

Aus dem Institut für Endokrinologie und Diabetes  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag

---

**Beteiligung von endogenem NUCB2/Nesfatin-1 im Nucleus  
paraventricularis des Hypothalamus bei der  
physiologischen Regulation der Energiehomöostase  
und Stressreaktion**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Daniel Stephan  
aus Wiesbaden



Lübeck 2022



1. Berichterstatter*in:	Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag
Ko-Betreuer*in:	Dr. rer. nat. Carla Schulz
2. Berichterstatter*in:	Priv.-Doz. Dr. med. Carl Göbel
Tag der mündlichen Prüfung:	03.03.2023
Zum Druck genehmigt:	Lübeck, den 03.03.2023

Promotionskommission der Sektion Medizin



---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>1.1</b>	<b>ÜBERGEWICHT UND ADIPOSITAS</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>DIE ENERGIEHOMÖOSTASE</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>ZENTRALNERVÖSE REGULATION DER ENERGIEHOMÖOSTASE</b>	<b>8</b>
<b>1.4</b>	<b>DER NUCLEUS PARAVENTRICULARIS</b>	<b>9</b>
<b>1.5</b>	<b>NESFATIN-1</b>	<b>11</b>
1.5.1	EIGENSCHAFTEN	11
1.5.2	SIGNALTRANSDUKTION UND INTERAKTION MIT ANDEREN SYSTEMEN	12
1.5.3	REGULATION DER NAHRUNGS-AUFNAHME	12
1.5.4	GLUKOSEHOMÖOSTASE	13
1.5.5	REGULATION DER WASSER-AUFNAHME	14
1.5.6	THERMOGENESE	14
1.5.7	STRESSREAKTION UND ANGSTVERHALTEN	15
<b>1.6</b>	<b>LIPIDOM</b>	<b>15</b>
<b>1.7</b>	<b>KALORIMETRIE</b>	<b>17</b>
<b>1.8</b>	<b>RNA-INTERFERENZ</b>	<b>17</b>
<b>1.9</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>18</b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b>2.1</b>	<b>AAV-HERSTELLUNG ZUM KNOCKDOWN VON NUCB2</b>	<b>21</b>
2.1.1	PLASMIDPRÄPARATION	21
2.1.2	VIRUSERSTELLUNG	22
2.1.3	VIRUSAUFREINIGUNG	22
2.1.4	QUALITÄTSKONTROLLE DES VIRUS	23
<b>2.2</b>	<b>DURCHFÜHRUNG DER TIEREXPERIMENTE</b>	<b>23</b>
2.2.1	VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	23
2.2.2	VIRUSINJEKTION	24
2.2.3	MESSRHYTHMUS	26
<b>2.3</b>	<b>MESSMETHODEN</b>	<b>27</b>
2.3.1	ZEITLICHES PROFIL DER NAHRUNGS-AUFNAHME	27
2.3.2	DIREKTE KALORIMETRIE	27
2.3.3	RUHE-INFRAROT-THERMOGRAPHIE	29
2.3.4	STRESS-INFRAROT-THERMOGRAPHIE	30
2.3.5	KÖRPERZUSAMMENSETZUNG	30
2.3.6	TÖTUNG UND ORGANENTNAHME	31
<b>2.4</b>	<b>GEHIRNE</b>	<b>31</b>
2.4.1	GEFRIERSCHNITTE	31
2.4.2	IMMUNFLUORESZENZ	32
2.4.3	LASER-CAPTURE MIKRODISSEKTION	32

## Einleitung

<b>2.5</b>	<b>MOLEKULARE ANALYSEN</b>	<b>33</b>
2.5.1	RNA-ISOLATION	33
2.5.2	NANODROP	34
2.5.3	CDNA-SYNTHESE	34
2.5.4	QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASE-KETTENREAKTION	35
2.5.5	RADIOIMMUNOASSAY	36
2.5.6	MASSENSPEKTROMETRIE	36
<b>2.6</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>37</b>
2.6.1	FALLZAHLEN	38
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>NAHRUNGS-AUFNAHME</b>	<b>39</b>
3.1.1	ZEITLICHES PROFIL DER NAHRUNGS-AUFNAHME	40
<b>3.2</b>	<b>WASSER-AUFNAHME</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>BLUTGLUKOSE-KONZENTRATION</b>	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>DIREKTE KALORIMETRIE</b>	<b>42</b>
3.4.1	NICHT-EVAPORATIVE WÄRMEABGABE	42
3.4.2	KORRELATION VON NICHT-EVAPORATIVER WÄRMEABGABE UND KÖRPERGEWICHTSVERLUST	44
<b>3.5</b>	<b>RUHE-INFRAROT-THERMOGRAPHIE</b>	<b>45</b>
3.5.1	TEMPERATUR VON IBAT, GEHÖRGANG UND SCHWANZ	45
3.5.2	KORRELATIONEN DER TEMPERATUREN DER DREI KÖRPERREGIONEN	47
<b>3.6</b>	<b>KÖRPERGEWICHT</b>	<b>49</b>
<b>3.7</b>	<b>KÖRPERZUSAMMENSETZUNG</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>LIPIDOM</b>	<b>51</b>
3.8.1	QUANTIFIZIERUNG DER VERSCHIEDENEN LIPIDE	51
3.8.2	KORRELATIONEN DER LIPIDE ZUM PHÄNOTYP	53
<b>3.9</b>	<b>STRESS-INFRAROT-THERMOGRAPHIE</b>	<b>54</b>
<b>3.10</b>	<b>GEWICHT DER NEBENNIERE BEI DER TÖTUNG</b>	<b>56</b>
<b>3.11</b>	<b>KORRELATION VON NEBENNIERENGEWICHT UND STRESSREAKTION</b>	<b>57</b>
<b>3.12</b>	<b>CORTICOSTERON-KONZENTRATION IM BLUTPLASMA</b>	<b>57</b>
<b>3.13</b>	<b>mRNA</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>AUSWIRKUNGEN DES NUCB2-KNOCKDOWN IM PVN AUF DEN ENERGIESTOFFWECHSEL</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>AUSWIRKUNGEN DES NUCB2-KNOCKDOWN IM PVN AUF DEN ENERGIEUMSATZ</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>AUSWIRKUNGEN DES NUCB2-KNOCKDOWN IM PVN AUF KÖRPERGEWICHT, KÖRPERZUSAMMENSETZUNG UND LIPIDHAUSHALT</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>AUSWIRKUNGEN DES NUCB2-KNOCKDOWN IM PVN AUF DIE STRESSREAKTION</b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES NUCB2-KNOCKDOWN IM PVN</b>	<b>79</b>
<b>4.6</b>	<b>ERLÄUTERUNGEN ZUR VORLIEGENDEN PUBLIKATION</b>	<b>81</b>

---

<b><u>5</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>97</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>98</u></b>
<b>9.1</b>	<b>ÜBERPRÜFUNG DER STRESSREAKTION</b>	<b>98</b>
9.1.1	ELEVATED PLUS MAZE TEST (EPM)	98
9.1.2	FEAR-POTENTIATED STARTLE	98
<b>9.2</b>	<b>VEKTORKARTEN</b>	<b>99</b>
<b>9.3</b>	<b>NÄHRUNGS- UND WASSERAUFNAHME UND KÖRPERGEWICHT VOR VIRUSINJEKTION</b>	<b>102</b>
<b>9.4</b>	<b>VERWENDETE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN</b>	<b>103</b>
<b>9.5</b>	<b>PIPETTIERSCHEMATA</b>	<b>106</b>
<b>9.6</b>	<b>HERSTELLUNG 2x BBS, TE UND DEPC</b>	<b>106</b>
<b>9.7</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>108</b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>PUBLIKATION</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>129</u></b>
<b><u>12</u></b>	<b><u>LEBENS-LAUF</u></b>	<b><u>130</u></b>



---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti-related Protein
ANOVA	Varianzanalyse
ARC	Nucleus arcuatus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	brown adipose tissue
BMI	Body-Mass-Index
CART	Cocaine- and Amphetamine Regulated Transcript
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRF	Corticotropin Releasing Factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPM	elevated plus maze
eWAT	epididymales WAT
FPS	fear-potentiated startle
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
iBAT	interskapulares braunes Fettgewebe
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IVC	individually ventilated cage
LC	liquid chromatography
LCM	laser-capture microdissection
MC3- (4-)R	Melanocortin-3 (4)-Rezeptor

---

miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NTS	Nucleus tractus solitarii
NPY	Neuropeptid Y
NUCB2	Nucleobindin 2
OD	optische Dichte
p.i.	post injectionem
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
POMC	Proopiomelanocortin
pri-miRNA	primary micro RNA
PVN	Nucleus paraventricularis
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SCN	Nucleus supraopticus
SD	Standardabweichung
shRNA	short hairpin RNA
SON	Nucleus supraopticus
TD-NMR	time-domain nuclear magnetic resonance
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
UCP1	Uncoupling Protein 1
WAT	white adipose tissue
ZNS	zentrales Nervensystem
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon

# 1 Einleitung

## 1.1 Übergewicht und Adipositas

Weltweit waren 2016 mehr als 1,9 Milliarden Erwachsene übergewichtig und davon mehr als 650 Millionen adipös. Seit 1975 hat sich die Prävalenz von Übergewicht fast verdreifacht, wobei sich dieser Trend auch in Zukunft fortsetzt, denn nach Schätzungen wird 2030 mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung übergewichtig sein (1). Obwohl beides vermeidbar wäre, stellen Übergewicht (Body-Mass-Index (BMI) von 25,0 – 29,9 kg / m<sup>2</sup>) und Adipositas (BMI ≥ 30,0 kg / m<sup>2</sup>) (2) damit eine große Bedrohung für die globale Gesundheit dar.

Ursächlich für die genannten Zahlen sind die sozioökonomischen und demografischen Veränderungen, die neben der Prävalenz von Krankheiten und dem Lebensstil auch die Ernährung betreffen. Letztendlich sind, abgesehen von seltenen genetischen Prädispositionen, Ernährung und Bewegung ausschlaggebend für die Entstehung von Übergewicht.

Die Kombination aus der Aufnahme von zu viel kalorienreicher Nahrung und gleichzeitiger physischer Inaktivität führt zu einem Ungleichgewicht zwischen aufgenommener und aufgewendeter Energie. Folglich bleibt ein Energieüberschuss bestehen, der im Körper hauptsächlich als Fett gespeichert wird.

Das hieraus resultierende Übergewicht hat weitreichende gesundheitliche Folgen, denn es ist ein Risikofaktor für degenerative muskuloskelettale Veränderungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes (2). So zeigen adipöse Patienten eine zwischen fünf und 20 Jahren verkürzte Lebenserwartung (3).

Weitere Konsequenzen hiervon sind die beträchtlichen Kosten für die Gesundheitssysteme und volkswirtschaftlichen Schäden. In den USA stand beispielsweise bereits 2005 ein Anteil von 20% aller Gesundheitsausgaben im Zusammenhang mit Adipositas (4). Neben den 65 bis 113 % höheren direkten medizinischen Kosten adipöser Patienten durch vermehrte Arztbesuche oder verschreibungspflichtige Medikamente (5), sind auch die indirekten

Kosten aufgrund von Produktivitätsausfällen zu beachten. In Deutschland betragen diese 2008 ca. 8,1 Milliarden Euro (6).

## **1.2 Die Energiehomöostase**

Jeder Mensch stellt sich regelmäßig bewusst oder unbewusst die Fragen, ob man etwas isst, wann man etwas isst, was man isst und wie viel man isst. Die Antworten hierauf und die daraus resultierenden Entscheidungen werden dabei von unzähligen Faktoren beeinflusst und sind deshalb auch immer unterschiedlich. Folglich variiert auch die dem Körper in Form von Nahrung zugeführte Menge an chemischer Energie von Zeit zu Zeit stark. Dennoch sollten sich Körpergewicht und Körperfett ohne dauerhaften Kalorienüberschuss relativ stabil verhalten (7).

Obwohl ein großer psychischer Einfluss besteht (8), sind Hunger und Nahrungsaufnahme eigentlich autonome Prozesse, denen die Energiehomöostase zugrunde liegt (9). Diese reguliert das Verhältnis von Energiezufuhr und Energieumsatz über lange Zeiträume hinweg. Wird dieses Gleichgewicht jedoch gestört, kann eine dauerhaft positive Energiebilanz auftreten. Die überschüssige Energie wird dann in Form von Lipiden in den Fettdepots des Körpers gespeichert und es kommt in der Folge zu Übergewicht und Adipositas (10).

## **1.3 Zentralnervöse Regulation der Energiehomöostase**

Jeder Organismus muss zu jeder Zeit seine Energiehomöostase aufrechterhalten. Dies erfordert hoch komplexe Regulationsmechanismen, die durch das zentrale Nervensystem (ZNS) koordiniert werden. Dabei nimmt der Hypothalamus eine besonders wichtige Stellung ein, wobei zwei Kerngebiete herausragen: der Nucleus arcuatus (ARC) und der Nucleus paraventricularis (PVN) (11).

Im ARC findet man zwei Neuronenpopulationen, welche gegensätzliche Funktionen hinsichtlich der Nahrungsaufnahme haben. Beim ersten Typ handelt es sich um orexigene Neurone, die Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related Protein (AgRP) exprimieren. Der zweite Typ sind anorexigene Neurone, die Proopiomelanocortin (POMC) und Cocaine and Amphetamin-regulated Transcript (CART) exprimieren. Beide Zellpopulationen fungieren

als Antagonisten. Während die Aktivierung von POMC/CART Neuronen zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt, bewirkt die Aktivierung von NPY/AgRP Neuronen eine Steigerung derselben (12).

Für die Vermittlung dieser Effekte kommt es zur Rekrutierung des Melanocortinsystems. So bilden ARC Neurone aus POMC das Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), welches an den Melanocortin-3 und Melanocortin-4-Rezeptor (MC3/4-R) bindet (13) und die Nahrungsaufnahme hemmt (14). Des Weiteren nimmt das Melanocortinsystem Einfluss auf die Thermogenese und damit den Energieumsatz (15). Abschließend scheint auch das nesfatinerge System eng mit dem Energiehaushalt verknüpft zu sein.

Diese zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme wird gleichzeitig aber auch von peripheren Hormonen wie u.a. Leptin und Ghrelin beeinflusst. Das vom Fettgewebe produzierte Adipokin Leptin (16) zirkuliert im Plasma in Konzentrationen proportional zur Menge des Fettgewebes (17) und gelangt über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (18). Dort hemmt es, durch die Beeinflussung der Aktivität von NPY/AgRP und POMC/CART Neuronen im ARC, das Hungergefühl (19). Weiterhin ist auch das vom Magen produzierte Hormon Ghrelin zur Modulation der Aktivität dieser Neuronenpopulation in der Lage. Hierbei wirkt es allerdings appetitstimulierend und fungiert damit als Antagonist zu Leptin (20).

Es kommt folglich zu einem Zusammenspiel aus peripheren und zentralen Systemen. Das ZNS integriert die Informationen aus Langzeit-Energiespeichern (z.B. Leptin) und kurzzeitigen, mahlzeitbezogenen Signalen (z.B. Ghrelin), um die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz zu regulieren. Dabei wird das Ziel verfolgt, die Körperfettmenge über die Zeit stabil zu halten. Außerdem greift das Belohnungssystem in diese Regulation ein, denn nach Überfütterung werden die belohnenden Eigenschaften von Nahrung blockiert und bei Energiemangel erhöht (11).

#### **1.4 Der Nucleus paraventricularis**

Die im vorherigen Kapitel beschriebene Mitwirkung des ARC bei der Energiehomöostase muss allerdings in einem größeren Zusammenhang betrachtet werden. So projizieren seine POMC/CART und NPY/AgRP Neurone in den PVN (21).

## Einleitung

---

Beim PVN handelt es sich wiederum um das primäre, endokrine Kontrollzentrum des Gehirns. Gleichzeitig stellt der PVN einen Treffpunkt verschiedener, energieregulierender Signalwege im Gehirn da und koordiniert so als oberstes Steuerorgan die Kontrolle der Energiebalance (22).

Zusätzlich zu den Neuronen im ARC projizieren auch Neuronenpopulationen zahlreicher anderer Hirnregionen wie dem lateralen Hypothalamus, dem Organum subfornicale, dem Nucleus supra-chiasmaticus (SCN) oder der lateralen Area praeoptica ebenfalls in den PVN (23). Dieser wiederum weist selbst zahlreiche Projektionen in andere Hirngebiete auf (24). Darunter finden sich beispielsweise auch der Nucleus tractus solitarii (NTS) und die Ursprungsregion parasymphathischer präganglionärer Zellen des Nervus vagus, der Nucleus dorsalis nervi vagi (25). Darüber hinaus bestehen ebenso Verbindungen vom PVN zum Nucleus intermediolateralis im Rückenmark, aus welchem die sympathischen Nervenfasern hervorgehen (26). Folglich ist der PVN über das sympathische und das parasymphathische Nervensystem mit sowohl dem weißen Fettgewebe (WAT), als auch dem braunen Fettgewebe (BAT) verbunden (27,28). Dies legt nahe, dass er auf die autonomen Prozesse der Fettspeicherung und Wärmeproduktion Einfluss nehmen kann.

Weiterhin ist der PVN auch an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt, denn eine Läsion dieses Kerngebiets hat eine Hyperphagie zur Folge (29).

Die endokrin wirksamen Nervenzellen innerhalb des PVN lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen befinden sich lateral magnozellige, neuroendokrine Neurone, die Axone in den posterioren Anteil der Hypophyse senden (30). Dort setzen sie Oxytocin und Vasopressin frei (31). Der zweite Anteil sind medial lokalisierte, parvozelluläre Neurone. Diese setzen Signalpeptide in der Eminentia mediana frei, welche so in den anterioren Anteil der Hypophyse gelangen und dort über die Produktion der Hypophysenhormone die verschiedenen physiologischen Hormonachsen des Körpers beeinflussen (32). Auch innerhalb des PVN bestehen Verbindungen, die von  $\gamma$ -Aminobuttersäure-haltigen (33) und glutamatergen (34) Interneuronen gebildet werden.

Zusammenfassend stellt der PVN einen höchst komplex verschalteten Kern dar, der aus den unterschiedlichsten Hirnregionen Informationen erhält und wiederum Projektionen in

viele verschiedene Gebiete aufweist. Auf diese Weise beeinflusst er zahlreiche Körperfunktionen und reguliert als primäres Steuerorgan die Energiehomöostase.

## 1.5 Nesfatin-1

Nesfatin-1 (Nucleobindin2 encoded satiety and fat influencing protein) ist ein Peptid mit pleiotropen Funktionen, welches maßgeblich an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt ist. Es wurde ursprünglich von Barnikol-Watanabe et al. (35) entdeckt und als  $\text{Ca}^{2+}$  - bindendes Protein identifiziert (36). Im Jahr 2006 haben Oh-I und Kollegen es zuerst in Zelllinien beschrieben und später auch im Hypothalamus von Ratten nachgewiesen (37).

### 1.5.1 Eigenschaften

Das 420 Aminosäuren (AS) lange Peptid Nucleobindin 2 (NUCB2) ist das Transkriptionsprodukt des *Nucb2* Gens. Ausgehend von den Erkennungsmotiven für die Prohormonkonvertasen 1/3 und 2 wird die Prozessierung in Nesfatin-1 (AS 1 – 82), Nesfatin-2 (AS 85 – 63) und Nesfatin-3 (AS 166 – 396) vermutet (37). Obwohl diese Prozessierung bisher nicht nachgewiesen wurde, konnte Nesfatin-1 bereits eindeutig im Hypothalamus und dem Liquor von Nagern (37) sowie im Blutplasma von Menschen identifiziert werden (38).

Die *Nucb2* mRNA ist zentralnervös in unterschiedlichen Kerngebieten des Hypothalamus, wie dem Nucleus supraopticus (SON), ARC und PVN (39,40) lokalisiert. Aber auch außerhalb des zentralen Nervensystems lässt sich NUCB2 in verschiedensten Geweben finden. Neben der Mukosa des Magens, wo es am stärksten exprimiert wird (41), ist es auch im weißen und braunen Fettgewebe (41), Pankreas (42) und Testikel (43) nachweisbar.

Intrazellulär befindet sich Nesfatin-1 in Vesikeln nahe des Golgi-Apparates, was eine auto- oder parakrine Sekretion nahelegt. Peripheres Nesfatin-1 übertritt die Blut-Hirn-Schranke durch Diffusion und gelangt so ins zentrale Nervensystem. Hierbei handelt es sich um einen Prozess, der sich im untersuchten Konzentrationsbereich als nicht sättigbar erwies (44).

### 1.5.2 *Signaltransduktion und Interaktion mit anderen Systemen*

Bisher ist es noch nicht gelungen, einen Rezeptor zu identifizieren, an den Nesfatin-1 bindet. Intrazellulär verursacht Nesfatin-1 einen Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration, wobei der Calciumeinstrom durch L-Typ, P/Q-Typ (39) und N-Typ (45) Calciumkanäle erfolgen kann. Aufgrund der Möglichkeit, diesen Effekt mit Pertussis-Toxin zu blockieren (39,46), scheint ein  $G_i$ -Protein gekoppelter Rezeptor an dieser Signalkaskade beteiligt zu sein.

Gleichzeitig unterscheidet sich die Aktivierung der Proteinkinase A in Abhängigkeit vom Gewebe, weshalb in der Literatur auch eine gewebsspezifische Rekrutierung von G-Protein Untereinheiten diskutiert wird (39,46,47). Insgesamt herrscht jedoch große Uneinigkeit über den exakten Mechanismus der Signaltransduktion.

Es lässt sich allerdings mit Sicherheit sagen, dass Nesfatin-1 mit vielen anderen Systemen interagiert und so verschiedenste Körperfunktionen beeinflusst.

Zuallererst bestehen enge Wechselwirkungen mit dem Melanocortinsystem. So bewirkt die zentrale Applikation von  $\alpha$ -MSH einen Anstieg der *Nucb2* mRNA (37) sowie eine Aktivierung von nesfatinergen Neuronen im PVN (48). Weiterhin werden die anorexigenen (49) und thermogenen (15) Eigenschaften von Nesfatin-1 durch MC3/4-R Antagonisten blockiert.

Die vorhandene Immunoreaktivität für Oxytocin und Vasopressin vieler NUCB2 exprimierender Neuronen im PVN und SON lässt auf eine enge Verknüpfung mit dem Oxytocinsystem schließen. Begleitend hierzu beeinflusst Nesfatin-1 die Freisetzung von Oxytocin im PVN (50), wobei der Einfluss von Nesfatin-1 auf die Nahrungsaufnahme wiederum unter anderem durch Oxytocin vermittelt wird (50).

Darüber hinaus lassen sich in der Literatur Belege für die Interaktion des nesfatinergen Systems mit zentralen Prostaglandinen und Leukotrienen (51) sowie den Neurotransmittern Serotonin (52) und Histamin (53) finden.

