

# **Prägung des Endocannabinoid-Systems durch Modifikation der frühen postnatalen Ernährung im Cross-fostering-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Merle Ackermann**

aus Krefeld

2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Joachim Wölfle
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schweizer

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.03.2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde – Allgemeine Pädiatrie

Direktor: Prof. Dr. med. Reiner Ganschow

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Hintergründe.....	8
1.2	Physiologie und Pathophysiologie des ECS.....	9
1.2.1	ECS im Gehirn .....	10
1.2.1.1	Hypothalamus .....	11
1.2.1.2	Mesolimbisches System .....	14
1.2.2	ECS in peripheren Geweben.....	15
1.2.2.1	ECS in der Leber.....	15
1.2.2.2	ECS im Fettgewebe.....	16
1.3	Das überaktive ECS und Übergewicht .....	17
1.4	Barker-Hypothese, fetale Programmierung und <i>developmental plasticity</i> .....	18
1.5	Epigenetik.....	21
1.6	Zielsetzung und Hypothese der Arbeit.....	23
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1	Material.....	24
2.1.1	Chemikalien.....	24
2.1.2	Puffer, Nährmedien und Agarplatten .....	25
2.1.3	Enzyme .....	25
2.1.4	Zellen.....	26
2.1.5	Kits .....	26
2.1.6	Geräte .....	26
2.1.7	Software .....	27
2.2	Cross-fostering-Modell .....	27

2.3	Expressionsanalysen.....	30
2.3.1	RNA-Extraktion.....	30
2.3.2	Messung von Konzentration und Reinheit der Ribonukleinsäuren .....	32
2.3.3	Umschreibung in cDNA .....	32
2.3.4	Real-time Polymerasekettenreaktion (PCR).....	32
2.4	Epigenetische Analysen .....	35
2.4.1	DNA-Extraktion.....	35
2.4.2	DNA-Methylierung .....	36
2.4.3	Ermittlung methylierter CpG-Dinukleotide .....	37
2.4.3.1	Bisulfit-Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
2.4.3.2	Gelelektrophorese .....	40
2.4.3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	40
2.4.3.4	Ligation und Klonierung.....	40
2.4.3.5	Aufreinigung und Sequenzierung der klonierten DNA .....	43
2.5	Statistische Analyse .....	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Auswirkungen auf auxologische Parameter .....	45
3.2	Genexpressionsanalysen .....	47
3.3	Konzentrationsmessungen der Endocannabinoide in Leber- und Fettgewebe..	50
3.4	Methylierungsanalysen.....	52
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	58
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1	Schwachpunkte und Stärken des Cross-fostering-Mausmodells.....	59
4.2	Veränderungen im Endocannabinoid-Metabolismus .....	61
4.3	Methylierungsstatus.....	65

4.4	<i>Developmental programming</i> von somatischem Wachstum und dem ECS.....	68
5.	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>71</b>
6.	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
7.	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
8.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
9.	<b>Danksagung</b> .....	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$ 9-THC	$\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol
2-AG	2-Arachidonylglycerol
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
AEA	N-Arachidonylethanolamin
AgPR	<i>Agouti-related peptide</i>
BMI	Body-Mass-Index
CART	<i>Cocaine- and amphetamin-related transcript</i>
CB1R	Cannabinoidrezeptor 1
CB2R	Cannabinoidrezeptor 2
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DAG	Diacylglycerol
DAGL	Diacylglycerollipase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endocannabinoide
ECS	Endocannabinoid-System
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
for	<i>forward</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GH	<i>Growth hormone</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i>
IL6	Interleukin 6
MAGL	Monoacylglycerol-Lipase
mRNA	<i>messenger RNA</i>

NAPE	N-Arachidonylphosphatidylethanolamin
NAPE-PLD	N-Arachidonylphosphatidylethanolamin selektive Phospholipase D
NAT	N-Acyltransferase
NPY	Neuropeptid Y
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Phosphatidylinositol
POMC	Proopiomelanocortin
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Drehzahl
RT	Raumtemperatur
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## 1. Einleitung

### 1.1 Hintergründe

Das Endocannabinoid-System (ECS) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Stoffwechsel und Energiebilanz. Daher ist die Erforschung der physiologischen sowie pathophysiologischen Wirkmechanismen im ECS zu einem zentralen Thema in der Genese der Adipositas und damit der Adipositas-assoziierten metabolischen Erkrankungen geworden. Bisherige Studien beschreiben eine Überaktivität des ECS bei übergewichtigen Menschen (Engeli et al. 2014). Noch ist aber unklar, ob diese Veränderung nur als Folge der Gewichtszunahme oder auch zu Teilen als mitursächlich für die Adipositasentstehung selbst zu werten ist. Einer dauerhaften Dysregulation des ECS könnten etwa Anpassungsvorgänge während früher Entwicklungsphasen (sog. *fetal* oder *developmental programming*) zugrunde liegen. Darauf weisen zahlreiche epidemiologische Studien hin, die ein geringes Geburtsgewicht und intrauterine Wachstumsretardierung gefolgt von einem starken Aufholwachstum in der frühen Kindheit in Korrelation zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen im Erwachsenenalter setzen (Barker et al. 1989; Barker und Fall 1993; Stevens et al. 2014). Das auf jenen Beobachtungen basierende Konzept der *thrifty phenotype*-Hypothese beschreibt, dass das postnatal bessere Nahrungsangebot in Dysbalance zu der Adaptation des Organismus an die ursprünglich weniger günstigen Umwelt- bzw. Ernährungsbedingungen steht und somit den während früher Entwicklungsphasen geprägten Stoffwechsel inadäquat belastet. Dies prädisponiert für Erkrankungen wie Übergewicht, Bluthochdruck und Diabetes mellitus Typ II (Barker 1993; Bateson et al. 2004; McMillen 2005). Die exakten molekularen Veränderungen hinter dieser metabolischen Anpassung sind jedoch noch in weiten Teilen unverstanden. Hierbei könnten epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen, durch welche die transkriptionelle Aktivität von Genen dauerhaft geprägt werden kann.

Aufgrund seiner komplexen Interaktion mit zahlreichen Parametern des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sowie der Einflussnahme auf die Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme selbst, könnte das ECS ein vielversprechendes Ziel dieser frühen Programmierungsvorgänge sein.



Um die Prägarbarkeit des ECS näher zu untersuchen, führten wir Versuche mit Variation der frühen postnatalen Ernährung mittels Veränderung der Wurfgröße im Cross-fostering-Mausmodell durch. Im Fokus dieser Arbeit lagen dabei Genexpressionsanalysen sowie epigenetische Analysen verschiedener Parameter des ECS.

## 1.2 Physiologie und Pathophysiologie des ECS

Bereits seit dem 19. Jahrhundert wird Cannabis in Europa aufgrund seiner antiemetischen und appetitanregenden Wirkung zu medizinischen Zwecken eingesetzt (Zaami et al. 2018). Doch erst im Jahr 1964 gelang die Identifizierung des Wirkstoffes  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) aus der Pflanze *Cannabis sativa* (Gaoni 1964). Mit der Klonierung des Cannabinoidrezeptors 1 (CB1R) im Jahr 1990 sowie der Entdeckung der Liganden AEA und 2-AG in den Jahren 1992 und 1995 (Devane et al. 1992; Matsuda et al. 1990; Sugiura et al. 1995) erfolgte der erstmalige Beweis der Existenz eines endogenen Endocannabinoid-Systems. Im Folgenden soll ein Überblick über die einzelnen Komponenten des ECS, ihre Synthese sowie Degradation und schließlich die metabolischen und zentralnervösen Auswirkungen gegeben werden.

Die Hauptkomponenten des ECS sind die Endocannabinoide (EC) N-Arachidonylethanolamin (Anandamid, AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) und deren auf- und abbauende Enzyme sowie die beiden Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2.

AEA und 2-AG sind Abkömmlinge der Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten  $\omega$ 6-Fettsäure. Diese kommt in phosphorylierter Form ubiquitär in den Lipiddoppelschichten der Biomembranen vor und ist ebenso Ausgangspunkt für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen. Aufgrund der Lipophilie von AEA und 2-AG erfolgt deren Synthese bedarfsangepasst bei einem Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  (Di Marzo et al. 1998). Anandamid wird hauptsächlich über zwei Schritte synthetisiert. Arachidonsäure und Ethanolamin reagieren mittels der N-Acyltransferase (NAT), deren Aktivität durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert wird (Cadas et al. 1996), zu N-Arachidonylphosphatidylethanolamin (NAPE). Mittels der selektiven Phospholipase D (NAPE-PLD) wird NAPE unter Abspaltung von Phosphatidsäure zu Anandamid umgewandelt (Okamoto et

al. 2007). Die intrazelluläre Degradation von Anandamid wird durch das Enzym Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) katalysiert (Cravatt et al. 1996). 2-AG hingegen, das im Gewebe in höheren Konzentrationen als Anandamid vorliegt, wird aus Phosphatidylinositol (PI) gewonnen. Dabei wird PI mittels der Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) umgewandelt und folgend, katalysiert durch das Enzym Diacylglycerollipase (DAGL), zu 2-AG hydrolysiert (Stella et al. 1997). Die Inaktivierung von 2-AG erfolgt durch die Monoacylglycerol-Lipase (MGL) (Dinh et al. 2002).

Die beiden Endocannabinoide AEA und 2-AG wirken als Agonisten an den Rezeptoren CB1 und CB2 (Di Marzo et al. 1998). 2-AG hat dabei eine höhere intrinsische Aktivität als AEA (Mackie 2008).

Cannabinoidrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, über die nach Bindung der EC eine Veränderung der Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Kanälen sowie eine Inhibition intrazellulärer Adenylylcyclasen ausgelöst wird (Howlett 2005). Dies initiiert teils komplexe Folgereaktionen, auf die spezifisch für die verschiedenen Gewebe in den anschließenden Kapiteln näher eingegangen werden soll. Der CB1-Rezeptor wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, darunter vor allem im zentralen Nervensystem, im Fettgewebe, in der Leber, im Pankreas und in den Muskeln. Der CB2-Rezeptor wird hauptsächlich in Zellen des Immunsystems sowie in geringer Ausprägung im zentralen Nervensystem exprimiert (Mackie 2008). Neben den genannten Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 können 2-AG und AEA auch über andere Rezeptoren wie z. B. GPR55 (Ryberg et al. 2007) weitere spezifische Signalwege modulieren.

### 1.2.1 ECS im Gehirn

Endocannabinoide werden, stimuliert durch neuronale Aktivität und einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg, postsynaptisch synthetisiert und gelangen als retrograde Neurotransmitter an die präsynaptisch gelegenen CB1-Rezeptoren. Deren Aktivierung führt letztlich über eine Inhibition der Ausschüttung von Neurotransmittern wie Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat zu einer Veränderung der synaptischen Aktivität (Schlicker und Kathmann 2001). CB1-Rezeptoren sind in zahlreichen unterschiedlichen Hirnarealen nachweisbar (Moldrich und Wenger 2000). Aufgrund ihrer Rolle in der Regulation von

Appetit, Hunger und Nahrungsaufnahme soll im Folgenden der Fokus auf die Effekte des ECS im Hypothalamus und im limbischen System gelegt werden.

Die Bedeutung der zentralen CB1-Rezeptor-vermittelten Effekte auf die Nahrungsaufnahme konnte in zahlreichen Studien verdeutlicht werden. Bereits Foltin et al. zeigten 1988, dass das Rauchen von Marihuana mit dem Cannabinoid  $\Delta^9$ -THC bei männlichen Probanden zu einem erhöhten Konsum hochkalorischer Nahrung führte. Eine Injektion des endogenen Cannabinoids 2-AG in den Nucleus accumbens, ein Teil des mesolimbischen Systems, bewirkte bei zuvor bereits gefütterten Ratten eine gesteigerte Nahrungsaufnahme. Die vorherige CB1R-Blockade mit dem selektiven Antagonisten SR144258 (Rimonabant) konnte die übermäßige Nahrungsaufnahme wiederum verhindern (Kirkham et al. 2002). Mittels systemischer Gabe von SR144258 wurde bei Mäusen, gefüttert *ad libitum*, eine verminderte Aufnahme von besonders schmackhafter (hochkalorischer süßer) Nahrung und bei Mäusen, denen zuvor Nahrung entzogen wurde, eine verminderte Aufnahme normaler Nahrung bewirkt (Rowland et al. 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten des CB1-Rezeptor-Gens (CB1<sup>-/-</sup>) bei Mäusen zu einem schlankeren Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp führte (Ravinet Trillou et al. 2004). Diese und weitere Erkenntnisse lassen zum einen zu dem Schluss kommen, dass eine Überaktivierung des CB1-Rezeptors kombiniert mit einem reichlichen Nahrungsangebot zu einer übermäßigen Nahrungsaufnahme und somit zu einer Anfälligkeit für die Entwicklung von Übergewicht führt (Piazza et al. 2007). Zum anderen wird deutlich, dass die Mechanismen, die zu der beschriebenen CB1R-vermittelten vermehrten Nahrungsaufnahme führen, auf neuroendokriner Ebene ablaufen und letztlich Verhaltensänderungen bewirken (Di Marzo und Matias 2005). Diese Mechanismen werden folgend anhand der Rolle des Hypothalamus und des mesolimbischen Systems erläutert.

#### 1.2.1.1 Hypothalamus

Der Hypothalamus übernimmt über die Vermittlung einer Vielzahl unterschiedlicher neuroendokriner Signale sowohl aus peripheren Geweben als auch aus verschiedenen Hirnregionen eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle des Essverhaltens. Zentraler Mechanis-

mus ist die Ausschüttung orexigener (appetitanregender) und anorexigener (appetitmindernder) Peptide. Dabei ist vor allem der Nucleus arcuatus, ein Kern der mittleren Gruppe im Hypothalamus, von Bedeutung. Dort angesiedelte spezielle Neuronengruppen schützen anorexigene Peptide (Proopiomelanocortin- bzw. POMC-Neuronen) wie  $\alpha$ -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) und CART (*cocaine- and amphetamineregulated transcript*) und orexigene Peptide (NPY/AgRP-Neuronen) wie NPY (Neuropeptid Y) und AgRP (*agoutirelated peptide*) aus (Sohn 2015). Über die Wirkung an entsprechenden Rezeptoren in übergeordneten hypothalamischen Arealen werden Signalwege ausgelöst, die zu einem Hunger- oder Sättigungsgefühl führen. Folgende periphere Hormone koordinieren die Ausschüttung orexigener und anorexigener Peptide:

Ausgeschüttet von Adipozyten bei Zunahme der Fettmasse führt **Leptin** zu einer Aktivierung anorexigener POMC-Neuronen und einer Hemmung orexigener NPY/AgRP-Neuronen. Die Bedeutung von Leptin für die Energiehomöostase konnte am Beispiel von ob/ob-Mäusen gezeigt werden. Ein Gendefekt führte bei diesen zu einer ausbleibenden Bildung von Leptin und konsekutiv zu einem massiven Übergewicht durch Hyperphagie (Houseknecht und Portocarrero 1998). **Ghrelin**, im Nüchternzustand gebildet von Zellen der Magenschleimhaut, führt zu einer Stimulation der NPY/AgRP-Neuronen und somit zu einem orexigenen Effekt. **Cholezystokinin** wird im Duodenum ausgeschüttet und wirkt über Rezeptoren an vagalen Afferenzen und im Nucleus arcuatus anorexigenen. Stimuliert wird die Ausschüttung von Cholezystokinin durch Anwesenheit von Fettsäuren, Aminosäuren und Peptiden im Duodenum (Sobrino Crespo et al. 2014). Auch für das **hypothalamische corticotropin-releasing hormone (CRH)** ist ein anorexigener Effekt beschrieben (Uehara et al. 1998).

Wie lässt sich nun das Endocannabinoid-System in diese komplexen Regelkreise einordnen?

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Endocannabinoiden im Hypothalamus und limbischen System während verschiedener Fütterungsphasen differiert. Dabei war sie während des Entzugs von Nahrung am höchsten (Kirkham et al. 2002). Des Weiteren konnte mittels einer direkten Injektion von AEA in den ventromedialen Hypothalamus im Tierexperiment eine Hyperphagie induziert werden (Jamshidi und Taylor 2001).

Über die Interaktion mit dem peripheren Hormon Leptin übt das ECS einen starken Einfluss auf die Regulation der Nahrungsaufnahme aus. Die Verabreichung von Leptin führte sowohl bei normalen Ratten als auch bei ob/ob-Mäusen, die aufgrund einer Mutation kein Leptin synthetisieren können, zu einer Reduktion von AEA und 2-AG im Hypothalamus. Zudem konnte bei ob/ob-Mäusen, db/db-Mäusen (fehlerhafter Leptinrezeptor) und bei sogenannten *Zucker rats* (fehlerhafter Leptinrezeptor, rezessives Merkmal), deren Gemeinsamkeit die fehlerhafte Leptinwirkung ist, eine erhöhte Konzentration von EC im Hypothalamus nachgewiesen werden (Di Marzo et al. 2001). Der Einfluss von EC auf die Expression von CRH und CART konnte mittels Expressionsanalysen dargestellt werden. Zunächst beschrieben Cota et al. (2003) eine Coexpression des CB1-Rezeptors mit CRH und CART. Gleichzeitig konnten für CB1R-defiziente (sog. *knockout*) Mäuse höhere CRH- und verminderte CART-Level im Hypothalamus nachgewiesen werden. Somit ist die Annahme, dass Endocannabinoide einen direkten Einfluss auf die Funktion oder Expression dieser anorexigenen Peptide haben (Cota et al. 2003). Ebenfalls am Beispiel CB1R-defizienter Mäuse zeigten andere Autoren wiederum eine verminderte Expression der anorexigenen Peptide POMC und CART im Nucleus arcuatus und stellten die Vermutung an, dass die reduzierte Gewichtszunahme bei CB1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gegensatz zu bisherigen Studien (Cota et al. 2003) unabhängig von der Nahrungsaufnahme ist und via Expressionsveränderungen anderer stoffwechselrelevanter hypothalamischer Peptide vermittelt wird. Dies verdeutlicht die komplexe und noch nicht gänzlich verstandene Rolle des ECS in der Regulation der Nahrungsaufnahme (Lage et al. 2015).

Die orexigene Wirkung des peripheren Hormons Ghrelin konnte mittels systemischer Gabe des CB1-Rezeptor-Antagonisten SR141716 umgekehrt werden (Tucci et al. 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass Nahrungsentzug bei Ratten zu einer vermehrten Expression des CB1-Rezeptors auf vagalen Afferenzen Cholezystokinin-exprimierender Neuronen führte. Durch anschließende Nahrungsaufnahme oder Gabe von Cholezystokinin verminderte sich die zuvor gesteigerte Expression wieder rapide (Burdyga et al. 2004). Daher lässt sich ebenfalls auf eine Interaktion des ECS mit der Informationsvermittlung aus dem Gastrointestinaltrakt schließen.

### 1.2.1.2 Mesolimbisches System

Das mesolimbische System übernimmt zum einen durch Auslösen von Glücksgefühlen eine Rolle als Verstärker-/Belohnungssystem, zum anderen ist es involviert in die durch Anreize vermittelte Motivation ein bestimmtes Verhalten zu zeigen (Berridge und Robinson 1998). Hauptbestandteil ist dabei der Nucleus accumbens, der unter Kontrolle des viszeralen sensorischen Kortex Körperempfindungen wie Hunger und Sättigungsgefühl, aber auch Geschmacksempfindungen weitergegeben bekommt. Über dopaminerge Neuronen vermittelt er die Motivation für ein bestimmtes Verhalten wie z. B. Aufsuchen und Aufnahme von Nahrung in Erwartung, eine Belohnung wie z. B. besonders schmackhafte Nahrung zu erhalten. Nach entsprechender Konditionierung reichen bereits Hinweisreize, die eine folgende Belohnung vermuten lassen, aus, um eine Erhöhung des Dopaminspiegels im Nucleus accumbens zu erwirken und letztlich ein Verlangen (sogenanntes *wanting*) nach der Belohnung auszulösen (Berridge und Robinson 1998; Schultz 1998). Zusammengefasst wird dieser Mechanismus als Hypothese der Anreizhervorhebung bezeichnet.

Nun existieren verschiedene Hinweise darauf, dass das Endocannabinoid-System eine Rolle als mesolimbisches Verstärkersystem einnimmt. Bekanntermaßen löst der Konsum von Cannabis mit dem aktiven Wirkstoff THC sowohl beim Tier als auch beim Menschen Belohnungseffekte wie Entspannung, Anxiolyse und Euphorie aus (Ameri 1999; Lupica et al. 2004). Belohnungseffekte, wie sie nach dem Konsum von Drogen ausgelöst werden, sind ihrerseits ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung einer Sucht. Die komplexen Zusammenhänge zwischen dem ECS und Sucht sollen aber nicht Bestandteil dieser Arbeit sein.

Wie bereits in Kapitel 1.2.1 geschildert induzierte die lokale Injektion von 2-AG in den Nucleus accumbens bei Ratten eine gesteigerte Motivation zur Nahrungsaufnahme (Kirkham et al. 2002). Später zeigten dann Cheer et al. (2004), dass ein Agonismus am CB1-Rezeptor die Ausschüttung von Dopamin in Neuronen des Nucleus accumbens bewirkte. Ein weiterer Faktor, der zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führt, ist eine Erhöhung der Schmackhaftigkeit von Nahrung. Im Sinne der hedonischen Bewertung (etwas wird danach beurteilt, wie viel Lust oder Freude es auslöst) bedeutet dies eine Intensivierung des Mögens (sogenanntes *liking*) von Nahrung. In einem Tierexperiment wurde deutlich,

dass eine Aktivierung des ECS durch Gabe von  $\Delta^9$ -THC und Anandamid die Schmackhaftigkeit von Nahrung verstärkt (Higgs et al. 2003). Die genaue Beteiligung des ECS an der Vermittlung hedonischer Aspekte im Belohnungssystem ist bisweilen zwar ungeklärt, jedoch heben kürzlich erschienene Studienergebnisse die Bedeutung des ECS an diesen hervor (Friemel et al. 2014).

### 1.2.2 ECS in peripheren Geweben

Verschiedene Beobachtungen legen nahe, dass die gewichtsreduzierende Wirkung der CB1-Rezeptorblockade nicht auf der alleinigen Reduktion der Nahrungsaufnahme basiert. Vielmehr ist die langfristige gewichtsreduzierende Wirkung auf die Regulation des peripheren Energiemetabolismus zurückzuführen (Colombo et al. 1998; Cota et al. 2003). Dies lässt sich am Beispiel der CB1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen. Obwohl sie sowohl in den ersten Lebenswochen als auch als adulte Tiere zwar weniger Nahrung im Vergleich zu Wildtypmäusen zu sich nahmen, konnte anhand von *pair-feeding*-Experimenten gezeigt werden, dass erwachsene CB1<sup>-/-</sup>-Mäuse bei vergleichbarer Nahrungsaufnahme zu CB1<sup>+/+</sup>-Mäusen weiterhin einen schlankeren Phänotyp besaßen (Cota et al. 2003).

