstellen von AP2, MRE bzw. PCRH-RE, nGRE, PP1 sowie STAT3 zeigen, welche nicht direkt durch Insulin aktiviert werden (Bishop et al. 1993, Jin et al. 1994). Dass sie darüberhinaus funktionell bedeutsam sein dürften, zeigt sich am Beispiel der im Folgenden erörterten nGRE-Bindungsstelle.

4.3.3 Methylierungsalterationen innerhalb des nGRE

Das „negative glukokortikoid-responsive Element“ bindet den Glukokortikoidrezeptor und hemmt hierdurch als einziger bekannter Repressor im POMC-Promotor die Gentranskription (Riegel et al. 1990 und 1991). Das nGRE besitzt ein CpG-Dinukleotid und ist als methylierungssensitiv beschrieben worden (Saluz et al. 1986, Thomassin et al. 2001). In der hier vorliegenden Studie präsentierte sich die Bindungsstelle in der Kontrollgruppe stärker methyliert als in der Gruppe der neonatal überernährten Tiere (CpG-Methylierung: 8 versus 4 Prozent), wobei der Unterschied jedoch aufgrund der großen Streuung statistisch nicht signifikant war. Während also die aktivierenden Transkriptionsfaktoren Nf- κ B und Sp1 in der KW-Gruppe einen höheren Methylierungsgrad ihrer Zielsequenz aufwiesen, war das einzige expressionshemmende Element in der KW-Gruppe eher weniger methyliert als in der Kontrollgruppe.

Der Grad der nGRE-Methylierung korrelierte allerdings nicht, wie in diesem Fall zu erwarten gewesen wäre, positiv mit der POMC-mRNA-Expression. Andererseits bedeutet der Wirkungsausfall eines Transkriptionsrepressors auch nicht zwingend die Aktivierung der Gentranskription, da erst das Zusammenspiel mehrerer regulatorischer Faktoren die Expression eines Gens steuert. So ist der Glukokortikoidrezeptor in der Lage, andere Transkriptionsfaktoren auch direkt durch Protein-Protein-Interaktion zu antagonisieren, z. B. Nf- κ B (Ray et al. 1994), AP-1 (Jonat et al. 1990), NUR-Faktoren (Martens et al. 2005) oder Sp1 (Ou et al. 2006). Bei neonatal überernährten Ratten ist die Menge an zirkulierenden Kortikosteronen und auch die mRNA-Expression des Glukokortikoidrezeptors im Hypothalamus signifikant erhöht gegenüber normal ernährten Kontrolltieren (Boullu-Ciocca et al. 2005). Diese erhöhte Präsenz und Aktivität des Glukokortikoidrezeptors bei KW-Ratten würde einerseits über Antagonisierung der aktivierenden Transkriptionsfaktoren und andererseits direkt über das nGRE zu einer Inhibierung der POMC-Transkription führen. Da Nf- κ B und Sp1 bei überernährten Tieren durch die höhere Methylierung ihrer Sequenzen an der DNA-Bindung gehemmt werden, lagen sie wie oben erwähnt vermutlich in höherer Konzentration im Zytoplasma vor und wären somit zugänglicher für die Antagonisierung durch den Glukokortikoidrezeptor gewesen.

Zusammengenommen könnten die veränderten Methylierungsmuster in den Bindungsstellen von Nf- κ B und Sp1 (sowie nGRE) eine Ursache sein für die bei neonatal überernährten Ratten beobachtete erniedrigte POMC-Expression in Relation zu Insulin und Leptin. Die zentrale Insulin-

und Leptinresistenz von Tieren aus kleinen Würfen scheint ein epigenetisches Korrelat innerhalb des POMC-Promotors zu haben. Anders gesagt ist bei den überernährten Ratten der POMC-Promotor durch Methylierung der insulin- und leptinresponsiblen Bindungsstellen Nf- κ B und Sp1 resistent gegenüber der Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie geworden. Es stellt sich die Frage nach möglichen Mechanismen, die zu einer solchen epigenetischen Anpassung innerhalb der Neonatalperiode führen könnten. Diese sollen nun zur Diskussion kommen.

4.4 Mechanismen epigenetischer Programmierung durch Aufzucht in kleinen Würfen

In der vorliegenden Studie wurde bei Ratten aus kleinen Würfen eine erhöhte CpG-Methylierung von spezifischen Bindungsstellen im POMC-Promotor festgestellt. Welche Faktoren unterscheiden sich bei Tieren, die in kleinen Würfen aufgezogen wurden, von ihren Altersgenossen aus normalen Wurfgrößen? Einerseits ist bei diesem Tiermodell die neonatale Ernährungssituation verändert. So findet sich bei Rattenmüttern, die lediglich vier Nachkommen aufziehen, eine erhöhte Absolutmenge von Milch pro Nachkommen (Fiorotto et al. 1991). Die Vermutung liegt nahe, dass der Anstieg von Cytosinmethylierungen in spezifischen Regionen des POMC-Promotors verursacht wurde durch die höhere Konzentration bzw. dem Überangebot bestimmter Nährstoffe der Muttermilch. Eine indirekte Bestätigung des Zusammenhangs zwischen Ernährung und epigenetischer Modifikation des POMC-Promotors lieferten zwei tierexperimentelle Studien, bei denen das umgekehrte Modell - eine fetale Unterernährung - zur Hypomethylierung des hypothalamischen POMC-Promotors führte. Dies konnte einerseits an perikonzeptionell unterernährten Schafen gezeigt werden (Stevens et al. 2010), andererseits aber auch an intrauterin wachstumsretardierten Ratten (Coupé et al. 2010). Weiterhin wurde in einer klinischen Studie an Patienten mit Anorexia nervosa bzw. Mangelernährung eine negative Assoziation festgestellt zwischen der CpG-Methylierung des POMC-Promotors in Monozyten und der peripheren POMC-Expression (Ehrlich et al. 2010).

Abgesehen vom Einfluss auf die Ernährung ist es ebenfalls möglich, dass die reduzierte Wurfgröße ein verändertes Sozialverhalten bei den Nestmitgliedern bewirkt. Dadurch werden die Spiegel der Stresshormone bei den Nachkommen beeinflusst, welche wiederum in der Lage sein könnten, spezifische Methylierungsalterationen hervorzurufen (Weaver et al. 2004 und 2007). All diese Einflußfaktoren auf die epigenetische Programmierung sowie die darin involvierten molekularen und biochemischen Mechanismen sollen nun im Einzelnen dargelegt werden.

4.4.1 Epigenetische Programmierung durch Methylgruppendonatoren

Besondere Bedeutung bei der ernährungsbedingten DNA-Modifikation könnten vor allem Aminosäuren und Vitamine haben, die an der Bildung von 5-Methylcytosin beteiligt sind, die also als Methylgruppendonatoren bzw. als Ko-Faktoren der DNA-Methylierungsreaktion fungieren. Dies sind die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein bzw. Homocystein, die methylgruppenreichen Aminosäuren Cholin und Betain sowie die Vitamine B9 (Folsäure) und B12 (Cobalamin). Methionin wird durch Verknüpfung mit ATP zu S-Adenosylmethionin (SAM) umgesetzt, welches an der Schwefelgruppe eine hochreaktive Methylgruppe trägt. SAM ist das Substrat verschiedener Enzyme, die Transmethylierungsreaktionen katalysieren, speziell auch der DNA-Methyltransferasen DNMT 1, 2 und 3 (Goll und Bestor 2005). Nach Abgabe der Methylgruppe entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), welches durch Hydrolyse zu Homocystein abgebaut wird. Homocystein wiederum kann einerseits durch Reaktion mit Serin zu Cystathionin und durch weitere Hydrolyse zu Homoserin und Cystein umgesetzt werden. Andererseits wird Homocystein auch zur Rückgewinnung von Methionin genutzt. Diese Reaktion ist cobalaminabhängig und erfordert die enzymatische Übertragung einer Methylgruppe von einem Ko-Faktor wie Tetrahydrofolsäure (THF) oder Betain bzw. Cholin auf S-Adenosylhomocystein. Die DNA-Methylierungsreaktion ist demnach in hohem Maße abhängig von der Verfügbarkeit der Substrate Methionin bzw. SAM, Vitamin B12 und Folsäure bzw. THF.

Bereits der singuläre Mangel nur eines Ko-Faktors der oben beschriebenen Transmethylierungsreaktionen ist in der Lage, die genomische Methylierung zu vermindern und zur Überexpression von Genen zu führen; für Folsäure (Kim et al. 1997) und Vitamin B12 (Choi et al. 2004) existieren eindeutige Belege bei Ratten. Auch eine Ernährung, die arm an Cholin ist, reduzierte die globale DNA-Methylierung ausgewählter Gewebe (Alonso-Aperte und Varela-Moreiras 1996). Insbesondere wenn ein Zustand aus kombiniertem Cholin- und Methioninmangel herbeigeführt wurde, fanden sich erniedrigte Spiegel von SAM und Cytosinmethylierungen (Wilson et al. 1984). Erste Hinweise dazu stammten aus der Tumorforschung. Bereits vor 25 Jahren wurde beobachtet, dass eine Ernährung, die arm an Methylgruppen, d.h. an den zentralen Substraten Folsäure, Methionin sowie Cholin („FMD-Diät“) ist, das Auftreten von Leberzellkarzinomen begünstigte (Mikol et al. 1983). Ratten, denen eine solche kanzerogene Nahrung gefüttert wurde, zeigten rasch eine Reduktion der hepatischen DNA-Methylierung (Wainfan et al. 1989). Damit einher ging ein Anstieg der Expression von Onkogenen wie c-myc oder h-ras (Hsieh et al. 1989),

die mit dem Verlust von CpG-Methylierungen innerhalb dieser spezifischen Gene korrelierte (Dizik et al. 1991).