### 1.5.3 *Regulation der Nahrungsaufnahme*

Bereits in der wegweisenden Publikation von Oh-I et al. wurden die anorexigenen Eigenschaften von Nesfatin-1 erkannt. So führt dessen pharmakologische Applikation in den dritten Ventrikel zu einer signifikant reduzierten Nahrungsaufnahme während der Dunkelphase bei ad libitum gefütterten Ratten. Diese Wirkung bleibt bei der Injektion von

Nesfatin-2 und -3 aus (37). Gleichzeitig hat eine Suppression von Nesfatin-1 den gegenteiligen Effekt, nämlich eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, zur Folge. Dies wurde für den akuten Zustand mithilfe von Antikörpern (37) belegt. Bei der mithilfe von antisense Morpholino-Oligomeren herbeigeführten chronischen Herunterregulation von NUCB2 blieb dieser Effekt jedoch aus. Hierbei konnte lediglich eine Reduktion der *Nucb2* mRNA im Hypothalamus nachgewiesen werden (54,55). Der anorexigene Effekt wird dabei unabhängig von Leptin vermittelt (56).

Während Nesfatin-1 also entscheidend an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, ist seine Expression wiederum vom Energiehaushalt abhängig. Nahrungsentzug führt sowohl zu einem Abfall der *Nucb2* mRNA und der NUCB2/Nesfatin-1 Konzentration im peripheren subkutanen Fettgewebe (57) als auch zentral im PVN und SON (58). Durch Nahrungszufuhr lässt sich diese Auswirkung jedoch rückgängig machen (58).

Interessanterweise gelang es der Arbeitsgruppe um Sedbazar nachzuweisen, dass die Unterdrückung der Nahrungsaufnahme während der frühen Hellphase mit einem Anstieg der *Nucb2* mRNA im PVN einhergeht. Außerdem folgte eine verstärkte Nahrungsaufnahme auf die antikörpervermittelte Neutralisation von Nesfatin-1 nur während der Hellphase, nicht jedoch in der Dunkelphase (59).

Auf die hedonischen Aspekte der Nahrungsaufnahme, an deren Regulation Nesfatin-1 ebenso entscheidend beteiligt ist (60), wird im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

#### 1.5.4 Glukosehomöostase

Passend zu seiner Beteiligung innerhalb der Regulation der Nahrungsaufnahme ist zentrales Nesfatin-1 auch in die Glukosehomöostase involviert. Diesbezüglich liegen in der Literatur jedoch Diskrepanzen vor. Die Arbeitsgruppe um Wu zeigte 2014 (61), dass der Knockdown von NUCB2 in einer peripheren Insulinresistenz resultiert und von einem gesteigerten hepatischen Glukoseflux begleitet wird. Umgekehrt steigert i.c.v. appliziertes Nesfatin-1 die periphere Insulinsensitivität (62) und moduliert die Erregbarkeit von Neuronen, die im PVN an der Glukosewahrnehmung beteiligt sind (63).

## Einleitung

---

Nichtsdestotrotz fanden zwei weitere, voneinander unabhängige, Studien keinen Effekt von zentralnervösem Nesfatin-1 auf die Plasmaglukosekonzentration, die Insulinsensitivität oder die Glukosetoleranz (64,65).

Die bei Patienten und Probanden erhobenen Daten zur Verknüpfung von Nesfatin-1 mit dem Glukosestoffwechsel und Diabetes Mellitus sind allerdings sehr widersprüchlich. So wurden bei Patienten mit Typ 2 Diabetes sowohl erhöhte (66) als auch verringerte (67) NUCB2/Nesfatin-1 Plasmalevel beschrieben. Gleichzeitig wurde eine entscheidende Rolle von Nesfatin-1 im Plasma bei der Pathogenese der Insulinresistenz postuliert (68).

### 1.5.5 Regulation der Wasseraufnahme

Über die Beteiligung von Nesfatin-1 bei der Regulation der Nahrungsaufnahme ist bisher nur wenig bekannt. Dennoch zeigten Yosten und Samson bereits 2009, dass die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 zu einer signifikant verringerten Wasseraufnahme führt. Dabei ist dieser Effekt unabhängig von der Nahrungsaufnahme und tritt früher ein (49). Weiterhin zeigte ein zweiter Versuch von der Arbeitsgruppe um Yosten (54), dass das durch Angiotensin II induzierte Trinkverhalten reduziert ist, wenn die *Nucb2* mRNA Expression mittels antisense Morpholino-Oligonucleotiden supprimiert wird.

### 1.5.6 Thermogenese

Die Wirkungen von zentralnervösem Nesfatin-1 gehen weit über seine Funktion als Sättigungsmolekül hinaus. Sein Vorkommen in efferenten Neuronen, die ins braune Fettgewebe projizieren (39), lässt eine Beteiligung an der Regulation der Thermogenese vermuten. So erkannten Könczöl et al. 2012, dass die i.c.v. Injektion von Nesfatin-1 zu einer gesteigerten Körperkerntemperatur führt (69). Diese signifikant gesteigerte Wärmeproduktion konnte dann 2014 erstmals von unserer Arbeitsgruppe mithilfe direkter Kalorimetrie quantifiziert werden (70). Im Jahr 2017 wurden diese Ergebnisse von unserer Arbeitsgruppe erneut repliziert und gleichzeitig um die Erkenntnis erweitert, dass der beobachteten Erhöhung der Thermogenese ein Temperaturanstieg des interskapulären braunen Fettgewebes (iBAT) zugrunde liegt (15). Hierfür ist die sympathische Aktivierung des iBAT notwendig (71).

### 1.5.7 Stressreaktion und Angstverhalten

Abgesehen von der vielfältigen Involvierung innerhalb der Energiehomöostase ist zentralnervöses Nesfatin-1 außerdem in die Abstimmung von autonomen, neuroendokrinen und Verhaltensreaktionen bei der Stressantwort beteiligt. Das Peptid kann die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) modulieren, denn eine i.c.v. Applikation resultiert in erhöhten Plasmaspiegeln von ACTH und Corticosteron (72,73). Außerdem erfolgt bei Stress die Rekrutierung des endogenen nesfatinergen Systems, was sich aus der erhöhten Corticosteronkonzentration (74), der erhöhten c-Fos Expression in NUCB2/Nesfatin-1 Neuronen verschiedener Kerngebiete (75) und dem Anstieg der *Nucb2* mRNA im PVN (72,76) als Antwort auf erzwungene Bewegungsunfähigkeit ableiten lässt.

Begleitend hierzu ruft Nesfatin-1 Verhaltensänderungen hervor, die mit Stress und Angst vergesellschaftet sind. Demzufolge zeigen Versuchstiere nach Nesfatin-1 Injektion in den Ventrikel eine verstärkte nicht erlernte (elevated plus maze test (EPM), siehe Anhang, Kapitel 9.1.1) sowie eine verstärkte erlernte Angstreaktion (fear-potentiated startle (FPS), siehe Anhang, Kapitel 9.1.2). Weiterhin zeigen dieselben Ratten in einer neuen Umgebung eine verlängerte Latenzzeit bis zur Annäherung an Futter und auch eine reduzierte Futteraufnahme (77).

Zusammen mit der ausgeprägten NUCB2/Nesfatin-1 Expression auf Proteinebene in Hirnregionen, welche besonders in die Angst- und Stressreaktion involviert sind (Corpus amygdaloideum, Stria terminalis, PVN und Hippocampus) (39,40,75,78), ist von einer Beteiligung von Nesfatin-1 bei der Vermittlung der Stressantwort auszugehen.

## 1.6 Lipidom

In den Zellmembranen und Membranen der intrazellulären Organellen jeder eukaryotischen Zelle lassen sich Lipide finden. Obgleich die meisten Lipide in Biomembranen eingelagert sind, weisen sie unterschiedlichste Funktionen auf. Neben ihrer Eigenschaft als Energiespeicher (79) fungieren sie auch als Signalmoleküle (80), sind in der Lage Proteine zu rekrutieren (81) und in die postranslationelle Modifikation von Proteinen involviert (82). Zwischen den verschiedenen Kompartimenten gibt es allerdings große

## Einleitung

---

Unterschiede hinsichtlich der Lipidzusammensetzung, der Lipidkonzentration und dem Verhältnis der Lipide zueinander (83). Am häufigsten lassen sich Phospholipide finden, wobei die Unterklassen der Phosphatidylcholine und Phosphatidylinositole den größten Anteil einnehmen (84). Die Lipidzusammensetzung zeigt ständige dynamische Veränderungen (85) und steht dabei unter homöostatischer Kontrolle (86). Dennoch ist die gesamte Komplexität des Lipidmetabolismus bisher nur unzureichend verstanden (87).

Es ist also nicht verwunderlich, dass Störungen der Lipidhomöostase, die über physiologische Schwankungen hinausgehen, schwerwiegende Folgen haben können. Beispielsweise bestimmt das Verhältnis der verschiedenen Fettsäuren zueinander entscheidend die Fluidität der Plasmamembranen. Dabei reduzieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren (z.B. Docosahexaensäure (DHA)) die Membransteifigkeit, wodurch die Endozytose beschleunigt wird (88).

Das vergleichsweise noch sehr junge Forschungsfeld der Lipidomanalyse ermöglicht die Untersuchung des gesamten Lipidmetabolismus. Es können gleichzeitig sowohl verschiedene Lipidklassen als auch die einzelnen Lipide einer Klasse identifiziert und quantifiziert werden. Dies ermöglicht über die Vergleichbarkeit gesamter Klassen zwischen mehreren Gruppen hinaus auch die Untersuchung der Verhältnisse der Lipide zueinander (89). Nichtsdestotrotz liegen bisher erst vereinzelt Daten vor, welche die Lipidveränderungen bei diversen Krankheiten beschreiben. Diese Studien deuten allerdings darauf hin, dass bei pathophysiologischen Prozessen ein Umbau des Lipidoms stattfindet. Zum einen können Veränderungen ganzer Lipidklassen mit Pathologien assoziiert sein, was vor allem für die Ceramide bisher gut untersucht wurde. So lässt sich eine Erhöhung der Ceramide bei Diabetes Mellitus Typ II, Krebs, Alzheimer, zystischer Fibrose und Entzündungsreaktionen feststellen (90). Weiterhin geht eine erhöhte Konzentration von Ceramiden mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher (91), während darüber hinaus in arteriellen Plaques ein größerer Anteil an Ceramiden vorliegt als im Plasma (92). Dennoch ist auch das Verhältnis der Lipide zueinander ein entscheidender Faktor, denn beispielsweise bei der arteriellen Hypertonie scheint eine Erhöhung der Diacylglycerole DG (16:0 / 22:5) und DG (16:0 / 22:6) von Bedeutung zu sein (93).

Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen suggerieren außerdem bereits Interaktionen zwischen dem nesfatinergen System und dem Lipidmetabolismus. Dabei zeigen peripher und zentral appliziertes Nesfatin-1 ähnliche Wirkungen in Form von gesteigerter Mobilisation von Fettsäuren sowie gesteigerter  $\beta$ -Oxidation (94,95). Weiterhin wurden in einer Patientengruppe mit metabolischem Syndrom erniedrigte Konzentrationen von Nesfatin-1 im Serum nachgewiesen (96). Es ist also durchaus denkbar, dass Nesfatin-1 im PVN entscheidend an der Regulierung und Kontrolle des Lipidoms im Blut beteiligt ist. Hierzu liegen bisher allerdings noch keine Erkenntnisse vor.

## **1.7 Kalorimetrie**

Mithilfe der Kalorimetrie lässt sich die Wärmeproduktion und damit die Stoffwechselrate von Versuchstieren quantifizieren. Grundlegend gibt es dabei zwei verschiedene Methoden, die zur Anwendung kommen können. Verwendet man die indirekte Kalorimetrie, auch Respirometrie genannt, werden Sauerstoffverbrauch und CO<sub>2</sub>-Produktion des Versuchstieres gemessen und daraus der Energieumsatz berechnet. Aufgrund der geringen Kosten, der breiten Verfügbarkeit und der geringen Komplexität ist dies die am häufigsten verwendete Methode. Dennoch stellt die direkte Kalorimetrie den Goldstandard dar, denn die Berechnungen der indirekten Kalorimetrie sind nur für gesunde Versuchstiere, nicht jedoch für abweichende metabolische Zustände validiert. Beispielsweise würde eine durch Veränderung der Darmflora gesteigerte Wärmeproduktion des Darms unentdeckt bleiben, da diese fast ausschließlich anaerob stattfindet (97). Um diese Fehler zu vermeiden, kam in der vorliegenden Arbeit die direkte Kalorimetrie zum Einsatz. Hierfür wurden, nach der Anleitung von Prof. em. Dr. Ingolf Lamprecht, selbst gebaute Kalorimeter verwendet (15,70,98).

## **1.8 RNA-Interferenz**

Zur Ausschaltung von physiologisch vorkommender mRNA bei Versuchstieren lässt sich der Mechanismus der RNA-Interferenz anwenden. Hierbei handelt es sich um einen natürlichen Prozess, an dessen Ende die Degradierung von mRNA steht und welcher daher, neben der Genexpression, eine Möglichkeit zur Regulierung der Genaktivität darstellt.

## Einleitung

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Adeno-assoziiertes Virus (AAV) mittels stereotaktischer Injektion in das Kerngebiet eingebracht, um die dortigen Nervenzellen zu infizieren. Der AAV fungiert als Vektor für die Transfektion, wobei ein Plasmid, welches für doppelsträngige short hairpin RNA (shRNA) codiert, in die spezifischen Neurone eingebracht wird. Das Gen für die shRNA wird bei diesem Vorgang nicht in das Genom der Wirtszelle aufgenommen, sondern verbleibt episomal im Zellkern (99).

Sobald es nun durch den Transkriptionsapparat der Wirtszelle zur Produktion der shRNA kommt, beginnt der Vorgang der RNA-Interferenz.

Die shRNA gelangt ins Cytoplasma und wird dort von der RNase III Endonuklease Dicer in Fragmente mit einer Länge von 21 - 22 Basenpaaren, die sogenannte small interfering RNA (siRNA), gespalten. Diese weist am 3'-Ende einen Überhang von zwei Basen auf, welcher als Erkennungssignal für den RNA-Interferenzapparat dient (100).

Nach der nun folgenden Anlagerung der siRNA an den RNA-induced silencing complex (RISC) wird diese in zwei Einzelstränge gespalten. Während der Passenger Strang aus dem Komplex freigesetzt wird, lagert sich an den noch gebundenen Leitstrang die komplementäre mRNA an. Die mRNA wird daraufhin zwischen Base zehn und elf (ausgehend vom 5'-Ende der komplementären siRNA) gespalten und anschließend weiter degradiert. (100).

Auf diese Weise wird verhindert, dass die bereits exprimierte mRNA am Ribosom translatiert werden kann. Das in diesem Versuch verwendete Plasmid codiert für *Nucb2* shRNA und unterdrückt die Expression des *Nucb2* Gens im PVN. Bei einer Kontrollgruppe erfolgt die Transfektion mit einem Plasmid, das für eine Oligonucleotidsequenz codiert, für die in Nagern und Menschen keine komplementäre mRNA bekannt ist.

### 1.9 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die physiologische Beteiligung von endogenem Nesfatin-1 im PVN an der Regulation der Energiehomöostase und Stressreaktion zu entschlüsseln und so neue Erkenntnisse über die Entstehung von Adipositas zu gewinnen.

Innerhalb unserer Gesellschaft gewinnen Übergewicht und Adipositas immer mehr an Bedeutung. Beide stellen nicht nur große Risikofaktoren für die individuelle Gesundheit

sondern gleichzeitig auch eine große ökonomische Belastung für das gesamte Gesundheitssystem dar. Daher ist es wichtig, die Pathogenese so genau wie möglich zu verstehen, um so neben den bereits bestehenden (Sport, Ernährung und Chirurgie) auch neue Therapieansätze finden zu können.

Adipositas entsteht durch eine unausgeglichene Energiebilanz, wobei der Körper mit einem dauerhaften Energieüberschuss konfrontiert ist. Störungen des Essverhaltens, Stress, Nahrungsaufnahme außerhalb physiologischer Zeiten und genetische Prädispositionen tragen alle zu diesem Zustand bei. Das anorexigene Peptid Nesfatin-1, welches sowohl die Nahrungsaufnahme reduziert, als auch den Energieumsatz steigert, scheint in all diese Prozesse involviert zu sein.

Da bisher noch kein Rezeptor für Nesfatin-1 identifiziert werden konnte, haben die meisten bisher durchgeführten Studien Versuchsansätze gewählt, die entweder auf der pharmakologischen Applikation von Nesfatin-1 oder seiner Blockade durch Antikörper basierten.

Der PVN im Hypothalamus bildet die Schnittstelle verschiedener energieregulierender Signalwege und stellt so ein entscheidendes Zentrum für die Regulation der Energiehomöostase dar.

Um die Funktionen von endogenem Nesfatin-1 im PVN zu untersuchen, soll mithilfe eines AAV ein Knockdown seines Vorläuferpeptids NUCB2 bei Ratten durchgeführt werden. Dies führt in der Folge dann zu einem Fehlen von Nesfatin-1. Gleichzeitig erhält eine Kontrollgruppe ein Kontrollvirus. Durch eine anschließende phänotypische Charakterisierung sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

- *Lässt sich mit dem Knockdown von NUCB2/Nesfatin-1 im PVN der gegenteilige Effekt einer pharmakologische Applikation von Nesfatin-1 erzeugen?*
- *Äußert sich diese Beeinflussung der Energiehomöostase als temporäres Ereignis oder zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein anhaltender Effekt, welcher in der Ausbildung eines eigenen Phänotyps, mit Einfluss auf die Körperzusammensetzung, resultiert?*
- *Verändert sich die Stressreaktion der Versuchstiere?*

## Einleitung

---

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen sollen sich neue Erkenntnisse über die zentralnervöse Regulation der Energiehomöostase und die Involvierung von Nesfatin-1 in diese ergeben. Die Erforschung dieser Mechanismen ist wichtig, um die Entstehung von Übergewicht und Adipositas zu verstehen und daraus letztlich neue Therapieansätze abzuleiten.

## 2 Material und Methoden

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind alle Herstellerangaben zu den verwendeten Geräten und Verbrauchsmaterialien separat im Anhang in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt.

### 2.1 AAV-Herstellung zum Knockdown von NUCB2

#### 2.1.1 Plasmidpräparation

Die in Kapitel 2.1 beschriebene Herstellung und Aufbereitung des in dieser Arbeit verwendeten AAV wurde von Christine Eichholz im Labor von Prof. Dr. Olaf Jöhren durchgeführt.

Der verwendete Adeno-assoziierte Virus vom Serotyp 2 wurde bei VectorBuilder gekauft und als Stammpreparation in Agar geliefert. Es erfolgte eine Maxipreparation entsprechend der Herstellerangaben unter Verwendung des NucleoBond® Xtra Maxi, um die aufgereinigte Plasmid DNA zu erhalten.

Zuerst wurde eine einzelne E. coli Bakterienkolonie bei 6.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen, um ein Zellpellet zu erhalten. Anschließend erfolgte die Resuspension in 12 ml Resuspensionspuffer (RES + RNase A). Die Lösung wurde auf dem Vortex-Mischer gut gemischt, damit keine Zell-Agglomerate mehr vorhanden waren. Diese würden die Zelllyse beeinträchtigen, welche durch Zugabe von 12 ml Lysepuffer (LYS) und fünfmaliges Schwenken zur Durchmischung erfolgte. Die Zellsuspension wurde nun für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 12 ml Neutralisationspuffer (NEU) hinzugefügt und erneut durch Schwenken vorsichtig durchmischt. Nachdem die Suspension für 5 Minuten auf Eis abgekühlt wurde, erfolgte das Filtrieren durch den, zuvor mit 25 ml Äquilibrationspuffer (EQU) befeuchteten, NucleoBond Xtra Column Filter. Das übrige Lysat im Filter wurde mit 15 ml Äquilibrationspuffer (EQU) ausgespült und der Filter entfernt. Danach wurde das Sammelgefäß mit 25 ml Waschpuffer (WASH) gespült und weiterhin 15 ml Elutionspuffer (ELU) hinzugefügt. Aus dem gesammelten Eluat wurde nun durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol, Durchmischen und Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C für 30 min die DNA

## Material und Methoden

---

präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und 5 ml Ethanol (70 %) zum Präzipitat hinzugegeben. Abschließend erfolgten die erneute Zentrifugation bei 10.000 g und Raumtemperatur für 15 Minuten, das Entfernen des Überstandes und das Trocknen bei Raumtemperatur, bevor das Präzipitat in TE Puffer gelöst wurde.

### 2.1.2 Virusherstellung

Zur Herstellung des Virus wurden HEK (human embryonic kidney) Zellen in Petrischalen ausgesät und für 24 Stunden wachsen gelassen. Es erfolgte die Transfektion der Zellen mit dem Virusplasmid durch Zugabe von 50 µl Plasmidlösung (inkl. der Helferplasmide DP1 und DP2), 62,5 µl 2 M Calciumchloridlösung, 387,5 µl Wasser und 500 µl 2x BBS. Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 3 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium gewechselt und erneut für 48 Stunden bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Hierfür wurden aus der Petrischale 8 ml Medium abgesaugt, die Zellen mit einem Zellschaber im verbleibenden Medium abgeschabt und diese Suspension dann in ein 50 ml Zentrifugiergefäß mit Spitzboden überführt. Nach Zentrifugation bei 1.000 g und 4 °C für 10 Minuten, wurde der Überstand in ein neues konisches Zentrifugenröhrchen überführt und das Pellet mit 5 ml TNT Extraktionspuffer resuspendiert. Auf eine 10-minütige Inkubationszeit folgte die Zentrifugation bei 2.100 g und 4 °C für 10 Minuten und das Überführen des Überstands zu dem Ersten. Zum Entfernen von RNA und DNA Resten wurden 3 µl Benzoase hinzu pipettiert und das ganze bei 37 °C eine Stunde lang im Wasserbad inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Aufbewahrung bei -80 °C.

### 2.1.3 Virusaufreinigung

Die wie oben beschrieben hergestellte Viruslösung wurde nun durch Affinitätschromatographie mithilfe einer Sepharose Säule aufgereinigt.

Dafür erfolgte als erstes die Zentrifugation bei 7.000 g und 4 °C für 30 Minuten. Zur Vorbereitung der Sepharose Säule erfolgte das Hindurchlaufen von 10 ml PBS aus einer Perfusorspritze mit einer Geschwindigkeit von 45 ml/h. Der Überstand des zentrifugierten Virus wurde in eine neue Perfusorspritze aufgezogen und in ein konisches Zentrifugenröhrchen filtriert. Diese Lösung wurde erneut in eine Perfusorspritze aufgezogen und mit der Sepharose Säule verbunden. Sobald die Viruslösung die Säule passiert hatte, wurden noch einmal 10 ml PBS hindurchgeführt. Die Eluierung des Virus

erfolgte durch Passage der Säule von 10 ml Glycin-HCl mit einem pH-Wert von 2,7 und Auffangen des Eluats in einem Becherglas mit 1 ml TE-Puffer (pH = 8,0). Anschließend wurde das Becherglas auf Eis gestellt, das Eluat auf einen Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter pipettiert und das Ganze bei 4.500 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis sich das gesamte Eluat auf dem Filter befand. Anschließend erfolgten zwei Waschvorgänge durch Zugabe von jeweils 3 ml PBS und Zentrifugation bei 4.500 g und 4 °C für 10 Minuten. Über einen Acrodisc® Syringe Filter erfolgte eine letzte Filtration, bevor das injektionsbereite Virus bei -80 °C gelagert werden konnte.