#### 1.2.2.1 ECS in der Leber

Wenngleich unter physiologischen Bedingungen die CB1-Rezeptor-Expression in der Leber gering ist, findet sich in pathologischen Zuständen wie der Steatosis hepatis und der Leberzirrhose eine vermehrte hepatozelluläre CB1-Rezeptorexpression (Osei-Hyiaman et al. 2005). Dass darin ein Zusammenhang besteht, impliziert zunächst die Beobachtung der durch die CB1R-Aktivierung bedingt vermehrten Expression von SREBP-1c, einem wichtigen Transkriptionsfaktor für die hepatische Lipogenese (Osei-Hyiaman et al. 2005). Auch ließ sich durch eine fettreiche Ernährung eine vermehrte CB1-Rezeptordichte und ein erhöhtes AEA-Level induzieren. Um dabei eine Unterscheidung zwischen zentralen und peripheren CB1R-vermittelten Effekten vornehmen zu können, untersuchten Osei-Hyiaman et al. (2008) die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung auf Mäuse mit leber-

spezifischem CB1R-*knockout*. Zwar präsentierten sie einen dem Wildtyp ähnlich übergewichtigen Phänotyp, metabolische Veränderungen wie Steatosis, Leptin- und Insulinresistenz, Hyperglykämie und Dyslipidämie waren aber, wie ebenfalls bei CB1-/-Mäusen beobachtet, deutlich geringer ausgeprägt als beim Wildtyp.

#### 1.2.2.2 ECS im Fettgewebe

Auch im Fettgewebe werden alle relevanten Bestandteile des ECS exprimiert, so dass das ECS den fettgewebsspezifischen Metabolismus beeinflusst. Bensaid et al. (2003) zeigten, dass über Antagonismus am CB1R via SR141716 eine vermehrte mRNA-Expression des Adipozyten-spezifischen Plasmaproteins Acrp30 (Adiponektin) bewirkt werden konnte. Adiponektin, ein sog. Adipokin (fettgewebsspezifisches Zytokin), wird vor allem dann produziert, wenn Adipozyten einen niedrigen Gehalt an Speicher-Triglyceriden haben. Dementsprechend korrelieren niedrige Adiponektin-Level mit Übergewicht, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Arteriosklerose (Chandran et al. 2003; Shimada et al. 2004). Auch in weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass ein Antagonismus am CB1-Rezeptor mittels SR141716 einen Anstieg der Adiponektinkonzentration induziert (Poirier et al. 2005).

Gleichzeitig beschrieben die Autoren (Bensaid et al. 2003), dass eine Hochregulation der CB1-Rezeptorexpression in Adipozyten fettleibiger Mäuse vorliegt. Ein wichtiger metabolischer Effekt ist die CB1R-abhängige Aktivierung der Lipoproteinlipase, wodurch es letztlich ähnlich der Effekte des ECS in der Leber zur vermehrten Lipogenese und somit zur Fettakkumulation kommt (Cota et al. 2003).

Allerdings kamen später durchgeführte Studien zu dem Schluss, dass zwischen der CB1R-Expression und der Adiponektinkonzentration in menschlichen Adipozyten keine Korrelation besteht (Löfgren et al. 2007).

Damit ergeben sich weitere mögliche, in weiten Teilen aber noch ungeklärte Einflussmöglichkeiten des ECS in der Pathophysiologie von Übergewicht und Übergewicht-assoziierten Erkrankungen.



### 1.3 Das überaktive ECS und Übergewicht

Betrachtet man das Endocannabinoid-System aus evolutionsbiologischer Sicht, liegt eine wesentliche Funktion in der Maximierung der Nahrungsaufnahme und Energiespeicherung in Zeiten der Nahrungsknappheit. Damit konnte ein Überleben gesichert werden (Di-Patrizio und Piomelli 2012). In der heutigen Zeit, in der ein reichliches Nahrungsangebot vorliegt, vermittelt ein überaktives ECS hingegen die Entstehung von Übergewicht und metabolischen Erkrankungen (Engeli et al. 2014; Silvestri und Di Marzo 2013).

Um den genaueren Zusammenhang zwischen einer Überaktivierung des ECS und der Genese von Übergewicht erklären zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene Studien mit Fokus auf die Konzentration der endogenen Cannabinoide AEA und 2-AG und die Expression der relevanten synthetisierenden und degradierenden Enzyme durchgeführt.

Zunächst zeigten verschiedene Autoren, dass die Plasmakonzentrationen von AEA und 2-AG positiv mit dem Body-Mass-Index (BMI) korrelieren (Cote et al. 2007; Engeli et al. 2005). Ebenfalls konnte eine positive Korrelation der FAAH-Aktivität in Adipozyten, nicht jedoch der Aktivität von MGL mit dem BMI männlicher Probanden beschrieben werden (Cable et al. 2011). Im Tiermodell ließ sich später hingegen auch für MGL eine gesteigerte Enzymaktivität in Adipozyten fettleibiger Tiere nachweisen (Cable et al. 2014). Aus der Beobachtung, dass sowohl bei normgewichtigen als auch bei übergewichtigen Versuchspersonen ein präprandialer AEA-Peak messbar ist und nach Nahrungsaufnahme bei normgewichtigen Personen wieder abfällt, lässt sich der Schluss ziehen, dass AEA möglicherweise die Nahrungsaufnahme initiiert. Bei den übergewichtigen Versuchspersonen hingegen zeigte sich ein deutlich verspäteter postprandialer AEA-Abfall, so dass eine Dysregulation des postprandialen AEA-Level bei Übergewichtigen anzunehmen ist (Gatta-Cherifi et al. 2012). Letztlich sind die Mechanismen, die zu der beschriebenen Überaktivierung des ECS führen, noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt eine adaptive Prägung von einzelnen Parametern des ECS hier eine entscheidende Rolle.

Für eine signifikante Beteiligung von Polymorphismen in Genen des ECS an der bei Adipositas zu beobachtenden ECS-Überaktivierung ergab sich in den bisherigen Untersuchungen kein Anhalt (Jensen et al. 2007; Schleinitz et al. 2010). Daher ergibt sich die

Frage, auf welcher Ebene eine Regulierung der Genaktivität im ECS stattfindet. Auf die mögliche Rolle epigenetischer Mechanismen wird in dieser Arbeit eingegangen.

#### 1.4 Barker-Hypothese, fetale Programmierung und *developmental plasticity*

Aufgrund ihrer immensen gesellschaftlichen Bedeutung ist die Erforschung der Ätiopathogenese von Zivilisationskrankheiten wie dem metabolischen Syndrom, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes mellitus zu einem Kerngebiet der modernen Wissenschaft geworden. Neben zahlreichen weiteren Risikofaktoren wie etwa Bewegungsmangel, Noxen oder ungünstigen Ernährungsgewohnheiten ist in den letzten Jahrzehnten zunehmend das Konzept der *Developmental Origins of Health and Disease*, abgeleitet von der Hypothese, dass eine sog. fetale Programmierung eine erhebliche Rolle in der Prägung des späteren Phänotyps und damit auch der Entwicklung metabolischer Erkrankungen spielen könnte (Barker 1993; Lucas 1994), zu einem weiteren möglichen Erklärungsmodell geworden (Barker 2004; Gluckman und Hanson 2006; Godfrey 2006; Wadhwa et al. 2009).

Grundlage für die Entwicklung dieser Theorie sind zunächst epidemiologische Beobachtungen aus den 1980er- und 1990er-Jahren. 1986 beschrieben Barker und Osmond erstmalig einen Zusammenhang zwischen der Mortalität von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Schlaganfällen in den Jahren 1968 bis 1978 und der Neugeborenensterblichkeit in den Jahren 1921 bis 1925. Sie kamen zu der Schlussfolgerung, dass sich das Erkrankungsrisiko bei Nachkommen von Müttern in schlechter gesundheitlicher Verfassung erhöht (Barker und Osmond 1986). Es folgten weitere Studien, in denen sich Zusammenhänge zwischen Umweltfaktoren wie insbesondere Unterernährung respektive Unterversorgung *in utero*, die zu einer Schädigung von Wachstum und Entwicklung führen und ein vermindertes Geburtsgewicht bedingen, und dem Risiko für die Entwicklung metabolischer Erkrankungen im Erwachsenenalter fanden (Barker et al. 1989a; Barker et al. 1989b). Weitere in den folgenden Jahren durchgeführte Studien konnten auch den Zusammenhang von niedrigem Geburtsgewicht und der Erkrankung an Bluthochdruck (Leon et al. 2000) bzw. der Entwicklung kardiovaskulärer Risikofaktoren (Bavdekar et al. 1999) im Erwachsenenalter bestätigen. Hales und Barker formulierten schließlich die Hypothese

vom sparsamen Phänotyp (*thrifty phenotype hypothesis*) und lieferten damit einen Erklärungsansatz für das später vermehrte Auftreten von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 bei ehemals *in utero* unterversorgten Kindern. Die Annahme ist, dass zur Sicherstellung der Versorgung lebenswichtiger Organe wie beispielsweise des Gehirns höhere Blutglukoselevel aufrechterhalten werden. Hat sich der Organismus auf diese Weise an seine Umwelt angepasst, maximiert er dadurch seine Überlebenschancen. Bessert sich hingegen das postnatale Nahrungsangebot, begünstigen diese Adaptationsmechanismen die Entwicklung von Diabetes (Hales und Barker 1992; Hales und Barker 2001). Man geht somit von einem Missverhältnis zwischen der pränatalen Voraussage und der postnatalen Realität der Umweltbedingungen aus. Adaptationsvorgänge, die auf der pränatalen Voraussage basieren, werden von einigen Autoren auch als *predictive adaptive responses* bezeichnet (Gluckman et al. 2005).

Weitere Erkenntnisse konnten aus dem Langzeit-Follow-up der sog. *Dutch famine*-Kohorte gewonnen werden. Diese Kohorte umfasst die um den Kriegswinter 1944/45 geborenen Nachkommen von Frauen, die im Jahr 1944 über eine Periode von einigen Monaten einer extremen Hungersnot und damit einer zeitweisen Unterernährung ausgesetzt waren (Roseboom et al. 2006). In Übereinstimmung mit den von Barker berichteten Beobachtungen zeigten Erwachsene, die als Feten von einer Mangelernährung betroffen waren, eine im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöhte Inzidenz an Glukoseintoleranz, kardiovaskulären Erkrankungen und Übergewicht (Painter et al. 2006; Roseboom et al. 2006).

Schließlich lassen sich all diese epidemiologischen Beobachtungen mit dem Begriff *developmental plasticity* beschreiben. Darunter versteht sich die Fähigkeit eines Genotyps, verschiedene Phänotypen als Antwort auf die jeweiligen Umweltbedingungen zu entwickeln (Barker 2004; Bateson et al. 2004). Führen frühere Umweltbedingungen zu einem Phänotyp, der unzureichend an aktuelle Umstände angepasst ist, kann dies negative Auswirkungen auf das Überleben des Individuums haben (Bateson et al. 2004). Dabei führen nicht nur Umwelteinflüsse in der wie bisher beschriebenen pränatalen Phase zu ungünstigen Adaptationsvorgängen. Auch während der postnatalen Phase scheint dem Organismus noch die Möglichkeit gegeben zu sein, sich an die jeweilige Umwelt anzupassen.

Beobachtungen aus Finnland bestätigen das. Die höchsten Erkrankungsraten an koronarer Herzkrankheit zeigten sich bei Männern, die als Säuglinge ein geringes Geburtsgewicht aufwiesen, dem eine rapide postnatale Gewichtszunahme (*rapid catch up growth*) folgte, die schließlich zu einem überdurchschnittlichen BMI in der Kindheit führte (Eriksson et al. 1998). Später konnte gezeigt werden, dass das metabolische Profil solcher Kinder Veränderungen aufweist, die sich möglicherweise mit einem kardiovaskulären Risiko in Verbindung bringen lassen (Stevens et al. 2014).

Auch im tierexperimentellen Modell ließen sich die oben geschilderten epidemiologischen Beobachtungen nachvollziehen. Bei Nagern zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer perinatalen Unterernährung des Muttertiers und dem verminderten Geburtsgewicht der Jungen, gefolgt von einer postnatalen Hyperphagie und der Entwicklung von Übergewicht, Bluthochdruck und erhöhten Insulinleveln (Vickers et al. 2000). In einer Folgestudie wurde darüber hinaus untersucht, ob eine perinatale Unterernährung zu Verhaltensänderungen der Nachkommen führt, und es wurde deutlich, dass diese langfristig deutlich weniger körperlich aktiv waren als die Kontrollgruppe (Vickers et al. 2003). Schließlich demonstrierten Gorski et al. (2006), dass auch die postnatale Umwelt Einfluss auf die spätere Entwicklung von Stoffwechselstörungen haben kann. Im Cross-fostering verbesserte sich die Insulinsensitivität der Nachkommen von fettleibigen Muttertieren, wenn sie postnatal von genetisch schlanken Muttertieren aufgezogen wurden. Umgekehrt entwickelten Nachkommen schlanker Muttertiere, postnatal aufgezogen von fettleibigen Muttertieren, Übergewicht und Insulinresistenz. Die Autoren postulieren, dass der Gehalt an Insulin und Fettsäuren in der Muttermilch ungünstige Veränderungen in hypothalamischen Signalwegen bewirken könnte.

Neben der Erforschung der molekularen Aspekte der *developmental plasticity* gilt es, insbesondere auch die genauen Zielkaskaden der fetalen Programmierung, die schließlich das erhöhte Erkrankungsrisiko im Erwachsenenalter bedingen, zu identifizieren. Hierbei gibt es bereits erste Hinweise, dass auch innerhalb des Endocannabinoid-Stoffwechsels derartige Anpassungsvorgänge möglich sind (Cinquina et al. 2020; Keimpema et al. 2013; Schlabritz-Loutsevitch et al. 2016). Beeinflusst durch mütterliche Ernährung bzw. den mütterlichen Stoffwechsel in der Schwangerschaft kann der Endocannabinoid-Stoffwechsel in Ungleichgewicht geraten. Hierdurch werden im Fetus Formation und Funktion von

Hypothalamus und Hippocampus durch Beeinflussung der neuronalen Zellentwicklung verändert, was die Autoren mit einer Begünstigung der Entstehung metabolischer und neuropsychiatrischer Erkrankungen in Verbindung bringen (Keimpema et al. 2013). In einer Folgearbeit beschreiben die Autoren dieser Arbeitsgruppe, dass die Differenzierung kortikaler Neurone beeinflusst wird durch eine hochkalorische Diät angereichert an Omega-6-Fettsäuren. Aus Omega-6-Fettsäuren in Überzahl synthetisierte Endocannabinoide führen über eine Desensibilisierung des CB1R zu Hypermethylierungen von Genen, die für die Transkriptionsfaktoren STAT3, MYB und CEBPB codieren, wodurch letztlich für das neuronale Wachstum relevante Gene inaktiviert werden (Cinquina et al. 2020). Des Weiteren beschreiben Schlabritz-Loutsevitch et al. (2016), dass mütterliches Übergewicht zum sog. *Fetal Syndrome of Endocannabinoid Deficiency* (FSECD) führt, das charakterisiert ist durch die Erkrankungen Reizdarmsyndrom, Autismus-Spektrum-Störungen, Asthma und Insulinresistenz. Allerdings gehen die Autoren eher von einem fetalen Endocannabinoid-Mangel durch gleichsinnig erniedrigte EC-Spiegel sowohl bei der Mutter als auch bei dem Fetus als von einer ursächlich auf den Fetus beschränkten „fehlerhaften“ fetalen Programmierung aus.

## 1.5 Epigenetik

Ein möglicher Weg, über den Umweltfaktoren mit Genen interagieren, um einen anderen Phänotyp hervorzurufen, ist die Anpassung im Epigenom (Gluckman et al. 2009; Jang und Serra 2013; Vickers 2014). Unter dem Epigenom versteht man die Gesamtheit von epigenetischen Veränderungen, die molekular die Aktivität von Genen beeinflussen, ohne dabei die genomische DNA-Sequenz selber zu verändern. Das Epigenom stellt einerseits ein labiles System dar, das durch Umwelteinflüsse wie beispielsweise Ernährung oder Stress modifiziert werden kann (Jang und Serra 2013). Andererseits sind epigenetische Veränderungen mitotisch vererbbar und überdies reversibel, weshalb die Idee von epigenetischen Therapien zunehmend an Bedeutung gewinnt und im Rahmen von Krebstherapien bereits in Ansätzen verwirklicht werden konnte (Griffiths und Gore 2013).

Epigenetische Modifikationen können unterteilt werden in DNA-Methylierungen, Abwandlungen von Histonen (Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitinierungen u.a. (Bernstein et al.)), nicht-codierende microRNA (Regulation der mRNA Translation (Guil und Esteller 2009)) sowie Positionierungen von Nucleosomen (D'Addario et al. 2013). Zusammengefasst wird durch diese Modifikationen die Struktur und Funktion des Chromatins sowie die Bindung von Transkriptionsfaktoren und Repressoren an Promotorregionen beeinflusst.

Insbesondere die Untersuchung der DNA-Methylierung ist aktuell von großem wissenschaftlichen Interesse und darüber hinaus Gegenstand dieser Arbeit. DNA-Methylierung erfolgt, katalysiert von DNA-Methyltransferasen, durch Hinzufügen einer Methylgruppe an die C5-Position der Nukleinbase Cytosin innerhalb von CpG-Dinukleotiden. CpG-Dinukleotide finden sich im Genom vorwiegend gebündelt in sog. CpG-Inseln, die wiederum in hoher Dichte in den für die Transkription wichtigen Promotorregionen vorliegen (D'Addario et al. 2013). Über die zusätzliche Bindung von *methyl-CpG-binding*-Proteinen wie MeCP2 an methylierte Cytosine und der darauffolgenden Rekrutierung von Histon-Deacetylasen wird letztlich die Chromatinstruktur so verändert, dass die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren zur Promotorregion beschränkt wird. Eine verstärkte Methylierung ist daher assoziiert mit einer Suppression der Transkription, wohingegen eine verminderte Methylierung in einer vermehrten Genexpression resultiert (D'Addario et al. 2013). Dass Umwelteinflüsse wie die mütterliche Ernährung direkte Auswirkungen auf Methylierungsmuster einzelner Gene der Nachkommen haben können, wurde bereits empirisch (Heijmans et al. 2008) und experimentell belegt (Waterland und Jirtle 2003). Im tierexperimentellen Modell mit *viable yellow agouti*-Mäusen konnten mittels Supplementation Methylgruppenliefernder Nährstoffe wie Vitamin B12 und Folsäure in unterschiedlichen Mengen während der frühen Schwangerschaft Veränderungen der Fellfarbe und des Körpergewichts genetisch identischer Nachkommen bewirkt werden. Dies führten die Autoren auf interindividuell unterschiedliche Methylierungsmuster im Agouti-Gen zurück. Dabei zeigte sich eine eindeutige Korrelation der Methylierungsdichte zu den definitiven Phänotypen (Waterland und Jirtle 2003).

## 1.6 Zielsetzung und Hypothese der Arbeit

Adipositas und damit assoziierte metabolische Erkrankungen sind mit einer Hoch- bzw. Dysregulation im Endocannabinoid-System vergesellschaftet. Unklar ist, ob die in verschiedenen Organsystemen messbaren Veränderungen des ECS hierbei lediglich die Folge oder bereits einen mitursächlichen Faktor bei der Entwicklung Adipositas-assoziiierter Erkrankungen darstellen. Nachdem bereits in einer vorangegangenen Arbeit dieser Arbeitsgruppe (Michalik 2013) unter Verwendung einer Cross-fostering-Strategie im Mausmodell gezeigt werden konnte, dass eine Veränderung der frühen postnatalen Ernährung durch Variation der Anzahl zu stillender Jungtiere zu einer anhaltenden Prägung von somatischem Wachstum und Parametern der somatotropen Hypophysenfunktion sowie auch der Entwicklung von Körpergewicht und Körperfettverteilung führt, ist nun Ziel der vorliegenden Arbeit, im genannten Modell die Prägbarkeit des ECS zu untersuchen. Die Tiere der unterschiedlichen Ernährungsgruppen sind im untersuchten Alter von 50 und 100 Tagen nicht als fehlernährt oder bereits krankhaft adipös zu bewerten. Vielmehr sind die unterschiedlichen Entwicklungsverläufe als phänotypische Bandbreite zu verstehen, die aus dem früh-postnatal innerhalb physiologischer Grenzen kontrollierten Ernährungsregime resultiert. Wir stellten die Hypothese auf, dass die durch Variation der frühen postnatalen Ernährung erzeugten Unterschiede von Wachstum und Parametern der somatotropen Funktion auch von einer differentiellen Transkription und Expression von Mitgliedern des ECS in stoffwechselaktiven Geweben begleitet sein könnte. Der Nachweis von anhaltenden Genexpressionsunterschieden könnte demnach auf eine früh erfolgte Prägung dieses Systems als möglichen Wegbereiter für die spätere Entwicklung metabolischer Erkrankungen hinweisen.

Ergänzend zu den Expressionsanalysen in verschiedenen metabolischen Zielgeweben (weißes Fettgewebe, Leber, Hypothalamus) sollte auch die DNA-Methylierung ausgewählter Promotorbereiche der analysierten Gene untersucht werden, die weitere Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Prägung liefern könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethanol	Otto Fischar, Saarbrücken
TRIzol Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Seelze
Low Mass DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
UltraPure Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agar-Pulver	AppliChem, Darmstadt
SOB-Pulver	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin-ratiopharm	Ratiopharm, Ulm
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> , 50 mM)	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> , 1M)	AppliChem, Darmstadt
Ribonukleotid-Lösung (NTP, 20 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Q-Solution (5x)	Qiagen, Hilden
Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi, Graz
Glucose 40 %	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl, 1M)	Fresenius Kabi, Graz
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
X-Gal	Fermentas, St. Leon-Rot



### 2.1.2 Puffer, Nährmedien und Agarplatten

#### TE-Puffer

Tris-HCl (10 mM), EDTA (0,1 mM), pH 7,5

#### LB-Agar (*lysogeny broth*)

LB-Agar-Pulver: Mischung aus Agar (15 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), Natriumchlorid (5 g/l), Trypton (10 g/l). Hiervon wurden 28 g mit 600 ml H<sub>2</sub>O mittels Magnetrührer vermischt, mit NaOH 5N auf einen pH von 7,5 titriert, mit 600 ml H<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 121 °C über 20 min autoklaviert. Nach Abkühlung auf < 50 °C wurden 800 µl Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml), 4 ml IPTG sowie 1,28 ml X-Gal hinzugegeben und bei 4 °C gelagert.

#### Nährmedium SOB (*super optimal broth*)

SOB-Pulver: Mischung aus Hefeextrakt (5 g/l), Natriumchlorid (0,5 g/l) und Trypton (20 g/l). Hiervon wurden 5,1 g mit 150 ml H<sub>2</sub>O mittels Magnetrührer vermischt, mit NaOH 5N auf einen pH von 7,5 titriert, 0,5 ml KCl 1 M hinzugegeben und mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml aufgefüllt. Anschließend wurde eine Autoklavierung bei 121 °C über 20 min durchgeführt.