Die Auswirkungen eines ernährungsbedingten Überschusses an Methylgruppen wurden bisher nur an Agouti-Mäusen untersucht. Bei diesen Mäusen wird die gelbe Fellfarbe durch das Agouti-Gen reguliert, welches bei A^{vy}-Allel-Trägern ein Retrotransposon beherbergt. Dieses zeichnet sich durch große interindividuelle Variabilität der CpG-Methylierung aus (ein sogenanntes metastabiles Epiallel), wobei der Grad der Methylierung invers zur Agouti-Expression korreliert (Michaud et al. 1994). Homozygote non-agouti Weibchen (a/a) wurden mit heterozygoten A^{vy}-Männchen angepaart und erhielten vor und während der Schwangerschaft sowie über die gesamte Stillzeit eine Nahrungsergänzung, die reich an Methylgruppendonatoren sowie an den Kofaktoren Folsäure, Vitamin B12, Cholin und Betain war. Bei heterozygotem A^{vy}-Nachwuchs führte das erhöhte Methylgruppenangebot zu einer vermehrten CpG-Methylierung des Agouti-Transposons, was mit verminderter Agouti-Expression und im Phänotyp mit schwarzen Schecken in der gelben Fellfarbe einherging (Wolff et al. 1998, Waterland und Jirtle 2003). Diese Arbeitsgruppen konnten damit erstmals zeigen, dass die Art der maternalen Ernährung die epigenetische Programmierung eines Merkmals der Nachkommen bedingt. Eine Folgestudie dieser Arbeitsgruppe untersuchte darüber hinaus den Effekt der methylgruppenreichen Ernährung der Mutter auf die Gewichtsentwicklung der Nachkommen, da das Agoutiprotein an MC₄-Rezeptoren im Hypothalamus bindet und hier antagonistisch wirkt. Das heißt, gelbe A^{vy}-Mäuse zeichnen sich durch Hyperphagie mit resultierender Adipositas aus. Es zeigte sich nun, dass die Methylsupplementierung der Mütter nicht nur die Fellfarbe der Nachkommen beeinflusste, sondern auch deren Hyperphagie und Adipositas verhinderte (Waterland et al. 2008). Ursächlich hierfür scheint jedoch nicht allein die Hypermethylierung und damit Stilllegung des Agouti-Transposons zu sein. Die Entstehung der Adipositas bei Agoutimäusen ist komplexer. Die Offenlegung der weiterhin involvierten Mechanismen ist wünschenswerter Gegenstand kommender Studien.

Ein anderes interessantes Tiermodell zum Studium des Zusammenhangs zwischen Ernährung und Methylierung stellt das der proteinarmen Ernährung von trächtigen Ratten dar, da sich auch hier der Phänotyp der Nachkommen durch Veränderungen der Genexpression deutlich von dem normalversorgter Feten bzw. Jungtiere unterscheidet (Übersicht z.B. bei Ozanne und Hales 1999). Lillycrop und Kollegen fanden in Hepatozyten von Ratten, deren Mütter während der

Schwangerschaft eine proteinarme Nahrung erhalten hatten, eine erniedrigte CpG-Methylierung und eine erhöhte Expression der Gene des Glukokortikoidrezeptors und des PPAR (peroxisomaler proliferator-aktivierter Rezeptor). Die Anhebung des täglichen Folsäurezusatzes in der Gruppe der mangelernährten Mütter konnte diesen Veränderungen vorbeugen (Lillycrop et al. 2005). Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die Autoren zur Erklärung des Zusammenhangs zwischen Proteinmangel, CpG-Methylierung des hepatischen GR-Gens und Folsäure keine überzeugende mechanistische Hypothese vortragen konnten.

Wie lassen sich die oben zusammengetragenen Studienmodelle, die die Beeinflussung der DNA-Methylierung durch die Zusammensetzung der Nahrung bezüglich Methylgruppendonatoren belegen, auf die Situation neonatal überernährter Ratten aus kleinen Würfen übertragen? Rattenmilch zeichnet sich durch einen hohen Proteingehalt aus (Wünsche et al. 1967). Durch Verminderung der Wurfgröße bei Rattenneonaten erhöht sich zwar die absolute Menge Muttermilch je Nachkommen und auch der relative Fettanteil steigt, jedoch nicht der relative Proteingehalt (Fiorotto et al. 1991). Daher kann das in der vorliegenden Studie verwendete Tiermodell nicht vollständig übertragen werden auf eine Versuchsanordnung entsprechend einer proteinreichen bzw. methylendonatoren-angereicherten Ernährung in der Stillzeit. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass mit der erhöhten Nahrungsaufnahme von Tieren aus kleinen Würfen selbstverständlich eine größere Absolutmenge an Proteinen und damit methylgruppenträgenden Aminosäuren aufgenommen wird. Somit scheint es nicht unwahrscheinlich, dass die epigenetischen DNA-Modifikationen an dem hier untersuchten Genabschnitt verursacht wurden durch die erhöhte Verfügbarkeit dieser Nahrungsbestandteile.

4.4.2 Epigenetische Programmierung durch Hyperglykämie

Bei Tieren, die in kleinen Würfen aufgezogen wurden, herrscht aufgrund des Überangebotes an Nahrung eine sehr gute Energieversorgung, was unter anderem an den hohen Blutglukosespiegeln abzulesen ist. Dass hohe Glukosespiegel in der Lage sind, die Methylierung verschiedenster Genabschnitte sowie CpG-Inseln zu ändern, konnte am Beispiel der Histonmethylierung in kultivierten Monozyten gezeigt werden (Miao et al. 2007). Die vorliegende Studie bestätigte diese Beobachtung, da der prozentuale Anteil methylierter CpG-Stellen im POMC-Promotor sowie innerhalb der Nf- κ B-Bindungsstelle positiv zu den Blutglukosespiegeln aller untersuchten Ratten korrelierte. Eine positive Korrelation zwischen Methylierung und Blutglukose konnte von unse-

rer Arbeitsgruppe ebenfalls für den Promotor von NPY als auch des Insulinrezeptors im Hypothalamus nachgewiesen werden (Plagemann et al. 2009 und 2010).

Folgender biochemischer Prozess könnte zu einer erhöhten DNA-Methylierung durch Hyperglykämie führen: 1. Intrazellulär wird im Rahmen der Glykolyse aus Glukose ATP gebildet. 2. ATP dient gemeinsam mit Methionin der SAM-Synthetase als Substrat für die Bildung von S-Adenosylmethionin (SAM). 3. SAM wiederum ist der wichtigste Methylgruppendonator bei Transmethylierungsreaktionen, d.h. Substrat der DNMTs. Die einzelnen Schritte dieser Reaktionskette sind nach Studienlage belegbar: So steigt der ATP-Spiegel mit der Höhe der Glukosekonzentration (Downs 1995). Speziell für den Hypothalamus ist gezeigt worden, dass extrazelluläre Glukose den intrazellulären ATP-Spiegel erhöht (Parton et al. 2007). Des Weiteren ist die Geschwindigkeit der SAM-Synthetase direkt abhängig von der ATP-Konzentration (Oden et al. 1983) und die Geschwindigkeit der DNMTs direkt abhängig von der SAM-Konzentration (Pradhan et al. 1999). Eine eindeutige Verbindung zwischen Hyperglykämie, erhöhter DNMT-Aktivität und darauf folgender globaler DNA-Hypermethylierung stellt eine In-vitro-Studie dar (Chiang et al. 2009). Es ist demnach vorstellbar, dass die Hyperglykämie der KW-Tiere über die resultierende Erhöhung des intrazellulären ATP-Spiegels die Enzyme der DNA-Methylierung stimuliert. Ihre Rolle soll daher eingehender beleuchtet werden.

4.4.3 Rolle der Methyltransferasen

In dem Mechanismus der epigenetischen Genmodifikation durch Ernährung spielen die DNA-Methyltransferasen (DNMT) eine zentrale Rolle. Dies konnte an einer Methylierungsstudie bei Honigbienen eindeutig belegt werden: Wird die DNMT3-Expression in frisch geschlüpften Bienenlarven ausgeschaltet, so entwickeln sich diese Larven zu Bienenköniginnen. Normalerweise werden Larven nur dann zu Königinnen, wenn sie von den Arbeiterinnen mit einer speziellen Substanz gefüttert werden, die Gelee Royal genannt wird. Die Untersuchung des Methylierungsmusters des Dynactin p62-Gens ergab eine gute Übereinstimmung zwischen Königinnen, die Gelee Royal erhalten hatten oder die eine ausgeschaltete DNMT-Expression hatten (Kucharski et al. 2008). Welcher Inhaltsstoff von Gelee Royal für die epigenetische Programmierung der Bienenlarven zu Königinnen statt Arbeiterinnen verantwortlich ist, ist noch unbekannt. Ob diese Substanz in der Lage ist, die DNMT3-Expression zu inhibieren, ist ebenfalls noch Gegenstand der Forschung.

Inzwischen ist für die cholinarme Ernährung erwiesen, dass der Mangel an Methylgruppen eine Hypomethylierung und damit die Überexpression der DNA-Methyltransferase 1 verursacht (Kovacheva et al. 2007). Auch die karzinogene FMD-Diät führt zu einer erhöhten Expression der DNMT 1 und 3 sowie der „Methyl-CpG bindenden Proteine“ MBD 1-3 (Goshal et al. 2006). Dieses DNMT-Überangebot korreliert mit Veränderungen von Methylierungsmustern und mRNA-Expression verschiedener epigenetisch regulierter Gene, wie IGF 2 (Insulin-like Growth-Factor 2) (Kovacheva et al. 2007).