#### 2.1.4 Qualitätskontrolle des Virus

Im Anschluss an die Herstellung und Aufreinigung des AAV erfolgte die Qualitätskontrolle. Nach der Inaktivierung einer Virusprobe bei 98 °C für 10 Minuten wurde eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, durchgeführt. So konnte sichergestellt werden, dass das Virus die *Nucb2* shRNA Plasmide trägt (Titer: shNUCB2  $3,33 \times 10^{10}$  DNA Partikel /  $\mu\text{L}$ ; scrambleRNA  $2,87 \times 10^{10}$  DNA Partikel /  $\mu\text{L}$ ).

Gleichzeitig wurden die viralen Proteine mithilfe einer Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierfür wurden 10  $\mu\text{L}$  des Virus mit 3,5  $\mu\text{L}$  4x Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)-Pufferlösung für 10 Minuten auf 98 °C erhitzt und auf ein 10 % Acrylamidgel aufgetragen. Es folgte das Anlegen einer Spannung von 200 V für 50 Minuten sowie die Färbung in Coomassie-Brillant-Blau für eine Stunde. Nach der anschließenden Entfärbung von einer Stunde wurde das Gel gescannt und ausgewertet.

## 2.2 Durchführung der Tierexperimente

### 2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Alle Versuche wurden mit der Genehmigung des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein durchgeführt (Aktenzeichen 99-8/17).

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten verwendet, die mit einem Gewicht zwischen 176 und 200 g von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen

## Material und Methoden

---

wurden. Gehalten wurden die Tiere in den Räumen der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck im Center of Brain, Behavior and Metabolism (CBBM), Gebäude 66 der Universität zu Lübeck in einem vom Außenlicht abgeschirmten Raum mit einer konstanten Temperatur von 21 °C. Darin wurde von einer Zeitschaltuhr ein 12 h / 12 h hell / dunkel Rhythmus erzeugt, wobei die Hellphase von 5:00 bis 17:00 Uhr dauerte.

Die Versuchstiere selbst befanden sich jeweils zu zweit in IVC (individually ventilated cage) Kunststoffkäfigen, um im Sinne des Tierschutzes eine soziale Interaktion zu ermöglichen. Die Käfige besaßen eine Grundfläche von 1862 cm<sup>2</sup>, zwei Ebenen und eine Innenhöhe von 38 cm, was den Tieren artspezifisches Verhalten wie Klettern und Springen erlaubten. Futter und Wasser waren über die Dauer des gesamten Versuches *ad libitum* verfügbar.

Unmittelbar vor der Virusinjektion erfolgte anhand von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme die Einteilung der Versuchstiere in zwei gleiche Gruppen, wobei beide Tiere eines Käfigs jeweils derselben Gruppe zugeordnet wurden.

### 2.2.2 Virusinjektion

Nach einer Eingewöhnungszeit von 8 bis 10 Tagen erfolgte die stereotaktische bilaterale Virusinjektion in den PVN. Hierfür wurde das Tier mit der intraperitonealen Gabe von Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (6 mg/kg) anästhesiert und, sobald das Fehlen von Lidschluss- und Zwischenzehenreflex eine suffiziente Narkosetiefe anzeigte, im stereotaktischen Apparat platziert. Eine unterliegende Wärmematte verhinderte das Auskühlen des Versuchstieres, während die Augen wiederholt mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt wurden, um ein Austrocknen zu verhindern. In regelmäßigen Abständen wurden die Reflexe kontrolliert und die Anästhesie gegebenenfalls durch erneute Gabe von Ketamin (25 mg/kg i.p.) verlängert.

Der Kopf wurde durch zwei Stifte in den äußeren Gehörgängen und eine Auflage für die Schneidezähne fixiert. Diese war dabei ebenfalls nach den Koordinaten von Paxinos und Watson ausgerichtet und befand sich 3,3 mm unterhalb des knöchernen Gehörgangs.

Danach erfolgte zunächst die Oberflächenanästhesie der Kopfhaut mit Emla Creme und anschließend deren Eröffnung durch eine Inzision mit dem Skalpell und das Fixieren derselben mithilfe von vier Bulldog Klemmen, um eine uneingeschränkte Sicht auf das Operationsfeld zu ermöglichen. Daraufhin wurde das auf der Schädeloberfläche

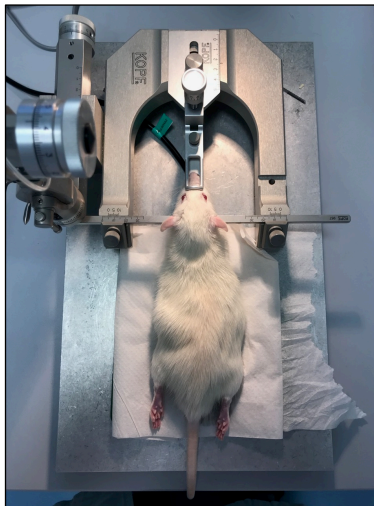
verbliebene Periost mit einem Knochenschaber entfernt und, falls erforderlich, der Schädel mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung von Blutanhaftungen gereinigt. Sobald freie Sicht auf den Orientierungspunkt Bregma (Schnittstelle von sutura coronalis und sagittalis) gegeben war, wurde eine mit Viruslösung gefüllte Injektionskapillare in die Mikromanipulationseinheit des stereotaktischen Apparates eingespannt und die Koordinaten des Bregmas bestimmt. Ausgehend von diesen erfolgte nun das Aufsuchen und Markieren der Injektionsstelle basierend auf den Koordinaten des Nucleus paraventricularis nach Paxinos und Watson (AP: - 1,80 mm; ML: +/- 0,30 mm; DV: - 7,90 mm; normiert für männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 270g – 310g (101)).

Im Anschluss wurde der Schädel mit dem elektrischen Bohrer (Durchmesser 0,7 mm) eröffnet und die Injektionskapillare eingeführt. Sobald diese in Position war, wurde die Injektion der Viruslösung (1 µl) mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/min durchgeführt. Nach erfolgter Injektion blieb die Kapillare für weitere 8 Minuten in der gleichen Position, um die ungestörte Diffusion der Lösung ins Gewebe zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Kapillare wieder entfernt. Dies erfolgte sehr langsam über einen Zeitraum von 1 Minute, um Rückfluss der Lösung durch einen möglicherweise entstehenden Unterdruck zu verhindern.

Die Injektionskapillare wurde nun neu ausgerichtet und es erfolgte die Virusinjektion in den kontralateralen PVN. Zum Schluss erfolgte der Verschluss der Operationswunde durch die Naht der Kopfhaut.

Im weiteren Verlauf bis zum Aufwachen wurde der Erhalt der Körpertemperatur durch eine Heizmatte sichergestellt. In der folgenden Woche erfolgte die tägliche Kontrolle von Körpergewicht, Nahrungs- und Wasseraufnahme, um den Erholungsprozess des Tieres zu überwachen.

Bevor mit dem weiteren Versuchsablauf fortgefahren wurde, mussten die Versuchstiere die vollständige Erholung von der Operation anzeigen. Maßgeblich hierfür waren die Rückkehr zum Körpergewicht vor der Operation, normales Verhalten und das Fehlen von Krankheitszeichen. Es wurde jedoch immer ein Mindestabstand von fünf Tagen zur Operation eingehalten.



*Abbildung 1: Versuchstier eingespannt im stereotaktischen Apparat*



*Abbildung 2: Versuchstier mit eröffneter Kopfhaut; Darstellung des Orientierungspunktes Bregma*



*Abbildung 3: Stereotaktische Injektion des AAV in den rechten PVN*

### 2.2.3 Messrhythmus

Jedes Versuchstier unterlag nach der Virusinjektion einem 14-tägigen Messzyklus, welcher insgesamt vier Mal wiederholt wurde. Jeder Messzyklus bestand aus der ersten Woche, in der jeweils einmal die Körperzusammensetzung, die Thermogenese und die direkte Wärmeabgabe bestimmt wurden. Daran schloss sich eine Woche Pause an, welche die zweite Woche eines jeden Messzyklus darstellt. Auch innerhalb der ersten Woche wurde durch die Kontrolle des Körpergewichts sichergestellt, dass die Versuchstiere zwischen den einzelnen Messungen genug Erholungszeit erhielten.

Weiterhin erfolgte die Erfassung von Körpergewicht, Nahrungsaufnahme und Wasseraufnahme durch dreimal wöchentliches Wiegen von Futter, Wasser und Versuchstier. Da diese Maßnahmen nicht mit Stress für das Versuchstier verbunden sind, wurden sie auch während der Pausenwochen durchgeführt. In Tabelle 1 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Wiegen + Messung der Körperzusam- mensetzung	Thermo- graphie	Wiegen	Pause	Wiegen + Direkte Kalorimetrie	Pause	Pause

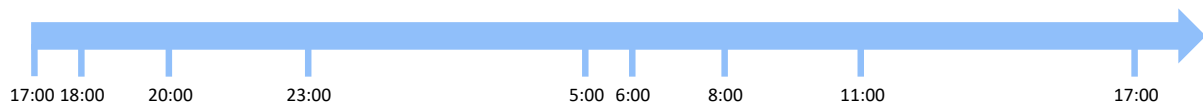
Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14
Wiegen	Pause	Wiegen	Pause	Wiegen	Pause	Pause

*Tabelle 1: Schematische Darstellung des Messrhythmus*

## 2.3 Messmethoden

### 2.3.1 Zeitliches Profil der Nahrungsaufnahme

Nachdem sich ein Unterschied in der Nahrungsaufnahme zwischen den beiden Gruppen zeigte, wurde sieben Wochen nach Virus-Applikation zusätzlich zur routinemäßigen Kontrolle der Nahrungsaufnahme ein 24-Stunden-Profil angefertigt, um strukturelle Veränderungen in der circadianen Rhythmik der Nahrungsaufnahme zu erfassen. Auf dem folgenden Zeitstrahl sind die genauen Messzeitpunkte aufgeführt.



*Abbildung 4: Schematische Darstellung der Messzeitpunkte für das 24-Stunden-Profil der Nahrungsaufnahme*

### 2.3.2 Direkte Kalorimetrie

Die nicht-evaporative Wärmeabgabe der Versuchstiere wurde mittels direkter Kalorimetrie quantifiziert. Da es keine kommerziell erhältlichen direkten Kalorimeter für Ratten gibt, wurde ein von unserer Arbeitsgruppe selbst konstruiertes Kalorimeter verwendet, welches auf dem von Prof. em. Dr. Ingolf Lamprecht der Freien Universität Berlin entwickelten System basiert (98). Dabei dient eine modifizierte Kühlbox als Kalorimeter. Diese enthält ein Thermo-Element, welches normalerweise nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung eine Temperaturdifferenz zwischen Innen- und Außenseite erzeugt (Peltier-Effekt) und so den Innenraum herunterkühlen kann.

Die Funktionsweise unseres Kalorimeters beruht auf der Umkehrung dieses Prinzips, indem das Thermo-Element als Wärmesensor fungiert und eine Spannung liefert (Seebeck-Effekt). Diese Spannung ist innerhalb des von uns untersuchten Temperaturbereichs proportional zur erzeugten Wärme. Sie wird im Versuch mit einem Voltmeter gemessen und durch eine Software (VC 820/840 Interface Program Ver. 1.00) jede Minute über einen Zeitraum von

## Material und Methoden

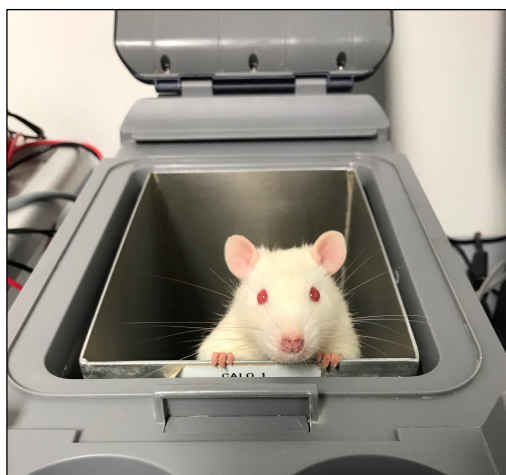
---

acht Stunden aufgezeichnet. Im Vorfeld der Messungen erfolgte eine 4-Punkt-Kalibrierung mit einem elektrischen Widerstand von 1,5 k $\Omega$  und einer Spannungsquelle.

Um eine Beeinflussung des Messsignals durch die Veränderung der Kontaktfläche des Versuchstieres mit dem Kalorimeter (z.B. durch den Wechsel von Stehen zu Liegen) zu verhindern, muss die Wärmeleitung zwischen Tier und Kalorimeter unterbunden werden. Hierzu befindet sich in dem Kalorimeter eine Aluminiumbox (180 mm x 125 mm x 160 mm), die mit Polypropylen-Distanzstücken im Abstand von 2 mm zu den Seitenwänden und 6 mm zu Boden und Vorderwand fixiert ist. So ist der Wärmetransport nur durch Konvektion und Wärmestrahlung möglich.

Zum Luftaustausch befindet sich an einer Schmalseite der Aluminiumbox in Bodennähe ein 5mm hoher Schlitz über die gesamte Seitenbreite. Weiterhin saugt eine Membranpumpe die bodennahe CO<sub>2</sub>-reiche Luft über PE-Schläuche ab. Die Flussrate der Pumpe beträgt 200  $\pm$  10 ml/min, während Öffnungen im Deckel die Zufuhr von Frischluft ermöglichen.

An jedem Versuchstag erfolgte eine ausführliche Kontrolle der gesamten Apparatur sowie der Funktionsfähigkeit und Flussraten der Pumpen mithilfe eines Durchflussmessers, um die Sicherheit der Versuchstiere und die Korrektheit der erhobenen Daten zu gewährleisten. Sowohl unmittelbar vor Beginn einer Kalorimeter-Sitzung als auch direkt danach wurde das Gewicht des Versuchstiers bestimmt. Mit Abschluss der Messung hatte das Tier wieder freien Zugang zu Futter und Wasser.



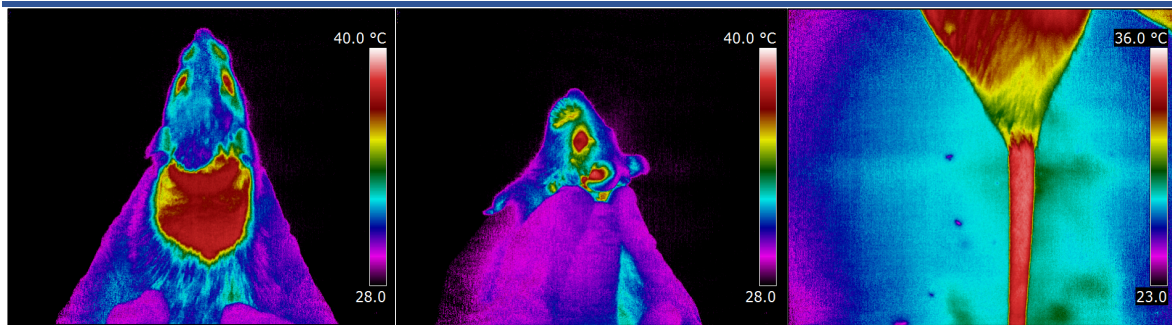
*Abbildung 5: Versuchstier im Kalorimeter*

### 2.3.3 *Ruhe-Infrarot-Thermographie*

Die Temperaturen von Interskapularregion, Gehörgang und Schwanz wurden mittels Infrarot-Thermographie bestimmt. Während die Gehörgangstemperatur, aufgrund der Korrelation beider Variablen (102), als Maß für die Körperkerntemperatur verwendet werden kann, stellt die Schwanztemperatur ein Maß für die Vasodilatation oder -konstriktion dar. Die Temperatur der Interskapularregion gibt Auskunft über die Wärmeproduktion des interskapularen braunen Fettgewebes.

Bei den Versuchen kam eine Infrarot-Thermographie Kamera mit einer Infrarot-Auflösung von 640 x 512 Pixel und einer Thermal-Sensitivität  $< 0,05$  °C bei +30 °C zum Einsatz. Im Vorfeld der ersten Messung erfolgte eine umfangreiche Habituation der Versuchstiere sowohl an den Versuchsraum als auch an das notwendige Handling. Weiterhin wurde zwei Tage vor der Messung die Interskapularregion rasiert. Am Versuchstag selbst wurden die Tiere um 7:00 Uhr morgens in den Versuchsraum gebracht und für zwei Stunden ungestört belassen, so dass die meisten Tiere zu Beginn des Versuches schliefen. Anschließend wurden die Tiere rasch und vorsichtig aus dem Käfig genommen, unter der Kamera platziert und ein Set aus drei Bildern pro Körperregion aufgenommen. Danach wurden die Tiere in den Käfig zurückverbracht. Diese gesamte Prozedur dauerte weniger als 30 Sekunden pro Versuchstier.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mithilfe der Software FLIR Quick Report 1.2. Dabei wurde die entsprechende Region jeweils markiert und die Durchschnittstemperatur ermittelt. Zur weiteren Analyse wurde die jeweils höchste Durchschnittstemperatur eines jeden Bildersets verwendet.



*Abbildung 6: Infrarotbild der Interskapularregion*

*Abbildung 7: Infrarotbild des Gehörgangs*

*Abbildung 8: Infrarotbild des Schwanzes*

### 2.3.4 Stress-Infrarot-Thermographie

Bei der Stress-Infrarot-Thermographie kam dasselbe (in Kapitel 2.3.3 beschriebene) Protokoll wie bei der Durchführung der Ruhe-Infrarot-Thermographie zur Anwendung. Nachdem ein erstes Bilderset als Referenzwert erstellt war, erfolgte die Applikation von Restraint Stress für jedes Versuchstier. Hierfür wurde das Tier in einem Plexiglaszylinder fixiert, wodurch keine Bewegung mehr möglich war. Da es sich um einen durchsichtigen Zylinder handelte, konnte das Versuchstier von außen die ganze Zeit überwacht werden.

Nach fünf Minuten im Zylinder wurde sofort ein weiteres Bilderset erstellt und das Tier zurück in den Käfig verbracht. Weiterhin wurden ein Bilderset 30 Minuten und eines 75 Minuten nach Ende des Stresses angefertigt.

Die Auswertung wurde so durchgeführt, wie schon in Kapitel 2.3.3 beschrieben.

### 2.3.5 Körperzusammensetzung

Die Messung der Körperzusammensetzung erfolgte mit Hilfe des Minispec LF110. Dabei ermöglicht das nicht invasive Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance (TD-NMR) Verfahren eine Quantifizierung von Fett, Muskel und freier Flüssigkeit nach dem gleichen Prinzip wie die Bildgebung bei der Magnetresonanztomographie, basierend auf der relativen Relaxationszeit der Wasserstoffkerne. Zur Verwendung kam hierbei zusätzlich die Software Opus 7.0.

An jedem Messtag erfolgte eine Kalibrierung nach den Angaben des Herstellers. Für die Messung selbst wurde das Versuchstier in einem Plexiglaszylinder fixiert, so dass keine Bewegungen mehr möglich waren. Im Anschluss wurde der Plexiglaszylinder im Analysator

platziert und die Quantifizierung der Körperzusammensetzung durchgeführt. Hierfür war eine Verweildauer von maximal 120 Sekunden erforderlich, bevor das Versuchstier wieder in den Käfig verbracht wurde. Für die Auswertung wurden die absoluten Massen der verschiedenen Gewebe in Bezug auf das Körpergewicht normalisiert und der Ausgangswert vor Virusinjektion für beide Gruppen jeweils als 100% festgesetzt.

### 2.3.6 Tötung und Organentnahme

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch Dekapitation. Anschließend wurde sofort der Glukosespiegel im Dekapitationsblut gemessen und die Gehirne sowie Proben von folgenden Geweben und Organen wurden entnommen: Blut, iBAT, und Nebennieren. Es erfolgte die sofortige Präparation und Wägung der Nebennieren. Die Proben wurden unverzüglich auf Trockeneis eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Analyse bei -80 °C.

## 2.4 Gehirne

### 2.4.1 Gefrierschnitte

Zur weiteren Analyse erfolgte die Anfertigung von 20 µm dicken Gefrierschnitten der Gehirne im Kryostat bei -20 °C, wobei das Gehirn mittels Einbettmedium an der Schnittplattform befestigt war. Es wurde die gesamte PVN-Region nach den Koordinaten von Paxinos und Watson (1,60 mm bis 2,20 mm hinter Bregma) auf Membranobjektträgern gesammelt (101). Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

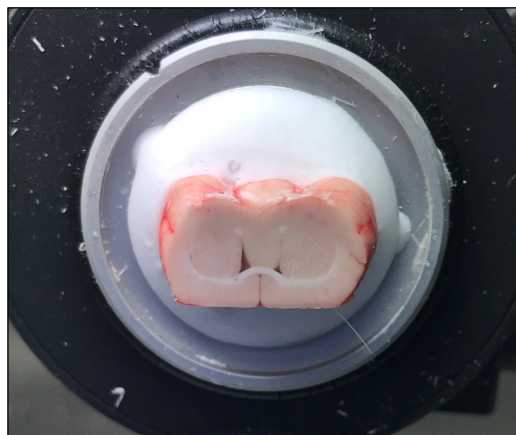
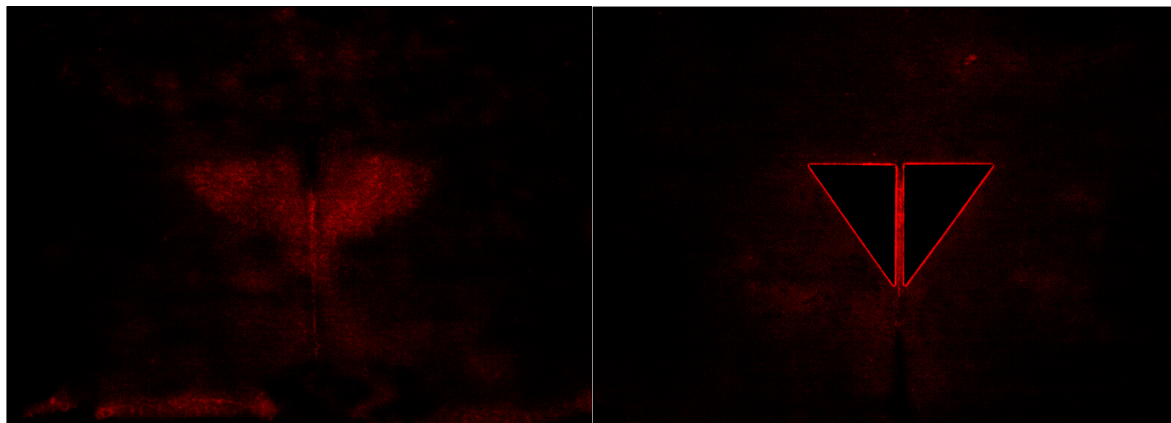


Abbildung 9: Gehirn, befestigt an Schnittplattform im Kryostat

### 2.4.2 Immunfluoreszenz

Die Verteilung des Virus im PVN konnte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops begutachtet werden. Dafür erfolgte die Begutachtung der Hirnschnitte sowie die Anfertigung von Photographien, um diese auf die Expression des fluoreszierenden Proteins mCherry (Absorptionsmaximum: 587 nm; Emissionsmaximum: 610 nm) zu überprüfen.