#### Nährmedium SOC (*super optimal broth with catabolite repression*)

10 ml SOB-Medium + 100 µl MgCl<sub>2</sub> (1M) + 90 µl Glucose 40 %

### 2.1.3 Enzyme

Exonuclease I	Fermentas, St. Leon-Rot
Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fast AP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase (recombinant 500 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim

## 2.1.4 Zellen

JM 109 Competent Cells Promega, Mannheim

## 2.1.5 Kits

EZ DNA Methylation-Direct Kit Zymo Research, Irvine, CA, USA

pGEM®-T Vector System II Promega, Mannheim

RNeasy Mini Kit Qiagen, Hilden

DNeasy Blood&Tissue Kit Qiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

QIAshredder spin column Qiagen, Hilden

RNeasy spin column Qiagen, Hilden

SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit Invitrogen, Karlsruhe

SYBR Green I Master Mix Roche, Penzberg

## 2.1.6 Geräte

Bandelin electronic UW 2070 Bandelin electronic, Berlin

Bandelin Sonopuls HD 2070 Bandelin electronic, Berlin

BDA digital Transilluminator TI1 Biometra, Göttingen

Centrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg

Waterbath 1083 GFL, Burgwedel

Magnetrührer MR 3001 Heidolph Instruments, Schwabach

Labor-pH-Meter CG843 Schott, Mainz

Lightcycler 480 II Roche, Penzberg

Maxi Oven MWG-Biotech, Ebersberg

Real-Time PCR Cycler Rotor-Gene 6000	Corbett Research, Hilden
Waage Scaltec SBC53	Scaltec Instruments, Göttingen
Eismaschine Scotsman AF100	Scotsman Ice, Milan
Thermocycler Tpersonal 48	Biometra, Göttingen
WPA Biowave II UV	Biochrome, Cambridge (UK)

### 2.1.7 Software

BioDoc Analyze digital Version 2.0	Biometra, Göttingen
BIQ Analyzer	Max-Planck-Institut, München
Chromas LITE Version 2.01	Technelysium Pty Ltd., Brisbane
SPSS Statistics Version 19	IBM, Chicago (USA)
Ensemble Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org">www.ensembl.org</a> ; Cambridge

## 2.2 Cross-fostering-Modell

Cross-fostering (sog. Fremdpflege) bzw. Aufzucht der Tiere sowie die Gewinnung der Organproben, die Geschlechtsbestimmung und die Auswertung der auxologischen Parameter sind Teile einer anderen wissenschaftlichen Arbeit aus dieser Arbeitsgruppe (Michalik 2013). Die Durchführung des Tierversuches wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A125).

Ausgangspunkt des Cross-fostering-Experiments waren weibliche Balb/c-Mäuse, die mit männlichen C57BL/6-Mäusen bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) gepaart wurden. Schwangere Muttertiere mit 16 Tage alten Embryos (E16) wurden an unser Labor übersandt. Wasser und Futter waren den Muttertieren frei zugänglich. Vier Tage nach der Ankunft (E20) gebaren sie im Mittel  $6,7 \pm 1,7$  CB6F1-Hybrid-Junge, die 24–36 Stunden später in Gruppen von drei, sechs oder zehn Jungen pro Muttertier umverteilt

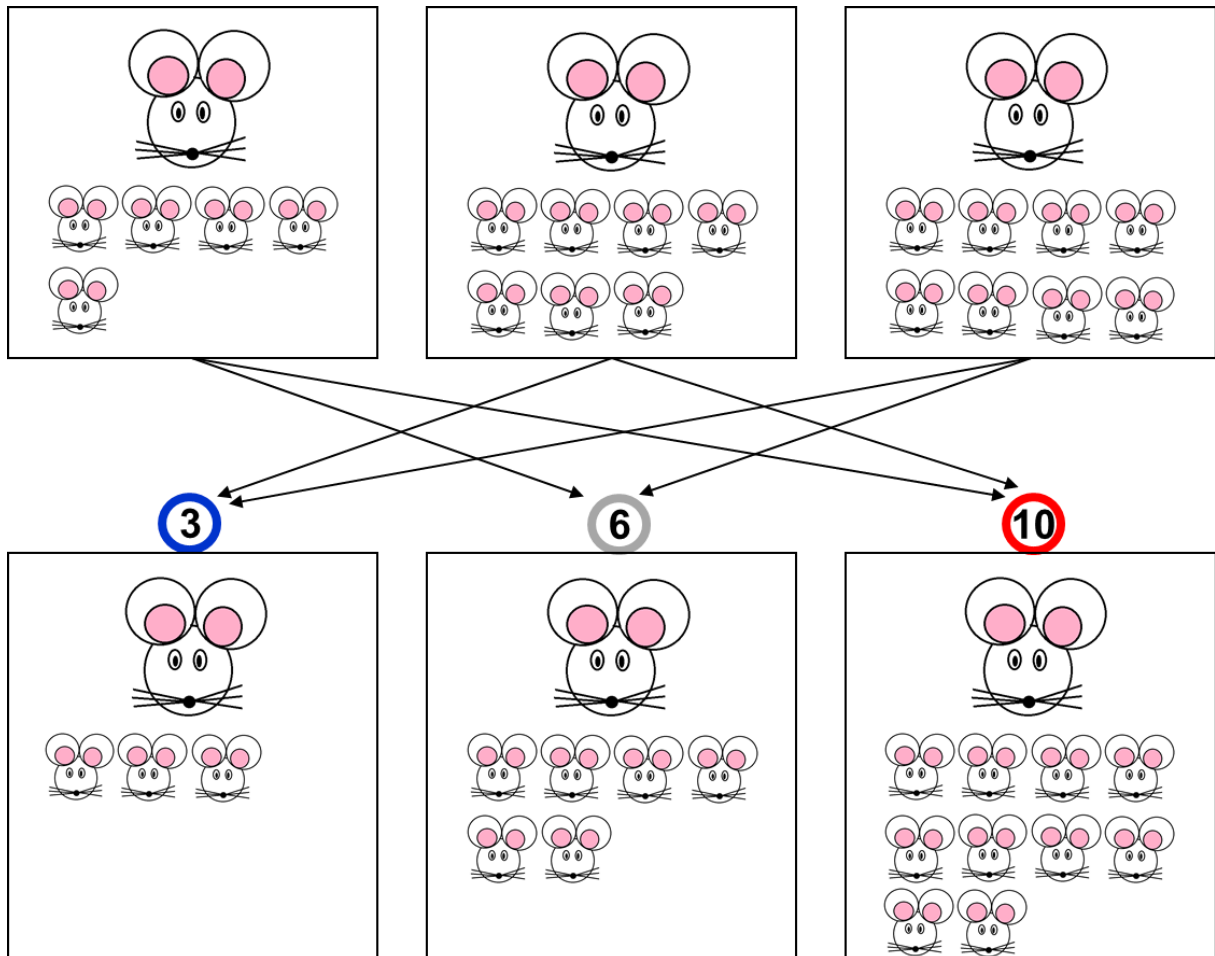
wurden, wobei kein Neugeborenes bei dem leiblichen Muttertier verblieb, um eine ungleiche mütterliche Fürsorge zwischen biologischen und nicht-biologischen Jungtieren zu vermeiden. Durch die unterschiedliche Anzahl zu stillender Jungtiere wurden Gruppen mit unterschiedlichem Nahrungsangebot geschaffen: eine relative Unterernährungs- (zehn Jungtiere pro Mutter), eine Kontroll- (sechs Jungtiere pro Mutter) und eine relative Überernährungsgruppe (drei Jungtiere pro Mutter). Die Überlebensrate am 6. postnatalen Tag (P6) lag bei 91,2 %, wobei die Mehrheit der verstorbenen Jungtiere aus der Gruppe der Unterernährungsgruppe stammte. Von diesen wurden Gruppen mit nur noch acht überlebenden Jungen von weiteren Experimenten und Analysen ausgeschlossen, da die auxologischen Parameter mehr denen der Kontrollgruppe mit sechs Jungen pro Pflegemuttertier ähnelten. Die Überlebensrate zwischen dem 7. (P7) und 21. (P21) postnatalen Tag lag in allen Ernährungsgruppen bei 100 %. Die Geschlechtsbestimmung anhand des SRY-Gens erfolgte an Tag 15. Hierzu wurden 0,3–0,5 cm des jeweiligen Tierschwanzes zerkleinert und die DNA gemäß dem Schnellprotokoll von Laird et al. 1991 isoliert. An Tag 21 (P21) erfolgte nach Abstillen eine erneute Umverteilung. Die Mäuse wurden von den Pflegemuttertieren getrennt und gemischt in Vierergruppen (Weibchen mit mindestens einer Maus aus jeder Ernährungsgruppe) oder alleine (Männchen) in Käfigen gehalten. Durch die Einzelhaltung konnten Rivalität und Aggressionsverhalten der Männchen vermieden werden. Die Käfighaltung erfolgte unter pathogenfreien Bedingungen in IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*) mit einem 12/12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus, einer konstanten Temperatur von 22 °C und einer freien Verfügbarkeit von Wasser und Futter.

An den Tagen P20, P50 und P100 erfolgte die Tötung von Mäusen der unterschiedlichen Gruppen nach vorheriger Fastenperiode von vier bis sechs Stunden während einer Anästhesie mittels Kohlenstoffdioxid durch den Bruch des Genicks. Die Organe wurden entnommen, gewogen und unmittelbar danach bei -80 °C zur weiteren Lagerung eingefroren. Die Feinpräparation der Hypothalamuskern wurde von Dr. Eva Rother, Universität Köln, durchgeführt.

Parallel zu der im Alter von 50 Tagen getöteten Kohorte wurden an einer weiteren Kohorte Verhaltenstests durchgeführt und die auxologische Entwicklung bis zu einem Alter von

100 Tagen weiterverfolgt. Die Bedingungen im Cross-fostering sowie die auxologischen Daten waren in diesen Kohorten vergleichbar.

Die Körperlängenbestimmung erfolgte durch Messung des naso-analen Abstandes. Der Body-Mass-Index wurde ermittelt aus dem Verhältnis zwischen Körpergewicht und Körperoberfläche [ $\text{g}/\text{m}^2$ ], die mittels der DuBois-Formel (Körperoberfläche [ $\text{m}^2$ ] =  $0,007184 \times \text{Körpergröße} [\text{cm}]^{0,725} \times \text{Körpergewicht} [\text{kg}]^{0,425}$ ) errechnet wurde.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Jungtierumverteilung. Die Umverteilung erfolgte 24–36 h postnatal in eine relative Überernährungs- (drei Jungtiere je Muttertier), Kontroll- (sechs Jungtiere je Muttertier) und eine relative Unterernährungsgruppe (zehn Jungtiere je Muttertier). Im Sinne der Fremdpflege verblieb dabei kein Jungtier beim leiblichen Muttertier.

## 2.3 Expressionsanalysen

Analysiert wurden die Expressionsmuster der für die Cannabinoidrezeptoren CB1R und CB2R sowie für die Enzyme NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , MGL und FAAH codierenden Gene in Lebergewebe, weißem (perigonadalem) Fettgewebe und im Nucleus arcuatus von Mäusen der drei Ernährungsgruppen. Aufgrund eines bekannten Einflusses des weiblichen Menstruationszyklus auf verschiedene Parameter des ECS (El-Talatini et al. 2010) wurden Expressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit nur in Geweben männlicher Tiere durchgeführt.

### 2.3.1 RNA-Extraktion

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Lebergewebe wurde das TRIzol Reagenz entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet (Life Technologies, Karlsruhe). Dazu wurde die gefrorene Leber mit Hilfe eines sterilen Skalpells in kleine Stücke zerteilt, in 1,5 ml fassende Zentrifugenröhrchen gegeben und gewogen. Zu je 30–60 mg Gewebe wurde 1 ml des TRIzol Reagenz hinzugefügt und dies bei Raumtemperatur (RT) für 10–30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt, mit Ultraschall homogenisiert (35 % Amplitude, 60 s Intervalle, 0,5/0,5 s = Mode 2; Bandelin Sonopuls HD 2070, Berlin). Nach erneuter Inkubation bei RT für 20 min wurden 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, die Zentrifugenröhrchen verschlossen, kräftig geschüttelt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (12000 g, 15 min, 5 °C) erfolgte die Phasentrennung, wobei die RNA-enhaltende obere wässrige Phase in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Der verbliebene Inhalt des Röhrchens (Interphase und organische Phase) wurde kurzzeitig asserviert und in gesonderten Schritten zur Isolation von DNA weiterverwendet (beschrieben in Kapitel 2.4.1). Nach Hinzugabe von 0,5 ml Isopropanol, kräftigem Schütteln und Inkubation für 5 min bei RT wurde die RNA präzipitiert. Durch Zentrifugation mit 12000 g für 10 min bei 5° C wurde die ausgefällte RNA pelletiert und anschließend mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen (15 s schütteln und Inkubation für 5 min bei RT). Der nach erneuter Zentrifugation bei 7500 g erzeugte Überstand konnte verworfen werden; das RNA-Pellet wurde für 5–10 min luftgetrocknet und

anschließend mittels Inkubation für 30 min bei 55 °C in 80 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Probenlagerung erfolgte bei -80 °C.

Die Gesamt-RNA-Extraktion aus weißem Fettgewebe erfolgte aufgrund des hohen Lipidgehaltes nach einer anderen Vorgehensweise mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen (Hilden). Zunächst wurden die Fettgewebeproben (60–80 mg) unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit Mörser und Stößel pulverisiert und in vorgekühlte 2 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Unter dem Abzug erfolgte nach Hinzufügen von 700 µl Lysepuffer die Homogenisierung durch mehrfaches Aufziehen des Lysats in eine Spritze mit einer 20 G Nadel. Zudem wurde das Lysat anschließend auf eine Homogenisierungssäule (QIAshredder spin column, Qiagen, Hilden) pipettiert und für 2 min mit 14000 g zentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 14000 g wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Zur Ausfällung der RNA wurde das einfache Volumen an 70%igem Ethanol hinzugefügt und durch Pipettieren vorsichtig gemischt. Von diesem Gemisch wurden 700 µl auf eine RNeasy Mini-Säule (RNeasy spin column, Qiagen, Hilden) geladen und für 15 s bei 11000 g zentrifugiert. Der Durchlauf (Lysepuffer) wurde verworfen. Nach Hinzufügen von 700 µl Waschpuffer erfolgte eine Zentrifugation für 15 s bei 8000 g. Der Durchlauf (Waschpuffer) wurde erneut verworfen und der Waschschrift mit einem anderen Waschpuffer zweimal wiederholt, wobei zuletzt für 2 min bei 8000 g zentrifugiert wurde. Nachdem die Mini-Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt wurde, erfolgte die Eluierung der RNA mit 35 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 8000 g. Um die RNA-Konzentration zu maximieren, wurde das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die Probenlagerung erfolgte bei -80 °C.

Aufgrund der geringen Gewebemenge aus der Präparation des hypothalamischen Nucleus arcuatus wurden rechter und linker Kern von jedem Versuchstier gepoolt. Die Gesamt-RNA-Extraktion erfolgte dann unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) gemäß dem Handbuch des Herstellers.

### 2.3.2 Messung von Konzentration und Reinheit der Ribonukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung von Ribonukleinsäuren in Form von RNA und DNA erfolgte mit Hilfe der UV/VIS Spektralphotometrie. Verwendet wurde dazu ein Spektralphotometer der Firma Biochrome (WPA Biowave II UV/VIS, Biochrome, Cambridge, United Kingdom). Durch Bestimmung des Verhältnisses der Optischen Dichte (OD) bei 260 nm zur OD bei 280 nm wurde die Reinheit der Probe kontrolliert.

### 2.3.3 Umschreibung in cDNA

Zur Umschreibung von RNA in cDNA (komplementäre DNA) wurde eine kommerziell erwerbliche Reverse Transkriptase (Superscript VILO cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet und die Reaktion gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden für den Reaktionsansatz je 2 µg RNA der Leber, 0,7 µg RNA des Fettgewebes sowie 0,3 µg RNA des gepoolten Nucleus arcuatus benutzt. Vor der weiteren Verwendung der cDNA wurde diese je nach gewünschter mittlerer RNA-Konzentration und angestrebtem Pipettiervolumen (z.B.  $\geq 2,0$  µl für Real-time PCR-Ansätze) mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

### 2.3.4 Real-time Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Messung der Menge vorhandener mRNA lässt sich die Genexpression quantifizieren und somit eine Aussage bezüglich der Aktivität eines Gens treffen. Während der Real-time PCR wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt nach jedem Zyklus verdoppelt und die Anzahl neu gebildeter DNA-Moleküle durch Fluoreszenz erfasst. Dabei ist die Zunahme der Fluoreszenz proportional zur Zunahme der amplifizierten DNA. Es wurden Expressionsanalysen der für die Rezeptoren CB1 und CB2 sowie für die Enzyme NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ , MGL und FAAH codierenden Gene durchgeführt. Mit Hilfe des Roche LightCycler 480 Systems (Roche, Penzberg) wurde die Real-time PCR auf 96er-Platten ausgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green (SYBR Green I Master Mix, Roche, Penzberg) verwendet, das unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Der Reaktionsansatz sowie die Zyklus-Einstellungen sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt. Zur



Bestimmung der Spezifität der PCR-Amplifikate erfolgte nach der PCR ein abschließendes Aufheizen bis 96 °C zur Schmelzkurvenanalyse. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Alle Messungen erfolgten für die jeweiligen Gene in Duplikaten. Zur Normierung der Messungen wurde eine Expressionsanalyse des für  $\beta$ -Aktin, ein zytoplasmatisches Strukturprotein, codierenden Gens durchgeführt. Dieses unterliegt als sogenanntes *Housekeeping*-Gen kaum Regulationsmechanismen und eignet sich daher in der Real-time PCR als Referenzgen (Suzuki et al. 2000). Zur Kalkulation der relativen Expression wurde die vergleichende *delta delta ct (cycle threshold)*-Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001). Unter dem Ct-Wert versteht man den Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser wird in der Berechnung  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  zur Ermittlung der n-fachen Expression eines Gens eingesetzt.

**Tab. 1:** Reaktionsansatz Real-time PCR (Gesamtvolumen 20  $\mu$ l).

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]
2 x Master Mix	10,0
Primer 1	0,2
Primer 2	0,2
H <sub>2</sub> O	5,6–6,6
cDNA	3,0–4,0

**Tab. 2:** Einstellung Zykler Real-time PCR.

Vorgang	Dauer	Temperatur [°C]	Heiz-/Kühlungsrate [°C/min]	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	5 min	95	4,4	} 45
Denaturierung	10 s	95	4,4	
Annealing	10 s	55	2,2	
Elongation	10 s	72	4,4	
Abschließendes Aufheizen zwecks Schmelzkurvenanalyse		bis 96		

**Tab. 3:** Primersequenzen für Expressionsanalysen mittels Real-time PCR. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen in 5'3'-Richtung der jeweiligen *forward* (for) oder *reverse* (rev) Primer.

Primer		5'3'-Nukleotidsequenz
CB1R	for	TTCCTTGTAGCAGAGAGCCAG
CB1R	rev	CTCAACGTGACTGAGAAAGAGG
CB2R	for	TGACAAATGACACCCAGTCTTCT
CB2R	rev	ACTGCTCAGGATCATGTACTCCTT
NAPE-PLD	for	CAGGTTCCAAAGAGGAACTTGAC
NAPE-PLD	rev	GATGAGCTCGTCCATTTCCAC
DAGL $\alpha$	for	GATTCCCAGTCAGATGCCTAC
DAGL $\alpha$	rev	GACAGGAAAGCCAAGATGTC
FAAH	for	GAGATGTATCGCCAGTCCGT
FAAH	rev	ACAGGCAGGCCTATACCCTT
MGL	for	TCTTCCTCCTGGGCCACT

MGL	rev	AAAGTAGGTTGGCCTCTCTGC
βActin	for	GTGATGGTGGGAATGGGTCA
βActin	rev	CTGGATGGCTACGTACATGG

## 2.4 Epigenetische Analysen

Ergänzend zu den Genexpressionsuntersuchungen wurden Methylierungsanalysen in den Promotorregionen der codierenden Gene für den Rezeptor CB1 sowie die Enzyme MGL und FAAH im Lebergewebe sowie NAPE-PLD im Fettgewebe von männlichen (s. Kapitel 2.2) Mäusen der unterschiedlichen Ernährungsgruppen durchgeführt.

### 2.4.1 DNA-Extraktion

Zur simultan zur RNA-Gewinnung durchgeführten Extraktion von DNA aus Lebergewebe wurde wie bereits in Kapitel 3.3.1 geschildert das TRIzol Reagenz (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet und nach Auftrennung der Probe in die verschiedenen Phasen und Abpipettieren der, die RNA enthaltenden, wässrigen Phase wie folgt verfahren: Die DNA-Fällung erfolgte mit 0,35 ml 100%igem Ethanol. Nach wiederholtem Mischen durch Umdrehen des Zentrifugenröhrchens und Inkubation für 5 min bei RT wurde die DNA pelletiert (5 min, 5 °C, 2000 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 0,1 M Natriumcitrat in 10%iger Ethanollösung gewaschen und anschließend für 30 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (5 min, 5 °C, 2000 g). Nach Wiederholung des Waschschrilles erfolgte die Zugabe von 1,5–2 ml 75%igem Ethanol und Inkubation für 10 min bei RT mit abschließender Zentrifugation (5 min, 5 °C, 2000 g). Der Überstand wurde verworfen, und das DNA-Pellet wurde für 5–10 min an der Luft getrocknet. Zuletzt erfolgten die Resuspension in 500 µl 8 mM Natriumhydroxid und Vermischung durch Pipettieren und schließlich die Lösung durch Inkubation für 3 h bei 55 °C. Die Probenlagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Extraktion von DNA aus Fettgewebe erfolgte unter Verwendung des DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben. Es wurde zunächst ein Probelauf mit Pulverisierung von Fettgewebe durch Mörsern nach Zugabe von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Aufgrund nicht signifikant verbesserter DNA-Erträge wurde im Weiteren auf diesen zusätzlichen Schritt verzichtet. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurden ferner 30 mg (statt 25 mg) Fettgewebe zur DNA-Extraktion genutzt. Daher wurden für den Proteinverdau mittels Proteinase K 25 µl statt 20 µl des Enzyms verwendet. Anschließend wurde die Probe durch einen Vortexmischer vermischt und für 4–6 h bei 56 °C inkubiert. Stündlich erfolgte eine wiederholte Mischung der Probe durch Schnippen gegen das Reaktionsgefäß. Lyse- und Waschschriffe wurden entsprechend der Protokollangaben durchgeführt. Um eine Maximierung der DNA-Konzentration zu erzielen wurde nach Elution mit 100 µl das Eluat erneut auf die Säule aufgetragen und damit reeluiert. Die Probenlagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.4.2 DNA-Methylierung

Zur Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden bedarf es einer chemischen Reaktion, die dazu führt, dass im Rahmen einer anschließenden Sequenzierungsanalyse eine veränderte Basenabfolge Rückschlüsse auf den DNA-Methylierungsgrad zulässt. Durch Anwendung der Bisulfit-Reaktion gelingt hierbei zunächst durch Desaminierung die Konversion unmethylierter Cytosine zu Uracil, das in der darauffolgenden PCR-Amplifikation und DNA-Sequenzierung als Thymin-Nukleotid erkannt wird. Die komplementäre Basenpaarung ehemals unmethylierter Cytosine nach Bisulfitkonvertierung erfolgt dann über Thymin mit Adenin, wohingegen methylierte Cytosine einer Bisulfit-Behandlung nicht zugänglich sind und weiterhin komplementär mit Guanin gepaart werden (Frommer et al. 1992).

Ziel der anschließenden mittels Einzelklonsequenzierung durchgeführten Methylierungsanalysen war die Erfassung möglicher Unterschiede lokusspezifischer Methylierungsdichten im Vergleich der drei Ernährungsgruppen (drei, sechs bzw. zehn Jungtiere je Muttertier) untereinander. Die Anzahl der Tiere für die Methylierungsanalysen

war begrenzt durch andere vorgeschaltete Untersuchungen, wodurch geringere Gewebemengen zur Verfügung standen. Daher sollten pro Lokus und Gruppe zumindest 8–10 Einzelklone sequenziert, die Zahl der notwendigen Klonierungen aber begrenzt werden. Dies wurde durch ernährungsgruppenbezogene Zusammenführung von DNA-Proben mit gepoolt durchgeführter Bisulfit-Behandlung und Klonierung erreicht.