Wie bei allen Enzymen wird die katalytische Aktivität der Methyltransferasen nicht nur von den Substraten der Reaktion induziert und von den Produkten (Homocystein) inhibiert, sondern auch von einer Anzahl anderer Enzyme, Ko-Faktoren und von dem Energiehaushalt der Zelle reguliert. S-Adenosylmethionin ist wie oben bereits erwähnt als Hauptdonator von Methylgruppen der wichtigste Induktor der DNMTs. In vitro konnte an Neuroblastomazellen gezeigt werden, dass SAM-Administration zu einer Erhöhung der Methylierung und damit zu einer Herunterregulation des Presenilin 1-Gens führt (Scarpa et al. 2003). In vivo finden sich erhöhte SAM-Spiegel bei Patienten mit bipolaren Störungen und Schizophrenie. An diesen Patienten konnte eine Überexpression der DNMT 1 demonstriert werden, welche ursächlich für die Hypermethylierung und die verminderte Expression des Reelin- und des GAD67-Gens zu sein scheint (Guidotti 2006). Ein anderer wichtiger Ko-Faktor der Transmethylierungsreaktionen ist ATP, da es den Energiehaushalt der Zelle anzeigt und eine Vielzahl von Enzymen reguliert. Die Aktivität der DNA-Methyltransferase DNMT 3B ist indirekt an die intrazellulären ATP-Konzentration gekoppelt, da es mit einem ATP-abhängigen Enzym namens hSNF2H interagiert (Geiman et al. 2004).

Es scheint nachvollziehbar, dass eine Überernährung von Ratten-Neonaten über die extrazelluläre Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zu einem intrazellulären anabolen Zustand führt mit konsekutiv hohen Spiegeln an ATP und SAM, welche die DNA-Methyltransferasen stimulieren. Dieser Effekt müsste jedoch zu einer global erhöhten DNA-Methylierung führen und nicht spezifisch bzw. teilweise gegenläufig für unterschiedliche Gene bzw. Genabschnitte sein, wie hier und in anderen Studien beobachtet worden ist. Daher soll anschließend ein hypothetischer Prozess vorgestellt werden, welcher dieses „Paradoxon“ erklären könnte.

4.4.4 Epigenetische Programmierung durch intrazelluläre Signalkaskaden

Die Hyperglykämie bei Jungtieren aus kleinen Würfen könnte eine Ursache für den erhöhten Methylierungsgrad im POMC-Promotor sein; wie erklärt sich jedoch die Spezifität dieser Veränderungen, die lediglich die Nf- κ B- und Sp1-Bindungsstellen betrifft?

Eine Schlüsselrolle könnten hierbei die verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden spielen, welche in Abhängigkeit vom metabolischen Milieu des Organismus bzw. der Zelle aktiviert oder gehemmt werden. Je nach ihrem Aktivitätszustand bedingen die Signalkaskaden die Freisetzung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren. So phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA bzw. AMPK) in Abhängigkeit von cAMP die Transkriptionsfaktoren AP1, AP2, CREB, Nf- κ B und PCRH (Bishop et al. 1993, Jin et al. 1994), welche hierdurch aktiviert werden. Anders verhält es sich mit den regulatorischen Proteinen, die durch Enzyme aktiviert werden, die an den Insulin- und/oder Leptinrezeptor gekoppelt sind. Sp1 und die NUR-Faktoren werden durch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3-K) der Insulin-Signalkaskade aktiviert und STAT über die Januskinase des Leptinrezeptors direkt mobilisiert (Carvalho et al. 2003). Es existieren erste Hinweise, dass auch Nf- κ B alternativ über die PI-3-Kinase aktiviert werden kann (Asaba et al. 2007).

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, dass die Proteinkinase A drei potente Inhibitoren besitzt: Sowohl Insulin und Leptin als auch hohe Glukosekonzentrationen hemmen ihre Aktivität spezifisch in hypothalamischen Neuronen (Minokoshi et al. 2004, Cai et al. 2007). Darüber hinaus bewirken Glukose und Insulin einen Abfall des cAMP-Spiegels, indem über Hemmung der Adenylatzyklase die cAMP-Bildung vermindert wird (Glukose) und über Stimulation der Phosphodiesterase der cAMP-Abbau beschleunigt wird (Insulin; siehe z.B. Löffler 2001). Auf diese Weise fällt einerseits vermehrt ATP an, welches z.B. bei Methylierungsreaktionen verbraucht wird, und andererseits können die PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren nicht aktiviert werden.

In dem metabolischen Zustand der neonatal überernährten KW-Ratten mit den erhöhten Konzentrationen der anorexigenen Signale Glukose, Insulin und Leptin würden somit spezifisch die Transkriptionsfaktoren Sp1, NUR, STAT und Nf- κ B freigesetzt, während die Mobilisierung der cAMP-abhängigen Proteine wie AP1 und -2, CREB oder PCRH inhibiert wäre. In Abwesenheit dieser konkurrierenden Faktoren könnten Sp1, STAT und Nf- κ B an ein Protein namens CBP

(CREB-Bindungsprotein) binden (Janknecht und Hunter 1996, Mynard et al. 2004). CBP ist ein Enzym der HAT-Gruppe, das durch die Azetylierung von Histonen die Zugänglichkeit der DNA für Demethylasen verändert (Cervoni und Szyf 2001). CBP ist aber auch ein wichtiger Ko-Aktivator der Transkription, da es die Verbindung zwischen der DNA-Polymerase II und den Transkriptionsfaktoren herstellt (Kwok et al. 1994).

In einem intrazellulären Zustand der Hyperglykämie und Hyperleptinämie würden demnach spezifische Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und Nf- κ B direkt aktiviert, was wiederum zur Öffnung spezifischer DNA-Sequenzen mittels HATs (CBP) führen würde. Gleichzeitig würde - wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben - der Zugang der DNA-Methyltransferasen zu diesen aktiven Genabschnitten ermöglicht. Liegt hier die DNA in einem demethylierten Zustand vor, so würde die DNMT Methylgruppen auf diese nackte Gensequenz übertragen. Es zeigt sich somit ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Cytosinmethylierung im POMC-Promotor hyperglykämischer Ratten in den Bindungsstellen von Sp1 und Nf- κ B.

4.4.5 Epigenetische Programmierung durch Glukokortikoide

Tiere, die in kleinen Würfen aufgezogen werden, unterscheiden sich nicht nur in der Menge aufgenommener Muttermilch von ihren Altersgenossen, die in einer normalen Wurfgröße aufwachsen. Man kann davon ausgehen, dass die Anzahl der Nachkommen sowohl das mütterliche Verhalten beeinflusst als auch einen sozial prägenden Effekt auf das Verhalten der Geschwisterratten untereinander hat. So ist in frühen Wurfstudien nachgewiesen worden, dass Ratten aus kleinen Nestgruppen von nur zwei Jungtieren früher in die Pubertät kommen, eine niedrigere Emotionalität zeigen und ein beeinträchtigt Lern- sowie Gedächtnisvermögen besitzen (Hinz et al. 1983). Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang scheint die Entwicklung des endokrinen Regelkreises der Steroidhormone zu spielen. Ratten aus kleinen Würfen (vier Tiere/Mutter) zeigen eine überschießende Reaktion auf Narkose- oder Immobilisierungsstress (Macho et al. 1975). Darüberhinaus ist der Tag-Nacht-Rhythmus der Glukokortikoidausschüttung gestört (Koldovsky et al. 1995). Eine Studie beschreibt bei überernährten Ratten aus Nestern mit drei Nachkommen/Mutter eine erhöhte basale und stressinduzierte Glukokortikoidsekretion (Boullu-Ciocca et al. 2005).

Beeinflusst Überernährung durch die daraus folgende Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie die Steroidhormonachse oder wird umgekehrt durch Aufzucht in kleinen Würfen die

Glukokortikoidsekretion in der Art geändert, dass die Entwicklung einer Adipositas mit allen Folgen begünstigt wird? Für beides finden sich Beispiele: So führte eine Leptininjektion bei Rattenneonaten zu einer erhöhten Expression des Glukokortikoidrezeptors im Nucleus paraventricularis hypothalami und einer verstärkten Downregulation von ACTH, d.h. Feedbackwirkung im Dexamethasonhemmtest (Proulx et al. 2001). Andererseits sind die deletären Effekte von Glukokortikoiden auf die Entwicklung des Fettgewebes, auf den Glukosemetabolismus sowie auf den Blutdruck gut charakterisiert (Björntorp et al. 2000), so dass sich das metabolische Syndrom von Ratten aus kleinen Würfen auch mit der Steroidwirkung erklären ließe. Sehr wahrscheinlich entstehen bei der Aufzucht in reduzierten Wurfgrößen durch die Beeinflussung von Stoffwechselmetaboliten und Hormonen gleichgerichtete, sich addierende Effekte, die letztlich zum metabolischen Syndrom führen.