*Abbildung 10: Darstellung der mCherry Expression im PVN in der Fluoreszenzmikroskopie (10-fache Vergrößerung)*

*Abbildung 11: Darstellung der mCherry Expression in der Fluoreszenzmikroskopie nach der Entfernung beider PVN mittels LCM (10-fache Vergrößerung)*

### 2.4.3 Laser-Capture Mikrodissektion

Um den Virus Knockdown von NUCB2 im PVN zu validieren, erfolgte das Ausschneiden des Kerngebietes unter Anwendung der Laser-Mikrodissektion (LCM). Nach Identifikation des PVN erfolgte die Erstellung einer Schablone um diesen Kern mittels der PALM RoboSoftware (siehe Abbildung 12). So war es möglich, mit dem Laser, exakt die gewünschte Region in den korrespondierenden Schnitten auf den Membranobjektträgern auszuschneiden (siehe Abbildung 13). Von jedem Versuchstier wurden so insgesamt Proben von sechs PVN (drei links und drei rechts) aus drei konsekutiven Schnitten gesammelt. Die an einem Tier gewonnen Proben wurden dann gemeinsam für die cDNA-Synthese weiterverarbeitet.

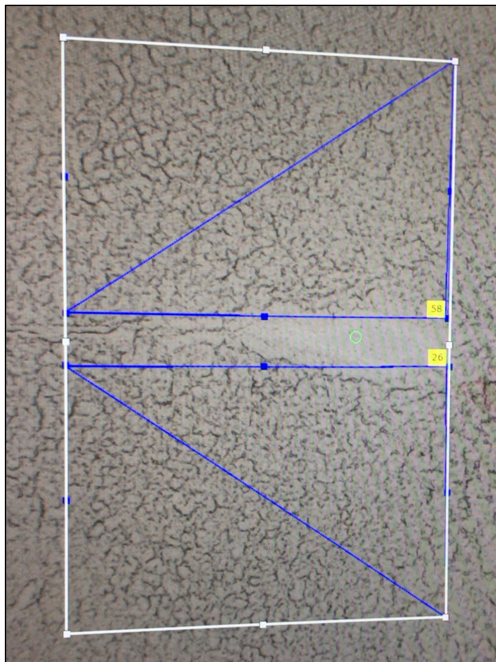


Abbildung 12: PVN beidseitig von Schablone umrandet

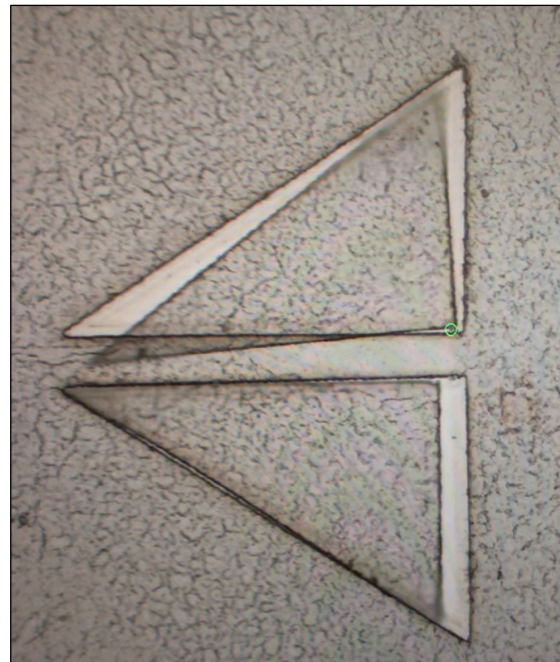


Abbildung 13: Beidseitig ausgeschnittener PVN nach Laser-Mikrodissektion

## 2.5 Molekulare Analysen

Die in den Kapiteln 2.5.1 bis 2.5.4 beschriebene qRT-PCR und die vorbereitenden Arbeiten wurden mit der Unterstützung von Christine Eichholz im Labor von Prof. Dr. Olaf Jöhren durchgeführt.

### 2.5.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus den mit der Laser-Mikrodissektion gewonnen Präparaten erfolgte unter Verwendung des Absolutely RNA Nanoprep Kit. Um die Zellen zu lysieren und die RNA zu gewinnen, wurde sofort nach Einsammeln der Präparate bei der LCM 100 µl Pufferlösung (hergestellt aus 100 µl Lysepuffer und 0,7 µl Mercaptoethanol) zu jeder Probe hinzugegeben. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 80 % Sulfolanlösung und der Transfer der Lösung in den dafür vorgesehenen nano spin cup, in dem eine silica-based fiber matrix die RNA bindet. Dieses Gefäß wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß gestellt und bei 12.000 g für 60 Sekunden zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und eine DNase-Behandlung durchgeführt, um DNA-freie RNA zu erhalten.

## Material und Methoden

---

Hierfür erfolgte die Zugabe von low salt wash buffer und die Zentrifugation bei 12.000 g für 60 Sekunden. Nach Verwerfen des Sediments und erneuter Zentrifugation bei 12.000 g für 120 Sekunden, um die Matrix zu trocknen, wurden 15 µl eines Mix aus 2,5 µl RNase-freier DNase I und 12,5 µl DNase Digestion Buffer direkt auf die Membran pipettiert. Es erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten.

Durch Hinzugeben von 300 µl high-salt wash buffer und Zentrifugation bei 12.000 g für 60 Sekunden wurde die DNase Lösung wieder ausgewaschen. Nach Verwerfen des Sediments erfolgte eine weitere Waschung mit 300 µl low-salt buffer und erneuter Zentrifugation (12.000 g, 60 Sekunden). Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt.

Durch dreiminütige Zentrifugation, nach Verwerfen des Sediments, wurde die Membran wieder getrocknet. Daraufhin wurde das 2 ml Spitzbodengefäß gegen ein Neues ausgetauscht.

Abschließend erfolgte das Herauslösen der RNA aus der Membran durch Zugabe von 10 µl Elutionspuffer direkt auf die Membran, Inkubation bei Raumtemperatur für 120 Sekunden und Zentrifugation (12.000 g, 5 Minuten). Die isolierte RNA konnte nun aus dem Sammelgefäß entnommen und weiterverarbeitet werden.

### 2.5.2 Nanodrop

Im Anschluss an die Isolation der RNA erfolgte die Überprüfung der Reinheit der RNA-Lösung. Hierfür wird mittels Spektralphotometer die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Gruppen der Proteine) bestimmt und der Quotient  $OD_{260} / OD_{280}$  errechnet. Ein Wert  $> 2$  wird als Beleg für eine hohe Reinheit der RNA-Lösung gewertet, während niedrigere Werte als Indikator für Verunreinigungen zum Beispiel durch Proteine oder Phenol gelten. Die in dieser Arbeit analysierten RNA-Lösungen wiesen einen  $OD_{260} / OD_{280}$  - Wert von  $1,87 \pm 0,65$  auf.

### 2.5.3 cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA erfolgte die cDNA Synthese unter Verwendung von Oligo(dt)20-Primern und einem Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit. Weiterhin wurde ein

Thermocycler verwendet. Die Pipettierschemata zur Herstellung des Primer- sowie des Mastermix sind im Anhang unter Kapitel 9.5 zusammengefasst.

Es folgte das Mischen auf einem Rüttler für 5 Sekunden, die Denaturierung von RNA und Primern im Thermocycler bei 65 °C für 5 Minuten und das anschließende Abkühlen auf Eis. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 8 µl Mastermix zu jeder Probe, das Mischen auf dem Rüttler für 5 Sekunden und die Inkubation im vorgeheizten Thermocycler bei 50 °C für 60 Minuten. Abschließend wurde die Reaktion durch Inkubation für 5 Minuten bei 85 °C beendet und die Proben bei -20 °C bis zur qRT-PCR gelagert.

#### 2.5.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der im PVN vorhandenen mRNA von *Nucb2* und *Crf* wurde die synthetisierte cDNA mittels qRT-PCR amplifiziert. Die Quantifizierung erfolgt hierbei über Fluoreszenzmessungen, wobei hierfür der Platinum® SYBR® Green qRT-PCR SuperMix UDG verwendet wurde. Die gleichzeitige Analyse der Verdünnungsreihe eines Standards ermöglicht die Berechnung der Anzahl an mRNA-Kopien (103). Die verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt:

qRT-PCR-Primer	Primersequenz (5' – 3')	Größe des Amplikons [Basenpaare]
r CRF 37F r CRF 137R	AAAGGGGAAAGGCAAAGAAA GTTTAGGGGCGCTCTCTTCT	137
r NUCB2 247F r NUCB2 357R	TTTCTCTTGGTTCCGTGCGT TGGCGGTTCTATCCTTGCA	142
r beta-Actin 968F r beta-Actin 1135R	TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA ATGCCACAGGATTCCATACCC	168

Tabelle 2: Primersequenzen für qRT-PCR

Nach dem Pipettierschema, welches im Anhang in Tabelle 8 zu finden ist, erfolgte die Herstellung des Mastermix.

Daraufhin wurde die Verdünnungsreihe des Standards durch Hinzugabe von TE-Pufferlösung in den Verdünnungsstufen  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  angefertigt. Für CRF erfolgte die Herstellung der Verdünnungsstufen  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$  und  $10^6$ . Anschließend wurden 40 µl des Mastermix in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert und 10 µl cDNA (1 Well / Probe), Wasser (2 Wells) oder Standardlösung (2 Wells / Verdünnungsstufe)

## Material und Methoden

---

hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen, bei 1.000 g zentrifugiert und in den Thermocycler mit der Software für die Sequenzdetektierung gestellt. Es erfolgte ein 2-Stufen Zyklus, wobei erst für zwei Minuten eine Temperatur von 50 °C herrschte, diese dann auf 95 °C erhöht und wieder für zwei Minuten gehalten wurde. Danach liefen 50 Zyklen mit 90 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 30 Sekunden.

### 2.5.5 Radioimmunoassay

Aus dem Dekapitationsblut erfolgte die Bestimmung der Corticosteronkonzentration im Plasma. Hierbei handelt es sich somit um die Konzentration von Corticosteron im Ruhezustand, da vor der Tötung keine Manipulation der Versuchstiere stattgefunden hat. Diese Messungen wurden von Dr. Sandro Catzeddu mithilfe eines kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays, unter Berücksichtigung der Anweisungen des Herstellers, durchgeführt. Die angewendete Prozedur wurde bereits ausführlich in einer vorherigen Publikation beschrieben (104).

### 2.5.6 Massenspektrometrie

Zur Analyse des Lipidoms der Versuchstiere kam das Verfahren der Massenspektrometrie zum Einsatz. Hierfür wird eine Serumprobe zuerst mittels Flüssigchromatographie aufgetrennt und die Lipide im nachgeschalteten Massenspektrometer fragmentiert und detektiert. Das im folgenden Abschnitt beschriebene Protokoll wurde von MSc. Julica Folberth im Labor des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck angewendet.

Zuerst erfolgte zu 50 µl Serum die Zugabe von 1.000 µl einer Mischung aus Methanol, Methyl-tert-butylether und Chloroform (Verhältnis 1,33:1:1), die zusätzlich 100 µg/l Butylhydroxytoluol sowie 2,5 µl SPLASH Internal Standard Mix enthielt. Die Probe wurde für 30 Sekunden auf einem Rüttler durchmischt, bei 25 °C und 950 rpm für 30 Minuten auf dem Schüttelinkubator inkubiert und erneut für 30 Sekunden durchmischt. Anschließend wurde die Probe für zehn Minuten bei 2.000 g zentrifugiert, der Überstand gesammelt, im Vakuumkonzentrator für ca. zwei Stunden getrocknet und in 50 µl Methanol und Isopropanol (Verhältnis 1:1) resuspendiert. Auf die erneute Zentrifugation bei 16.000 g für zehn Minuten folgte das Überführen in die LC Glasbehälter.

Nach Durchlauf der Flüssigchromatographie, während der die Moleküle aufgetrennt werden, gelangt die Probe ins Massenspektrometer. Hier befindet sich ein HESI-Ionisorator (Heated Electrospray Source), der die Probe erhitzt, sodass das Lösungsmittel verdampft. Gleichzeitig werden die zu untersuchenden Moleküle in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und im Analysator nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis aufgetrennt. Die simultane Messung einer definierten Lipidmenge (enthalten in dem SPLASH Internal Standard Mix) ermöglicht neben der Identifizierung auch die Quantifizierung der untersuchten Lipide. Zusätzlich wurden Proben zur Qualitätskontrolle mitgemessen.

Die Auswertung der Messung erfolgte unter Verwendung der Software TraceFinder™ 4.1. Dabei wurden für jedes Lipid dieselben Kriterien angewendet. So musste bei drei wiederholten Injektionen der gleichen Qualitätskontrolle, für mindestens drei verschiedene Konzentrationen, die Variation  $CV \% \leq 20 \%$  sein. Weiterhin musste die Linearität im gewählten Konzentrationsbereich mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 \geq 0,95$  gegeben sein und es durfte kein carry over (Verschleppung der Lipide in die nächste Messung) stattgefunden haben. In den gleichzeitig gemessenen Blanks (reines Lösungsmittel) und Extraction Blanks (extrahiertes Wasser) dürfen keine Lipide nachweisbar sein.

Unter diesen Voraussetzungen ist es möglich, die Lipide über das Masse-zu-Ladung-Verhältnis, Retentionszeit, Fragmente und Isotopenmuster eindeutig zu identifizieren, wobei die Peaks mit einem internen Standard (Deuterium markierte Lipide) normalisiert werden. Sofern es sich um die gleiche Lipidklasse handelt, werden diese dann auch gleich quantifiziert (105,106).

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die zur statistischen Auswertung verwendete Software waren Microsoft Excel 15.33 und GraphPad Prism 6.0. Bei allen dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Die Korrelation zweier Variablen wurde über Pearsons Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt. Das Signifikanzniveau für alle Tests wurde als  $p < 0,05$  festgelegt.

## Material und Methoden

---

Der Effekt des Virus-Knockdowns wurde mit einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen auf statistische Signifikanz hin überprüft. Dabei ist die virusvermittelte NUCB2-Unterdrückung als Intersubjektfaktor und die Zeit als Innersubjektfaktor anzusehen.

Stellte sich bei dieser Analyse für einen oder mehrere dieser drei Faktoren (Genotyp, Zeit und Interaktion von Zeit und Genotyp) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen oder ein Trend mit  $p < 0,09$  heraus, so erfolgte eine Post-hoc Überprüfung der einzelnen Messzeitpunkte nach Holm-Sidak. Die relevanten Zeitpunkte sind dabei in den Graphen als signifikant (\* für  $p < 0,05$ ), hoch signifikant (\*\* für  $p < 0,01$ ) und höchst signifikant (\*\*\*) für  $p < 0,001$ ) markiert. Hinsichtlich der Analyse des Lipidoms erfolgte die Korrektur für multiples Testen mittels der Benjamini-Hochberg-Prozedur unter Verwendung von MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (107,108).

### 2.6.1 Fallzahlen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die AAV-Injektion in den PVN an insgesamt zwölf Versuchstieren durchgeführt. Bei sechs Tieren wurde der NUCB2-Knockdown durchgeführt, während 6 Tiere der Kontrollgruppe zugeordnet wurden. Hinsichtlich der Messungen der Blutglukosekonzentration (Kap. 3.3), der direkten Kalorimetrie (Kap. 3.4), der Ruhe-Infrarot-Thermographie (Kap. 3.5), des Körpergewichts (Kap. 3.6), des Lipidoms (Kap. 3.8), der Stress-Infrarot-Thermographie (Kap. 3.9), des Nebennierengewichts (Kap. 3.10, 3.11) sowie der Corticosteronkonzentration (Kap. 3.12) und der mRNA im PVN (Kap. 3.13) beträgt die Fallzahl daher  $n = 6$  pro Gruppe. Lediglich in Kapitel 3.4.1 Woche sechs und Kapitel 3.13 musste jeweils ein Versuchstier der NUCB2-Knockdowngruppe aus technischen Gründen ausgeschlossen werden. Die Messung der Körperzusammensetzung (Kap. 3.7) konnte aufgrund des eingeschränkten Zugangs zum Minispec aus Kapazitätsgründen nur an insgesamt acht Versuchstieren durchgeführt werden, weshalb die Fallzahl hierbei  $n = 4$  pro Gruppe beträgt. Weiterhin wurden jeweils zwei Versuchstiere derselben Gruppe in einem Käfig gehalten, weshalb keine Differenzierung zwischen beiden Tieren möglich war, sodass Nahrungsaufnahme (Kap. 3.1) und Wasseraufnahme (Kap. 3.2) jeweils pro Käfig (Fallzahl  $n = 3$  pro Gruppe) ausgewertet wurden.

### 3 Ergebnisse

Um die physiologischen Funktionen von endogenem NUCB2/Nesfatin-1 im PVN auf die Energiehomöostase zu untersuchen, wurde im Rahmen einer tierexperimentellen Studie bei männlichen Wistar Ratten eine AAV-vermittelte Suppression von paraventriculärem NUCB2 durchgeführt. Anschließend wurden die Versuchstiere im Hinblick auf Körpergewicht und -zusammensetzung, Lipidom, Wasser- und Futteraufnahme, Wärmeabgabe, Thermogenese und Stressreaktion phänotypisch charakterisiert. Abschließend erfolgte auf molekularer Ebene die Untersuchung der mRNA Expression im PVN.

Für alle in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen gilt, dass die Kontrollgruppe in dunkelgrau und die NUCB2-Knockdowngruppe in hellblau abgebildet ist. Einzig bei den Abbildungen 23 B, 24 B, 25 B und 47 wurde auf diese Unterscheidung verzichtet, da hier beide Gruppen zusammengefasst sind. Die Präsentation aller Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

#### 3.1 Nahrungsaufnahme

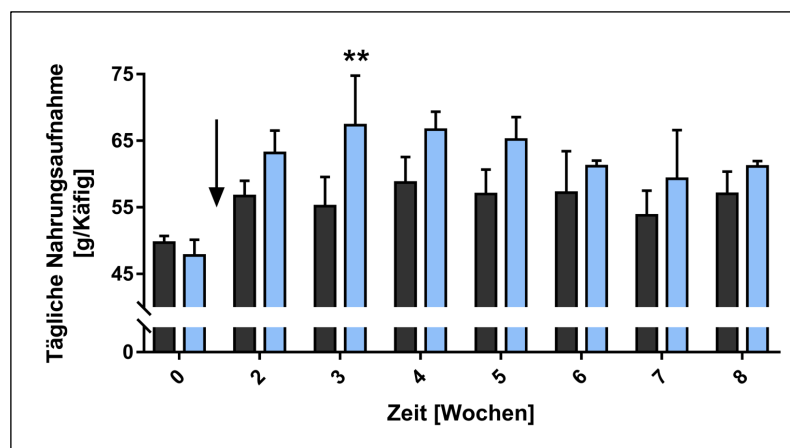


Abbildung 14: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Nahrungsaufnahme;  $n = 3$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion); modifiziert nach Stephan et al. (109)

Zu Beginn des Versuches bestand zwischen beiden Versuchsgruppen kein Unterschied bezüglich der Nahrungsaufnahme ( $F(1,4) = 2,27$ ; n.s.). Nach der Operation zeigte die statistische Analyse (ANOVA mit Messwiederholungen) einen signifikanten Unterschied für die Interaktion aus Zeit und Genotyp zwischen den Gruppen ( $F(7,28) = 3,91$ ;  $p = 0,0043$ ),

## Ergebnisse

wobei eine Post-Hoc Untersuchung den Unterschied in Woche drei als statistisch signifikant identifizierte.

### 3.1.1 Zeitliches Profil der Nahrungsaufnahme

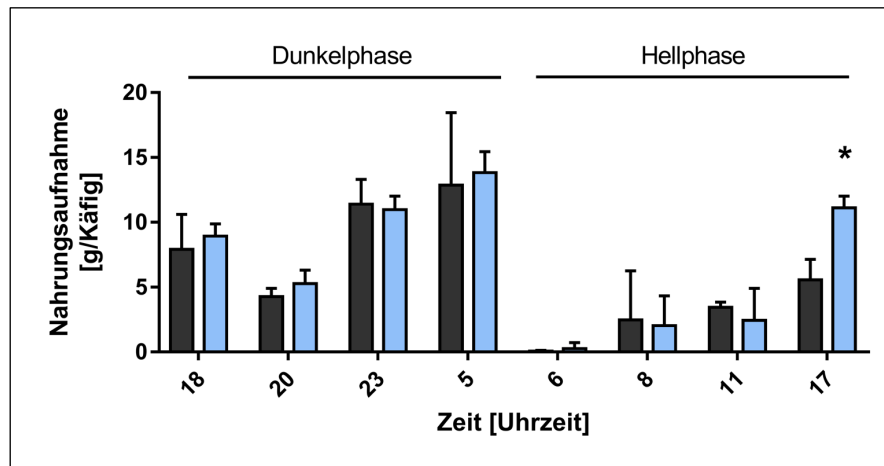


Abbildung 15: Effekt des NUCB2-Knockdown auf das zeitliche Profil der Nahrungsaufnahme;  $n = 3$  (in Woche sieben nach Virusinjektion)

In der Dunkelphase war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen ( $F(1,4) = 0,23$ ; n.s.), während sich in der Hellphase eine erhöhte Nahrungsaufnahme der Knockdowngruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte. In der ANOVA mit Messwiederholungen fand sich für die Hellphase hinsichtlich der Interaktion aus Genotyp und Zeit ein statistischer Trend, der nicht ganz Signifikanzniveau erreichte ( $F(3,12) = 3,48$ ;  $p = 0,0505$ ). Diese gesteigerte Nahrungsaufnahme ließ sich auf die 2. Hälfte der Hellphase, also zwischen Stunde 18 und 24 terminieren, in der die Knockdowntiere die doppelte Nahrungsmenge der Kontrolltiere zu sich nahmen. Der Post-Hoc Test zeigte für diesen Zeitpunkt einen hoch signifikanten Unterschied.

