

DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR NSCL-2 –
NEURONALE KONTROLLE VON GEWICHT UND
FETTGEWEBSSTRUKTUR



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DER

NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT I
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

VON FRAU KAREN RUSCHKE
GEB. AM 20.09.1978 IN ASCHERSLEBEN

GUTACHTER:

1. PROF. DR. DR. T. BRAUN
2. PROF. DR. K. BREUNIG
3. PROF. DR. DR. I. KLÖTING

HALLE (SAALE), 28.09.2006

VERTEIDIGT AM: 20.04.02007

urn:nbn:de:gbv:3-000011684

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011684>]

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Der Hypothalamus als Zentrum der Gewichtsregulation	1
1.1.1	Entwicklung	1
1.1.2	Die Kontrolle der Futtermittelaufnahme	3
1.1.2.1	NPY und AgRP wirken orexigen	4
1.1.2.2	α -MSH und CART wirken anorexigen	5
1.1.2.3	Signalweiterleitung über den lateralen Hypothalamus in Bereiche des Hinterhirns	6
1.2	Das Fettgewebe – Energiespeicher und endokrines Organ	7
1.3	Die Familie der bHLH Transkriptionsfaktoren	9
1.3.1	Neuronale bHLH Transkriptionsfaktoren	10
1.3.1.1	NSCL-2	11
1.4	Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Kits	13
2.1.3	Enzyme	14
2.1.4	Lösungen und Medien	14
2.1.5	Lösungen und Medien für die Zellkultur	16
2.1.6	Oligonukleotide	17
2.1.7	Mausstämme	19
2.1.8	Bakterienstämme	19
2.1.9	Zelllinien	19
2.1.10	Klonierungsvektoren	20
2.1.11	Antikörper	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	Präparation von Nukleinsäuren aus Geweben	20
2.2.1.1	Isolation von genomischer DNA	20
2.2.1.2	Isolation von RNA aus tierischem Gewebe	21
2.2.2	Reinigung und Fällung von DNA	21
2.2.2.1	Aufreinigung von DNA	21
2.2.2.2	Fällung	21
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von gelösten Nukleinsäuren	22

2.2.4	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	22
2.2.5	Elektroelution von DNA aus Agarosegelen	23
2.2.6	Klonierung von DNA	23
2.2.6.1	Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonuklasen	23
2.2.6.2	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	23
2.2.6.3	Ligation	24
2.2.6.4	Herstellung PEG-kompetenter <i>E.coli</i> Zellen	24
2.2.6.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> Zellen	24
2.2.7	Präparation von Plasmid-DNA	25
2.2.7.1	DNA Maxi-Präparation	25
2.2.7.2	DNA Minipräparation	25
2.2.7.3	Plasmidpräparation mittels Säule	26
2.2.8	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	26
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.9.1	PCR zur Genotypisierung von Mäusen	27
2.2.9.2	PCR-Mutagenese	28
2.2.9.3	Reverse Transkription	29
2.2.9.4	Real-Time-PCR	29
2.2.10	Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren	30
2.2.10.1	Verdau und Transfer von DNA (NSCL-2 Genotypisierung)	30
2.2.10.2	Prähybridisierung	31
2.2.10.3	Radioaktive DNA-Markierung	31
2.2.10.4	Hybridisierung	32
2.2.10.5	Autoradiographie	32
2.2.11	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	33
2.2.12	In vitro Proteinsynthese	33
2.2.13	Electro Mobility Shift Assay (EMSA)	33
2.2.14	Immunopräzipitation	34
2.2.14.1	Ko-Immunopräzipitation	34
2.2.14.2	Chromatin-Immunopräzipitation	35
2.2.15	Präparation von Geweben	36
2.2.16	Histologie	37
2.2.16.1	Harzeinbettung und Ultramikrotomschnitte	37
2.2.16.2	Immunhistochemie	37
2.2.16.3	Fotodokumentation	38
2.2.17	Statistische Analyse	38
2.2.18	Wirkstoffbehandlung von Mäusen	39

2.2.19	Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
2.2.20	Radioimmunoassay (RIA)	39
2.2.21	Zellkultur	40
2.2.21.1	Kultivierung und Passagierung von Säugerzellen	40
2.2.21.2	Kryokonservierung von Säugerzellen	40
2.2.21.3	Transfektion	40
2.2.21.3.1	<i>Kalziumphosphat Transfektion</i>	40
2.2.21.3.2	<i>Lipofektion</i>	41
2.2.21.4	Übersicht über die Kultivierungsmethoden der verwendeten Zelllinien	41
2.2.21.5	Transaktivierungs-Analyse mittels Luziferase	41
2.2.21.5.1	<i>Lyse von Zellen</i>	42
2.2.21.5.2	<i>Abgleich von Transfektionseffizienzen</i>	42
2.2.21.5.3	<i>Bestimmung der Luziferaseaktivität</i>	43
2.2.21.6	Isolation und Kultivierung von Präadipozyten	43
2.2.21.7	In Vitro Differenzierung von Präadipozyten	43
2.2.21.8	Öl-Rot-O Färbung	44
2.2.21.9	Zell-Charakterisierung mit FACS	44
2.2.21.10	Isolation von Adipozyten, Bestimmung der Zellgröße, des Glukosetransports, des Glukosemetabolismus und der Lipolyse	44
3	Ergebnisse	46
3.1	Vorarbeiten	46
3.2	NSCL-2 aktiviert den Promotor des Necdin-Gens	46
3.2.1	NSCL-2 bindet <i>in vitro</i> an spezifische Sequenzmotive innerhalb des Necdin-Promotors	46
3.2.2	NSCL-2 bindet <i>in vivo</i> an spezifische Sequenzmotive innerhalb des Necdin-Promotors	47
3.2.3	NSCL-2 transaktiviert den Necdin-Promotor	49
3.2.4	Koimmunopräzipitation von NSCL-2/LMO-Komplexen	51
3.3	Analyse des Leptin Signalweges in NSCL-2 Mutanten	53
3.3.1	NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen eine Leptinresistenz	53
3.3.2	Generierung von NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Doppelmutanten	54
3.3.3	Leptinbehandlung von Doppelmutanten	56
3.3.4	Die Anzahl POMC positiver Zellen ist nicht verändert	58
3.3.5	NSCL-2 $-/-$ Mäuse reagieren auf die Stimulation des MC4 Rezeptors mit Gewichtsverlust	60
3.4	Die NSCL-2 Nullmutation führt zu einer veränderten Fettgewebsstruktur	62

3.4.1	NSCL-2 Mutanten weisen eine erhöhte Anzahl von Präadipozyten im weißen Fettgewebe auf	62
3.4.2	Charakterisierung isolierter Adipozyten	64
3.4.3	In vitro Differenzierung isolierter Adipozyten	67
3.4.4	Expressionsanalyse von Fettzell-Differenzierungsfaktoren	68
3.4.5	Glukose- und Insulintoleranztest	70
3.4.6	Insulinspiegel NSCL-2 defizienter Mäuse	72
3.4.7	NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Serum-Resistinspiegel	73
3.4.8	Die Serum-Adiponektinspiegel sind in NSCL-2 Nullmutanten erhöht	75
4	Diskussion	77
4.1	Die Expression des Necdin-Gens steht unter direkter Kontrolle von NSCL-2	78
4.1.1	NSCL-2 interagiert mit verschiedenen Kofaktoren, um die Transkription von Necdin zu aktivieren	81
4.2	Die zentrale Kontrolle des Energiehaushalts ist in NSCL-2 Mutanten gestört	83
4.2.1	Leptinresistenz	83
4.2.2	Der leptininduzierte anorexigene Signalweg	85
4.3	NSCL-2 Mutanten zeigen eine Insulinresistenz in Adipozyten, die jedoch keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz der Tiere hat	87
4.3.1	NSCL-2 Defizienz führt zur Akkumulation von Präadipozyten im weißen Fettgewebe	90
4.4	Wie kontrolliert das neuronal exprimierte NSCL-2 die Fettgewebs-struktur?	91
4.5	Ausblick	92
5	Referenzen	94
6	Anhang	108
6.1	Abkürzungen	108
6.2	Sequenz des Necdin-Promotorbereichs	109
6.3	Tagungsbeiträge, Auszeichnungen und Publikationen	110
6.4	Curriculum vitae	111
6.5	Erklärung	112
6.6	Danksagung	113
7	Zusammenfassung	114

1 Einleitung

Die Zusammensetzung und Menge der Nahrung, die wir zu uns nehmen, variiert von Mahlzeit zu Mahlzeit und von Tag zu Tag. Unser Essverhalten wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. So haben zum Beispiel soziale Faktoren, Emotionen, die Tageszeit, Bequemlichkeit und Kosten Einfluss auf die Energieaufnahme während einzelner Mahlzeiten. Deshalb ist die tägliche Nahrungsaufnahme variabel und korreliert nur schlecht mit dem täglichen Energieverbrauch (Edholm, 1977). Trotz kurzfristiger Störungen der Energiebalance gelingt es den meisten Menschen jedoch, Energieaufnahme und -verbrauch zu synchronisieren, wenn man größere Zeitspannen über viele Mahlzeiten in Betracht zieht. Dieses sich langfristig einstellende Gleichgewicht verdeutlicht den starken Einfluss genetischer Komponenten auf den Energiehaushalt. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Signalmolekülen identifiziert, die Einfluss auf die Energiehomöostase haben. Durch die Forschung am Mausmodell wurden verschiedene monogenetische Formen von Übergewicht beim Menschen identifiziert und neue Ansätze für die Entwicklung von Medikamenten gegen Übergewicht und damit verbundene Krankheiten geschaffen.

Bereits 1940, lange vor Identifizierung der ersten „Sättigungssignale“, beschrieben Hetherington und Ranson die Bedeutung des Hypothalamus für die Gewichtsregulation, indem sie spezifische Regionen dieses Hirnabschnitts durch elektrolytische Verletzungen zerstörten. In Folge dessen zeigten die behandelten Ratten eine Erhöhung des Gewichts oder einen Schutz vor Diät-induzierter Gewichtszunahme, je nachdem, welche Abschnitte innerhalb des Hypothalamus inaktiviert wurden (Hetherington und Ranson, 1940).

1.1 Der Hypothalamus als Zentrum der Gewichtsregulation

1.1.1 Entwicklung

Im sich entwickelnden Embryo entstehen nach der Gastrulation aus den drei Keimblättern die verschiedenen Organanlagen. Aus dem Entoderm entwickeln sich in der weiteren Entwicklung vor allem die epithelialen Anlagen der Verdauungs- und Atemwege. Das Mesoderm liefert die Anlagen für das spätere Skelett, die Skelettmuskulatur, die Kreislauforgane und die Harn- und Geschlechtsorgane. Das äußere Keimblatt, das Ektoderm, bildet im Wesentlichen die Anlagen des Epithels und des Zentralnervensystems (Gehirn und

1. Einleitung

Rückenmark, Ohrbläschen, Riechgrube und Augenlinsen). Nach Ende der Neurulation entstehen im rostralen Bereich des Neuralrohrs aus den drei Gehirnblasen die Anlagen von Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon. In der weiteren Entwicklung entsteht aus dem Prosencephalon (Vorderhirn) durch Unterteilung der vorderen Gehirnblase das Telencephalon und Diencephalon. Aus letzterem gehen Thalamus und Hypothalamus hervor.

Der Hypothalamus befindet sich unterhalb des Thalamus und umschließt den dritten Ventrikel zu beiden Seiten. Er kann chronologisch aufgrund der Entstehung der hypothalamischen Neuronen von lateral nach medial in drei Schichten unterteilt werden (Altman und Bayer, 1978; Altman und Bayer, 1979). Der „retikuläre“ Hypothalamus entsteht zunächst aus Neuronen des Neuroepithels. Diese werden gefolgt von einer zweiten Welle von Neuronen, die aus dem Neuroepithel heraus migrieren, noch bevor die Bildung des „retikulären“ Hypothalamus beendet ist. Diese Neuronen bilden den „core“ Hypothalamus. Die dritte Welle von Neuronen, die vom immer dünner werdenden Neuroepithel abgegeben werden, formen den „midline“ Hypothalamus. Dieser befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum dritten Ventrikel. Im Laufe der Entwicklung entstehen die verschiedenen Kernregionen des Hypothalamus. Abbildung 1 zeigt die Entstehung der drei Regionen des Hypothalamus und die weitere Unterteilung.

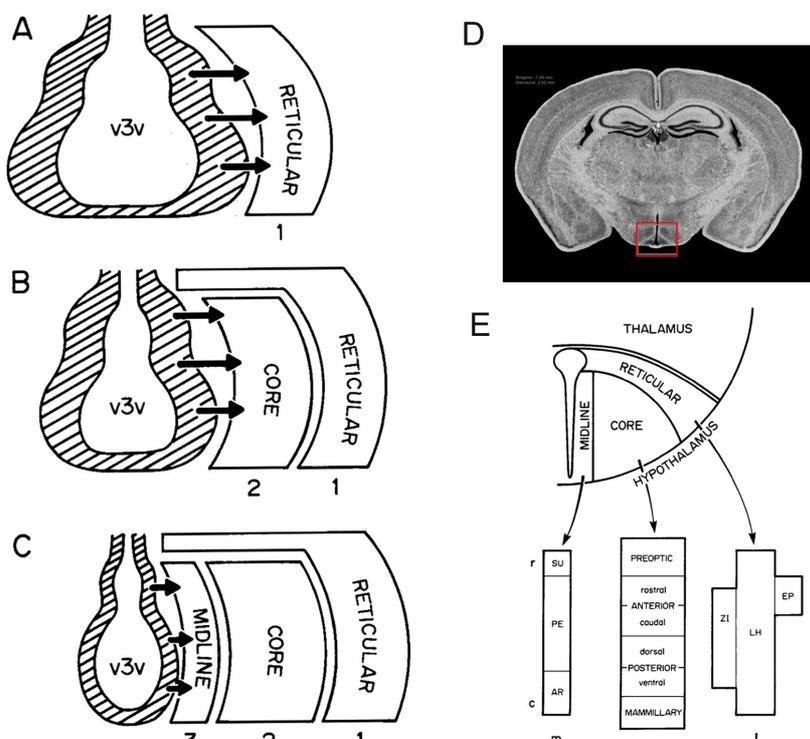


Abbildung 1 Schematische Darstellung zur Entstehung der drei Abschnitte des Hypothalamus (A-C) aus drei aufeinanderfolgenden Wellen von migrierenden Neuronen (siehe Pfeile). (D) Coronaler Schnitt durch ein Maushirn in Höhe des Nucleus Arcuatus. Die in A-C dargestellte Entwicklung bildet später die rot eingerahmte Region. (E) Die drei Abschnitte können weiter in die verschiedenen Kernregionen des Hypothalamus unterteilt werden. Abbildungen aus: (Altman und Bayer, 1986) (A-C, E); www.mbl.org (D). Abkürzungen: v3v Dritter Ventrikel, ventraler Abschnitt; SU Suprachiasmatischer Kern; PE Periventriculäres Feld; AR Nucleus Arcuatus; ZI Zona incerta; LH Lateraler Hypothalamus; EP Entopeduncular nucleus; m medial; l lateral.

1.1.2 Die Kontrolle der Futtermittelaufnahme

Die Erhöhung der Blutzuckerkonzentration nach einer Mahlzeit führt zur Ausschüttung von Insulin aus den pankreatischen β -Zellen. Das Hormon stimuliert die Glukoseaufnahme in Fett und Muskel, wo die Speicherung der Energie in Form von Triglyzeriden stattfindet. Gleichzeitig inhibiert Insulin die Produktion und Ausschüttung von Glukose aus der Leber. Die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen wird über eine Signalkaskade kontrolliert, die unter anderem über den Insulinrezeptor, das Insulinrezeptor Substrat (IRS) und die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) wirkt, und in der Translokation von intrazellulär gespeichertem Glukosetransporter (GLUT4) an die Zelloberfläche resultiert (Saltiel, 2001; Slot et al., 1991a, 1991b; Smith et al., 1991). Durch die Aufnahme von Glukose in Fettzellen wird die Sekretion von Leptin stimuliert (Mueller et al., 1998). Insulin hat demnach einen regulatorischen Effekt auf die Leptinsekretion. Die Ausschüttung dieses Adipocytokins wird jedoch nicht allein durch Insulin gesteuert. So haben z.B. Faktoren wie Glukocorticoide (Sliker et al., 1996), die Aktivierung von Beta3-adrenergen Rezeptoren auf Fettzellen (Mantzoros et al., 1996) und einige Zytokine (Grunfeld et al., 1996) ebenfalls Einfluss auf die Expression von Leptin.

Adipozyten sekretieren Leptin in Konzentrationen, die proportional zu ihren Triglyceridgehalt sind. Die im Blut zirkulierenden Level wiederum korrelieren positiv mit dem Maß an Übergewicht (Considine et al., 1996; Maffei et al., 1995). Das Hormon wird über ein insulinunabhängiges, erschöpfbares Transportsystem in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) aufgenommen (Banks et al., 1996), wobei die Transportrate im Bereich des Hypothalamus am höchsten ist (Kastin und Pan, 2000). Banks et al. konnten 1996 durch die systematische Injektion von radioaktiv markiertem Leptin zeigen, dass der größte Anteil in benachbarten Strukturen der Median Eminence aufgenommen wurde. Die für die Gewichtsregulation so wichtigen Strukturen wie der Nucleus Arcuatus und der ventromediale Kern liegen direkt über dieser Brücke zwischen Blutkreislauf und Gehirn. Zwischen dem Blut-Hirn-Transport von Leptin und der Konzentration im Blut besteht ein enger Zusammenhang, da parallel zum Absinken der Leptinkonzentration während einer Nahrungskarenz auch der Transport ins Hirn absinkt. 1950 wurden von Ingalls et al. Mäuse mit einer spontanen Punktmutation im *obese* Gen beschrieben, die Symptome wie Hyperphagie, extremer Obesität, Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Hypogonadismus zeigten (ob/ob Maus). Friedman und Halaas (1998) konnten vier Jahrzehnte später das entsprechende Gen und Hormon Leptin identifizieren. Während die Leptinkonzentration im Blut bei Energiemangel niedrig ist, zeigen

übergewichtige Patienten und auch diätinduzierte übergewichtige Mäuse hohe Spiegel, die aufgrund einer Leptinresistenz nicht mehr zur Gewichtsabnahme führen (Flier, 2004). Durch die Behandlung von ob/ob Tieren mit Leptin reduzieren sich sowohl die Futteraufnahme als auch das Gewicht. Des Weiteren normalisieren sich neuroendokrine Störungen wie der Hypogonadismus und Hypercortisosteronemie.

Der Leptinrezeptor gehört zur Familie der Klasse I Cytokin Rezeptoren. Mutationen innerhalb des für den Rezeptor codierenden *diabetes* Gens führen zu Mäusen (db/db), die sich phänotypisch nicht von ob/ob Tieren unterscheiden und Leptin resistent sind (Chen et al., 1996; Chua, Jr. et al., 1996). Durch posttranslationale Prozessierung entstehen mehrere Isoformen (Ob-Ra-e), von denen die lange Isoform Ob-Rb die wichtigste Rolle in der Weiterleitung des Leptinsignals spielt. Der Rezeptor ist am stärksten im Hypothalamus exprimiert, speziell im Nucleus Arcuatus, aber auch in Teilen des ventromedialen, dorsomedialen Nucleus (Elmqvist et al., 1998; Fei et al., 1997; Hakansson et al., 1998; Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1996b). Die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor aktiviert den Janus Kinase (JAK)- STAT („signal transducer and activator of transcription“) Signaltransduktionsweg (Myers, Jr., 2004). Das durch JAK phosphorylierte und somit aktivierte STAT3 wird homodimerisiert und in den Zellkern translokalisiert, wo es als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Expression von Neuropeptiden nimmt, die unter anderen Funktionen innerhalb gewichtsregulatorischer Prozesse haben. Ein Suppressor des Leptinsignals ist SOCS3, welche in einem negativen Regulationsmechanismus die Signale des JAK-STAT-Signalweges inhibiert (Howard et al., 2004) und dadurch die Expression des Leptin-Rezeptors vermindert. SOCS3 defiziente Mäuse zeigen demnach eine erhöhte Leptinsensitivität und sind vor einer Diät-induzierten Gewichtszunahme geschützt (Mori et al., 2004).

1.1.2.1 NPY und AgRP wirken orexigen

Das Neuropeptid Y ist in Neuronen des Nucleus Arcuatus exprimiert, die zum größten Teil auch positiv für den Leptin Rezeptor sind (Abbildung 2). Cerebroventrikuläre Injektionen von NPY stimulieren die Futteraufnahme (Stanley et al., 1986) und reduzieren den Energieverbrauch, was bei kontinuierlicher Applikation schnell zu Obesität führt (Zarjevski et al., 1993). Leptin inhibiert die NPY Expression. Eine NPY Defizienz auf dem ob/ob Hintergrund reduziert die Hyperphagie und das Übergewicht Leptin defizienter Mäuse während NPY Nullmutanten keine Veränderungen in Gewicht und Appetit zeigen, aber auf

Nahrungskarenz mit Hyperphagie reagieren (Erickson et al., 1996; Schwartz et al., 1998). Durch diese Erkenntnisse wird einerseits die Funktion von NPY innerhalb der Leptin Signalkaskade deutlich, andererseits zeigte sich, dass noch NPY unabhängige Leptin-Signalwege bestehen. Die orexigen wirkenden Signale von NPY werden hauptsächlich über den NPY Y1 bzw. Y5 Rezeptor an Neurone des paraventriculären Nucleus weitergeleitet (Inui, 2000).

In NPY positiven Neuronen des Nucleus Arcuatus wird das sogenannte „Agouti-related protein“ (AgRP) koexprimiert (Broberger et al., 1998a; Hahn et al., 1998), welches genau wie NPY während einer Nahrungskarenz hochreguliert und durch Leptin inhibiert wird. Die Überexpression in der Maus führt zu Obesität, ähnlich der Agouti (A^y/a) Mutation, die sich durch eine gelbe Fellfarbe und Übergewicht auszeichnet. AgRP ist ein Antagonist des Melanocortin Rezeptors 3 und 4 (MC3R, MC4R), welcher die anorexigene Signalweiterleitung von Leptin über α -MSH und den MC4R blockiert (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997).

1.1.2.2 α -MSH und CART wirken anorexigen

Das α -Melanocyten stimulierende Hormon (α -MSH) ist ein Prozessierungsprodukt des Proopiomelanocortin (POMC) und bindet an Rezeptoren aus der Familie der Melanocortin Rezeptoren. Leptin steigert die Expression von POMC in Neuronen des Nucleus Arcuatus, was zu einer vermehrten Ausschüttung von α -MSH führt. In Folge dessen bindet α -MSH an seinen Rezeptor und die Futteraufnahme wird gesenkt (Cone et al., 1996). MC3R und MC4R sind vorrangig im Gehirn exprimiert (Mountjoy et al., 1994b). Fan et al. (1997) konnten zeigen, dass durch die Gabe von Agonisten dieser Rezeptoren die Futteraufnahme sank und Antagonisten den gegenteiligen Effekt hervorriefen. Die Rolle von POMC/ α -MSH und dessen Rezeptor MC4R innerhalb der antagonistisch wirkenden Leptin-Signalkaskade wird durch die Inaktivierungen von POMC (Yaswen et al., 1999) und MC4R (Huszar et al., 1997) in der Maus deutlich. Beide Modelle zeichnen sich durch Hyperphagie und Obesität aus.

POMC positive Neurone des Nucleus Arcuatus exprimieren das ebenfalls anorexigene „cocaine and amphetamine regulated transcript“ (CART) das seinen Namen aufgrund der Expression nach der Verabreichung von Kokain und Amphetamin bekam (Abbildung 2). Injektionen von CART in den lateralen Ventrikel reduzieren die Nahrungsaufnahme (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998) und CART ist in Leptin defizienten ob/ob Mäusen reduziert, was die

Rolle von CART in der zentralen Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht bestätigt. Weiterhin konnten Kristensen und Mitarbeiter zeigen, dass die Expression von CART wie auch die von POMC durch Leptin erhöht wird.

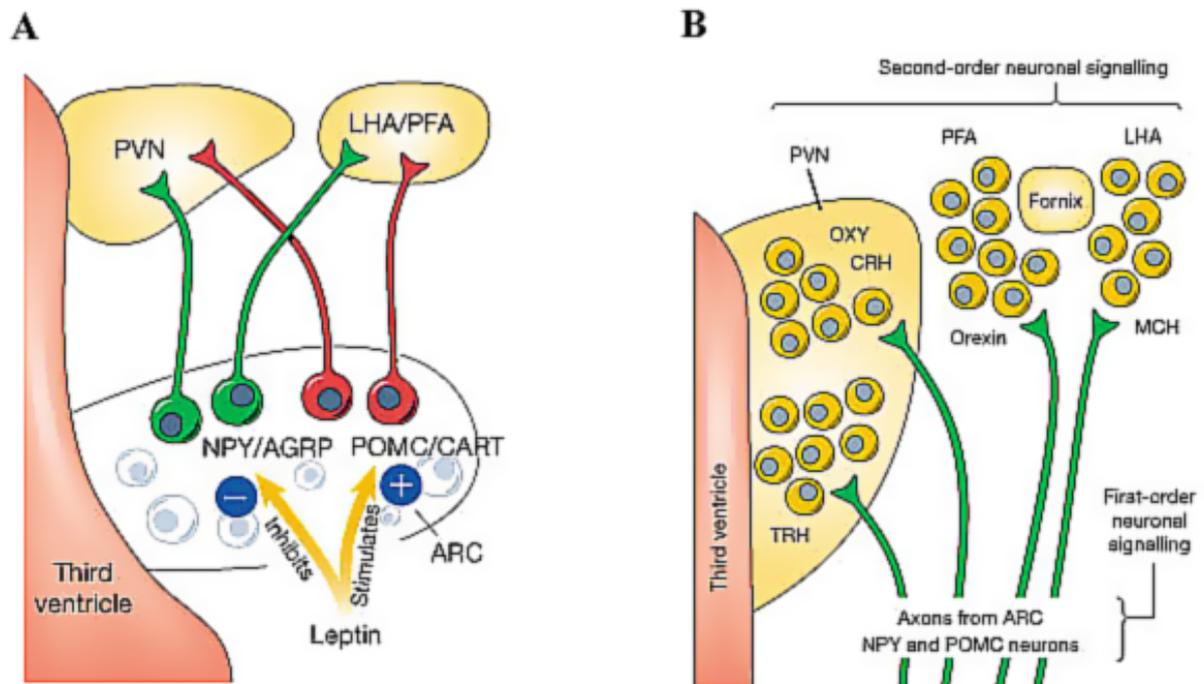


Abbildung 2 Übersicht über die hypothalamische Antwort auf die gewichtsregulatorisch wirkenden Signale von Leptin und Insulin. (A) NPY/AgRP und POMC/CART positive Neurone des Nucleus Arcuatus wirken auf Neurone des paraventriculären Nucleus (PVN) und des lateralen Hypothalamus (LHA). (B) Die NPY und α -MSH positiven Axone innervieren den PVN, LHA und den Bereich neben dem Fornix („perifornical area“). Neurone des PVN exprimieren das Corticotropin Releasing Hormon (CRH) und das Thyrotropin Releasing Hormon (TRH) und Oxytocin (OXY) (anorexigene Wirkung). Die Neurone des PFA und LHA, exprimieren Orexin und das Melanin-concentrating Hormone (MCH) und steigern die Futtermittelaufnahme. Abbildungen aus (Schwartz et al., 2000).

1.1.2.3 Signalweiterleitung über den lateralen Hypothalamus in Bereiche des Hinterhirns

Durch die Erkenntnisse über die Abläufe innerhalb des Nucleus Arcuatus kann man diesen Bereich als erste Signaltransduktionsstelle beschreiben, der die ankommenden humoralen Signale von Leptin und Insulin aus dem Blut in elektrische Signale umsetzt und dessen Neurone in Bereiche wie den paraventriculären Nucleus (PVN) und lateralen Hypothalamus (LHA) innervieren, wo eine Weiterverarbeitung der Signale erfolgt.

Diese Hirnregionen werden von Axonen POMC/CART und NPY/AgRP positiver Neurone innerviert (Elmqvist et al., 1999). In Neuronen des PVN werden Peptide synthetisiert, die die

Futteraufnahme und das Körpergewicht reduzieren, wenn sie zentral verabreicht werden. Dazu gehören das Corticotropin Releasing Hormon (CRH), das Thyrotropin Releasing Hormon (TRH) und Oxytocin (Verbalis et al., 1995; Kow und Pfaff, 1991; Dallman et al., 1993). Innerhalb des lateralen Hypothalamus bzw. der „perifornical area“ ist das orexigene Melanin-concentrating Hormone (MCH) exprimiert (Abbildung 2). MCH defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Nahrungsaufnahme (Shimada et al., 1998), was die Beobachtungen von Qu et al. (1996) bestätigte. Es wurde gezeigt, dass die MCH Synthese bei Leptindefizienz und Nahrungskarenz erhöht ist. Ein weiteres, die Futteraufnahme stimulierendes Peptid ist Orexin. Allerdings sind die Erkenntnisse über diese sekundäre Signalweiterleitung noch unzureichend und die Vorgänge während der weiterführenden Kontrolle der Futteraufnahme erst in Anfängen beschrieben. Durch neuroanatomische Studien konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass reziproke Verbindungen zwischen hypothalamischen Regionen wie LHA und PVN und einer Region im kaudalen Hirnstamm, dem Nucleus Tractus Solitarius (NTS) bestehen (Ter Horst et al., 1989; Saper, 1985). Während einer Mahlzeit kommen in dieser Region mechanische und chemische Sättigungssignale aus Magen, Darm und Leber an und induzieren das Ende der Nahrungsaufnahme, auch wenn alle neuronalen Verbindungen zwischen Vorder- und Hinterhirn getrennt wurden (Grill und Smith, 1988). Neurone des NTS exprimieren MC4-Rezeptoren, Leptinrezeptoren und POMC (Bronstein et al., 1992; Mercer et al., 1998; Mountjoy et al., 1994a), was auf die Sensitivität dieser Region gegenüber Leptin hindeutet. Zum Beispiel führt die Applikation von MC4-R Agonisten in den vierten Ventrikel, der neben dem NTS gelegen ist, zur Reduktion der Futteraufnahme (Grill et al., 1998). Diese Erkenntnisse weisen auf eine gemeinsame Verarbeitung der Sättigungssignale durch Vorder- und Hinterhirnbereiche hin.

1.2 Das Fettgewebe – Energiespeicher und endokrines Organ

Das Fettgewebe sezerniert eine Reihe von Faktoren, sogenannte Adipozytokine, die verschiedenste autokrine aber auch endokrine Funktionen ausüben. So spielen sie innerhalb der Regulation der Energiehomöostase, der Insulinsensitivität aber auch der Immunantwort eine zentrale Rolle. Die Expansion des weißen Fettgewebes (WAT) mit zunehmendem Alter ist nicht nur auf die Vergrößerung der Fettzellen durch die Einlagerung von Triglyceriden zu erklären, sondern auch durch die Erhöhung der Fettzellzahl. Im Fettgewebe finden sich Fettvorläuferzellen, die Präadipozyten, die auch *in vitro* zu reifen Adipozyten reifen können (Wabitsch et al., 2001; Halvorsen et al., 2001). Im humanen Fettgewebe wurden aber auch

weitere, multipotente Vorläuferzellen gefunden, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage waren, zu Adipozyten zu differenzieren (Zuk et al., 2001). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass neben den bereits zur adipogenen Linie determinierten Präadipozyten auch multipotente Vorläuferzellen im WAT zu finden sind. Die molekularen Mechanismen der Determination solcher Vorläuferzellen sind bisher weitgehend unbekannt.

Dagegen ist die Differenzierung von Präadipozyten durch die Nutzung von Zelllinien wie 3T3-L1 umfassend untersucht worden. Zwei Proteinfamilien sind unerlässlich für die Reifung von Fettzellen: Transkriptionsfaktoren aus der Familie der „CCAAT-enhancer binding proteins“ (C/EBP's) und aus der Familie der „peroxisome-proliferator activated receptors“ (PPAR's). C/EBP β und C/EBP δ sind als erstes exprimiert und aktivieren die Expression von PPAR γ , welches unmittelbar C/EBP α aktiviert. Während *in vivo* die Abwesenheit von C/EBP β und C/EBP δ durch alternative Signalwege kompensiert werden kann (Tanaka et al., 1997), spielt die gekoppelte Expression von PPAR γ und C/EBP α eine Schlüsselrolle während der Differenzierung von Präadipozyten (Linhart et al., 2001; Rosen et al., 1999; Wang et al., 1995; Wu et al., 1999). Das „sterol responsive element binding protein 1c“ (SREBP1) stimuliert die Adipogenese durch Erhöhung der Transkriptionsaktivität von PPAR γ . Durch die Aktivierung dieser Signaltransduktionkaskade werden Gene aktiviert und exprimiert, die den Phänotyp eines differenzierten Adipozyten charakterisieren, wie z.B. den Insulinrezeptor, den Glukosetransporter GLUT-4 und das Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1). Der Präadipozyten Faktor 1 (Pref1) ist stark in den Fettvorläuferzellen exprimiert. Er gilt als Inhibitor der Differenzierung von Adipozyten. Die Expression von Pref1 fällt mit der beginnenden Differenzierung stark ab und ist in reifen Adipozyten nicht zu finden (Smas et al., 1998; Smas und Sul, 1993).

Das Fettgewebe sekretiert eine Reihe von Adipozytokinen, von denen Leptin das wohl bekannteste und am besten charakterisierte ist. Ein weiteres von Fettzellen produziertes Polypeptid ist Adiponektin (Hu et al., 1996; Nakano et al., 1996; Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995). Die Plasmakonzentrationen sind in übergewichtigen Menschen und entsprechenden Mausmodellen stark herabgesetzt und korrelieren negativ mit den Insulinkonzentrationen im Blut (Diez und Iglesias, 2003; Kershaw und Flier, 2004; Chandran et al., 2003). Adiponektin defiziente Mäuse entwickeln eine frühe Glukoseintoleranz und Insulinresistenz bei unverändertem Gewicht und Futterverbrauch (Maeda et al., 2002; Kubota et al., 2002). Dagegen zeigen Mäuse, die Adiponektin überexprimieren, eine gesteigerte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz (Combs et al., 2004; Maeda et al., 2002).

Resistin, ein weiteres Adipozytokin, wird bei Nagern hauptsächlich vom Fettgewebe produziert, beim Mensch dagegen zeigt sich eine nur schwache Expression in Adipozyten. Resistin hemmt die Wirkung von Insulin in der Leber (Rajala et al., 2003). Die Serumkonzentrationen sind in übergewichtigen Mäusen und bei Insulinresistenz erhöht. Resistin Nullmutanten zeigen keine Veränderungen im Gewicht und eine verbesserte Glukosetoleranz (Banerjee et al., 2004). Kim et al. (2001) konnten zeigen, dass Resistin die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten inhibiert und vermuten daher eine Rolle als Negativ-Regulator der Adipogenese.

1.3 Die Familie der bHLH Transkriptionsfaktoren

Aufgrund von Homologien zum SCL-Gen („stem cell leukemia“) wurden die beiden Gene NSCL-1 und NSCL-2 („neurological stem cell leukemia“) in einer E 11,5 Mausembryo cDNA Bank identifiziert und kloniert. Sie gehören zur Protein Superfamilie der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren, die unter anderem ihre Funktionen während Determinierungs- und Differenzierungsprozessen der Hämatopoese, Myogenese und Neurogenese ausüben (Arnold und Braun, 2000; Lee, 1997; Porcher et al., 1996). Proteine dieser Gruppe zeichnen sich durch eine Helix-Loop-Helix Domäne aus, die aus zwei amphipatischen α -Helizes und einer zentralen variablen Loop Region besteht. Diese Domäne vermittelt die Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen HLH Proteinen. Amino-terminal zur HLH Domäne befindet sich die basische Region, mit der die Proteine paarweise an das sogenannte E-Box DNA-Sequenzmotiv (CANNTG) binden (Murre et al., 1989).

Aufgrund von Unterschieden in Struktur, Expression und Funktion ordnen sich die einzelnen Mitglieder der Superfamilie in verschiedene Gruppen ein. Ubiquitär exprimierte Proteine wie E12, E47 und E2A dienen als Dimerisierungspartner für andere Faktoren. Der myogene Differenzierungsfaktor MyoD oder auch NSCL-2 sind gewebspezifisch exprimiert und aktivieren die Transkription von Zielgenen nach Homo- oder Heterodimerisierung mit ubiquitären bHLH Transkriptionsfaktoren (Arnold und Braun, 2000; Krüger et al., 2004). Die Mitglieder der dritten Gruppe inhibieren die Transkription durch Bindung an N-Boxen (CACNAG) (Paroush et al., 1994). Proteine mit einer C-Terminal zur HLH Domäne liegenden Leucin-Zipper Dömäne (bHLH-Zip), durch die zusätzliche Interaktionen mit bZip Proteinen eingegangen werden können, bilden eine weitere Gruppe von bHLH Transkriptionsfaktoren.

1.3.1 Neuronale bHLH Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe der in *Drosophila* charakterisierten Gene *achate-scute* und *atonal* (Campos-Ortega, 1993; Jan und Jan, 1993), die gewebsspezifisch exprimiert sind und als Heterodimere mit dem ubiquitären Daughterless Protein als positive Regulatoren des neuronalen Entwicklungsprogramms fungieren, sowie dem negativen wirkendem Protein Enhancer-Of-Split wurden in Säugern einige im Nervensystem spezifisch exprimierte Gene identifiziert, die Determinierungs- und Differenzierungsprozesse steuern. Die Bildung von Neuronen lässt sich gut am Beispiel des Kortex beschreiben. Neuronale Vorläuferzellen entstehen in Folge asymmetrischer Zellteilungen innerhalb ventrikulärer Schichten, durch die Zellen nach außen migrieren und in der intermediären Schicht entweder zu Nerven- oder Gliazellen differenzieren. Die Axone der reifen Neurone bilden dann die äußere marginale Schicht. Als Determinierungsfaktoren gelten die *achaete-scute* Homologen *MASH-1* und *MASH-2* (Guillemot und Joyner, 1993; Johnson et al., 1990; Lo et al., 1991), sowie das *atonal* Homologe *Math-1* (Akazawa et al., 1995). Ebenso werden die Proteine der Neurogenin Subfamilie (Ngn1-3) und NeuroD3 zu den früh exprimierten Determinierungsfaktoren der Neurogenese gezählt (Lee, 1997).