Interessant ist in diesem Kontext jedoch die epigenetische Potenz von neonatalen Stresserfahrungen. So führte die Arbeitsgruppe um Meaney eine Methylierungsanalyse durch bei Nachkommen von Rattenmüttern, die sich in der Intensität der Nachwuchspflege natürlicherweise unterschieden. Er stellte fest, dass das Verhalten der Mutter das Methylierungsmuster des hippocampalen Glukokortikoidrezeptors der Nachkommen veränderte (Weaver et al. 2004 und 2007). Ratten, die weniger Zuwendung durch ihre Mütter erfahren hatten, hatten höhere Kortikosteronlevel im Blut und eine geringere Expression der Glukokortikoidrezeptors im Hippocampus (Liu et al. 1997). Gleichzeitig fand sich ein höherer Prozentsatz an CpG-Methylierung innerhalb der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NGFI-A im Promoter des Glukokortikoidrezeptors. Eine Demethylierung der CpG-Stelle innerhalb dieser Bindungsstelle senkte wiederum die basalen und stressinduzierten Plasmakortikosteronlevel (Weaver et al. 2004). Dieselbe Arbeitsgruppe versuchte diese Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen: Im Hippocampus von Suizidopfern mit Missbrauchsvergangenheit erwies sich ebenfalls die Expression des Glukokortikoidrezeptors als erniedrigt bei erhöhter Cytosinmethylierung seines Promotors (McGowan et al. 2009). Interessanterweise wird in diesen Publikationen ein Mechanismus diskutiert, der zu der beobachteten epigenetischen Programmierung dieser spezifischen Genregion geführt haben könnte: Das mütterliche Verhalten verändert den Serotoninspiegel der Nachkommen. Dadurch wird spezifisch die cAMP-abhängige PKA beeinflusst, welche wiederum auf die Bindungsaktivität von NGFI-A sowie auf die HATs (verantwortlich für Histonazetylierung) wirkt. So konnte nachgewiesen werden, dass bei Nachkommen von stark umsorgenden Rattenmüttern NGFI-A überexprimiert war, was zu einer Induktion von Histonazetylierung, DNA-

Methylierung und Aktivierung des Glukokortikoidrezeptor-Promotors führte (Weaver et al. 2007).

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel ausgeführt, wäre ein ähnlicher Mechanismus epigenetischer Programmierung auch durch Aufzucht in kleinen Würfen denkbar. Nicht nur durch die Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie sondern ebenfalls durch das differente mütterliche Verhalten würden bei den Nachkommen spezifische intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (PI-3-K, JAK-STAT) bzw. inhibiert (PKA). In Abhängigkeit davon würden zellspezifisch die Transkriptionsfaktoren und Methylierungsreaktionen beeinflusst. Wie oben erwähnt, scheinen Ratten aus kleinen Würfen durch die Hyperleptinämie eine erhöhte Aktivität des Glukokortikoidrezeptors im Hypothalamus zu haben. Dies könnte zu einer verstärkten Bindung des Rezeptors an seine Erkennungssequenz innerhalb des POMC-Promotors führen, was einerseits wie oben beschrieben die POMC-Expression inhibieren würde und andererseits den Zugang der DNA-Methyltransferasen zu der nGRE-Bindungsstelle behindern könnte. Die Folge wäre die hier beobachtete Hypomethylierung dieser Sequenz.

4.5 Limitierungen der Methodik

In der vorliegenden Studie wurde die Untersuchung des Methylierungsmusters des POMC-Promotors aus der DNA von Rattenhypothalami in Anlehnung an das Protokoll von Olek und Mitarbeitern durchgeführt (Olek et al. 1996). Die hierbei benutzte Methode der Bisulfitsequenzierung gilt als „Goldstandard“ der DNA-Methylierungsanalyse (Clark et al. 2006), da sie durch exakte Identifizierung jedes einzelnen methylierten Cytosins innerhalb des untersuchten DNA-Stranges sehr sensitiv ist (Frommer et al. 1992). Auf diese Weise können sowohl CpG- als auch non-CpG-Methylierung detektiert werden (Ramsahoye et al. 2000). Jedoch sind auch bei dieser Technik Limitierungen und systematische Fehler denkbar, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

So ist zum einen möglich, dass die Umwandlung von nichtmethylierten Cytosinen in Uracil im Rahmen der Bisulfitbehandlung nicht vollständig gelingt. In der Literatur wird eine Konversionsrate von 99,5 Prozent angegeben (Grunau et al. 2001), womit die Methode hoch zuverlässig erscheint. Zur Absicherung wurden in der vorliegenden Studie Kontrollen durch methylierungsspezifische PCRs im Anschluss an die Bisulfitreaktion durchgeführt (Herman et al. 1996). In der Kontroll-PCR I (siehe Kapitel 2.7.3.1) wurden die Primer in der Art gewählt, dass

sie nur an modifizierte, d.h. durch Bisulfit vollständig umgewandelte DNA binden konnten – sie galt daher als Positivkontrolle der Konversion. Die Negativkontrolle wurde mit Primern durchgeführt, welche nur an die unveränderte Originalsequenz binden konnten (siehe hierzu Kapitel 2.7.3.2 bzw. Kontroll-PCR II). Beide Kontrollen zeigten hier die Bestätigung einer erfolgreichen DNA-Modifikation, so dass die weiteren Schritte der Methylierungsanalyse folgen konnten.

Eine zweite mögliche Limitierung der Methode stellt das sogenannte „PCR-Bias“ dar. Darunter versteht man die Bevorzugung der DNA-Taq-Polymerase für unmethylierte (nach der Bisulfitbehandlung tyrosinreiche) Sequenzen, so dass diese während der PCR in größerer Menge als die methylierten (cytosinreichen) Sequenzen amplifiziert werden (Warnecke et al. 1997). Dies würde ein ungenaues Messergebnis des DNA-Methylierungsgrades hervorrufen. Zur Vermeidung des PCR-Bias wurden folgende in der aktuellen Literatur vorgeschlagenen Kriterien des Primerdesigns für bisulfitbehandelte DNA eingehalten (Wojdacz et al. 2008): 1. Mindestens ein CpG-Dinukleotid sollte in der Primersequenz enthalten sein. 2. Dieses CpG sollte so weit wie möglich vom 3'-Ende des Primers entfernt sein. 3. Die Schmelztemperatur des Primers sollte ungefähr 65 °C betragen. 4. Mindestens ein Tyrosin, welches ursprünglich ein Cytosin in nicht-CpG-Position war, sollte am 3'-Ende des Primers enthalten sein. 5. Die üblichen Standardparameter des Primerdesigns wie Sekundärstruktur oder Dimerbildung sollten beachtet werden.

Eine dritte methodische Limitierung der vorliegenden Studie liegt in der Art des untersuchten Gewebes. Um eine maximale DNA-Ausbeute zu erhalten, wurde der gesamte Hypothalamus präpariert und den weiteren Analyseschritten zugänglich gemacht. Es musste somit eine Zellheterogenität in Kauf genommen werden, die sich in einer Heterogenität der DNA-Methylierungsmuster niedergeschlagen haben könnte. Zum Einfluss unterschiedlicher Zelltypen innerhalb eines untersuchten Gewebes auf das Ergebnis einer Methylierungsanalyse ist in der Literatur wenig zu finden. In den hier zitierten maßgebenden Studien auf dem Gebiet der epigenetischen Programmierung wird nicht auf dieses Problem eingegangen und ebenfalls das vollständige Organ als Grundlage für die Methylierungsanalysen herangezogen: So kam z.B. genomische DNA aus dem Gesamthippocampus (Weaver et al. 2004, McGowan et al. 2009), der Leber (Lillycrop et al. 2008), der Nebennierenkapsel (Bogdarina et al. 2007) oder aus der Schwanzspitze der Agoutimaus zur Verwendung (Waterland und Jirtle 2003). Um die Heterogenität des Hypothalamusgewebes zu vermeiden und zellgruppen-spezifische Methylierungsmuster zu erheben, müssten allein die POMC-exprimierenden Neuronen aus dem Nucleus arcuatus

hypothalami präpariert werden. Dies könnte beispielsweise durch die Methode der Lasermikrodissektion erreicht werden, bei der mikroskopisch aus immunhistologisch angefärbten Hypothalamusschnitten die Zielzellen mit einem Laser extrahiert werden (Emmert-Buck et al. 1996). Es ist bereits gelungen, aus der so gewonnenen DNA eine Methylierungsanalyse mittels Bisulfidsequenzierung durchzuführen (Patel et al. 2000). Auch in unserer Arbeitsgruppe wird an der Etablierung dieser Methodik gearbeitet. Es bleibt Gegenstand kommender Studien, ob sich diese Präparationsmethode durchsetzen wird.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass neonatale Überernährung durch Aufzucht von Ratten in kleinen Wurfen zu veränderten Methylierungsmustern von regulatorischen Bindungsstellen innerhalb des hypothalamischen POMC-Promotors führte. Da POMC bzw. sein Spaltprodukt α -MSH das wichtigste anorexigen wirkende Neuropeptid ist, könnten diese epigenetischen Alterationen dessen Fehlregulation bei neonatal überernährten Ratten programmieren. Über die genauen Mechanismen, durch die neonatale Ernährungsmodifikationen eine epigenetische Programmierung bewirken, ist bislang noch vieles im Unklaren. Es wurden verschiedene Hypothesen zusammengetragen, die die Zugänglichkeit von Promotorelementen für CpG-Methylierung während der neonatalen Differenzierung zu erklären versuchen. Die durch Aufzucht in kleinen Wurfen induzierte epigenetische Programmierung von Genen, die zentral in die Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht involviert sind, hat eine erhöhte Disposition gegenüber Adipositas und dem metabolischen Syndrom zur Folge. Bei neonatal überernährten Ratten bleiben Übergewicht und Insulinresistenz lebenslang bestehen, so dass von einer Permanenz der Methylierungsalterationen auszugehen ist. Die Bedeutung der Neonatalzeit für die ernährungsbedingte Prägung von metabolischen Prozessen und Essverhalten wurde somit herausgehoben.