### 3.2 Wasseraufnahme

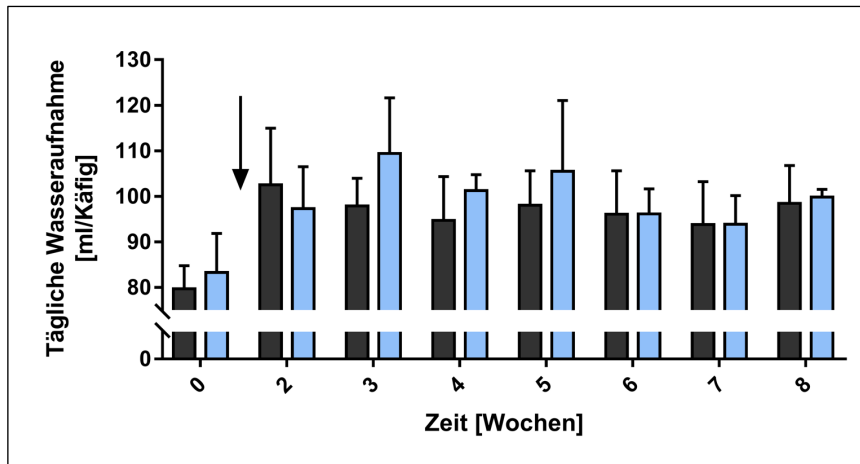


Abbildung 16: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Wasseraufnahme;  $n = 3$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion.)

Bei der Wasseraufnahme war weder vor der Virusinjektion ( $F(1,4) = 0,22$ ; n.s.) noch danach ( $F(1,4) = 0,48$ ; n.s.) ein Unterschied zwischen Knockdown- und Kontrolltieren zu beobachten (ANOVA mit Messwiederholungen).

### 3.3 Blutglukosekonzentration

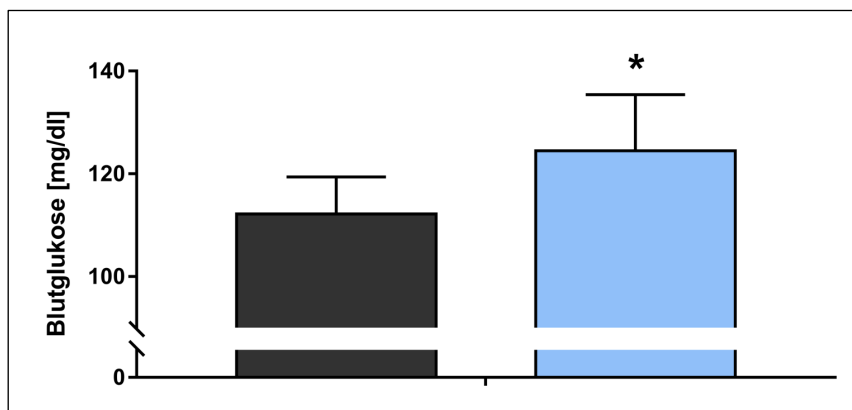


Abbildung 17: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Blutglukosekonzentration,  $n = 6$ ; übernommen aus Stephan et al. (109)

Zum Zeitpunkt der Tötung und Organentnahme erfolgte die gleichzeitige Messung der Blutglukosekonzentration. Dabei ließ sich ein ~11 % erhöhter Blutzuckerspiegel bei den NUCB2-Knockdowntieren im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen ( $124,5 \pm 10,9$  mg/dl vs.  $112,2 \pm 7,2$  mg/dl). Dieser Unterschied erwies sich im Student's T-Test als statistisch signifikant.

### 3.4 Direkte Kalorimetrie

Die nicht- evaporative Wärmeabgabe wurde mittels direkter Kalorimetrie quantifiziert. Für die Auswertung wurde die erste Stunde entfernt, da in dieser Zeit die Equilibrierung der Geräte stattfindet. Die Einbeziehung dieser Daten würde zu einer Verfälschung des Faktors Zeit in der Statistik führen und ebenso die durchschnittlichen Werte der Wärmeproduktion deutlich beeinflussen. Daher erfolgt lediglich Auswertung der Stunden zwei bis acht.

#### 3.4.1 Nicht- evaporative Wärmeabgabe

Woche zwei

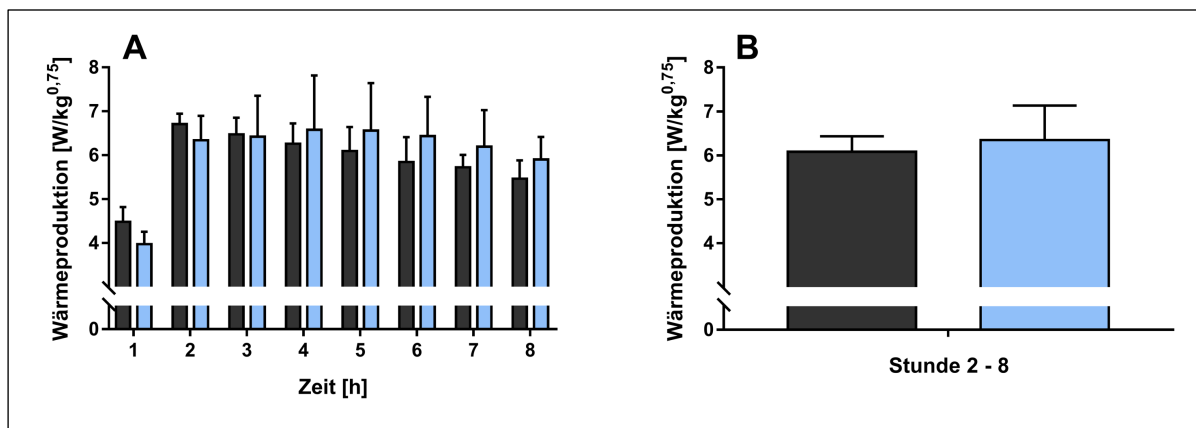


Abbildung 18: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die nicht- evaporative Wärmeabgabe in Woche zwei nach Virusinjektion; n = 6 (A: stündlich; B: durchschnittlich von Stunde zwei bis acht)

Zwei Wochen nach der Virusinjektion ließ sich kein statistisch signifikanter Effekt (ANOVA mit Messwiederholungen) des Genotyps auf die stündliche Wärmeabgabe feststellen ( $F(1,10) = 0,56$ ; n.s.), wie Abbildung 18 A verdeutlicht. Lediglich der Einflussfaktor Zeit war statistisch gesehen signifikant ( $F(6,60) = 7,96$ ;  $p < 0,0001$ ). Die durchschnittliche Wärmeabgabe von Stunde zwei bis acht, in Abbildung 18 B dargestellt, zeigte auch keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (Student's T-Test).

## Woche vier

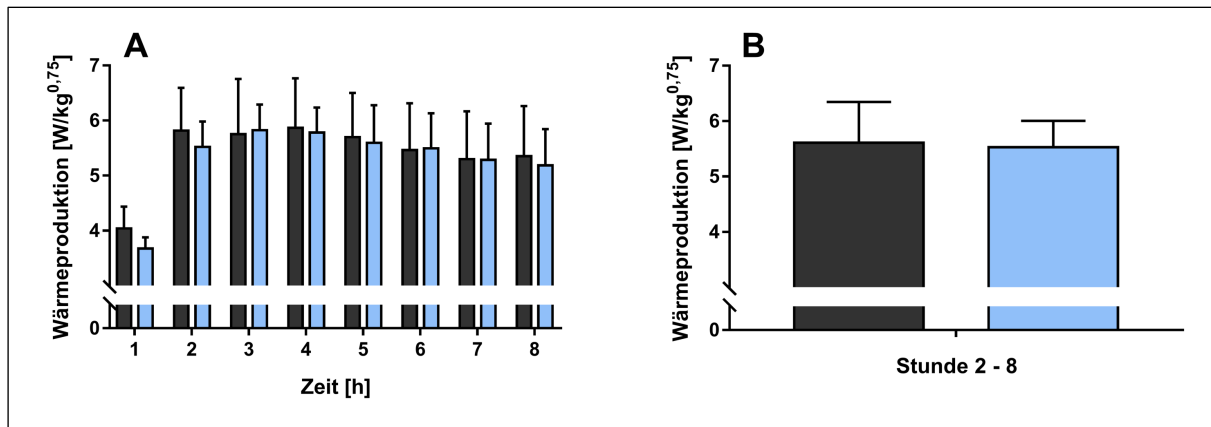


Abbildung 19: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe in Woche vier nach Virusinjektion; n = 6 (A: stündlich; B: durchschnittlich von Stunde zwei bis acht)

Auch in der vierten Woche nach Virusinjektion war kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar. So lieferte die ANOVA mit wiederholten Messungen (Abbildung 19 A) ein nicht signifikantes Ergebnis ( $F(1,10) = 0,05$ ; n.s.). Gleichzeitig zeigte auch die Analyse der durchschnittlichen Wärmeabgaben von Stunde zwei bis acht (Abbildung 19 B), dass die Wärmeabgabe beider Versuchsgruppen annähernd gleich ist (Student's T-Test).

## Woche sechs

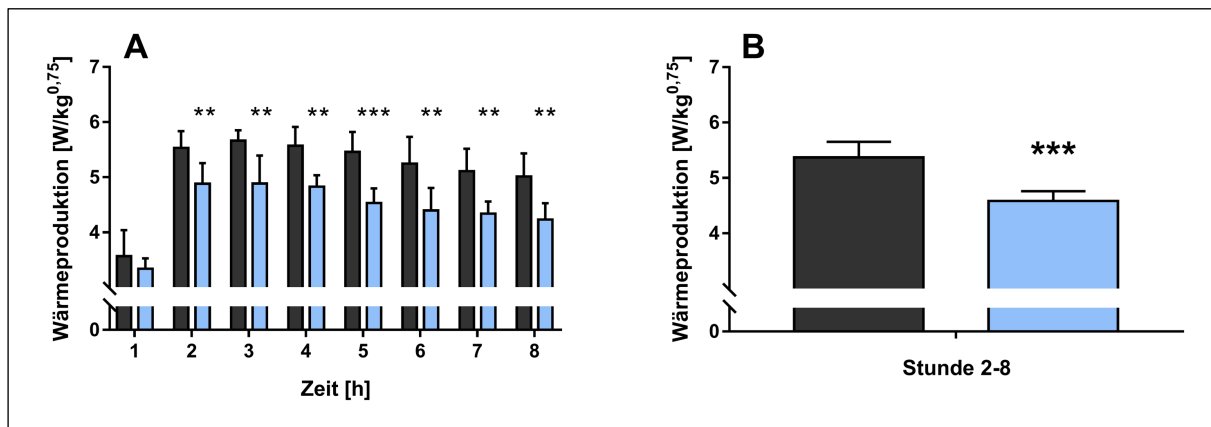


Abbildung 20: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe in Woche sechs nach Virusinjektion; n = 6; 5 (A: stündlich; B: durchschnittlich von Stunde zwei bis acht); übernommen aus Stephan et al. (109)

Nach sechs Wochen ließ sich in der direkten Kalorimetrie eine signifikante Reduktion (ANOVA mit Messwiederholungen) der nicht-evaporativen Wärmeabgabe in den NUCB2-Knockdowntieren gegenüber den Kontrolltieren erkennen ( $F(1,9) = 28,4$ ;  $p = 0,0005$ ). Zur Analyse einzelner Zeitpunkte wurde der Holm-Sidak Post-Hoc Vergleich angewendet. Da es

## Ergebnisse

sich beim Knockdown nicht um einen akuten sondern um einen chronischen Effekt handelt, wurde die durchschnittliche Wärmeabgabe von Stunde zwei bis acht im Kalorimeter berechnet. Zu erkennen war eine statistisch höchst signifikante Reduktion um ~15 % ( $4,58 \pm 0,18 \text{ W/kg}^{0,75}$  vs.  $5,37 \pm 0,28 \text{ W/kg}^{0,75}$ ,  $p < 0,001$ ; Student's T-Test) verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 21 B).

### Woche acht

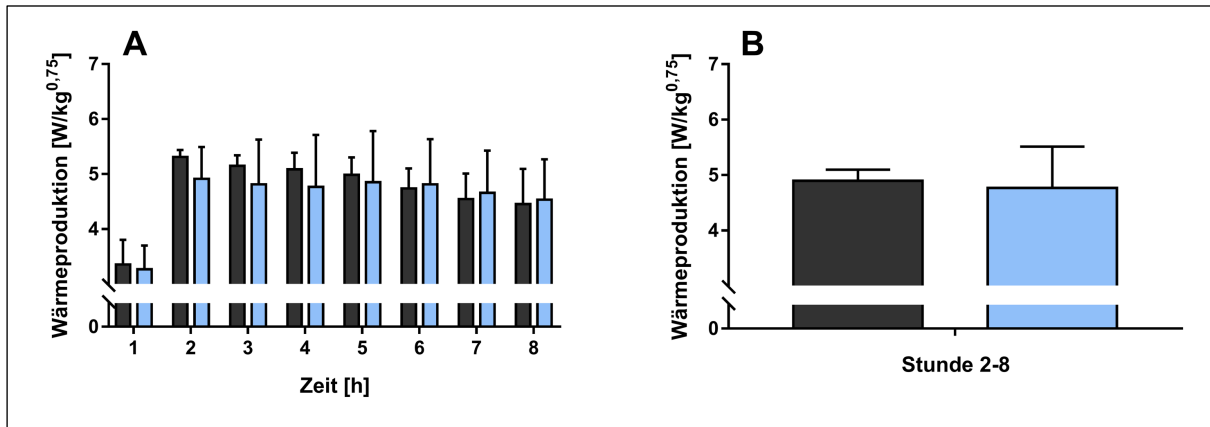


Abbildung 21: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe in Woche acht nach Virusinjektion;  $n = 6$  (A: stündlich; B: durchschnittlich von Stunde zwei bis acht)

In der achten Woche ließ sich kein Unterschied (ANOVA mit Messwiederholungen) hinsichtlich der nicht-evaporativen Wärmeabgabe im Kalorimeter mehr feststellen ( $F(1,10) = 0,18$ ; n.s.). Auch die Analyse der durchschnittlichen Wärmeabgabe von Stunde zwei bis acht (Student's T-Test) zeigte, dass diese bei beiden Gruppen ungefähr gleich ist ( $4,90 \pm 0,18 \text{ W/kg}^{0,75}$  vs.  $4,76 \pm 0,74 \text{ W/kg}^{0,75}$ ,  $p = 0,68$ ; n.s.).

### 3.4.2 Korrelation von nicht-evaporativer Wärmeabgabe und Körpergewichtsverlust

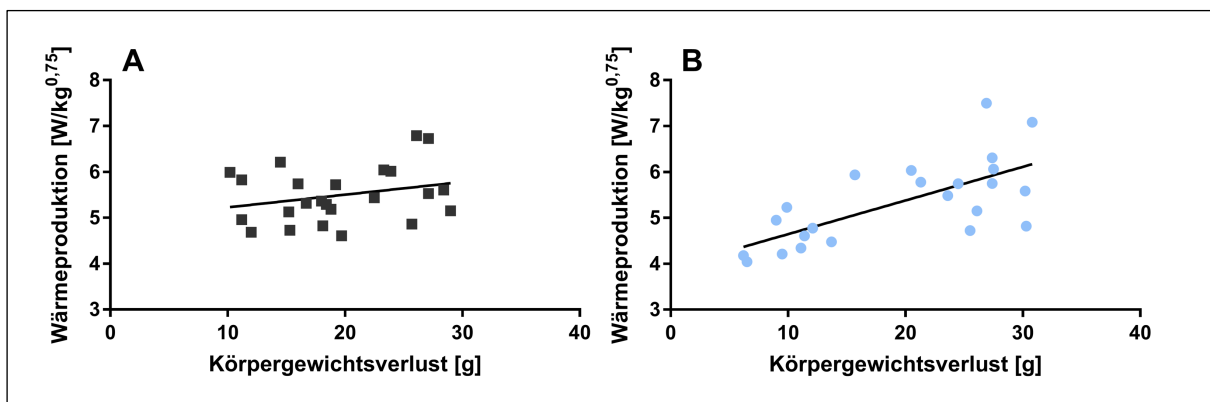


Abbildung 22: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Korrelation der nicht-evaporativen Wärmeabgabe mit dem Körpergewichtsverlust im Kalorimeter (A: Kontrollgruppe,  $n = 24$ ; B: NUCB2-Knockdowngruppe,  $n = 23$ )

Korreliert man die durchschnittliche, nicht-evaporative Wärmeabgabe von Stunde zwei bis acht mit dem Körpergewichtsverlust der Versuchstiere während der Zeit im Kalorimeter unter Verwendung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson, so zeigte sich für die Kontrollgruppe eine nur schwach positive, nicht signifikante ( $r = 0,2667$ ;  $p = 0,21$ ; n.s.) Korrelation. Gleichzeitig wies die NUCB2-Knockdowngruppe eine stark positive, höchst signifikante ( $r = 0,6881$ ;  $p = 0,0003$ ) Korrelation beider Variablen auf. Die Gruppengröße beträgt  $n = 24$  für die Kontrolltiere und  $n = 23$  für die Knockdowntiere. Es wurden alle Messungen im Kalorimeter mit einbezogen, sodass jedes Versuchstier mit Werten von vier verschiedenen Zeitpunkten (ein Tier der Knockdowngruppe nur an drei Zeitpunkten) vertreten ist.

### 3.5 Ruhe-Infrarot-Thermographie

Zur Ermittlung der Thermogenese des braunen Fettgewebes wurde die Temperatur der Interskapularregion unter der Verwendung von Infrarot-Thermographie erfasst. Gleichzeitig diente die Ermittlung der Gehörgangstemperatur als Maß für die Körperkerntemperatur während die Temperatur des Schwanzes Auskunft über die Vasokontraktivität gab.

#### 3.5.1 Temperatur von iBAT, Gehörgang und Schwanz

##### iBAT

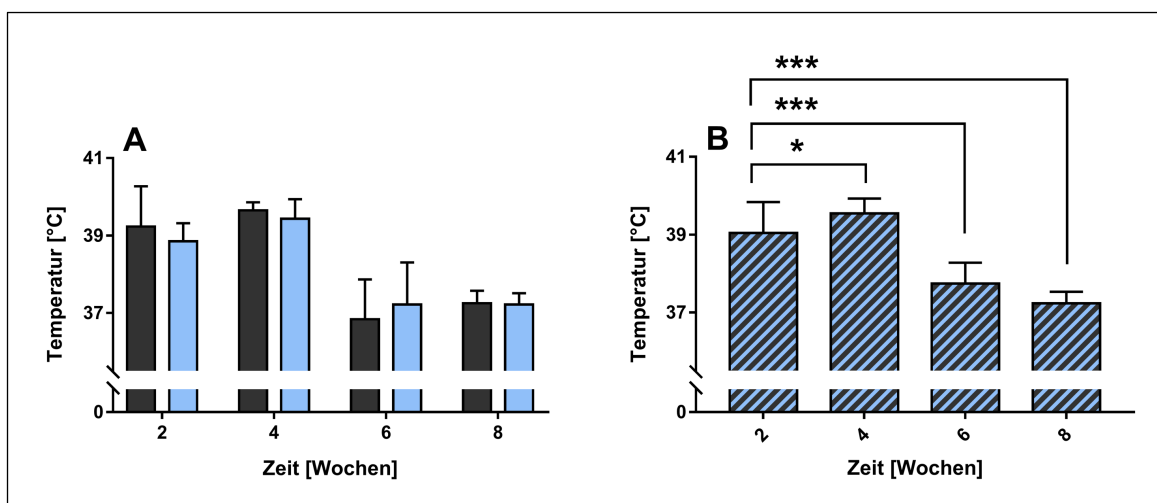


Abbildung 23: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die iBAT-Temperatur nach Virusinjektion (A: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe getrennt,  $n = 6$ ; B: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe gemeinsam,  $n = 12$ ); modifiziert nach Stephan et al. (109)

## Ergebnisse

Bei der unter Verwendung einer Infrarotkamera ermittelten Temperatur des iBAT bestand kein Unterschied (ANOVA mit Messwiederholungen) zwischen der NUCB2-Knockdown Gruppe und den Kontrolltieren (Abbildung 23 A;  $F(1,10) = 0,08$ ; n.s.). Allerdings erwies sich der Faktor Zeit als statistisch signifikant ( $F(3,30) = 40,61$ ;  $p < 0,0001$ ). Kombiniert man beide Gruppen (Abbildung 23 B), so ist eine statistisch höchst signifikante Reduktion der Temperatur des braunen Fettgewebes um  $\sim 5\%$  ( $39,0 \pm 0,79\text{ °C}$  vs.  $37,2 \pm 0,29\text{ °C}$ ) nach acht Wochen erkennbar (Dunnett's Test).

## Gehörgang

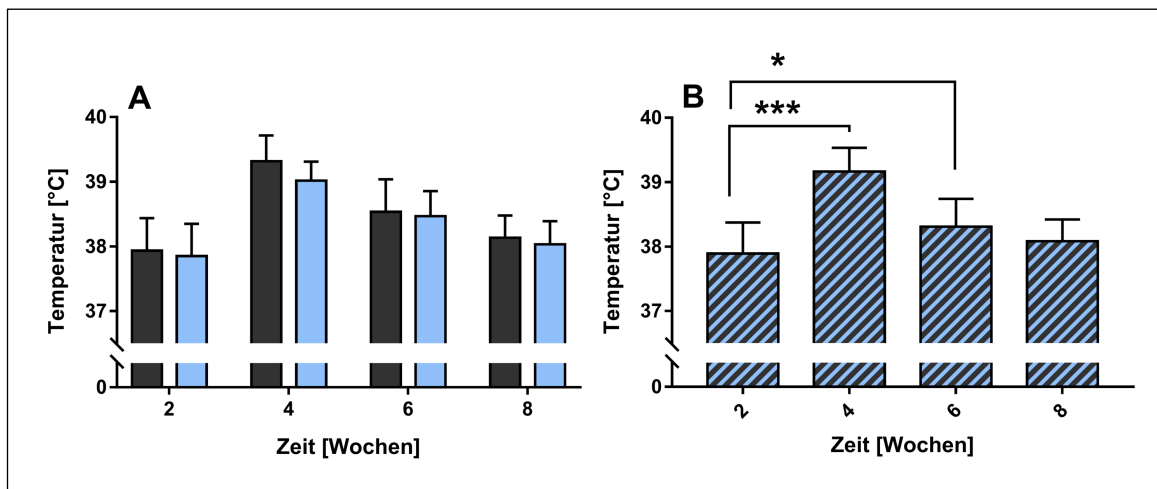


Abbildung 24: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Gehörgangstemperatur nach Virusinjektion (A: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe getrennt,  $n = 6$ ; B: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe gemeinsam,  $n = 12$ ); modifiziert nach Stephan et al. (109)

Hinsichtlich der Gehörgangstemperatur zeigte die ANOVA mit wiederholten Messungen, dass kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bestand (Abbildung 24 A;  $F(1,10) = 1,84$ ; n.s.). Jedoch stellte auch hier die Zeit einen signifikanten Einflussfaktor dar ( $F(3,30) = 19,89$ ;  $p < 0,0001$ ). AnAbbildung 24 B lässt sich erkennen, dass die Temperatur des Gehörgangs aller Versuchstiere von Woche zwei bis vier signifikant um  $\sim 3\%$  ( $37,9 \pm 0,48\text{ °C}$  vs.  $39,2 \pm 0,37\text{ °C}$ ) anstieg (Dunnett's Test). Im Anschluss nahm diese wieder ab und erreichte in der achten Woche fast das Ausgangsniveau ( $37,9 \pm 0,48\text{ °C}$  vs.  $38,1 \pm 0,34\text{ °C}$ ).