Zu den Differenzierungsfaktoren der Neurogenese zählt neben Nex-1/Math-2 (Bartholoma und Nave, 1994) auch NeuroD. Dieser bHLH Transkriptionsfaktor weist einige Parallelen zu NSCL-2 auf. NeuroD ist während der Embryogenese stark in weiten Teilen des ZNS exprimiert, die sich differenzierende Neurone enthalten, und ist teilweise noch in adulten Tieren zu finden. Das Protein zeigt zudem eine transiente Expression im peripheren Nervensystem. NeuroD/BETA2 Nullmutanten Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund einer Insulindefizienz (Naya et al., 1997), was durch eine Expression in den β -Zellen der Pankreas zu erklären ist, die für die korrekte Differenzierung und Funktionalität dieser Insulin produzierenden Zellen von entscheidender Bedeutung ist.

Auch NSCL-1 und -2 zählen zu den Differenzierungsfaktoren der Neurogenese und zeigen ein zeitlich und räumlich stark überlappendes Expressionsmuster. Erste NSCL-1 Transkripte sind am Embryonaltag E8,5 zu detektieren. Die Expression endet bei E12,5. Die NSCL-2 Expression ist zeitlich ein wenig versetzt und verläuft von E9,0 bis E12,5 mit einem Maximum bei E11,5 (Krüger, 2002). Beide Proteine stimmen auf DNA Ebene zu 93% überein (Gobel et al., 1992). Die Inaktivierung von NSCL-1 führt zu phänotypisch unauffälligen Tieren, die jedoch wahrscheinlich aufgrund von Störungen der Herzfunktion

früher sterben (Cogliati et al., 2002). NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten sterben kurz nach der Geburt (Krüger, 2002).

1.3.1.1 NSCL-2

Das murine NSCL-2 Gen ist auf Chromosom 3 zu finden. Das Protein besteht aus 135 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 15,6 kDa auf. Während der Embryogenese ist NSCL-2 stark in postmitotischen Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert. NSCL-2 positive Zellen befinden sich in bestimmten Bereichen des Metenzephalons, des Mesenzephalons und des Dienzephalons. Eine Expression im peripheren Nervensystem ist in den dorsalen und cranialen Ganglien, in der Retina, im Vomeronasalorgan und im olfaktorischen Epithel zu finden. Das Riechepithel, das sich während der gesamten Lebenszeit ständig regeneriert und neue Nervenzellen produziert, weist in adulten Mäusen NSCL-2 positive Zellen auf. Auch in Bereichen des Hypothalamus ist NSCL-2 sowohl während der Embryogenese, als auch in adulten Stadien aktiv (Jing et al., 2004). NSCL-2 Transkripte sind ab E 14,5 detektierbar und verstärken sich bis E 18,5. In diesem Entwicklungsstadium finden sich NSCL-2 positive Zellen in gewichtsregulatorisch wichtigen Bereichen, wie dem Nucleus Arcuatus, dem periventriculären und dem lateralen Nucleus (Krüger, 2002). Postnatal sinkt die Expression in den meisten Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems stark ab und ist nur noch in Neuronen des olfaktorischen Epithels und in hypothalamischen Kerngebieten nachweisbar.

Das Fehlen von NSCL-2 führt bei der Maus zu einer postpubertären Gewichtszunahme und Infertilität (Good et al., 1997). Die Tiere weisen erhöhte Leptinspiegel und eine Reduktion GnRH positiver Neurone auf (Krüger et al., 2004). Aufgrund seiner Funktion als positiv wirkender bHLH Transkriptionsfaktor bindet NSCL-2 an das Necdin-Gen, welches bei Patienten mit Prader-Willi-Syndrom deletiert ist. Die DNA-Bindung erfolgt innerhalb eines Proteinkomplexes, an dem Proteine wie CLIM2 und Vertreter der LMO-Familie beteiligt sind. Interaktionen dieser Art wurden bereits von Aoyama et al. (2005) und Krüger et al. (2004) und am Modellorganismus *Xenopus laevis* von Bao et al. (2000) beschrieben.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Analyse der Funktionen des neuronalen Transkriptionsfaktors NSCL-2 innerhalb neuroendokriner Regulationsmechanismen, die den Energiehaushalt und das Körpergewicht kontrollieren. Weiterhin sollten die molekularen Mechanismen untersucht werden, die zu einer Aktivierung von potentiellen NSCL-2 Zielgenen führen. Gegenstand der Experimente war eine NSCL-2 defiziente LacZ „knock-in“ Mauslinie (Krüger et al., 2004), die eine postpubertäre Gewichtszunahme aufweist. Aufgrund der Expression des Transkriptionsfaktors im adulten Hypothalamus sollte durch Kreuzungen mit leptindefizienten ob/ob Mäusen mögliche Funktionen von NSCL-2 innerhalb der Leptin-Signalkaskade an NSCL-2^{-/-} x ob/ob Doppelmutanten untersucht werden, die im Gegensatz zu den leptinresistenten NSCL-2 Mutanten aufgrund des ob/ob Hintergrunds leptinsensitiv sind.

Durch histologische und funktionelle Analysen des Fettgewebes sollten potentielle gewebsspezifische Unterschiede in der Insulinresistenz und in Bezug auf den Glukosetransport untersucht werden. Des weiteren sollten verschiedene gewichtsregulatorisch relevante Faktoren auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden, um Aufschluss über die Veränderungen in NSCL-2 Mutanten zu erlangen, die in der postpubertären Gewichtszunahme resultieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität von Merck (Darmstadt, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Radioaktive Stoffe stammten von Amersham Buchler (Freiburg, Deutschland).

2-2-2 Tribromoethanol (Avertin)	Stocklösung : 1 g in 630 µl Methyl-2-Butanol lösen, dunkel bei 4°C lagern Gebrauchslösung: 60 µl Stocklösung in 5 ml PBS verdünnen, pro 4 g Körpergewicht 0,1 ml Gebrauchslösung
4',6-Diamidino-2-phenylindol,dihydrochloride (DAPI)	Molecular Probes, USA
Acetyl-[Cys4,D-Phe7,Cys10]-Alpha MSH (4-13)- NH ₂	Phoenix, Karlsruhe
Agarose NuSieve® 1:3	Biozym, Hamburg
Collagenase A	Roche, Schweiz
Complete, Mini, EDTA-free (Proteasen-Inhibitor-Cocktail Tabletten)	Roche, Schweiz
Deoxyribonucleic acid sodium salt from salmon testes	Fluka
dNTP's	Promega, Heidelberg
Fluorescein Calibration Dye	Bio-Rad, USA
Formaldehyd-Lösung 4,0%	Otto Fischar GmbH, Saarbrücken
Fugene 6 Transfektions Reagent	Roche, Schweiz
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Sweden
Recombinant Mouse Leptin	Chemicon, USA
Trizol®	Invitrogen, Karlsruhe
VECTABOND™ Reagent	Vector Laboratories, USA

2.1.2 Kits

Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (#4336917)	Applied Biosystems, USA
Master Taq® Kit	Eppendorf, Hamburg
Mouse Adiponektin ELISA Kit	R&D Systems, USA
Mouse Leptin RIA Kit (#ML-82K)	Linco Research, USA
Mouse Resistin ELISA Kit (#EZMR-96K)	Linco Research, USA

2. Material & Methoden

Nucleo Bond® PC500 (#740574)	Macherey-Nagel, Düren
Quick Change® Site-Directed Mutagenesis Kit (#200519-5)	Stratagene, USA
QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (#204143)	Qiagen, Hilden
Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (#EZRMI-13K)	Linco Research, USA
TNT® T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System (#L5010)	Promega, Heidelberg

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Shrimp	Roche, Schweiz
Collagenase A	Roche, Schweiz
DNA Polymerase I large (Klenow) fragment	Promega, Heidelberg
Pfu DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionendonukleasen	New England Biolabs; Jena Bioscience, Jena
RNase A	AppliChem, Darmstadt
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
Rnasin®	Promega, Heidelberg
Super Script™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Promega, Heidelberg

2.1.4 Lösungen und Medien

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q; Millipore) angesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die pH-Werte mit NaOH bzw. HCl eingestellt.

10x PBS	1,5 M NaCl, 30 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 10 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
10x TBE	1,1 M Tris, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8,3
10x TE	100 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8,0
1x TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,6
20x SSC	3 M NaCl ; 0,3 M tri-Natriumcitrat; pH 7,0
2x SDS-Gel Ladepuffer	1,52 g Tris, 20 ml Glyzerol, 2 g SDS, 2 ml β-Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau, pH 6,8 ; ad 100 ml H ₂ O
4x Tris-HCl/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-HCl ; 0,4% SDS
4x Tris-HCl/SDS pH 8,8	1,5 M Tris-HCl ; 0,4% SDS

2. Material & Methoden

50x TAE	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA; pH 8,3
5x Oligo-annealing Puffer	200 mM Tris pH 7,5; 100 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl
5x SDS-Elektrophoresepuffer	15,1 g Tris; 72 g Glycin, 5 g SDS; ad 1 l H ₂ O
6x Gel-Ladepuffer	12% Ficoll 400, 60 mM EDTA pH 8,0; 0,6% SDS; 0,15% Bromphenolblau, 0,15% Xylencyanol
ChIP-Proteinase K-Lösung	1 µl 20µg/µl Glykogen, 10 ml 10µg/µl Proteinase K, 244 µl 1x TE, pH 7,6
Church&Gilbert Puffer	0,5 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer, 1 mM EDTA, 7% SDS
EMSA-Puffer	200 ng Heringssperma DNA, 10 mM Hepes pH 7,5; 10% Glyzerol; 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 4 mM Spermidin, 2 mM MgCl ₂ , 0,5 mM DTT
Get-Puffer	50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8,0
Hochsalz	3 M Kaliumacetat; 1,8 M Ameisensäure
IHC-Tag1 Puffer	1% BSA; 0,3% Triton X-100 in PBS
Ich-Tag2 Puffer	0,3% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS
IP-Puffer A	10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2% NP40, 2 mM EDTA
IP-Puffer B	10 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl, 0,2% NP40, 2 mM EDTA
IP-Solubilisierungspuffer	50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 1% NP40
LB-Agar	LB-Medium, 15 g/l Agar
LB-Amp(Kan,Tet)-Selektionsmedium oder -Agar	Dem Medium bzw. Agar wird nach Abkühlung auf 60°C das Antibiotikum mit folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: Ampicillin 50 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml, Tetracyclin 12,5 µg/ml
LB-Medium	10 g/l Trypton , 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl; pH 7,5
LiCl/Detergent Waschpuffer	0,5% Na-Desoxycholat, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl ; 0,5% NP-40, 10 mM Tris pH 8,0
Luziferase-Messpuffer	AppliChem, Darmstadt
Lysispuffer	1% SDS; 0,2 M NaOH, frisch herstellen
Medium A	10 mM MgSO ₄ , 0,2% Glukose, in LB-Medium
Medium B	36% Glycerin, 12% PEG 8000, 12 mM MgSO ₄ in LB-Medium
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 (Calbiochem), 6 g Glyzerol, 6 ml H ₂ O; mehrere H bei RT rühren, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 bei 50°C rühren bis zur vollständigen Auflösung. Aliquotieren und bei -20°C lagern.

2. Material & Methoden

NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer	ca. 530 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ , ca. 460 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ , pH mit NaOH auf 6,8 einstellen
Öl Rot O Lösung	0,5 g Öl Rot O, 100 ml Propylen Glycol Erhitzen auf 95°C und Filtern durch Faltenfilter.
Oligo-labeling-buffer (OLB)	Lsg.0: 1,25 M Tris pH 8,0; 0,125 M MgCl ₂ ; Lsg.A: 1 ml Lsg.0, 18 µl β-Mercaptoethanol, je 5 µl dATP,dTTP,dGTP; Lsg.B: 2 M Hepes pH 6,6; Lsg.C: pd(N) ₆ Random Hexamer 5'-Phosphate sodium salt (Amersham); Verhältnis A:B:C 300 µl:750 µl:450 µl
Proteinase K-Puffer	100 mM Tris pH 8,5; 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K frisch dazugeben
RIPA Puffer	10 mM Tris pH 8,0; 140 mM NaCl, 1% Triton-X100; 0,1% SDS, 1% Na-Desoxycholat, 5 mM EDTA
RIPA-500 Puffer	RIPA Puffer mit 500 mM NaCl
Superbroth	Lösung A: 60 g Tryptone, 120 g Hefeextrakt, 22 ml 98% Glyzerin, ad 4,5 l H ₂ O Lösung B: 125 g K ₂ HPO ₄ , 38 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l H ₂ O; pH 7,2; autoklavieren
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol

2.1.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur

100x Penicillin/Streptomycin/Glutamin 2xHBS	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe 8,0 g NaCl; 6,5 g HEPES, 10 ml Na ₂ HPO ₄ Stocklösung (5,25 g in 500 ml H ₂ O), pH 7,0
D-MEM (4.5mg/l Glucose, 25mM HEPES)	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM:F12 (1:1)	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's MEM Medium (1mg/l Glucose)	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
Einfriermedium	90% FCS, 10% DMSO, steril filtrieren
Erythrozyten Lysis Puffer	0,154 M NH ₄ Cl; 0,01 M KHCO ₃ ; 0,1 mM tetranatrium EDTA, ph 7,3
FCS	PAA Laboratories, Österreich
Induktionsmedium für primäre Präadipozyten	D-MEM:F12 (1:1), 10% FCS, Pen/Strep/Glutamin, 2 µg/ml Dexamethasone; 0,5 mM IBMX
Kulturmedium für 10T ^{1/2} -, HEK 293T-Zellen	D-MEM (1 mg/l Glukose), 10% FCS, Pen/Strep/Glutamin
Kulturmedium für GT1 ^{trk} -Zellen	D-MEM (4,5 mg/l Glucose, 25 mM HEPES), 10% FCS, Pen/Strep/Glutamin
Kulturmedium für primäre Präadipozyten	D-MEM:F12 (1:1), 10% FCS, Pen/Strep/Glutamin

2. Material & Methoden

OPTIMEM 1	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
Prädipozyten-Isolationspuffer	123 mM NaCl, 5 mM KCl; 1,3 mM CaCl ₂ , 5 mM Glukose, 100 mM HEPES, Pen/Strep, 4%BSA, steril filtrieren, Lagerung bei -20°C, Collagenase A 1,5 mg/ml frisch dazugeben
Trypsin/EDTA	Gibco™, Invitrogen, Karlsruhe
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol

2.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Roth bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
AntisenseGFP	GAACTCCAGCAGGACCATGT
SenseGFP	TATATCATGGCCGACAAGCA
E1mut necdinprom-forw	TATATATATTTTATATATCCCTCATTTCGGTGGGGCCT
E1mut necdinprom-rev	GGGGGATTAAATTCT AGAATTTAAATCCCCCAGGCCCCACCGAAAAATGAGGG ATATATAAAATATATATA
E1mut-forw	GGATGGGTGCGTGGGGCC
E1mut-rev	GGGGCCCCACGCACCCAT
E2mut necdinprom-forw	TCTACTACTTCTAGAACATTCAAATCTTGAATGGATTTA
E2mut necdinprom-rev	TCTCCAGTGTCTGTAAC GTTACAGACACTGGAGATAAATCCATTCAAGATTTGAA TGTTCTAGAAGTAGTAGA
E2mut-forw	GGAACAGACTATGGATTT
E2mut-rev	GGAAATCCATAGTCTGTT
E-box1-forw	GGGCCCTCATTTCATGTGGGGCCTGGGGG
E-box1-rev	GGCCCCCAGGCCCCACATGAAAATGAGGG
E-box2-forw	GGCATTCAAATCTCACATGGATTTATCTCC
E-box2-rev	GGGGAGATAAATCCATGTGAGATTTGAATG
HumNecdinprom-forw	CTGGGCAGAGGGAAAAGACAT
HumNecdinprom-rev	ATCGACTCCCTACCAAATCAGA

2. Material & Methoden

IRES2-forw-440 IRES2-rev-820	CATTGACGTCAATGGGAGTT GGAATGCTCGTCAAGAAGAC
LMO1-Sal1-forw LMO1-Sal1-rev	CAGTCGACCTATGATGGTGCTGGACAAGGA GTGTCGACGTTTACTGAACCTGGGATTCAA
LMO2-Sal1-forw LMO2-Sal1-rev	CAGTCGACCTATGTCCTCGGCCATCGAAAG GTGTCGACGTCTAGATGATCCCATTGATCT
LMO4-Sal1-forw LMO4-Sal1-rev	CAGTCGACCTATGGTGAATCCGGGCAGCAG GTGTCGACGTTTCTAGCAGACCTTCTGGTCTG
LMO4-Stu1 LMO4-Xba1	GTAGGCCTATGGTGAATCCGGGCAGCAGC CATCTAGATTCAGCAGACCTTCTGGTCTGG
m36B4-forw m36B4-rev	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT CCGCAGGGGCAGCAGTGGT
mAdipsin-forw mAdipsin-rev	GTGGCTGGTTGGGGTGTGGTCA AAGTGTCCCTGCGGTTGCTCTC
mausNecdinprom-forw mausNecdinprom-rev	CAACAAACTGAGCATCCAATGA GAATGCAGATCAAACAAGCAAGA
MausPOMC1-forw MausPOMC1-rev	TCGGCCCCAGGAACAGCAGCAGT GGGGGCCTTGGAATGAGAA
mCEB/P α -forw mCEB/P α -rev	GGGTGGAACAGCTGAGCCGTGAACT ATCCAGCGACCCGAAACCATCCTCT
mCEB/P δ -forw mCEB/P δ -rev	AGCCCACTCCACCCACTT CGACAACTCCACCAGCTTC
mPPAR γ -forw mPPAR γ -rev	TGCGGAAGCCCTTTGGTGAC CTTGCGAACAGCTGAGAGGAC
Necdin-BW-748 Necdin-FW-215	TTCAGGTAATTCTGATGGACG AATCCTGCAGCAGGCCGC
NSCL2-forw NSCL2-rev	AGGTATACCGATGATGCTGAGTCCGGACCA TTGCGGCCCGCAGCTACACGTCCAGGACATGGTT
OBM-1 OBW-1 OBW-2	TGACCTGGAGAATCTCT TGACCTGGAGAATCTCC CATCCAGGCTCTCTGGC

2. Material & Methoden

Pref1-1	GTCCCACGTGCGCGAAGAAGC
Pref1-2	CTGGGGTGGGGTGGGGTGAA
Resistin-forw	TCCAAATGCAATAAAGAACA
Resistin-rev	GCAGAGCCACAGGAGCAG
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
SREBP1-1	CCACATGGCGGGAGCACAC
SREBP1-2	GCCAGCCGGATCTACTATG
T3	ATTAACCCTCACTAAAG
T7	CGCGCGTAATACGACTCACTTATAG

2.1.7 Mäusstämme

Ob/ob (C57BL/6J Lep ^{ob})	The Jackson Laboratory, USA Von Prof. Braun zur Verfügung gestellt. (Krüger et al., 2004)
NSCL-2	(Cowley et al., 2001)
POMC-EGFP	

2.1.8 Bakterienstämme

Für Transformationen wurden Bakterien vom Stamm *XLI-Blue* (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac-; F-[proAB+ acIq lacZdeltaM15 Tn10(tetr)]) ; (Bullock et. al., 1987; Stratagene) verwendet.

2.1.9 Zelllinien

GT1- <i>trk</i> (maus)	Hypothalamische neuronale Zelllinie, InPro Biotechnology, USA; (Mellon et al., 1990)
HEK 293T (human)	Von Prof. Braun zur Verfügung gestellt. (Graham et al., 1977)

2.1.10 Klonierungsvektoren

pBlueskript KSII+ (Genbank-Nr.: X52327) PCS2MT	Stratagene, USA von Prof. Braun zur Verfügung gestellt
pGEM [®] -T Vector pIRES2-EGFP	Promega, Heidelberg Clontech, USA
pT7βSal	von Prof. Braun zur Verfügung gestellt

2.1.11 Antikörper

Alexa Fluor [®] 488 Hünchen anti- Kaninchen IgG (H+L) 1:1000	MoBiTec, Göttingen
Anti c-myc Epitop (Klon 9E10), 1:50	Von Prof. Braun zur Verfügung gestellt
Anti E12, 1:30	Von Prof. Braun zur Verfügung gestellt
Kaninchen polyklonal anti-GFP, 1:10.000	MoBiTec, Göttingen

2.2 Methoden

Standardtechniken der Molekularbiologie wurden, wenn nicht anders erwähnt, gemäß „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1998) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt. Die Sterilisation von Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Medien erfolgte in Autoklaven der Firmen Fedegari und H+P Labortechnik bei 121°C unter Druck für 20 min. Glaspipetten für die Zellkultur wurden 180°C für 6 h in einem Trockenschrank sterilisiert. Hitzesensitive Flüssigkeiten wurden durch 0,2 µm oder 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter der Firma Sautorius sterilfiltriert.

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren aus Geweben

2.2.1.1 Isolation von genomischer DNA

Für die Genotypisierung der in der Arbeit verwendeten Mäuse wurde diesen ein ca. 1 cm langes Stück Schwanzspitze abgeschnitten, in 500 µl Proteinase K-Puffer überführt und über Nacht bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Nicht lysierte Gewebeteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml

Eppendorf-Gefäß überführt. Die genomische DNA wurde mit 500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation und Waschen der DNA mit 70% Ethanol erfolgte die Lösung in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 56°C. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.1.2 Isolation von RNA aus tierischem Gewebe

Zur Gewinnung von RNA wurden entsprechende Gewebe entnommen und entweder sofort in Trizol® Reagent überführt oder zur Zwischenlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Zellen wurden nach Waschen mit PBS in Trizol aufgenommen und bei –80°C gelagert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte unter Kühlung mit einem Ultraturrax T8 von IKA Labortechnik. Die Aufreinigungs- und Fällungsschritte wurden laut Protokoll des Trizol-Herstellers Invitrogen durchgeführt. Die präzipitierte RNA wurde in H₂O resuspendiert.

2.2.2 Reinigung und Fällung von DNA

2.2.2.1 Aufreinigung von DNA

Um DNA von Proteinen zu trennen, wurde die zu reinigende Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI 25:24:1, Roth) in ein „Phase Lock Heavy Gel“ Gefäß der Firma Eppendorf überführt und kräftig gemischt. Durch Zentrifugieren trennen sich die Komponenten entsprechend ihrer Dichte, wobei das „Phase Lock“ Gel eine Barriere zwischen oberer wässriger Phase und unterer organischer Phase bildet. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.

2.2.2.2 Fällung

Der DNA-Lösung wurde ein Volumen 4 M Ammoniumacetat zugesetzt und zu diesem Ansatz zwei Volumen Isopropanol gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in H₂O aufgenommen.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von gelösten Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am BioPhotometer von Eppendorf. Das Verfahren beruht auf der Messung der Absorption bei 260 nm und es gilt folgende Regel: 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. RNA. Das Verhältnis der Nukleinsäureabsorption zur Proteinabsorption gibt Auskunft über den Reinheitsgehalt einer Nukleinsäurelösung. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ kann man erkennen, inwiefern eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Proteinreste verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Eine 50-%ige DNA-Protein-Lösung zeigt ein Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ von ca. 1,5.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Diese Technik dient der analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten. Die elektrophoretische Trennung erfolgte je nach Größe der zu detektierenden DNA Fragmente in 1-3%-igen Agarosegelen in Flachbettgelapparaturen mit 1x TAE-Puffer. Eine entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer gelöst und in einem Mikrowellenherd aufgekocht. Die flüssige Agarose wurde mit 3 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml versetzt und in die Apparatur gefüllt. Die zu analysierende DNA-Probe wurde in entsprechendem Verhältnis mit 6x Gel-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 3-6 H bei 60-100 V durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Fotodokumentation in Gegenwart von UV-Licht. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente dienten die DNA-Längenstandards *PUC18* mit *Sau3A* hydrolysiert bzw. λ-DNA mit *EcoRI/HindIII* hydrolysiert, welche ebenfalls auf das Gel aufgetragen wurden.

2.2.5 Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können mittels dieser Methode aufgrund ihrer negativen Ladung elektrophoretisch aus Agarosegelstücken eluiert werden. Die Elutionskammer wurde mit 1x TAE-Puffer, die V-förmigen Kanäle mit 3 M NaAc und die mit den Kanälen verbundenen Kammern mit DNA enthaltenden Agarosestücken befüllt. Die Elution erfolgte bei 100 V für ca. 30 min. Durch die hohe Salzkonzentration nimmt die Leitfähigkeit stark zu, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit stark verlangsamt wird und die DNA im Kanal verbleibt. Die DNA wurde durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an Ethanol nach einstündiger Inkubation bei -20°C und Zentrifugation bei 13000 rpm präzipitiert.

2.2.6 Klonierung von DNA

2.2.6.1 Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsendonuklasen

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA, meist Palindrome, und spalten die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden an bestimmten Stellen dieser Erkennungssequenzen. Zur enzymatischen Spaltung wurde die DNA mit der entsprechenden Endonuklease in einem optimierten Puffer bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach der DNA-Menge. Eine Einheit Enzym verdaut 1 μg DNA in einer h.

2.2.6.2 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Zur Vorbereitung auf die Ligation wurde der linearisierte Vektor am 5'-Terminus mit Alkalischer Phosphatase, Shrimp von Roche laut Herstellerprotokoll dephosphoryliert. Dies verhindert eine Religation der Plasmidenden bei der Ligation.

2.2.6.3 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in dephospholylierte Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase genutzt. Die Menge an Plasmid-DNA betrug 50 ng. Das entsprechende DNA-Fragment wurde in äquimolarem Verhältnis beigemischt. Die Reaktion erfolgte mit 10 U Ligase in entsprechendem Puffer für 2 H bei RT oder bei 16°C über Nacht.

2.2.6.4 Herstellung PEG-kompetenter *E.coli* Zellen

500 µl einer 5 ml *E.coli* Übernachtskultur wurden in 50 ml Medium A überführt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,55 bei 600 µm kultiviert. Anschließend wurde für 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen 10 min bei 1500 g und 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl eiskaltem Medium A aufgenommen, vorsichtig mit 2,5 ml Medium B vermischt. Aliquots von je 100 µl wurden bei - 80 °C gelagert.

2.2.6.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli* Zellen

Die Transformation ist als Einschleusung von DNA in kompetente Bakterien definiert. Durch eine Vorbehandlung der Bakterien ist die Membran teilweise permeabel für Moleküle. Durch die Kultivierung der transformierten Bakterien können Klonierungsprodukte vervielfältigt werden.

100 µl PEG-kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 25 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Nach Inkubation für 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für eine h bei 37°C kultiviert. Der Ansatz wurde dann auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Kolonien für die Isolation von Plasmid-DNA gepickt.

2.2.7 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.7.1 DNA Maxi-Präparation

Zur Gewinnung hochreiner DNA wurde eine Maxi-Präparation mit Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

500 ml Superbroth wurden mit einer 5 ml Übernachtskultur beimpft und für 24 h bei 37°C geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem GET-Puffer aufgenommen, 80 ml Lysispuffer addiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 40 ml Hochsalz und einer Inkubation für 15 min auf Eis wurden die ausgefallenen Proteine 10 min bei 4°C und 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und die Plasmid-DNA mit 1,5 Volumen Isopropanol präzipitiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 10000 rpm für 30 min. Das Pellet wurde in 5,5 ml 1 x TE aufgenommen.

Für die anschließende Dichtegradientenzentrifugation wurde die gelöste DNA mit 1 g Cäsiumchlorid und 0,1 ml 1% Ethidiumbromid pro ml Lösung versetzt und in Optiseal Zentrifugenröhrchen (Beckmann) gefüllt. Nach 24 h Ultrazentrifugation bei 45000 rpm wurde unter UV-Licht die Plasmid-DNA-Bande mit einer Spritze abgezogen. Die Dichtegradientenzentrifugation wurde wiederholt. Zur Entfernung des Ethidiumbromid aus der isolierten Plasmid-DNA wurde mit Isobutanol/12% H₂O extrahiert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die wässrige Phase farblos war. Das Cäsiumchlorid wurde durch Dialyse mit 1x TE über Nacht entfernt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt.

2.2.7.2 DNA Minipräparation

Die Minipräparation liefert ausgehend von einer 2 ml Übernachtskultur einer rekombinanten Bakterienkolonie bis zu 50 µg DNA.

Nach Sedimentierung der Bakterien wurden diese in 100 µl eiskaltem GET-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frischem Lysispuffer wurde wiederum für 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit 150 µl Hochsalz gemischt und für 10 min auf Eis belassen. Die ausgefallenen Zelltrümmer, genomische DNA und Proteine, wurden bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 800 µl Ethanol die Plasmid-DNA präzipitiert. Die DNA wurde mittels Zentrifugation pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen

und in 50 µl H₂O aufgenommen. Anschließend folgte ein RNase A Verdau für 30 min bei 37°C.

2.2.7.3 Plasmidpräparation mittels Säule

Neben den oben genannten Präparationstechniken wurden zur DNA-Maxipräparation auch Nucleo Bond® PC500 von Macherey-Nagel verwendet.

2.2.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Das verwendete "Cycle Sequencing" System beruht auf dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977). Bei der Sequenzreaktion werden hier neben den vier Desoxy Nukleosid-Triphosphaten 2',3'-Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate verwendet, welche jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgt mit einem entsprechenden Sequenziergerät. Für die Sequenzierung wurden ca. 250 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Als Primer dienten die Universalprimer T3, T7, SP6 bzw. sequenzspezifische Oligonukleotide.

Sequenzansatz:

x µl Plasmid-DNA
4 µl "Ready Reaction Premix"
2 µl "Big Dye Sequencing" Puffer
10 pmol Primer
x µl H ₂ O
10 µl Gesamtvolumen

Die Reaktion erfolgte in einem Eppendorf Mastercycler Gradient. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt, die Annealingtemperatur variierte je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Primer zwischen 50° und 60°C. Die Extension erfolgte bei 60°C für 2 min, die Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C (2.2.9). Anschließend erfolgte die Fällung der DNA. Zum Reaktionsansatz wurden 5 µl 125 mM EDTA und 75 µl 96% Ethanol hinzugefügt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Es schloss sich eine Inkubation für 15 min bei RT an. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurden die Amplifikationsprodukte präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA gewaschen und getrocknet. Die Auftrennung und Sequenzierung der Produkte erfolgte laut

Herstellieranleitung in der Sequenzieranlage (Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer).

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die "Polymerase Chain Reaction" (PCR) ermöglicht eine pseudoexponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Die Verwendung von der aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammenden hitzestabilen Taq-Polamerase (Saiki et al., 1985) ermöglichte eine Automatisierung der Reaktion durch Einsatz von Thermocyclern. Die Anlagerungstemperatur (T_{an}) der Primer, die für den Start der Polymerase-Reaktion nötig sind, errechnete sich aus folgender Formel:

$$T_{an} = (4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)) - 5^{\circ}\text{C}, \quad (1)$$

wobei G, C, A und T für die vier Basen der DNA stehen.

2.2.9.1 PCR zur Genotypisierung von Mäusen

- Stamm ob/ob (Ingalls et al., 1996)

Für jedes Tier wurden zwei Reaktionen gefahren, eine für das Wildtyp-Allel und eine für das mutierte Allel des *obese* Gens. Da es sich bei dieser natürlichen Mutation um eine Punktmutation von Cytosin zu Thymin handelt, kann man sich die abweichenden Anlagerungstemperaturen eines Wildtyp- und Mutanten-Primers zunutze machen. Fährt man z.B. die beiden PCR-Ansätze einer Ob/Ob WT-Maus bei einer Anlagerungstemperatur von 54°C, so wird nur in der Wildtyp-PCR, aber nicht in der Mutanten-PCR ein Produkt von 110 bp amplifiziert.. Bei einer heterozygoten Ob/ob Maus findet sich das Produkt in beiden Ansätzen und bei einer ob/ob Maus nur in der Mutanten-PCR.

PCR-Ansatz:

100 ng genomische DNA
50 pmol Primer OBW-1 (OBM-1 für Mutanten-PCR)
50 pmol Primer OBW-2
10 µl 10x PCR-Puffer
20 µl 5x PCR-Enhancer
2 µl dNTP-Mix 10 mmol
1 µl Taq-Polymerase (5 U)
x µl H ₂ O
100 µl Gesamtansatz

PCR-Programm:

1. 95°C 5'
2. 95°C 1'
3. 54°C 1'
4. 72°C 1'
38 Zyklen beginnend bei 2.
5. 72°C 5'

Die PCR Produkte wurden in einem 3%-igen Agarose-Gel aufgetrennt (Agarose NuSieve® 1:3; Biozym).

- **Stamm POMC-EGFP (Overstreet et al., 2004)**

Diese Mäuse exprimieren unter der Kontrolle des Proopiomelanocortin (POMC) Promotors das „enhanced green fluorescent protein“. Mittels „touch down“-PCR wurde ein Produkt von 220 bp amplifiziert, welches sich in hetero- und homozygoten Mäusen an Intensität im Agarosegel unterscheidet. Da homozygote Mäuse zwei transgene Allele aufweisen, sollte die Intensität der Bande stärker sein. Wildtyp Tiere weisen bei der Genotypisierung keine Bande auf.

PCR-Ansatz:

100 ng genomische DNA
2,25 µl sense GFP-Primer (25µM)
2,25 µl antisense GFP-Primer (25µM)
2,5 µl 10x PCR-Puffer
2 µl dNTP-Mix 2,5 mM
0,5 µl Taq-Polymerase (5 U)
x µl H ₂ O
25 µl Gesamtansatz

PCR-Programm:

1. 95°C 5'
2. 95°C 1'
3. 67°C 1' verringere um 1°C/Zyklus
4. 72°C 1'
16 Zyklen beginnend bei 2.
5. 94°C 1'
6. 52°C 1'
7. 72°C 1'
15 Zyklen beginnend bei 5.
8. 72°C 5'

2.2.9.2 PCR-Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine sogenannte „Site-directed mutagenesis“ durchgeführt, um die beiden E-Boxen innerhalb des Necdin-Promotors, der durch Bindung von NSCL-2 an die E-Box Sequenzmotive im Reporterplasmid pTA-Luc-NP die Expression der Luciferase kontrolliert, zu mutieren. Damit sollte indirekt die spezifische Bindung von NSCL-2 in die E-Boxen des murinen Necdin-Promotors bestätigt werden.

Primer zur Mutagenese der E-Box1 (-701 bis -696) CATGTG mutiert zu TCGGTG:

E1mut necdinprom-forw	TATATATATTTTATATATCCCTCATTTTT <u>TCGGT</u> GGGGC CTGGGGGATTTAAATCT
E1mut necdinprom-rev	AGAATTTAAATCCCCCAGGCCCC <u>CACCG</u> AAAAATGAGG GATATATAAAATATATATA

Primer zur Mutagenese der E-Box2 (-553 bis -548) CACATG mutiert zu TGAATG:

E2mut necdinprom-forw	TCTACTACTTCTAGAACATTCAAATCTTGAATGGATTT ATCTCCAGTGTCTGTAAC
E2mut necdinprom-rev	GTTACAGACACTGGAGATAAATCCATTCAAGATTTGA ATGTTCTAGAAGTAGTAGA

Die Mutagenese wurde mit dem QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (#200519-5) der Firma Stratagene durchgeführt und richtete sich nach dem Herstellerprotokoll. Die Mutationskonstrukte heißen pTA-Luc-NP-EBox1-mut, -Ebox2-mut und -Ebox1,2-mut.

2.2.9.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Methode zur Umschreibung von isolierter RNA in cDNA, wodurch man in einer anschließenden PCR spezifische mRNA-Moleküle nachweisen und quantifizieren kann. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll mit der Super Script[™] II Reversen Transcriptase von Invitrogen. Als Ausgangsmenge wurden jeweils 500 ng RNA eingesetzt. Durch den Einsatz von Oligo-dT Primern wurden spezifisch Boten-RNA Moleküle umgeschrieben, da diese einen „Poly-A“ am 3'-Ende besitzen, an dem sich der Primer anlagert. Nach Abschluss der cDNA Erststrangsynthese schloss sich ein RNA Verdau mit RNase H für 20 min bei 37°C an. Zur Amplifikation spezifischer cDNA Fragmente wurde 1 µl des 20 µl cDNA Ansatzes in einer PCR mit entsprechenden Primern eingesetzt. Um eventuelle Kontaminationen der Reaktionskomponenten feststellen zu können, wurde immer eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle von cDNA mitgeführt. Zur Überprüfung der erfolgreichen cDNA Synthese wurde jeweils eine PCR zum Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Enzym ist konstitutiv in allen Geweben in hohem Maße exprimiert und gehört deshalb zu Gruppe der Haushaltsgene.

2.2.9.4 Real-Time-PCR

Zur Ermittlung quantitativer Unterschiede in der mRNA Expression verschiedener Gruppen wurden Real-Time-PCR Reaktionen in einem ICycler[®] von BioRad durchgeführt. Um cDNA Proben (2.2.9.3) und Standards (Genabschnitt in pGem T-Vektor kloniert, bekannte Anzahl Kopien, Verdünnungsreihe) vergleichen zu können, ist eine Minimierung möglicher

2. Material & Methoden

Pipettierfehler anzustreben. Deshalb wurden statt 1 µl cDNA zu pipettieren, von den 20 µl cDNA Ansätzen 1:5 Verdünnungen hergestellt und je 5 µl dieser Verdünnungen eingesetzt. Für den PCR-Ansatz wurde das QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (#204143) von Qiagen verwendet. Für jedes zu analysierende Gen wurden in einem PCR Lauf eine Standardreihe (10⁸ Kopien, 10⁷ Kopien, ..., 10² Kopien) und die unbekanntenen cDNA Proben gefahren.

Die Messung beruht auf der verstärkten Fluoreszenz des SYBR® Green nach Einlagerung in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. An die PCR schloss sich eine Schmelzkurve an, in der von 60°C Ausgangstemperatur pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C bis auf 95°C erhöht wurde. Schmelzkurven ermöglichen eine Aussage über die Reinheit des PCR Produkts und geben Auskunft über das Auftreten von Primer Dimeren.