Für die 3er- und 6er-Ernährungsgruppen wurden je 250 ng DNA von vier Versuchstieren, für die 10er-Ernährungsgruppe 200 ng DNA von fünf Versuchstieren gepoolt, so dass schließlich je Gruppe 1 µg gepoolter DNA der Bisulfitkonvertierung unterzogen wurde. Dazu wurde das EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) genutzt. Es wurde gemäß den Vorgaben des Herstellers verfahren, wobei zur Eluierung der konvertierten DNA 20 µl statt 10 µl Elutionspuffer verwendet wurden. Die Probenlagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 2.4.3 Ermittlung methylierter CpG-Dinukleotide

Für die mittels Einzelklonsequenzierung durchgeführten Methylierungsanalysen, wodurch Unterschiede in der Methylierung regulativer Bereiche der untersuchten Gene zwischen den drei Ernährungsgruppen erfasst werden sollten, war zunächst die DNA-Vervielfältigung erforderlich. Hierzu wurde die Polymerasekettenreaktion, angepasst an die Eigenschaften der Bisulfit-DNA, und anschließend die Generierung von Einzelklonen genutzt.

##### 2.4.3.1 Bisulfit-Polymerasekettenreaktion (PCR)

Während der Polymerasekettenreaktion wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase über die Teilschritte Denaturierung (Auftrennung der DNA-Stränge), Annealing (Bindung der Primer-Oligonukleotide) und Elongation (Auffüllen der komplementären Einzelstränge mit den fehlenden Nukleotiden) das gewünschte DNA-Molekül vervielfältigt. Da das DNA-Molekül zuvor einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen wurde und folglich nur noch, ausgenommen der ehemals methylierten CpG-Dinukleotide, aus den drei Basen Adenin, Guanin und Thymin bestand, ergaben sich hieraus folgende Modifikationen der Polymerasekettenreaktion:

- Notwendigkeit eines sog. *hot start* mit initialer Denaturierung bei 95 °C und Verwendung einer *hot start*-Taq-Polymerase (hitzebeständige Polymerase) zur Erhöhung der Bindungsspezifität
- Primerdesign:
  - lediglich aus drei Basen bestehend (A, T und G für die *forward*- und A, T und C für die *reverse*-Primer), ausgenommen die Primerregion enthält ein CpG-Dinukleotid mit unklarem Methylierungsstatus
  - max. 1 CpG-Dinukleotid je Primerpaar

Für die verschiedenen Primer wurden unterschiedliche Reaktionsansätze etabliert. Diese sowie die Einstellungen des Thermozyklers lassen sich den Tabellen 4 und 5 entnehmen. Tabelle 6 gibt die Sequenzen der verwendeten Primer in 5'3'-Richtung wieder.

**Tab. 4:** Reaktionsansätze Bisulfit-PCR und Annealing-Temperatur der verschiedenen Primer.

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]			
	CB1	NAPE-PLD	MGL	FAAH
PCR Puffer 10 x	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,75	1,5	2,0	2,0
NTP (20 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
DNA-Lösung	1,8	1,5	1,5	1,5
Primer 1 for	0,3	0,3	0,3	0,3
Primer 2 rev	0,3	0,3	0,3	0,3
Taq-Polymerase	0,5	0,5	0,5	0,5
Q-Solution	-	-	-	5,0
H <sub>2</sub> O	17,6	17,9	17,4	12,4
Annealing [°C]	60	58	60	59

**Tab. 5:** Einstellung Thermozykler Bisulfite-PCR. Die Annealing-Temperatur xx für die verschiedenen Reaktionsansätze ist Tab. 4 zu entnehmen.

Vorgang	Dauer	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	10 min	95	
Denaturierung	30 s	95	} 35–40
Annealing	30 s	xx	
Elongation	45 s	72	
Polishing	7 min	72	

**Tab. 6:** Primersequenzen für Methylierungsanalysen mittels PCR. Dargestellt sind die Nukleotidsequenzen in 5'3'-Richtung der jeweiligen *forward* (for) oder *reverse* (rev) Primer.

Primer	5'3'-Nukleotidsequenz
CB1R for	GGGTCGTTGGTGGTAAAGAGT
CB1R rev	CCTACAAAAAATCCCTACCTCTC
MGL for	GGCGGGTAAGAGGTAAAGTTTG
MGL rev	CCATCTCTCCTAAAATCTCCAC
FAAH for	GAAGGGGTTTAGGTTTGATTTTG
FAAH rev	CTCCTAATCCATCGCAAACCCAC
NAPE-PLD for	GGAAGGTTGGGAGTTAAATTGGTTAG
NAPE-PLD rev	CTCCGCTAAAAACACCAACAACCT

#### 2.4.3.2 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der DNA-Amplifikate erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Dazu wurden TE-Puffer als Elektrophoresepuffer, Agarose als Gel sowie Ethidiumbromid zur DNA-Markierung verwendet.

Das Agarose-Gel wurde in eine Gelkammer, gefüllt mit dem TE-Puffer (ionische Pufferlösung), gelegt. Über die Gelkammer, die über eine Anode und eine Kathode verfügte, ließ sich somit ein elektrisches Feld über dem Gel erzeugen. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wanderten Richtung Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Moleküle abhängig war.

Nach Beendigung der Elektrophorese konnten dann die anfangs mit Bromphenolblau angefärbten DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe in Form von verschieden weit gewandelter Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Nach Vergleich mit einem parallel gelaufenen DNA-Größenmarker ließen sich letztlich die gewünschten Amplifikate identifizieren.

#### 2.4.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QIAquick Purification Kits (Qiagen, Hilden). Die Vorgehensweise entsprach den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.3.4 Ligation und Klonierung

Als nächster Schritt zur DNA-Vervielfältigung erfolgte dann die Ligation und Klonierung. In diesem Verfahren wird das gewünschte DNA-Molekül in einen Vektor integriert, der als Transportvehikel dient, worüber es dann in einen Wirkorganismus eingeschleust werden kann. Als Vektor wurde ein Plasmid (pGEM-T Vector System II der Firma Promega, Mannheim) verwendet, das als ringförmiges dsDNA-Molekül extrachromosomal in Bakterien vorliegt, sowie kompetente E. coli Bakterien als Wirkorganismus (JM109 Zellen der Firma Promega, Mannheim). Die transformierten Bakterienzellen vermehrten sich, bildeten Kolonien und erzeugten hierdurch ein Vielfaches des ursprünglichen DNA-Einzelmoleküls.



Es erfolgte zunächst die Ligation des DNA-Fragments mit dem Vektor. Die Vektoren waren bereits einem Restriktionsverdau mit einer EcoRV Restriktionsendonuklease unterzogen worden, so dass das Plasmid aufgeschnitten und linearisiert war. Zudem verfügten die o. g. Vektoren über einen Thymidinüberhang an den 3'-Enden, wodurch ein vorzeitiges Zirkularisieren verhindert wurde. Die Ligation der DNA-Moleküle konnte dann dem Protokoll des Herstellers entsprechend erfolgen. Im Ligationsansatz wurden 3 µl des aufgereinigten PCR-Produktes eingesetzt. Nachdem dieser für 20 h bei 4 °C inkubiert wurde, erfolgte die Transformation der JM109 Zellen. Dazu wurden 50 µl der angetauten Zellen zu je 3 µl des auf Eis gekühlten Ligationsproduktes hinzugefügt, sehr vorsichtig durch Schnippen des Reaktionsröhrchens gemischt und erneut für 20 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 45 s bei 42 °C, wodurch die Reaktion gestoppt bzw. die Plasmidaufnahme optimiert werden sollten. Nach Kühlung der Proben auf Eis (2 min), Zufügen von 950 µl SOC-Medium und 1,5 h im Inkubator bei 37 °C wurden je Ernährungsgruppe mehrere Fraktionen à 100–800 µl auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei erfolgreicher Ligation und Transformation wird im Vektor die codierende Region für die  $\alpha$ -Peptide der  $\beta$ -Galaktosidase unterbrochen, so dass die Reaktion des in den Agarplatten enthaltenen Substrats X-Gal zur Galaktose und dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo durch Fehlen einer funktionsfähigen  $\beta$ -Galaktosidase ausbleibt. Dementsprechend wurden ausschließlich weiße Kolonien selektiert und weiterverwendet.

Mit den zuvor verwendeten genspezifischen Primerpaaren (s. Tabelle 6) erfolgte in der anschließenden PCR die Amplifikation der klonierten DNA für NAPE-PDL, FAAH und MGL. In der PCR für CB1R wurden hingegen ligationsvektorspezifische Primer (M13 for 20: GTAAAACGACGGCCAGT, M13 rev 29: CAGGAAACAGCTATGACC) benutzt, deren Bindungsstellen nur wenige Basen vom zu sequenzierenden Insert entfernt liegen. Der Reaktionsansatz sowie die Einstellungen des Thermozyklers für CB1R und FAAH lassen sich den Tabelle 7, 8 und 9 entnehmen. Die Thermozyklereinstellungen für MGL und NAPE-PDL entsprachen denen der Bisulfit-PCR.

**Tab. 7:** Reaktionsansätze PCR mit DNA der Klone.

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]			
	CB1R	NAPE-PDL	FAAH	MGL
PCR Puffer 10 x	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0	1,5	1,5	2,0
NTP (20 mM)	0,5	0,5	0,25	0,5
DNA (1 Kolonie)	1,0	1,0	1,0	1,0
Primer 1 for	0,3	0,3	0,3	0,3
Primer 2 rev	0,3	0,3	0,3	0,3
Taq-Polymerase	0,5	0,5	0,4	0,5
Formamide	0,25	0,25	0,25	0,25
H <sub>2</sub> O	17,65	18,15	18,5	17,65

**Tab. 8:** Einstellungen Thermozykler PCR Klone CB1R mit Primer M13.

Vorgang	Dauer	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	10 min	95	
Denaturierung	30 s	95	} 40
Annealing	30 s	47	
Elongation	60 s	72	
Polishing	7 min	72	

**Tab. 9:** Einstellungen Thermozykler PCR Klone FAAH mit spezifischen Primern.

Vorgang	Dauer	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	10 min	95	
Denaturierung	30 s	95	} 36
Annealing	30 s	59	
Elongation	30 s	72	
Polishing	7 min	72	

#### 2.4.3.5 Aufreinigung und Sequenzierung der klonierten DNA

Nachdem mittels PCR diejenigen Kolonien, die das gewünschte DNA-Fragment aufgenommen und vermehrt haben, identifiziert wurden, erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte unter Einsatz der Enzyme Exonuklease I (Exo I) und Alkalische Phosphatase (AP). Das Reaktionsprotokoll ist dargestellt in Tabelle 10. Es folgte die Inkubation im Thermozykler für 30 min bei 37 °C und 20 min bei 85 °C. Durch Gelelektrophorese und Vergleich mit einem standardisierten DNA *low mass ladder* ließ sich die DNA-Konzentration abschätzen.

**Tab. 10:** Reaktionsansatz Aufreinigung DNA-Klone.

Reagenzien	Volumen [µl]
10 x Puffer Fast AP	0,4
Exo I	0,25
Fast AP	1
PCR-Produkt	10,0
H <sub>2</sub> O	2,35

Die DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell von der Firma Eurofins durchgeführt (MWG Eurofins, Ebersberg). Mit Hilfe der Chromas LITE Software, Version 2.01 (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australien) wurden die Sequenzierungsergebnisse analysiert.

## 2.5 Statistische Analyse

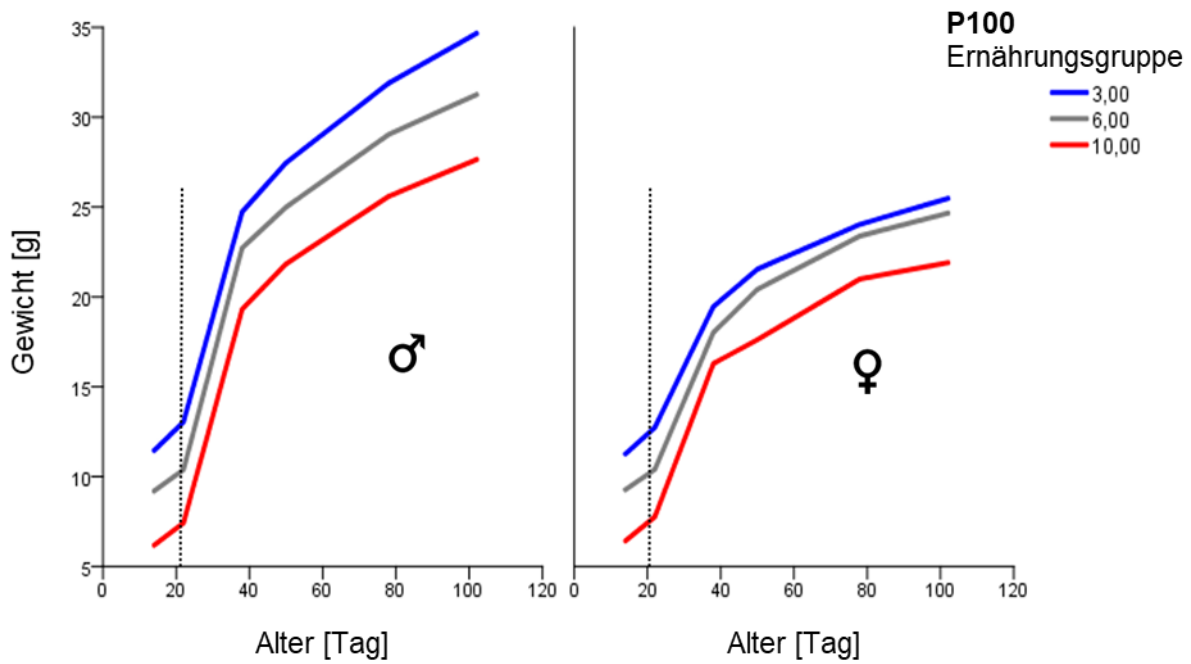
Für die statistische Analyse wurde SPSS Statistics, Version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) genutzt. Unterschiede zwischen den Ernährungsgruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) untersucht und Effektstärken durch lineare Regression beurteilt. Für Werte, die keine Normalverteilung zeigten, wurden nichtparametrische Tests (Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test) angewandt. Eine statistische Signifikanz wurde für P-Werte  $< 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

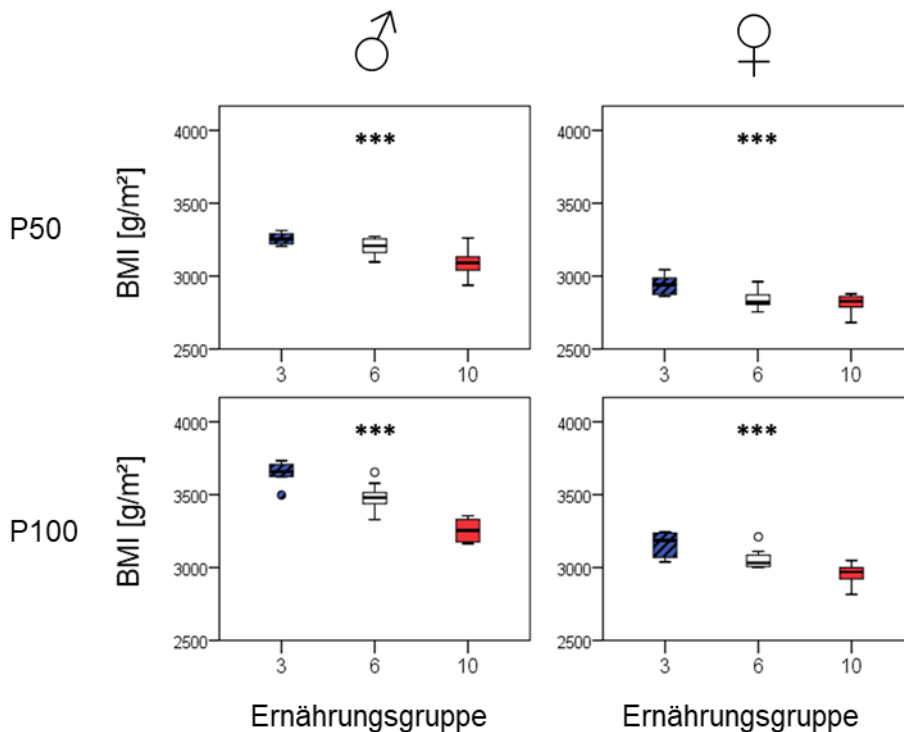
Das Cross-fostering bzw. die Aufzucht der Tiere sowie die Gewinnung der Organproben, die Geschlechtsbestimmung und die Auswertung der auxologischen Parameter sind Teile einer anderen wissenschaftlichen Arbeit aus dieser Arbeitsgruppe (Michalik 2013). Als Ausgangspunkt unserer Expressions- und Methylierungsanalysen werden zunächst die Auswirkungen der mittels Cross-fostering-Strategie erzielten unterschiedlichen postnatalen Ernährung auf die auxologischen Parameter der Tiere dargestellt.

#### 3.1 Auswirkungen auf auxologische Parameter

Nachdem an Tag 21 das Cross-fostering beendet wurde, zeigten sich zwischen den Ernährungsgruppen signifikante Unterschiede in Körpergröße und -gewicht. Von da an wurden die Jungtiere von den Ziehmüttern getrennt und hatten freien Zugang zu Nahrung (Ernährung *ad libitum*). Bis zu einem Lebensalter von 100 Tagen persistierten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Ernährungsgruppen in Bezug auf das Gewicht (Abbildung 2), den BMI (Abbildung 3) und die Masse an viszeralem (perigonadalem) Fett (Abbildung 4). Allerdings ließ sich bis dahin keines der Versuchstiere als mager oder übergewichtig beschreiben. Die Unterschiede zwischen den Ernährungsgruppen erschienen dabei für männliche Tiere etwas deutlicher als für weibliche Tiere. Bezugnehmend auf die postnatale Ernährung in Gruppen zu je drei, sechs und zehn Jungtieren je Muttertier erfolgte die auch in den folgenden Teilen der Arbeit verwendete Bezeichnung als relative Über- (3), Kontroll- (6) oder Unterernährungsgruppe (10).

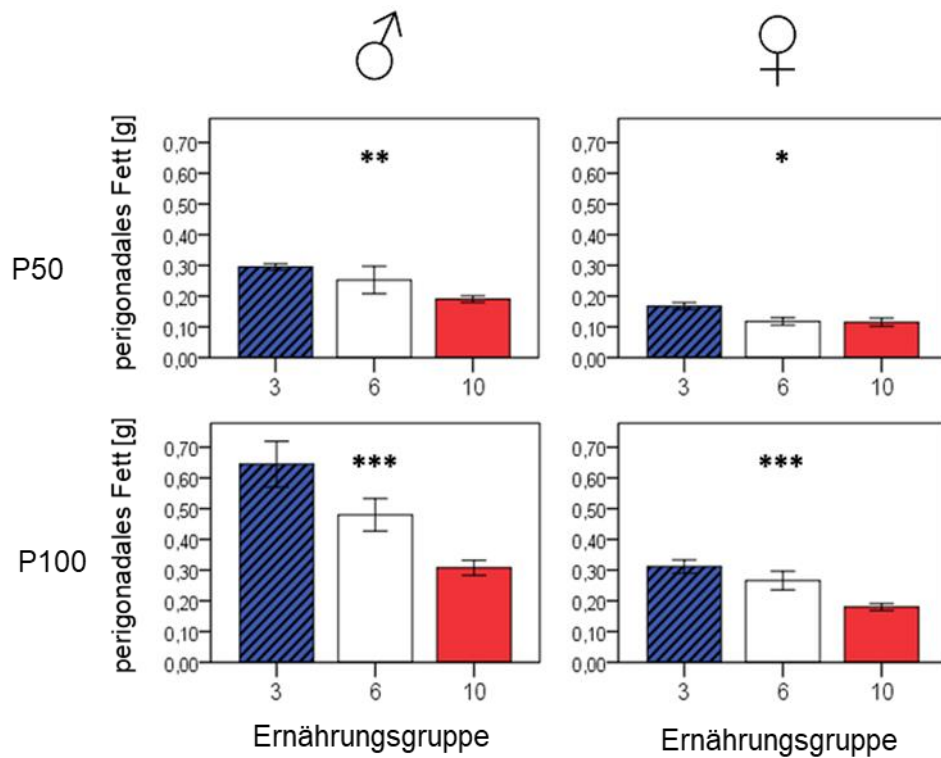


**Abb. 2:** Gewicht [g] in Abhängigkeit vom Lebensalter [Tag] und dem Geschlecht einer P100 Kohorte. Unterschiede zwischen den Ernährungsgruppen persistieren nach der Entwöhnung von der Ziehmutter und Umverteilung mit freiem Zugang zu Nahrung ab Tag P21.



**Abb. 3:** BMI [g/m<sup>2</sup>] an den Tagen P50 und P100 in Abhängigkeit von der Ernährungsgruppe und dem Geschlecht. P50: n = 4–10 Tiere je Ernährungsgruppe und Geschlecht;

P100: n = 5–10 Tiere je Ernährungsgruppe und Geschlecht. Die gezeigten Signifikanzniveaus (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) beziehen sich auf Vergleiche mittels Varianzanalyse zwischen allen drei Ernährungsgruppen. Es bestanden signifikante ( $p < 0,001$ ) Unterschiede im BMI zwischen den Ernährungsgruppen der P50 und der P100 Kohorte mit einem höheren BMI in der relativen Überernährungsgruppe.



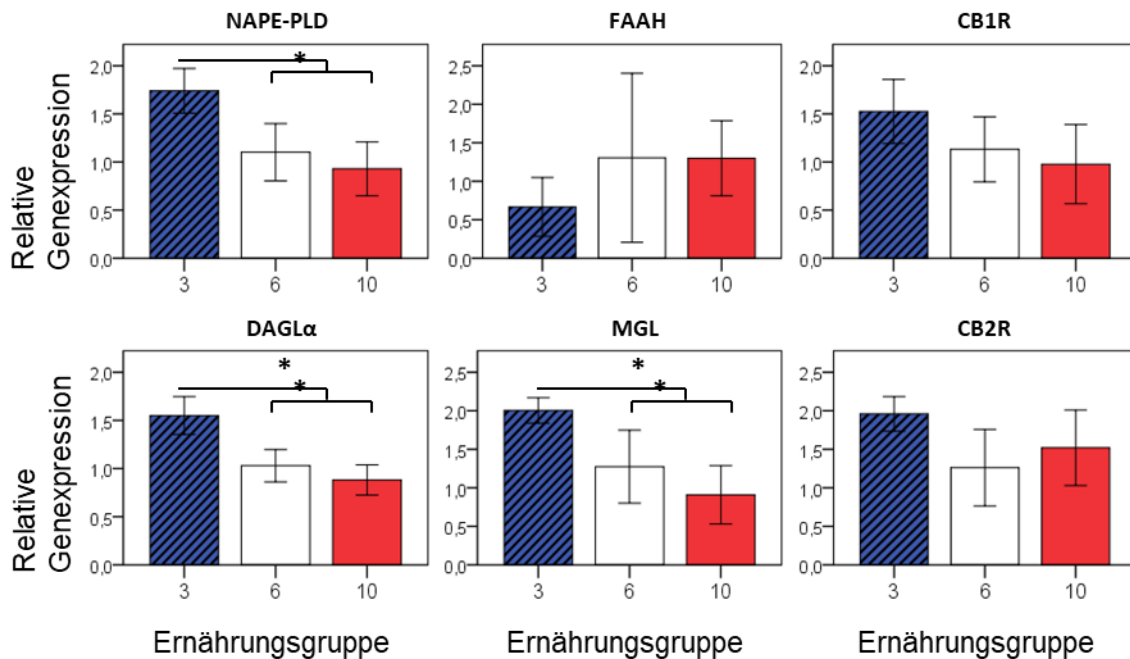
**Abb. 4:** Masse perigonadales Fett [g] an den Tagen P50 und P100 in Abhängigkeit von der Ernährungsgruppe und dem Geschlecht. P50: n = 4–10 Tiere je Ernährungsgruppe und Geschlecht; P100: n = 5–10 Tiere je Ernährungsgruppe und Geschlecht. Die gezeigten Signifikanzniveaus (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) beziehen sich auf Vergleiche mittels Varianzanalyse zwischen allen drei Ernährungsgruppen. Es bestanden signifikante Unterschiede in der Fettgewebsmasse zwischen den Ernährungsgruppen der P50 und der P100 Kohorte mit einer höheren Fettgewebsmasse in der relativen Überernährungsgruppe.