## Schwanz

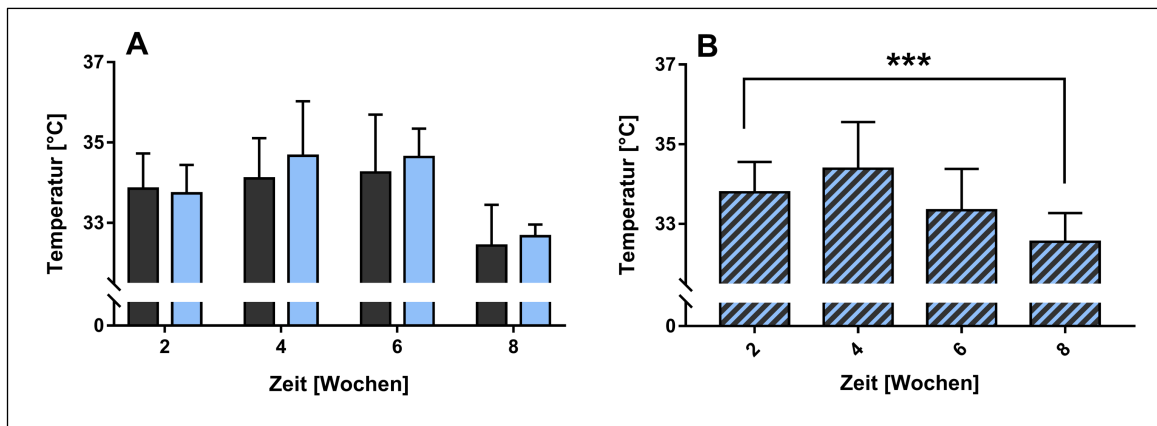


Abbildung 25: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Schwanztemperatur nach Virusinjektion (A: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe getrennt,  $n = 6$ ; B: Kontroll- und NUCB2-Knockdowngruppe gemeinsam,  $n = 12$ ); modifiziert nach Stephan et al. (109)

Bei der Messung der Temperatur des Schwanzes ergab sich erneut kein Unterschied (ANOVA mit Messwiederholungen) zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 25 A;  $F(1,10) = 0,37$ ; n.s.). Die Zeit war auch hier ein signifikanter Einflussfaktor ( $F(3,30) = 17,01$ ;  $p = 0,0002$ ). Es zeigte sich bei allen Versuchstieren (Abbildung 25 B) eine hoch signifikante Reduktion der Schwanztemperatur um  $\sim 4\%$  ( $33,8 \pm 0,76$  °C vs.  $32,6 \pm 0,72$  °C) in Woche acht verglichen mit dem Ausgangswert (Dunnett's Test).

### 3.5.2 Korrelationen der Temperaturen der drei Körperregionen

#### Korrelation von iBAT und Gehörgangstemperatur

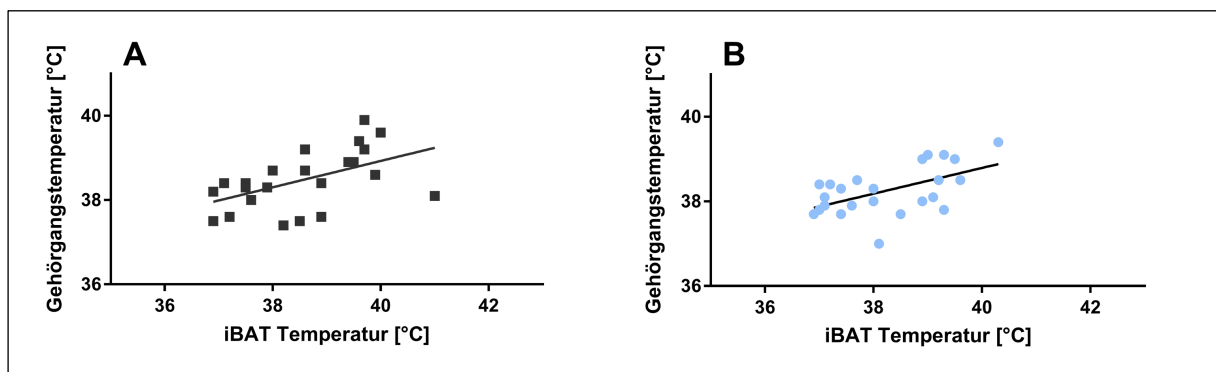


Abbildung 26: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Korrelation von iBAT- und Gehörgangstemperatur (A: Kontrollgruppe,  $n = 24$ ; B: NUCB2-Knockdowngruppe,  $n = 24$ )

Für beide Versuchsgruppen zeigten sich hoch signifikante, positive Korrelationen der mittels Infrarot-Thermographie ermittelten Temperaturen von iBAT und Gehörgang, unter

## Ergebnisse

Verwendung von Pearson's Korrelationskoeffizienten. Dabei ist die Größe der Korrelationen für beide Gruppen fast identisch (Kontrolle:  $r = 0,5205$ ;  $p = 0,009$ ; NUCB2-Knockdown:  $r = 0,5463$ ;  $p = 0,006$ ). Verwendet wurden alle Daten aus allen Messungen, so dass für jedes Tier insgesamt vier Werte in die Berechnung mit einbezogen wurden.

### Korrelation von iBAT und Schwanztemperatur

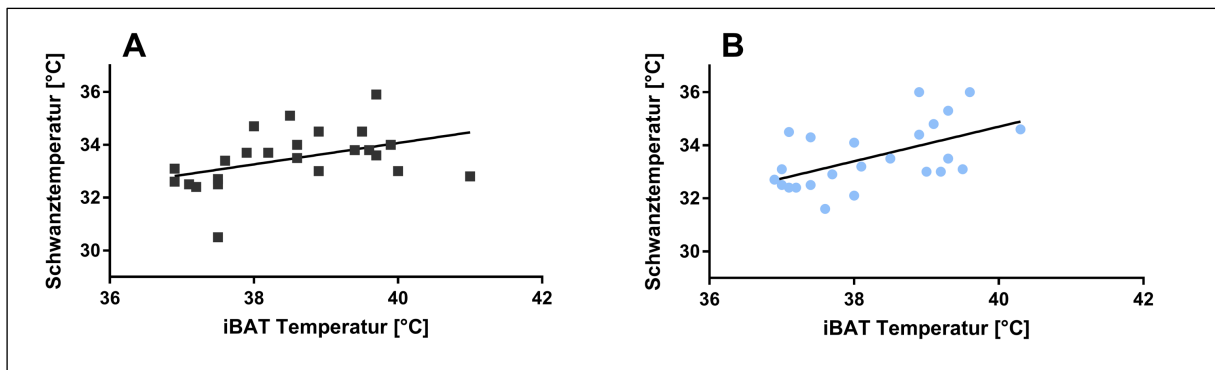


Abbildung 27: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Korrelation von iBAT- und Schwanztemperatur (A: Kontrollgruppe,  $n = 24$ ; B: NUCB2-Knockdowngruppe,  $n = 24$ )

Korreliert man die Temperatur vom iBAT mit der des Schwanzes, so ergab sich eine hoch signifikante, positive Korrelation beider Variablen für die zwei Versuchsgruppen. In der Knockdowngruppe zeigte sich eine größere positive Korrelation ( $r = 0,5519$ ;  $p = 0,005$ ) als in der Kontrollgruppe ( $r = 0,4224$ ;  $p = 0,040$ ). Die Berechnung erfolgte erneut mit Pearson's Korrelationskoeffizienten unter Einbeziehung aller Messergebnisse jedes Versuchstieres.

### Korrelation von Gehörgangs- und Schwanztemperatur

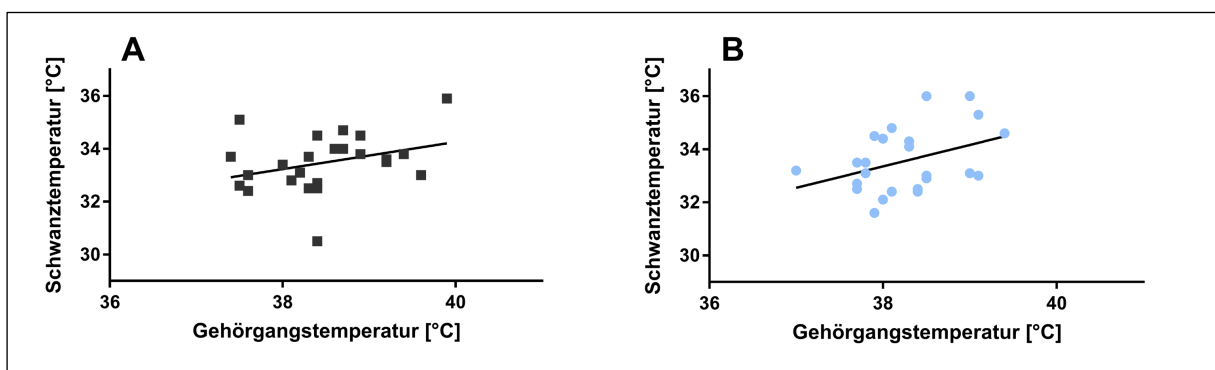


Abbildung 28: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Korrelation von Gehörgangs- und Schwanztemperatur (A: Kontrollgruppe,  $n = 24$ ; B: NUCB2-Knockdowngruppe,  $n = 24$ )

Analysiert man den Zusammenhang zwischen Gehörgangstemperatur und Schwanztemperatur mithilfe von Pearson's Korrelationskoeffizienten und verwendet alle

vier Messungen, so zeigten sich nur schwache, positive Korrelationen in beiden Gruppen (Kontrolle:  $r = 0,323$ ; NUCB2-Knockdown:  $r = 0,3815$ ), welche jedoch als nicht signifikant angezeigt wurden (Kontrolle:  $p = 0,124$ ; NUCB2-Knockdown:  $p = 0,066$ ).

### 3.6 Körpergewicht

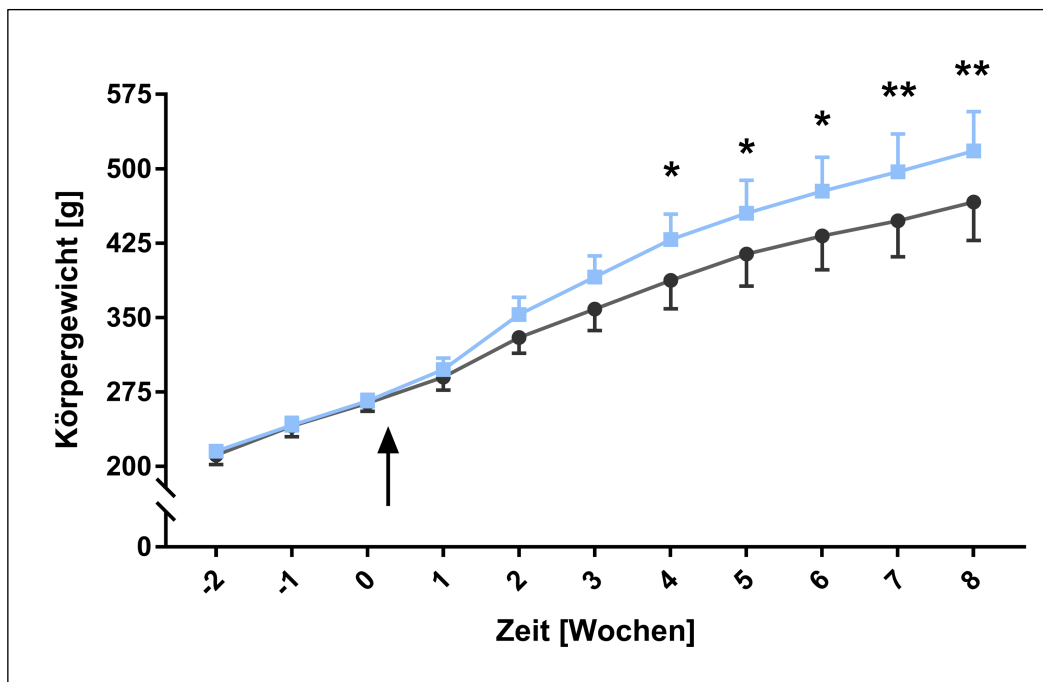


Abbildung 29: Effekt des NUCB2-Knockdown auf das Körpergewicht,  $n = 6$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion); modifiziert nach Stephan et al. (109)

Vor der Operation bestand zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Körpergewichts kein Unterschied ( $F(1,10) = 0,09$ ; n.s.). Das mittlere Körpergewicht beider Versuchsgruppen über die Dauer des gesamten Versuchs ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Analyse mit einer univariaten ANOVA mit Messwiederholungen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $F(1,10) = 5,68$ ;  $p = 0,0384$ ), wobei die Knockdowngruppe von der zweiten bis zur achten Woche  $\sim 10\%$  schwerer war. Die mittels Holm-Sidak Post-Hoc Vergleich als statistisch signifikant erkannten Zeitpunkte sind im Graphen gekennzeichnet.

### 3.7 Körperzusammensetzung

Unter Verwendung der TD-NMR Technologie erfolgte eine Quantifizierung der Körperzusammensetzung der Versuchstiere. Für die Auswertung wurden die absoluten Massen der verschiedenen Gewebe in Bezug auf das Körpergewicht normalisiert.

## Ergebnisse

Anschließend wurden die Ausgangswerte vor der Virusinjektion für beide Gruppen jeweils als 100% festgelegt und die folgenden Messwerte hierzu in Bezug gesetzt.

### Muskelmasse

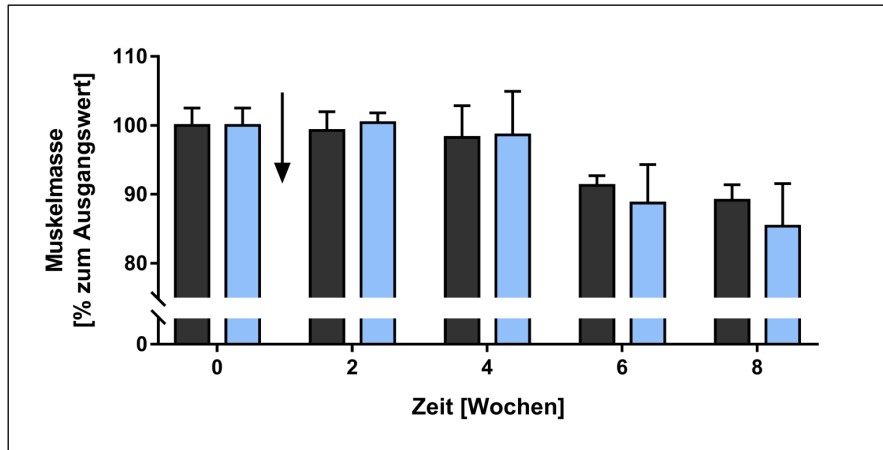


Abbildung 30: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Muskelmasse,  $n = 4$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion.); übernommen aus Stephan et al. (109)

Hinsichtlich der Muskelmasse zeigten beide Gruppen eine Abnahme über den Zeitraum von acht Wochen. Dabei ließ sich allerdings kein Unterschied (ANOVA mit Messwiederholungen) zwischen den beiden Gruppen feststellen ( $F(1,6) = 0,23$ ; n.s.).

### Freie Flüssigkeit

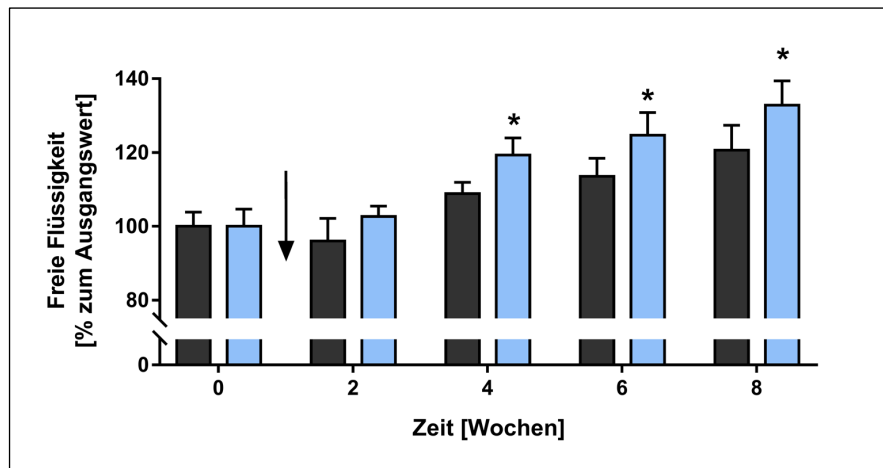


Abbildung 31: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Freie Flüssigkeit,  $n = 4$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion.); übernommen aus Stephan et al. (109)

Die Knockdowntiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren einen stärkeren Anstieg der freien Flüssigkeit. Dies ist in Abbildung 31 gezeigt, wobei die relative Masse an freier Flüssigkeit bezogen auf den Ausgangswert vor der Operation dargestellt wird. Hierbei

handelte es sich um einen in der univariaten ANOVA mit Messwiederholungen als statistisch signifikant angezeigten Unterschied ( $F(1,6) = 26,11$ ;  $p = 0,0022$ ), wobei die einzelnen Zeitpunkte erneut mit dem Holm-Sidak Post Hoc Test überprüft wurden.

### Fettmasse

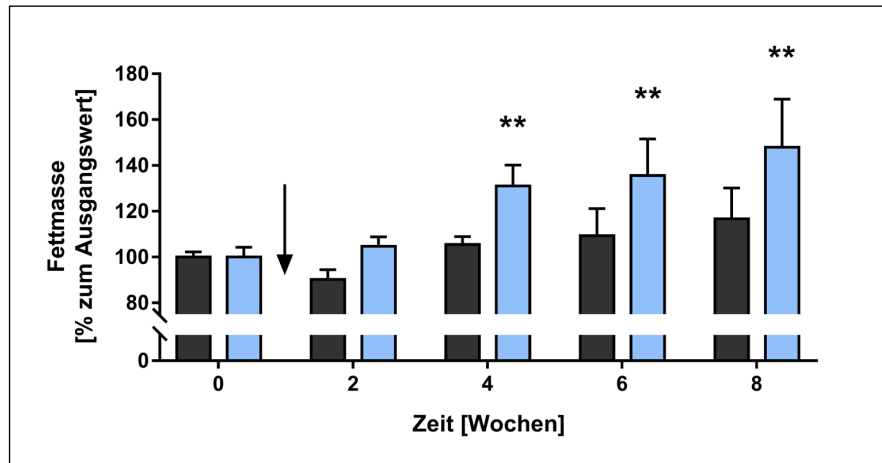


Abbildung 32: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Fettmasse,  $n = 4$  (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Virusinjektion.); übernommen aus Stephan et al. (109)

Der vorliegende Graph in Abbildung 32 zeigt die relative Masse des Fettgewebes bezogen auf den Ausgangswert vor der Operation. Zu erkennen ist eine deutlich stärkere Zunahme des Fettgewebes in der Knockdowngruppe über die gesamte Dauer des Versuches, welche in einer fast 3-fach höheren Zunahme der Fettmasse in Woche acht verglichen zur Kontrollgruppe resultierte ( $\sim 48\%$  vs  $\sim 17\%$ ). Dabei handelte es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied, wie die univariate ANOVA mit Messwiederholungen zeigte ( $F(1,6) = 12,17$ ;  $p = 0,0130$ ). Die Überprüfung einzelner Zeitpunkte erfolgte mit dem Holm-Sidak Post-Hoc Vergleich.

## 3.8 Lipidom

### 3.8.1 Quantifizierung der verschiedenen Lipide

Die Quantifizierung der Serumlipide erfolgte zehn Wochen nach Virusinjektion mittels an Flüssigkeitschromatographie gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie. Die Auswertung der einzelnen aus dem Plasma der Versuchstiere quantifizierten Lipide erfolgte relativ zur Kontrollgruppe, welche immer als 100 % definiert wurde.

## Ergebnisse

Hierbei zeigten 13 der 99 analysierten Lipide in der NUCB2-Knockdowngruppe signifikant erhöhte Serumspiegel, wie in Kapitel 9.6 im Anhang dargestellt (Sphingomyelin (d32:1), Lysophosphatidylcholin (18:1), Lysophosphatidylethanolamin (18:1), Phosphatidylcholin (31:1, 32:2, 33:1, 35:1, 35:2, 37:1, 37:2) und Phosphatidylinositol (34:1, 36:1, 36:2)). Nach der Korrektur für multiples Testen erwies sich allerdings keines der untersuchten Lipide mehr als signifikant verändert.

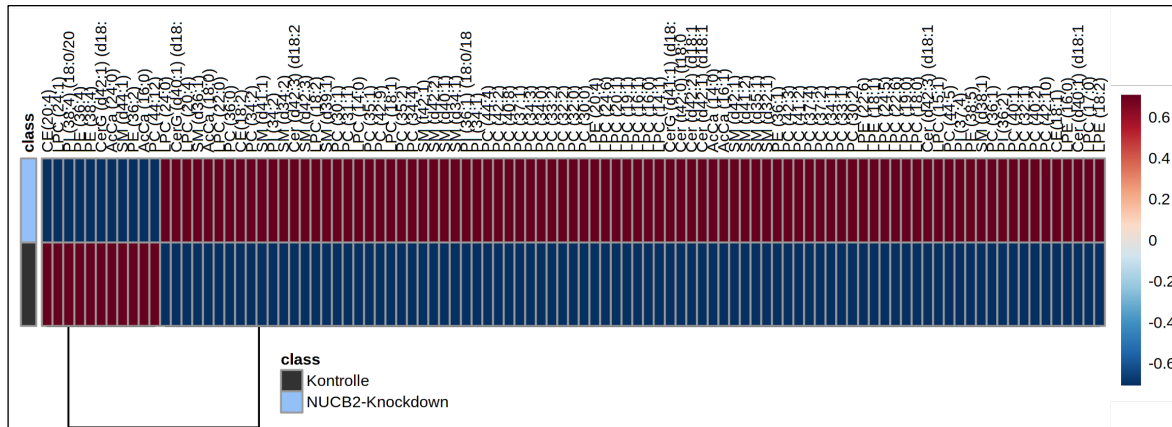


Abbildung 33: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Lipidkonzentrationen im Serum zehn Wochen nach Virusinjektion. Die Darstellung der Durchschnittswerte erfolgt als Heatmap für alle 99 analysierten Lipide,  $n = 6$

Obwohl keine einzelnen Lipide als signifikant erhöht identifiziert wurden, zeigt Abbildung 33 insgesamt dennoch eine eindeutige Tendenz zu einer generellen Erhöhung der Lipidkonzentration im Serum der NUCB2-Knockdowngruppe verglichen mit den Kontrolltieren.