PCR-Ansatz:

5 µl cDNA (1:5 verdünnt)
10 µl 2x QuantiTect™ Mix
20 pmol Primer 1
20 pmol Primer 2
0,2 µl 100x Fluorescein Calibration Dye
ad H ₂ O
20 µl Gesamtansatz

PCR-Programm:

1. 95°C 8'30''
2. 95°C 30''
3. T _{an} 30''
4. 72°C 1' ("Real Time" Fluoreszenz Messung)
40 Zyklen
5. 72°C 1'
6. 60°C 10'' Erhöhung 0,5°C/Zyklus ("Real Time" Fluoreszenz Messung)
70 Zyklen
7. 14°C HOLD

2.2.10 Southern Blot und Hybridisierung von Nukleinsäuren

2.2.10.1 Verdau und Transfer von DNA (NSCL-2 Genotypisierung)

In einem 30 µl Restriktionsansatz wurden 20 µl genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease Bgl II über Nacht bei 37°C verdaut. Der Ansatz wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, bis die für die Genotypisierung relevanten Banden von 9,5 kb (Wildtyp) und 3 kb (Mutante) gut voneinander getrennt vorlagen. Das Gel wurde für 10 min mit 0,25 M HCl inkubiert, was zu einer Depurinierung der DNA führt. Nach 10-

minütigem Waschen in H₂O wurde die DNA in einem Kapillar-Blot über Nacht mit 0,4 M NaOH auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membran 0,45 µm; Pall) transferiert. Anschließend wurde 10 min in 2x SSC gewaschen und die Membran für eine h bei 80°C im Vakuumofen getrocknet. Die Membran wurde für eine h bei 65°C unter Schütteln in 0,1x SSC/0,1% SDS-Lösung inkubiert und anschließend für zwei bis drei H bei gleicher Temperatur prähybridisiert.

2.2.10.2 Prähybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde pro ml Church&Gilbert Puffer 200 µg gelöste Heringssperma-DNA zugegeben, welche vorab 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis inkubiert wurde. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei bis drei H bei 65°C im Hybridisierungssofen.

2.2.10.3 Radioaktive DNA-Markierung

Die am häufigsten verwendete Methode ist das „random priming“. Hierbei wird die zu markierende doppelsträngige DNA in die beiden Einzelstränge denaturiert und mit Zufallshexameren („random primer“) hybridisiert, die dann als Primer für eine DNA Polymerase (Klenow Fragment) dienen. Die Markierung erfolgt durch Einbau von radioaktiven Nukleotiden ([α-³²P]-dCTP, Amersham). Die Länge der entstehenden markierten Fragmente beträgt üblicherweise zwischen 250 und 500 Nukleotide. Diese Methode eignet sich jedoch nur für DNA-Fragmente größer 300 Nukleotide, da bei kürzeren die Wahrscheinlichkeit für die „Random Primer“, eine Bindungsstelle zu finden, stark abnimmt, was zu einer niedrigen Einbaurrate führt.

Als Matrizen-DNA für die NSCL-2 Genotypisierung wurde ein isoliertes 1,3 kb SacI/ScaI Fragment aus dem 3' Bereich des NSCL-2 Gens verwendet, dass zuvor 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt wurde.

Ansatz:

30 ng DNA in 30 ml H₂O

10 µl Oligo-labeling-Buffer (OLB)

2 µl 10 mg/ml BSA

5 µl [α-³²P]-dCTP (50 µCi)

1 µl Klenow Fragment (2U/µl)

2. Material & Methoden

Der Ansatz wurde für zwei bis drei H bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine Probenreinigung mittels NAP-5 Säulen (Amersham) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Zur Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden (2.2.11) wurden 100 ng DNA mit 5 mM dNTP's ohne dCTP und 30 µCi [α -³²P]-dCTP für 20 min bei RT inkubiert. Es wurden 2 ml 5 mM dCTP zugesetzt und der Ansatz für weitere 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und der Ansatz auf ein 8%-iges natives Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 3-4 H bei 15 V/cm. Durch kurzes Auflegen eines Filmes und anschließende Entwicklung wurde die Laufhöhe der markierten Oligonukleotide ermittelt und diese ausgeschnitten. Es schloss sich eine Elektroelution (2.2.5) an. Das eluierte Fragment wurde mit 1 ml Ethanol und 1 µl Glykogen (10 mg/ml) für zehn min im Trockeneisbad und Zentrifugation gefällt. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 300 µl Wasser aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt.

PAA-Gel (8%-ig):

26,6 ml	Rotiphorese® Gel 40
5 ml	10x TBE
ad 100 ml H ₂ O	
300 µl	25% Ammoniumpersulfat (APS)
300 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

2.2.10.4 Hybridisierung

Die Prähybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung, bestehend aus Church&Gilbert Puffer, 100 µg/ml Heringssperma DNA und der radioaktiven DNA-Sonde (1,5-3x 10⁶ cpm/ml) ersetzt und die Membran über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen hybridisiert. Es schlossen sich drei 15-minütige Waschgänge mit 40 mM NaH₂PO₄/1% SDS an.

2.2.10.5 Autoradiographie

Die feuchten, gewaschenen Membranen wurden in Klarsichtfolie eingewickelt und mit einem Film (Kodak) in lichtundurchlässigen Kassetten exponiert. Je nach Radioaktivität der Filter variierte die Expositionszeit (2 min bis 14 Tage) und Temperatur (RT oder -80°C). Die Filme wurden in einer Dunkelkammer routinemäßig entwickelt.

2.2.11 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Um z.B. für DNA-Protein-Bindungsnachweise wie den EMSA (2.2.13) funktionale Sequenzmotive zur Verfügung zu haben, ist es notwendig, komplementäre Oligonukleotide von ca. 20 bp Länge zu hybridisieren.

Ansatz:

1 μ Oligonukleotid 1 (1 μ g/ μ l)

1 μ Oligonukleotid 2 (1 μ g/ μ l)

2 μ l 5x Oligo-annealing Puffer

ad 10 μ l H₂O

Der Ansatz wurde zwei min bei 95°C inkubiert und sofort für 15 min in ein 65°C warmes Wasserbad (Becher gefüllt mit Wasser in 65°C Wasserbad stellen) überführt. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlung, indem der Ansatz zusammen mit dem Becher 40 min bei RT stand. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation bei 37°C an. Der Ansatz wurde bei –20°C gelagert.

2.2.12 *In vitro* Proteinsynthese

Die Proteinsynthese erfolgte mit Hilfe des TNT® T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate Systems von Promega laut Herstellerprotokoll. Hierfür benötigt man den codierenden Bereich des gewünschten Proteins in einem Klonierungsvektor, der über einen T3, T7 oder SP6 RNA Polymerase Promotor stromaufwärts von der zu translatierenden DNA verfügt. Die Lagerung des Proteinansatzes erfolgte bei –20°C.

2.2.13 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die an spezifische DNA-Sequenzmotive binden, zu identifizieren. Ebenso kann man in einem EMSA nach potentiellen Bindungssequenzen für ein bekanntes Protein suchen.

Zum Nachweis der Bindung von *in vitro* translatiertem NSCL-2 an E-Box Sequenzmotive aus dem Necdin-Promotorbereich wurden 2 μ l Lysat aus der vorangegangenen *in vitro* Proteinsynthese (2.2.12) in 30 μ l EMSA-Puffer auf Eis inkubiert. Nach fünf min wurde der

radioaktiv markierte doppelsträngige Oligonukleotid (2.2.10.3) (70000 cpm entsprechend ca. 25 pmol) hinzugefügt und der Ansatz für weitere 30 min auf Eis inkubiert. In Kompetitionsansätzen wurden unmarkierte doppelsträngige Oligonukleotide bzw. Oligonukleotide mit mutierter E-Box in verschiedenen Konzentrationen gleichzeitig mit der markierten DNA zugesetzt. Nach abschließenden 5 min bei RT wurde der Ansatz auf ein 4%-iges natives Polyacrylamid-Gel geladen und mit 0,5 x TBE bei 10 V/cm in einer 4°C Kühlkammer drei bis vier h gefahren. Das Gel wurde 15 min in 10% Essigsäure fixiert, auf Whatman Papier gebracht und für 90 min bei 80°C in Vakuumtrockner getrocknet. Das Gel wurde über Nacht bei -80°C exponiert und der Film entwickelt.

2.2.14 Immunopräzipitation

2.2.14.1 Ko-Immunopräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Bindungen wurden die entsprechenden *in vitro* translatierten (2.2.12), mit S³⁵ markierten Proteine zu gleichen Mengen in einem 1,5 ml Schraubdeckelgefäß (Eppendorf) 15 min bei 4°C auf einem Drehrad (10 Umdrehungen/min) inkubiert. Um Schwankungen in der *in vitro* Proteinsynthese abzugleichen, wurden Proben der synthetisierten Proteine vorab elektrophoretisch in einem denaturierendem PAA-Gel aufgetrennt und die Stärke der Proteinbanden nach Autoradiographie des Gels abgeschätzt. Anschließend wurde ein Volumen IP-Solubilisierungspuffer, 1 µl Pferde-Serum und 35 µl Protein G Sepharose „Slurry“ zugegeben und die Inkubation für eine weitere h bei 4°C fortgesetzt.

Die Protein G Sepharose wurde vorab dreimal mit IP-Puffer A gewaschen und in einem Verhältnis von 1:1 mit IP-PufferA versetzt („Slurry“). Nach 15-sekündiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 5 µl Anti-myc Epitop Antikörper hinzugesetzt und der Ansatz unter Rotation eine h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 35µl Sepharose „Slurry“ folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Der Sepharose-Antikörper-Protein-Komplex wurde anschließend dreimal mit IP-Puffer A und zweimal mit IP-Puffer B gewaschen, durch Zentrifugation aufkonzentriert und zusammen mit SDS-Gel Ladepuffer fünf min gekocht, was zur Dissoziation des Komplexes führt. Somit konnte die Sepharose durch Zentrifugation aus dem Ansatz entfernt werden. Die verbliebenen Proteine wurden in einem 12%-igen denaturierendem Polyacrylamid-Gel mittels SDS-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Das Gel wurde abschließend 30 min mit 40% Methanol/ 10% Ameisensäure

2. Material & Methoden

fixiert, 10 min gewässert und 30 min in 1 M Natriumsalicylat inkubiert. Nach dem Trocknen wurde das Gel über Nacht bei -80°C autoradiographisch exponiert.

12%-iges denaturierendes Polyacrylamid-Gel:

Sammelgel	Trenngel	Fußgel
0,65 ml PAA 29:1	18 ml PAA 29:1	1,4 ml Trenngel ohne APS, TEMED
1,25 ml 4x Tris-HCL/SDS pH 6,8	11,25 ml 4x Tris-HCL/SDS pH 8,8	10 μl TEMED
3,05 ml H_2O	15,75 ml H_2O	14 μl 10% APS
75 μl 10% APS	150 μl 10% APS	
15 μl TEMED	30 μl TEMED	

2.2.14.2 Chromatin-Immunopräzipitation

In Gegensatz zum EMSA (2.2.13), das zur *in vitro* Analyse von Protein-DNA-Komplexen genutzt wird, kann man mit der Chromatin-Immunopräzipitation die Bindung von Proteinen an distinkte DNA-Abschnitte *in vivo* nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zum Nachweis der Bindung von NSCL-2 an E-Boxen des humanen bzw. murinen Necdin-Promotors durchgeführt. Humane HEK 293T Zellen bzw. murine GT1-*trk* Zellen wurden mit NSCL-2, LMO4, E12 und CLIM2 Expressionskonstrukten transfiziert (2.2.21.3). Als Negativkontrolle dienten mit leerem pCSMT-Plasmid transfizierte Zellen, wobei dieselbe Menge DNA wie in der Kotransfektion transfiziert wurde. 48 H nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert (2.2.21.1). 10^7 Zellen wurden in 50ml Kulturmedium resuspendiert und DNA-Protein-Komplexe durch Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 1% fixiert. Der Ansatz wurde unter gelegentlichem Invertieren 15 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min durch Glyzin mit einer Endkonzentration von 36 mM „gequencht“. Es folgten eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000 rpm und ein Waschschrift mit eiskaltem TBS. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml RIPA-Puffer lysiert, dem zuvor eine Tablette Proteasen-Inhibitor-Cocktail (complete, Mini, EDTA-free; Roche) zugesetzt wurde. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lyse der Zellen durch mehrmaliges Passieren des Ansatzes durch eine Spritze mit 21-er Kanüle unterstützt. Nach Zugabe von 100 μl 10 mg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) schloss sich eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis an. Das Lysate wurde anschließend in 1 ml Aliquots auf 2 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen verteilt.

Durch Sonifizierung (70% Leistung / 0,6 von 1 Zyklus Schalldauer) wurde das Chromatin bis auf eine Größe von ca. 500 bp geschert. Es wurde dreimal 10 Sekunden gepulst und zwischen den Pulsen zwei min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen wurden 30 µl Protein A Sepharose Beads zugesetzt und der Ansatz 50 min bei 4°C gerollt. Die Sepharose wurde abzentrifugiert und dem Überstand anti-myc Epitop Antikörper (Klon 9E10) zugegeben. Nach dreistündiger Inkubation auf Eis wurden 30 µl Sepharose A hinzugefügt und die Bead-Antikörper-Protein-DNA Komplexe eine h bei 4°C präzipitiert. Es schlossen sich vier Waschschrte mit RIPA-Puffer, RIPA-500 Puffer, LiCl/Detergent Waschpuffer und TBS an. Nach Elution der Immuno-Präzipitate mit 1%SDS/TE für 10 min bei 65°C folgte die Reversion der „cross-links“ in 0,67% SDS/TE für 6 H bei 65°C. Zur Entfernung der Proteine von der DNA wurde der Ansatz mit ChIP-Proteinase K-Lösung für zwei H bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA aufgereinigt (2.2.2.1) und gefällt (2.2.2.2).

Die Necdin-Promotorregion wurde mittels Standard PCR (2.2.9) in den GT-1*trk* Zellen durch Maus Primer (MausNecdinprom-forw, MausNecdinprom-rev) amplifiziert (277 bp), welche die zwei E-Boxen flankieren. Die Präzipitation des humanen Necdin-Promotorbereiches wurde durch Amplifikation (276 bp) mit humanen Primern (HumNecdinprom-forw, HumNecdinprom-rev) nachgewiesen, die eine von drei E-Boxen im 5' Bereich des Necdin-Gens flankieren.

2.2.15 Präparation von Geweben

Für die Präparation von Geweben zur Isolierung von RNA (2.2.1.2) wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und das entsprechende Gewebe präpariert, direkt weiter verwendet oder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung von Serum wurde der Brustkorb eröffnet und Blut mit einer Spritze aus der rechten Herzkammer abgesaugt. Die Gerinnung erfolgte über 4 H auf Eis. Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min wurde das Serum in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die immunhistochemische Analyse von bestimmten Geweben erfordert eine ausreichende Fixierung, die durch kardiale Perfusion mit 4% PFA in PBS erreicht wurde. Der Maus wurde zur Betäubung Avertin intraperitoneal gespritzt. Nach erfolgter Anästhesie wurde der Brustkorb geöffnet und zunächst 20 ml kaltes PBS durch die linke Herzkammer in den Körper gespritzt und daraufhin 20 ml kaltes PFA in gleicher Weise verabreicht. Direkt nach der Perfusion wurden die entsprechenden Gewebe präpariert.

Histologien von weißem Fettgewebe erfolgten nach Präparation und sofortiger Fixierung in gepuffertem 4%-igem Formaldehyd (durchgeführt von AG Prof. M. Blüher, IZKF Leipzig).

2.2.16 Histologie

Agaroseeinbettung und Vibratomschnitte

Adultes Mausgehirn wurde nach Kardialer Perfusion und Präparation nochmals für 2 H in 4% PFA nachfixiert und kurz in PBS gewaschen. Als Einbettungsmedium diente 2%-ige Agarose in PBS, die nach Aufkochen auf ca. 50°C abgekühlt wurde. Die Agarose wurde in Plastikeinbettungsformen überführt und das Gewebe sofort darin positioniert. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gehirn mit einem Mikrovibrator VT1000S von Leica geschnitten. Die Schnittdicke betrug 50 µm. Die Agarose wurde einzeln während des Schneidens entfernt und die Schnitte in 24-Well Schalen in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.16.1 Harzeinbettung und Ultramikrotomschnitte

Die Einbettung und Histologie von weißem Fettgewebe erfolgte am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Blüher.

Nach Fixation wurde das Fettgewebe in kleine Würfel getrimmt, in PBS gespült und in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 50-100% gefolgt von Propylenoxid dehydratisiert. Es schloss sich eine Infiltration mit Propylen:Epon 812 Mischungen mit graduell ansteigender Resin Konzentration an. Von den eingebetteten Geweben wurden 0,5 µm dicke Schnitte mit einem Reichert Ultramikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden auf Polylysin beschichtete Objektträger gebracht und zur Vorbereitung auf die systematische Analyse der Präadipozytenzahl, Adipozytenzahl und -größe mit Azur-II-Methylenblau angefärbt (Färbung nach Richardson).

2.2.16.2 Immunhistochemie

Die in PBS frei schwimmenden Schnitte (0) wurden direkt für eine Fluoreszenz-Antikörperfärbung eingesetzt. Die Anfärbung erfolgte in 24-Well-Schalen.

Schritt	Lösung	Inkubation
Absättigung unspezifischer Bindungen	5% Hühnchen Serum in IHC-Tag1 Puffer	1 h, RT
1. Antikörper	Antikörper in entsprechender Verdünnung (0) in IHC-Tag1 Puffer	über Nacht , 4°C
Waschen	IHC- Tag2 Puffer	2 x, 5 min
2. Antikörper fluoreszenzgekoppelt	Antikörper in entsprechender Verdünnung (0) in IHC-Tag2 Puffer	1 h, RT
Waschen	IHC- Tag2 Puffer	2 x, 5 min
Waschen	PBS	5 min
Kernfärbung	DAPI 1:10000 in H ₂ O	3 min
Waschen	PBS	5 min
Einbettung	Mowiol	zuvor Gewebeschnitt kurz in bidest H ₂ O tauchen, Schnitt auf Objektträger bringen, kurz antrocknen lassen, anschließend einbetten

2.2.16.3 Fotodokumentation

Fluoreszenz-Anfärbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines entsprechenden Filters vergrößert und mit einer digitalen Nikon Kamera (Nikon Coolpix 990) fotografiert. Die Bildverarbeitung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 6.0.

2.2.17 Statistische Analyse

Wenn nicht anders erwähnt, sind alle Werte Mittelwerte \pm Standardfehler. Zur statistischen Analyse wurden zweiseitige ungepaarte Studentische T-Tests durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tuckey-Test angewandt. Wenn nicht anders angezeigt, lag das Signifikanzlevel bei $p \leq 0,05$. Die Auswertung erfolgte mit Matlab 6.5 (The Mathworks).

2.2.18 Wirkstoffbehandlung von Mäusen

Die Wirkstoffbehandlung von Mäusen über einen Zeitraum von 10 Tagen erfolgte mittels implantierter osmotischer Minipumpen der Firma Alzet. Der Wirkstoff wurde laut Herstellerprotokoll in entsprechender Konzentration in das Reservoir überführt und die Pumpe, die bei Körpertemperatur kontinuierlich Flüssigkeit abgibt, subkutan im Nacken der Maus platziert. Hierfür wurde das Tier vorab mit Avertin anästhesiert und im Nacken ein ca. ein Zentimeter langer Hautschnitt gesetzt. Die Pumpe wurde mit der Öffnung voran unter die Haut geschoben und die Wunde mit zwei Klammern geschlossen. Die Wirkstofffreisetzung erfolgte über zehn Tage. Während dieser Zeit wurden die Mäuse täglich gewogen und die Futteraufnahme dokumentiert. Als Negativkontrollen dienten Mäuse, denen mit PBS gefüllte Pumpen implantiert wurden.

2.2.19 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Serum Insulin-, Resistin- und Adiponektinkonzentrationen Sandwich-ELISA Kits der Firma LINCO Research bzw. R&D Saystems genutzt (2.1.2). Alle Proben und Standards wurden in Duplikaten gemessen und der Nachweis laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden je 10 μ l Mausserum (2.2.15) eingesetzt.

2.2.20 Radioimmunoassay (RIA)

Die Bestimmung der Serum-Leptinkonzentration erfolgte unter Einsatz von je 100 μ l Mausserum (2.2.15) in Duplikaten mittels Maus Leptin RIA Kit der Firma LINCO Research (2.1.2). Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll.

2.2.21 Zellkultur

2.2.21.1 Kultivierung und Passagierung von Säugerzellen

Die Kultivierung erfolgte in entsprechendem Kulturmedium auf Zellkulturschalen (Nunc) in einem 37°C Zellkulturinkubator (9% CO₂). Alle 2 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 x Trypsin/EDTA trypsiniert. Die abgelösten Zellen wurden je nach Zelllinie in entsprechender Höhe gesplittet und auf neue Zellkulturschalen überführt.

2.2.21.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden trypsiniert und die Aktivität des Trypsins mit Kulturmedium gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min bei RT. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen, so dass eine Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen pro ml Medium gegeben war. Die Zellen wurden zu 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (Nunc) gefüllt und in einer Styroporbox über Nacht auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Das Auftauen von Kryostocks erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium auf 10 cm Schalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.21.3 Transfektion

Die Aufnahme von DNA in eukaryontische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Es gibt verschiedene Verfahren zur Einschleusung von Fremd-DNA in Zellen.

2.2.21.3.1 Kalziumphosphat Transfektion

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und mittels einer Neubauer Zählkammer gezählt. Auf 6 cm Zellkulturschalen wurden in Abhängigkeit von der Zelllinie so viele Zellen ausplattiert, dass die Zellen zur Transfektion am nächsten Tag ca. 80% konfluent waren. Am darauffolgenden Tag wurde 2-3 H vor der Transfektion das Medium

2. Material & Methoden

gewechselt. In ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurde eine entsprechende Menge DNA vorgelegt. Dann folgte die Zugabe von Zellkulturwasser und 61 μl 2 M CaCl_2 . Die Wassermenge wurde so gewählt, dass Ansatz ein Volumen von 500 μl hatte. Es schloss sich die tropfenweise Zugabe von 500 μl 2 x HBS Puffer an, wobei das Einbringen von Luft durch die Pipette von großer Bedeutung war, da die entstehenden CaPO_4 -DNA-Präzipitate für die Endozytose durch Zellen möglichst fein sein müssen. Der Ansatz ruhte 20 min bei RT und wurde abschließend auf die vorbereiteten Zellen getropft. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 48 H.

2.2.21.3.2 Lipofektion

Zur Transfektion einiger Zelllinien wurde das Transfektionsreagent Fugene6 von Roche verwendet. Die Zellen wurden hierfür einen Tag zuvor gesplittet (2.2.21.3.1) und eine angemessene Zellzahl auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.2.21.4 Übersicht über die Kultivierungsmethoden der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium	Transfektionsmethode/ DNA Menge (6 cm Schale)	Ausgesäte Zellzahl vor Transfektion (6 cm Schale)
GT1- <i>trk</i>	D-MEM (4,5 mg/l Glukose, 25 mM HEPES), 10% FCS, Pen/Strep/Glutamin	Lipofektion, 6 μg DNA	3×10^5
HEK 293T	siehe C3H10T1/2	Kalziumphosphat-Transfektion, 2 μg DNA	3×10^5

2.2.21.5 Transaktivierungs-Analyse mittels Luziferase

HEK293T Zellen bzw. GT1-*trk* Zellen wurden zur Analyse der Bindung von NSCL-2 an E-Boxen des Necdin-Promotors mit verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert.

Transfektionsansätze:

Reporter pTA-Luc-NP + β Gal Expressionskonstrukt

Reporter + NSCL-2 + β Gal Expressionskonstrukt

Reporter + NSCL-2 + Kofaktor (LMO, E12, CLIM2) + β Gal Expressionskonstrukt

Es wurden immer dieselben Gesamtmengen an DNA transfiziert, wobei das Reporterkonstrukt und das β -Galaktosidase Expressionsplasmid im Unterschuss vorlagen, um sicherzustellen, dass in jeder pTA-Luc-NP, β Gal positiven Zelle auch die Expressionskonstrukte vorhanden waren. Die Ansätze wurden in Triplets vorgenommen.

2.2.21.5.1 Lyse von Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 2 Mal mit 1 x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,4 ml PBS wurden die Zellen mit einem Zellkratzer (Greiner) von der Platte abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurde zwei min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 100 μ l 0,25 M Tris pH 7,5 gelöst. Die Lyse der Zellen erfolgte mechanisch durch wiederholtes Einfrieren auf Trockeneis, Auftauen bei 37°C und Vortexen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand bei -20°C gelagert.

2.2.21.5.2 Abgleich von Transfektionseffizienzen

Zur Bestimmung von Transaktivierungen mittels Luciferaseaktivität wurde zum Vergleich von Transfektionseffizienzen verschiedener Ansätze stets ein LacZ-Expressionskonstrukt kotransfiziert. Die im Proteinextrakt befindliche β -Galaktosidasemenge kann durch den Umsatz des Substrates Chlorphenolred- β -D-Galactopyranosid (CPRG) gemessen werden. Es wurden 10 μ l CPRG mit 70 μ l Z-Puffer gemischt. Dem gelben Substrat wurden 10 μ l Proteinextrakt beigemischt und der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Rotfärbung zu erkennen war. Die Reaktion wurde mit 500 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Extinktion bei 574 nm gemessen. Als Leerwert diente das Substrat plus 10 μ l Wasser. Von den Extinktionswerten ausgehend kann man die Mengen an Proteinextrakt errechnen, die für vergleichende Proteinaktivitätsmessungen eingesetzt werden müssen.

2.2.21.5.3 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Luziferase wird als Reporterprotein genutzt, mit dessen Hilfe die Genexpression und Funktion eines fremden Gens in einem Wirtsorganismus analysiert werden kann. Das Enzym oxidiert Luziferin in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium-Ionen. Es kommt zur Abstrahlung von Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Nach Bestimmung der Transfektionseffizienz durch β -Galaktosidase-Analyse wurden die errechneten Mengen an Proteinextrakt mit 100 μ l Luziferase-Messpuffer (Appllichem) in einem 5 ml Röhrchen (Sarstedt) gemischt und im FB 12 Luminometer (Berthold Detection Systems) platziert. Durch Zugabe von 100 μ l 0,25 mM D-Luziferin wurde die Reaktion gestartet. Die Lumineszenz wird in „Relative Light Units“/sec (RLU/sec) gemessen. Die Messung dauerte 10 Sekunden.

2.2.21.6 Isolation und Kultivierung von Präadipozyten

Nach Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurde das perigonadale Fettgewebe steril entnommen und kurz in PBS gewaschen. Unter der Sterilbank wurde das Gewebe in 2 ml PBS mit einem Skalpell fein zerkleinert und in 4 ml vorgewärmten Präadipozyten-Isolationspuffer überführt. Der Ansatz wurde für 40 min bei 37°C im Wasserbad (90 Umdrehungen/Min) geschüttelt. Während dieser Inkubationszeit wurde alle fünf min für 10 Sekunden vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde der Verdauungs-Ansatz durch einen 100 μ m Nylonfilter gefiltert. Es wurde 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde 10 min bei RT in Erythrozyten Lysis Puffer resuspendiert und inkubiert. Es wurde wieder zentrifugiert, in Kulturmedium für primäre Präadipozyten aufgenommen und auf Zellkulturschalen ausgesät. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.21.7 *In Vitro* Differenzierung von Präadipozyten

Bei Erreichen der Konfluenz der Präadipozyten wurde das Kulturmedium durch Induktionsmedium ersetzt und die Zellen 48 H damit kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen wiederum mit Präadipozyten-Kulturmedium kultiviert.

2.2.21.8 Öl-Rot-O Färbung

Fünf Tage nach der Induktion der Differenzierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit 4%-iger Formaldehyd-Gebrauchslösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser folgten zwei 5-minütige Inkubationen mit Propylen Glykol. Die Zellen wurden anschließend 7 min mit Öl-Rot-O Lösung inkubiert. Die Färbelösung wurde abgesaugt und 85%-iges Propylen Glycol für drei min aufgetragen. Es wurde in destilliertem Wasser gewaschen und die Zellkerne 30 Sekunden mit Hematoxylin blaugefärbt. Anschließend wurde fünf min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Anzahl differenzierter Adipozyten wurde durch Auszählen ermittelt.

2.2.21.9 Zell-Charakterisierung mit FACS

Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) sind Laboranalytoren, welche die Fluoreszenz von Partikeln messen, die durch eine bestimmte Wellenlänge angeregt werden.

Die Zellen wurden trypsinisiert und in FACS Röhrchen überführt. Sie wurden mit PBS gewaschen, drei min bei 1700 rpm zentrifugiert und wiederum in PBS aufgenommen. Die Bedienung des FACS (Becton&Dickinson) wurde von Herrn Dr. Henning Ebel übernommen.

2.2.21.10 Isolation von Adipozyten, Bestimmung der Zellgröße, des Glukose- transports , des Glukosemetabolismus und der Lipolyse

Die Charakterisierung isolierter Adipozyten erfolgte am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Blüher.

Die Tiere wurden getötet (2.2.15) und die perigonadalen Fett Pads entnommen. Die Adipozyten wurden durch Collagenaseverdau (1 mg/ml) isoliert. Ein Teil der Adipozyten wurde mit Osmiumsäure fixiert und in einem automatischen Zählgerät („Coulter Counter“) analysiert, um die Verteilung der Adipozytengröße und die Zellzahl zu bestimmen (Cushman und Salans, 1978). Zur Bestimmung des Glukostransports wurden isolierte Adipozyten mit 80 nM Insulin für 30 min und anschließend für weitere 30 min mit 3 μ M U-¹⁴C-Glukose inkubiert. Direkt danach wurden die Zellen mit Osmiumsäure fixiert und für 48 H bei 37°C inkubiert. Nach Entfärbung wurde die Radioaktivität bestimmt (Blüher et al., 2002).

2. Material & Methoden

Zur Analyse der Lipolyseaktivität wurden Adipozyten (100 µl einer 10%-igen isolierten Zellsuspension) für die Bestimmung der basalen Lyse in Anwesenheit von Adenosin Deaminase und 10 µM PIA (N6-[R-(-)-1-methyl-2-phenyl]Adenosin), für eine maximale Lipolyse in Anwesenheit von 100 µM Isoproterenol und für die Insulin inhibierte Lipolyse durch Zugabe von 100 nM Insulin 15 min vor Zugabe von 100 µM Isoproterenol inkubiert. Der Glycerolgehalt des Inkubationsmediums wurde nach 15 min durch radiometrische Analyse bestimmt (Blüher et al., 2002).

Zur Bestimmung der Lipogenese wurde der Glukosemetabolismus an isolierten Adipozyten unter Anwesenheit von 5 mM Glukose (3 µM U-¹⁴C-Glukose enthalten) bestimmt. Die in Triglyceride und CO₂ eingebaute Glukose wurde nach einer h ohne (basal) oder mit 80 nM Insulin bestimmt (Tozzo et al., 1995). Die in Laktat eingebaute Glukose wurde mittels Anionenaustauschsäulen (AG1-X8 Resin, Bio-Rad) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse bauen auf vorangegangene Arbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe auf. Von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun wurde eine NSCL-2 LacZ „knock-in“ Mauslinie generiert, indem die basische Helix-Loop-Helix Domäne deletiert und an dieser Stelle eine Neomycinkassette und das β -Galaktosidase Gen inseriert wurde. NSCL-2 Mutanten zeigen eine Gewichtszunahme nach der Pubertät. Eine Macroarray Analyse von isolierter RNA aus dem Kleinhirn von neugeborenen NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten zeigte eine Reduktion des Necdin-Gens in Doppelmutanten (Krüger et al., 2004).

3.2 NSCL-2 aktiviert den Promotor des Necdin-Gens

3.2.1 NSCL-2 bindet *in vitro* an spezifische Sequenzmotive innerhalb des Necdin-Promotors

Innerhalb der 5' flankierenden Region des Necdin-Gens befinden sich zwei CANNTG Sequenzmotive, so genannte E-Boxen, die als DNA-Bindestelle für bHLH Transkriptionsfaktoren dienen (Abbildung 3). Zur Klärung der Frage, ob NSCL-2 spezifisch an beide oder eine der beiden E-Boxen bindet, wurde ein „Elektro Mobility Shift Assay (EMSA)“ mit *in vitro* synthetisiertem NSCL-2 Protein und doppelsträngigen radioaktiven Oligonukleotiden durchgeführt.

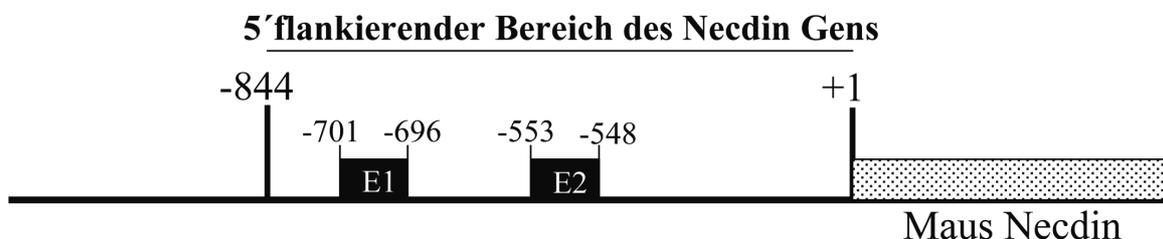


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Necdin-Gens und der 5' flankierenden Region. Innerhalb des Promotorbereiches (-844 bis 0) befinden sich zwei E-Boxen (E1 und E2), die potentielle Bindungsstellen für den bHLH Transkriptionsfaktor NSCL-2 darstellen. Die Stelle +1 symbolisiert die erste Base der codierenden Region des Gens.

Die Basenabfolge der Oligonukleotide wurde so gewählt, dass sie die jeweilige E-Box und mindestens sechs benachbarte Basen enthalten (E-Box 1:GGGCCCTCATTTCATGTGG GGCCTGGGGG; E-Box 2: GGCATTCAAATCTCACATGGATTATCTCC).

Wie in Abbildung 4 zu sehen, bindet NSCL-2 stark an die E-Box1 (Bahn 1), wohingegen die E-Box 2 nur ein schwaches Bindemotiv für NSCL-2 darstellt (Bahn 8). Die Spezifität des EBox-NSCL-2 -Komplexes zeigt sich in Kompetitionsansätzen, in denen zu dem radioaktiv markierten Oligonukleotiden jeweils die selben, jedoch unmarkierten Oligonukleotide in 100-1000-fachem molarem Überschuss zugesetzt wurden (E-Box 1: Bahn 2-5; E-Box 2: Bahn 9-12) . Die WT-Oligos binden in ansteigendem Maße NSCL-2, so dass die Menge an detektierbaren Komplexen abnimmt. Durch Zugabe von Oligonukleotiden, in denen die E-Box 1 von CATGTG nach TGCGTG und die E-Box 2 von CACATG nach ACTATG mutiert wurde, konnte die spezifische Bindung von NSCL-2 an die E-Boxen des Necdin-Promotors nicht kompetitiert werden (E-Box 1: Bahn 6-7; E-Box 2: Bahn 13-14). Die zusätzliche nicht-spezifische Bande (NS) konnte hingegen auch mit mutierten Oligonukleotiden kompetitiert werden.

3.2.2 NSCL-2 bindet *in vivo* an spezifische Sequenzmotive innerhalb des Necdin-Promotors

Mittels „Chromatin Immunopräzipitation“ (ChIP) konnte die Bindung von NSCL-2 an den endogenen Necdin-Promotor innerhalb der natürlichen Chromatin Struktur in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T) und Maus GT1-*trk* Zellen neuronaler Herkunft nachgewiesen werden (Abbildung 5). Die Zellen wurden mit einem NSCL-2 Expressionsplasmid (NSCL-2-pCS2MT) transfiziert und nach Fixierung mit Formaldehyd geerntet und das Chromatin sonifiziert. Neben NSCL-2 wurden Konstrukte cotransfiziert, von denen bekannt ist, dass sie mit bHLH Proteinen einen Komplex bilden. Das bHLH Protein E12 dimerisiert mit NSCL-2 und die Proteine CLIM2 und LMO4, die unter anderem in Hirnbereichen exprimiert sind, in denen NSCL-2 aktiv ist, binden an das NSCL-2-E12 Heterodimer ohne selbst mit der DNA in Kontakt zu treten.

Nach der Immunopräzipitation von NSCL-2-DNA-Komplexen mit einem Antikörper gegen c-myc, das mit dem transfizierten NSCL-2 ein Fusionprotein bildet, erfolgte der Nachweis durch PCR mit Primern, die eine (humaner Promotor) bzw. zwei E-Boxen des Necdin-Promotors flankieren (Maus).

3. Ergebnisse

Ein ChIP Ansatz mit Zellen, die zuvor mit dem leeren Expressionsplasmid pCS2MT transfiziert worden waren, zeigt kein Produkt in der abschließenden PCR.