In diesem Zusammenhang ist die hier gefundene positive Korrelation zwischen der Promotormethylierung und der Blutglukose neonatal überernährter Ratten von besonderer Bedeutung. Die deletären Folgen einer Hyperglykämie während der frühen Entwicklung eines Organismus, speziell in der Prä- und Neonatalzeit sind hinreichend bekannt. Als Beispiel sei der mütterliche Gestationsdiabetes genannt, der nicht nur zu fetaler Makrosomie und Organfehlbildung führen kann, sondern auch zu einem hohen Risiko des Kindes für späteres Übergewicht

und die Entwicklung eines Diabetes mellitus (Dabelea et al. 2000, Plagemann 2004, HAPO-Studie 2008). Auf diese Weise wird ein Circulus vitiosus initiiert, über den die präkonzeptionelle Hyperglykämie der Mutter zu Übergewicht und erneuter diabetischer Stoffwechsellage bei der Tochter führt, die bei einer eigenen Schwangerschaft wiederum ihr Kind einer fetalen Hyperglykämie aussetzt.

Ein solch intergenerativer, epigenetischer Effekt könnte einen hohen Anteil an der epidemischen Zunahme von Adipositas und Diabetes in den letzten Jahrzehnten haben. Sollte die pränatale und/oder neonatale Hyperglykämie über eine Beeinflussung der DNA-Methylierung zu einer Fehlprogrammierung des neuroendokrinen Netzwerks der Energiebalance führen, wäre hier auch der Ansatzpunkt für eine Primärprävention von Übergewicht und metabolischem Syndrom zu finden. So sollten die epigenetischen Prozesse, die dem programmierenden Effekt von Ernährung zugrunde liegen, Gegenstand weiterer intensiver Forschung sein, da nur durch genaues Verständnis der Mechanismen eine Möglichkeit der gezielten Prävention besteht und eventuell die Chance auf Reversibilität. Des Weiteren unterstreicht die vorliegende Studie die Wichtigkeit einer konsequenten Therapie von (Gestations-) Diabetes und einer Vermeidung neonataler Überernährung zur Prävention des metabolischen Syndroms.

5 Zusammenfassung

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas ist in den Industriestaaten seit Jahrzehnten kontinuierlich gestiegen und stellt mit den assoziierten Folgekrankheiten ein medizinisches wie sozioökonomisches Problem dar. Ein erhöhtes Geburtsgewicht sowie eine starke neonatale Gewichtszunahme sind ein Risiko für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms. Neonatale Überernährung führt bei Ratten, die in kleinen Würfen aufgezogen werden, zu juveniler und lebenslang persistierender Adipositas. Darüberhinaus besteht eine periphere Insulinresistenz und auf zentraler Ebene eine Fehlregulation von orexigenen und anorexigenen Neuropeptiden im Hypothalamus. Die Auswirkungen fetaler und neonataler Einflüsse auf den Phänotyp und die Funktionsweise des Organismus (inklusive der resultierenden Krankheitsdispositionen) werden als perinatale Programmierung bezeichnet. Ein epigenetischer Mechanismus, welcher perinatalen Programmierungsprozessen zugrunde liegen könnte, ist die CpG-Methylierung von Genpromotoren. Ratten aus kleinen Würfen weisen im Promotor des stärksten orexigen wirkenden Neuropeptids im Hypothalamus (NPY) keine Methylierungsalteration auf. Den anorexigenen Gegenpart zu NPY bildet Proopiomelanocortin (POMC) mit seinem Spaltprodukt α -MSH. Der POMC-Promotor eignet sich aufgrund seiner Lage innerhalb einer CpG-Insel und einer Anzahl bekannter Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren gut für eine Methylierungsanalyse. Ziel dieser Studie war es, im hypothalamischen POMC-Promotor epigenetische Veränderungen d.h. Methylierungsmerkmale zu finden, die zu einer lebenslangen Fehlregulation von Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel führen könnten.

Entsprechend dem Tiermodell der kleinen Würfe wurde am dritten Lebenstag neugeborener Ratten die Primärwurfgröße in der Versuchsgruppe („KW“) von zwölf Nachkommen pro Mutter auf drei reduziert. Die Tötung der Nachkommen zur Gewebe- und Blutprobengewinnung erfolgte zum Zeitpunkt des Absetzens am 21. Lebenstag. Versuchs- und Kontrollgruppe bestanden aus jeweils acht Tieren. Aus den präparierten Hypothalami wurde die DNA und RNA für die folgenden Analyseschritte extrahiert. Mittels der Methode der semisemiquantitativen RT-PCR wurde die hypothalamische Expression der POMC-mRNA bestimmt. Die Methylierungsanalyse beruhte auf der Methode der Natriumbisulfitbehandlung der DNA mit nachfolgender Klonierung und abschließender Sequenzierungs-PCR, so dass schlussendlich jede einzelne methylierte Cytosinbase innerhalb des untersuchten POMC-Promotors erkennbar war.

Tiere aus kleinen Würfen waren am 21. Lebenstag übergewichtig und zeigten im Blut erhöhte Konzentrationen von Glukose, Insulin und Leptin sowie eine deutlich erhöhte Insulin-Glukose-Ratio als Maß der Insulinresistenz. Im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten war die Expression von POMC nicht erhöht und korrelierte nicht mit den hohen Blutspiegeln der peripheren Sättigungssignale Insulin und Leptin. Wurde die POMC-Expression durch Quotientenbildung in Bezug zu Insulin bzw. Leptin gesetzt, so zeigten sich diese Quotienten signifikant erniedrigt bei Tieren aus kleinen Würfen. Das Methylierungsmuster des POMC-Promotors erwies sich als heterogen: Die einzelnen CpG-Dinukleotide waren zu null bis maximal 84 Prozent methyliert. Im Durchschnitt lag die CpG-Methylierung des POMC-Promotors bei 12 Prozent. In der Analyse des Anteils methylierter CpG-Dinukleotide innerhalb der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren fanden sich signifikant mehr Methylierungen innerhalb der Nf- κ B-Bindungssequenz bei neonatal überernährten Tieren. Auch stromaufwärts einer Sp1-Bindungsstelle zeigte sich der Anteil methylierter CpG-Stellen als signifikant erhöht bei Tieren aus kleinen Würfen. Statistisch signifikante negative Korrelationen ergaben sich zwischen den CpG-Methylierungen der Nf- κ B-Bindungsstelle sowie stromaufwärts der Sp1-Sequenz und dem Quotienten aus POMC-mRNA und Leptin bzw. Insulin. Sowohl der Anteil methylierter CpG-Stellen des Gesamtpromotors als auch innerhalb der Nf- κ B-Bindungsstelle korrelierten positiv mit den Plasmaglukose- sowie Insulinkonzentrationen aller untersuchten Tiere.

Wie bereits für Neuropeptid Y gezeigt worden ist, fanden sich auch bei seinem Gegenspieler POMC deutliche Hinweise auf eine zentrale Leptin- und/oder Insulinresistenz neonatal überernährter Ratten im Sinne einer Entkopplung der hypothalamischen POMC-Expression von den Sättigungsparametern Insulin und Leptin. Für die auf metabolischer Ebene bestätigte Fehlprogrammierung der POMC-Expression durch frühe Umwelteinflüsse (hier: Ernährung) fanden sich auf molekularer Ebene folgende epigenetische Entsprechungen: 1. Der hypothalamische POMC-Promotor lag nicht vollständig demethyliert vor, wie es in der Literatur für POMC-exprimierendes Gewebe beschrieben worden ist. Vielmehr entsprach der gefundene Methylierungsanteil von zwölf Prozent aller CpG-Dinukleotide einer relevanten transkriptionsbeeinflussenden Promotoreigenschaft, was sich an der relativ erniedrigten insulin- und leptinabhängigen mRNA-Expression zeigte. 2. Neonatale Überernährung führte in der KW-Gruppe zu epigenetischen Modifikationen der Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Nf- κ B und Sp1 des POMC-Promotors. Die erhöhte CpG-Methylierung beider Bindungsstellen kann nach der Literatur die Anlagerung des jeweiligen Signalproteins verhindern und auf diese

Weise die Expression des nachgeschalteten Gens vermindern. Da Sp1 in der Lage ist, seine starke transkriptionsaktivierende Wirkung auch über Bindung an die Nf- κ B-Sequenz zu entfalten, kann die erhöhte CpG-Methylierung der Bindungsstelle von Nf- κ B in zweifacher Hinsicht die POMC-Aktivierung bei KW-Ratten behindern. 3. Für die funktionelle Relevanz der Nf- κ B- und Sp1-Methylierungen dürfte die nachgewiesene negative Korrelation dieser zu der insulinabhängigen POMC-mRNA-Expression sprechen. Da Nf- κ B und Sp1 in hohem Maße die glukose- und insulinabhängige POMC-Stimulation vermitteln, könnten die epigenetischen Modifikationen ihrer Bindungsstellen für die Fehlprogrammierung der hypothalamischen POMC-Expression bei KW-Ratten verantwortlich sein. 4. Die gefundenen epigenetischen Merkmale des POMC-Promotors stehen in direktem Zusammenhang mit der neonatalen Ernährung und den dadurch verursachten Stoffwechselbedingungen, worauf die positiven Korrelationen zwischen der Blutglukose und der CpG-Methylierung des Gesamtpromotors sowie der Nf- κ B-Sequenz und stromaufwärts der Sp1-Sequenz schließen lassen.

Die vorliegende Studie präsentiert zusammengenommen erstmals das Methylierungsmuster des POMC-Promotors im Hypothalamus gesunder sowie übergewichtiger Ratten und gibt deutliche Hinweise auf eine epigenetische Programmierung des Neuropeptids durch neonatale Überernährung. Klinische Relevanz ergibt sich aus der hier erneut nachgewiesenen Begünstigung von Übergewicht und metabolischem Syndrom durch neonatale Hyperglykämie. Die Bedeutung einer Prävention von Gestationsdiabetes und Überernährung in der Säuglingszeit ist herauszustellen.