### 3.2 Genexpressionsanalysen

Um ein umfassendes Bild über die Aktivität des Endocannabinoid-Systems in den Versuchstieren der jeweiligen Ernährungsgruppen zu bekommen, wurden mRNA-Expressi-

onsanalysen der einzelnen Komponenten des ECS (Gene der auf- und abbauenden Enzyme sowie Rezeptoren) im Fett- und Lebergewebe sowie im hypothalamischen Nucleus arcuatus in den unterschiedlichen Ernährungsgruppen der P50 Kohorte durchgeführt.

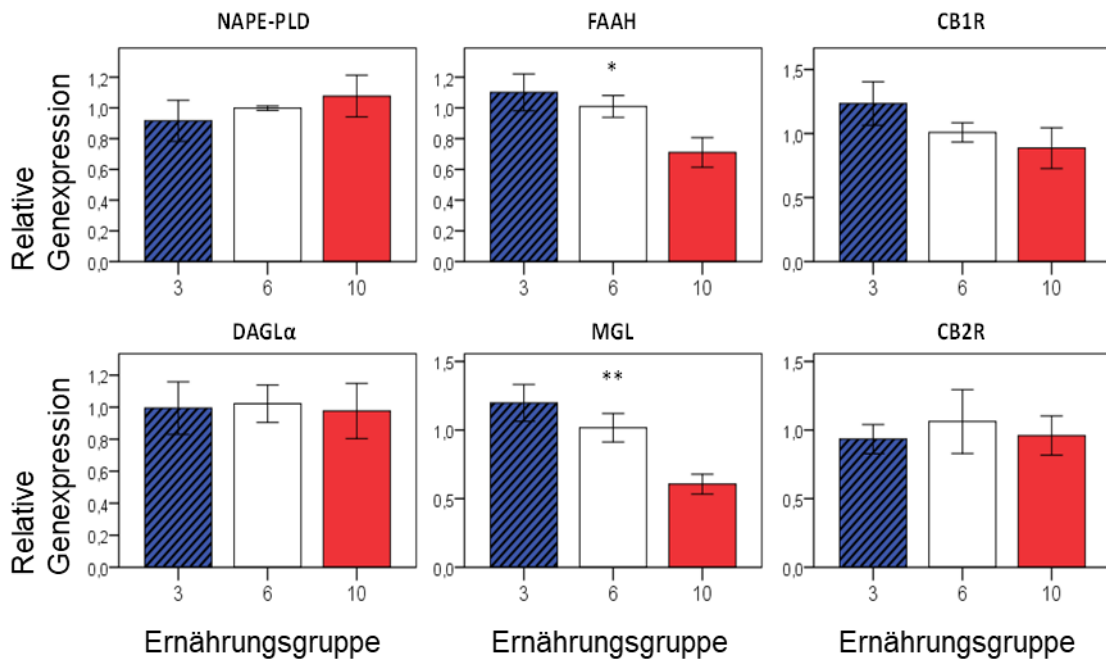
Die Gene der EC-synthetisierenden Enzyme NAPE-PLD und DAGL $\alpha$  schienen im weißen Fettgewebe der relativen Überernährungsgruppe vermehrt exprimiert zu werden (3 > 6 > 10: DAGL $\alpha$  p = 0,02, NAPE-PLD p = 0,06; 3 vs. 6/10: DAGL $\alpha$  p = 0,03, NAPE-PLD p = 0,02), wohingegen keine Unterschiede im Lebergewebe festgestellt wurden. Eine gesteigerte Expression von FAAH und MGL, deren Genprodukte an der EC-Degradation beteiligt sind, konnte ebenfalls in der relativen Überernährungsgruppe sowohl im Fett- (3 > 6 > 10: MGL p = 0,03) als auch im Lebergewebe (3 > 6 > 10: FAAH p = 0,01 und MGL p < 0,01) festgestellt werden. Bei den für die Rezeptoren CB1 und CB2 codierenden Genen fanden sich weder im Fett- noch im Lebergewebe Expressionsunterschiede zwischen den Ernährungsgruppen (Abbildungen 5 und 6).



**Abb. 5:** Relative Genexpression metabolisierender Enzyme des ECS im viszeralen Fettgewebe männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen. n = 4–6 Tiere je Ernährungsgruppe. Die gezeigten Signifikanzniveaus (\* p < 0,05) bezie-

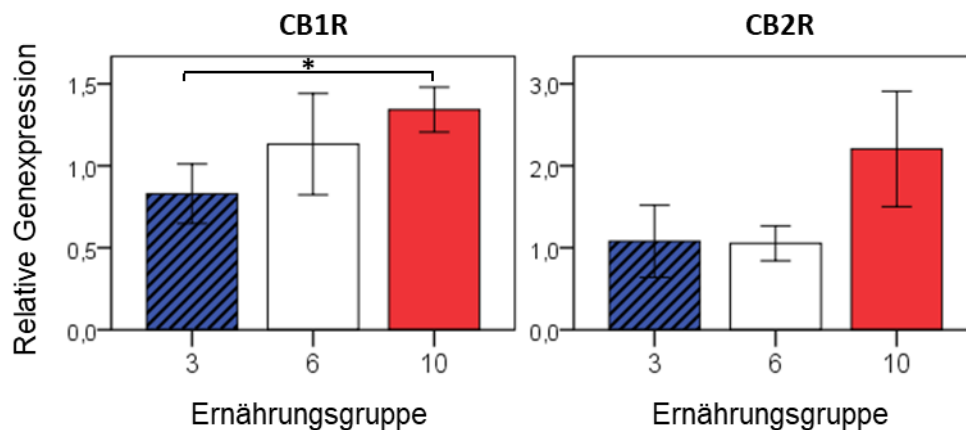


hen sich auf Vergleiche mittels Varianzanalyse zwischen den jeweils dargestellten Ernährungsgruppen. Die relative Genexpression ist in der relativen Überernährungsgruppe für die Enzyme NAPE-PLD, DAGL $\alpha$  und MGL signifikant erhöht.



**Abb. 6:** Relative Genexpression metabolisierender Enzyme des ECS im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen.  $n = 4-6$  Tiere je Ernährungsgruppe. Die gezeigten Signifikanzniveaus (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ) beziehen sich auf Vergleiche mittels Varianzanalyse zwischen allen drei Ernährungsgruppen. Die relative Genexpression der Enzyme FAAH und MGL in der relativen Überernährungsgruppe ist signifikant erhöht.

Expressionsanalysen im Gewebe des Nucleus arcuatus wurden an einer geringeren Anzahl ausgewählter Gene durchgeführt, da nur geringe Gewebemengen und somit wenig RNA vorlagen. Hierbei zeigten sich signifikante Expressionsunterschiede für CB1R mit einer signifikant vermehrten Expression in der relativen Unterernährungsgruppe im Vergleich zur Überernährungsgruppe und für CB2R eine Tendenz zu gesteigerter Expression in den Kernen ebenfalls ehemals relativ unterernährter Tiere (CB1R: 10 vs. 3:  $p = 0,04$ ; CB2R: 10 vs. 3/6: CB2R  $p = 0,08$ ; Abbildung 7).



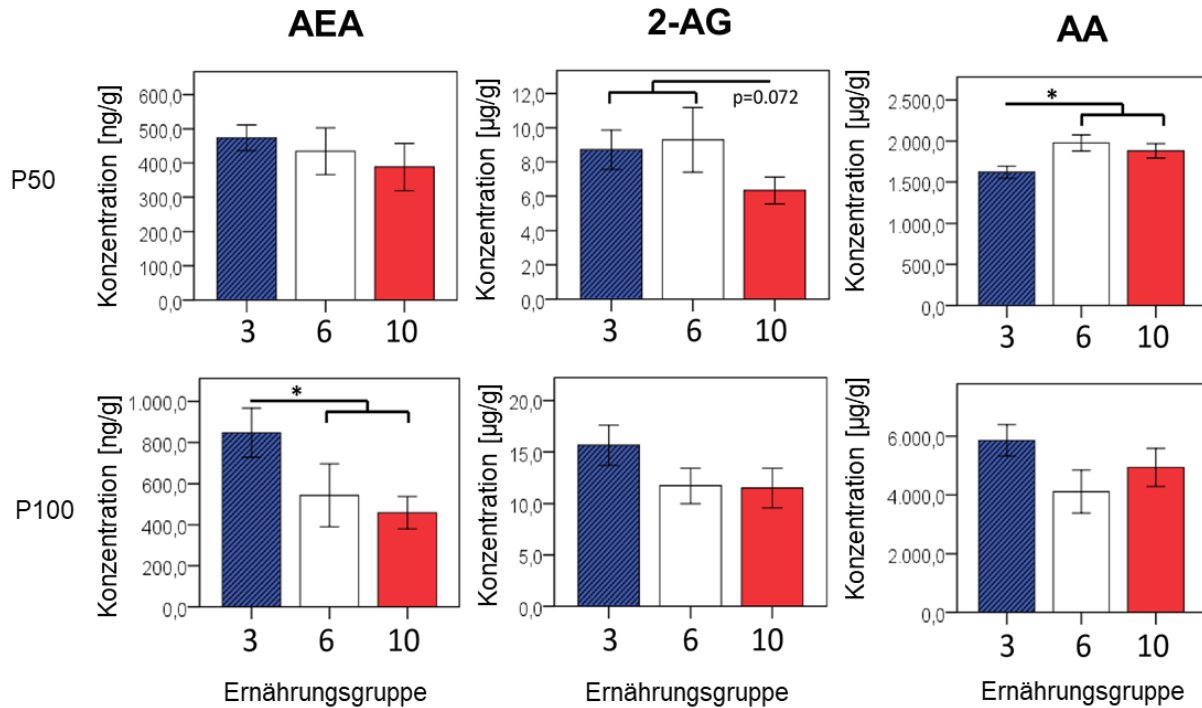
**Abb. 7:** Relative Genexpression der Cannabinoidrezeptoren CB1R und CB2R im Nucleus arcuatus männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen.  $n = 4-6$  Tiere je Ernährungsgruppe. Die gezeigten Signifikanzniveaus (\*  $p < 0,05$ ) beziehen sich auf Vergleiche mittels Varianzanalyse zwischen den jeweils dargestellten Ernährungsgruppen. In der relativen Unterernährungsgruppe zeigten sich eine signifikant vermehrte relative Genexpression für CB1R und eine tendenziell vermehrte CB2R-Expression.

### 3.3 Konzentrationsmessungen der Endocannabinoide in Leber- und Fettgewebe

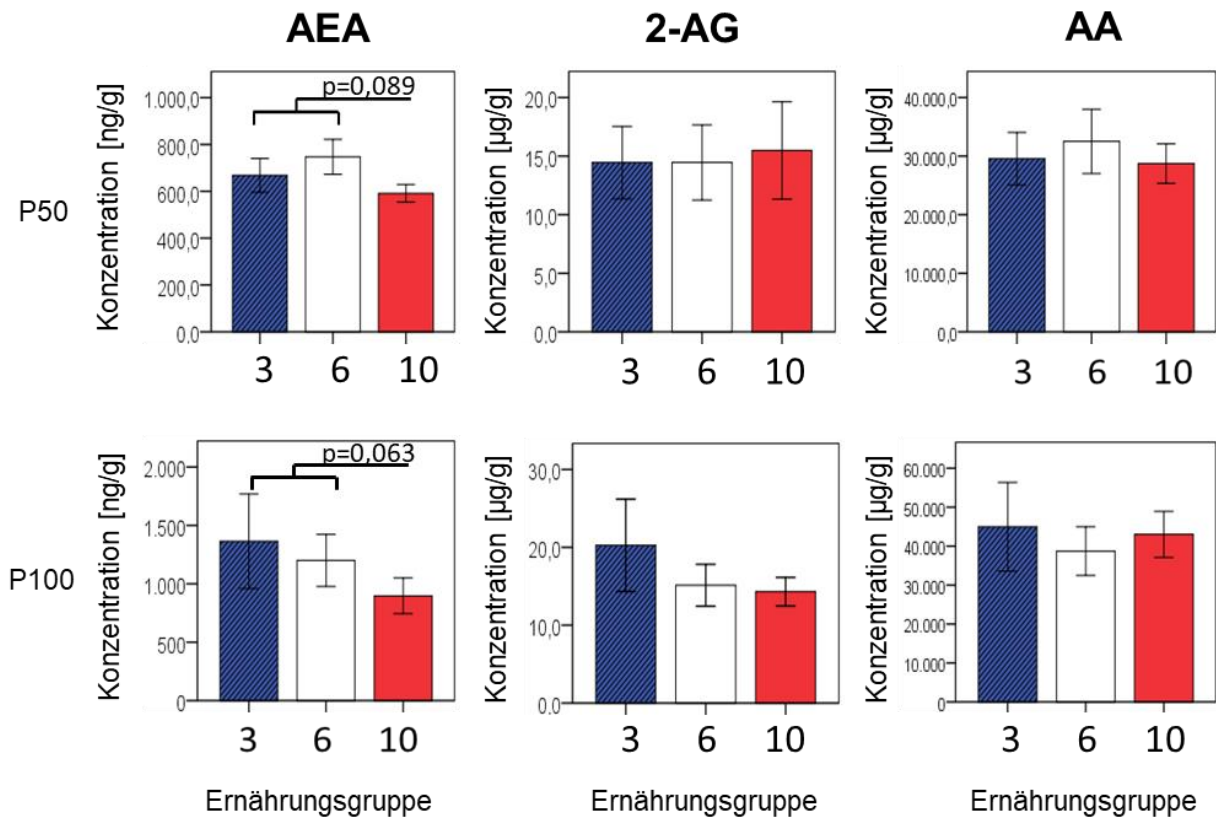
Zur Konzentrationsmessung der endogenen Cannabinoide Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) sowie deren Vorläufer Arachidonsäure (AA) wurden Proben aus Fett- und Lebergewebe der P50 und P100 Kohorten verwendet. Die Messungen erfolgten im Institut für Physiologische Chemie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mittels LC/MRM-Quantifizierung (*Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring*, Massenspektrometrie) gemäß einem zuvor veröffentlichten Protokoll (Lomazzo et al. 2015). Für die statistische Analyse wurde die Konzentration von AEA und 2-AG auf den Proteingehalt der Gewebe normiert.

An Tag P50 konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von AEA und 2-AG zwischen den Ernährungsgruppen gemessen werden. Allerdings zeigte sich eine tendenziell verminderte Konzentration von 2-AG im Lebergewebe der ehemals relativen Unterfütterungsgruppe (10 vs. 3/6:  $p = 0,072$ ) sowie von AEA im Fettgewebe der ehemals relativen Unterfütterungsgruppe (10 vs. 3/6:  $p = 0,089$ ). In der P100 Kohorte waren eine signifikant vermehrte AEA-Konzentration im Lebergewebe ehemals relativ überernährter

Mäuse ( $p = 0,049$ ) und eine tendenziell verminderte AEA-Konzentration im Fettgewebe ehemals relativ unterernährter Mäuse nachweisbar. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.



**Abb. 8:** Konzentration der Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie der Arachidonsäure in ng/g Protein [ng/g] bzw. µg/g Protein [µg/g] im Lebergewebe männlicher 50 und 100 Tage alter Tiere.  $n = 4-7$  Tiere je Ernährungsgruppe. Es zeigen sich signifikante Konzentrationsunterschiede für AA in der P50 Kohorte mit einer verminderten Konzentration in der relativen Überernährungsgruppe (3 vs. 6/10:  $p = 0,023$ ) sowie für AEA in der P100 Kohorte mit einer vermehrten Konzentration der relativen Überernährungsgruppe ( $p = 0,049$ ).



**Abb. 9:** Konzentration der Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie der Arachidonsäure in ng/g Protein [ng/g] bzw. µg/g Protein [µg/g] im Fettgewebe männlicher 50 und 100 Tage alter Tiere. n = 4–7 Tiere je Ernährungsgruppe. Außer einer tendenziell verminderten AEA-Konzentration in der relativen Unterernährungsgruppe (P50: 10 vs. 3/6: p = 0,089; P100: 10 vs. 3/6: p = 0,063) zeigen sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

### 3.4 Methylierungsanalysen

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, auf welcher Ebene die Aktivität des Endocannabinoid-Systems reguliert wird und ob dabei epigenetische Veränderungen von Bedeutung sind, wurde ergänzend zu den oben geschilderten Expressionsanalysen der Methylierungsstatus einiger Komponenten des Endocannabinoid-Systems untersucht. Es wurden Methylierungsanalysen für CpG-Dinukleotid-reiche Abschnitte, sog. CpG-Inseln (Gesamtlänge etwa 200–300 bp, CpG-Anteil > 50 %), aus den Promotor- bzw. Enhancerregionen der für die Enzyme CB1R, MGL und FAAH codierenden Gene im Lebergewebe sowie für das Enzym NAPE-PLD im Fettgewebe männlicher 50 Tage alter Tiere (P50)

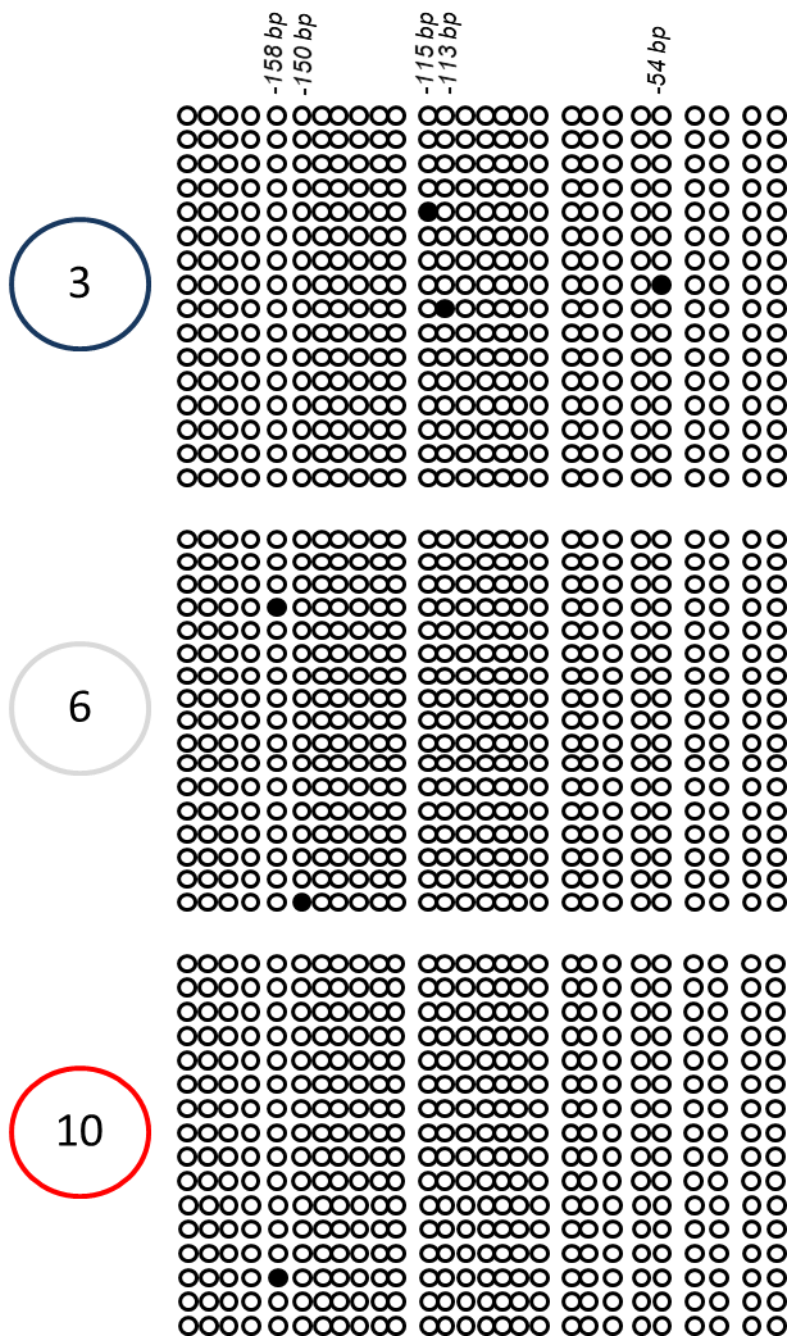
durchgeführt. Die zu untersuchenden CpG-reichen Zielregionen wurden zuvor mit Hilfe der Genomdatenbank *www.ensembl.org* ausgewählt.

Nach Vergleich der Sequenzierungsergebnisse der Bisulfit-DNA mit den entsprechenden ursprünglichen Gensequenzen aus der Genomdatenbank ließ sich für die Bisulfit-Konvertierung unmethylierter Cytosine zu Uracil, die dann als Thymidin erkannt und amplifiziert wurden, eine Erfolgsquote von > 99 % feststellen.

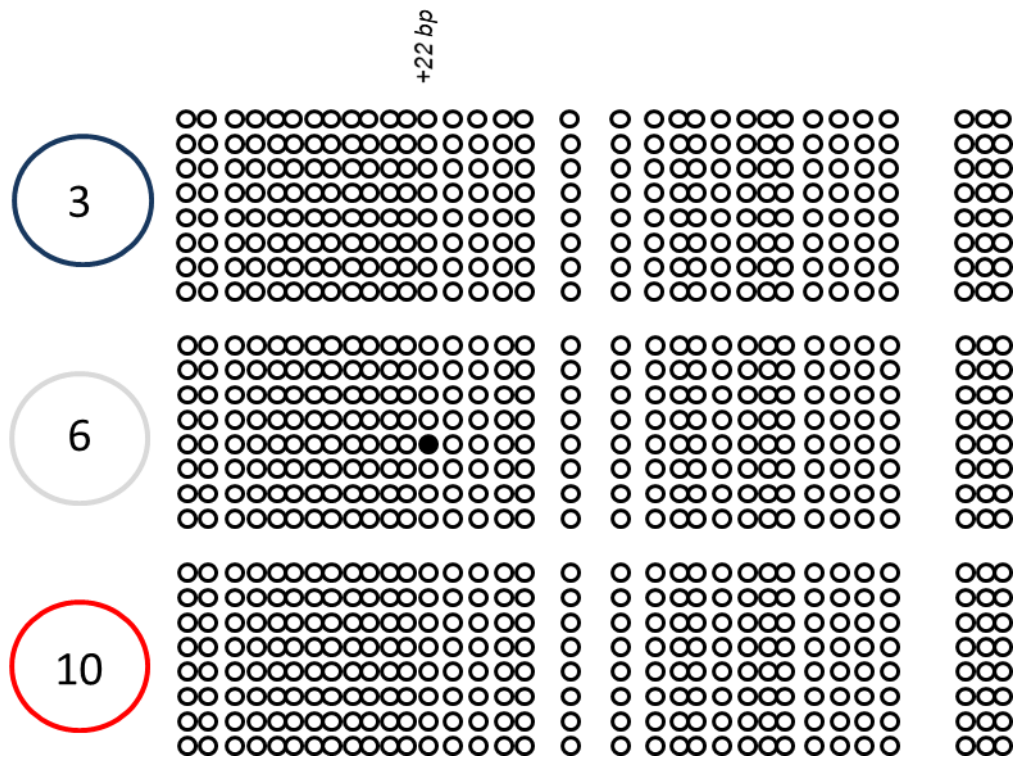
Im Folgenden werden die Methylierungsmuster der untersuchten Genregionen gemäß den durchgeführten Einzelklonsequenzierungen pro Ernährungsgruppe dargestellt (Abbildung 10–13).