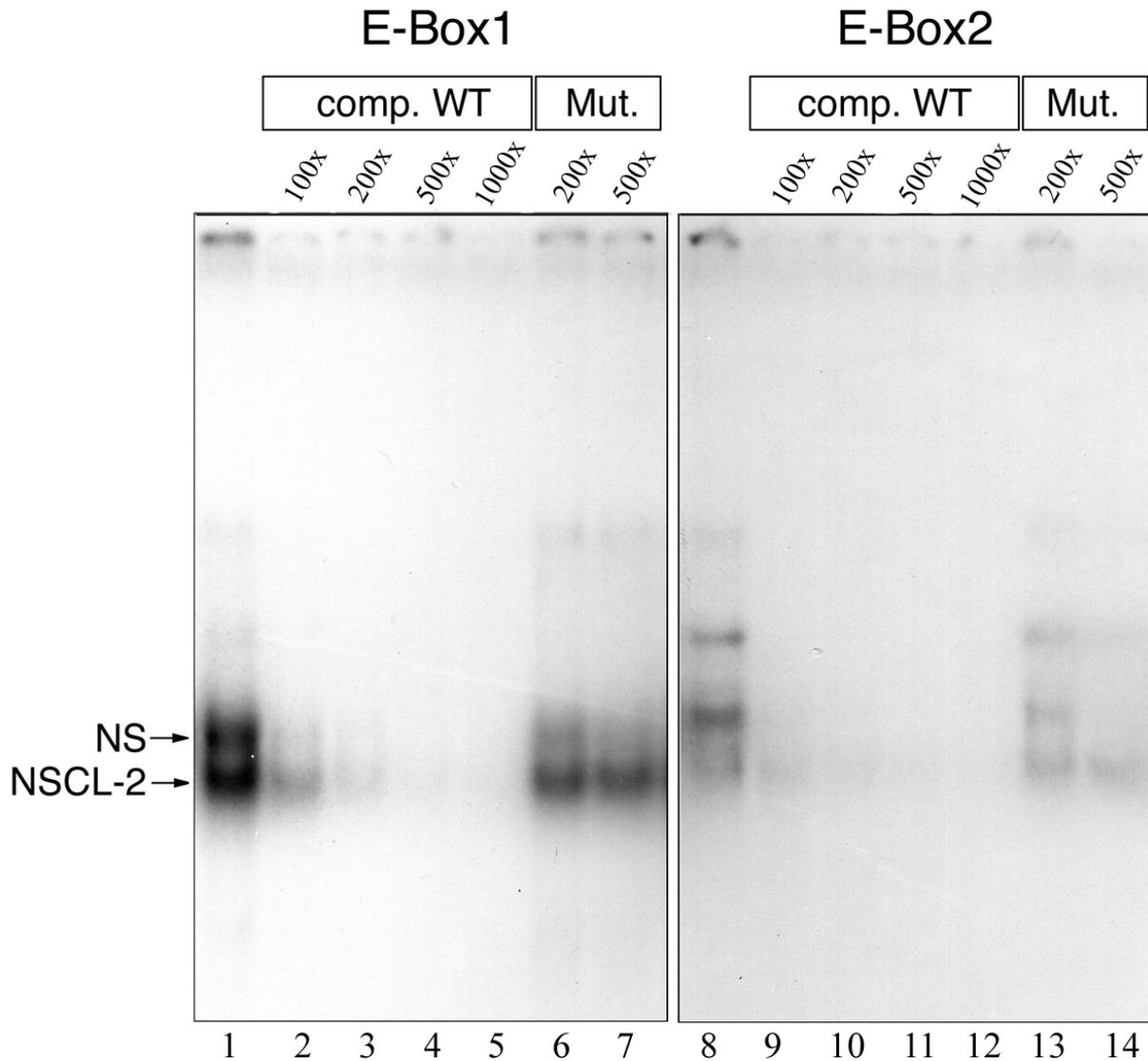


Abbildung 4 NSCL-2 bindet direkt an den Necdin-Promotor. EMSA mit *in vitro* translatiertem NSCL-2 und E-Box 1 (Bahn 1-7) bzw. E-Box 2 Oligonukleotiden (Bahn 8-14). Die mit NSCL-2 gekennzeichnete Bande in Bahn 1 und 8 zeigt den NSCL-2-Oligonukleotid-Komplex, der spezifisch mit nicht radioaktivem (WT) E-Box 1 bzw. 2 Oligonukleotid in 100-1000-fachem Überschuss (Bahn 2-5 und 9-12) und E-Box 2 Oligonukleotid in 100-1000-fachem Überschuss kompetitiert wurde (Bahn 9-12). Die Zugabe von mutierten E-Box Oligonukleotiden in 200-500-fachem molarem Überschuss hat keine kompetitive Wirkung auf den Komplex (Bahn 6-7 für E-Box 1; Bahn 13-14 für E-Box2). Eine nicht-spezifische Bindung (NS) mit E-Box 1 bzw. 2 wird dagegen auch mit mutierten Oligonukleotiden kompetitiert. Ungebundene radioaktiv markierte Oligonukleotide lagen stets im Überschuss vor. Abbildung aus (Krüger et al., 2004).

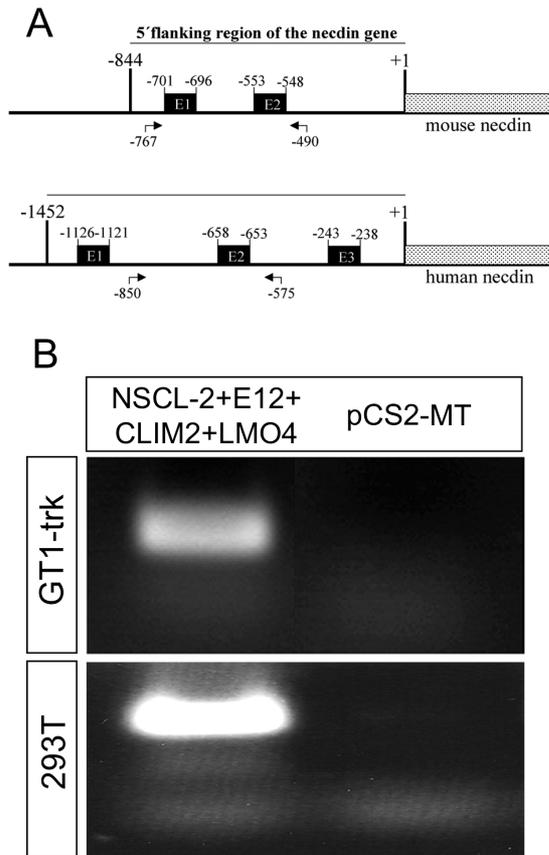


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Necdin-Promotors und Chromatin Immunopräzipitation. Zum Nachweis der Bindung von NSCL-2 an E-Boxen des endogenen Promotors wurde eine Chromatin Immunopräzipitation mit anschließender PCR durchgeführt. (A) Schema des murinen und humanen Necdin-Promotors, Lokalisation der E-Boxen und Positionen der Primer, die für die Identifizierung von immunopräzipitiertem Chromatin genutzt wurden. (B) ChIP des Necdin-Promotors durch ein NSCL-2-Myc-tag Fusionsprotein. Proben von sonifiziertem Chromatin von GT1-trk oder HEK 293T Zellen, die zuvor mit einer Kombination von NSCL-2, E12, CLIM2 und LMO4 oder leerem pCS2MT Vektor transfiziert wurden, wurden mittels Anti-myc Antikörper immunopräzipitiert. Die aus dem präzipitiertem Material isolierte DNA wurde in einer PCR mit Primern, spezifisch für den Maus und Mensch Necdin-Promotor, amplifiziert und in einem Agarosegel aufgetrennt.

3.2.3 NSCL-2 transaktiviert den Necdin-Promotor

Zur Klärung der Frage, ob die Bindung von NSCL-2 an den Necdin-Promotor zu einer Aktivierung der Transkription des Necdin-Gens führt, wurde der Necdin-Promotorbereich und ein Teil der codierenden Region von Necdin (-844 bis +63) so in den Luziferase-Reporterplasmid pTA-Luc kloniert, dass die Expression von Luziferase unter der Kontrolle des Necdin-Promotors stand (Abbildung 6). Wird der Necdin-Promotor durch Bindung von NSCL-2 aktiviert, kann dies durch eine verstärkte Aktivität des Reporterenzym gemessen werden.

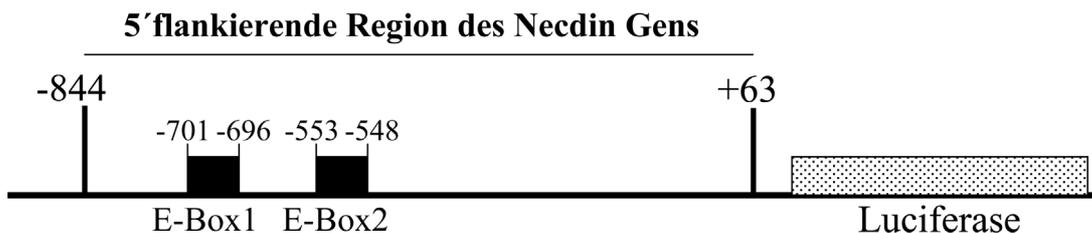


Abbildung 6 Schematische Darstellung des Luziferase Reporter Plasmids pTA-luc-NP. Die Expression des Enzyms steht unter der Kontrolle des Necdin-Promotors.

3. Ergebnisse

Die Kotransfektion des Reporters mit NSCL-2 verstärkte die basale Luziferase Aktivität in HEK 293T Zellen um das 18-fache (Abbildung 7, links). Die kombinierte Überexpression mit dem Dimerisierungspartner E12 konnte die Aktivität in HEK 293T Zellen auf das 25-fache verstärken. Die Transfektion des Reporters zusammen mit NSCL-2 und LMO-1, -2, oder -4 führte zu einer weiteren Steigerung der Enzymaktivität. LMO-2 und LMO-4, aber nicht LMO-1 konnten die Promotorgene Aktivität auf das 36-fache bzw. 40-fache der basalen Aktivität steigern, was eine wichtige Rolle dieser Kofaktoren in der NSCL-2 vermittelten Aktivierung des Necdinpromotors vermuten lässt. Die kombinierte Transfektion von E12 und LMO-2 oder LMO-4 zusammen mit NSCL-2 und E12 führte zu einer 70-fachen bzw. 60-fachen Erhöhung der Reporter-gen-Aktivität in HEK 293T Zellen. Die Transaktivierungsexperimente wurden parallel in GT1-*trk* Zellen durchgeführt, um die Aktivierbarkeit des Necdin-Promotors in neuronalen Zellen zu testen (Abbildung 7, rechts). In dieser Zelllinie konnte die Enzymaktivität nach Transfektion mit pTA-luc-NP und NSCL-2 um das 100-fache erhöht werden. Die kombinierte Überexpression von NSCL2, E12, CLIM2 und LMO4 führte im Gegensatz zu den in HEK 293T Zellen beobachteten Steigerungen jedoch zu keiner zusätzlichen Aktivitätserhöhung.

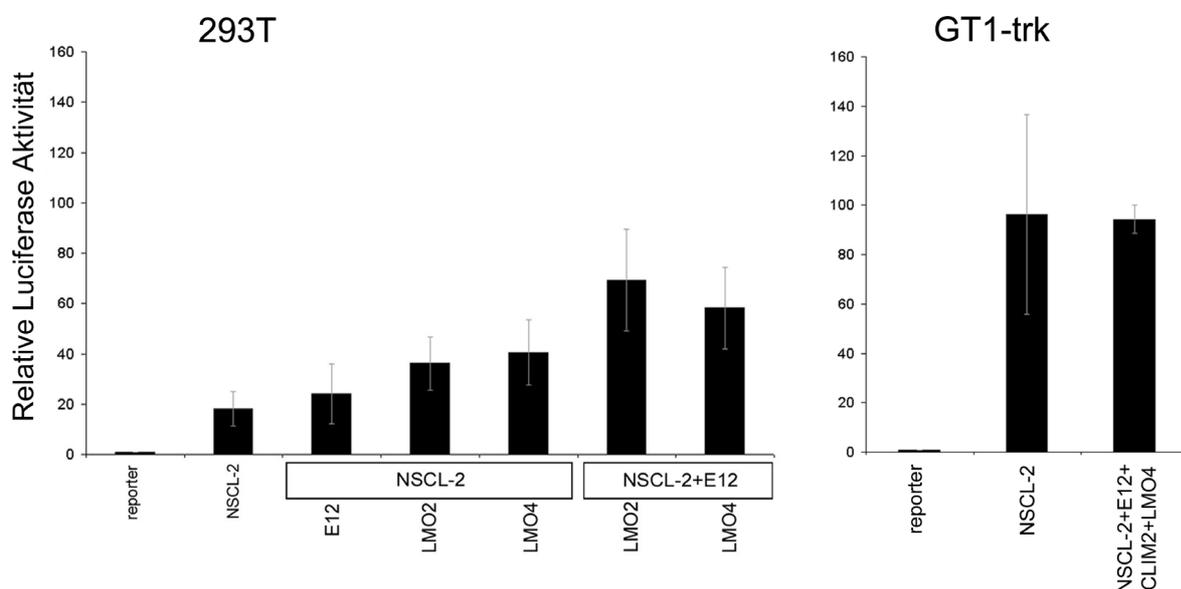


Abbildung 7 NSCL-2 transaktiviert den Necdin-Promotor in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen. HEK 293T Zellen und die hypothalamische Zelllinie GT1-*trk* wurden mit dem Luciferase Reporter Konstrukt allein, mit NSCL-2 oder mit NSCL-2 zusammen mit verschiedenen Kombinationen von Kofaktoren transfiziert. In HEK 293T Zellen wurde die stärkste Aktivierung der Luciferaseexpression durch die kombinierte Expression von NSCL-2, E12 und LMO-2 oder LMO-4 erreicht. In GT1-*trk* Zellen zeigte sich eine starke Aktivierung des Necdin-Promotors durch die Kotransfektion von Reporter Konstrukt und NSCL-2, die durch zusätzliche Kofaktoren nicht weiter gesteigert werden konnte. Abbildung modifiziert aus (Krüger et al., 2004).

Um zu bestätigen, dass die Transaktivierung des Necdin-Promotors durch die spezifische Bindung von NSCL-2 an die identifizierten E-Boxen vermittelt wird, wurden die E-Boxen innerhalb des Reporterkonstrukts einzeln oder in Kombination mutiert (siehe 0 PCR-Mutagenese). Die E-Box 1 wurde von CATGTG zu TCGGTG mutiert (pTA-Luc-Ebox1mut), die E-Box 2 von CACATG zu TGAATG (pTA-Luc-Ebox2mut) und eine kombinierte Mutation beider E-Boxen fand sich in dem Konstrukt pTA-Luc-Ebox1,2mut.

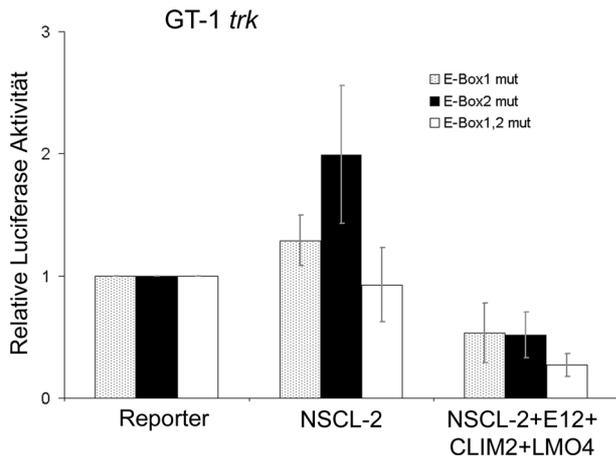


Abbildung 8 Keine Transaktivierung des Necdin-Promotors nach Mutation der E-Boxen in GT1-*trk* Zellen. Durch die Mutation der E-Box 1, der E-Box 2 oder beider Sequenzmotive führt weder die Kotransfektion mit NSCL-2 noch die Transfektion in Kombination mit den Kofaktoren zu einer deutlichen Steigerung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur basalen Reporteraktivität.

Abbildung 8 zeigt, dass die Transfektion von NSCL-2 zusammen mit den mutierten Reporterkonstrukten die Aktivität des Reporterenzym nicht wesentlich über das basale Niveau steigern konnte. War lediglich die E-Box 2 mutiert, E-Box 1 aber nicht, konnte eine Erhöhung der Luziferaseaktivität um das 2-fache beobachtet werden, was die Beobachtung einer verstärkten Bindung an E-Box 1 im EMSA (Abbildung 4) unterstützt. Auch die kombinierte Kotransfektion mit NSCL-2, E12, CIM2 und LMO-4 resultierte nicht in einer Aktivierung des Necdin-Promotors, wenn beide E-Boxen oder nur eine E-Box mutiert war.

Es konnte gezeigt werden, dass NSCL-2 zusammen mit einer Kombination von Proteinen, die einen Aktivierungskomplex bilden, spezifisch an die beiden E-Boxen des Necdin-Promotors bindet und diesen aktiviert.

3.2.4 Koimmunopräzipitation von NSCL-2/LMO-Komplexen

Da die Transaktivierung des Necdin-Promotors besonders durch NSCL-2/LMO-2 bzw. -4 Kotransfektionen erfolgte, wurde in einer Koimmunopräzipitation mit NSCL-2 und LMO-Proteinen untersucht, ob die Proteine direkt aneinander binden. Radioaktives, *in vitro*

3. Ergebnisse

translatiertes NSCL-2-mycTag Protein wurde mit ebenfalls radioaktivem, *in vitro* synthetisierten LMO-1, -2 oder -4 inkubiert und anschließend mit einem Anti c-myc Epitop Antikörper (Klon 9E10) präzipitiert.

Bahn 2-5 der Abbildung 9 zeigt die vier untersuchten Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese. Um unspezifische Bindungen der LMO-Proteine an den anti c-myc Antikörper auszuschließen zu können, wurden die Proteine einzeln mit dem Antikörper inkubiert und dieser anschließend präzipitiert (Bahn 6-9). Nur das NSCL-2-myc Tag Fusionsprotein wurde mit dem Antikörper präzipitiert, die LMO-Proteine jedoch nicht. Die Koimmunopräzipitationen von NSCL-2 mit LMO-1, -2 und -4 sind in Bahn 10-12 abgebildet. Lediglich LMO-4 zeigte eine schwache Komplexbildung mit NSCL-2 (Bahn 12). In den Ansätzen mit LMO-1 und LMO-2 konnte in der SDS-Gelelektrophorese nur das NSCL-2-mycTag Protein nachgewiesen werden.

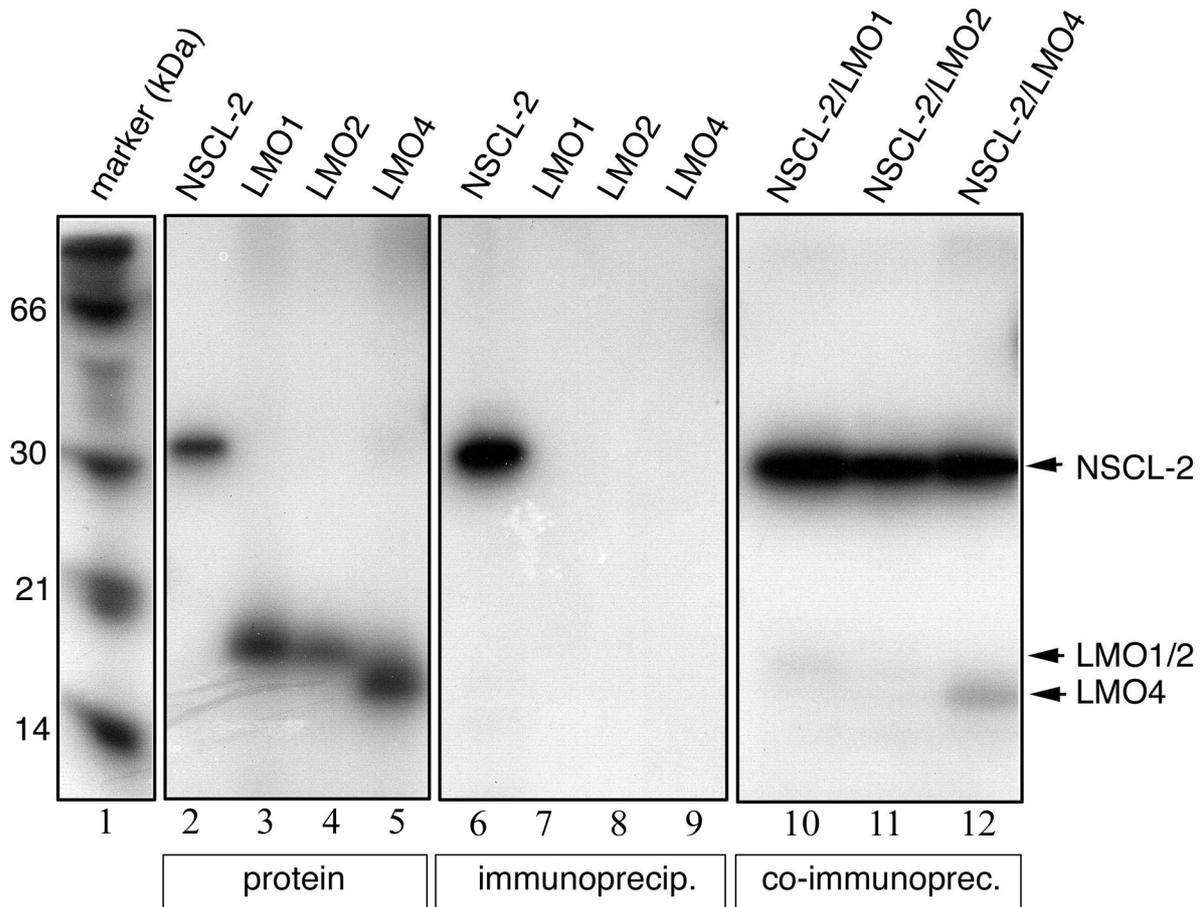


Abbildung 9 Koimmunopräzipitation von NSCL-2 und LMO-Proteinen. SDS-Gelelektrophorese von *in vitro* translatiertem, S^{35} -Methionin markiertem NSCL-2-mycTag, LMO-1, -2 und -4 (Bahn 2-5). Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden die Proteine einzeln mit dem anti c-myc Epitop Antikörper inkubiert und präzipitiert (Bahn 6-9). Die Koimmunopräzipitation (Bahn 10-12) zeigte eine schwache NSCL-2/LMO-4-Komplexbildung (Bahn 12).

3.3 Analyse des Leptin Signalweges in NSCL-2 Mutanten

Untersuchungen von Good und Mitarbeitern (Good et al., 1997) haben gezeigt, dass NSCL-2 Defizienz zu einem postpubertären Anstieg des Körpergewichts führt. Diese Beobachtung konnte durch Messungen in unserer Arbeitsgruppe (Krüger, 2002) und eigene Untersuchungen bestätigt werden (Abbildung 13). Die Futtermittelaufnahme steht unter der Kontrolle des Hormons Leptin, welches in Fettzellen produziert und bei positiver Energiebilanz, d.h. wenn Energie in Form von Lipiden in Fettzellen gespeichert wird, in den Blutkreislauf sezerniert wird. Das Hormon bindet an seinen Rezeptor innerhalb hypothalamischer Kerngebiete, wo das Signal über den JAK/STAT Signalweg die Expression einer Vielzahl von Genen kontrolliert, die unter anderem die Energieaufnahme steuern. So erhöht sich die Expression des anorexigen wirkenden α -MSH, während die Expression des orexigen wirkenden Neuropeptid Y (NPY) sinkt.

3.3.1 NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen eine Leptinresistenz

Adulte NSCL-2 Mutanten haben einen erhöhten Leptinspiegel im Blut. Daten von Good und Mitarbeitern (Good, 2000) geben einen 2,5-fachen Leptinspiegel in NSCL-2 $-/-$ Mäusen an. Eigene Messungen des Serum-Leptinspiegels von NSCL-2 Mutanten im Alter zwischen sechs und neun Monaten sind in Abbildung 10 dargestellt. Die Messungen zeigten einen 10-fach erhöhten Serum-Leptinspiegel in NSCL-2 Mutanten.

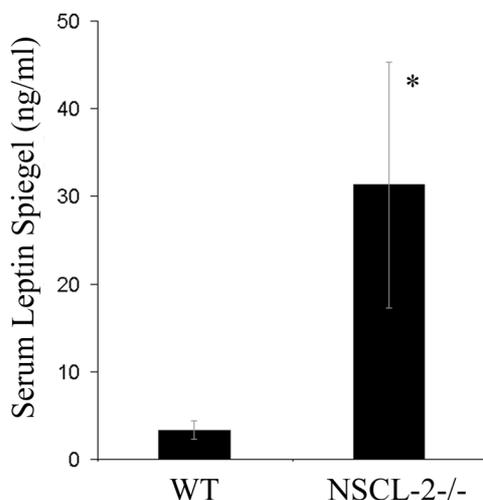


Abbildung 10 Homozygote NSCL-2 Mutanten haben einen erhöhten Serum-Leptinspiegel. (WT: n=5; NSCL-2 $-/-$: n=3; p< 0,05)

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob trotz des hohen Leptinspiegels durch eine exogene Gabe von Leptin eine Reduktion des Körpergewichts erreicht werden kann, wurden weibliche NSCL-2 Mutanten und WT-Mäuse im Alter von sechs Monaten einer Behandlung mit rekombinantem Leptin unterzogen. Den Tieren wurden osmotische Minipumpen subkutan auf den Rücken implantiert, die den Wirkstoff in einer Dosis von 400 ng/g/Tag über einen Zeitraum von zirka 10 Tagen kontinuierlich abgeben. In Abbildung 11 sind die Gewichtsänderungen während und nach der Behandlung dokumentiert. Bei den WT-Tieren war der maximale Gewichtsverlust von 15% an Tag 5 nach der Pumpenimplantierung erreicht. Das NSCL-2 defiziente Tier hatte zu diesem Zeitpunkt 4 % seines Anfangsgewichts verloren. Bei den Kontrolltieren war kein Gewichtsverlust zu verzeichnen. Nach zirka 10 Tagen konnte bei den WT-Mäusen eine allmähliche Gewichtszunahme bis nahe an das Ausgangsgewicht verzeichnet werden, da das Leptindepot in den Pumpen aufgebraucht war.

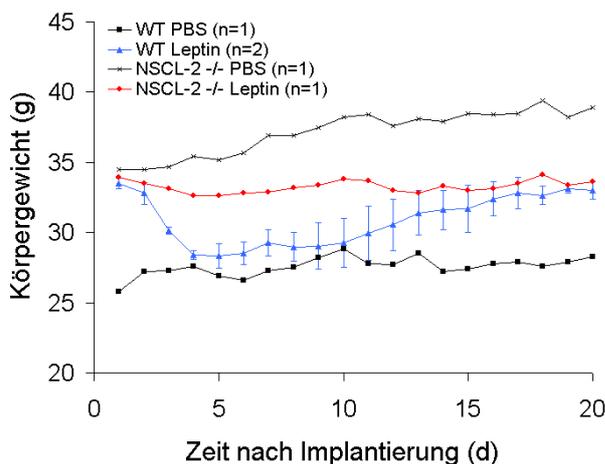


Abbildung 11 Periphere Behandlung mit Leptin
Nach subkutaner Implantierung osmotischer Minipumpen, die kontinuierlich Leptin freisetzen, kommt es zu einer Gewichtsreduktion in WT-Tieren, jedoch nicht in NSCL-2 Mutanten. Als Kontrolle dienten Tiere, denen PBS gefüllte Pumpen eingesetzt worden waren.

3.3.2 Generierung von NSCL-2 -/- x ob/ob Doppelmutanten

Um mögliche Veränderungen in der Leptin-Signalkaskade in NSCL-2 defizienten Tieren näher charakterisieren zu können, wurden heterozygote NSCL-2 Mutanten mit heterozygoten Tieren des Stammes C57BL/6J Lep^{ob} gekreuzt. Homozygote ob/ob Mäuse entwickeln aufgrund einer Punktmutation im *obese* Gen und des dadurch fehlenden „Sättigungssignals“ Leptin eine extreme Fettsucht und reagieren auf eine Leptingabe mit starkem Gewichtsverlust. Die Entstehung der Leptinresistenz adulter NSCL-2 Mutanten wird durch die Kreuzung mit ob/ob Mäusen verhindert und ermöglicht die Analyse des Leptin-Signalweges nach peripherer Leptingabe in NSCL-2 defizienten Tieren.

3. Ergebnisse

In Abbildung 12 ist die Gewichtskurve von ob/ob Mäusen und Doppelmutanten im Zeitraum von 5 bis 18 Wochen dargestellt. NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Tieren zeigten im Vergleich mit ob/ob Mäusen keine Unterschiede in der wachstumsbedingten Gewichtszunahme.

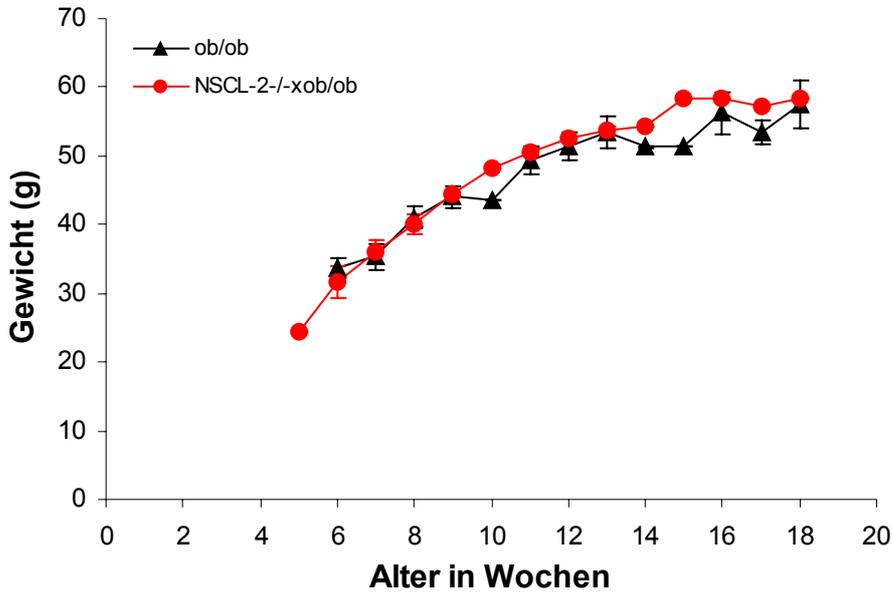


Abbildung 12 Gewichtskurve Die wöchentliche Messung des Gewichts von isoliert gehaltenen ob/ob Mäusen und NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Doppelmutanten ergab keine signifikanten Unterschiede. (n=1-8)

Auch das durchschnittliche Gewicht von Tieren im Alter von sechs bis acht Monaten ist gleich, wohingegen NSCL-2 Mutanten im Vergleich zu WT-Mäusen in diesem Alter 40 % schwerer sind (Abbildung 13).

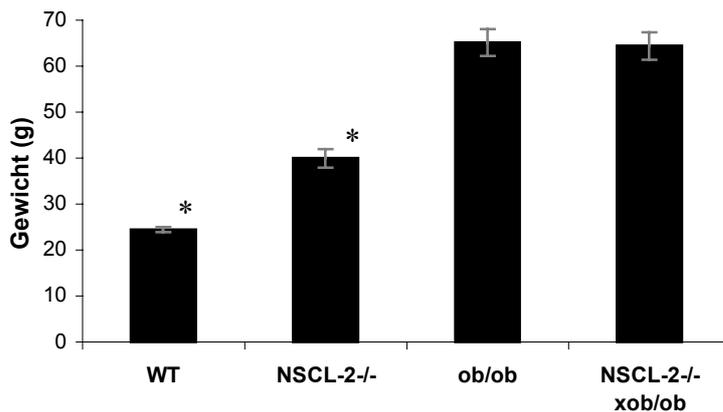


Abbildung 13 Körpergewicht von NSCL-2 Mutanten und NSCL-2-/- x ob/ob Doppelmutanten im Vergleich zu WT und ob/ob Mäusen im Alter von 6-8 Monaten. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen WT und NSCL-2 $-/-$ Mäusen. Leptindefiziente Tiere und Doppelmutanten zeigen keine Gewichtsunterschiede. (ANOVA $F=53,33$; $p<10^{-4}$)

3.3.3 Leptinbehandlung von Doppelmutanten

Sechs Monate alten weiblichen Doppelmutanten und ob/ob Tieren wurde durch den Einsatz osmotischer Minipumpen rekombinantes Leptin in einer Konzentration von 400 ng/g/Tag über 10 Tage verabreicht. Als Kontrollen dienten Tiere, denen PBS gefüllte Pumpen implantiert worden waren. Über einen Zeitraum von 19 Tagen wurde täglich das Körpergewicht und der Futterverbrauch der Tiere gemessen.

Die leptindefiziente Maus hatte am Tag 11 nach Beginn der Behandlung 30 % ihres Ausgangsgewichts verloren. Die gleiche Dosis Leptin führte bei der Doppelmutante zu einem geringeren Gewichtsverlust von 22% (Abbildung 14 A). Die Gewichtsänderungen resultierten aus der Reduktion der aufgenommenen Nahrung, wie in (Abbildung 14 B) zu sehen ist. Die Kontrolltiere zeigten keine signifikanten Veränderungen des Futterverhaltens oder des Gewichts.

In einem nachfolgenden Experiment wurden Mäuse des selben Genotyps und Alters mit geringeren Leptinkonzentrationen behandelt, um zu testen, ob sich die geringere Sensitivität für peripher verabreichtes Leptin in NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Mäusen bestätigt oder ob die Tiere bei geringen Leptindosen keine Gewichtsreduktion zeigen. Jeweils einem leptindefizienten Tier und einer Doppelmutante wurde Leptin in einer Dosis von 100, 50 oder 20 ng/g/d mittels osmotischen Minipumpen verabreicht. Gewichtsänderung und Futterverbrauch wurden täglich gemessen. Die maximalen Gewichtsänderungen sind in Abbildung 15 dargestellt. Das Diagramm beinhaltet auch den maximalen Gewichtsverlust bei einer Dosis von 400 ng/g/d. Die NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Tiere verloren unabhängig von der Leptinmenge weniger Gewicht als ob/ob Mäuse desselben Alters, Geschlecht und Körpergewichts. Die Werte sind in Tabelle 1 aufgelistet. Da für die verschiedenen Leptinmengen jeweils nur eine ob/ob Maus und eine NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Doppelmutante behandelt wurde, müssen zukünftige Wiederholungen des Experimentes diese Beobachtungen bestätigen.

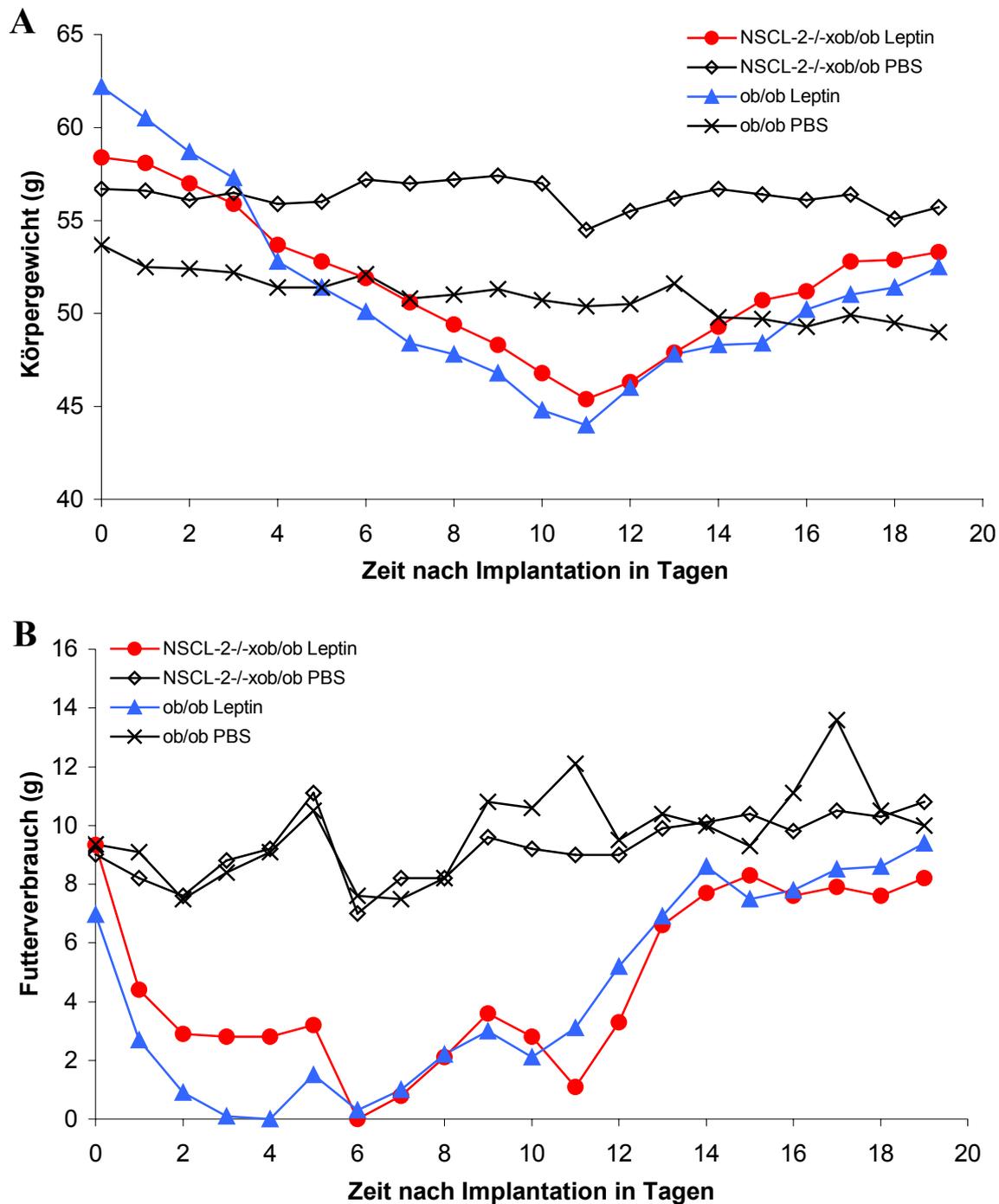


Abbildung 14 Gewichtsänderung und Futterverbrauch während der Behandlung mit Leptin. Sechs Monate alten weiblichen Doppel- und ob/ob Mutanten wurde entweder 400ng/g/d rekombinates Leptin oder PBS kontinuierlich über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht. (A) Gewichtsänderung. Mit PBS behandelte Tiere nahmen nicht ab. Bei den mit Leptin behandelten Tieren war der maximale Gewichtsverlust am Tag 11 nach der Pumpenimplantation zu verzeichnen. Nach Ende der Leptinfreisetzung durch die Pumpe nahmen die Tiere wieder an Körpergewicht zu. (B) Futterverbrauch. Die Kontrolltiere zeigten keine Änderungen im täglichen Futterverbrauch, wohingegen die mit Leptin behandelten Tiere zu Beginn der Behandlung signifikant weniger Nahrung zu sich nahmen. Nach Ende der Leptinfreisetzung stieg die täglich aufgenommene Futtermenge wieder an.