Literaturverzeichnis

- Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histology and Histopathology* 2000; 15: 835-842.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus: provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine* 1998; 15: 539-553.
- Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, et al. Increase in intranuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79: 682-690.
- Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Brain folates and DNA methylation in rats fed a choline deficient diet or treated with low doses of methotrexate. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 1996; 66: 232-236.
- Ananth CV, Wen SW. Trends in fetal growth among singleton gestations in the United States and Canada, 1985 through 1998. *Seminars in Perinatology* 2002; 26: 260-267.
- Andria ML, Simon EJ. Localisation of promotor elements in the human mu-opioid receptor gene and regulation by DNA methylation. *Molecular Brain Research* 1999; 70: 54-65.
- Antequera F, Bird A. CpG islands. *EXS* 1993; 64: 169-185.
- Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1990; 62: 503-514.
- Apfelbacher CJ, Cairns J, Bruckner T, et al. Prevalence of overweight and obesity in East and West German children in the decade after reunification: population-based series of cross-sectional studies. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2008; 62: 125-130.
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Medicine* 2005; 11: 191-198.

- Asaba K, Iwasaki Y, Asai M, et al. High glucose activates pituitary proopiomelanocortin gene expression: possible role of free radical-sensitive transcription factors. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2007; 23: 317-323.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; 17: 305-311.
- Banks WA. The blood-brain barrier as a cause of obesity. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14: 1606-1614.
- Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 1972; 97: 142-145.
- Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *British Medical Journal* 1995; 311: 171-174.
- Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Hormone and Metabolic Research* 1999; 31: 345-350.
- Bednarik DP, Duckett C, Kim SU, et al. DNA CpG methylation inhibits binding of NF-kappaB proteins to the HIV-1 long terminal repeat cognate DNA motifs. *The New Biologist* 1991; 3: 969-976.
- Bergmann RL, Richter R, Bergmann KE et al. Secular trends in neonatal macrosomia in Berlin: influences of potential determinants. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2003; 17: 244-249.
- Bertrand F, Philippe C, Antoine PJ, et al. Insulin activates nuclear factor kappaB in mammalian cells through a Raf-1-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 24435-24441.
- Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* 2000; 9: 2395-2402.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209-213.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 1979; 7: 1513-1523.

- Bishop JF, Mouradian MM. Characterization of a corticotropin releasing hormone responsive region in the murine proopiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1993; 97: 165-171.
- Bishop JF, Rinaudo MS, Ritter JK, et al. A putative AP-2 binding site in the 5' flanking region of the mouse POMC gene. *FEBS Letters* 1990; 264: 125-129.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 1998; 139: 3485-3491.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, et al. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* 1998; 1: 619-625.
- Bjorbaek C, Lavery HJ, Bates SH, et al. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 40649-40657.
- Björntorp P, Rosmond R. Obesity and cortisol. *Nutrition* 2000; 16: 924-936.
- Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. *Frontiers in Eating and Weight Regulation. Forum of Nutrition* 2010; 63: 133-140.
- Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005; 115: 290-296.
- Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, et al. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood. *Diabetes* 2005; 54: 197-203.
- Bouloumié A, Maruma T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; 13: 1231-1238.
- Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S. Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 1417-1425.

- Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, et al. Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Molecular Endocrinology* 1995; 9: 745-755.
- Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO Journal* 1992; 11: 327-333.
- Bray GA, Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* 2006; 29: 109-117.
- Brown LM, Clegg DJ, Benoit SC, Woods SC. Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiology and Behavior* 2006; 89: 687-691.
- Brunn M. DNA-Methylierung des Neuropeptid Y-Genpromotors im Hypothalamus neonatal überernährter Ratten. Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Dissertationsschrift veröffentlicht online 2010 unter: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000015311.
- 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: 1219-1223.
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nature Medicine* 2005; 11: 183-190.
- Cai F, Gyulhandanyan AV, Wheeler 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. *Journal of Endocrinology* 2007; 192: 605-614.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996; 348: 159-161.
- Carvalho JB, Ribeiro EB, Folli F, et al. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biological Chemistry* 2003; 384: 151-159.

- Carvalho JB, Siloto RM, Ignacchitti I, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *The FEBS Letters* 2001; 500: 119-124.
- Cedergren MI. Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology* 2004; 103: 219-224.
- Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 40778-40787.
- Chen B, He L, Savell VH, Jenkins JJ, Parham DM. Inhibition of the Interferon- γ /signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21/WAF1 promoter region. *Cancer Research* 2000; 60: 3290-3298.
- Choi SW, Friso S, Ghandour H, et al. Vitamin B-12 deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. *Journal of Nutrition* 2004; 134: 750-755.
- 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 deoxyribonucleic acid methylation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; 94: 1017-1025.
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-534.
- Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 is inhibited by mCpG methylation. *Gene* 1997; 195: 67-71.
- Cochet M, Chang AC, Cohen SN. Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequences for human proopiomelanocortin. *Nature* 1982; 297: 335-339.
- Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortinergic system. *Nature Neuroscience* 2005; 8: 571-578.

- Counts JL, Sarmiento JI, Harbison ML, et al. Cell proliferation and global methylation status changes in mouse liver after phenobarbital and/or choline-devoid, methionine deficient diet administration. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1251-1257.
- Coupé B, Amarger V, Grit I, et al. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 2010; 151: 702-713.
- Crowther NJ, Hiller JE, Moss JR et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *The New England Journal of Medicine* 2005; 16: 2477-2486.
- Cuadrado M, Sacristán M, Antequera F. Species-specific organization of CpG island promoters at mammalian homologous genes. *EMBO Reports* 2001; 2: 586-592.
- Culotta VC, Hamer DH. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9: 1376-1380.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB et al. Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996; 94: 3246-3250.
- Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000; 49: 2208-2211.
- Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 2007; 18: 521-524.
- Davidowa H, Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport* 2000; 11: 2795-2798.
- Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes and Development* 2011; 25: 1010-1022.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005; 146: 4192-4199.

- Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen LA et al. Breast-fed infants are leaner than formula-fed infants at 1 y of age: the DARLING study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1993; 57: 140-145.
- Dhillon H, Kalra SP, Prima V, et al. Central leptin gene therapy suppresses body weight gain, adiposity and serum insulin without affecting food consumption in normal rats: a long-term study. *Regulatory Peptides* 2001; 99: 69-77.
- Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1307-1312.
- Dörner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biologica et Medica Germanica* 1974; 34: 1093-1095.
- Dörner G, Hagen N, Witthuhn W. Early postnatal overfeeding as an etiopathogenetic factor in adult obesity. *Acta Biologica et Medica Germanica* 1976; 35: 799-803.
- Douet V, Heller MB, Le Saux O. DNA methylation and Sp1 binding determine the tissue specific transcriptional activity of the mouse *Abcc6* promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2007; 354: 66-71.
- Downs SM. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Developmental Biology* 1995; 167: 502-512.
- Drouet C, Shakhov AN, Jongeneel CV. Enhancers and transcription factors controlling the inducibility of the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary macrophages. *Journal of Immunology* 1991; 147: 1694-1700.
- Drouin J, Chamberland M, Charron J, et al. Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Letters* 1985; 193: 54-58.
- Drouin J, Sun YL, Chamberland M, et al. Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *The EMBO Journal* 1993; 12: 145-156.

- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21: 5400-5413.
- Ehrlich S, Weiss D, Burghardt R, et al. Promoter specific DNA methylation and gene expression of POMC in acutely underweight and recovered patients with anorexia nervosa. *Journal of Psychiatric Research* 2010; 44: 827-833.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
- Faust IM, Johnson PR, Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *The Journal of Nutrition* 1980; 110: 2027-2034.
- Finley JC, Lindström P, Petrusz P. Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology* 1981; 33: 28-42.
- Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1991; 260: R1104-1113.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1992; 89: 1827-1831.
- Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, et al. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2004; 101: 4661-4666.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology* 1987; 196: 261-282.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. Transcripts and CpG islands associated with the pro-opiomelanocortin gene and other neurally expressed genes. *Journal of Molecular Endocrinology* 1994; 12: 365-382.

- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, et al. DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodelling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2004; 318: 544-555.
- Gerrero MR, McEvelly RJ, Turner E, et al. Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1993; 90: 10841-10845.
- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, et al. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93: 6231-6235.
- Gill G. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays in Biochemistry* 2001; 37: 33-43.
- Gloriam DE, Fredriksson R, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* 2007; 8: 338.
- Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 2005; 74: 481-514.
- Goshal K, Li X, Datta J, et al. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferase and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *Journal of Nutrition* 2006; 136: 1522-1527.
- Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, et al. Development of metabolic systems. *Physiology and Behavior* 2005; 86: 646-660.
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: e65.
- Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Glucose intolerance is predicted by the high fasting insulin-to-glucose ratio. *Diabetes and Metabolism* 2001; 27: 117-121.

- Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR, et al. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-I mRNA overexpression in psychosis. *Neurochemistry* 2006; 18: 57-60.
- Günter HH, Scharf A, Hertel H et al. Perinatale Morbidität in Schwangerschaften von präkonzeptionellen Diabetikerinnen und Gestationsdiabetikerinnen im Vergleich mit Nichtdiabetikerinnen. Ergebnisse der niedersächsischen Perinatalerhebung. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 2006; 210: 200-207.
- Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35: 595-601.
- HAPO Study Cooperative Research Group: Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358: 1991-2002.
- Harder T, Bergmann R, Kallischnigg G et al. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 2005; 162: 397-403.
- Harder T, Kohlhoff R, Dörner G, et al. Perinatal programming of insulin resistance in childhood: critical impact of neonatal insulin and low birth weight in a risk population. *Diabetic Medicine* 2001; 18: 634-639.
- Harder T, Rodekamp E, Schellong K et al. Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 2007; 165: 849-857.
- Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1988; 85: 2066-2070.
- Heisler LK, Cowley MA, Kishi T, et al. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003; 994: 169-174.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1996; 93: 9821-9826.