Der ursprüngliche Methylierungsstatus des Cytosins des CpG-Dinukleotids entspricht dabei einem Kreis, der bei vorhandener Methylierung schwarz hinterlegt ist. Die Methylierungsmuster der CpG-Dinukleotide je sequenziertem Klon werden in einer Zeile, von links nach rechts gelesen, schematisch dargestellt. Die Abstände der Kreise zueinander veranschaulichen orientierend die Abstände der CpG-Dinukleotide untereinander in der Gensequenz.

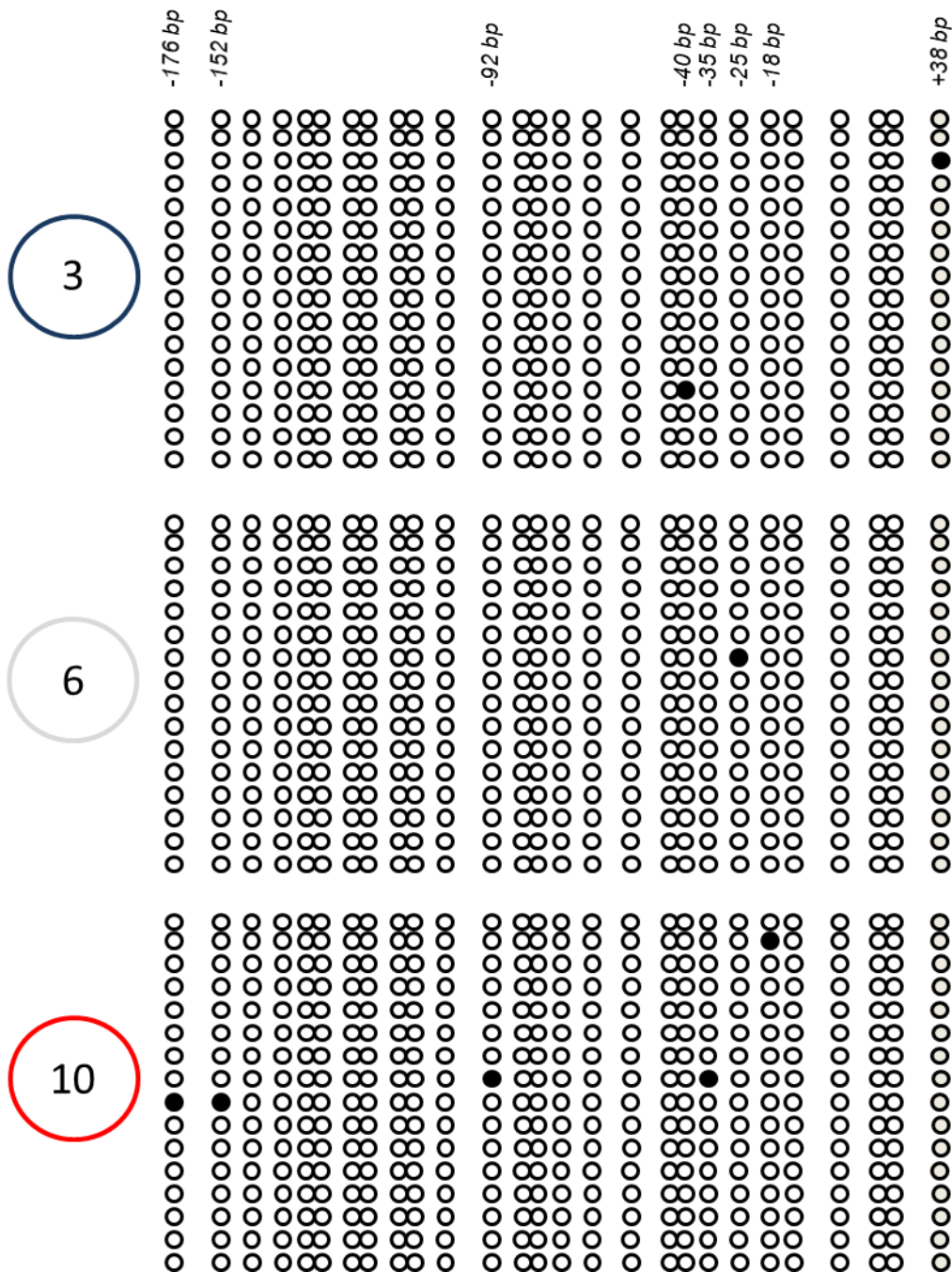
Wie den Abbildungen 10–13 zu entnehmen ist, fanden wir in den untersuchten Regionen insgesamt nur sehr wenige Methylierungen. Für die untersuchte Sequenz des CB1R- und MGL-Gens waren keine Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen den Ernährungsgruppen auszumachen (Abb. 10 und 11). Geringe, statistisch jedoch nicht verwertbare Tendenzen für eine möglicherweise vermehrte Methylierung in der relativen Unterfütterungsgruppe im Vergleich zur Kontroll- und relativen Unterernährungsgruppe fanden wir für FAAH und NAPE-PLD (Abb. 12 und 13).



**Abb. 10:** Methylierungsmuster CB1R-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50. Lokalisation auf Chromosom 4: 33,924,632–33,948,831, Promotorregion, Sequenzierungslänge inklusive Primer ~297 bp. Die Lokalisationsangabe der methylierten CpG-Dinukleotide bezieht sich auf deren Lage zum Start-Codon von Exon 1. Bei 16–17 sequenzierten Klonen je Ernährungsgruppe fanden sich insgesamt im untersuchten Bereich nur sehr wenige Methylierungen.

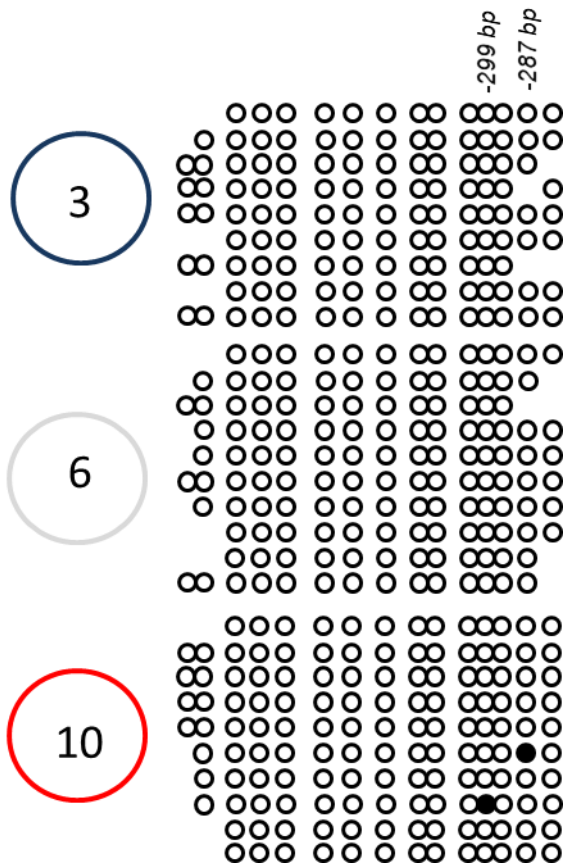


**Abb. 11:** Methylierungsmuster MGL-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50. Lokalisation auf Chromosom 6: 88,724,878–88,724,942, Sequenzierungslänge inklusive Primer ~459 bp. Die Lokalisationsangabe methylierter CpG-Dinukleotide bezieht sich auf deren Lage zum Start-Codon von Exon 1. Bei 8 sequenzierten Klonen fanden sich im untersuchten Abschnitt bei allen drei Ernährungsgruppen kaum methylierte Cytosine.



**Abb. 12:** Methylierungsmuster FAAH-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50. Lokalisation auf Chromosom 4: 115,996,669–116,017,926, Promotorregion, Sequenzierungslänge inklusive Primer ~303 bp. Die Lokalisationsangabe methylierter CpG-Dinukleotide bezieht sich auf deren Lage zum Start-Codon von Exon 1. Tendenziell finden sich bei 16 untersuchten Klonen je Ernährungsgruppe etwas mehr methylierte Cytosine in der relativen Unterfütterungsgruppe, wobei diese Methylierungen über die untersuchten CpG-Dinukleotide zufällig verteilt erscheinen.





**Abb. 13:** Methylierungsmuster NAPE-PLD-Gen im Fettgewebe männlicher Tiere an Tag P100. Lokalisation auf Chromosom 5: 21,701,390–21,701,535, Promotorregion, Sequenzierungslänge ~258 bp. Die Lokalisationsangabe methylierter CpG-Dinukleotide bezieht sich auf deren Lage zum Start-Codon von Exon 1. Bei den fehlenden Kreisen war eine Beurteilung des Methylierungsstatus aufgrund ungenauer Sequenzierung nicht möglich. Bei 9–10 Klonen je Ernährungsgruppe fanden sich im untersuchten Bereich kaum methylierte Cytosine.

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgend wird eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse gezeigt.

**Tab. 11:** Zusammenfassung der Expressionsanalysen. Signifikante Unterschiede (↑ grün und ↓ rot hinterlegt) und Tendenzen ((↑) hellgrün und ((↓) hellrot hinterlegt) in der mRNA-Expression durch Modifikation der frühen postnatalen Ernährung.

Gewebe	Gen		3 vs. 6		10 vs. 6	
Leber	NAPE-PLD	DAGL				
	FAAH	MGL	↑	↑	↓	↓
	CB1R	CB2R				
Fett	NAPE-PLD	DAGL	(↑)	↑	(↓)	↓
	FAAH	MGL		↑		↓
	CB1R	CB2R				
Nucleus arcuatus	CB1R	CB2R	↓	(↓)	↑	(↑)

**Tab. 12:** Zusammenfassung der EC-Konzentrationsmessung. Signifikante Unterschiede (↑ grün und ↓ rot hinterlegt) und Tendenzen ((↑) hellgrün und ((↓) hellrot hinterlegt) in der Endocannabinoid-Konzentration durch Modifikation der frühen postnatalen Ernährung.

Gewebe	EC	3 vs. 6		10 vs. 6	
		P50	P100	P50	P100
Leber	AEA		(↑)		(↓)
	2-AG	(↑)		(↓)	
	AA	↓		↑	
Fett	AEA	(↑)	(↑)	(↓)	(↓)
	2-AG				
	AA				

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte am Cross-fostering-Mausmodell gezeigt werden, dass eine Variation der frühen postnatalen Ernährung innerhalb einer natürlichen Spannweite dauerhafte Veränderungen in der körperlichen Entwicklung sowie im Endocannabinoid-System bewirkt. Die messbaren Veränderungen im Endocannabinoid-System könnten Ergebnisse einer direkten Adaptation des Organismus an das unterschiedliche Nahrungsangebot sein (*developmental programming*), wobei gerade die frühe postnatale Phase hierfür ein kritisches Zeitfenster darstellen könnte.

### 4.1 Schwachpunkte und Stärken des Cross-fostering-Mausmodells

Veränderungen im Endocannabinoid-System wurden in bisherigen Studien insbesondere für den Zustand von Übergewicht oder bei Vorliegen metabolischer Erkrankungen beschrieben. Die Modifikation der frühen postnatalen Ernährung in dem hier angewandten Cross-fostering-Ansatz wurde durch Veränderung der Wurfgrößen erreicht, d. h. vorrangig hinsichtlich der Quantität und nicht der Qualität (niedrig- bzw. hochkalorisch, veränderter Fettanteil o. Ä.), und die Tiere zeigten je nach Ernährungsgruppe signifikante Unterschiede bezüglich Größe, Gewicht und BMI, ohne dabei krankhaft über- bzw. untergewichtig zu sein. Somit spiegeln diese Bedingungen am ehesten die Gegebenheiten in natürlicher Umgebung wider. Ob die Veränderungen im ECS lediglich als Adaptation der Organismen an die Veränderungen von Körperzusammensetzung bzw. BMI zu werten sind oder sich im weiteren Verlauf als Risikofaktoren für metabolische Erkrankungen in einem späteren Erwachsenenalter herausstellen, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden. Hierzu hätte eine Nachbeobachtung der Versuchstiere aus den jeweiligen Ernährungsgruppen mit Evaluierung metabolischer Risikofaktoren wie z.B. Blutdruckmessung, Glucosetoleranz-Tests o. Ä. erfolgen müssen. Nach Umverteilung und freiem Zugang zu Nahrung an Tag P21 zeigten sich an Tag P50 und P100 anhaltende Unterschiede in Gewicht, BMI und Fettgewebsmasse. Hierzu bleibt aber ungeklärt, ob die im ECS gefundenen Veränderungen direkten Einfluss auf Entwicklung und Unterhalt der

anhaltenden auxologischen Unterschiede haben, etwa durch Beeinflussung von Appetit und Nahrungsaufnahme, oder aber lediglich Folge der unterschiedlich geprägten Körperzusammensetzungstypen sind. Möglicherweise sind diese Veränderungen auch durch eine direkte Interaktion mit der für das postnatale somatische Wachstum maßgeblichen somatotropen Achse bedingt (Al-Massadi et al. 2010; Migliarini und Carnevali 2008). Zwar wurde in unserem Cross-fostering-Ansatz keine Quantifizierung der Nahrungsmengen nach Umverteilung durchgeführt, jedoch fanden Kappeler et al. (2009) in einem ähnlichen Cross-fostering-Modell mit ebenfalls drei, sechs und zehn Jungtieren je Muttertier keine signifikanten Unterschiede in der aufgenommenen Nahrungsmenge zwischen den ehemaligen Ernährungsgruppen im Alter von drei Monaten bei weiterhin nachweisbaren deutlichen Unterschieden in Körpergröße und -gewicht. Zudem zeigten die Autoren, dass bei den Tieren der ehemaligen Überfütterungsgruppe im Alter von drei Monaten trotz ähnlicher Nahrungsaufnahme eine Hyperinsulinämie sowie eine reduzierte Glucosetoleranz vorlag. Daher gehen die Autoren von langfristigen Veränderungen im Energiemetabolismus bzw. Kohlenhydratstoffwechsel ausgelöst durch Veränderungen der frühen postnatalen Ernährung aus. Auch andere Autoren brachten persistierende Gewichtsunterschiede nach Modifikation der frühen postnatalen Ernährung mit langfristigen metabolischen Veränderungen in Verbindung, wenn auch eine eindeutige Zuordnung von Ursache und Folgeeffekten hier nicht möglich ist (Li et al. 2013; Velkoska et al. 2008).

Hinsichtlich des hier angewandten Cross-fostering-Ansatzes, in dem neben der Umverteilung in Ernährungsgruppen mit vorgegebenen Wurfgrößen systematisch alle Jungtiere von ihren leiblichen Muttertieren getrennt wurden, um dadurch ein bevorzugtes Säugen verbliebener eigener Nachkommen zu vermeiden, sollte erwähnt werden, dass es mittlerweile Hinweise auf eine mögliche stressbedingte Beeinflussung des ECS durch Trennung vom Muttertier gibt (Mela et al. 2016). Da in der vorliegenden Versuchsreihe jedes Jungtier vom Muttertier getrennt wurde, ist davon auszugehen, dass dadurch keine nennenswerte Beeinflussung hinsichtlich der gruppenspezifischen ECS-Aktivität entstanden ist. In zukünftigen Cross-fostering-Modellen wäre aber eine Kontrollgruppe mit z. B. sechs leiblichen Jungtieren eine interessante Ergänzung.

## 4.2 Veränderungen im Endocannabinoid-Metabolismus

Nachdem bereits zahlreiche Studien eine Dysregulation des Endocannabinoid-Systems im Sinne einer Überaktivität bei Übergewicht beschrieben haben (Bensaid et al. 2003; Blüher et al. 2006; Côté et al. 2007; Engeli et al. 2014; Osei-Hyiaman et al. 2005), soll im Folgenden eine Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in die aktuelle Studienlage erfolgen.

Entgegen der Aussagen einiger vorheriger Studien mit zum Teil widersprüchlichen Folgerungen hinsichtlich Relevanz und Regulationsmechanismus der CB1R-Aktivität bei einer Überaktivierung des ECS fanden wir keine Expressionsunterschiede des CB1R im Leber- und Fettgewebe der unterschiedlichen Ernährungsgruppen. Zum einen zeigten einige Autoren eine vermehrte mRNA-Expression des CB1R im viszeralen Fettgewebe übergewichtiger Patienten (Pagano et al. 2007; Sarzani et al. 2009) bzw. im subkutanen abdominellen Fettgewebe übergewichtiger Mäuse (Bensaid et al. 2003). Zum anderen berichteten verschiedene Autoren wiederum von einer verminderten CB1R-mRNA-Expression im subkutanen abdominellen Fettgewebe übergewichtiger Probanden (Bennetzen et al. 2010; Engeli et al. 2005) und führten dies auf einen negativen *feedback*-Mechanismus (verminderte CB1R-mRNA-Expression als Folge vermehrter zirkulierender ECs (Engeli et al. 2005)) zurück oder sprachen dem CB1R eine Relevanz an der Überaktivität des ECS ab (Bennetzen et al. 2010; Löfgren et al. 2007). Andere Autoren wiederum gehen von einem positiven *feedback*-Mechanismus im ECS aus (Di Marzo und Matias 2005; Piazza et al. 2007). Laut Cooper und Regnell (2014) sowie Osei-Hyiaman et al. (2008) besteht eine deutliche Assoziation erhöhter CB1R-Expression im Lebergewebe bei ernährungsbedingtem Übergewicht und Vorliegen Übergewicht-assoziiierter Erkrankungen wie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung. Somit gehen wir davon aus, dass das Fehlen von CB1R-Expressionsunterschieden im Fett- und Lebergewebe in unserer Studie dadurch bedingt ist, dass die Tiere weder adipös noch (bereits) metabolisch erkrankt waren. Dies wird zudem dadurch bestätigt, dass keine statistisch signifikanten Konzentrationsunterschiede der Endocannabinoide AEA und 2-AG zwischen den jeweiligen Ernährungsgruppen der P50-Kohorte vorliegen, wie dies jedoch von mehreren Autoren im Status von Übergewicht (Blüher et al. 2006; Engeli et al. 2014) bzw. krankhaftem Übergewicht mit

Vorliegen weiterer kardiometabolischer Risikofaktoren (Côté et al. 2007) beschrieben wurde.

Der Nucleus arcuatus vermittelt über die Ausschüttung orexigener und anorexigener Peptide ein Hunger- bzw. Sättigungsgefühl. Die Ausschüttung jener Peptide erfolgt über spezielle Neuronengruppen und wird dabei vom Endocannabinoid-System beeinflusst (s. Kapitel 1.2.1). Entgegen der unveränderten CB1R-Expression im Leber- und Fettgewebe konnten wir im Nucleus arcuatus der relativen Überernährungsgruppe eine im Vergleich zur relativen Unterernährungsgruppe verminderte CB1R-Expression messen. Eine negative Korrelation zwischen Übergewicht und CB1R-Expression wurde, wie oben bereits erwähnt, in einigen Studien für periphere Gewebe beschrieben. Aber auch im zentralen Nervensystem (allerdings ausschließlich in extrahypothalamischen Regionen) zeigten weitere Autoren eine verminderte CB1R-Expression im Tiermodell übergewichtiger Ratten (Harrold et al. 2002). Das Fehlen des CB1R bewirkt im Tiermodell ein verändertes Expressionsmuster anorexigener Peptide (Cota et al. 2003; Lage et al. 2015), und man könnte annehmen, dass dies ebenso durch eine verminderte Expression des CB1R bedingt werden kann. Ob dies in unserem Tiermodell schließlich zu einem verminderten Hunger- bzw. vermehrten Sättigungsgefühl mit konsekutiv veränderter Nahrungsaufnahme führt, können wir nicht beantworten.

Hinweise für Veränderungen im EC-Metabolismus fanden sich im Expressionsmuster der auf- (NAPE-PLD und DAGL) sowie abbauenden Enzyme (FAAH und MGL). Im viszeralen Fettgewebe der relativ überernährten Tiere zeigten sich signifikant bzw. grenzwertig signifikant erhöhte mRNA-Expressionsmuster für DAGL und NAPE-PLD. Eine ebenfalls erhöhte mRNA-Expression von NAPE-PLD im viszeralen Fettgewebe sowie von DAGL im subkutanen abdominellen (aber nicht im viszeralen) Fettgewebe übergewichtiger Probanden beschrieben bereits Pagano et al. (2007). Erhöhte DAGL-mRNA-Expressionsmuster fanden sich zudem im subkutanen abdominellen Fettgewebe übergewichtiger Probanden unabhängig von einer fettarmen oder -reichen Ernährung (Engeli et al. 2014).

Hinsichtlich der Endocannabinoid-Degradation fanden wir eine signifikant vermehrte mRNA-Expression von MGL sowohl im Leber- als auch im Fettgewebe sowie von FAAH im Lebergewebe der relativen Überfütterungsgruppe.

Bezüglich der FAAH-Expression ist die Studienlage kontrovers, da zum einen von einer verminderten (Blüher et al. 2006; Engeli et al. 2014), zum anderen von einer unveränderten, wie bei uns vorliegend, oder auch vermehrten (Cable et al. 2014; Pagano et al. 2007) FAAH-Expression im Fettgewebe in Zusammenhang mit Übergewicht bzw. Überernährung berichtet wird. Eine weitere interessante Beobachtung im FAAH-Expressionsmuster machten Murdolo et al. (2007). Sie beschrieben eine positive Korrelation zwischen der FAAH-Expression und dem Seruminsulinspiegel. Hierzu untersuchten die Autoren mittels euglykämischer Insulinclamp-Technik subkutanes Fettgewebe schlanker und adipöser Männer und zeigten bei den schlanken Männern eine vermehrte FAAH-Expression 270 Minuten nach Beginn der Insulininfusion. Bei den adipösen Männern hingegen fand sich kein insulinabhängiger Expressionsunterschied, jedoch war die FAAH-Expression im Nüchternzustand im Vergleich zur schlanken Gruppe bereits signifikant erhöht. In unserem Cross-fostering-Ansatz sind die Tiere der ehemaligen relativen Überfütterungsgruppe zwar schwerer, aber nicht übergewichtig. Dies und die Annahme, dass die Tiere, wie bereits in Bezug auf die Expressionsmuster des CB1R angenommen wurde, zudem metabolisch gesund waren und vermutlich zum Untersuchungszeitpunkt keinen erhöhten Insulinspiegel aufwiesen, ist mit der unveränderten FAAH-Expression vereinbar.

Im Hinblick auf MGL wurde bisher von einer entweder vermehrten Expression in viszeralem und subkutanem abdominellen Fettgewebe (Pagano et al. 2007) bzw. verminderten Expression in subkutanem abdominellen Fettgewebe übergewichtiger Probanden (Engeli et al. 2014) berichtet. Pagano et al. kamen aber auch zu dem Schluss, dass eine Dysregulation im ECS Fettgewebsdepot-abhängig ist. So zeigten sie im subkutanen glutealen Fettgewebe wiederum eine verminderte Expression von MGL wie auch Fettgewebsdepot-spezifische Unterschiede für weitere Parameter des ECS. Dies verdeutlicht die Komplexität der Regulationsmechanismen im ECS. Eine vermehrte Expression von MGL im Fettgewebe bei ausbleibendem relativen Anstieg der FAAH-Expression wie in unserem Cross-fostering-Ansatz ließe sich durch die Beteiligung von MGL an der Degradation aller Monoglyceride im Fettgewebe erklären. MGL ist nicht spezifisch für die Endocannabinoid-Degradation (Dinh et al. 2002).