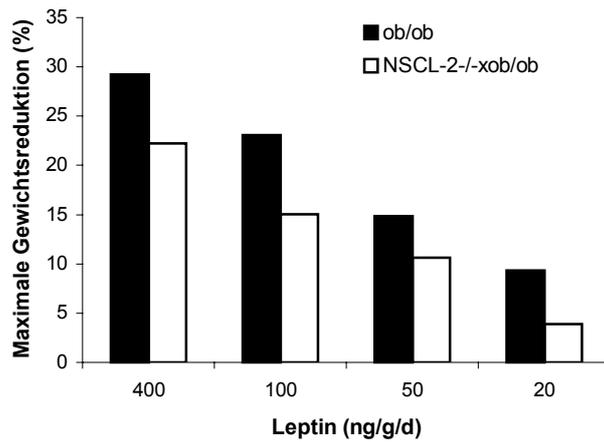


Abbildung 15 NSCL-2 -/- x ob/ob Mutanten verlieren bei peripherer Behandlung mit Leptin weniger Gewicht. Die Tiere wurden einer täglichen Dosis von 400, 100, 50 oder 20 ng Leptin pro Gramm Körpergewicht über ca. 10 Tage ausgesetzt. Im Vergleich zu ob/ob Mäusen mit gleichem Alter, Geschlecht und Gewicht zeigen Doppelmutanten eine geringere Gewichtsreduktion.

Tabelle 1 Maximale Gewichtsverluste bei Doppelmutanten und ob/ob Mäusen nach Behandlung mit Leptin

Genotyp	Leptinkonz. (ng/g/d)	Ausgangsgewicht (g)	Max. Gewichtsverlust (%)
ob/ob	400	62,2	29,3
NSCL-2 -/- x ob/ob	400	58,4	22,3
ob/ob	100	62,4	21,4
NSCL-2 -/- x ob/ob	100	62,3	12,0
ob/ob	50	65,9	14,0
NSCL-2 -/- x ob/ob	50	63,2	9,1
ob/ob	20	66,2	7,4
NSCL-2 -/- x ob/ob	20	64,6	1,2

3.3.4 Die Anzahl POMC positiver Zellen ist nicht verändert

Das Pro-opiomelanocortin (POMC) Gen codiert für ein Prohormon, aus dem durch posttranslationale Prozessierung unter anderem die Peptide β -Endorphin, β -Lipoprotein und das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) entstehen. Aus ACTH spaltet sich wiederum das bei der Regulation der Futteraufnahme wichtige α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) ab. POMC ist im Nucleus Arcuatus (Arc) des Hypothalamus sowie in vorderen und intermediären Lappen der Hypophyse exprimiert. POMC „knockout“ Mäuse sind adipös, was die Rolle von POMC in gewichtsregulatorischen Prozessen bestätigte (Yaswen et al., 1999). Durch Kreuzung von NSCL-2 heterozygoten Tieren mit Mäusen, die EGFP („enhanced green fluorescent protein“) unter der Kontrolle des POMC Promotors exprimieren, wurden NSCL-2 x POMC EGFP Mutanten generiert, um die POMC Expression und Anzahl POMC positiver Zellen im Nucleus Arcuatus von NSCL-2 defizienten Tieren zu untersuchen. Die

3. Ergebnisse

Antikörperanfärbung gegen EGFP und anschließendes Auszählen GFP positiver Zellen im ARC ergab keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität und der Anzahl fluoreszierender Zellen im Vergleich zu WT x POMC EGFP Tieren (Abbildung 16). Da die Expression des EGFP durch den POMC Promotor kontrolliert wird, kann man auf eine unveränderte Zahl POMC exprimierender Zellen in NSCL-2 Mutanten schließen.

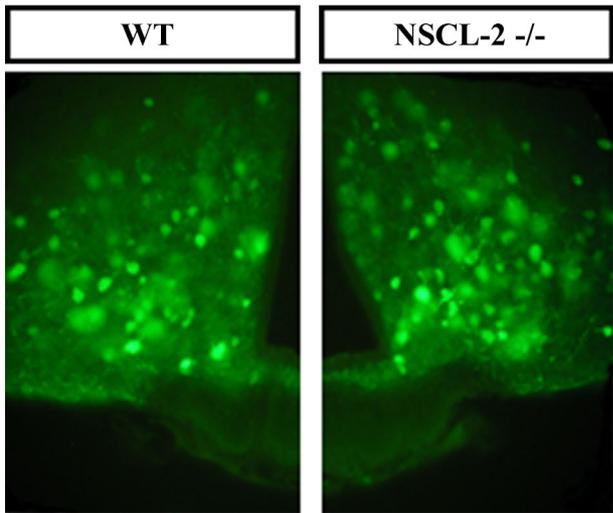
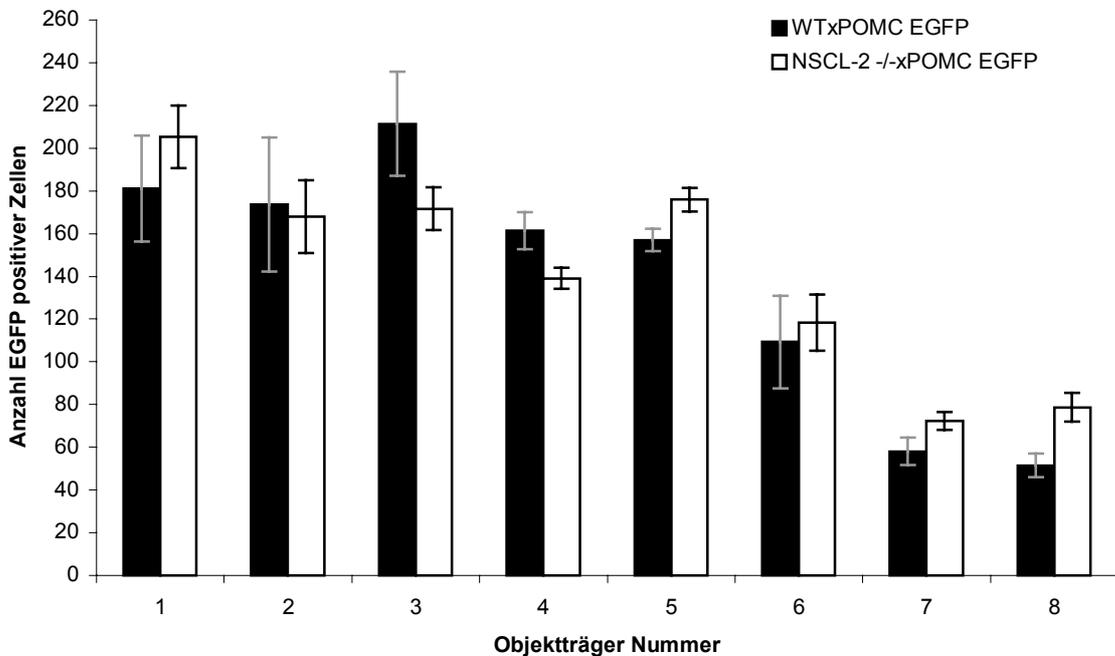


Abbildung 16 Die Anzahl POMC positiver Zellen ist NSCL-2 Mutanten nicht verändert. Links: 50 µm dicke frontale Schnitte des Hypothalamus in Höhe des Nucleus Arcuatus einer WT-Kontrolle und NSCL-2 x POMC EGFP Mutante. Die grüne Fluoreszenz kennzeichnet EGFP positive Zellen.

Unten: Jeweils drei Schnitte (50 µm) wurden auf einem Objektträger platziert und die fluoreszierenden Zellen ausgezählt. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl EGFP positiver Zellen detektiert werden ($n_{WT} = 3361$; $n_{Mut} = 3388$).



3.3.5 NSCL-2 -/- Mäuse reagieren auf die Stimulation des MC4 Rezeptors mit Gewichtsverlust

Innerhalb des Leptin-Melanocortin-Signalweges bindet das α -Melanocyte-stimulierende Hormon (α -MSH) an seinen Rezeptor, den Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R). Die Aktivierung des Rezeptors reduziert die Körperfett-Reserven durch eine verringerte Futterraufnahme und einen erhöhten Energieumsatz. Mutationen innerhalb des MC4R Gens führen sowohl bei der Maus als auch beim Menschen zu Übergewicht (Balthasar et al., 2005; Farooqi et al., 2003).

Um die Funktionalität des MC4R in NSCL-2 defizienten Mäusen zu untersuchen, wurde den Tieren ein Analogon des MC4R Liganden α -MSH intraperitoneal gespritzt bzw. in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/g/d}$ über osmotische Minipumpen verabreicht. Als Analogon kam Acetyl-[Cys4, D-Phe7,Cys10]-Alpha MSH (4-13)-NH₂ zum Einsatz. Über die Pumpen waren die Mäuse dem Wirkstoff dauerhaft ausgesetzt, da die Pumpen 1 μl Flüssigkeit pro h freisetzen. Weiteren NSCL-2 -/- und WT-Mäusen wurde die Dosis von 1 μg täglich ca. zwei H vor Beginn der Dunkelphase gespritzt.

Abbildung 17 zeigt die relativen Gewichtsänderungen durch die Behandlung mit dem MC4-R Liganden. Durch das tägliche Spritzen der Tiere zeigte sich eine leichte Gewichtsreduktion bei NSCL-2 defizienten Tieren mit dem Minimum an den Tagen 6-9 nach Beginn der Therapie. Die Kontrolltiere zeigten im Durchschnitt eine geringere Gewichtsänderung, wobei aber bei Betrachtung der Einzeltiere vergleichbare Reduktionen gemessen wurden, was in den großen Standardfehlern deutlich wird. NSCL-2 Mutanten, denen der Wirkstoff kontinuierlich über osmotische Pumpen zugeführt wurde, verloren durchschnittlich mehr Gewicht als die WT-Kontrollen. So hatten die NSCL-2 Mutanten am Tag 11 nach Implantation signifikant an Körpergewicht verloren (5,25% Gewichtsreduktion). Nach Ende der Wirkstofffreisetzung nahmen die Tiere wieder an Gewicht zu, verblieben jedoch von Tag 16 an bis zum Ende der Gewichtsdocumentation auf demselben Gewichtsniveau.

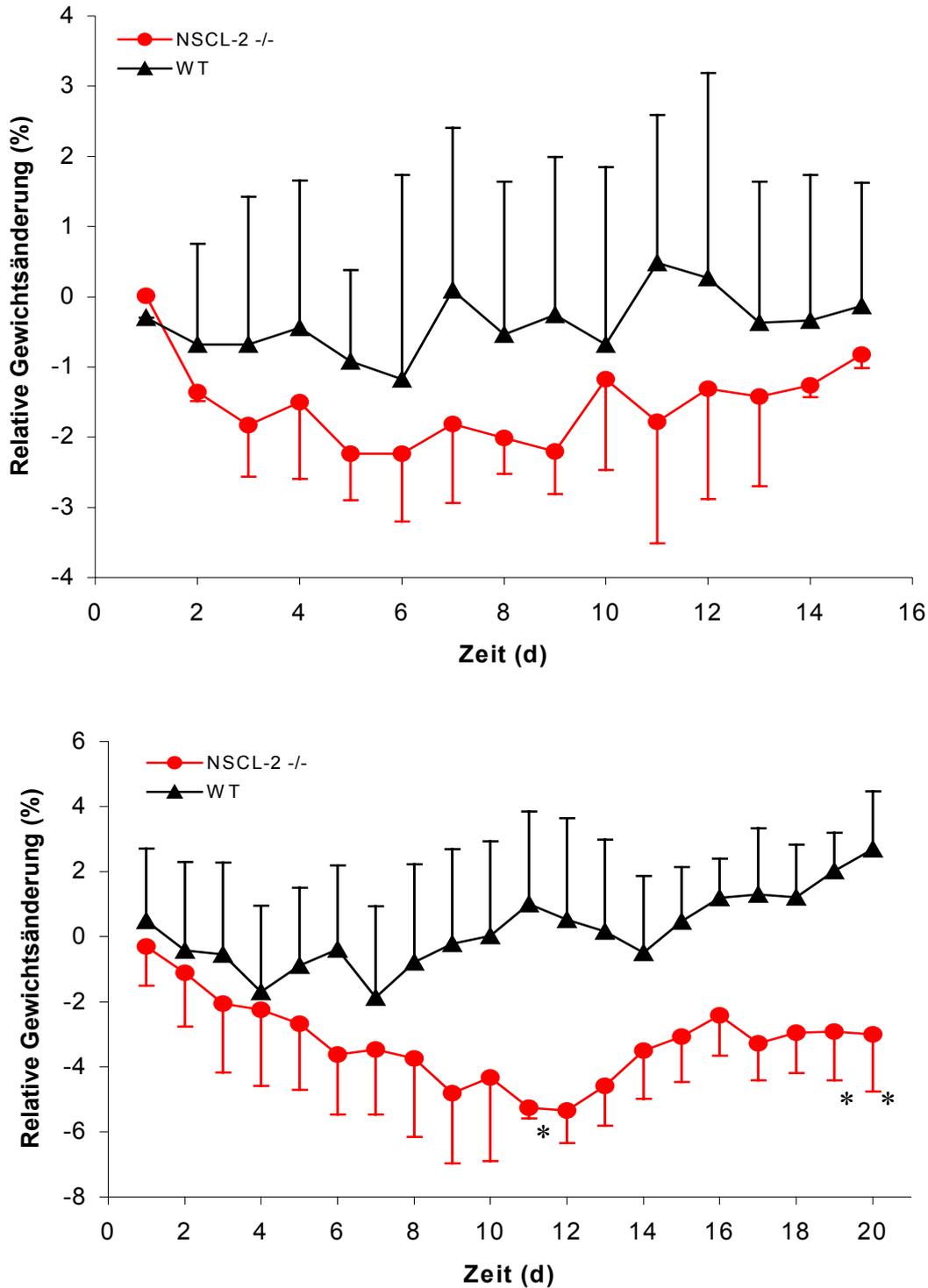


Abbildung 17 Relative Gewichtsänderung von NSCL-2 Mutanten und WT-Tieren durch die Behandlung mit einem α -MSH Analogon. Die relativen Gewichtsänderungen beziehen sich auf das Gewicht der jeweiligen Tiere (n=3) zu Beginn des Experiments und sind in Prozent angegeben. Oben: Es wurden über 15 Tage täglich 1 μ g des Wirkstoffs intraperitoneal gespritzt. Unten: Den Tieren wurden osmotische Minipumpen implantiert, die den Wirkstoff über 10 Tage in einer Konzentration von 0,2 μ g/g/d freisetzen. Die mit einem Stern gekennzeichneten Datenpunkte verweisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$).

3.4 Die NSCL-2 Nullmutation führt zu einer veränderten Fettgewebsstruktur

3.4.1 NSCL-2 Mutanten weisen eine erhöhte Anzahl von Präadipozyten im weißen Fettgewebe auf

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Blüher von der Universität Leipzig wurde eine Fettgewebscharakterisierung an NSCL-2 Mutanten und NSCL-2 x ob/ob Doppelmutanten durchgeführt. Als Kontrollen dienten Wildtyp Tiere und leptindefiziente ob/ob Mäuse. Alle untersuchten Tiere waren männlich und im Alter von sechs Monaten. Den getöteten Tieren wurden Proben vom epigonadalem Fettgewebe entnommen. Ultradünnschnitte vom Fettgewebe wurden nach Richardson gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Fettstrukturanalyse zusammengefasst. NSCL-2 Mutanten und Doppelmutanten wiesen eine 7-fach erhöhte Anzahl von Präadipozyten im WAT auf. Außerdem zeigten NSCL-2 defiziente Tiere eine starke Heterogenität der Zellen im Fettgewebe. Es wurde eine bimodale Verteilung der Fettzellen festgestellt. Es fand sich eine Gruppe von sehr großen Adipozyten mit einem Durchmesser > 100 µm und eine Gruppe kleinerer Adipozyten mit einem Durchmesser < 50 µm (Abbildung 18B).

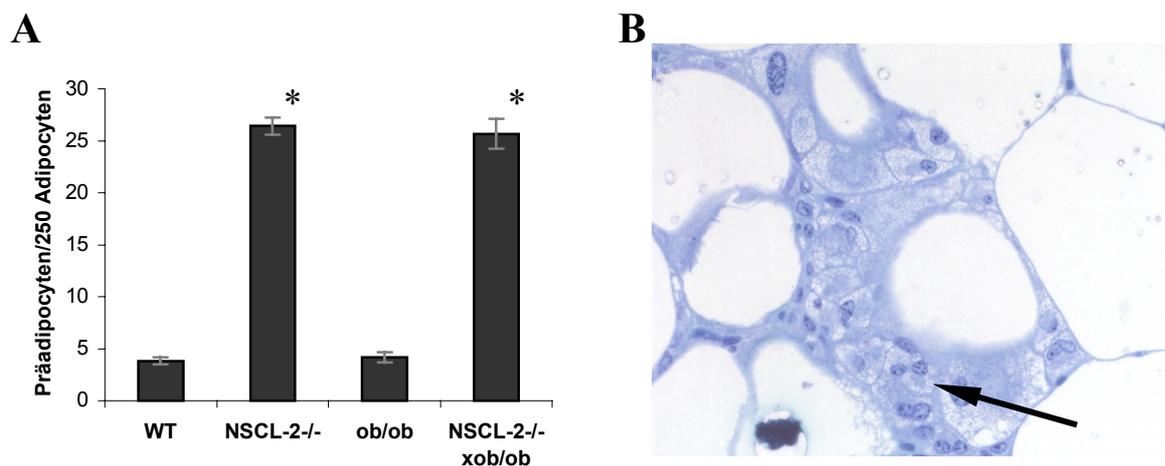


Abbildung 18 NSCL-2 Defizienz führt zu einer erhöhten Anzahl von Präadipozyten in epigonadalem Fettgewebe. Es wurden Proben von je vier männlichen, sechs Monaten alten Männchen entnommen und histologisch ausgewertet. (A) In repräsentativen Ausschnitten, die 250 Adipozyten umfassen, wurde eine 7-fach erhöhte Anzahl an Vorläuferzellen ermittelt ($F=250.71$; $p<10^{-4}$). (B) Histologie vom epigonadalen Fettgewebe eines NSCL-2^{-/-}xob/ob Tieres. Der Pfeil deutet auf eine Ansammlung von Präadipozyten zwischen reifen Adipozyten.

3. Ergebnisse

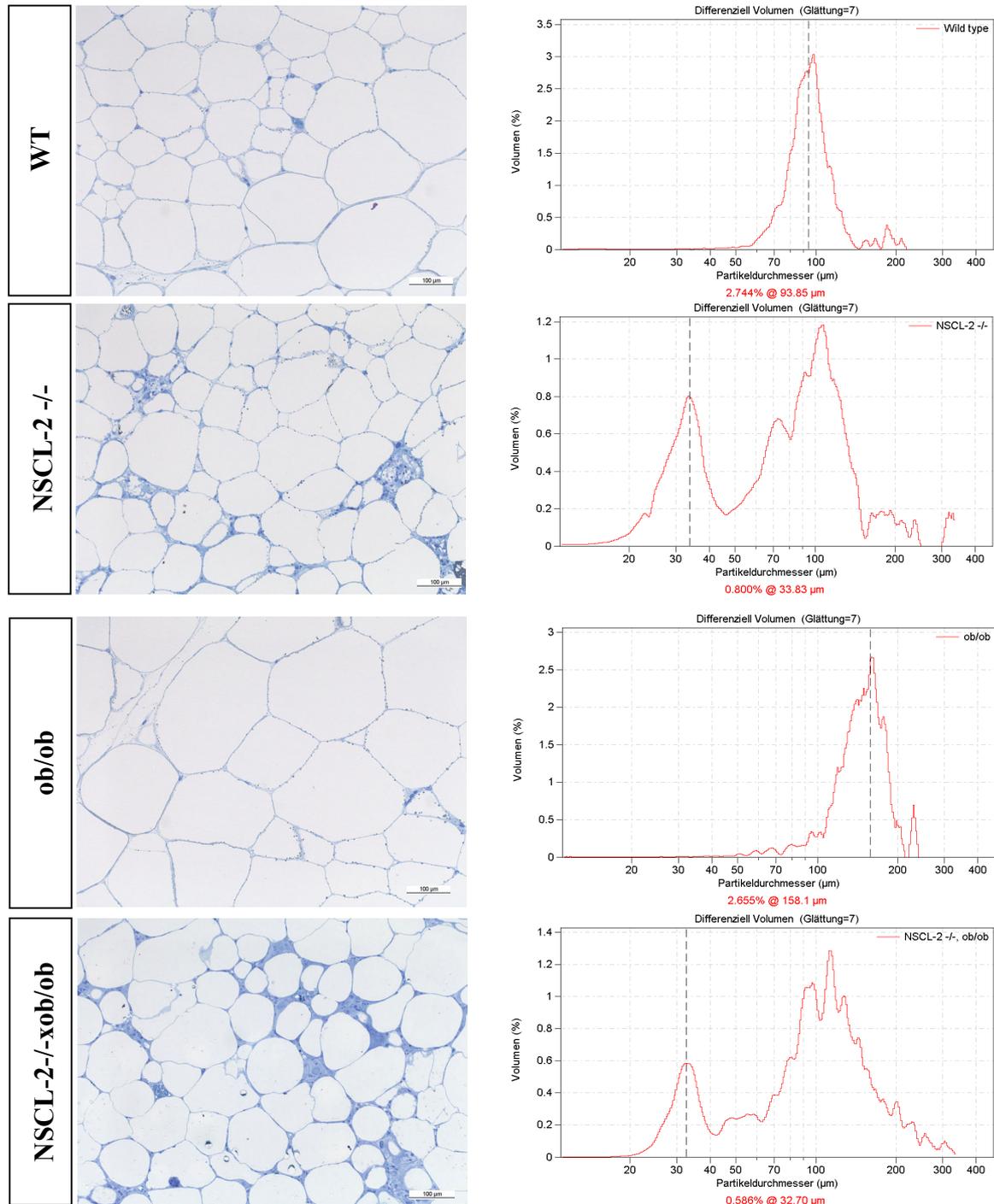


Abbildung 19 Morphologie vom weißem Fettgewebe und Histogramme zur Darstellung von Adipozytengröße und Adipozytenverteilung. Von vier männlichen, sechs Monate alten Männchen jedes Genotyps wurden Proben von epigonadalem Fettgewebe entnommen und histologisch ausgewertet. (C) Ultradünnschnitte (Färbung nach Richardson) von WAT der vier Genotyp-Gruppen mit den dazugehörigen Histogrammen der Zellgrößenverteilungen. NSCL-2 Mutanten und Doppelmutanten zeigen eine starke Heterogenität im Fettgewebe mit sehr großen Adipozyten (> 100 µm) und kleinen Adipozyten (< 50 µm).

3.4.2 Charakterisierung isolierter Adipozyten

In der Arbeitsgruppe von Prof. Blüher aus Leipzig wurden Adipozyten aus epigonadalem Fettgewebe von NSCL-2 Mutanten, NSCL-2 x ob/ob Doppelmutanten und Kontrolltieren (WT, ob/ob) isoliert und zur Messung der basalen Glukoseaufnahme mit 5 mM radioaktiver U-[¹⁴C]Glukose versetzt (basale Werte, Abbildung 20 A). Zur Untersuchung der Insulinsensitivität der Adipozyten wurde einem Teil der isolierten Zellen 30 min vor Glukosezugabe 80 nM Insulin zugesetzt und nach Fixierung die Radioaktivität der aufgenommenen U-[¹⁴C]-Glukose gemessen (insulinstimulierte Werte, Abbildung 20A). Die basale Glukoseaufnahme war in den Adipozyten der drei Mutantengruppen im Vergleich zu den WT-Adipozyten erhöht ($F = 28,17$; $p < 10^{-4}$). Die Glukoseaufnahme nach Stimulation mit Insulin war in allen Gruppen signifikant höher als die basale Aufnahme ($p < 0,005$), jedoch zeigten sich in Vergleich zur WT-Situation, dass NSCL-2 -/-, ob/ob, und NSCL-2 -/- x ob/ob Adipozyten nach Insulinzugabe weniger Glukose aufgenommen hatten ($F = 24,22$; $p < 10^{-4}$). NSCL-2 defiziente Adipozyten und ob/ob Zellen reagierten besonders wenig auf Insulin, wohingegen die insulinstimulierte Glukoseaufnahme von Doppelmutanten Adipozyten nur leicht unter den WT-Werten lag. Dieser Trend zeigte sich auch bei der Analyse der Lipogenese. Der Glukose-Metabolismus in die drei Endprodukte Triglyceride, CO₂ und Laktat wurde wie bei den Glukosetransport-Messungen auf basalem und insulinstimuliertem Niveau erfasst (Abbildung 20 B-D). In allen drei Analysen waren die insulinstimulierten Werte signifikant höher als der basale Glukoseeinbau. Der basale Einbau radioaktiver Glukose in Triglyceride und Laktat war im Falle der WT-Adipozyten signifikant geringer als in den drei Mutanten Gruppen. NSCL-2 -/- und ob/ob Adipozyten zeigten wie schon im Glukosetransport eine Insulinresistenz, da der insulinstimulierte Glukoseeinbau stets deutlich unter WT-Niveau lag. Die isolierten Adipozyten der Doppelmutanten hingegen wiesen deutlich höhere insulinstimulierte Werte auf. Die relativen Unterschiede zwischen basalen und insulinstimulierten Werten sind in Tabelle 2 aufgelistet.

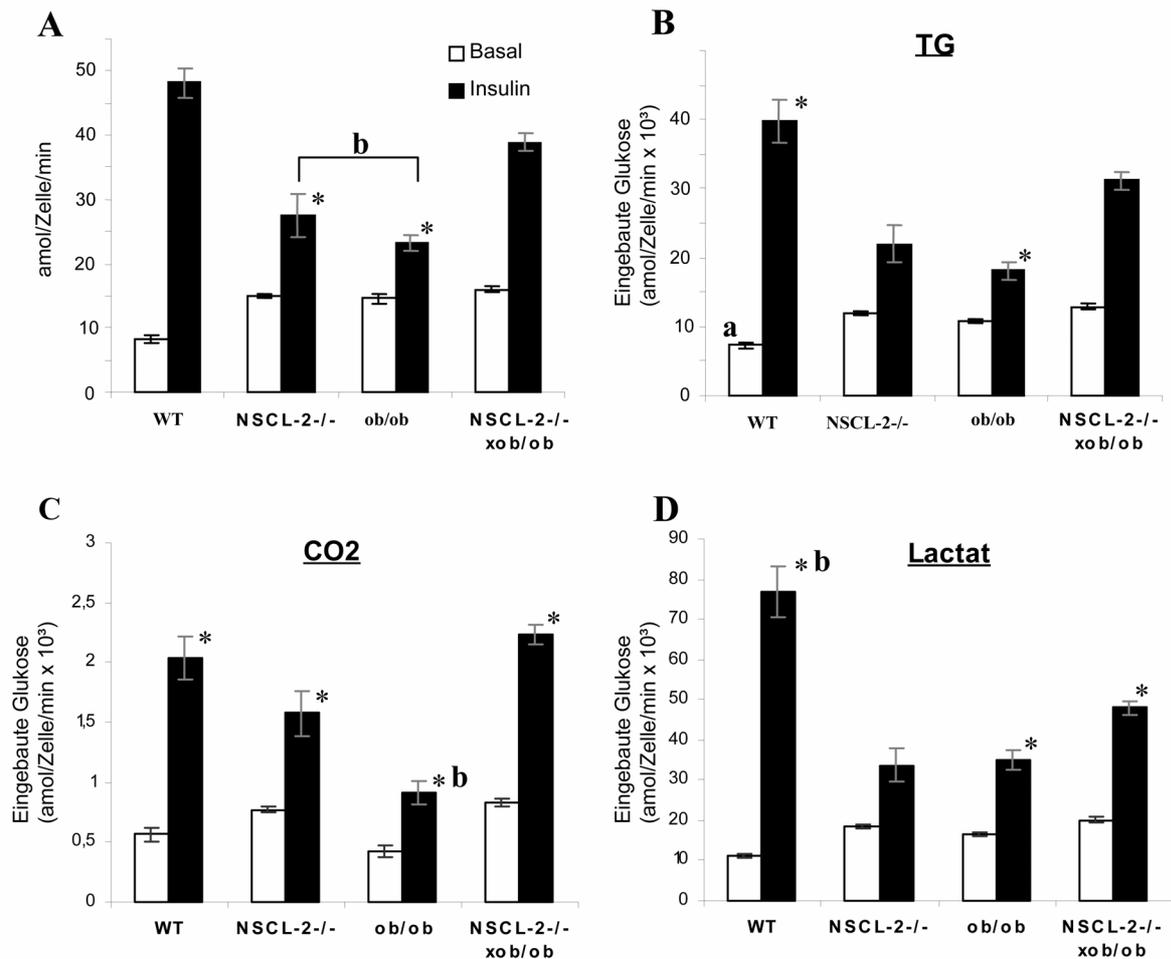


Abbildung 20 Glukoseaufnahme und Glukose Metabolismus isolierter Adipozyten. (A) Basale und insulinstimulierte U-[¹⁴C]Glukoseaufnahme in isolierten Adipozyten von sechs Monate alten WT, NSCL-2^{-/-}, ob/ob (n=4) und NSCL-2^{-/-} x ob/ob Tieren (n=3). Die insulinstimulierte Glukoseaufnahme ist im Vergleich zu den basalen Werten in allen Gruppen signifikant höher (p<0,005). a: signifikanter Unterschied zwischen WT basal und basal Level aller anderen Gruppen, b: signifikanter Unterschied zwischen insulinstimulierter Glukoseaufnahme von NSCL-2^{-/-} und ob/ob Adipozyten in Vergleich zu NSCL-2^{-/-} x ob/ob Adipozyten. (B-D) Lipogenese Assay. Glukose Metabolismus in Triglyzeride (B), CO₂ (C) und Laktat (D). Die basalen Messungen wurden unter 5 mM Glukose gemessen, die stimulierten nach Zugabe von 80 nM Insulin. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen basalen und insulinstimulierten Werten in allen Gruppen (p<0,005). a: signifikanter Unterschied zwischen WT basal und basalen Werten aller anderen, b: signifikanter Unterschied zwischen insulinstimuliert und insulinstimuliert aller anderen Genotypen.

Tabelle 2 Relative Änderung (des Mittelwertes) zwischen basaler und insulinstimulierter Glukoseaufnahme bzw. Glukoseeinbau.

Messung	WT	NSCL-2 ^{-/-}	ob/ob	NSCL-2 ^{-/-} xob/ob
	insulinst./basal	insulinst./basal	insulinst./basal	insulinst./basal
Glukosetransport	5,85	1,87	1,60	2,43
Lipogenese TG	5,47	1,83	1,67	2,43
Lipogenese CO₂	3,60	2,04	2,20	2,70
Lipogenese Laktat	6,85	1,81	2,10	2,40

3. Ergebnisse

In den isolierten Adipozyten wurde desweiteren die Lipolyse durch Isoproterenol stimuliert (Abbildung 21). Gemessen wurde der Glycerolgehalt in isolierten Adipozyten bei basaler Lipolyse, maximaler Lipolyse durch Isoproterenol und bei durch Insulin inhibierter Lipolyse durch Zugabe von 100 nM Insulin 15 min vor Zugabe des Isoproterenol. Zwischen den drei gemessenen Parametern zeigten sich bei allen Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 10^{-4}$). Bei den WT-Adipozyten konnte die Zugabe von Insulin die maximale Lipolyse um mehr als die Hälfte reduzieren, was die Insulinsensitivität der Zellen verdeutlicht. Bei den insulinresistenten Adipozyten von NSCL-2 Mutanten und ob/ob Mäusen wurde diese starke Reduktion der Glycerolfreisetzung nicht erreicht. Die Adipozyten der Doppelmutanten reagierten wiederum sensitiver auf Insulin als die der Einzelmutanten und das gemessene Glycerol war im Vergleich zur maximalen Lipolyse um den Faktor 1,54 reduziert.

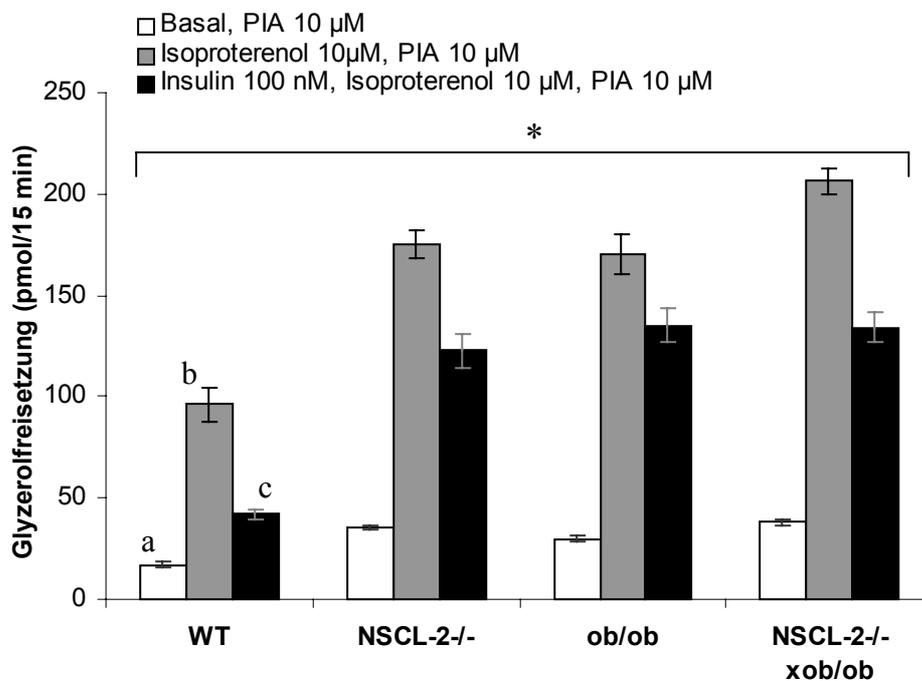


Abbildung 21 Lipolyse in isolierten Adipozyten. Für die Analyse der Lipolyse wurden isolierte Adipozyten (100 μ l einer 10 %-igen Fettzell-Suspension) erstens mit Adenosin Deaminase und 10 μ M PIA (N6-[R-(-)-1-methyl-2-phenyl]adenosine) für die basale Messung inkubiert, zweitens mit 100 μ M Isoproterenol für die maximale Lipolyse und drittens mit 100 nM Insulin 15 min vor Zugabe von Isoproterenol für die insulininhibierte Lipolyse inkubiert. Der Glycerolgehalt des Inkubationsmediums wurde nach 15 min gemessen. Der Stern kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen basaler, maximaler und insulininhibierter Glycerolfreisetzung in allen Gruppen ($p < 10^{-4}$). a: Signifikanter Unterschied zwischen WT basal und basal aller anderen; b: Signifikanter Unterschied zwischen WT maximaler Freisetzung und maximaler Freisetzung aller anderen; c: Signifikanter Unterschied zwischen WT insulininhibierter Freisetzung und insulininhibierter Freisetzung aller anderen Gruppen.

3.4.3 *In vitro* Differenzierung isolierter Adipozyten

Zu Klärung der Frage, ob die hohe Anzahl an Präadipozyten in NSCL-2 defizienten Tieren durch ein intrazellulär verursachtes reduziertes Differenzierungspotential verursacht ist, wurden Präadipozyten aus dem epigonadalen Fettgewebe von je vier NSCL-2 Mutanten und WT-Tieren isoliert und vereinigt, kultiviert und durch Inkubation mit 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und Dexamethason zur Differenzierung zu Adipozyten angeregt. Um sicherzustellen, dass die Präparation der Zellen von WT und NSCL-2 $-/-$ Mäusen vergleichbar war und die selben Ausgangsbedingungen für die Differenzierung gegeben sind, wurden über Nacht kultivierte Präadipozyten mittels FACS charakterisiert (Abbildung 22). Die beiden Populationen wiesen keine Unterschiede in Zellgröße und Granularität auf. Fünf Tage nach Induktion wurden die Zellen fixiert und lipidhaltige Zellen mittels Öl-Rot-O Färbung angefärbt. Die Auszählung ergab keine Unterschiede im *in vitro* Differenzierungspotential zwischen WT und NSCL-2 defizienten Präadipozyten. (Abbildung 23).

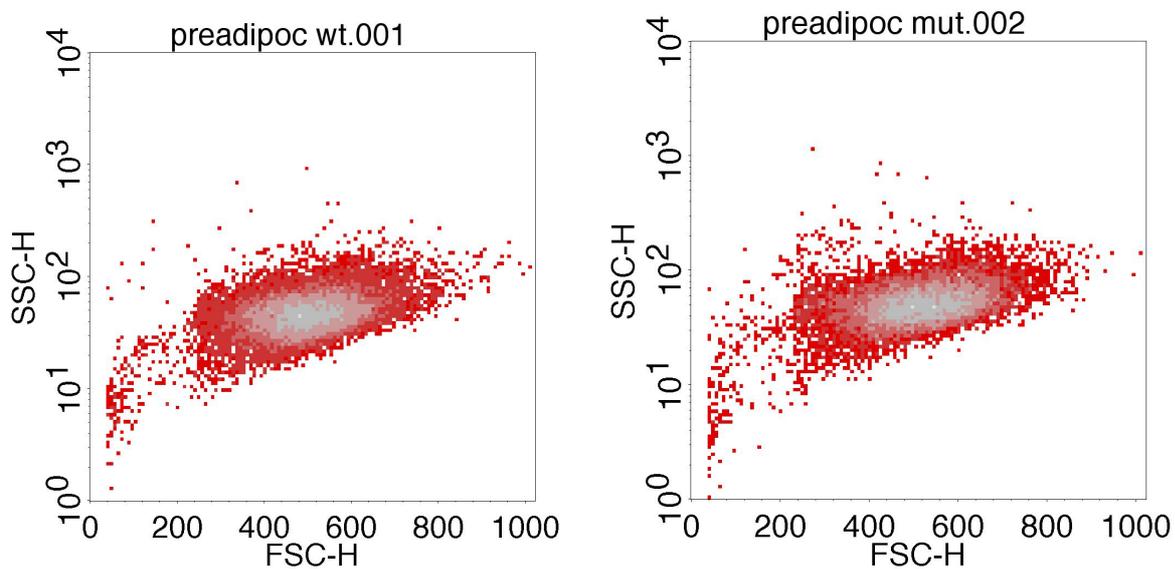


Abbildung 22 Charakterisierung isolierter Präadipozyten mittels Durchflußzytometrie.