- Hermann R, Doerfler W. Interference with protein binding at AP2 sites by sequence-specific methylation in the late E2A promoter of adenovirus type 2 DNA. *FEBS Letters* 1991; 281: 191-195.
- Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, et al. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *The EMBO Journal* 1994; 13: 2870-2875.
- Hidaka S, Yoshimatsu H, Kondou S, et al. Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *FASEB Journal* 2002; 16: 509-518.
- Hinz G, Hecht K, Rohde W, Dörner G. Long-term effects of early postnatal nutrition on subsequently body weight gain, emotionality and learning behaviour in male rats. *Experimental and Clinical Endocrinology* 1983; 82: 73-77.
- Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, et al. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 1266-1274.
- Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; 238: 163-170.
- Hsieh LL, Wainfan E, Hoshina S, et al. Altered expression of retrovirus-like sequences and cellular oncogenes in mice fed methyl-deficient diets. *Cancer Research* 1989; 49: 3795-3799.
- Hübschle T, Thom E, Watson A, et al. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21: 2413-2424.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997; 88: 131-141.
- Jang PG, Namkoong C, Kang GM, et al. NF-kappaB activation in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons is essential in illness- and leptin-induced anorexia. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 9706-9715.
- Janknecht R, Hunter T. Transcription. A growing coactivator network. *Nature* 1996; 383: 22-23.

- Jeannotte L, Trifiro MA, Plante RK, et al. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Molecular and Cellular Biology* 1987; 7: 4058-4064.
- Jin WD, Boutillier AL, Glucksman MJ, et al. Characterization of a corticotropin-releasing hormone-responsive element in the rat proopiomelanocortin gene promoter and molecular cloning of its binding protein. *Molecular Endocrinology* 1994; 8: 1377-1388.
- Johnson WD, Kroon JJ, Greenway FL, et al. Prevalence of risk factors for metabolic syndrome in adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2001-2006. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 2009; 163: 371-377.
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; 62: 1189-1204.
- Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM 3rd, et al. De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1990; 87: 6117-6121.
- Joseph SA, Tassorelli C, Prasad AV, Lynd-Balta E. NF-kappaB transcription factor subunits in rat brain: colocalisation of p65 and alpha-MSH. *Peptides* 1996; 17: 655-664.
- Kalra SP. Central leptin gene therapy ameliorates diabetes type 1 and 2 through two independent hypothalamic relays: a benefit beyond weight and appetite regulation. *Peptides* 2009; 30: 1957-1963.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 68-100.
- Kalra SP, Kalra PS. Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin. *Endocrine* 2003; 22: 49-56.
- Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1745: 287-299.

- Karalis KP, Venihaki M, Zhao J, et al. NF-kappaB participates in the corticotropin-releasing, hormone-induced regulation of the pituitary proopiomelanocortin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 10837-10840.
- Kastin AJ, Pan W, Maness LM, et al. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* 1999; 20: 1449-1453.
- Kim YI, Progribny IP, Basnakian AG, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the tumor p53 suppressor gene. *American Journal of Clinical Nutrition* 1997; 65: 46-52.
- Koldovský O, Hahn P, Hromadová M, et al. Late effects of early nutritional manipulations. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 1995; 44: 357-360.
- Koletzko B, von Kries R, Closa R, et al. European Childhood Obesity Trial Study Group. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2009; 89: 1836-1845.
- Kovacheva VP, Mellott TJ, Davison JM, et al. Gestational choline deficiency causes global and Igf2 gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 31777-31788.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA-methylation. *Science* 2008; 319: 1827-1830.
- Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 5492-5499.
- Kurth BM, Schaffrath Rosario A. Die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. Ergebnisse des bundesweiten Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2007; 50: 736-743.
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, et al. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 1994; 370: 223-226.

- Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 2001; 104: 849-859.
- Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, et al. Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes and Development* 1996; 10: 1284-1295.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992; 13: 1095-1107.
- Lavender P, Clark AJ, Besser GM, Rees LH. Variable methylation of the 5'-flanking DNA of the human pro-opiomelanocortin gene. *Journal of Molecular Endocrinology* 1991; 6: 53-61.
- Levin BE. Epigenetic influences on food intake and physical activity level: review of animal studies. *Obesity* 2008; 16 Suppl. 3: 51-54.
- Levin BE. Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. *Nutrition* 2000; 16: 909-915.
- Liedtke C, Zschemisch NH, Cohrs A, et al. Silencing of caspase-8 in murine hepatocellular carcinomas is mediated via methylation of an essential promoter element. *Gastroenterology* 2005; 129: 1790-1792.
- Lillicrop KA, Phillips EA, Jackson AA, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *Journal of Nutrition* 2005; 135: 1382-1386.
- Lillicrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *The British Journal of Nutrition* 2007; 97: 1064-1073.

- Liu B, Mortrud M, Low MJ. DNA elements with AT-rich core sequences direct pituitary cell-specific expression of the pro-opiomelanocortin gene in transgenic mice. *The Biochemical Journal* 1995; 312: 827-832.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, et al. Maternal Care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 1997; 277: 1659-1662.
- Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie des endokrinen Systems. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 14. Auflage. Springer-Verlag. Berlin 2001: 489.
- 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. *Diabetologica* 2005; 48: 140-148.
- Lopez M, Tovar S, Vázquez MJ, et al. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *International Journal of Obesity* 2007; 31: 371-377.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium* 1991; 156: 38-50.
- Lyko M, Foret S, Kucharski R, et al. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *Public Library of Science Biology* 2010; 8: e1000506.
- Ma X, Bruning J, Ashcroft FM. Glucagon-like peptide 1 stimulates hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *Journal of Neuroscience* 2007; 27: 7125-7129.
- Macho L, Alexandrová M, Hromadová M et al. Response of the adrenals to stress in animals from litters with different numbers of the young. *Physiologia Bohemoslovaca* 1975; 24: 501-508.
- Martens C, Bilodeau S, Maira M, et al. Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI/NUR77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptors. *Molecular Endocrinology* 2005; 19: 885-897.
- May MJ, Gosh S. Signal transduction through NF-kappaB. *Immunology Today* 1998; 19: 80-88.

- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience* 2009; 12: 342-348.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *Journal of Neuroscience* 2000; 20: 3926-3935.
- Mensink GB, Lampert T, Bergmann E. Overweight and obesity in Germany 1984-2003. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005; 48: 1348-1356.
- Miao F, Wu X, Zhang L, et al. Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 13854-13863.
- Michaud EJ, van Vugt MJ, Bultman SJ, et al. Differential expression of a new dominant agouti allele is correlated with methylation state and is influenced by parental lineage. *Genes and Development* 1994; 8: 1463-1472.
- Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino-acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1619-1629.
- Millington WR, Rosenthal DW, Unal CB, Nyquist-Battie C. Localization of pro-opiomelanocortin mRNA transcripts and peptide immunoreactivity in rat heart. *Cardiovascular Research* 1999; 43: 107-116.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428: 569-574.
- Mitchell JB, Betito K, Rowe W, et al. Serotonergic regulation of type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures: evidence for the importance of serotonin-induced changes in cAMP-levels. *Neuroscience* 1992; 48: 631-639.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2003; 289: 76-79.

- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 1987; 99: 371-382.
- Monk M, Grant M. Preferential X-chromosome inactivation, DNA methylation and imprinting. *Development (Cambridge, England)*. Supplement 1990: 55-62.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, et al. SOCS3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nature Medicine* 2004; 10: 739-743.
- Münzberg H, Huo L, Nillni EA, et al. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 2003; 144: 2121-2131.
- Münzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nature Neuroscience* 2005; 8: 566-570.
- Mynard V, Guignat L, Devin-Leclerc J, et al. Different mechanisms for leukemia inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin promoter regions. *Endocrinology* 2002; 143: 3916-2394.
- Mynard V, Latchoumanin O, Guignat L, et al. Synergistic signaling by corticotropin-releasing hormone and leukemia inhibitory factor bridged by phosphorylated 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein at the NUR response element (NUR-RE)-signal transducers and activators of transcription (STAT) element of the proopiomelanocortin promoter. *Molecular Endocrinology* 2004; 18: 2997-3010.
- 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. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 338-348.
- Ng HH, Jeppesen P, Bird A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20: 1394-1406.
- Oden KL, Clarke S. S-adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels. *Biochemistry* 1983; 22: 2978-2986.

- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006; 295: 1549-1555.
- Ohgane J, Yagi S, Shiota K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. *Placenta* 2008; 29A: 29-35.
- Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Research* 1996; 24: 5064-5066.
- Oscari LB, McGarr JA. Evidence that the amount of food consumed in early life fixes appetite in the rat. *The American Journal of Physiology* 1978; 235: R141-144.
- Ou X-M, Chen K, Shih JC. Glucocorticoid and Androgen Activation of Monoamine Oxidase A is Regulated Differently by R1 and Sp1. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 21512-21525.
- Owen CG, Martin RM, Whincup PH et al. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 84: 1043-1054.
- Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 1999; 58: 615-619.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.
- Pan X, Solomon SS, Borromeo DM, et al. Insulin deprivation leads to deficiency of Sp1 transcription factor in H-411 E hepatoma cells and in streptozotocin-induced diabetic ketoacidosis in the rat. *Endocrinology* 2001; 142: 1635-1642.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007; 449: 228-233.
- 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.

- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 1986, San Diego.
- Picó C, Oliver P, Sánchez J, et al. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *International Journal of Obesity* 2007; 31: 1199-1209.
- Plagemann A, Roepke K, Harder T, et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of Perinatal Medicine* 2010; 38: 393-400.
- 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. *The Journal of Physiology* 2009; 587: 4963-4976.
- Plagemann A. "Fetal programming" and "functional teratogenesis": on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *Journal of Perinatal Medicine* 2004; 32: 297-305.
- 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 Research* 1999a; 836: 146-155.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed rats. *Journal of Neuroendocrinology* 1999b; 11: 541-546.
- Plagemann A, Heidrich I, Götz F, et al. Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Experimental and Clinical Endocrinology* 1992; 99: 91-95.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 33002-33010.
- Proulx K, Clavel S, Nault G, et al. High neonatal leptin exposure enhances brain GR expression and feedback efficacy on the adrenocortical axis of developing rats. *Endocrinology* 2001; 142: 4607-4616.

- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2000; 97: 5237-5242.
- Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1994; 91: 752-756.
- Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18: 6938-6947.
- Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Human Molecular Genetics* 1995; 4: 1751-1755.
- Rees WD, Hay SM, Brown DS, et al. Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in livers of rat fetuses. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 1821-1826.
- Reik W, Surani MA. Cancer genetics. Genomic imprinting and embryonal tumours. *Nature* 1989; 338: 112-113.
- Riegel AT, Lu Y, Remenick J, et al. Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Molecular Endocrinology* 1991; 5: 1973-1982.
- Riegel AT, Remenick J, Wolford RG, et al. A novel transcriptional activator (PO-B) binds between the TATA box and cap site of the pro-opiomelanocortin gene. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 4513-4521.
- Rizk NM, Liu LS, Eckel J. Hypothalamic expression of neuropeptide-Y in the New Zealand obese mouse. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1998; 22: 1172-1177.
- Ruan H, Hacohen N, Golub TR, et al. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocyte: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 2002; 51: 1319-1336.

- Rushlow C, Warrior R. The rel family of proteins. *Bioessays* 1992; 14: 89-95.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1996.
- Saluz HP, Jiricny J, Jost JP. Genomic sequencing reveals a positive correlation between the kinetics of strand-specific DNA demethylation of the overlapping estradiol/glucocorticoid-receptor binding sites and the rate of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1986; 83: 7167-7171.
- Samson SL, Wong NC. Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29: 265-279.
- Sanger F, Nicklein S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1977; 74: 5463-5467.
- Scarpa S, Fusco A, D'Anselmi F, Cavallaro RA. Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Letters* 2003; 541: 145-148.
- Schellong K, Rodekamp E, Ziska T, et al. Malprogramming of the hypothalamic melanocortinergetic system in neonatally overfed rats. *Early Human Development* 2006; 82: 555.
- Schmidt I, Schoelch C, Ziska T, et al. Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiological Genomics* 2000; 3: 113-120.
- Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, et al. Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine* 1996; 24: 1285-1292.
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997; 46: 2119-2123.
- Shi ZQ, Nelson A, Whitcomb L, et al. Intracerebroventricular administration of leptin markedly enhances insulin sensitivity and systemic glucose utilization in conscious rats. *Metabolism* 1998; 47: 1274-1280.

- Shuman S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 32678-32684.
- Siegmund KD, Laird PW. Analysis of complex methylation data. *Methods* 2002; 27: 170-178.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2007; 104: 19351-19356.
- Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine Reviews* 1988; 9: 159-179.
- Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebath AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obesity Research* 2004; 12: 180-186.
- Sorensen HT, Sabroe S, Rothman KJ et al. Relation between weight and length and birth and body mass index in young adulthood: cohort study. *British Medical Journal* 1997; 315: 1137.
- Sothorn MS. Obesity prevention in children: physical activity and nutrition. *Nutrition* 2004; 20: 704-708.
- Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Science* 1984; 35: 2635-2642.
- 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: 1897-1903.
- Stevens A, Begum G, Cook A, et al. Glucocorticoid receptor genes in the ovine fetus after periconceptional epigenetic changes in the hypothalamic proopiomelanocortin and undernutrition. *Endocrinology* 2010; 151: 3652-3664.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2002; 99: 3740-3745.

- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Developmental Cell* 2001; 1: 749-758.
- Therrien M, Drouin J. Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Biology* 1993; 13: 2342-2353.
- Therrien M, Drouin J. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology* 1991; 11: 3492-3503.
- Thomassin H, Flavin M, Espinás ML, Grange T. Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *The EMBO Journal* 2001; 20: 1974-83.
- Thompson D, Edelsberg J, Colditz GA, et al. Lifetime health and economic consequences of obesity. *Archives of Internal Medicine* 1999; 159: 2177-2183.
- Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, et al. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *The British Journal of Nutrition* 2006; 95: 830-837.
- Tsukada T, Nakai Y, Fukushima M, et al. Functional analysis of the cell-specific enhancer in the human proopiomelanocortin gene by beta-galactosidase histochemical staining. *DNA and Cell Biology* 1994; 13: 755-762.
- Velculescu VE. Defining the blueprint of the cancer genome. *Carcinogenesis* 2008; 29:1087-1091.
- Voits M, Förster S, Rödel S, et al. Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1996; 354: 374-378.
- Waddington CH. The Epigenotype. *Endeavour* 1942: 118-120.

- Wainfan E, Dizik M, Stender M, Christman JK. Rapid appearance of hypomethylated DNA in livers of rats fed cancer-promoting, methyl-deficient diets. *Cancer Research* 1989; 49: 4094-4097.
- Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, et al. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 1997; 46: 335-341.
- Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, et al. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 4422-4426.
- Waterland RA, Garza C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *Journal of Nutrition* 2002; 132: 357-364.
- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 69: 179-197.
- Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets or early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23: 5293-5300.
- Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, et al. Methyl donor supplementation prevents trans-generational amplification of obesity. *International Journal of Obesity* 2008; 32: 1373-1379.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behaviour. *Nature Neuroscience* 2004; 7: 847-854.
- Weaver ICG, D'Alessio AC, Brown SE, et al. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein A mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *Journal of Neuroscience* 2007; 27: 1756-1768.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics* 2007; 39: 457-466.

- Whiteside ST, Goodbourn S. Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *Journal of Cell Science* 1993; 104: 949-955.
- Wilson MJ, Shivapurkar N, Poirier LA. Hypomethylation of hepatic nuclear DNA in rats fed with a carcinogenic methyl-deficient diet. *Biochemical Journal* 1984; 218: 987-990.
- Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Research Notes* 2008; 1: 54.
- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB Journal* 1998; 12: 949-957.
- Wünsche J, Herrmann U, Bock HD. Über die Aminosäuren-Zusammensetzung der Milch verschiedener Tierarten. *Food/Nahrung* 1967; 11: 331-336.
- Ye L, Li X, Kong X, et al. Hypomethylation in the promoter region of POMC gene correlates with ectopic overexpression in thymic carcinoids. *The Journal of Endocrinology* 2005; 185: 337-343.
- Yerneni KK, Bai W, Khan BV, et al. Hyperglycaemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999; 48: 855-864.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, et al. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 1997; 91: 243-252.
- Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, et al. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23: 4056-4065.

Publikationsliste

Vorliegende Methylierungsstudie des POMC-Promotors:

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. *The Journal of Physiology* 2009; 587: 4963-4976.

Folgestudie zum Methylierungsstatus des Insulinrezeptor-Promotors:

Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, **Wittrock-Staar M**, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of Perinatal Medicine* 2010; 38: 393-400.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Professor Dr. A. Plagemann, Leiter der Arbeitsgruppe für Experimentelle Geburtsmedizin der Klinik für Geburtsmedizin an der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Aufnahme als Doktorandin und die Bereitstellung des Promotionsthemas.

Für die Einführung in die Arbeits- und Denkweisen experimenteller und klinischer Forschung und die hervorragende fachliche Betreuung über die Jahre danke ich Herrn Dr. T. Harder, stellvertretender Leiter der Arbeitsgruppe für Experimentelle Geburtsmedizin.

Mein lieber ehemaliger Kommilitone und nun Kollege Dr. Matthias Brunn arbeitete mich in die Methode der Bisulfitequenzierung ein und war voller Enthusiasmus immer zu einem sachlichen Disput bereit.

Frau Katharina Roepke wies mich als Biologin in die korrekte und sichere Benutzung eines Labors ein und war mir mit Ihrer Integrität, ihrem Fleiß und Ihrer Genauigkeit ein stetes Vorbild.

Das Herz und die Seele der Arbeitsgruppe stellten für mich Frau Kerstin Melchior, Veterinärmedizinerin, und Herr Thomas Ziska, Biochemiker, dar. Danke für die liebevolle Aufnahme und Unterstützung. Niemand führt ein solch akkurates Labor- und Protokollwesen wie Herr Ziska. Niemand führt besonnener und freundlicher ein Tierlabor als Frau Melchior. Sie hatten beide für mich immer ein offenes Ohr und einen Lösungsvorschlag parat.

Frau Dr. Elke Rodekamp war für mich die Expertin auf dem Gebiet der RT-PCR. Danke für den freundschaftlichen und fachlichen Gedankenaustausch.

Ohne Frau Dr. Uta Neitzke und Frau Karen Schellong wäre die Doktorandenzeit nur halb so angenehm gewesen.

Mein bester Gatte Dr. Marc Wittrock ging mir mit gutem Beispiel voran. Danke, dass es dich gibt.

Abschließend gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. J.-W. Dudenhausen, der während meiner Zeit als Doktorandin der großartige Direktor der Klinik für Geburtsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin war.

Erklärung

„Ich, Manon Josephine Wittrock-Staar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Untersuchungen zur DNA-Methylierung des hypothalamischen POMC-Promotors bei neonatal überernährten 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.“

Schwerin,