Während bereits einige Studien hinsichtlich der ECS-Aktivität unter Betrachtung sowohl der Rezeptoren als auch der synthetisierenden und degradierenden Enzyme im Fettgewebe existieren, liegen bezüglich der beteiligten Enzyme im Lebergewebe bei Übergewicht weniger Arbeiten vor. Hier konzentriert sich die aktuelle Forschung mehr auf die Bedeutung des ECS im Hinblick auf die Entwicklung von Lebererkrankungen. Nun stellt sich die Frage, wie sich hier die im Lebergewebe der relativen Überfütterungsgruppe vermehrte Expression von FAAH an Tag P50 einordnen lässt. Hierzu soll im Folgenden erneut auf die Untersuchungsergebnisse von Osei-Hyiaman et al. (2005) eingegangen werden. Diese Autoren zeigten u. a., dass eine fettreiche Ernährung sowohl bei adipösen CB1R+/+ als auch bei nicht-adipösen CB1R/--Mäusen eine signifikante Erhöhung der AEA-Konzentration im Lebergewebe bedingt. Dies wiederum führten die Autoren auf eine deutlich verminderte FAAH-Aktivität zurück. Expressionsanalysen führten wir bei 50 Tage alten Tieren durch, die keine Konzentrationsunterschiede für AEA im Lebergewebe zeigten, wohingegen eine grenzwertig erhöhte AEA-Konzentration im Lebergewebe der relativen Überfütterungsgruppe 100 Tage alter Tiere vorlag; eine Messung der FAAH-Expression im Lebergewebe der P100-Kohorte erfolgte nicht. Man könnte spekulieren, dass das lediglich vermehrte Nahrungsangebot in unserem Modell anders als eine explizit fettreiche Ernährung keine relevanten Veränderungen der AEA-Konzentration bedingt und somit die vermehrte FAAH-Expression in der relativen Überfütterungsgruppe anderen Regulationsmechanismen unterliegen muss.

Den Übergang von Übergewicht zum Folgeerkrankungs-behafteten Übergewicht kennzeichnet das Hinzukommen einer chronischen metabolischen Inflammation, auch Metaflammation genannt, durch im Fettgewebe vermehrt gebildete proinflammatorische Zytokine wie z.B. *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL6) (Lee et al. 2013). In diesem Zustand ist, wie bereits in der Einleitung erörtert, das Risiko für die Entwicklung metabolischer Erkrankungen wie z.B. der nicht-alkoholischen Steatohepatitis erhöht. Von den Autoren Kempf et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von FAAH in viszeralem Fettgewebe übergewichtiger Probanden *in vitro* durch TNF- $\alpha$  negativ reguliert wird, wodurch eine Überaktivierung im ECS durch verminderten Abbau der EC entsteht. Daraus lässt sich schließen, dass sich eine Dysregulation im ECS im Sinne einer Überaktivierung möglicherweise erst im Rahmen einer sich später entwickelnden Metaflam-



mation etabliert. Die in unserem Cross-fostering-Ansatz beobachtete vermehrte Expression von FAAH im Lebergewebe ehemals relativ überernährter Versuchstiere könnte somit dadurch erklärt werden, dass sich die Tiere zum Zeitpunkt der Messung noch nicht in einem Zustand chronischer Inflammation befunden haben.

Konzentrationsmessungen der Endocannabinoide AEA und 2-AG erfolgten, anders als in vielen der bisher genannten Studien, im Gewebe (Leber- und Fettgewebe) und nicht im Serum, aber ebenfalls nach vorheriger Fastenperiode. Bei übergewichtigen Probanden konnten vermehrt zirkulierende EC nachgewiesen werden (Côté et al. 2007, Engeli et al. 2005). Zwar konnten wir keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für AEA und 2-AG zwischen den Ernährungsgruppen feststellen, konnten aber im Vergleich der jeweiligen Ernährungsgruppen vor allem der P100-Kohorte Tendenzen in Richtung einer zunehmenden EC-Konzentration mit zunehmendem Nahrungsangebot beschreiben. Möglicherweise lassen diese tendenziellen Unterschiede in der Gewebekonzentration den Rückschluss auf eine dauerhafte Veränderung im Metabolismus der EC zu.

Insgesamt lassen unsere Beobachtungen einer vermehrten Expression sowohl der auf- als auch der abbauenden Enzyme in der relativen Überfütterungsgruppe der P50-Kohorte mit geringen Konzentrationsunterschieden der Endocannabinoide AEA und 2-AG in der relativen Überfütterungsgruppe vor allem der P100-Kohorte zwar auf dauerhafte, mit der Körperzusammensetzung korrelierende, Veränderungen im ECS schließen. Jedoch gehen wir davon aus, dass das ECS in diesem hier untersuchten Zustand noch weitgehend ausbalanciert ist.

#### 4.3 Methylierungsstatus

Unterliegen die Expressionsunterschiede einer messbaren epigenetischen Regulation? Hierzu untersuchten wir den Methylierungsstatus in CpG-Dinukleotid-reichen Abschnitten der Promoterregionen von CB1R, FAAH und MGL im Lebergewebe sowie von NAPE-PLD im Fettgewebe. In den untersuchten Regionen ließen sich insgesamt nur sehr wenige Methylierungen nachweisen. In jenen Abschnitten mit fehlendem bzw. nahezu fehlendem Nachweis von Methylierungen sind dementsprechend keine Unterschiede zwischen den

Ernährungsgruppen auszumachen. Geringe, statistisch jedoch nicht verwertbare Tendenzen für eine vermehrte Methylierung in der relativen Unterfütterungsgruppe fanden wir für FAAH und NAPE-PLD. Einen Vergleich unserer Methylierungsanalysen mit z. B. der Methylierungsdichte von CpG-Dinukleotiden in der POMC-Promotorregion, deren Methylierungsmuster sich durch postnatale Überernährung im Sinne einer Hypermethylierung verändert (Plagemann et al. 2009), führten wir in dem von uns gewählten Screeningansatz nicht durch. Jedoch wäre in Anbetracht der geringen Zahl nachgewiesener Methylierungen einzelner Komponenten des ECS die zusätzliche Methylierungsanalyse einer vorbeschrieben höhergradig methylierten Region wie etwa der genannten POMC-Promotorregion als Positivkontrolle von Interesse, um die Zuverlässigkeit bzw. Sensitivität der eingesetzten Methoden zu demonstrieren.

Ein möglicher Erklärungsansatz für unsere Ergebnisse ist, dass die ausgewählten Gensequenzen nicht die relevanten Regionen einer via CpG-Methylierung gesteuerten Expressionsregulation sind.

Die Auswahl der Genabschnitte wurde ebenfalls durch eine Selektion geeigneter Primer eingeschränkt. Denkbar wäre, dass etwa benachbarte Promotorabschnitte, die aufgrund z.B. einer noch höheren CpG-Dichte einer PCR-Amplifikation schwerer zugänglich sind, die gesuchten methylierungsreicheren Abschnitte beinhalten. Des Weiteren zeigten Irizarry et al. (2009), dass gewebespezifische DNA-Methylierungen, die deutlich mit einer verminderten Genexpression korrelieren, ebenfalls in sog. *island shores* zu finden sind. Dabei handelt es sich um Gensequenzen, die im Abstand bis zu 2 kb zu den CpG-Inseln zu finden sind. Zusammenfassend erachteten wir es nicht als zielführend, mit der verwendeten konventionellen Methode und weiteren Einzelklonsequenzierungen nach methylierten bzw. ernährungsabhängig differenziell methylierten Regionen zu screenen. Vielmehr gehen die Überlegungen dahin, zukünftig mittels Array-basierter Methoden methylierte Kandidatenregionen zu identifizieren und etwaige Methylierungsunterschiede dann mittels durchsatzstarker Verfahren wie der Pyrosequenzierung quantitativ zu bestätigen.

Hinsichtlich des Methylierungsstatus des CB1R liegen verschiedene Beobachtungen vor. Eine vermehrte Methylierung im Promotor mit konsekutiv verminderter Genexpression wurde in humanen Gewebeproben kolorektaler Karzinome (Wang et al. 2008) sowie in männlichen Keimzellen von Mäusen, die postnatal täglich für drei Stunden vom Muttertier

getrennt wurden (Franklin et al. 2010), beschrieben. An dieser Stelle sollte aber betont werden, dass Methylierungsmuster in Karzinomen einen besonderen Stellenwert besitzen. In der Tumorgenese ist neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Genmutationen auch die Inaktivierung durch epigenetische Mechanismen wie Methylierungen von Bedeutung (Jones und Baylin 2002), weshalb hier im Sinne von Hypermethylierungen ein deutlich erhöhter Methylierungsanteil zu erwarten ist. In den humanen Gewebeproben kolorektaler Karzinome lag der Anteil methylierter CpG-Dinukleotide bei bis zu 77 % (Wang et al. 2008). Franklin et al. (2010) untersuchten in Keimzellen männlicher Mäuse einen Abschnitt im CB1R-Gen, der nahezu identisch mit dem von uns untersuchten Abschnitt (ca. 200–100 bp vor dem Startcodon) ist. Eine Quantifizierung methylierter CpG-Dinukleotide erfolgte in dieser Studie via Pyrosequenzierung, und es konnten insgesamt wenige (bis zu max. 15 %) Methylierungen nachgewiesen werden, die jedoch in der Gruppe der wiederholt vom Muttertier getrennten Mäuse signifikant erhöht waren. Man kann aus den Ergebnissen dieser Studie schlussfolgern, dass der von uns untersuchte Genabschnitt im CB1R prinzipiell Veränderungen im Grad der Methylierungen zeigen kann. Im Blut von Patienten mit verschiedenen Essstörungen fanden Frieling et al. (2009) eine vermehrte CB1R-Expression und ebenfalls Methylierungen in der CB1R-Promotorregion (> 60 %), konnten aber nur eine geringe Korrelation des Methylierungsgrades mit der mRNA-Expression ausmachen. Obwohl in unserer sowie in der Arbeit von Franklin et al. kurze etwa 200–300 bp lange Abschnitte untersucht wurden, analysierten Frieling et al. den Methylierungsstatus der gesamten Promotorregion, was einer Länge von > 5000 bp entspricht. Die für die Transkriptionsregulation kritischen Regionen, die CpG-Inseln, sind mit etwa 200 bp deutlich kürzer, weshalb bei Analyse eines langen Genabschnittes keine Aussage über den Methylierungsstatus in den entsprechenden Abschnitten gemacht werden können. In einer weiteren Arbeit zur Alzheimererkrankung wurden Expressions- und Methylierungsanalysen einiger Parameter des ECS durchgeführt, und es fand sich eine vermehrte FAAH-Expression bei gleichzeitig verminderter DNA-Methylierung mit 41,2 % vs. 55,9 % in der Kontrollgruppe (D'Addario et al. 2012). Methylierungsanalysen wurden hier in einem Abschnitt innerhalb des Exon1, der 18 CpG-Dinukleotide beinhaltet, durchgeführt.

Somit existieren Hinweise darauf, dass Expressionsunterschiede von Komponenten des ECS durch Veränderungen im Methylierungsstatus ihrer Gene bedingt sein können. Unserem Kenntnisstand nach konnte aber bisher kein Zusammenhang zu einer Beeinflussung durch Ernährung in Stoffwechsel-relevanten Geweben hergestellt werden.

#### 4.4 *Developmental programming* von somatischem Wachstum und dem ECS

Unsere Annahme ist, dass durch Variation der frühen postnatalen Ernährung Umweltbedingungen geschaffen wurden, die im Sinne eines *developmental programming* Veränderungen im Metabolismus des ECS bewirkt haben. Daraufhin entwickelten sich verschiedene Phänotypen: die „größeren“ Tiere der relativen Überfütterungsgruppe und die „kleineren“ Tiere der relativen Unterfütterungsgruppe. Nun gibt es bereits Studien, die untersucht haben, welche molekularen Mechanismen die Entstehung dieser unterschiedlichen Phänotypen bedingen. Hierbei ist die somatotrope Achse, auch GH/IGF-Achse (*Growth hormone / Insulin-like growth factors*), von Bedeutung. In dem bereits erwähnten ähnlichen Cross-fostering-Modell von Kappeler et al. (2009) entstanden durch Variation der Wurfgröße ähnliche Phänotypen wie in unserem Versuch. Gleichzeitig führten die Autoren Untersuchungen einzelner Parameter der somatotropen Achse durch und kamen zu der Schlussfolgerung, dass Veränderungen in dieser die Entstehung der verschiedenen Phänotypen bedingen. Wenn auch bisher wenig über die Interaktion zwischen dem ECS und der somatotropen Achse bekannt ist, konnten Al-Massadi et al. (2010) eine mögliche Interaktion vermittelt über das Hormon Ghrelin (s. Kapitel 1.2.1.1) beschreiben. Ghrelin stimuliert als Ligand die GH-Freisetzung, die wiederum durch periphere CB1R-Blockade mittels SR141716 inhibiert werden konnte.

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass das Endocannabinoid-System ebenfalls einer frühen Programmierung als Reaktion auf eine veränderte postnatale Ernährungssituation zugänglich ist. Jene Programmierung resultiert in einer veränderten Genexpression einzelner Enzyme des ECS, hinweisend auf zugrundeliegende epigenetische Veränderungen, wenn auch letztere mittels des in dieser Arbeit verwendeten Screening-Ansatzes (Bisulfitierung der DNA und Einzelklonsequenzierungen CpG-reicher Promotorbereiche zur Detektion differenzieller Methylierungsmuster) nicht untermauert werden konnten.

Epidemiologische Beobachtungen, die bereits im Einleitungsteil erwähnt wurden, zeigten eine Korrelation zwischen niedrigem Geburtsgewicht, raschem Aufholwachstum und einem erhöhten Risiko für metabolische Erkrankungen im Erwachsenenalter (Barker und Osmond 1986; Eriksson et al. 1999; Stevens et al. 2014). Dem vorweg geht eine Unterversorgung *in utero*, so dass ein Missverhältnis zwischen Vorhersage (postnatal ebenfalls vermindertes Nahrungsangebot) und Realität (gebessertes Nahrungsangebot) entsteht. Das angenommene Missverhältnis in unserem Cross-fostering-Ansatz besteht in einer „normalen“ Versorgung *in utero* mit einem dann postnatal vermehrten oder verminderten Nahrungsangebot. Man nimmt an, dass nicht nur ein niedriges Geburtsgewicht per se die Neigung zu Übergewicht und metabolischen Erkrankungen im Erwachsenenalter bedingt, sondern eben jene Missverhältnisse zwischen Vorhersage und Realität als *predictive adaptive response* zu ungünstigen Anpassungsvorgängen im Organismus führen (Cleal et al. 2007). Dabei ist insbesondere ein rasches Aufholwachstum bei Kindern, die in Bezug auf das Reifealter klein geboren wurden (*small for gestational age*, SGA) von Bedeutung. Hier ist aber bisher in weiten Teilen noch unverstanden, wie stark und wie lange in die Kindheit hinein ein postnatales Aufholwachstum das *developmental programming* beeinflussen kann. Wirkt sich ein langsames Aufholwachstum ähnlich aus wie ein rasches, wenn die Ernährungsbedingungen gleich sind? Damit würde sich die Frage ergeben, ob metabolische Veränderungen eher direkte Anpassungen an ein zwar verbessertes, aber in Kontrast zur ursprünglichen Erwartung stehendes Nahrungsangebot sind und eine Gewichtszunahme bewirken oder sekundär als Folge der Gewichtszunahme auftreten. In einer Assoziationsstudie zeigten Leunissen et al. (2009), dass das Tempo der postnatalen Gewichtszunahme (rasch innerhalb der ersten drei vs. langsam innerhalb der ersten zwölf Lebensmonate) ausschlaggebend für das Risikoprofil (höherer Anteil Gesamtkörperfett, zentrale Adipositas und verminderte Insulinsensitivität) im Erwachsenenalter ist. Eine rasche postnatale Gewichtszunahme korreliert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko im Erwachsenenalter. Zudem postulieren die Autoren, dass lediglich ein niedriges Geburtsgewicht keine erhöhte Morbidität im Erwachsenenalter für metabolische Erkrankungen bedingt.

Ein Aufholwachstum oder gar eine überschießende pathologische Gewichtszunahme findet sich nach freiem Zugang zu Nahrung ab P21 in unserem Cross-fostering-Ansatz zumindest bis zu einem Alter von 100 Tagen nicht. Hier sollte aber noch einmal deutlich

gemacht werden, dass wir weder Veränderungen der pränatalen Umweltbedingungen vorgenommen haben, um z.B. Jungtiere mit besonders niedrigem Geburtsgewicht i.S. einer intrauterinen Wachstumsretardierung hervorzubringen, noch provozierten wir ein rasches Aufholwachstum ab Tag P21 durch z.B. Gabe einer hochkalorischen Ernährung. Möglicherweise findet ein pathologisches Aufholwachstum erst im Rahmen einer tatsächlichen Überernährung mit anhaltend erhöhter Kalorienzufuhr statt.

Die beschriebenen Überlegungen zu Prägbarkeit, *developmental programming* und Aufholwachstum stützen sich überwiegend auf epidemiologische sowie tierexperimentelle Studien, in denen zumeist sowohl die prä- als auch postnatalen Umweltbedingungen verändert wurden. Hierbei bleibt es allerdings unklar, ob kritische Zeitfenster für Prägbarkeit bei Mensch und Maus überhaupt vergleichbar bzw. deckungsähnlich sind. So ist die Maus bei Geburt hinsichtlich der Reifung der Organe doch wesentlich weniger weit entwickelt als der Mensch bei Geburt. Wir konnten am Beispiel der Maus die frühe postnatale Phase als ein mögliches kritisches Zeitfenster ermitteln. Ob dies auf den Menschen übersetzt ebenfalls der frühen postnatalen Phase entspräche, können wir nicht beantworten.

## 5. Zusammenfassung

In zahlreichen epidemiologischen Studien und Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die frühe postnatale Phase ein kritisches Zeitfenster ist, in dem durch veränderte (anders als die Vorhersage *in utero*) bzw. ungünstige Umweltbedingungen eine langfristig nachteilige Prägung des Metabolismus entstehen kann. Diese Veränderungen können das Risiko für die Entwicklung von u. a. Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes mellitus im Erwachsenenalter erhöhen. Des Weiteren besteht nach aktuellem Stand der Wissenschaft ein Zusammenhang zwischen Adipositas bzw. Adipositas-assoziierten Erkrankungen und einer Dysregulation im Sinne einer Überaktivität im Endocannabinoid-System. Das ECS spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels sowie der Nahrungsaufnahme, weshalb die Erforschung der Faktoren, die zu einer dauerhaften Überaktivierung führen, sowie die Erforschung langfristiger Folgen einer Überaktivität im ECS eine bedeutende Rolle spielen.

Das Cross-fostering-Mausmodell eignet sich zur Erforschung möglicher Folgen einer (relativen) Unter- bzw. Überernährung auf den Metabolismus. Ziel unserer Arbeitsgruppe war es, durch Variation der Wurfgröße bzw. Anzahl der zu stillenden Jungtiere (drei, sechs und zehn je Muttertier) ein unterschiedliches Nahrungsangebot im Rahmen einer natürlichen Spannweite zu schaffen und im Rahmen der vorliegenden Arbeit Auswirkungen auf die relative Expression und Methylierungsmuster relevanter Enzyme und Rezeptoren des ECS zu untersuchen.

Wir konnten zeigen, dass die o. g. Cross-fostering-Strategie mit konsekutiver relativer Über- bzw. Unterernährung dauerhafte Veränderungen in Körperwachstum und Expressionsmuster einiger Parameter im ECS bewirkt. Insbesondere zeigte sich in der Gruppe der relativ überernährten Tiere eine vermehrte Expression im Lebergewebe für die Enzyme FAAH und MGL, im Fettgewebe für DAGL und MGL sowie in der Gruppe der relativ unterernährten Tiere eine vermehrte Expression für den CB1-Rezeptor im Nucleus arcuatus.

Demgegenüber zeigten die von uns untersuchten Promotorregionen der für CB1R, MGL und FAAH codierenden Gene im Lebergewebe sowie für NAPE-PLD im Fettgewebe keine

signifikanten Methylierungsunterschiede zwischen den jeweiligen Ernährungsgruppen. Auch aufgrund des in allen untersuchten Promotorregionen insgesamt allenfalls äußerst geringen Grades nachweisbarer CpG-Methylierungen erschien es nicht als zielführend, mit der verwendeten konventionellen Methode und weiteren Einzelklonsequenzierungen nach methylierten bzw. ernährungsabhängig differenziell methylierten Regionen zu screenen. Vielmehr gehen die Überlegungen dahin, zukünftig mittels Array-basierter Methoden variabel methylierte Kandidatenregionen zu identifizieren und etwaige Methylierungsunterschiede dann mittels durchsatzstärkerer Verfahren wie der Pyrosequenzierung genauer zu quantifizieren.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass eine früh-postnatale Modifikation der Ernährung wie hier durch Modifikation der Wurfgröße in einem Cross-fostering-Mausmodell langfristig messbare Veränderungen im Endocannabinoid-System bewirken kann. Die gefundenen Expressionsunterschiede sind in Teilen mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen vereinbar. Weitere Arbeiten müssen nun zeigen, inwieweit diese anhaltenden Veränderungen im ECS, die sich bereits in Folge einer die natürliche Variationsbreite nicht überschreitenden Ernährungsmodifikation ergeben, in kausalem Zusammenhang mit dem im Erwachsenenalter erhöhten metabolischen und kardiovaskulären Risikoprofil etwa von Menschen mit niedrigem Geburtsgewicht oder perinataler Mangelversorgung stehen könnten.