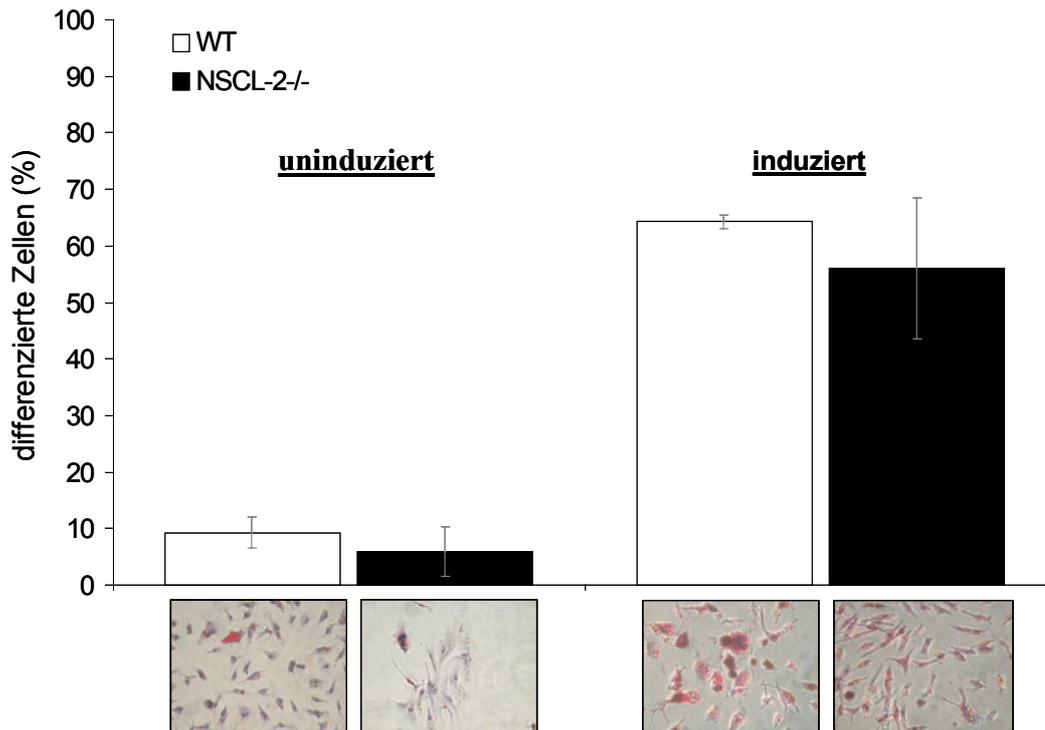


Abbildung 23 Isolierte NSCL-2^{-/-} Präadipozyten zeigen das gleiche Differenzierungspotential wie WT-Präadipozyten. Fünf Tage nach Induktion wurden differenzierte, lipidhaltige Zellen ausgezählt. Als Negativkontrolle wurden uninduzierte Präadipozyten angefärbt.

3.4.4 Expressionsanalyse von Fettzell-Differenzierungsfaktoren

Aus epigonadalem Fettgewebe von NSCL-2 Mutanten, Doppelmutanten, ob/ob Mäusen und WT-Tieren wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um durch anschließende „Real time PCR“ mögliche Veränderungen in der Expressionsstärke spezifischer Faktoren, die für die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen nötig sind, zu messen. Die Expressionsanalyse beschränkte sich auf die Messung der relativen mRNA Expressionslevel von C/EBP α , C/EBP δ , PPAR γ , und SREBP1, sowie auf die der Adipozytokine Adipsin und Resistin (Tabelle 3). Das „CCAAT enhancer binding Protein δ “ (C/EBP δ) ist ein früher Differenzierungsmarker für Adipozyten und transaktiviert die Expression von C/EBP α . 85% der C/EBP δ defizienten Mäuse sterben innerhalb von 24 H nach der Geburt. NSCL-2 defiziente Tiere zeigten eine leicht reduzierte Expression von C/EBP δ .

C/EBP α spielt zusammen mit PPAR γ eine Schlüsselrolle während der Differenzierung von weißem Fettgewebe (Linhart et al., 2001; Wang et al., 1995; Wu et al., 1999). Transgene C/EBP α ^{-/-} Tieren fehlt jegliches subkutanes und viszerales weißes Fettgewebe (Wu et al.,

3. Ergebnisse

1999). Rosen et al. (1999) konnten zeigen, dass Fibroblasten und ES-Zellen von PPAR γ (Peroxisome-proliferator activated receptor) defizienten Tieren nicht zu Adipozyten differenzieren. Die Expression der beiden Gene C/EBP α und PPAR γ war in den Mutanten nicht wesentlich verändert. Lediglich im Falle der Doppelmutanten konnte eine schwache Reduktion der PPAR γ Expression verzeichnet werden.

Das „Sterol responsive element binding protein 1c“ (SREBP1c) hat einen positiven Einfluss auf die Adipogenese und stimuliert die Expression von Genen, die in der Lipogenese eine Rolle spielen. Die Expression dieses Gens war im epigonadalen Fettgewebe von NSCL-2 -/- Tieren leicht erhöht.

Tabelle 3 Relative Expressionslevel verschiedener Fett-Differenzierungsfaktoren und Adipozytokine, die im epigonadalen Fettgewebe exprimiert sind. Angegeben sind Mittelwerte ($n \geq 3$). Fett gedruckte Werte sind größer als 150% im Vergleich zum WT; kursiv gedruckte Werte kennzeichnen Expressionslevel, die kleiner als 50 % der WT-Level sind. Relative Expressionslevel = $(\text{GenX}^{\text{Mutante}}/36\text{B4}^{\text{Mutante}})/(\text{GenX}^{\text{WT}}/36\text{B4}^{\text{WT}})$.

	WT	NSCL-2 -/-	ob/ob	NSCL-2 -/- x ob/ob
PPAR γ	1 \pm 0,27	0,92 \pm 0,02	0,53 \pm 0,20	0,58 \pm 0,23
C/EBP α	1 \pm 0,20	0,93 \pm 0,09	0,56 \pm 0,19	0,52 \pm 0,21
C/EBP δ	1 \pm 0,27	0,36 \pm 0,01	0,55 \pm 0,13	0,42 \pm 0,13
SREBP-1	1 \pm 0,32	1,53 \pm 0,03	1,01 \pm 0,43	0,73 \pm 0,44
Adipsin	1 \pm 0,38	0,30 \pm 0,06	0,06 \pm 0,04	0,08 \pm 0,90
Resistin	1 \pm 0,38	0,66 \pm 0,11	0,33 \pm 0,14	0,28 \pm 0,27

Adipsin, ein Serin Protease Homolog, wird von Adipozyten sekretiert und ist in den durch Übergewicht charakterisierten Mausstämmen ob/ob und db/db stark in seiner Expression reduziert (Flier et al., 1987). Das Protein ist an der enzymatischen Produktion von ASP, eines Komplementproteins, dass Funktionen im Lipid- und Glukose-Metabolismus ausübt, beteiligt und hat somit Einfluss auf den Energiehaushalt (Cianflone et al., 2003). Die relativen Expressionslevel von Adipsin waren in NSCL-2 defizienten Mäusen wie die der ob/ob Tiere im Vergleich zu WT-Tieren stark reduziert.

Die Expression von Resistin war in allen drei Gruppen im Vergleich zu WT-Mäusen reduziert, wobei eine negative Korrelation zum Gewicht der Tiere beobachtet wurde. Resistin wird von weißen und braunen Fettgewebe produziert, eine Expression wurde aber auch in anderen Geweben wie z.B. dem Hypothalamus und der Hypophyse gefunden. Das Protein gilt als Antagonist von Insulin. Ukkola (2002) zeigte, dass Insulinresistenz und Übergewicht mit einer reduzierten Resistin Expression assoziiert sind.

3.4.5 Glukose- und Insulintoleranztest

Beim Glukosetoleranztest (GTT) wird die individuelle Fähigkeit eines Organismus getestet, nach Aufnahme einer bestimmten Menge Glukose die Blutglukosehomöostase aufrecht zu erhalten. Der Test setzt sich aus Messungen der Blutglukose zu bestimmten Zeiten nach der Glukoseaufnahme zusammen.

Für die Messungen wurden je vier weibliche WT und NSCL-2 $-/-$ Tieren im Alter von sechs Monaten ausgewählt. Die NSCL-2 Mutanten zeigten bereits deutliches Übergewicht und waren durchschnittlich 23% schwerer als die WT-Tiere (Gewicht_{WT}: $21,72 \pm 0,98$ g; Gewicht_{NSCL-2 $-/-$} : $28,03 \pm 0,94$ g). Die Tiere waren einer Futterkarenz von 16 H ausgesetzt und wurden nach Bestimmung des nüchternen Blutzuckerspiegels mit 2g Glukose/kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt. Die Messungen wurden nach 15, 30, 60 und 120 min durchgeführt. Die nüchternen Werte und auch die hohen Blutzuckerwerte 15 min nach Injektion waren in beiden Gruppen identisch. Die folgenden Werte waren in NSCL-2 defizienten Tieren erhöht, aber nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten der WT-Kontrollen. Nach 120 min hatten beide Gruppen den nüchtern gemessenen Ausgangswert wieder erreicht (Abbildung 24A).

Der Insulintoleranztest ist ähnlich dem Glukosetoleranztest. Denselben Tieren wurde zwei Wochen später ohne vorherige Futterkarenz 1Unit Insulin/kg Körpergewicht intraperitoneal gespritzt, nachdem der Blutglukose Ausgangswert ermittelt wurde. Die Messungen der Blutzuckerwerte erfolgten nach 15, 30 und 60 min. Im Vergleich zu den deutlich abgesunkenen Blutzuckerspiegeln der WT-Tiere nach der Insulin-Injektion lagen die Werte der NSCL-2 Mutanten bei allen Messungen signifikant höher (Abbildung 24B).

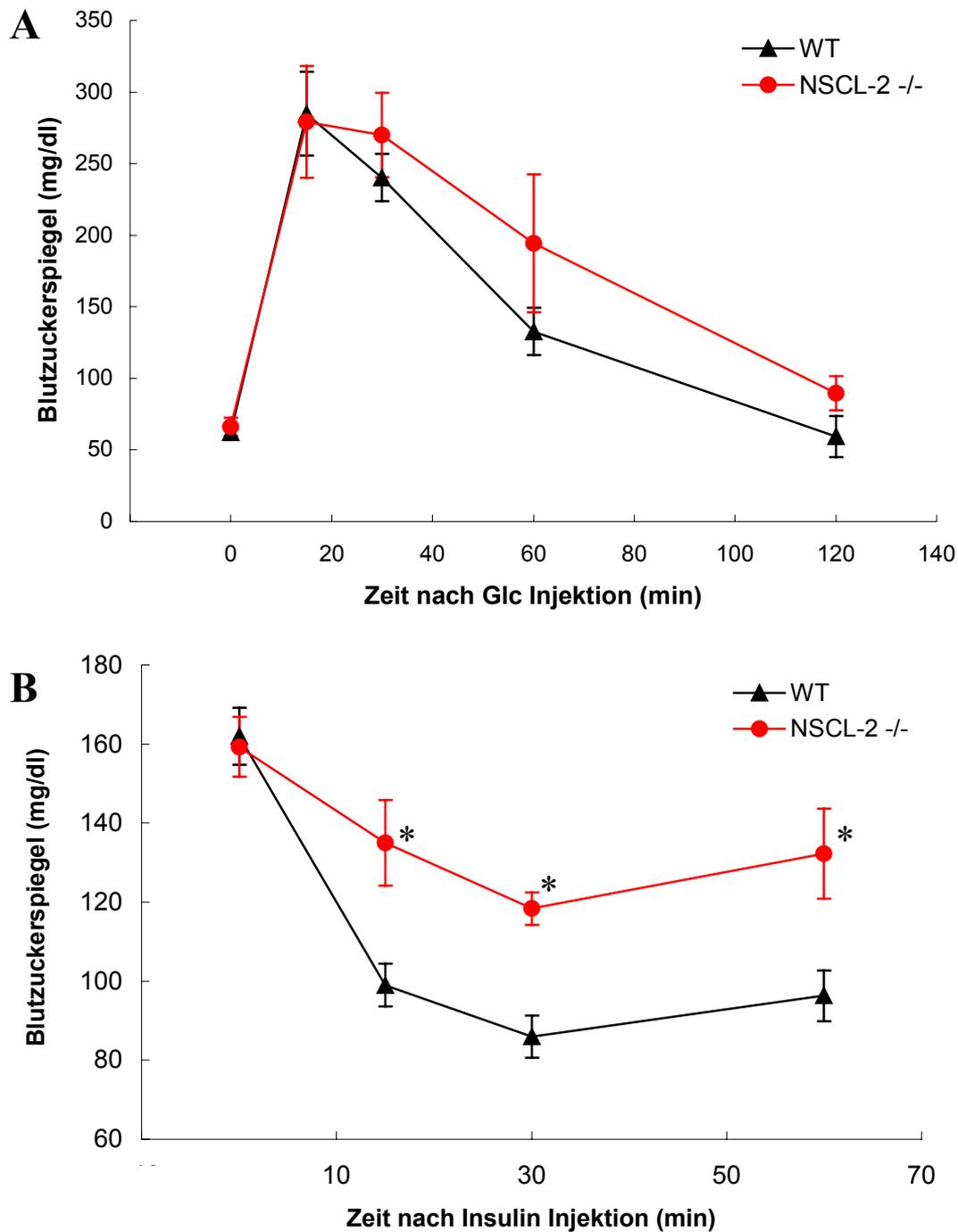


Abbildung 24 NSCL-2 Mutanten zeigen eine normale Glukosetoleranz aber eine verminderte Reaktion auf Insulin. Die Messungen wurden an je vier weiblichen WT und NSCL-2 $-/-$ Mäusen im Alter von sechs Monaten durchgeführt. (A) Glukosetoleranztest. Nach intraperitonealer Glukose-Injektion wurde zu bestimmten Zeiten die Blutglukose gemessen. (B) Insulintoleranztest. Die durchschnittlichen Blutglukose Werte nach Injektion von Insulin sind signifikant höher als die der WT-Tiere ($p < 0,05$).

3.4.6 Insulinspiegel NSCL-2 defizienter Mäuse

Abbildung 25 zeigt die durchschnittlichen Serum-Insulinwerte adulter NSCL-2 Mutanten, Doppelmutanten sowie WT und ob/ob Kontrolltiere im Alter zwischen sechs und 12 Monaten ($n_{WT} = 8$; $n_{NSCL-2^{-/-}} = 3$; $n_{ob/ob} = 12$; $n_{NSCL-2^{-/-} \times ob/ob} = 3$). Die Proben wurden immer zum selben Zeitpunkt vormittags zwischen 10:00 und 12:00 Uhr entnommen, um tageszeitabhängige Schwankungen auszuschließen. Der durchschnittliche Insulinspiegel von NSCL-2 $^{-/-}$ Mutanten war gegenüber dem der WT-Tiere nur gering erhöht, obgleich sie durchschnittlich 22 % schwerer waren, und lag signifikant unter den Werten der hyperinsulinämischen ob/ob Tiere ($F = 5,98$; $p < 10^{-4}$). Die Doppelmutanten hatten durchschnittlich deutlich geringere Serum-Insulinspiegel als die leptindefizienten ob/ob Mäuse, obwohl die Vertreter dieser beiden Genotypen sich im Körpergewicht nicht unterscheiden und eine extreme Adipositas entwickeln.

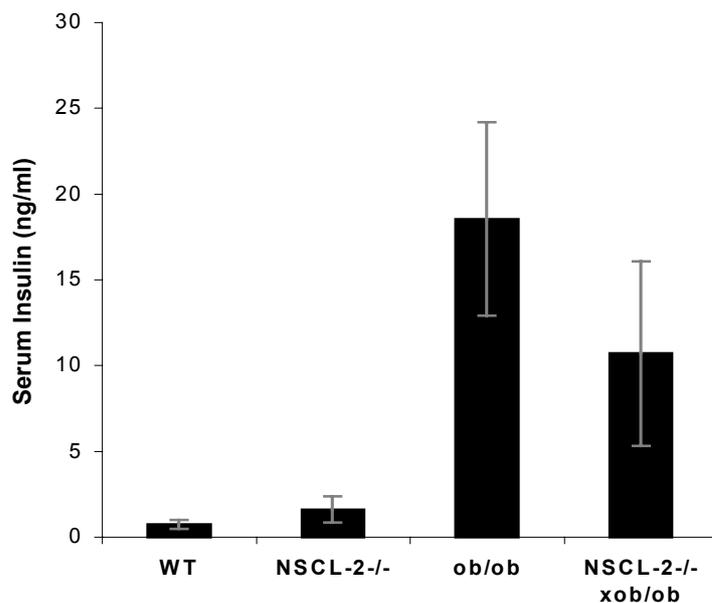


Abbildung 25 Insulinspiegel von adulten NSCL-2 Mutanten, Doppelmutanten sowie WT und ob/ob Kontrolltieren.

Die Entwicklung einer Insulinresistenz (Typ II Diabetes) ist meist an die Entstehung von Übergewicht gekoppelt und tritt oft im fortgeschrittenen Alter auf. Aus diesem Grund sind die Insulinwerte der ob/ob und NSCL-2 $^{-/-}$ x ob/ob Tiere in Abbildung 26 altersabhängig dargestellt. Die Altersgruppe 1 umfasst Tiere im Alter von sechs bis acht Monaten und in Altersgruppe 2 wurden die Insulinwerte der älteren Tiere von neun bis zwölf Monaten eingeordnet, um die altersabhängige Erhöhung des Insulinspiegels in den untersuchten Tieren

zu veranschaulichen. Verglichen mit den Werten der ob/ob Tiere zeigten die Doppelmutanten in beiden Altersgruppen deutlich niedrigere Insulinspiegel.

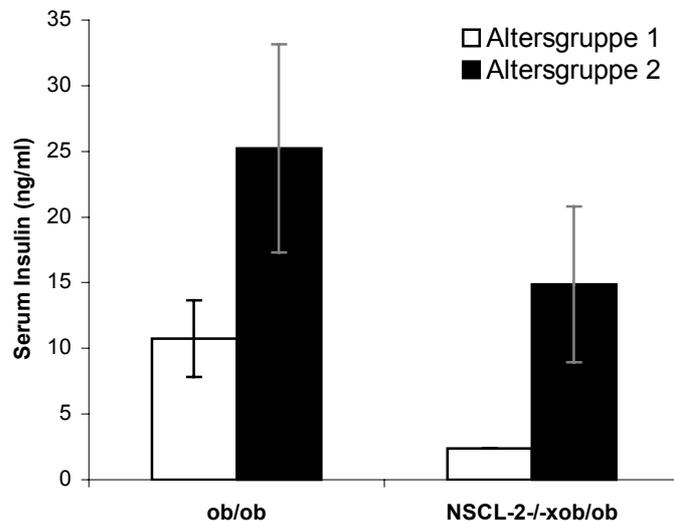


Abbildung 26 Altersabhängige Darstellung der Serum-Insulinspiegel leptindefizienter Tiere und NSCL-2 defizienter ob/ob Tiere.

3.4.7 NSCL-2 defiziente Mäuse zeigen einen erhöhten Serum-Resistinspiegel

Die Analyse der Serumproteine umfasste neben den Konzentrationsbestimmungen von Leptin und Insulin auch die Messung des Resistinspiegels. Resistin wird in Mäusen größtenteils von weißem Fettgewebe produziert, mRNA Expression und Protein finden sich aber auch in anderen Geweben, u.a. im Hypothalamus (ARC) und der Hypophyse (Adeghate, 2004). Adipöse Mausstämmen (z.B. ob/ob, db/db), insulinresistente Tiere sowie Tiere, die durch eine fettreiche Diät Übergewicht zeigen, weisen hohe Resistinwerte auf (Steppan et al., 2001a). Die Serum-Resistinwerte von NSCL-2 Mutanten, Doppelmutanten und WT sowie ob/ob Kontrollen wurden mittels ELISA Technik bestimmt und auf das Körpergewicht normiert, um den Vergleich der Resistinspiegel nur in Abhängigkeit vom Genotyp zu ziehen.

NSCL-2 defiziente Tiere wiesen erhöhte Resistinspiegel im Serum auf. Doppelmutanten hatten im Vergleich zu den phänotypisch identischen ob/ob Tieren signifikant erhöhte Werte. In Abbildung 27 sind die Werte in ng/ml und auf das Körpergewicht normiert in (ng/ml)/(Körpergewicht in Gramm) dargestellt. Die normierten Werte NSCL-2 defizienter Tiere waren signifikant höher als die der Kontrollen ($F = 6,33$; $p < 0,0009$). Von einigen Tieren waren sowohl die Serum-Resistinspiegel als auch die relative Resistin mRNA Konzentration im epigonadalen Fettgewebe gemessen worden. In Abbildung 28 sind diese Daten gegeneinander dargestellt. Auffällig ist, dass Serum-Resistinspiegel und Resistin

3. Ergebnisse

mRNA Level umgekehrt proportional zueinander sind. So wiesen WT-Mäuse die niedrigsten Serumwerte aber das höchste Resistin mRNA Level auf und die NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Tiere die höchsten Serumspiegel aber die geringste relative mRNA Expression. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von Rajala et al. (2004) an WT und ob/ob Tieren beschrieben.

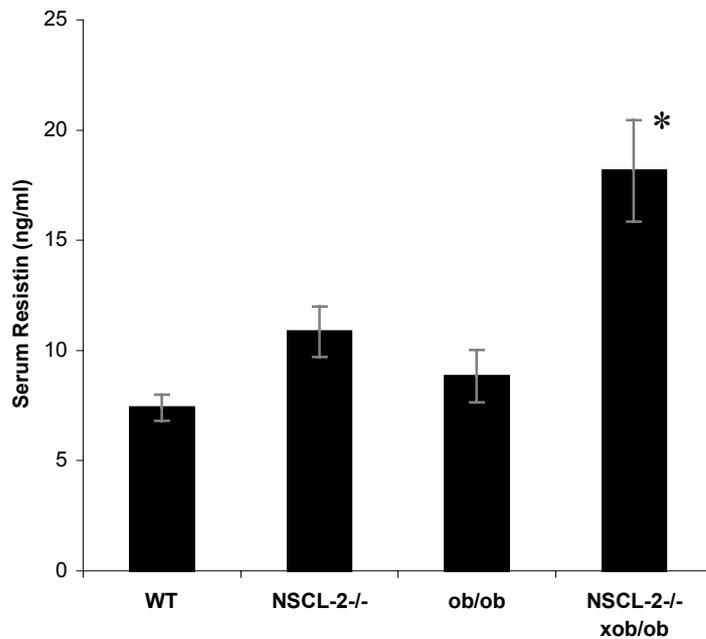
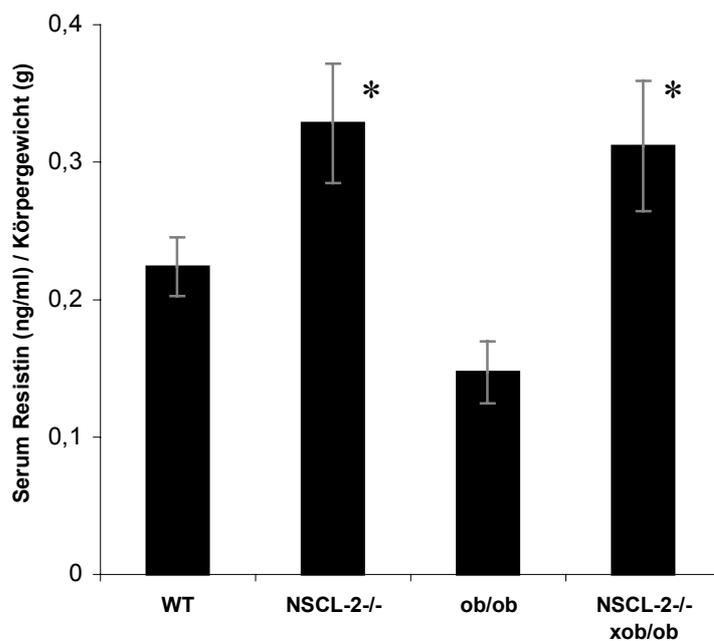


Abbildung 27 NSCL-2 Defizienz führt zu erhöhten Serum-Resistinkonzentrationen. (Oben) Durchschnittliche Serum-Resistinwerte der vier Genotyp Gruppen ($n_{WT} = 23$; $n_{NSCL-2-/-} = 15$; $n_{ob/ob} = 14$; $n_{NSCL-2-/-xob/ob} = 8$). (Unten) Die Werte wurden auf das Körpergewicht der Tiere normiert, um die Resistinkonzentration in Abhängigkeit vom Genotyp (unabhängig vom Körpergewicht) darzustellen.



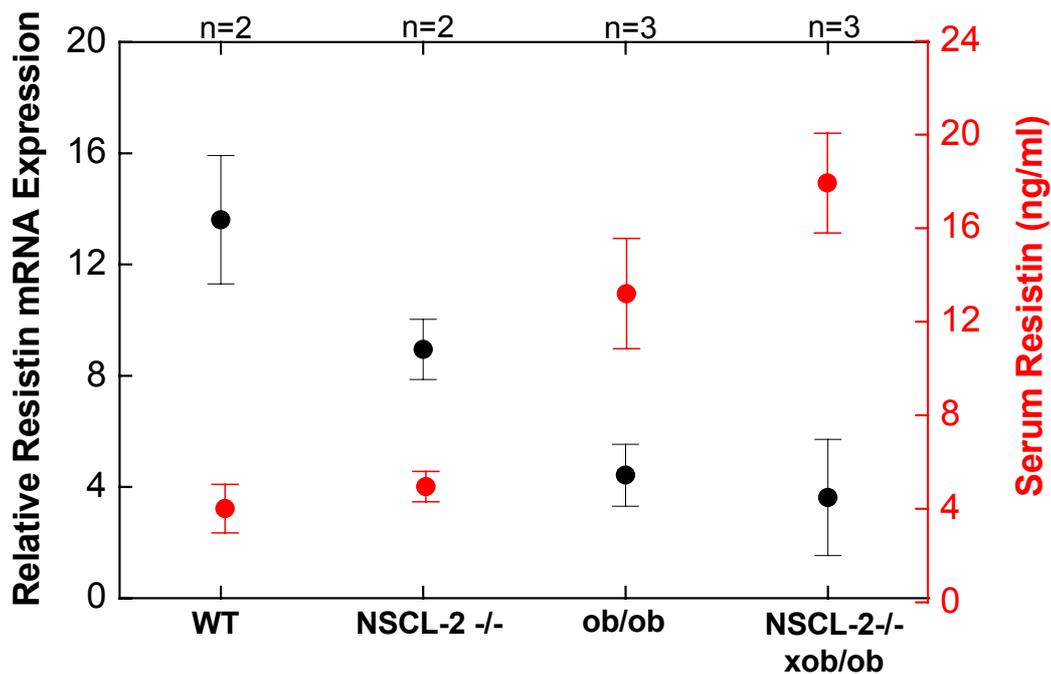


Abbildung 28 Vergleichende Darstellung der Serum-Resistinspiegel und der relativen mRNA Expressionslevel von adulten NSCL-2 defizienten Mäusen und WT sowie ob/ob Kontrolltieren.

3.4.8 Die Serum-Adiponektinspiegel sind in NSCL-2 Nullmutanten erhöht

Das Fettgewebe produziert ein weiteres Protein, das sogenannte Adiponektin. Es zirkuliert im Blut als niedermolekulares Dimer bzw. Trimer oder in Form von hochmolekularen Komplexen. Der Serum-Adiponektinspiegel korreliert negativ mit dem Blutzuckerspiegel. Übergewichtige Menschen als auch übergewichtige Mausmodelle weisen reduzierte Adiponektinwerte auf (Qi et al., 2004).

Mittels ELISA Technik wurden die Serum-Adiponektinwerte 6 Monate alter weiblicher WT, NSCL-2 -/-, ob/ob und NSCL-2 x ob/ob Tiere ermittelt. Die Werte der NSCL-2 defizienten Tiere unterschieden sich nicht von denen der WT-Kontrollen (NSCL-2 -/-: $13,77 \pm 1,38$; WT: $12,2 \pm 0,74$). Die hyperglykämischen ob/ob und NSCL-2 x ob/ob Mäuse wiesen deutlich erniedrigte Adiponektinspiegel auf (ob/ob: $2,77 \pm 1,86$; NSCL-2 -/- x ob/ob: $2,81$).

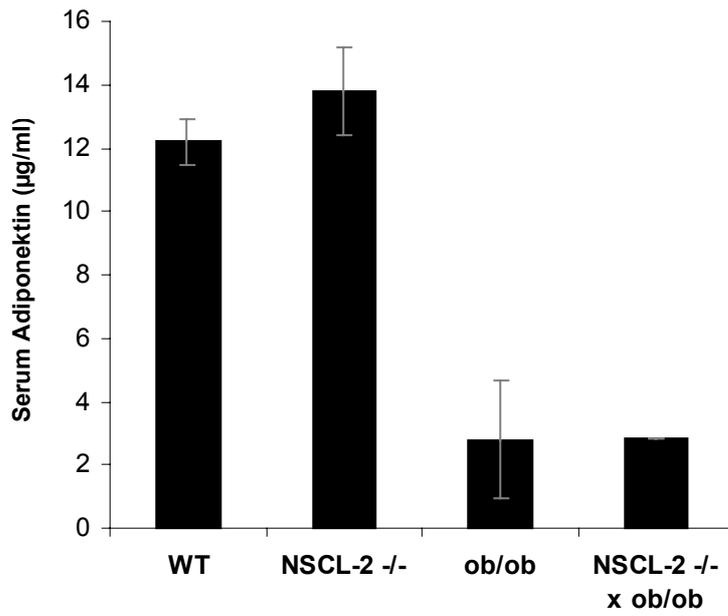


Abbildung 29 Die Adiponektinwerte NSCL-2 defizienter Tiere liegen auf WT-Niveau. Durchschnittliche Serum-Adiponektinwerte weiblicher Tiere der vier Genotyp-Gruppen ($n_{WT} = 4$; $n_{NSCL-2-/-} = 9$; $n_{ob/ob} = 3$; $n_{NSCL-2-/- \times ob/ob} = 1$). $F=2,98$; $p=0,07$

4 Diskussion

Das Körpergewicht wird durch Veränderungen in der Futtermittelaufnahme und des Energiehaushaltes gesteuert. Mit dem Hypothalamus als „Schaltzentrale“ werden diese Veränderungen durch spezifische neuronale Signalwege und zirkulierende Signale reguliert. In NSCL-2 defizienten Mäusen liegt eine Störung des Energiegleichgewichts vor. Eigene Ergebnisse und Arbeiten von Good und Mitarbeitern (Good et al., 1997) zeigten, dass NSCL-2 Mutanten nach der Pubertät durch eine leicht erhöhte Futtermittelaufnahme und verminderte Aktivität Übergewicht entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Veränderungen innerhalb bekannter gewichtsregulatorischer Signalwege Ursache für diesen Phänotyp sein könnten. Durch *in vitro* und *in vivo* Bindungsanalysen konnte gezeigt werden, dass NSCL-2 an E-Box Sequenzmotive innerhalb der Promotorregion des Necdin-Gens bindet. Die Bindung führt zu einer Aktivierung des Promotors und der Transkription des Necdin-Gens. Die Aktivierung wird durch Bildung eines Proteinkomplexes mit den Kofaktoren E12, LMO-4 und CLIM2 verstärkt, was durch Transaktivierungsexperimente in neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien nachgewiesen wurde.

Durch die Generierung von NSCL-2 $-/-$ x *ob/ob* Doppelmutanten konnte die in NSCL-2 Mutanten vorliegende Leptinresistenz umgangen werden. Hierdurch wurden Untersuchungen der Leptinantwort in NSCL-2 defizienten Tieren möglich. Doppelmutanten reagierten in Vergleich zu *ob/ob* Tieren auf eine Behandlung mit Leptin mit einem geringeren Gewichtsverlust, was auf eine Störung der Weiterleitung von Leptinsignalen in NSCL-2 mutanten Tieren hindeutet. Andere gewichtsregulierende Faktoren, wie zum Beispiel die Expression von POMC und die Funktionalität des MC4- Rezeptors zeigten dagegen keine Veränderungen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Charakterisierung der Fettgewebsstruktur NSCL-2 defizienter Tiere. Im weißen Fettgewebe kommt es zu einer Akkumulation von Präadipozyten. In *in vitro* Experimenten zeigten isolierte Präadipozyten jedoch keine Veränderungen in der Differenzierung zu Adipozyten. Die Serum-Konzentrationen des Adipozytokins Resistin, eines Adipogenese-Inhibitors, waren in NSCL-2 defizienten Tieren signifikant erhöht.

Adipozyten von NSCL-2 Mutanten zeigten eine Insulinresistenz, die jedoch in NSCL-2 $-/-$ x *ob/ob* Tieren gemildert war. Die Insulinkonzentrationen im Blut waren im Gegensatz dazu in

NSCL-2 Nullmutanten nicht erhöht und lagen bei den Doppelmutanten trotz ihrer extremen Adipositas deutlich unter dem Niveau von ob/ob Tieren.

4.1 Die Expression des Necdin-Gens steht unter direkter Kontrolle von NSCL-2

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Expression des Gens Necdin im Kleinhirn von NSCL-1 x NSCL-2 Doppelmutanten Mäusen des Entwicklungstages 18,5 reduziert ist. *In situ* Hybridisierungen mit einer Necdin-Probe zeigten eine stark reduzierte Expression des Gens im Bereich des optischen Chiasma von NSCL-2 Mutanten und ein komplettes Fehlen der Necdin-Expression im medialen präoptischen Bereich des Hypothalamus von NSCL-1/2 Doppelmutanten im Entwicklungsstadium E 18,5 (Krüger et al., 2004). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass NSCL-2 an der Kontrolle der Necdin-Genexpression im Hypothalamus beteiligt ist. Die Expression beider Gene überlappt in spezifischen Regionen des Hypothalamus, so z.B. im Nucleus Arcuatus, der als Zentrum für die Signalweitergabe zirkulierender Sättigungsfaktoren an andere Kerngebiete des Hypothalamus gilt (Muscatelli et al., 2000). Eine weitere Übereinstimmung ist die inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von Zellen. Beide Proteine werden in postmitotischen Neuronen exprimiert (Kobayashi et al., 2002; Taniura et al., 1999; Tcherpakov et al., 2002; Uetsuki et al., 1996). Eigene Arbeiten zeigten, dass die Überexpression von NSCL-2 in eukaryontischen Zelllinien zur Inhibierung der Proliferation führt (Ruschke et al., unpublizierte Daten).

Das humane Necdin-Gen ist auf Chromosom 15q11-13 lokalisiert. Diese Region ist in Patienten mit Prader-Willi-Syndrom (PWS) deletiert (Jay et al., 1997; MacDonald und Wevrick, 1997). PWS ist eine neurogenetische Erkrankung mit komplexen Symptomen, die zum großen Teil durch hypothalamische Defekte hervorgerufen werden. Die Patienten leiden unter anderem an Hypogonadismus und Obesität, was ebenfalls phänotypische Merkmale NSCL-2 defizienter Mäuse sind. Die betroffene Region auf Chromosom 15 unterliegt dem genomischen Imprinting, bei dem die Expression autosomaler Gene von väterlichen oder mütterlichen Ursprung des Chromosoms abhängt. PWS unterliegt dem maternalen Imprinting und ist ausschließlich durch die fehlende Expression des paternalen Chromosomenabschnitts aufgrund einer großen Deletion, maternaler Disomie oder Imprinting-Mutation begründet. Es existieren verschiedene Untersuchungen an necdindefizienten Mäusen, die in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund sehr unterschiedliche Phänotypen zeigen. So konnten Tsai et al. (1999) keinen abnormalen Phänotyp feststellen, während bei Gerard et al. (1999) die Deletion des Necdin-Gens zum postnatalen Tod der Tiere führte. Muscatelli et al. (2000) beschrieben

ebenfalls einzelne Tiere mit 129Sv-C57Bl6/J Hintergrund, die kurz nach der Geburt starben, jedoch aufgrund genetischer Unterschiede zwischen den gehaltenen Populationen auch Tiere, welche die kritische Phase nach der Geburt überlebten und eine Reduktion von Oxytocin- und GnRH-produzierenden Neuronen im Hypothalamus zeigten. Die Beobachtungen bestätigen, dass einzelne Symptome des PWS eindeutig durch das Fehlen von Necdin hervorgerufen werden. Der unstillbare Hunger von PWS-Patienten könnte eine Ursache im Fehlen von Oxytocin haben (Swaab, 1997). Jüngste Arbeiten haben allerdings gezeigt, dass die Expression von Oxytocin auf mRNA Ebene im Hypothalamus von NSCL-2 $-/-$ Mutanten nicht erniedrigt ist (Ruschke *et al.*, unpublizierte Daten).

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon wird von Neuronen des Nucleus Arcuatus produziert, deren Axone das Hormon über die Blut-Hirnschranke im Bereich der Eminentia Medialis schubweise in den Blutkreislauf sekretieren. Nach Bindung von GnRH an Rezeptoren der Adenohypophyse kommt es zur Freisetzung des Lutenisierenden Hormons (LH) und des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH). FSH fördert die Reifung der Eizellen in den Ovarien und sorgt für die Entwicklung der Spermien. LH unterstützt die Eireifung, den Eisprung und die Bildung des Gelbkörpers und fördert die Spermienreifung und Testosteronsekretion aus den Leydig-Zellen des Hodens. NSCL-2 Defizienz führt in der Maus aufgrund von zellautonomen Dysregulationen während Differenzierungs- und Migrationsprozessen, wie z.B. einer Necdin-Defizienz zur Reduktion GnRH-positiver Neurone im Hypothalamus (Krüger *et al.*, 2004). Dies beeinflusst die Reifung der Geschlechtsorgane negativ und wäre eine mögliche Erklärung für die Entstehung des hypogonadalen Hypogonadismus in NSCL-2 Nullmutanten.

Durch eine Transaktivierungs-Analyse in neuronalen GT1-trk Zellen und nicht-neuronalen HEK293T Zellen konnte gezeigt werden, dass Necdin ein direktes Zielgen von NSCL-2 ist. Die Kotransfektion von NSCL-2 und einem Necdin-Promotor-Reporterkonstrukt in GT1-trk Zellen resultierte in einer bis zu 100-fachen Erhöhung der basalen Luciferaseaktivität. In HEK 293T Zellen führte die NSCL-2 Expression ebenfalls zu einer Aktivierung der Reporterexpression. Die Erhöhung der Luciferaseaktivität um den Faktor 20 konnte in diesen Zellen durch die gemeinsame transiente Transfektion mit zusätzlichen Kofaktoren wie E12 und LMO2 bis auf dem Faktor 70 gesteigert werden. Durch die Analyse des Necdin-Promotors wurden zwei E-Boxen identifiziert, die mit ihrer Sequenzabfolge CATGTG und CACATG das Bindemotiv für den bHLH Transkriptionsfaktor darstellen. Durch *in vitro* Bindungsanalysen, in denen auch Kompetitionsansätze mit mutierten E-Boxen durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass NSCL-2 spezifisch an beide E-Box Sequenzen des

Necdin-Promotors bindet. Diese Beobachtung wurde durch eine Chromoatin Immunopräzipitation *in vivo* bestätigt. Durch die transiente Expression eines NSCL-2cmyc Fusionsproteins zusammen mit den bereits erwähnten Kofaktoren konnten Necdin-Promotorbereiche präzipitiert werden, die dann mit E-box flankierenden Primern spezifisch nachgewiesen wurden (Abbildung 5). Die Mutationen der E-Box1, E-Box2 und auch die kombinierte Mutation beider E-Boxen innerhalb des Luziferase Reporterkonstrukts führten zur kompletten Inaktivierung der Necdin-Promotoraktivität, was die spezifische Bindung und Wirkungsweise von NSCL-2 als Aktivator des Necdin-Promotors bestätigte.

Da sich die Reduktion der Necdin-Expression in NSCL-2 Nullmutanten auf den Hypothalamus beschränkte, liegt die Vermutung nahe, dass die NSCL-2 kontrollierte Necdin-Expression Einfluss auf die Entwicklung spezifischer Nervenzellen in diesem Bereich hat, wie es auch am Beispiel der GnRH positiven Neurone gezeigt wurde. Die NSCL-2 kontrollierte Expression von Necdin ist nötig, um die Differenzierung GnRH positiver Neurone während der Migration zu gewährleisten, so dass diese zu ihrem Bestimmungort, dem Nucleus Arcuatus gelangen.

Tseng et al. (2005) zeigten mit ihren Experimenten an IRS-1 defizienten Mäusen, dass Necdin Einfluss auf die Insulin-Signalkaskade in Präadipozyten des braunen Fettgewebes hat. IRS-1 Defizienz führte zu einer Akkumulation von braunen Fettvorläuferzellen, die, wie sich zeigte, eine erhöhte Expression von Necdin aufwies. Durch Reduktion von Necdin mittels siRNA oder Expression von IRS-1 war eine normale Differenzierung der Zellen wieder möglich. Desweiteren wurde durch Reduktion von Necdin die Expression von Pref-1, einem Inhibitor der Fettzellendifferenzierung vermindert. Goldfine et al. (2006) haben nachgewiesen, dass durch die Überexpression von Necdin in 3T3-L1 Präadipozyten die Differenzierung zu reifen Adipozyten blockiert ist. Weitere Indizien, die für einen Zusammenhang zwischen Necdin und der Entwicklung von Übergewicht sprechen, sind neben der Übergewichtigkeit von PWS-Patienten Polymorphismen im humanen Necdin-Gen, die allerdings nicht mit dem BMI übergewichtiger Erwachsener korrelierten (Oeffner et al., 2001). Diese Erkenntnisse sprechen klar für einen Einfluss von Necdin innerhalb gewichtsregulatorischer Mechanismen. Eine eventuell erhöhte Expression von Necdin in den akkumulierten Präadipozyten NSCL-2 defizienter Tiere sollte in zukünftigen Experimenten abgeklärt werden, obwohl ein direkter, möglicherweise inhibitorischer Einfluss von NSCL-2 auf die Expression von Necdin im Fettgewebe aufgrund der spezifisch neuronalen Expression von NSCL-2 undenkbar ist.

4.1.1 NSCL-2 interagiert mit verschiedenen Kofaktoren, um die Transkription von Necdin zu aktivieren

Durch transiente Kotransfektionen von NSCL-2 mit E12-, LMO- und CLIM2-Expressionskonstrukten konnte in HEK293T Zellen die Aktivierung des Reportergens zusätzlich verstärkt werden. Die kombinierte Expression von NSCL-2, E12 und LMO2 oder LMO4 führte zu einer fast 70-fachen Erhöhung der relativen Luziferaseaktivität im Vergleich zur 20-fachen Erhöhung durch NSCL-2 allein. Durch die Transfektionen der Kofaktoren LMO2 und LMO4 zusammen mit dem Necdin-Promotor-Reporterkonstrukt wurde die starke Aktivierung des Necdin-Promotors nicht in diesem Umfang erzielt, es zeigte sich jedoch ein moderates Aktivierungspotential, was vermuten lässt, dass diese Proteine in der NSCL-2 vermittelten Regulation der Necdin-Expression eine wichtige Rolle spielen.

Es existieren mehrere Studien zur Interaktion von bHLH Transkriptionsfaktoren und „Lim only“ Proteinen (LMO's). So ist während der Hämatopoese ein Protein Komplex bestehend aus dem bHLH Protein SCL/TAL1 und seinem ubiquitär exprimierten Dimersierungspartner E2A aktiv, die mit LMO2, GATA-1 und den LIM-binding Protein Ldb1 (Synonyme: CLIM2, NLI) interagieren (Abbildung 30A). Dieser oligomere Komplex bindet an ein E-Box DNA Motiv und eine nahe gelegene GATA Bindungsstelle und aktiviert oder reprimiert die Expression stromaufwärts gelegener Gene (Wadman et al., 1997). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Arbeiten am Tiermodell *Xenopus*. In Embryonen führte die Koexpression von SCL, GATA1 und LMO2 zu einer verstärkten Erythrocytenproduktion aus mesodermalem Gewebe (Mead et al., 2001). Die Interaktion des neuronalen bHLH Proteins XHEN1, das im Vergleich mit NSCL-2 eine 98 %-ige Homologie in der bHLH Domäne aufweist, mit Vertretern der „Lim only“ Proteinfamilie wurde von einer anderen Gruppe ebenfalls in *Xenopus* beschrieben. Durch eine Yeast-Two-Hybrid-Analyse wurde die Bindung von XHEN1 mit XLMO3 nachgewiesen. Die Expression beider Gene zeigte eine starke Überlappung während der frühen Neurogenese. Die Koexpression beider Gene in *Xenopus* Embryonen aktivierte eine Expressionskaskade neuronaler bHLH Proteine, die Funktionen während der Neurogenese ausüben (Bao et al., 2000). Manetopoulos et al. (2003) konnten zeigen, dass durch die Überexpression von HEN1 und LMO4 in neuronalen HiB5 Stammzellen diese zur Bildung von Neuriten angeregt wurden.

Die Expression von LMO2 und LMO4 überschneidet sich mit der von NSCL-2 in weiten Teilen des zentralen Nervensystems, sowohl in embryonalen als auch adulten Stadien. LMO4

ist im paraventriculären, dorsomedialen und ventromedialen Hypothalamus exprimiert (Hermanson et al., 1999), wo auch in adulten Stadien der Maus noch NSCL-2 Signale detektiert werden konnten (Jing et al., 2004). Aus der "Lim only" Proteinfamilie sind bisher nur die vier Vertreter LMO1-4 bekannt, die durch ihre zwei aufeinander folgenden LIM-Domänen gekennzeichnet sind (Dawid et al., 1995; Perez-Alvarado et al., 1994; Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994). Jede LIM-Domäne besteht wiederum aus zwei Zink-Finger Motiven, die dem des Transkriptionsfaktors GATA-1 ähneln. Über diese Domäne interagieren die Proteine mit anderen LIM Proteinen, so z. B. auch mit CLIM2. Dieser Faktor ist während der Zebrafisch-Entwicklung in spezifischen neuronalen Zelltypen exprimiert und hat dort positiven Einfluss auf die Bildung von Axonen (Becker et al., 2002).

Durch die kombinierte Transfektion von NSCL-2, E12, LMO4 und CLIM2 konnte in der Chromatin-Immunopräzipitation die Bindung des Komplexes an den Necdin-Promotor nachgewiesen werden. CLIM2 könnte demnach ebenfalls Teil des NSCL-2 Proteinkomplexes sein. Diese Hypothese wird durch jüngste Arbeiten bestätigt. Han et al. (2005) konnten in humanen fötalen Gehirnextrakten die Koexpression von NSCL-2, LMO2 und Bex2 nachweisen und durch Koimmunopräzipitation die Interaktion der Proteine bestätigen. „Brain expressed, X-linked Protein“ (Bex2) ist während früher embryonaler Entwicklungsstadien exprimiert und scheint eine Rolle für die Aktivität reifer Neurone zu spielen. Der von dieser Gruppe postulierte DNA-Bindungskomplex ist in Abbildung 30B dargestellt. Das aus den eigenen Experimenten resultierende potentielle Modell zu Regulation der Necdinexpression ist in Abbildung 30C abgebildet.

NSCL-2/E12 Heterodimere binden vermutlich an beide E-Boxen und sind mit einem LMO-Protein, z.B. LMO2, verbunden, das seinerseits mit CLIM2 interagiert. Zwar konnte in der Koimmunopräzipitation keine Interaktion zwischen NSCL-2 und LMO2 und nur eine schwache Interaktion zwischen NSCL-2 und LMO4 gezeigt werden, aber die Ergebnisse der Transaktivierungsexperimente in HEK293T Zellen zeigen eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität durch Kotransfektion mit LMO2/4 und E12. Diese Steigerung durch eine Kotransfektion wurde in GT1-*trk* Zellen nicht erreicht. Vermutlich verfügt diese hypothalamische Zelllinie über genügend endogene Faktoren dieser Art, wodurch auch die extrem starke Necdin-Promotoraktivierung durch NSCL-2 allein zu erklären wäre.

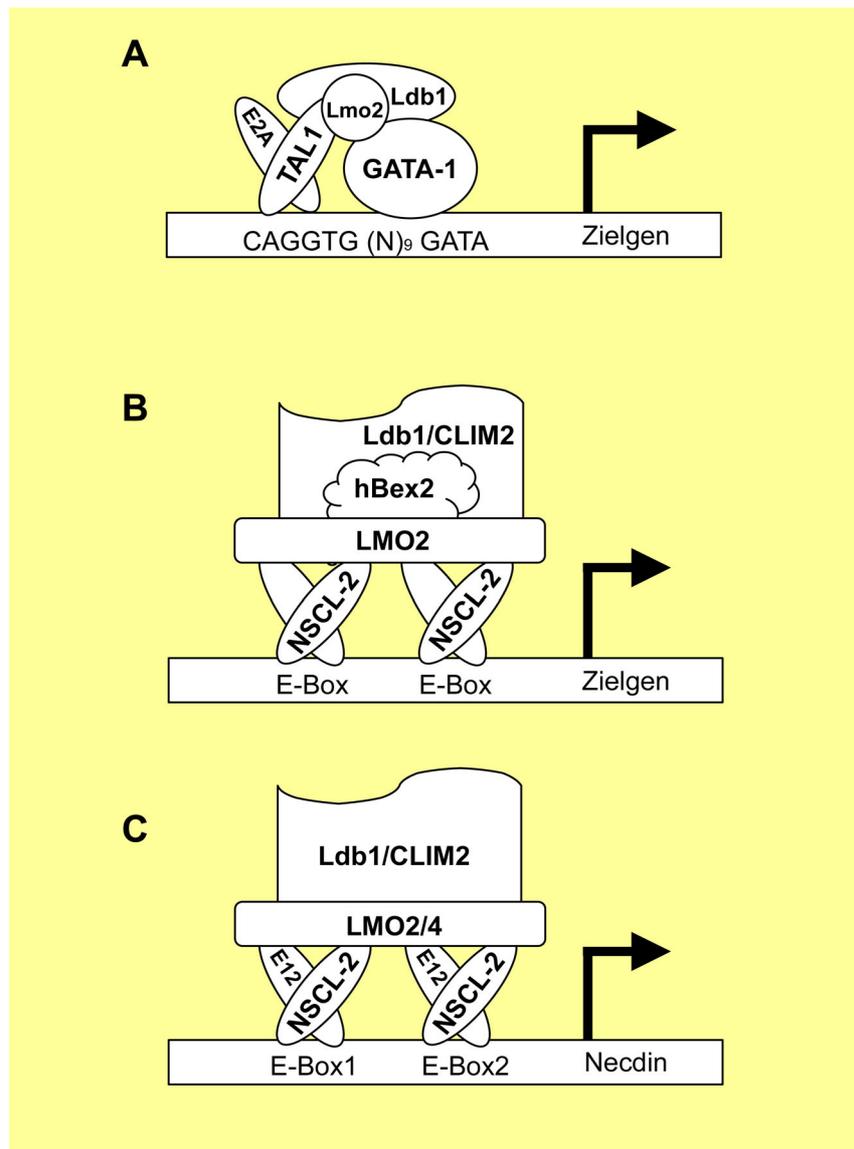


Abbildung 30 Modelle möglicher DNA-Bindungskomplexe. (A) Modell aus (Wadman et al., 1997), (B) Modell aus (Han et al., 2005). (C) Modell des Proteinkomplexes für die Aktivierung des Nectin-Promotors, das sich aus den durchgeführten Experimenten ergibt.

4.2 Die zentrale Kontrolle des Energiehaushalts ist in NSCL-2 Mutanten gestört

4.2.1 Leptinresistenz

Das phänotypische Merkmal NSCL-2 defizienter Mäuse ist die beginnende Gewichtszunahme im Alter von ca. 8 Wochen. Mit sechs Monaten wiegen sie ungefähr 30% mehr als C57/Bl6 Wildtypiere. Das vom Pankreas produzierte Hormon Insulin und das von Adipocysten sekretierte Leptin sind „Adipositas-Signale“, die proportional zum Körperfettgehalt im Blut zirkulieren (Bagdade et al., 1967; Considine et al., 1996) und die Blut-Hirnschranke proportional zum Serumgehalt passieren (Baura et al., 1993; Schwartz et al., 1996a). Sie

agieren in verschiedenen Signalwegen innerhalb des Hypothalamus, wo sie einerseits anabolische neuronale Signalwege reprimieren, die die Futtermittelaufnahme stimulieren und den Energieverbrauch senken, und andererseits katabolische Signalwege aktivieren, die die Futtermittelaufnahme senken und den Energieverbrauch steigern. Leptin spielt in der Kontrolle der Energiehomöostase die kritischere Rolle, da z.B. Leptindefizienz, wie z.B. in ob/ob (Zhang et al., 1994) und db/db (Campfield et al., 1995) Mausmodellen, trotz hoher Insulinspiegel Obesität und Hyperphagie hervorruft. Im Gegensatz dazu führt Insulindefizienz nicht zu Übergewicht. Im unkontrolliertem Diabetes mellitus, der durch Verlust von Insulin entsteht, steigen die Körperfett- und Leptinspiegel trotz erhöhter Nahrungsaufnahme nicht (Hathout et al., 1999; Havel et al., 1998; Leedom und Meehan, 1989). Im Rattenmodell einer insulindefizienten Diabetes mit dem Merkmal der diabetischen Hyperphagie konnte durch Leptingabe die Futtermittelaufnahme reduziert werden (Sindelar et al., 1999). Damit konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall nicht Insulin sondern Leptin für die Hyperphagie verantwortlich war. NSCL-2 defiziente Tiere hatten im Alter von sechs Monaten einen bis zu 10-fach erhöhten Serum-Leptinspiegel und sprachen nicht auf die periphere Gabe hoher Leptindosen an.

Eine Leptinresistenz tritt im Zusammenhang mit Übergewicht auf und kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden.

1. Der Transport durch endotheliale Zellen der Blut-Hirnschranke ist reduziert. Von Endothelzellen exprimierte Leptinrezeptoren transportieren das Hormon unabhängig vom Insulin (Bjorbaek et al., 1998b). Der Transport findet über den Choroid Plexus, Nucleus Arcuatus und Median Eminence statt, wobei das Transportsystem intaktes Leptin transportiert, aber erschöpfbar ist (Banks et al., 1996). Dieser mögliche Mechanismus zur Entstehung einer Leptinresistenz wird durch Untersuchungen von Caro et al. (1996) untermauert. Sie fanden in der Cerebrospinalflüssigkeit von Adipositas-Patienten im Vergleich zum Serumspiegel geringe Leptinkonzentrationen. Außerdem sollen hohe Serum-Triglyzeridspiegel mitverantwortlich für den Verlust des Leptintransports ins Gehirn sein (Banks et al., 2004).
2. Der Leptinrezeptor ist mutiert, wie im Mausmodell db/db und in fa/fa Ratten (Chua, Jr. et al., 1996).
3. Eine Reduktion der Leptinrezeptor-Signaltransduktion. Durch negative Rückkopplung führt die Aktivierung des Leptinrezeptors zur Expression von SOCS-3 („suppressor of cytokine signalling“), das die leptininduzierte Phosphorylierung des Leptinrezeptors

inhibiert. Erhöhte Level dieses Proteins in leptinsensitiven Zellen des ZNS könnten demnach eine Rolle für die Leptinresistenz spielen (Bjorbaek et al., 1998a, 1999).

4. Funktionalitätsverluste eines Schaltweges hinter dem Leptinrezeptor innerhalb der Leptin-Signalkaskade, wie z.B. Mutation des MC4-R (Bjorbaek et al., 1998a, 1999; Marsh et al., 1999) fallen ebenfalls unter die Leptinresistenz.

Besonders die durch SOCS-3 reprimierte Leptinsensitivität könnte im Fall der Leptinresistenz NSCL-2 mutanter Mäuse eine Rolle spielen. Die periphere Leptinbehandlung von NSCL-2 x ob/ob Doppelmutanten führte im Vergleich mit ob/ob Tieren zu einem geringeren Gewichtsverlust, obwohl die Tiere gleichen Geschlechts, Alters und Gewichts waren. Da durch die Kreuzung mit ob/ob Tieren kein funktionales Leptin produziert und somit die Entstehung einer Resistenz vermieden wird, sollten die Tiere bei einer intakten Leptin-Signalkaskade ohne Einschränkung auf Leptin reagieren. Eine erhöhte SOCS-3 Expression durch das Fehlen von NSCL-2 könnte durchaus ein Faktor für den verminderten Gewichtsverlust der Doppelmutanten sein.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass nachgeschaltete Signalwege, wie z.B. eine verminderte α -MSH Freisetzung oder ein erhöhtes Ansprechen auf orexigene Signale wie das NPY verantwortlich für die relative Leptinresistenz sind.

4.2.2 Der leptininduzierte anorexigene Signalweg

Im Nucleus Arcuatus befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft Neurone, die einerseits die orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related Protein (AGRP) und andererseits die anorexigenen Propeptide Proopiomelanocortin (POMC) und das „Cocaine and amphetamine regulated transcript“ (CART) exprimierten (Broberger et al., 1998b; Elias et al., 1998; Hahn et al., 1998). Diese Neurone präsentieren zudem den Leptinrezeptor auf ihrer Zelloberfläche (Baskin et al., 1999; Cheung et al., 1997). Während die Expression von NPY/AGRP als Antwort auf Leptin reprimiert wird, steigt die Expression von POMC/CART. POMC ist Ausgangsprodukt mehrerer Proteine und unterliegt einer Reihe von Prozessierungsschritten. Das Enzym „Prohormon Convertase 1“ (PC1) spaltet POMC in ACTH und β -LPH. Das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) wird von PC2 prozessiert und es entstehen CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) und α -MSH. Letzteres wird wie POMC zu den anorexigenen Proteinen gezählt und reduziert durch Bindung an den Melanocortin 4 Rezeptor (MC4R) die Futteraufnahme.

Mutationen des POMC-Locus beim Mensch bestätigten die Funktion des Prohormons innerhalb der Leptin-Signalkaskade. Krude et al. (1998) beschrieben Patienten mit Nebenniereninsuffizienz aufgrund von ACTH-Defizienz, einer frühen Adipositas und roten Haaren aufgrund von Pigmentierungsstörungen. Die Mutation führt in der Maus zu Obesität, einer veränderten Pigmentierung und Störungen in der Nebennierenentwicklung. Die Behandlung mit einem α -MSH Agonisten führte in POMC-Mutanten zu einem schnellen Gewichtsverlust von 40 % (Yaswen et al., 1999). Durch konditionelle Inaktivierung der Leptinrezeptoren in POMC positiven Neuronen konnten Balthasar et al. (2004) zeigen, dass Leptinsignale an POMC exprimierenden Neuronen zwar für eine normale Energiehomöostase notwendig sind, aber keine allesentscheidende Bedeutung besitzen, da die Tiere nur eine milde Obesität entwickelten. Vermutlich kompensieren die Wirkungen von Leptin an anderen Neuronen die fehlende Signalweiterleitung in den POMC-Neuronen.

Durch die Kreuzung von NSCL-2 Tieren mit Mäusen, die GFP unter der Kontrolle des POMC-Promotors exprimieren (Cowley et al., 2001), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Anzahl POMC positiver Neurone durch das Fehlen von NSCL-2 nicht gestört ist. Aufgrund einer unveränderten Intensität des GFP Signals nach immunhistochemischen Anfärbungen des Nucleus Arcuatus, kann man desweiteren von einer normalen Aktivität des POMC Promotors ausgehen. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit den Daten von Jing et al. (2004). Sie beschrieben neben einer unveränderten POMC Expression die Kolokalisierung mit NSCL-2 in ca. 30% der POMC positiven Neurone im rostralen Bereich des Nucleus Arcuatus NSCL-2 defizienter Tiere. Desweiteren konnten sie zeigen, dass die Konzentrationen der anorexigenen Peptide α -MSH und TRH (thyrotropin-releasing hormone) reduziert sind. Die Autoren begründen diese Reduktion mit einer verringerten Funktionalität bzw. reduzierten Expression der reifen Enzyme PC1 und/oder PC2, die bekanntlich für die posttranslationale Prozessierung von POMC verantwortlich sind. Ob diese Vermutung der Grund für eine reduzierte α -MSH Konzentration und letztendlich für das Übergewicht von NSCL-2 Nullmutanten ist, bleibt fraglich, da PC1 defiziente Mäuse keine Gewichtszunahme zeigen (Zhu et al., 2002), und Jing et al. (2004) die Expression der Prohormon Convertasen 1 und 2 nicht gemessen oder eine direkte Bindung von NSCL-2 an regulatorische Bereiche der jeweiligen Promotoren untersucht haben. Es wurde lediglich eine erhöhte Expression von Adrenocorticotropen Hormon (ACTH), einem Spaltungsprodukt von POMC, immunhistochemisch nachgewiesen. Da PC1 bzw. 2 ACTH zu α -MSH spalten, wurde eine Reduktion von PC1 bzw. PC2 in NSCL-2 Mutanten Mäusen als Grund für die erhöhten ACTH- und reduzierten α -MSH-Level postuliert.

Eine reduzierte α -MSH Konzentration könnte allerdings Einfluss auf die post-pubertäre Gewichtszunahme von NSCL-2 Mutanten haben. Das Fehlen des Hormons (POMC „knockout“) und auch der Ausfall der α -MSH Signalweiterleitung durch Mutation des α -MSH Rezeptors (MC4-R) führen im Mausmodell zu Obesität.

NSCL-2 Mutanten, denen kontinuierlich ein α -MSH Agonist verabreicht wurde, verloren signifikant an Gewicht. Die Funktionalität des Rezeptors ist demnach nicht eingeschränkt. In Abbildung 31 ist die anorexigene Leptin-Signalweiterleitung schematisch und vereinfacht dargestellt. Eine mögliche Veränderung durch das Fehlen von NSCL-2 könnte die reduzierte Prozessierung vom POMC sein. Als Folge dessen kommt es zu einer geringeren Ausschüttung von α -MSH, und der Organismus reagiert nicht ausreichend auf das Sättigungssignal Leptin. So würde kontinuierlich mehr Nahrung aufgenommen werden als nötig. Dadurch steigt auch das Risiko der Leptinresistenz. Es steht außer Frage, dass die Entstehung des Übergewichts in NSCL-2 Mutanten durch Veränderungen innerhalb der Leptin-Signalkaskade zu erklären ist. Das Gleichgewicht zwischen Futteraufnahme und Energieverbrauch ist allerdings durch ein kompliziertes Netzwerk reguliert, und ein Einfluss von NSCL-2 auf weitere Faktoren innerhalb dieses Netzwerkes ist wahrscheinlich. NSCL-2 Mutanten zeigen z.B. auch Veränderungen innerhalb der orexigenen Leptin-Signalweitergabe über NPY (Krüger, 2002).

4.3 NSCL-2 Mutanten zeigen eine Insulinresistenz in Adipozyten, die jedoch keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz der Tiere hat

Durch die Adipozyten-Charakterisierung der vier Genotyp-Gruppen hinsichtlich basalem und insulininduziertem Glukosetransport, Glukosemetabolismus und Lipolyse zeigte sich, dass NSCL-2 defiziente Fettzellen insulinresistent sind. Die Werte waren vergleichbar mit denen der ebenfalls untersuchten ob/ob Adipozyten. Erstaunlicherweise waren die Werte der NSCL-2 $-/-$ x ob/ob Adipozyten hinsichtlich der Insulinsensitivität besser als die beider Einzelmutanten. Die Serum-Insulinspiegel der NSCL-2 Mutanten lagen deutlich unter denen der ob/ob Tiere (auch die älterer Mäuse) und lagen nur wenig über dem WT-Niveau. Auch die Doppelmutanten hatten vergleichsweise niedrige Insulinwerte, obwohl sie sich im Körpergewicht nicht von leptindefizienten Mäusen unterschieden und sogar größere epigonadale Fettdepots aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von NSCL-2

Konsequenzen für Wirkung von Insulin auf das Fettgewebe, aber nicht auf den Organismus im Ganzen hat, was durch Glukose- und Insulintoleranztests bestätigt wurde.

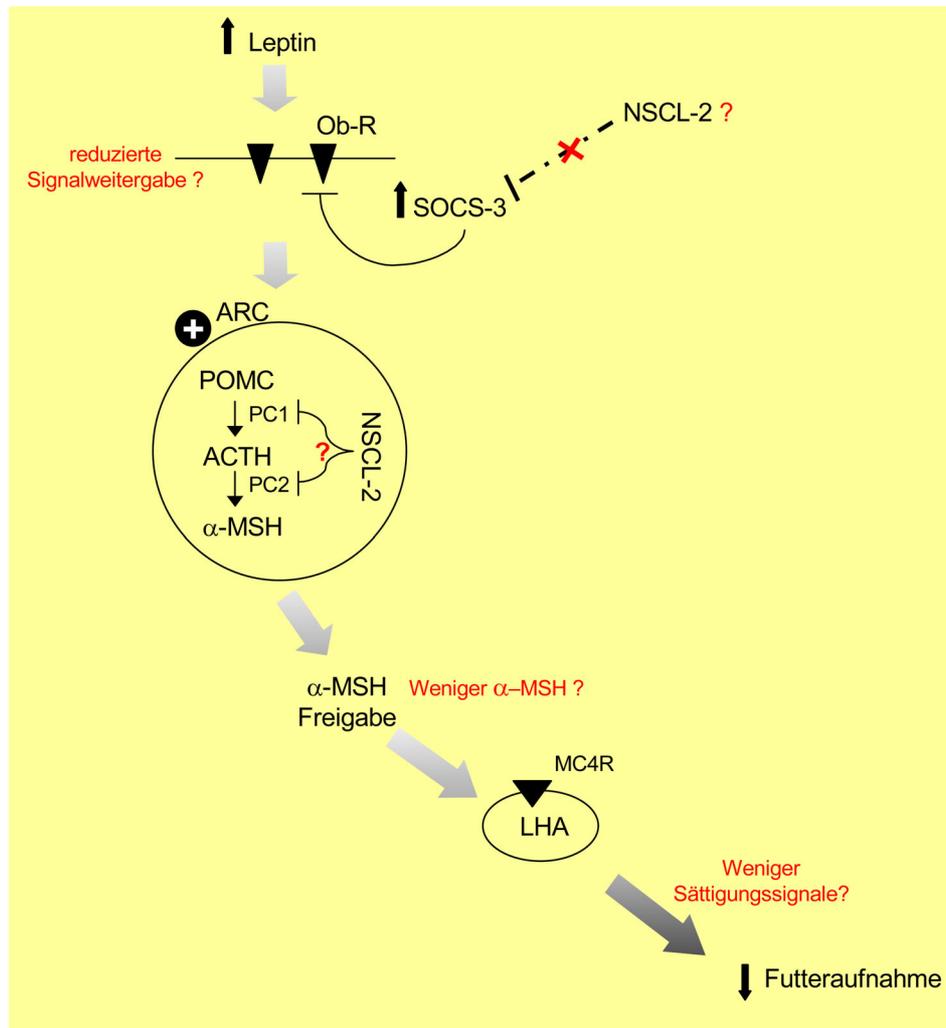


Abbildung 31 Schematische Darstellung der anorexigenen Leptin-Signalkaskade. Gezeigt ist ein vereinfachtes Modell mit dem Schwerpunkt auf der Signalweiterleitung über POMC/α-MSH/MC4R. Mögliche Veränderungen in NSCL-2 mutanten Mäusen sind rot gekennzeichnet. Die Abbildung wurde teilweise aus (Schwartz et al., 2000) entnommen. Abkürzungen: Ob-R Leptinrezeptor; SOCS-3 suppressor of cytokine signalling-3; POMC Proopiomelanocortin; ACTH Adrenocorticotropes Hormon; α-MSH α-Melanozyten stimulierendes Hormon; MC4R Melanocortin 4 Rezeptor; LHA Laterales hypothalamisches Kerngebiet.

Hier zeigten NSCL-2 Mutanten mit einem durchschnittlich höheren Gewicht von 23% eine normale Glukosetoleranz und Insulintoleranz, die zwar signifikant niedriger als die von WT-Tieren war, aber keine kritischen Werte erreichte, wenn man die hohe Insulinresistenz der Adipozyten mit in Betracht zieht.

Insulin stimuliert über die Bindung an den Insulinrezeptor (IR) die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelgewebe und reguliert dadurch den Blutzuckerspiegel. Ohne Insulinsignal befindet sich der Glukosetransporter GLUT-4 in einem „tubulovesikulärem System“ innerhalb der

Zelle und wird durch Insulinstimulation an die Zelloberflächen im Fett, Skelett- und Herzmuskel transportiert (Slot et al., 1991a, 1991b; Smith et al., 1991). Der Phänotyp von GLUT-4 Nullmutanten beschreibt sich durch reduziertes Körpergewicht aufgrund einer Reduktion von weißem Fettgewebe (WAT) und gut regulierte Plasma Glukosespiegel, die wahrscheinlich durch kompensatorische Mechanismen reguliert werden (Katz et al., 1995). Heterozygote GLUT-4 Mutanten zeigen dagegen eine Altersdiabetes aufgrund einer sinkenden GLUT-4 Expression ab ca. acht Wochen, die wahrscheinlich nicht durch alternative Wege abgepuffert wird (Stenbit et al., 1997). Das Fettgewebe spielt eine entscheidende Rolle für die Glukosehomöostase, wie es am Beispiel der durch Übergewicht entstehenden Insulinresistenz (Kopelman, 2000), der verschiedenen Syndrome der Lipodystrophie (Joffe et al., 2001) und der Insulinresistenz in Fett-spezifischen GLUT-4 „knockout“ Mäusen (Abel et al., 2001) deutlich wird.

Eine weitere kritische Rolle für die Entstehung von Insulinresistenz spielt der Insulin Rezeptor (IR). Die fettspezifische Inaktivierung des IR in der Maus (FIRKO für „fat specific insulin receptor knockout“ (Blüher et al., 2002)) stellt ein interessantes Modell dar, da es viele Parallelen zur NSCL-2 „knockout“ Maus zeigt. So zeigt die FIRKO Maus z.B. eine selektive Insulinresistenz im Fettgewebe, die aber keinen Einfluss auf die Glukose Homöostase des Organismus hat. Eine weitere Übereinstimmung ist die Heterogenität des Fettgewebes, die sich wie auch in der NSCL-2 $-/-$ Maus durch sehr große und sehr kleine Fettzellen auszeichnet. Die Autoren suchen Erklärungen dieses Phänomens in der unterschiedlichen Regulation von Lipogenese, Lipolyse und Differenzierung in den beiden Zellfraktionen. Jedoch werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die Mechanismen zur Entstehung der Heterogenität erklären zu können. Interessanterweise sind die FIRKO Mäuse vor Übergewicht geschützt. Sie haben erhöhte Serum-Leptinspiegel, was vermuten lässt, dass die Inaktivierung des IR in Fettzellen Veränderungen in der Leptinsekretion hervorruft.

Aufgrund der Gemeinsamkeiten mit dem Fett-Phänotyp der FIRKO Maus und der Tatsache, dass das Fehlen von NSCL-2 zur Insulinresistenz führt, die sich jedoch nach den bisherigen Untersuchungen nur auf das Fettgewebe beschränkt, liegt die Vermutung nahe, dass eine fettspezifische Störung des Glukosetransportsystems vorliegt. In der Tat war die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in Adipozyten von NSCL-2 Mutanten deutlich reduziert. Allerdings war die basale Glukoseaufnahme in den Mutanten erhöht, was gegen eine massive Störung des Glukosetransportmechanismus spricht.

Die uneingeschränkte Glukosetoleranz der NSCL-2 $-/-$ Tiere ist durch die Hypothese erklärbar, dass die Skelettmuskulatur für 70%-90% der Glukoseaufnahme aus dem Blut

verantwortlich sein könnte (DeFronzo, 1997). Ein weiterer Grund für die gute Glukosetoleranz bzw. das Fehlen eines Typ II Diabetes könnte im nahezu unveränderten bzw. leicht erhöhten Adiponektinspiegeln in NSCL-2 Mutanten liegen.

Trotz der Gemeinsamkeiten zwischen NSCL-2 Mutanten und FIRKO Mäusen bzw. GLUT-4 „knockout“ Modellen gibt es auch viele Unterschiede, unter anderem die Entwicklung von Übergewicht. Jedoch haben Modelle, wie z.B. die muskelspezifische IR (Brüning et al., 1998) und GLUT-4 „knockout“ Maus (Zisman et al., 2000) gezeigt, dass die Inaktivierung verschiedener Proteine innerhalb der Insulin-Signalkaskade, die zur Insulinresistenz führt, große Unterschiede im Phänotyp hervorruft.

4.3.1 NSCL-2 Defizienz führt zur Akkumulation von Präadipozyten im weißen Fettgewebe

Die Entwicklung des Fettgewebes aus mesodermalem Gewebe beginnt in Abhängigkeit von Spezies in der Mitte bzw. am Ende der Schwangerschaft. Nach der Geburt expandiert das Gewebe durch Vergrößerung vorhandener Fettzellen und Proliferation von Fettvorläuferzellen, den Präadipozyten (Hood, 1982; Martin et al., 1998). Die Entstehung neuer Fettzellen vollzieht sich während des gesamten Lebens (Anderson und Kauffman, 1973). Die Differenzierung ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von Lipiden. Schlüsselproteine sind C/EBP β und C/EBP δ , die die Aktivierung von PPAR γ und C/EBP α induzieren, welche dann Adipozyten spezifische Gene hochregulieren (Hausman et al., 2001; MacDougald und Mandrup, 2002).

Die Anzahl der Präadipozyten war in NSCL-2 $-/-$ Tieren um das 7-fache erhöht. Auch die Kreuzung mit ob/ob Mäuse veränderte nichts an dieser Auffälligkeit. Die Fettzellstruktur der leptindefizienten Tiere, die sich durch Hypertrophie auszeichnet, wurde durch das zusätzliche Fehlen von NSCL-2 verändert und es zeigte sich die auch in den NSCL-2 Einzelmutanten auftretende bimodale Fettzellverteilung und die Akkumulation von Präadipozyten. *In vitro* Differenzierungsexperimente mit isolierten NSCL-2 $-/-$ Präadipozyten zeigten, dass die Zellen ein normales Differenzierungspotenzial besitzen und auch wichtige Differenzierungsgene wie C/EBP α , δ und PPAR γ keine veränderte Expression im Fettgewebe aufweisen. Auffällig waren die signifikant erhöhten Serum-Resistinspiegel in NSCL-2 defizienten Tieren. Resistin ist ein Adipozytokin und wird in Mäusen hauptsächlich von weißem Fettgewebe sekretiert (Holcomb et al., 2000; Stepan et al., 2001a, 2001b). Resistin gilt als Antagonist von Insulin

(Steppan et al., 2001a). Rajala et al. (2003) konnten zeigen, dass eine Resistin-Behandlung die Insulinsensitivität durch Verminderung der insulinvermittelten Inhibierung der Glukoneogenese in der Leber herabsetzte. Mausmodelle wie ob/ob und DIO Mäuse (Diät induzierte Obesität) weisen erhöhte Resistinlevel auf. Desweiteren ist das Protein ein Inhibitor der Präadipozyten Differenzierung. Die Behandlung von 3T3-L1 Zellen mit Resistin inhibiert die Adipogenese dieser Präadipozyten Zelllinie (Kim et al., 2001).

Da die Serum-Resistinwerte in NSCL-2 defizienten Tieren noch über denen der ob/ob Tiere lag, wäre es denkbar, dass dies ein Grund für die Akkumulation der Präadipozyten ist. Durch Überschreitung eines kritischen Levels könnte das Differenzierungsprogramm in den Präadipozyten nachhaltig gestört sein. Ein möglicher Mechanismus wäre die gesteigerte Ausschüttung von Resistin durch die große Fettzellpopulation im Fettgewebe NSCL-2 defizienter Tiere, was dann die Differenzierung benachbarter Präadipozyten hemmen könnte. Neben der erhöhten Resistinspiegel im Blut zeigten sich stark reduzierte Resistin-mRNA-Level im Fettgewebe. Diese Beobachtung wird von Daten anderer Gruppen bestätigt (Rajala et al., 2004; Way et al., 2001). Vermutlich wirken verlängerte Halbwertszeiten des Proteins oder eine negative Rückkopplung des Proteinlevels auf die Expression des Resistin-Gens und führen so zu einer niedrigen Genaktivität.