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Jungtierumverteilung.....	29
Abb. 2: Gewicht [g] in Abhängigkeit vom Lebensalter [Tag] und dem Geschlecht einer P100 Kohorte.....	46
Abb. 3: BMI [g/m <sup>2</sup> ] an den Tagen P50 und P100 in Abhängigkeit von der Ernährungsgruppe und dem Geschlecht.....	46
Abb. 4: Masse perigonadales Fett [g] an den Tagen P50 und P100 in Abhängigkeit von der Ernährungsgruppe und dem Geschlecht.....	47
Abb. 5: Relative Genexpression metabolisierender Enzyme des ECS im viszeralen Fettgewebe männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen.....	48
Abb. 6: Relative Genexpression metabolisierender Enzyme des ECS im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen.....	49
Abb. 7: Relative Genexpression der Cannabinoidrezeptoren CB1R und CB2R im Nucleus arcuatus männlicher Tiere an Tag P50 innerhalb der verschiedenen Ernährungsgruppen.....	50
Abb. 8: Konzentration der Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie der Arachidonsäure in ng/g Protein [ng/g] bzw. µg/g Protein [µg/g] im Lebergewebe männlicher 50 und 100 Tage alter Tiere. ....	51
Abb. 9: Konzentration der Endocannabinoide AEA und 2-AG sowie der Arachidonsäure in ng/g Protein [ng/g] bzw. µg/g Protein [µg/g] im Fettgewebe männlicher 50 und 100 Tage alter Tiere. ....	52
Abb. 10: Methylierungsmuster CB1R-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50.....	54
Abb. 11: Methylierungsmuster MGL-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50.....	55

Abb. 12: Methylierungsmuster FAAH-Gen im Lebergewebe männlicher Tiere an Tag P50.....	56
Abb. 13: Methylierungsmuster NAPE-PLD-Gen im Fettgewebe männlicher Tiere an Tag P100. ....	57

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Reaktionsansatz Real-time PCR (Gesamtvolumen 20 µl). .....	33
Tab. 2: Einstellung Zykler Real-time PCR.....	34
Tab. 3: Primersequenzen für Expressionsanalysen mittels Real-time PCR.....	34
Tab. 4: Reaktionsansätze Bisulfit-PCR und Annealing-Temperatur der verschiedenen Primer. ....	38
Tab. 5: Einstellung Thermozykler Bisulfit-PCR. ....	39
Tab. 6: Primersequenzen für Methylierungsanalysen mittels PCR. ....	39
Tab. 7: Reaktionsansätze PCR mit DNA der Klone. ....	42
Tab. 8: Einstellungen Thermozykler PCR Klone CB1R mit Primer M13. ....	42
Tab. 9: Einstellungen Thermozykler PCR Klone FAAH mit spezifischen Primern.....	43
Tab. 10: Reaktionsansatz Aufreinigung DNA-Klone.....	43
Tab. 11: Zusammenfassung der Expressionsanalysen.....	58
Tab. 12: Zusammenfassung der EC-Konzentrationsmessung. ....	58

## 8. Literaturverzeichnis

- Al-Massadi, O.; Gabellieri, E.; Trujillo, M. L.; Señaris, R.; Pagotto, U.; Pasquali, R. et al. (2010): Peripheral endocannabinoid system-mediated actions of rimonabant on growth hormone secretion are ghrelin-dependent. In: *Journal of neuroendocrinology* 22, 1127–1136
- Ameri, A. (1999): The effects of cannabinoids on the brain. In: *Progress in Neurobiology* 58, 315–348
- Barker, D. J. P. (2004): Developmental origins of adult health and disease. In: *Journal of Epidemiology and Community Health* 58: 114–115
- Barker, D. J. P.; Osmond, C. (1986): Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. In: *The Lancet* 1, 1077–1081
- Barker, D. J. P.; Osmond, C.; Golding, J.; Kuh, D.; Wadsworth, M. E. (1989a): Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. In: *BMJ: British Medical Journal* 298, 564–567
- Barker, D. J. P.; Osmond, C.; Winter, P. D.; Margetts, B.; Simmonds, S. J. (1989b): Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. In: *The Lancet* 334: 577–580
- Barker, D. J. P.; Fall, C. H. (1993): Fetal and infant origins of cardiovascular disease. In: *Archives of Disease in Childhood* 68, 797–799
- Bateson, P.; Barker, D. J. P.; Clutton-Brock, T.; Deb, D.; D’Udine, B.; Foley, R. A. et al. (2004): Developmental plasticity and human health. In: *Nature* 430, 419–421
- Bavdekar, A.; Yajnik, C. S.; Fall, C. H.; Bapat, S.; Pandit, A. N.; Deshpande, V. et al. (1999): Insulin resistance syndrome in 8-year-old Indian children: small at birth, big at 8 years, or both? In: *Diabetes* 48, 2422–2429
- Bennetzen, M. F.; Nielsen, T. S.; Paulsen, S. K.; Bendix, J.; Fisker, S.; Jessen, N. et al. (2010): Reduced cannabinoid receptor 1 protein in subcutaneous adipose tissue of obese. In: *European journal of clinical investigation* 40, 121–126

- Bensaid, M.; Gary-Bobo, M.; Esclangon, A.; Maffrand, J. P.; Le Fur, G.; Oury-Donat, F.; Soubrié, P. (2003): The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. In: *Molecular pharmacology* 63, 908–914
- Bernstein, B. E.; Meissner, A.; Lander, E. S.: The Mammalian Epigenome. In: *Cell* 128, 669–681
- Berridge, K. C.; Robinson, T. E. (1998): What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? In: *Brain Research Reviews* 28, 309–369
- Blüher, M.; Engeli, S.; Klöting, N.; Berndt, J.; Fasshauer, M.; Bátkai, S. et al. (2006): Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. In: *Diabetes* 55, 3053–3060
- Burdyga, G.; Lal, S.; Varro, A.; Dimaline, R.; Thompson, D. G.; Dockray, G. J. (2004): Expression of Cannabinoid CB1 Receptors by Vagal Afferent Neurons is Inhibited by Cholecystokinin. In: *The Journal of Neuroscience* 24, 2708–2715
- Cable, J. C.; Tan, G. D.; Alexander, S. P. H.; O'Sullivan, S. E. (2011): The activity of the endocannabinoid metabolising enzyme fatty acid amide hydrolase in subcutaneous adipocytes correlates with BMI in metabolically healthy humans. In: *Lipids in health and disease* 10, 129
- Cable, J. C.; Tan, G. D.; Alexander, S. P. H.; O'Sullivan, S. E. (2014): The effects of obesity, diabetes and metabolic syndrome on the hydrolytic enzymes of the endocannabinoid system in animal and human adipocytes. In: *Lipids in health and disease* 13, 43
- Cadas, H.; Gaillet, S.; Beltramo, M.; Venance, L.; Piomelli, D. (1996): Biosynthesis of an Endogenous Cannabinoid Precursor in Neurons and its Control by Calcium and cAMP. In: *The Journal of Neuroscience* 16, 3934–3942
- Chandran, M.; Phillips, S. A.; Ciaraldi, T.; Henry, R. R. (2003): Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone? In: *Diabetes Care* 26, 2442–2450
- Cheer, J. F.; Wassum, K. M.; Heien, M. L. A. V.; Phillips, P. E. M.; Wightman, R. M. (2004): Cannabinoids Enhance Subsecond Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Awake Rats. In: *The Journal of Neuroscience* 24, 43932–4400

- Cinquina, V.; Calvigioni, D.; Farlik, M. et al. (2020): Life-long epigenetic programming of cortical architecture by maternal 'Western' diet during pregnancy. In: *Mol Psychiatry* 25, 22–36
- Cleal, J. K.; Poore, K. R.; Boullin, J. P.; Khan, O.; Chau, R.; Hambidge, O. et al. (2007): Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9529–9533
- Colombo, G.; Agabio, R.; Diaz, G.; Lobina, C.; Reali, R.; Gessa, G. L. (1998): Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. In: *Life Sciences* 63, 113–117
- Cooper, M. E.; Regnell, S. E. (2014): The hepatic cannabinoid 1 receptor as a modulator of hepatic energy state and food intake. In: *British journal of clinical pharmacology* 77, 21–30
- Cota, D.; Marsicano, G.; Tschöp, M.; Grübler, Y.; Flachskamm, C.; Schubert, M. et al. (2003): The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. In: *The Journal of Clinical Investigation* 112, 423–431
- Côté, M.; Matias, I.; Lemieux, I.; Petrosino, S.; Alméras, N.; Després, J.-P.; Di Marzo, V. (2007): Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. In: *International journal of obesity* 31, 692–699
- Cravatt, B. F.; Giang, D. K.; Mayfield, S. P.; Boger, D. L.; Lerner, R. A.; Gilula, N. B. (1996): Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. In: *Nature* 384, 83–87
- D'Addario, C.; Di Francesco, A.; Arosio, B.; Gussago, C.; Dell'Osso, B.; Bari, M. et al. (2012): Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. In: *PloS one* 7, e39186
- D'Addario, C.; Di Francesco, A.; Pucci, M.; Finazzi Agrò, A.; Maccarrone, M. (2013): Epigenetic mechanisms and endocannabinoid signalling. In: *The FEBS journal* 280, 1905–1917

- Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson L. A.; Griffin, G. et al. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. In: *Science* 258, 1946–1949
- Di Marzo, V.; Melck, D.; Bisogno, T.; Petrocellis, L. (1998): Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. In: *Trends in Neurosciences* 21, 521–528
- Di Marzo, V.; Goparaju, S. K.; Wang, L.; Liu, J.; Bátkai, S.; Járαι, Z. et al. (2001): Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. In: *Nature* 410, 822–825
- Di Marzo, V.; Matias, I. (2005): Endocannabinoid control of food intake and energy balance. In: *Nature neuroscience* 8, 585–589
- Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F. M.; Freund, T. F.; Katona, I.; Sensi, S. L. et al. (2002): Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10819–10824
- DiPatrizio, N. V.; Piomelli, D. (2012): The thrifty lipids: Endocannabinoids and the neural control of energy conservation. In: *Trends in Neurosciences* 35, 403–411
- El-Talatini, M. R.; Taylor, A. H.; Konje, J. C. (2010): The relationship between plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, sex steroids, and gonadotrophins during the menstrual cycle. In: *Fertility and sterility* 93, 1989–1996
- Engeli, S.; Böhnke, J.; Feldpausch, M.; Gorzelniak, K.; Janke, J.; Bátkai, S. et al. (2005): Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. In: *Diabetes* 54, 2838–2843
- Engeli, S.; Lehmann, A.-C.; Kaminski, J.; Haas, V.; Janke, J.; Zoerner, A. A. et al. (2014): Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. In: *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22, 70–76
- Eriksson, J. G.; Forsén, T.; Tuomilehto, J.; Winter, P. D.; Osmond, C.; Barker, D. J. P. (1999): Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease. Longitudinal study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 318, 427–431

- Franklin, T. B.; Russig, H.; Weiss, I. C.; Gräff, J.; Linder, N.; Michalon, A. et al. (2010): Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. In: *Biological psychiatry* 68, 408–415
- Frieling, H.; Albrecht, H.; Jedtberg, S.; Gozner, A.; Lenz, B.; Wilhelm, J. et al. (2009): Elevated cannabinoid 1 receptor mRNA is linked to eating disorder related behavior and attitudes in females with eating disorders. In: *Psychoneuroendocrinology* 34, 620–624
- Friemel, C. M.; Zimmer, A.; Schneider, M. (2014): The CB1 Receptor as an Important Mediator of Hedonic Reward Processing. In: *Neuropsychopharmacology* 39, 2387–2396
- Frommer, M.; McDonald, L. E.; Millar, D. S.; Collis, C. M.; Watt, F.; Grigg, G. W. et al. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1827–1831
- Gaoni Y., Mechoulam R. (1964): Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. In: *Journal of the American Chemical Society* 86, 1646–1647
- Gatta-Cherifi, B.; Matias, I.; Vallee, M.; Tabarin, A.; Marsicano, G.; Piazza, P. V.; Cota, D. (2012): Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. In: *International Journal of Obesity* 36, 880–885
- Gluckman, P. D.; Hanson, M. (Hg.) (2006): *Developmental Origins of Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press
- Gluckman, P. D.; Hanson, M. A.; Buklijas, T.; Low, F. M.; Beedle, A. S. (2009): Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. In: *Nature reviews. Endocrinology* 5, 401–408
- Gluckman, P. D.; Hanson, M. A.; Spencer, H. G. (2005): Predictive adaptive responses and human evolution. In: *Trends in ecology & evolution* 20, 527–533
- Godfrey, K. (2006): The ‘developmental origins’ hypothesis: epidemiology. In: Peter Gluckman und Mark Hanson (Hg.): *Developmental Origins of Health and Disease*. Cambridge University Press, 6–32



- Gorski, J. N.; Dunn-Meynell, A. A.; Hartman, T. G.; Levin, B. E. (2006): Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, 768–778
- Griffiths, E. A.; Gore, S. D. (2013): Epigenetic Therapies in MDS and AML. In: *Advances in experimental medicine and biology* 754, 253–283
- Guil, S.; Esteller, M. (2009): DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. In: *Directed Issue: Epigenetics and Disease* 41, 87–95
- Hales, C. N.; Barker, D. J. P. (2001): The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. In: *British Medical Bulletin* 60, 5–20
- Hales, C. N.; Barker, D. J. P. (1992): Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. In: *Diabetologia* 35, 595–601
- Harrold, J. A.; Elliott, J. C.; King, P. J.; Widdowson, P. S.; Williams, G. (2002): Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? In: *Brain Research* 952, 232–238
- Heijmans, B. T.; Tobi, E. W.; Stein, A. D.; Putter, H.; Blauw, G. J.; Susser, E. S. et al. (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 17046–17049
- Higgs, S.; Williams, C. M.; Kirkham, T. C. (2003): Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, anandamide, 2-arachidonoyl glycerol and SR141716. In: *Psychopharmacology* 165, 370–377
- Houseknecht, K. L.; Portocarrero, C. P. (1998): Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. In: *Domestic Animal Endocrinology* 15, 457–475
- Howlett, A. C. (2005): Cannabinoid Receptor Signaling. In: Roger G. Pertwee (Hg.): *Cannabinoids*. Springer Berlin Heidelberg, 53–79

Irizarry, R. A.; Ladd-Acosta, C.; Wen, B.; Wu, Z.; Montano, C.; Onyango, P. et al. (2009): The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. In: *Nature genetics* 41, 178–186

Jamshidi, N.; Taylor, D. A. (2001): Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. In: *British Journal of Pharmacology* 134, 1151–1154

Jang, H.; Serra, C. (2013): Nutrition, Epigenetics, and Diseases. In: *Clinical Nutrition Research* 3, 1–8

Jensen, D. P.; Andreasen, C. H.; Andersen, M. K.; Hansen, L.; Eiberg, H.; Borch-Johnsen, K. et al. (2007): The functional Pro129Thr variant of the FAAH gene is not associated with various fat accumulation phenotypes in a population-based cohort of 5,801 whites. In: *Journal of molecular medicine* 85, 445–449

Jones, P. A.; Baylin, S. B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. In: *Nature reviews. Genetics* 3, 415–428

Kappeler, L.; de Magalhaes Filho, C.; Leneuve, P.; Xu, J.; Brunel, N.; Chatziantoniou, C. et al. (2009): Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. In: *Endocrinology* 150, 314–323

Keimpema, E.; Calvigioni, D.; Harkany, T. (2013): Endocannabinoid signals in the developmental programming of delayed-onset neuropsychiatric and metabolic illnesses. In: *Biochemical Society transactions* 41, 1569–1576

Kempf, K.; Hector, J.; Strate, T.; Schwarzloh, B.; Rose, B.; Herder, C. et al. (2007): Immune-mediated activation of the endocannabinoid system in visceral adipose tissue in obesity. In: *Hormone and metabolic research* 39, 596–600

Kirkham, T. C.; Williams, C. M.; Fezza, F.; Di Marzo, V. (2002): Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation. Stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. In: *British Journal of Pharmacology* 136, 550–557

Lage, R.; Parisi, C.; Seoane-Collazo, P.; Fernø, J.; Mazza, R.; Bosch, F. et al. (2015): Lack of Hypophagia in CB1 Null Mice is Associated to Decreased Hypothalamic POMC

and CART Expression. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 18, pyv011

Laird, P. W.; Zijderveld, A.; Linders, K.; Rudnicki, M. A.; Jaenisch, R.; Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. In: *Nucleic acids research* 19, 4293

Lee, H.; Lee, I. S.; Choue, R. (2013): Obesity, inflammation and diet. In: *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition* 16, 143–152

Leon, D. A.; Johansson, M.; Rasmussen, F. (2000): Gestational Age and Growth Rate of Fetal Mass Are Inversely Associated with Systolic Blood Pressure in Young Adults: An Epidemiologic Study of 165,136 Swedish Men Aged 18 Years. In: *American Journal of Epidemiology* 152, 597–604

Leunissen, R. W. J.; Kerkhof, G. F.; Stijnen, T.; Hokken-Koelega, A. (2009): Timing and tempo of first-year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood. In: *JAMA* 301, 2234–2242

Li, G.; Kohorst, J. J.; Zhang, W.; Laritsky, E.; Kunde-Ramamoorthy, G.; Baker, M. S. et al. (2013): Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. In: *Diabetes* 62, 2773–2783

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. In: *Methods* 25, 402–408

Löfgren, P.; Sjölin, E.; Wåhlen, K.; Hoffstedt, J. (2007): Human adipose tissue cannabinoid receptor 1 gene expression is not related to fat cell function or adiponectin level. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92, 1555–1559

Lomazzo, E.; Bindila, L.; Remmers, F.; Lerner, R.; Schwitter, C.; Hoheisel, U.; Lutz, B. (2015): Therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid degradation for the treatment of stress-related hyperalgesia in an animal model of chronic pain. In: *Neuropsychopharmacology* 40, 488–501

Lucas, A. (1994): Role of nutritional programming in determining adult morbidity. In: *Archives of Disease in Childhood* 71, 288–290

Lupica, C. R.; Riegel, A. C.; Hoffman, A. F. (2004): Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits. In: *British Journal of Pharmacology* 143, 227–234

- Mackie, K. (2008): Cannabinoid Receptors: Where They are and What They do. In: *Journal of Neuroendocrinology* 20, 10–14
- Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. In: *Nature* 346, 561–564
- McMillen, I. C. (2005): Developmental Origins of the Metabolic Syndrome. Prediction, Plasticity, and Programming. In: *Physiological Reviews* 85, 571–633
- Mela, V.; Piscitelli, F.; Berzal, A. L.; Chowen, J.; Silvestri, C.; Viveros, M. P.; Di Marzo, V. (2016): Sex-dependent effects of neonatal maternal deprivation on endocannabinoid levels in the adipose tissue. Influence of diet. In: *Journal of Physiology and Biochemistry* 73, 349–357
- Michalik, M. (2013): Biochemical and epigenetic analyses of the GH-receptor signaling cascade after early postnatal nutrient restriction in a cross-fostering mouse model. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Molekulare Biotechnologie.
- Migliarini, B.; Carnevali, O. (2008): Anandamide modulates growth and lipid metabolism in the zebrafish *Danio rerio*. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 286, 12–16
- Moldrich, G.; Wenger, T. (2000): Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. In: *Peptides* 21, 1735–1742
- Murdolo, G.; Kempf, K.; Hammarstedt, A.; Herder, C.; Smith, U.; Jansson, P. A. (2007): Insulin differentially modulates the peripheral endocannabinoid system in human subcutaneous abdominal adipose tissue from lean and obese individuals. In: *Journal of Endocrinological Investigation* 30, 17–21
- Okamoto, Y.; Wang, J.; Morishita, J.; Ueda, N. (2007): Biosynthetic Pathways of the Endocannabinoid Anandamide. In: *Chemistry & Biodiversity* 4, 1842–1857
- Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, Sv.; Bátkai, S. et al. (2005): Endocannabinoid activation at hepatic CB(1) receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. In: *Journal of Clinical Investigation* 115, 1298–1305

Osei-Hyiaman, D.; Liu, J.; Zhou, L.; Godlewski, G.; Harvey-White, J.; Jeong, W. et al. (2008): Hepatic CB(1) receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. In: *The Journal of Clinical Investigation* 118, 3160–3169

Pagano, C.; Pilon, C.; Calcagno, A.; Urbanet, R.; Rossato, M.; Milan, G. et al. (2007): The Endogenous Cannabinoid System Stimulates Glucose Uptake in Human Fat Cells via Phosphatidylinositol 3-Kinase and Calcium-Dependent Mechanisms. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 4810–4819

Painter, R. C.; de Rooij, S. R.; Bossuyt, P. M.; Simmers, T. A.; Osmond, C.; Barker, D. J. P. et al. (2006): Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 84, 322–327

Piazza, P. V.; Lafontan, M.; Girard, J. (2007): Integrated physiology and pathophysiology of CB1-mediated effects of the endocannabinoid system. In: *Diabetes & metabolism* 33, 97–107

Plagemann, A.; Harder, T.; Brunn, M.; Harder, A.; Roepke, K.; Wittrock-Staar, M. et al. (2009): Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology* 587, 4963–4976

Poirier, B.; Bidouard, J.-P.; Cadrouvele, C.; Marniquet, X.; Staels, B.; O'Connor, S. E. et al. (2005): The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 7, 65–72

Ravinet Trillou, C.; Delgorge, C.; Menet, C.; Arnone, M.; Soubrié, P. (2004): CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders* 28, 640–648

Roseboom, T.; de Rooij, S.; Painter, R. (2006): The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. In: *Early human development* 82, 485–491

Rowland, N. E.; Mukherjee, M.; Robertson, K. (2001): Effects of the cannabinoid receptor antagonist SR 141716, alone and in combination with dexfenfluramine or naloxone, on food intake in rats. In: *Psychopharmacology* 159, 111–116

- Ryberg, E.; Larsson, N.; Sjögren, S.; Hjorth, S.; Hermansson, N.-O.; Leonova, J. et al. (2007): The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. In: *British Journal of Pharmacology* 152, 1092–1101
- Sarzani, R.; Bordicchia, M.; Marcucci, P.; Bedetta, S.; Santini, S.; Giovagnoli, A. et al. (2009): Altered pattern of cannabinoid type 1 receptor expression in adipose tissue of dysmetabolic and overweight patients. In: *Metabolism* 58, 361–367
- Schlabritz-Loutsevitch, N.; German, N.; Ventolini, G.; Larumbe, E.; Samson, J. (2016): Fetal Syndrome of Endocannabinoid Deficiency (FSECD) In Maternal Obesity. In: *Medical hypotheses* 96, 35–38
- Schleinitz, D.; Carmienke, S.; Böttcher, Y.; Tönjes, A.; Berndt, J.; Klötting, N. et al. (2010): Role of genetic variation in the cannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) in the pathophysiology of human obesity. In: *Pharmacogenomics* 11, 693–702
- Schlicker, E.; Kathmann, M. (2001): Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 565–572
- Schultz, W. (1998): Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. In: *Journal of Neurophysiology* 80, 1–27
- Shimada, K.; Miyazaki, T.; Daida, H. (2004): Adiponectin and atherosclerotic disease. In: *Clinica chimica acta* 344, 1–12
- Silvestri, C.; Di Marzo, V. (2013): The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. In: *Cell Metabolism* 17, 475–490
- Sobrino Crespo, C.; Perianes Cachero, A.; Puebla Jiménez, L.; Barrios, V.; Arilla Ferreiro, E. (2014): Peptides and food intake. In: *Frontiers in endocrinology* 5, 58
- Sohn, J.-W. (2014): Network of hypothalamic neurons that control appetite. In: *BMB Reports* 48, 229–233
- Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. (1997): A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. In: *Nature* 388, 773–778
- Stevens, A.; Bonshek, C.; Whatmore, A.; Butcher, I.; Hanson, D.; De Leonibus, C. et al. (2014): Insights into the pathophysiology of catch-up compared with non-catch-up growth

in children born small for gestational age. An integrated analysis of metabolic and transcriptomic data. In: *The Pharmacogenomics Journal* 14, 376–384

Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K. et al. (1995): 2-Arachidonoylglycerol. A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. In: *Biochemical and biophysical research communications* 215, 89–97

Suzuki, T.; Higgins, P. J.; Crawford D. R. (2000): Control selection for RNA quantitation. In: *Biotechniques* 29, 332–337

Tucci, S. A.; Rogers, E. K.; Korbonits, M.; Kirkham, T. C. (2004): The cannabinoid CB(1) receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin. In: *British Journal of Pharmacology* 143, 520–523

Uehara, Y.; Shimizu, H.; Ohtani, K.; Sato, N.; Mori, M. (1998): Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. In: *Diabetes* 47, 890–893

Velkoska, E.; Cole, T. J.; Dean, R. G.; Burrell, L. M.; Morris, M. J. (2008): Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. In: *The Journal of nutrition* 138, 1622–1627

Vickers, M. H.; Breier, B. H.; Cutfield, W. S.; Hofman, P. L.; Gluckman, P. D. (2000): Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279, E83–E87

Vickers, M. H.; Breier, B. H.; McCarthy, D.; Gluckman, P. D. (2003): Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 285, R271–273

Vickers, M. H. (2014): Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. In: *Nutrients* 6, 2165–2178

Wadhwa, P. D.; Buss, C.; Entringer, S.; Swanson, J. M. (2009): Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. In: *Seminars in reproductive medicine* 27, 358–368

Wang, D.; Wang, H.; Ning, W.; Backlund, M. G.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. (2008): Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. In: *Cancer research* 68, 6468–6476

Waterland, R. A.; Jirtle, R. L. (2003): Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation. In: *Molecular and Cellular Biology* 23, 5293–5300

Zaami, S.; Di Luca, A.; Di Luca, N. M.; Montanari Vergallo, G. (2018): Medical use of cannabis. Italian and European legislation. In: *European review for medical and pharmacological sciences* 22, 1161–1167



## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wölfle für die Überlassung des Dissertationsthemas und bei Herrn PD Dr. Schreiner für die unermüdliche und engagierte Betreuung bedanken.