4.4 Wie kontrolliert das neuronal exprimierte NSCL-2 die Fettgewebsstruktur?

Am Beispiel der FIRKO Maus wird erkennbar, dass die Störung der Insulin-Signalkaskade Auswirkungen auf die Fettgewebsstruktur hat. Der „knockout“ des Insulinrezeptors in Adipozyten führte zur Heterogenität des Fettgewebes (Blüher et al., 2002).

NSCL-2 wird ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert und kann also keinen direkten Einfluss auf die Funktionalität und Differenzierung von Adipozyten haben. NSCL-2 ist jedoch auch in Zellen des peripheren Nervensystems exprimiert, das direkten Kontakt mit dem Fettgewebe hat. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass die Innervation des Fettgewebes in NSCL-2 defizienten Tieren Veränderungen aufweist. Ob dies Einfluss auf die veränderte Fettstruktur hat, müssen weitere Studien zeigen.

Ein anderer interessanter Ansatz zur Aufklärung der Mechanismen, die den veränderten Fettphänotyp hervorrufen, ist die Expression des Insulinrezeptors im zentralen Nervensystem. Der IR ist unter anderem im Hypothalamus exprimiert. Durch spezifische Inaktivierung des

IR in Nervenzellen von Mäusen (NIRKO Maus) konnten Brüning et al. (2000) zeigen, dass der Einfluss von Insulin nicht nur peripher, sondern auch zentral besteht. Die NIRKO Maus weist interessante Übereinstimmungen mit der NSCL-2 Maus auf. Die Tiere haben eine unauffällige Gehirnentwicklung. Die weiblichen Tiere entwickeln ein erhöhtes Körpergewicht durch erhöhte Nahrungsaufnahme. Besonders das epigonadale weiße Fettgewebe wird vermehrt produziert und die Tiere haben erhöhte Leptinspiegel. Auch die Reproduktivität ist durch verminderte Ausschüttung von GnRH eingeschränkt. Möglicherweise wirken sowohl der neuronale Insulinrezeptor wie auch NSCL-2 auf die Expression und Sekretion neurohumoraler Faktoren, welche die Akkumulation und die Differenzierung von Fettvorläuferzellen beeinflussen. Potentielle Veränderungen in der neuronalen Expression des Insulinrezeptors in NSCL-2 defizienten Tieren sind denkbar und müssen in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.5 Ausblick

Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Funktion von NSCL-2 innerhalb verschiedener gewichtsregulatorisch wirkender Signaltransduktionswege hin. NSCL-2 Mutanten auf ob/ob Hintergrund zeigten eine verminderte Reaktion auf peripheres Leptin, die sich in adulten NSCL-2 Einzelmutanten in einer ausgeprägten Leptinresistenz äußert. Durch Messungen der Serum-Leptinkonzentrationen jüngerer Tiere könnten Veränderungen der Leptinsensitivität zeitlich enger eingegrenzt werden. Neben der leptinvermittelten Kontrolle der Energiehomöostase gibt es noch weitere Signaltransduktionswege, wie z.B. die Insulin-Signalkaskade, die auch im Gehirn aktiv ist. Desweiteren wäre es interessant, die Wirkung des „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) in NSCL Mutanten zu untersuchen. Die Applikation dieses Faktors führt zu einer nachhaltigen Gewichtsreduktion sowohl im Mensch als auch im Nager und wirkt vermutlich über die Generierung neuer an der Leptin-Signalweitergabe beteiligter Neurone im Hypothalamus. Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von putativen Zielgenen bzw. von durch NSCL-2 beeinflussten Faktoren ist die vergleichende Expressionsanalyse von hypothalamischem Gewebe mittels Microarray-Technik.

Die stark erhöhte Anzahl an Präadipozyten im weißen Fettgewebe könnte auch Ursache einer fehlerhaften Innervation im Fettgewebe sein. Die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit in dieser Region bzw. die histologische Analyse der innervierenden Nerven könnten in Bezug auf diese Veränderung im Fettgewebe weitere Erkenntnisse bringen. Um den möglichen Einfluss von Resistin auf den Fettphänotyp weiter zu untersuchen, wäre eine Inaktivierung

des Faktors von Interesse. Dies ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* möglich. Die Inkubation isolierter Präadipozyten mit dem Serum von NSCL-2 defizienten bzw. WT-Tieren und die sich anschließende Induktion der Adipogenese könnte Änderungen im Differenzierungspotential aufgrund inhibitorischer Komponenten im Serum aufzeigen. Der mögliche Einfluss überdurchschnittlich hoher Resistinkonzentrationen könnte auch durch Kreuzung von NSCL-2 defizienten Tieren mit Resistin „knockout“ Tieren näher untersucht werden. Die zeitweise Inaktivierung von Resistin in adulten NSCL-2 Mutanten durch Injektion von „antisense“ Oligonukleotiden oder einem anti-Resistin Antikörper könnte helfen, die mögliche Rolle von Resistin in der veränderten Differenzierung von Präadipozyten in NSCL-2 Nullmutanten einzuordnen.

5 Referenzen

- Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I., und Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409, 729-733.
- Adeghate, E. (2004). An update on the biology and physiology of resistin. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 2485-2496.
- Akazawa, C., Ishibashi, M., Shimizu, C., Nakanishi, S., und Kageyama, R. (1995). A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J. Biol. Chem.* 270, 8730-8738.
- Altman, J. und Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp Neurol.* 182, 973-993.
- Altman, J. und Bayer, S.A. (1979). Development of the diencephalon in the rat. V. Thymidine-radiographic observations on internuclear and intranuclear gradients in the thalamus. *J. Comp Neurol.* 188, 473-499.
- Altman, J. und Bayer, S.A. (1986). The development of the rat hypothalamus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 100, 1-178.
- Anderson, D.B. und Kauffman, R.G. (1973). Cellular and enzymatic changes in porcine adipose tissue during growth. *J. Lipid Res.* 14, 160-168.
- Aoyama, M., Ozaki, T., Inuzuka, H., Tomotsune, D., Hirato, J., Okamoto, Y., Tokita, H., Ohira, M., und Nakagawara, A. (2005). LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Res.* 65, 4587-4597.
- Arnold, H.H. und Braun, T. (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 48, 129-164.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.T., Seidmann, J.G., Smith, J.A., und Struhl, K. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: Grenne Publishing Associates and Wiley-Interscience).
- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., und Porte, D., Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J. Clin. Invest* 46, 1549-1557.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., und Lowell, B.B. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983-991.
- Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C.Y., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J.K., und Lowell, B.B. (2005).

Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493-505.

Banerjee,R.R., Rangwala,S.M., Shapiro,J.S., Rich,A.S., Rhoades,B., Qi,Y., Wang,J., Rajala,M.W., Poci,A., Scherer,P.E., Stepan,C.M., Ahima,R.S., Obici,S., Rossetti,L., and Lazar,M.A. (2004). Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303, 1195-1198.

Banks,W.A., Coon,A.B., Robinson,S.M., Moinuddin,A., Shultz,J.M., Nakaoke,R., and Morley,J.E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53, 1253-1260.

Banks,W.A., Kastin,A.J., Huang,W., Jaspan,J.B., and Maness,L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.

Bao,J., Talmage,D.A., Role,L.W., and Gautier,J. (2000). Regulation of neurogenesis by interactions between HEN1 and neuronal LMO proteins. *Development* 127, 425-435.

Bartholoma,A. und Nave,K.A. (1994). NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech. Dev.* 48, 217-228.

Baskin,D.G., Breininger,J.F., und Schwartz,M.W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828-833.

Baura,G.D., Foster,D.M., Porte,D., Jr., Kahn,S.E., Bergman,R.N., Cobelli,C., und Schwartz,M.W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest* 92, 1824-1830.

Becker,T., Ostendorff,H.P., Bossenz,M., Schluter,A., Becker,C.G., Peirano,R.I., und Bach,I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. *Mech. Dev.* 117, 75-85.

Bjorbaek,C., El Haschimi,K., Frantz,J.D., und Flier,J.S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 274, 30059-30065.

Bjorbaek,C., Elmquist,J.K., Frantz,J.D., Shoelson,S.E., und Flier,J.S. (1998a). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1, 619-625.

Bjorbaek,C., Elmquist,J.K., Michl,P., Ahima,R.S., van Bueren,A., McCall,A.L., und Flier,J.S. (1998b). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 3485-3491.

Blüher,M., Michael,M.D., Peroni,O.D., Ueki,K., Carter,N., Kahn,B.B., und Kahn,C.R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3, 25-38.

Broberger,C., de Lecea,L., Sutcliffe,J.G., und Hokfelt,T. (1998a). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp Neurol.* 402, 460-474.

- Broberger,C., Johansen,J., Johansson,C., Schalling,M., und Hokfelt,T. (1998b). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15043-15048.
- Bronstein,D.M., Schafer,M.K., Watson,S.J., und Akil,H. (1992). Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res.* 587, 269-275.
- Brüning,J.C., Gautam,D., Burks,D.J., Gillette,J., Schubert,M., Orban,P.C., Klein,R., Krone,W., Muller-Wieland,D., und Kahn,C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.
- Brüning,J.C., Michael,M.D., Winnay,J.N., Hayashi,T., Horsch,D., Accili,D., Goodyear,L.J., und Kahn,C.R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell* 2, 559-569.
- Campfield,L.A., Smith,F.J., Guisez,Y., Devos,R., und Burn,P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.
- Campos-Ortega,J.A. (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* 24, 1305-1327.
- Caro,J.F., Kolaczynski,J.W., Nyce,M.R., Ohannesian,J.P., Opentanova,I., Goldman,W.H., Lynn,R.B., Zhang,P.L., Sinha,M.K., und Considine,R.V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161.
- Chandran,M., Phillips,S.A., Ciaraldi,T., und Henry,R.R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 26, 2442-2450.
- Chen,H., Charlat,O., Tartaglia,L.A., Woolf,E.A., Weng,X., Ellis,S.J., Lakey,N.D., Culpepper,J., Moore,K.J., Breitbart,R.E., Duyk,G.M., Tepper,R.I., und Morgenstern,J.P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495.
- Cheung,C.C., Clifton,D.K., und Steiner,R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489-4492.
- Chua,S.C., Jr., Chung,W.K., Wu-Peng,X.S., Zhang,Y., Liu,S.M., Tartaglia,L., und Leibel,R.L. (1996). Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271, 994-996.
- Cianflone,K., Xia,Z., und Chen,L.Y. (2003). Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim. Biophys. Acta* 1609, 127-143.
- Cogliati,T., Good,D.J., Haigney,M., Delgado-Romero,P., Eckhaus,M.A., Koch,W.J., und Kirsch,I.R. (2002). Predisposition to arrhythmia and autonomic dysfunction in *Nhlh1*-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 4977-4983.
- Combs,T.P., Pajvani,U.B., Berg,A.H., Lin,Y., Jelicks,L.A., Laplante,M., Nawrocki,A.R., Rajala,M.W., Parlow,A.F., Cheeseboro,L., Ding,Y.Y., Russell,R.G., Lindemann,D., Hartley,A., Baker,G.R., Obici,S., Deshaies,Y., Ludgate,M., Rossetti,L., und Scherer,P.E.

- (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* *145*, 367-383.
- Cone, R.D., Lu, D., Koppula, S., Vage, D.I., Klungland, H., Boston, B., Chen, W., Orth, D.N., Pouton, C., und Kesterson, R.A. (1996). The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* *51*, 287-317.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J. und Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* *334*, 292-295.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., und Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480-484.
- Cushman, S.W. und Salans, L.B. (1978). Determinations of adipose cell size and number in suspensions of isolated rat and human adipose cells. *J. Lipid Res.* *19*, 269-273.
- Dallman, M.F., Strack, A.M., Akana, S.F., Bradbury, M.J., Hanson, E.S., Scribner, K.A., und Smith, M. (1993). Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol.* *14*, 303-347.
- Dawid, I.B., Toyama, R., und Taira, M. (1995). LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III* *318*, 295-306.
- DeFronzo, R.A. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* *50*, 191-197.
- Diez, J.J. und Iglesias, P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur. J. Endocrinol.* *148*, 293-300.
- Edholm, O.G. (1977). Energy balance in man studies carried out by the Division of Human Physiology, National Institute for Medical Research. *J. Hum. Nutr.* *31*, 413-431.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., und Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* *21*, 1375-1385.
- Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., und Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp Neurol.* *395*, 535-547.
- Elmquist, J.K., Elias, C.F., und Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* *22*, 221-232.
- Erickson, J.C., Hollopeter, G., und Palmiter, R.D. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* *274*, 1704-1707.
- Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., und Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* *385*, 165-168.
- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., und O'Rahilly, S. (2003). Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N. Engl. J. Med.* *349*, 606-609.

- Fei,H., Okano,H.J., Li,C., Lee,G.H., Zhao,C., Darnell,R., und Friedman,J.M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 7001-7005.
- Flier,J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.
- Flier,J.S., Cook,K.S., Usher,P., und Spiegelman,B.M. (1987). Severely impaired adipin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237, 405-408.
- Friedman,J.M. und Halaas,J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770.
- Gerard,M., Hernandez,L., Wevrick,R., und Stewart,C.L. (1999). Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat. Genet.* 23, 199-202.
- Gobel,V., Lipkowitz,S., Kozak,C.A., und Kirsch,I.R. (1992). NSCL-2: a basic domain helix-loop-helix gene expressed in early neurogenesis. *Cell Growth Differ.* 3, 143-148.
- Goldfine,A.B., Crunkhorn,S., Costello,M., Gami,H., Landaker,E.J., Niinobe,M., Yoshikawa,K., Lo,D., Warren,A., Jimenez-Chillaron,J., und Patti,M.E. (2006). Necdin and E2F4 are modulated by rosiglitazone therapy in diabetic human adipose and muscle tissue. *Diabetes* 55, 640-650.
- Good,D.J., Porter,F.D., Mahon,K.A., Parlow,A.F., Westphal,H., und Kirsch,I.R. (1997). Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the Nhlh2 gene. *Nat. Genet.* 15, 397-401.
- Good,D.J. (2000). How tight are your genes. *Hormones and Behavior* 37, 284-298.
- Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C., und Nairn,R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Graham,M., Shutter,J.R., Sarmiento,U., Sarosi,I., und Stark,K.L. (1997). Overexpression of Agrp leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* 17, 273-274.
- Grill,H.J., Ginsberg,A.B., Seeley,R.J., und Kaplan,J.M. (1998). Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J. Neurosci.* 18, 10128-10135.
- Grill,H.J. und Smith,G.P. (1988). Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am. J. Physiol* 254, 853-856.
- Grunfeld,C., Zhao,C., Fuller,J., Pollack,A., Moser,A., Friedman,J., und Feingold,K.R. (1996). Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J. Clin. Invest* 97, 2152-2157.
- Guillemot,F. und Joyner,A.L. (1993). Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech. Dev.* 42, 171-185.
- Hahn,T.M., Breininger,J.F., Baskin,D.G., und Schwartz,M.W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271-272.

- Hakansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C., und Meister, B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J. Neurosci.* *18*, 559-572.
- Halvorsen, Y.D., Bond, A., Sen, A., Franklin, D.M., Lea-Currie, Y.R., Sujkowski, D., Ellis, P.N., Wilkison, W.O., und Gimble, J.M. (2001). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. *Metabolism* *50*, 407-413.
- Han, C., Liu, H., Liu, J., Yin, K., Xie, Y., Shen, X., Wang, Y., Yuan, J., Qiang, B., Liu, Y.J., und Peng, X. (2005). Human Bex2 interacts with LMO2 and regulates the transcriptional activity of a novel DNA-binding complex. *Nucleic Acids Res.* *33*, 6555-6565.
- Hathout, E.H., Sharkey, J., Racine, M., Ahn, D., Mace, J.W., und Saad, M.F. (1999). Changes in plasma leptin during the treatment of diabetic ketoacidosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *84*, 4545-4548.
- Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., und Martin, R.J. (2001). The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* *2*, 239-254.
- Havel, P.J., Uriu-Hare, J.Y., Liu, T., Stanhope, K.L., Stern, J.S., Keen, C.L., und Ahren, B. (1998). Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am. J. Physiol* *274*, R1482-R1491.
- Hermanson, O., Sugihara, T.M., und Andersen, B. (1999). Expression of LMO-4 in the central nervous system of the embryonic and adult mouse. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* *45*, 677-686.
- Holcomb, I.N., Kabakoff, R.C., Chan, B., Baker, T.W., Gurney, A., Henzel, W., Nelson, C., Lowman, H.B., Wright, B.D., Skelton, N.J., Frantz, G.D., Tumas, D.B., Peale, F.V., Jr., Shelton, D.L., und Hebert, C.C. (2000). FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* *19*, 4046-4055.
- Hood, R.L. (1982). Relationships among growth, adipose cell size, and lipid metabolism in ruminant adipose tissue. *Fed. Proc.* *41*, 2555-2561.
- Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C., und Flier, J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* *10*, 734-738.
- Hu, E., Liang, P., und Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* *271*, 10697-10703.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., und Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131-141.
- Ingalls, A.M., Dickie, M.M., und Snell, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* *41*, 317-318.

- Inui,A. (2000). Transgenic study of energy homeostasis equation: implications and confounding influences. *FASEB J.* *14*, 2158-2170.
- Jan,Y.N. und Jan,L.Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* *75*, 827-830.
- Jay,P., Rougeulle,C., Massacrier,A., Moncla,A., Mattei,M.G., Malzac,P., Roeckel,N., Taviaux,S., Lefranc,J.L., Cau,P., Berta,P., Lalande,M., und Muscatelli,F. (1997). The human neccdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat. Genet.* *17*, 357-361.
- Jing,E., Nillni,E.A., Sanchez,V.C., Stuart,R.C., und Good,D.J. (2004). Deletion of the Nhlh2 transcription factor decreases the levels of the anorexigenic peptides alpha melanocyte-stimulating hormone and thyrotropin-releasing hormone and implicates prohormone convertases I and II in obesity. *Endocrinology* *145*, 1503-1513.
- Joffe,B.I., Panz,V.R., und Raal,F.J. (2001). From lipodystrophy syndromes to diabetes mellitus. *Lancet* *357*, 1379-1381.
- Johnson,J.E., Birren,S.J., und Anderson,D.J. (1990). Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* *346*, 858-861.
- Kastin,A.J. und Pan,W. (2000). Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul. Pept.* *92*, 37-43.
- Katz,E.B., Stenbit,A.E., Hatton,K., DePinho,R., und Charron,M.J. (1995). Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* *377*, 151-155.
- Kershaw,E.E. und Flier,J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *89*, 2548-2556.
- Kim,K.H., Lee,K., Moon,Y.S., und Sul,H.S. (2001). A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *276*, 11252-11256.
- Kobayashi,M., Taniura,H., und Yoshikawa,K. (2002). Ectopic expression of neccdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 42128-42135.
- Kopelman,P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* *404*, 635-643.
- Kow,L.M. und Pfaff,D.W. (1991). The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *38*, 359-364.
- Kristensen,P., Judge,M.E., Thim,L., Ribel,U., Christjansen,K.N., Wulff,B.S., Clausen,J.T., Jensen,P.B., Madsen,O.D., Vrang,N., Larsen,P.J., und Hastrup,S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* *393*, 72-76.
- Krude,H., Biebermann,H., Luck,W., Horn,R., Brabant,G., und Gruters,A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* *19*, 155-157.

- Krüger, M. Molekulare und funktionelle Charakterisierung der neuronalen bHLH Transkriptionsfaktoren NSCL-1 und NSCL-2. 2002. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Krüger, M., Ruschke, K., und Braun, T. (2004). NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control neclin gene expression. *EMBO J.* 23, 4353-4364.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., und Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J. Biol. Chem.* 277, 25863-25866.
- Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., und Kuhar, M.J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29, 293-298.
- Lee, J.E. (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 13-20.
- Leedom, L.J. und Meehan, W.P. (1989). The psychoneuroendocrinology of diabetes mellitus in rodents. *Psychoneuroendocrinology* 14, 275-294.
- Linhart, H.G., Ishimura-Oka, K., DeMayo, F., Kibe, T., Repka, D., Poindexter, B., Bick, R.J., und Darlington, G.J. (2001). C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12532-12537.
- Lo, L.C., Johnson, J.E., Wuenschell, C.W., Saito, T., und Anderson, D.J. (1991). Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* 5, 1524-1537.
- MacDonald, H.R. und Wevrick, R. (1997). The neclin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1873-1878.
- MacDougald, O.A. und Mandrup, S. (2002). Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab* 13, 5-11.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., und Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221, 286-289.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., und Matsuzawa, Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat. Med.* 8, 731-737.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., und Ranganathan, S. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1, 1155-1161.
- Manetopoulos, C., Hansson, A., Karlsson, J., Jonsson, J.I., und Axelson, H. (2003). The LIM-only protein LMO4 modulates the transcriptional activity of HEN1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 891-899.

- Mantzoros,C.S., Qu,D., Frederich,R.C., Susulic,V.S., Lowell,B.B., Maratos-Flier,E., und Flier,J.S. (1996). Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45, 909-914.
- Marsh,D.J., Hollopeter,G., Huszar,D., Laufer,R., Yagaloff,K.A., Fisher,S.L., Burn,P., und Palmiter,R.D. (1999). Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet.* 21, 119-122.
- Martin,R.J., Hausman,G.J., und Hausman,D.B. (1998). Regulation of adipose cell development in utero. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 219, 200-210.
- Mead,P.E., Deconinck,A.E., Huber,T.L., Orkin,S.H., und Zon,L.I. (2001). Primitive erythropoiesis in the *Xenopus* embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128, 2301-2308.
- Mellon,P.L., Windle,J.J., Goldsmith,P.C., Padula,C.A., Roberts,J.L., und Weiner,R.I. (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5, 1-10.
- Mercer,J.G., Hoggard,N., Williams,L.M., Lawrence,C.B., Hannah,L.T., und Trayhurn,P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387, 113-116.
- Mercer,J.G., Moar,K.M., und Hoggard,N. (1998). Localization of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology* 139, 29-34.
- Mori,H., Hanada,R., Hanada,T., Aki,D., Mashima,R., Nishinakamura,H., Torisu,T., Chien,K.R., Yasukawa,H., und Yoshimura,A. (2004). Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.* 10, 739-743.
- Mountjoy,K.G., Mortrud,M.T., Low,M.J., Simerly,R.B., und Cone,R.D. (1994a). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298-1308.
- Mountjoy,K.G., Mortrud,M.T., Low,M.J., Simerly,R.B., und Cone,R.D. (1994b). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298-1308.
- Mueller,W.M., Gregoire,F.M., Stanhope,K.L., Mobbs,C.V., Mizuno,T.M., Warden,C.H., Stern,J.S., und Havel,P.J. (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* 139, 551-558.
- Murre,C., McCaw,P.S., Vaessin,H., Caudy,M., Jan,L.Y., Jan,Y.N., Cabrera,C.V., Buskin,J.N., Hauschka,S.D., und Lassar,A.B.(1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Muscатели,F., Abrous,D.N., Massacrier,A., Boccaccio,I., Le Moal,M., Cau,P., und Cremer,H. (2000). Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 9, 3101-3110.

- Myers, M.G., Jr. (2004). Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 287-304.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem. (Tokyo)* 120, 803-812.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., and Tsai, M.J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 11, 2323-2334.
- Oeffner, F., Korn, T., Roth, H., Ziegler, A., Hinney, A., Goldschmidt, H., Siegfried, W., Hebebrand, J., and Grzeschik, K.H. (2001). Systematic screening for mutations in the human neccin gene (NDN): identification of two naturally occurring polymorphisms and association analysis in body weight regulation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 25, 767-769.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.
- Overstreet, L.S., Hentges, S.T., Bumashny, V.F., de Souza, F.S., Smart, J.L., Santangelo, A.M., Low, M.J., Westbrook, G.L., and Rubinstein, M. (2004). A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J. Neurosci.* 24, 3251-3259.
- Paroush, Z., Finley, R.L., Jr., Kidd, T., Wainwright, S.M., Ingham, P.W., Brent, R., and Ish-Horowicz, D. (1994). Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79, 805-815.
- Perez-Alvarado, G.C., Miles, C., Michelsen, J.W., Louis, H.A., Winge, D.R., Beckerle, M.C., and Summers, M.F. (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nat. Struct. Biol.* 1, 388-398.
- Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1996). The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat. Med.* 10, 524-529.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.
- Rajala, M.W., Obici, S., Scherer, P.E., and Rossetti, L. (2003). Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J. Clin. Invest* 111, 225-230.
- Rajala, M.W., Qi, Y., Patel, H.R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U.B., Sinha, M.K., Gingerich, R.L., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53, 1671-1679.

- Rosen,E.D., Sarraf,P., Troy,A.E., Bradwin,G., Moore,K., Milstone,D.S., Spiegelman,B.M., und Mortensen,R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611-617.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., und Arnheim,N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Saltiel,A.R. (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104, 517-529.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., und Maniatis,T. (1998). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez-Garcia,I. und Rabbitts,T.H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* 10, 315-320.
- Sanger,F., Nicklen,S., und Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 5463-5467.
- Saper,C.B. (1985). Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. *J. Comp Neurol.* 237, 21-46.
- Scherer,P.E., Williams,S., Fogliano,M., Baldini,G., und Lodish,H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746-26749.
- Schwartz,M.W., Erickson,J.C., Baskin,D.G., und Palmiter,R.D. (1998). Effect of fasting and leptin deficiency on hypothalamic neuropeptide Y gene transcription in vivo revealed by expression of a lacZ reporter gene. *Endocrinology* 139, 2629-2635.
- Schwartz,M.W., Peskind,E., Raskind,M., Boyko,E.J., und Porte,D., Jr. (1996a). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2, 589-593.
- Schwartz,M.W., Seeley,R.J., Campfield,L.A., Burn,P., und Baskin,D.G. (1996b). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest* 98, 1101-1106.
- Schwartz,M.W., Woods,S.C., Porte,D., Jr., Seeley,R.J., und Baskin,D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Shimada,M., Tritos,N.A., Lowell,B.B., Flier,J.S., und Maratos-Flier,E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396, 670-674.
- Sindelar,D.K., Havel,P.J., Seeley,R.J., Wilkinson,C.W., Woods,S.C., und Schwartz,M.W. (1999). Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 48, 1275-1280.
- Sliker,L.J., Sloop,K.W., Surface,P.L., Kriauciunas,A., LaQuier,F., Manetta,J., Bue-Valleskey,J., und Stephens,T.W. (1996). Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J. Biol. Chem.* 271, 5301-5304.

- Slot,J.W., Geuze,H.J., Gigengack,S., James,D.E., und Lienhard,G.E. (1991a). Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 7815-7819.
- Slot,J.W., Geuze,H.J., Gigengack,S., Lienhard,G.E., und James,D.E. (1991b). Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* 113, 123-135.
- Smas,C.M., Kachinskas,D., Liu,C.M., Xie,X., Dircks,L.K., und Sul,H.S. (1998). Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression. *J. Biol. Chem.* 273, 31751-31758.
- Smas,C.M. und Sul,H.S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725-734.
- Smith,R.M., Charron,M.J., Shah,N., Lodish,H.F., und Jarett,L. (1991). Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6893-6897.
- Stanley,B.G., Kyrkouli,S.E., Lampert,S., und Leibowitz,S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189-1192.
- Stenbit,A.E., Tsao,T.S., Li,J., Burcelin,R., Geenen,D.L., Factor,S.M., Houseknecht,K., Katz,E.B., und Charron,M.J. (1997). GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat. Med.* 3, 1096-1101.
- Steppan,C.M., Bailey,S.T., Bhat,S., Brown,E.J., Banerjee,R.R., Wright,C.M., Patel,H.R., Ahima,R.S., und Lazar,M.A. (2001a). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.
- Steppan,C.M., Brown,E.J., Wright,C.M., Bhat,S., Banerjee,R.R., Dai,C.Y., Enders,G.H., Silberg,D.G., Wen,X., Wu,G.D., und Lazar,M.A. (2001b). A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 502-506.
- Swaab,D.F. (1997). Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr. Suppl* 423, 50-54.
- Tanaka,T., Yoshida,N., Kishimoto,T., und Akira,S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432-7443.
- Taniura,H., Matsumoto,K., und Yoshikawa,K. (1999). Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J. Biol. Chem.* 274, 16242-16248.
- Tcherpakov,M., Bronfman,F.C., Conticello,S.G., Vaskovsky,A., Levy,Z., Niinobe,M., Yoshikawa,K., Arenas,E., und Fainzilber,M. (2002). The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 49101-49104.
- Ter Horst,G.J., de Boer,P., Luiten,P.G., und van Willigen,J.D. (1989). Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31, 785-797.

- Tozzo,E., Shepherd,P.R., Gnudi,L., und Kahn,B.B. (1995). Transgenic GLUT-4 overexpression in fat enhances glucose metabolism: preferential effect on fatty acid synthesis. *Am. J. Physiol* 268, 956-964.
- Tsai,T.F., Armstrong,D., und Beaudet,A.L. (1999). Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat. Genet.* 22, 15-16.
- Tseng,Y.H., Butte,A.J., Kokkotou,E., Yechool,V.K., Taniguchi,C.M., Kriauciunas,K.M., Cypess,A.M., Niinobe,M., Yoshikawa,K., Patti,M.E., und Kahn,C.R. (2005). Prediction of preadipocyte differentiation by gene expression reveals role of insulin receptor substrates and necdin. *Nat. Cell Biol.* 7, 601-611.
- Uetsuki,T., Takagi,K., Sugiura,H., und Yoshikawa,K. (1996). Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J. Biol. Chem.* 271, 918-924.
- Ukkola,O. (2002). Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur. J. Endocrinol.* 147, 571-574.
- Verbalis,J.G., Blackburn,R.E., Hoffman,G.E., und Stricker,E.M. (1995). Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 395, 209-225.
- Wabitsch,M., Brenner,R.E., Melzner,I., Braun,M., Moller,P., Heinze,E., Debatin,K.M., und Hauner,H. (2001). Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 25, 8-15.
- Wadman,I.A., Osada,H., Grutz,G.G., Agulnick,A.D., Westphal,H., Forster,A., und Rabbitts,T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.
- Wang,N.D., Finegold,M.J., Bradley,A., Ou,C.N., Abdelsayed,S.V., Wilde,M.D., Taylor,L.R., Wilson,D.R., und Darlington,G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.
- Way,J.M., Gorgun,C.Z., Tong,Q., Uysal,K.T., Brown,K.K., Harrington,W.W., Oliver,W.R., Jr., Willson,T.M., Kliewer,S.A., und Hotamisligil,G.S. (2001). Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 276, 25651-25653.
- Wu,Z., Rosen,E.D., Brun,R., Hauser,S., Adelmant,G., Troy,A.E., McKeon,C., Darlington,G.J., und Spiegelman,B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151-158.
- Yaswen,L., Diehl,N., Brennan,M.B., und Hochgeschwender,U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine* 5, 1066-1070.
- Zarjevski,N., Cusin,I., Vettor,R., Rohner-Jeanrenaud,F., und Jeanrenaud,B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753-1758.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., und Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J., und Steiner, D.F. (2002). Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10293-10298.

Zisman, A., Peroni, O.D., Abel, E.D., Michael, M.D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B.B., Wojtaszewski, J.F., Hirshman, M.F., Virkamaki, A., Goodyear, L.J., Kahn, C.R., und Kahn, B.B. (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* 6, 924-928.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., und Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenin
AK	Antikörper
BHLH	Basic Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine serum albumine
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	copied DNA (zur RNA komplementär)
E	Embryonaltag
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
h	Stunde
Kb	Kilobasen
LacZ	B-Galaktosidase
LMO	LIM-only
Lsg.	Lösung
min	Minute
Mut	Mutante
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
T	Thymin
ü.N.	über Nacht
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

6.3 Tagungsbeiträge, Auszeichnungen und Publikationen

Tagungsbeiträge

21.09.2003-24.09.2003	Poster "Activation of the neclin promoter by interaction between NSCL-2 and LMO proteins", ELSO 2003, Dresden
25.02.2005-26.02.2005	Vortrag "Charakterisierung des Fettgewebes NSCL-2 defizienter Mäuse", interne NGFN2 Sitzung, Essen
06.10.2005-08.10.2005	Vortrag "Untersuchungen zum Einfluss von NSCL-2 auf die Fettgewebsstruktur und die Entwicklung von Übergewicht", 21. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft, Berlin
21.01.2006-26.01.2006	eingeladener Vortrag "Deficiency of the neural transcription factor NSCL-2 results in an increased number of preadipocytes in WAT" Poster: "Deficiency of the neural transcription factor NSCL-2 results in an increased number of preadipocytes in WAT" Keystone Symposia, "Adipogenesis, Obesity and Inflammation", Vancouver, BC, Kanada
06.03.2006-07.03.2006	Marr J., Raum K.; Ruschke K., "Effects of leptin deficiency on the elastic bone phenotype of the C57/BL6 mouse", 1st European Symposium on Ultrasound Characterization of Bone, Paris, March 6-7, 2006

Auszeichnungen

2006	NIDDK Scholarship Winner, Keystone Symposia, "Adipogenesis, Obesity and Inflammation", Vancouver, BC, Kanada
------	--

Publikationen

2004	Krüger M. *, Ruschke K.* und Braun T., "NSCL1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control neclin gene expression", <i>EMBO J.</i> , vol. 23, no. 21, pp. 4353-64, 2004; * gleichberechtigte Erstautorenschaft
eingereicht	Ruschke K., Blüher M., Klötting N., Ebel H, und Braun T., "Deficiency of the neuronal transcription factor NSCL-2 causes an increased number of preadipocytes in white adipose tissue"

6.4 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name Karen Ruschke

Geburtsdatum 20.09.1978

Geburtsort Aschersleben

Familienstand ledig, 1 Kind

Schulbildung

1985-1990 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule „Valentina Tereschkova“ in Aschersleben

1991-1997 Gymnasium „Ascaneum“ in Aschersleben, Abschluss mit Abitur

Studium

09.1997-11.2002 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000-2002 Studentische Hilfskraft am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

02.2002-11.2002 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, Inst. für Physiologische Chemie, MLU Halle zum Thema:
Aktivierung von Zielgenen und Beeinflussung des Zellzyklus durch das neuronale bHLH Gen NSCL-2, Gesamtnote: sehr gut

Promotion

ab 2003 Promotion bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun an der MLU Halle

01.2006-04.2006 Wechsel an das Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

seit 05.2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik III der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Blüher

6.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit, wenn nicht extra gekennzeichnet, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Halle, den

Karen Ruschke

6.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Tomas Braun. Neben der Überlassung des Themas danke ich ihm für die beständige, fördernde Unterstützung. Sein Vertrauen und die exzellente Betreuung auch nach seinem Wechsel an das MPI Bad Nauheim haben wesentlich dazu beigetragen, dass die Arbeit abgeschlossen werden konnte.

Prof. Blüher danke ich für die gute Zusammenarbeit während und nach der Promotionszeit.

Meinen Kollegen Undine Ziese, Nicole Glaubitz, Stefan Günther, Thomas Schmid, Jens-Uwe Hartmann, Daniela Bräuer, Dr. Petra und Dr. Herbert Neuhaus, Olesya Vakhrusheva, Svetlana Ustanina, Katja Kolditz, Fikru Belema Bedada, Cristian Smolka, Thilo Borchardt, Katja Zabel, Robert Kramek, Susan Weinlich, Julia Kruse, Dr. Henning Ebel, Dr. Manja Schulze, Annelies Wolter, Anett Thate, Dr. Eva Bober, Dr. Dagobert Glanz, Dr. Friedeman Laube, Dr. Beate Fricke, Dr. Detlev Mennerich, Dawaasuren Agambai Dr. Markus Krüger, Sonja Krüger und anderen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die unablässige Unterstützung, Hilfe und Liebe. Ihr seid mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen.

7 Zusammenfassung

NSCL-2 (neurological stem cell leukaemia) ist ein 15 kDa großes Protein aus der Gruppe der basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren. Für eine Vielzahl von bHLH Proteinen ist die Beteiligung an Determinierungs und Differenzierungsprozessen mitotischer Vorläuferzellen in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden. NSCL-2 gehört zusammen mit NSCL-1, Neuro D und Nex1/Math-2 zu den neuronal exprimierten Differenzierungsfaktoren. Während der Embryogenese der Maus finden sich NSCL-2 Transkripte in weiten Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems. Postnatal fällt die Expression stark ab, ist in adulten Stadien jedoch noch in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Gewichtsregulation an NSCL-2 defizienten Mäusen durchgeführt. Die Tiere zeigen eine postpubertäre Obesität mit einer einhergehenden Leptinresistenz und sind infertil. Necdin, ein in postmitotischen Zellen exprimiertes Gen, wurde in *in vitro* und *ex vivo* Studien als direktes Zielgen von NSCL-2 identifiziert. Der Necdin-Genlocus ist beim Prader-Willi-Syndrom deletiert. Die Patienten leiden unter anderem unter Hypogonadismus und Adipositas. Diese Symptome ähneln dem Phänotyp der NSCL-2 Mutanten. Durch Transaktivierungsexperimente konnten die Aktivierung des Necdinpromotors durch einen oligomeren Proteinkomplex, bestehend aus NSCL-2, dem ubiquitären bHLH Faktor E12, und den Kofaktoren LMO4 und CLIM2 in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen werden.

Adulte NSCL-2 defiziente Tiere zeigten eine Insulinresistenz isolierter Adipozyten, die in *ob/ob* x NSCL-2 *-/-* Doppelmutanten gemildert war. Die Insulinresistenz von NSCL-2 Einzelmutanten scheint sich jedoch auf das Fettgewebe zu beschränken, da die Blutzuckerwerte und durchgeführten Glukosetoleranztests keine Änderungen zeigten und die Serum-Adiponektinspiegel sogar leicht über WT-Niveau lagen.

Eine weitere Auffälligkeit im weißen Fettgewebe ist die stark erhöhte Anzahl an Präadipozyten. Das im Vergleich zum Wildtyp unverändert gute Differenzierungspotential isolierter NSCL-2 *-/-* Präadipozyten zeigte, dass keine zellautonomen Differenzierungsblockaden vorliegen, sondern exogene Signale die Ausbildung reifer Adipozyten beeinflussen. Die Messung der Serum-Resistin-Konzentration ergab signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu *ob/ob* Tieren. Resistin wird vom Fettgewebe sekretiert und kann unter anderem die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten inhibieren. Ob die Veränderungen der Fettgewebsstruktur tatsächlich durch veränderte Level humoraler Faktoren hervorgerufen werden, müssen weitere Arbeiten zeigen.