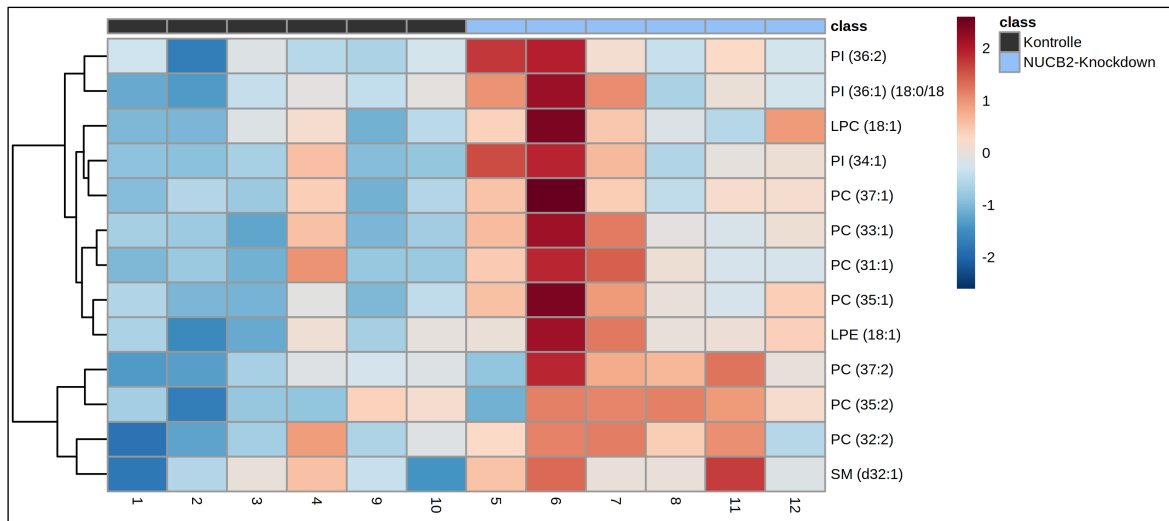


Abbildung 34: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Lipidkonzentrationen im Serum zehn Wochen nach Virusinjektion. Dargestellt sind alle Werte beider Gruppen als Heatmap für die 13 initial als signifikant verändert identifizierten Lipide,  $n = 6$ ; übernommen aus Stephan et al. (109)

Betrachtet man die Konzentrationen der 13 initial als signifikant erhöht identifizierten Lipide im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie in Abbildung 34 dargestellt, so zeigt sich eine deutlich (jedoch nicht signifikant) veränderte Lipiddistribution im Serum der NUCB2-Knockdowntiere.

### 3.8.2 Korrelationen der Lipide zum Phänotyp

Aufgrund eines möglichen Zusammenhangs zwischen Lipidom und Phänotyp wurden alle analysierten Lipide einzeln mit den drei Parametern Körpergewichtszunahme, Zunahme der Fettmasse und Blutglukosekonzentration unter der Verwendung von Pearson's Korrelationskoeffizienten auf Korrelationen untersucht.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Tabellen im Anhang in Kapitel 9.7 abgebildet. Während Tabelle 13 nur die Zusammenfassungen der als signifikant erkannten Korrelationen für die jeweilige Lipidklasse angibt, ist die Auflistung aller Lipide separat in Tabelle 14 dargestellt.

Bei den Ceramiden weist ein Anteil von 67 % der untersuchten Lipide eine signifikante Korrelation mit der Körpergewichtszunahme auf. Auch die Phosphatidylcholine (63 %) und die Lysophosphatidylethanolamine (60 %) zeigen eine hohe Anzahl signifikanter Korrelationen mit selbiger.

## Ergebnisse

Gleichzeitig zeigt sich für die Blutglukosekonzentration der größte Anteil an signifikanten Korrelationen in der Klasse der Lysophosphatidylethanolamine (60 %). Für die Phosphatidylinositole liegt dieser Anteil bei 50 % und für die Phosphatidylcholine bei 38 %.

Im Gegensatz dazu lässt sich für die Zunahme der Fettmasse eine vergleichsweise deutlich geringere Anzahl an signifikanten Korrelationen mit den verschiedenen Lipidklassen feststellen. So beträgt diese bei den Phosphatidylinositolen 33 %, den Phosphatidylcholinen 28 % und den Lysophosphatidylethanolaminen 20 %.

### 3.9 Stress-Infrarot-Thermographie

#### iBAT

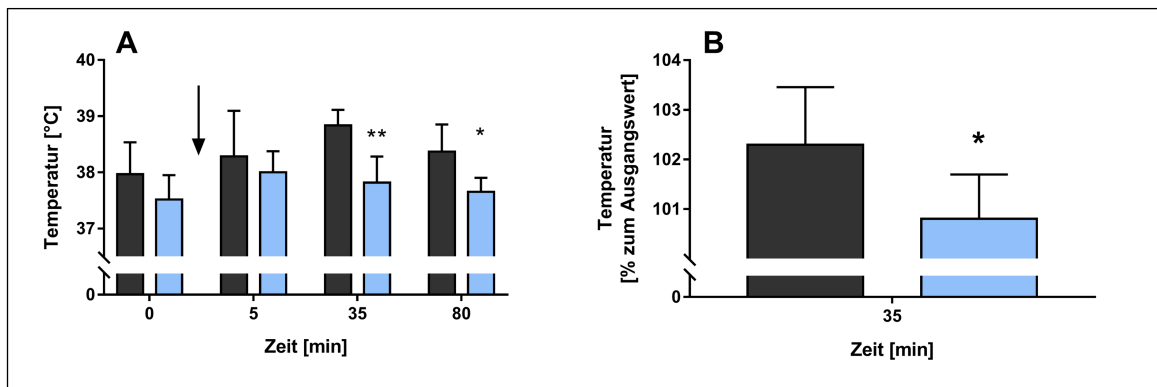


Abbildung 35: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die stressinduzierte Thermogenese des iBAT,  $n = 6$  (A: Temperatur absolut (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Stressapplikation.); B: Temperatur relativ zum Ausgangswert); übernommen aus Stephan et al. (109)

Nach Induktion der Thermogenese im braunen Fettgewebe durch Anwendung von Restraint Stress von Minute null bis fünf zeigte sich hinsichtlich der Temperatur des iBAT ein in der ANOVA mit Messwiederholungen als statistisch signifikant identifizierter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ( $F(1,10) = 12,18$ ;  $p = 0,0058$ ). So kam es bei den NUCB2-Knockdowntieren zu einem um ~35 % ( $0,9 \pm 0,43$  °C vs.  $0,3 \pm 0,33$  °C) verminderten Temperaturanstieg verglichen mit den Kontrolltieren (Abbildung 35 A). Weiterhin war bei den Knockdowntieren bereits bei der Ausgangsmessung vor Stressapplikation die Temperatur des iBAT geringer ( $38,0 \pm 0,57$  °C vs.  $37,5 \pm 0,43$  °C), jedoch nicht statistisch signifikant. Um diesen Unterschied auszugleichen, erfolgte zum Zeitpunkt von 30 Minuten nach Stressapplikation (bedeutendster Zeitpunkt aufgrund der Wirkungskurve von Cortisol) die Relativierung der Werte in Bezug zum Ausgangswert. Auch

hier zeigte sich ein verminderter Temperaturanstieg bei den Knockdowntieren (Abbildung 35 B), welcher statistische Signifikanz aufwies (Student's T-Test).

### Gehörgang

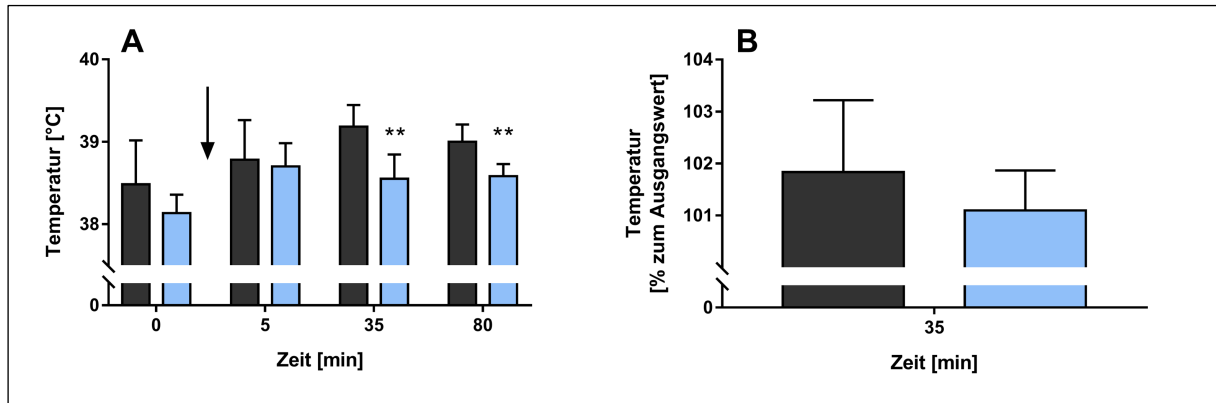


Abbildung 36: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Gehörgangstemperatur bei stressinduzierter Thermogenese,  $n = 6$  (A: Temperatur absolut (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Stressapplikation.); B: Temperatur relativ zum Ausgangswert)

Wie schon beim iBAT, war auch der Temperaturanstieg im Gehörgang nach der Applikation von Stress bei den NUCB2-Knockdowntieren im Vergleich zu den Kontrolltieren in der ANOVA mit Messwiederholungen signifikant reduziert (Abbildung 36 A;  $F(1,10) = 10,56$ ;  $p = 0,0087$ ). Nivelliert man den bei der Ausgangsmessung bestehenden, statistisch aber nicht signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen durch Bezug der Werte zum Zeitpunkt 35 Minuten auf den Ausgangswert, so zeigte sich im Student's T-Test, dass zwischen beiden Gruppen kein Unterschied hinsichtlich der relativen Temperaturerhöhung bestand (Abbildung 36 B).

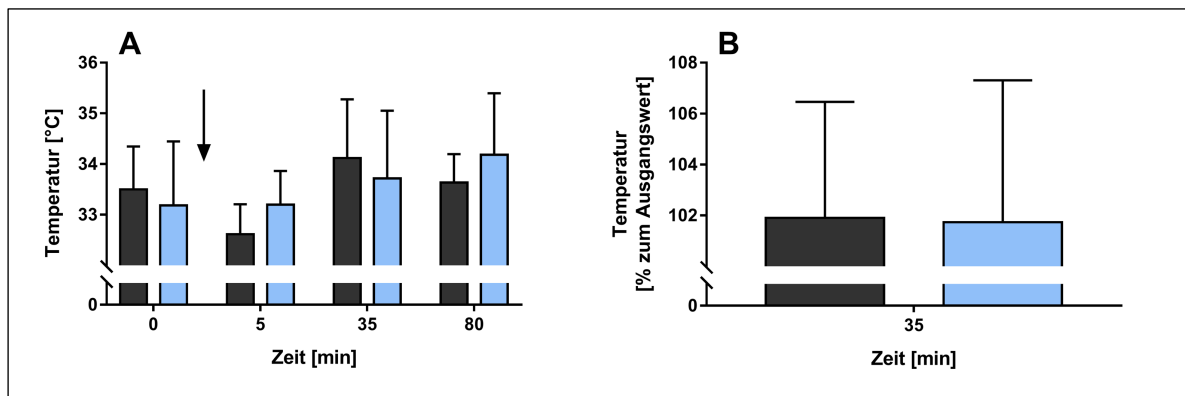


Abbildung 37: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Schwanztemperatur bei stressinduzierter Thermogenese,  $n = 6$  (A: Temperatur absolut (Der Pfeil symbolisiert den Zeitpunkt der Stressapplikation.); B: Temperatur relativ zum Ausgangswert)

Bezüglich der Schwanztemperatur bestand kein Unterschied (ANOVA mit Messwiederholungen) zwischen den Knockdown- und den Kontrolltieren ( $F(1,10) = 0,08$ ; n.s.).

### 3.10 Gewicht der Nebenniere bei der Tötung

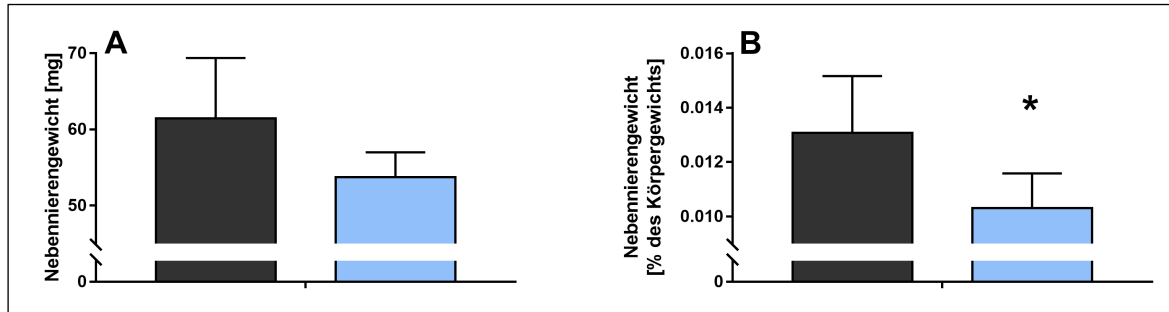


Abbildung 38: Effekt des NUCB2-Knockdown auf das Nebennierengewicht,  $n = 6$  (A: in g; B: in % des Körpergewichts)

Die Nebennieren der Tiere der Knockdowngruppe waren kleiner als die der Kontrollgruppe. So wiesen diese bei den Tieren, welche das Virus zum NUCB2-Knockdown erhielten, ein um ~13 % reduziertes Gewicht gegenüber den Tieren auf, die den Kontrollvirus injiziert bekamen (Abbildung 38 A:  $53,7 \pm 3,3$  mg vs.  $61,4 \pm 7,9$  mg). Im Student's T-Test erwies sich dieser Unterschied als statistischer Trend ( $p = 0,052$ ). Nach Normalisierung der Werte in Bezug auf das Körpergewicht, wie in Abbildung 38 B dargestellt, zeigten die NUCB2-Knockdowntiere ein signifikant reduziertes Nebennierengewicht.

### 3.11 Korrelation von Nebennierengewicht und Stressreaktion

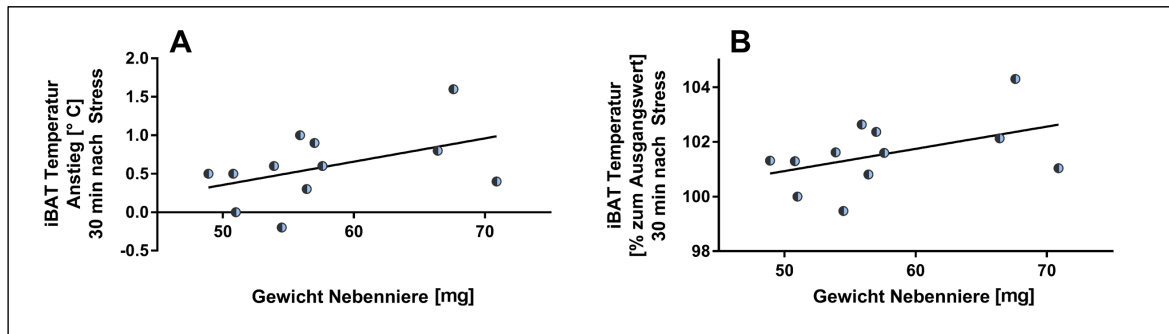


Abbildung 39: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Korrelation von Nebennierengewicht und Stressantwort für alle Versuchstiere, n=12 (A: iBAT Temperatur absolut; B: iBAT Temperatur relativ zum Ausgangswert)

Es konnte, unter Berücksichtigung aller Messdaten, mithilfe von Pearson's Korrelationskoeffizienten, eine schwache, positive Korrelation zwischen dem Gewicht der Nebennieren und dem Temperaturanstieg im iBAT 30 Minuten nach Stressapplikation nachgewiesen werden. Der relative Temperaturanstieg (Abbildung 39 B) zeigte hierbei eine stärkere Korrelation ( $r = 0,4561$ ) als der absolute Temperaturanstieg (Abbildung 39 A;  $r = 0,3334$ ), jedoch besaß keine dieser beiden Korrelationen statistische Signifikanz.

### 3.12 Corticosteronkonzentration im Blutplasma

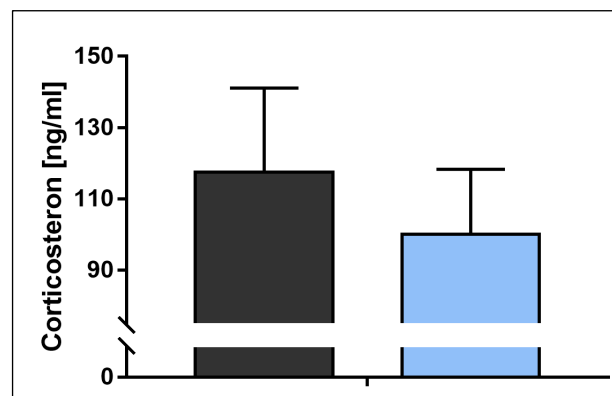


Abbildung 40: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die Konzentration von Corticosteron im Plasma, n = 4; 6

Die Messung der Corticosteronkonzentration im Plasma der Versuchstiere erfolgte aus Dekapitationsblut in der zehnten Woche nach Virusinjektion. Hierbei zeigte sich im Student's T-Test kein Unterschied zwischen den Versuchstieren.

### 3.13 mRNA

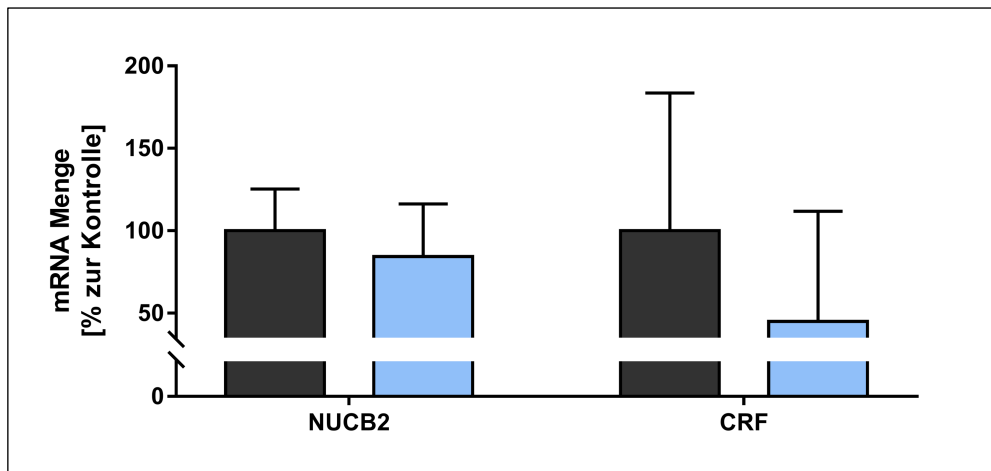


Abbildung 41: Effekt des NUCB2-Knockdown auf die mRNA-Expression im PVN, n = 6; 5

Hinsichtlich der mRNA Expression von *Nucb2* und *Crf* im PVN ließ sich mithilfe des Student's T-Test kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen feststellen.

## 4 Diskussion

Im Jahr 2006 wurde Nesfatin-1 von der Arbeitsgruppe um Oh-I wiederentdeckt (37). Es handelt sich bei Nesfatin-1 um ein Peptid mit pleiotropen Funktionen, welches aus dem Vorläuferpeptid NUCB2 gebildet und sowohl in der Peripherie (Mukosa des Magens, weißes Fettgewebe (41), Pankreas (42) und Hoden (43)), als auch im zentralen Nervensystem (110) exprimiert wird. Die Expression lässt sich in verschiedenen Gebieten des Gehirns wie Hypothalamus und Hirnstamm (39), aber auch in einzelnen Kerngebieten nachweisen. Hierunter findet sich auch der PVN (110), ein wichtiges Regulationszentrum der Energiehomöostase (22,111).

Neben seiner anorexigenen Wirkung und dem daraus resultierenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme, welcher bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (37,50,70,112), nimmt Nesfatin-1 auch Einfluss auf den Energieumsatz und steigert nach zentralnervöser Applikation die nicht-evaporative Wärmeabgabe (70). Auch über die Energiehomöostase hinaus interagiert Nesfatin-1 mit anderen Systemen und ist so zum Beispiel an der Vermittlung der Stressantwort beteiligt (77). Doch nicht nur Nesfatin-1 ist von Bedeutung. So erfüllt schon das Vorläuferpeptid NUCB2 physiologische Funktionen im Rahmen der Calciumhomöostase (36,113).

Aufgrund der fehlenden Rezeptoridentifikation beschränken sich viele Studien auf die pharmakologische Applikation von Nesfatin-1, welche meistens in sehr hohen, nicht physiologischen Dosen stattfindet (15,37,70). Das Ausschalten von endogenem Nesfatin-1 durch Antikörper stellt eine Möglichkeit dar, seine Funktionen auf physiologischer Ebene zu untersuchen. Ein solcher Versuch wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt (114).

Ein drittes Versuchsmodell stellt die Unterdrückung der NUCB2/Nesfatin-1 Produktion durch Abbau der *Nucb2* mRNA dar. Dies lässt sich entweder durch die Gabe von antisense Morpholino-Oligonucleotiden gegen *Nucb2* mRNA erreichen, was zum Beispiel von den Arbeitsgruppen um Yosten & Samson (49) oder García-Galiano (55) durchgeführt wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass regelmäßige Injektionen erfolgen müssen.

Dies lässt sich umgehen, indem man mithilfe eines AAV einen chronischen Knockdown von NUCB2 erzeugt, was auch in der vorliegenden Arbeit praktiziert wurde.

Das Ziel der Arbeit war es, durch das Ausschalten von endogenem Nesfatin-1 im PVN mehr über dessen physiologische Funktionen herauszufinden. Dabei zeigte sich, dass der Knockdown von NUCB2 im PVN zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und einer verminderten Wärmeabgabe führt. Hieraus resultierte ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, welches fast ausschließlich auf eine verstärkte Zunahme der Fettmasse zurückzuführen ist. Insgesamt entwickelten die NUCB2-Knockdowntiere einen Adipositas-ähnlichen Phänotyp mit gleichzeitiger Veränderung des Lipidhaushalts. Weiterhin kam es zu einer abgemilderten Stressreaktion infolge des Knockdown von NUCB2.

### **4.1 Auswirkungen des NUCB2-Knockdown im PVN auf den Energiestoffwechsel**

Bei Nesfatin-1 handelt es sich um ein anorexigenes Peptid, welches nach zentralnervöser Applikation die Nahrungsaufnahme reduziert (37,50,70). Folglich ist zu erwarten, dass sein Fehlen zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führt. Tatsächlich wurde dies schon von verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl in antikörperbasierten (115) als auch in antisense Morpholino-Oligonucleotid basierten (37) Versuchsmodellen nachgewiesen. Dazu passend wurden vergleichbare Beobachtungen auch bei den chronischen, AAV-vermittelten NUCB2-Knockdown Modellen gemacht (116,117).

Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme unterschieden sich die Tiere, die den NUCB2-Knockdown aufwiesen, signifikant von der Kontrollgruppe. Das Fehlen von NUCB2/Nesfatin-1 führte zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit befinden sich daher im Einklang mit den Erwartungen und dienen als Bestätigung der Funktion von endogenem Nesfatin-1 als Sättigungsmolekül sowie als Positivkontrolle für die Wirkung des Virus und einen vorhandenen Knockdown-Effekt. Der zeitliche Verlauf der Entwicklung eines nachweisbaren Phänotyps als Folge eines AAV-vermittelten NUCB2-Knockdown war bei den Studien von Nakata et al. (116), Darambazar et al. (117) sowie der hier vorliegenden Arbeit jeweils unterschiedlich. Während wir die erste statistisch signifikante Erhöhung der Nahrungsaufnahme nach drei Wochen

nachweisen konnten, was sich mit den Daten von Nakata (116) deckt, so war diese bei der Arbeitsgruppe um Sedbazar (59) bereits vier Tage nach Transfektion eingetreten. Außerdem stellte Nakata (116), im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, auch nach acht Wochen noch einen signifikanten Unterschied fest. Diese Differenzen lassen sich möglicherweise auf Unterschiede hinsichtlich des Versuchsaufbaus zurückführen. Sedbazar et al. (59) führte den Knockdown ebenfalls im PVN von Ratten durch, verwendete jedoch nicht wie unsere Arbeitsgruppe einen AAV, sondern ein polymerbasiertes Reagenz (in vivo-jetPEI™) zur Transfektion. Nakata verwendete dagegen Mäuse als Versuchstiere sowie einen anderen AAV (116). Es ist durchaus denkbar, dass der Effekt dadurch länger anhält.

Interessanterweise zeigt sich dieser Unterschied in der Nahrungsaufnahme nicht während der Dunkelphase. In der Hellphase lässt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen feststellen. Dieser manifestierte sich vor allem in der späten Hellphase, während der die NUCB2-Knockdowntiere doppelt so viel Nahrung zu sich genommen haben, wie die Kontrolltiere. Dies bestätigt die Hypothese, dass ein Tagesrhythmus der *Nucb2* mRNA Expression existiert, welcher die Nahrungsaufnahme in der Hellphase beeinflusst und so zu einem circadianen Rhythmus der Nahrungsaufnahme beiträgt. Wegweisend hierfür war die Arbeitsgruppe um Sedbazar, die gezeigt hat, dass Nesfatin-1 Antikörper nur in der Hellphase, nicht aber während der Dunkelphase zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führen. Auf molekularer Ebene liegt dieser Beobachtung zugrunde, dass die *Nucb2* mRNA im PVN in der frühen Hellphase ansteigt. Parallel dazu kommt es zu einer Suppression der Nahrungsaufnahme. Erst in der späten Hellphase, wenn die *Nucb2* mRNA Level wieder fallen, beginnt erneut die Nahrungsaufnahme (59).

In der vorliegenden Arbeit sollte jedoch in den NUCB2-Knockdowntieren die *Nucb2* mRNA Expression unterdrückt sein, sodass sich die Hypothese aufstellen lässt, dass der mRNA Spiegel tagsüber deutlich geringer ist als in der Kontrollgruppe. Dies müsste allerdings anhand von mRNA Messungen über den Tag noch bestätigt werden. Anfangs reicht der Spiegel noch aus, um die Nahrungsaufnahme zu unterdrücken, doch sobald in der späten Hellphase der Spiegel wieder abfällt, ist die Hemmung geringer ausgeprägt als in den Kontrolltieren und die NUCB2-Knockdowngruppe konsumiert mehr Nahrung. Diese Verknüpfung des tageszeitlichen Rhythmus von NUCB2 mit dem circadianen Rhythmus der

## Diskussion

---

Nahrungsaufnahme wird möglicherweise von Oxytocin vermittelt. Ein Hinweis dafür ist, dass Oxytocin ein substantieller Mediator des anorexigenen Effekts von Nesfatin-1 ist (50).

Ein circadianer Rhythmus der Nahrungsaufnahme ist eine Voraussetzung für eine korrekte Energiehomöostase (118). Störungen von diesem sind mit Übergewicht und Adipositas vergesellschaftet (119,120). Weiterhin bestehen anatomische und funktionelle Verbindungen zwischen dem PVN und dem SCN, dem Sitz der zentralnervösen Haupt-Uhr (121). Man kann nun also postulieren, dass sowohl eine gestörte circadiane Rhythmik als auch eine gestörte Nesfatin-1 Expression wesentliche Bestandteile der Pathogenese von Adipositas sind. Dabei kann das eine Ursache des anderen sein, gleichzeitig aber auch davon verursacht werden. Die genauen Wechselwirkungen zwischen dem nesfatinergen System und der circadianen Steuerung müssen somit weiter untersucht werden.

Wie in Material und Methoden Kapitel 2.2.1 geschildert, wurden in unserem Experiment die Tiere aus Tierschutz-Gründen zu zweit in einem Käfig gehalten, um soziale Interaktionen über den mehrwöchigen Versuchszeitraum zu ermöglichen. Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme war der Versuchsaufbau mit zwei Tieren (mit jeweils gleicher PVN - Behandlung) pro Käfig nicht ideal, da sich so nur die gesamte Nahrungsaufnahme beider Tiere gemeinsam bestimmen lässt. Dennoch lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass lokal im PVN synthetisiertes Nesfatin-1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme spielt. Trotz des möglichen Übertritts von Nesfatin-1 aus der Peripherie über die Blut-Hirn-Schranke, ist ein NUCB2/Nesfatin-1 Mangel im PVN nicht zu kompensieren.

Im Anschluss an die Nahrungsaufnahme steigt der Blutzuckerspiegel im Blut und führt zur Freisetzung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Insulin bewirkt die Aufnahme von Glucose in die Zellen, steigert die Glykolyse und die Glykogensynthese in der Leber und hemmt gleichzeitig die Lipolyse. (122). Wenn die Insulinsensitivität des Körpers abnimmt und aufgrund der Insulinresistenz ein erhöhter Blutzuckerspiegel vorliegt, spricht man von Diabetes Mellitus Typ 2 (123). Diese Krankheit ist sehr häufig im Rahmen des metabolischen Syndroms mit Hypertonie und Adipositas vergesellschaftet. Wie in Kapitel 4.3 ausführlich beschrieben, entwickelte sich innerhalb der NUCB2-Knockdowngruppe ein Adipositas-ähnlicher Phänotyp. Deshalb erfolgte die Messung der Blutglukosekonzentration und es zeigte sich, dass diese, zum Zeitpunkt der Tötung, bei der

NUCB2-Knockdowngruppe um ~11 % signifikant erhöht war. Während bereits viele Erkenntnisse über die Wirkung von peripherem Nesfatin-1 auf den Glukosestoffwechsel vorliegen, weiß man über die Rolle von zentralem Nesfatin-1 dagegen bisher nur sehr wenig.

Im PVN befinden sich glukosesensible Neurone, deren Erregbarkeit durch Nesfatin-1 moduliert wird (63). Neben dieser Beteiligung bei der Glukoseerkennung scheint Nesfatin-1 im zentralen Nervensystem auch zahlreiche weitere Aufgaben bezüglich des Glukosemetabolismus zu übernehmen. So bewirkt die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 die Stimulation des Insulinrezeptorsignalweges der Leber, was in der Inhibition der Glukoneogenese resultiert. Zusätzlich hierzu ist in der Folge die Insulinsensitivität im ganzen Körper erhöht (62). Im Gegensatz dazu kommt es beim Knockdown von NUCB2 aufgrund einer Insulinresistenz zu einem gesteigerten hepatischen Glukoseflux und zur reduzierten Glukoseaufnahme in peripheren Geweben. Interessanterweise zeigte sich dies sowohl bei fettreich als auch bei normal ernährten Ratten (61). Nichtsdestotrotz macht das Scheitern zweier weiterer Arbeitsgruppen, die Verknüpfungen zwischen zentralem Nesfatin-1 und dem Glukosestoffwechsel zu bestätigen, deutlich, dass diesbezüglich noch Diskrepanzen in der Literatur zu finden sind (64,65).

Für peripheres Nesfatin-1 lässt sich eine enge Verknüpfung mit der Glukosehomöostase herstellen (124,125). Des Weiteren sind auch schon Verbindungen zwischen dem nesfatinergen System und Diabetes mellitus beschrieben worden. Diese Daten sind jedoch nicht eindeutig, zum Teil widersprüchlich und deshalb nur mit Vorsicht zu interpretieren. So wurden bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ II sowohl erhöhte (66) als auch verringerte (67) Nesfatin-1 Plasmakonzentrationen festgestellt. Außerdem wiesen Betazellen dieser Patienten reduzierte *Nucb2* mRNA Konzentrationen auf, was signifikant mit der Insulinsekretionskapazität korrelierte (126), wobei jedoch die Gruppengröße in diesem Versuch sehr klein war. Ein Knockdown von NUCB2 in den Betazellen geht dagegen mit einer gestörten glukoseabhängigen Insulinsekretion einher (127).

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Wu (61), dass das zentralnervöse nesfatinerge System eng mit der Glukosehomöostase vergesellschaftet ist. Seine Unterdrückung im PVN führt zu erhöhten Blutzuckerspiegeln, sodass man ihm eine

## Diskussion

---

protektive Funktion gegenüber der Hyperglykämie im Rahmen von Diabetes Mellitus Typ II zuschreiben könnte. Hierzu müssen jedoch noch weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel die Messung der Insulinsekretion in Ruhe und nach Nahrungsaufnahme, ein oraler Glukosetoleranztest und regelmäßige Blutzuckermessungen, durchgeführt werden.

Im Gegensatz zur Nahrungsaufnahme zeigte sich kein Unterschied bei der Wasseraufnahme zwischen beiden Versuchsgruppen. Dies war unerwartet, denn in der Literatur sind einige Publikationen zu finden, die einen Einfluss von Nesfatin-1 auf die Wasseraufnahme beschreiben. So zeigten Yosten und Samson bereits 2009 (49), dass i.c.v. appliziertes Nesfatin-1 die Wasseraufnahme signifikant reduziert. Weiterhin sei dieser Effekt von Nesfatin-1 unabhängig von dem Effekt auf die Nahrungsaufnahme, denn auch nach dem durch Angiotensinogen II angeregtem Durst verursachte die zentrale Gabe von Nesfatin-1 eine signifikante Reduktion der Wasseraufnahme (54). Weiterhin ist mit verschiedenen Versuchsmodellen die zu erwartende gegenteilige Auswirkung, nämlich eine Steigerung der Wasseraufnahme bei fehlendem NUCB2/Nesfatin-1, ebenso belegt worden. Hierfür kamen sowohl Antikörper gegen Nesfatin-1 im PVN (114), als auch antisense Morpholino-Oligonucleotide (54) zum Einsatz.

Das Trinkverhalten wird also auch physiologisch von endogenem Nesfatin-1 moduliert, was wir in dieser Arbeit allerdings nicht nachweisen konnten. Ein möglicher Grund dafür ist, dass es sich bei dem Knockdown von NUCB2 um einen chronischen Zustand handelt. Während also das Trinkverhalten durch variierende Nesfatin-1 Konzentrationen akut beeinflusst wird, treten bei länger andauernden Zuständen Kompensationsmechanismen auf, um das Gleichgewicht des Flüssigkeitshaushaltes sicherzustellen. Neben dem PVN nimmt auch das subfornische Organ eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Wasserhaushalts ein und kann das, durch die Manipulation im PVN, veränderte Trinkverhalten korrigieren. Darüber hinaus können an unserem Versuchsaufbau noch Verbesserungen vorgenommen werden. Eine Einzelkäfighaltung sowie eine Unterscheidung zwischen Hell- und Dunkelphase würden die Messungen verbessern, womit zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden könnten. Außerdem sind die verwendeten Wasserflaschen für eine solche Messung nicht geeignet, da es bei Bewegungen des Käfigs oder der Flaschen zum Auslaufen von unterschiedlichen Mengen

Wasser kommen kann. Diese Ungenauigkeit muss bei zukünftigen Versuchen ausgeschlossen werden.

#### **4.2 Auswirkungen des NUCB2-Knockdown im PVN auf den Energieumsatz**

In Bezug auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe ließen sich in der zweiten und vierten Woche keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen feststellen. In der sechsten Woche konnte jedoch ein Unterschied aufgezeigt werden, wobei die NUCB2-Knockdowngruppe eine signifikant verringerte nicht-evaporative Wärmeabgabe gegenüber der Kontrollgruppe aufwies. Bei dem angewendeten Versuchsmodell handelt es sich nicht um einen akuten, pharmakologischen Effekt, sondern einen chronischen Zustand. Deshalb sind die einzelnen Messzeitpunkte innerhalb einer kalorimetrischen Messung von untergeordneter Bedeutung und es findet hauptsächlich die durchschnittliche nicht-evaporative Wärmeabgabe Beachtung. Diese war gegenüber den Kontrolltieren um ~15 % reduziert. Nach acht Wochen war dieser Unterschied nicht mehr nachzuweisen.

Über seine anorexigene Wirkung hinaus beeinflusst Nesfatin-1 auch den Energieumsatz. So konnte unsere Arbeitsgruppe 2014 (70) unter Verwendung der direkten Kalorimetrie erstmals die nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Nesfatin-1 Gabe quantifizieren. Dabei zeigte sich, dass die i.c.v. Applikation diese von der dritten bis zur sechsten Stunde post injectionem signifikant erhöht. Passend zu diesem Befund bewirkt Nesfatin-1 eine Steigerung der Körperkerntemperatur (69) sowie der sympathischen Aktivität (128).

Wie wir im vorliegenden Experiment zeigen konnten, führt im Umkehrschluss das Fehlen von Nesfatin-1 zu einer verringerten nicht-evaporativen Wärmeabgabe. Damit bestätigen wir in einem chronischen experimentellen Modell die Experimente unserer Arbeitsgruppe (115), in denen wir zeigen konnten, dass zentral applizierte Nesfatin-1 Antikörper in der Aktivitätsphase die nicht-evaporative Wärmeabgabe bei Ratten senken.

Fraglich ist allerdings, warum dieser Effekt erst in der sechsten Woche nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Wirkung auf die Thermogenese vorher noch nicht stark genug ausgeprägt war, um nachgewiesen werden zu können. Auch wenn sich bereits bei anderen, mit der Energiehomöostase vergesellschafteten Systemen, die Beeinflussung

## Diskussion

---

durch fehlendes NUCB2/Nesfatin-1 bemerkbar machte, so stellt die direkte Kalorimetrie nur eine Momentaufnahme dar. Anders als beispielsweise bei dem Körpergewicht, fehlt hier der kumulierende Effekt. Dass bei den Versuchstieren nach acht Wochen kein Knockdown-Effekt auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe mehr erkennbar war, lässt sich am ehesten damit erklären, dass der Effekt schlichtweg nicht mehr vorhanden oder zu gering zum Nachweisen ist. Dafür spricht auch, dass reduzierte NUCB2 Proteinspiegel bisher maximal in der vierten Woche nach Virusinjektion nachgewiesen wurden (116), nicht aber zu späteren Zeitpunkten. Näheres hierzu findet sich in Kapitel 4.5. Auch die Arbeitsgruppe um Nakata (116) konnte acht Wochen nach Virusinjektion keinen Unterschied bezüglich des  $O_2$ -Verbrauchs und des respiratorischen Quotienten feststellen. Insgesamt findet man in der Literatur allerdings noch große Diskrepanzen bezüglich solcher Zeitverläufe. Daher sind definitiv noch weiterführende Versuche, in denen die Expression von *Nucb2* mRNA, die NUCB2/Nesfatin-1 Proteinlevel und ähnliche Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Virusinjektion untersucht werden, notwendig.

Interessanterweise zeigt sich innerhalb der NUCB2-Knockdowngruppe eine stark positive, höchst signifikante Korrelation zwischen Körpergewichtsverlust im Kalorimeter und nicht-evaporativer Wärmeabgabe. Gleichzeitig weist die Kontrollgruppe eine nicht signifikante, nur schwach positive Korrelation auf, was auf eine höhere Effizienz der Knockdowngruppe bei der Umwandlung von gespeicherter Energie in Wärme hindeutet. Folglich stellt der durch den Knockdown von NUCB2 im PVN reduzierte Energieumsatz einen entscheidenden Einflussfaktor bei der Akkumulation von Fett dar.

Dasselbe Ergebnis findet man auch bei Dore et al. (15). Auch hier ließ sich eine positive signifikante Korrelation zwischen Körpergewichtsverlust und nicht-evaporativer Wärmeabgabe nur für Nesfatin-1 behandelte Tiere feststellen, nicht jedoch bei allen anderen Versuchsgruppen.

Mit der direkten Kalorimetrie als Grundlage lässt sich allerdings noch keine Aussage über die zugrundeliegende Ursache der reduzierten nicht-evaporativen Wärmeabgabe treffen. Es sind durchaus Hinweise darauf vorhanden, dass der Knockdown von NUCB2 im PVN zu einer generell reduzierten Stoffwechselaktivität der Versuchstiere führt, welche sich folglich in einem reduzierten Energieumsatz widerspiegelt. Dabei stellt die Wärmeproduktion einen wesentlichen Bestandteil des Energieumsatzes dar, weshalb sich

als nächster Schritt die Untersuchung der Auswirkungen des NUCB2-Knockdown auf die Thermogenese anschloss. Hierfür wurden mittels Infrarot-Thermographie die Temperaturen von iBAT, Gehörgang und Schwanz ermittelt.

Es ließ sich für keine der genannten Lokalisationen ein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen feststellen. Jedoch ließ sich für beide Gruppen gemeinsam zeigen, dass es über die Dauer des Versuches bis zur achten Woche zu einer signifikanten Abnahme der Temperaturen von iBAT und Schwanz kam. Auch die Temperatur des Gehörgangs wies intraindividuelle Veränderungen auf. Auf einen anfänglichen Anstieg in der zweiten Woche, folgte ein signifikanter Abfall bis zur achten Woche.

In der Literatur gibt es bisher nur zwei Versuche, deren Daten sich zum Vergleich heranziehen lassen. So hat unsere Arbeitsgruppe 2017 (15) gezeigt, dass die i.c.v. Injektion von Nesfatin-1 die iBAT Temperatur in den Stunden zwei bis sieben post injectionem, gegenüber einer mit PBS behandelten Kontrollgruppe, signifikant erhöht. Auch die Temperaturen von Gehörgang (Stunde drei bis sieben) und Schwanz (Stunde eins, vier, fünf und acht) waren signifikant erhöht. Dabei spielt das Melanocortinsystem bei der Vermittlung dieser Effekte eine entscheidende Rolle. Diese Ergebnisse konnten 2019 von uns bestätigt werden (71).

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die berichteten, dass zentral appliziertes Nesfatin-1 akut den Plasmaspiegel der Katecholamine (129) und bei subchronischer Behandlung die Konzentration von Uncoupling Protein 1 (UCP1) erhöht (130). Weiterhin steigert die PVN spezifische Nesfatin-1 Gabe die sympathische Nervenaktivität (128). Hierfür spricht auch, dass Nesfatin-1 in sympathischen und parasymphatischen präganglionären Neuronen lokalisiert ist (40,75,110).

Fasst man alle diese Erkenntnisse zusammen, so lässt sich die Aussage aufstellen, dass auf hypothalamischer Ebene Interaktionen zwischen Nesfatin-1 und dem Melanocortinsystem bestehen. Es handelt sich bei Nesfatin-1 wahrscheinlich um einen Upstream Regulator des Melanocortinsystems, welcher durch die Rekrutierung selbigen eine Steigerung der sympathischen Nervenaktivität von Fasern, die das iBAT innervieren, verursacht. Hieraus resultiert dann eine verstärkte Thermogenese im iBAT, welche in einer erhöhten Körperkerntemperatur endet.

## Diskussion

---

Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass der Knockdown von NUCB2 den gegenteiligen Effekt habe und die Versuchstiere reduzierte Temperaturen von iBAT, Gehörgang und Schwanz aufweisen müssten. Dies war aber nicht der Fall. Allerdings deuten die signifikanten positiven Korrelationen zwischen den Temperaturen von iBAT und Gehörgang sowie iBAT und Schwanz in beiden Versuchsgruppen auf eine funktionale Thermoregulation hin.

In den Wochen zwei, vier und acht war schon in der direkten Kalorimetrie kein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der nicht-evaporativen Wärmeabgabe zu erkennen, obwohl es sich hierbei um die deutlich sensitivere Messmethode handelt. Es ist also nicht verwunderlich, dass auch die Infrarot-Thermographie keinen Unterschied für die Wärmeproduktion anzeigte. Allerdings war in der sechsten Woche die nicht-evaporative Wärmeabgabe in der NUCB2-Knockdowngruppe signifikant reduziert, sodass man durchaus auch eine verringerte iBAT Wärmeproduktion hätte erwarten können. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten den Rückschluss implizieren, dass der reduzierte Energieumsatz nicht als Folge einer verringerten Wärmeproduktion des iBAT oder einer niedrigeren Körperkerntemperatur angesehen werden kann. Nichtsdestotrotz liefert die Literatur hierfür Belege (131).

Der fehlgeschlagene Nachweis dieses Zusammenhangs lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass das zentrale nesfatinerge System nur im physiologischen Bereich manipuliert wurde. Die auf der pharmakologischen Applikation basierenden Versuche hingegen arbeiteten mit Dosierungen, welche weit über den physiologischen Bereich hinausgehen. So wurden für die direkte Kalorimetrie 25 pmol pro Versuchstier appliziert (70). Die Messung der erhöhten Temperaturen mithilfe der Infrarot-Thermographie erforderte schon die vierfache Menge, nämlich 100 pmol pro Versuchstier (15). Zum Nachweis von gesteigerter sympathischer Nervenaktivität und erhöhtem Katecholaminspiegel war dann erneut eine Vervierfachung der applizierten Menge, auf 400 pmol pro Versuchstier, erforderlich (128,129). Beruhend auf dem physiologischen Ansatz, nur endogenes Nesfatin-1 auszuschalten, könnte man daher einen geringer ausgeprägten Effekt erwarten.

Des Weiteren beschränkte sich der NUCB2-Knockdown auf den PVN. Es ist denkbar, dass dies nicht ausreichend war, um die Aktivität des sympathischen Nervensystems im

Ruhezustand zu verringern. Bei gezielter Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch Stress zeigte sich jedoch, bedingt durch das Fehlen von NUCB2, eine Verringerung seiner Aktivität (s. Kapitel 4.4). Grund hierfür sind POMC exprimierende Neurone, welche neben dem Hypothalamus auch in andere Regionen wie Amygdala oder NTS projizieren (132). Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass der Effekt des NUCB2-Knockdown auf das sympathische Nervensystem auf einem nicht aktivierten Basislevel kompensiert werden kann, diese Kompensation aber nicht mehr ausreichend ist, sobald es zu einer Aktivierung kommt.

Zusammenfassend hat diese Arbeit einen Beweis dafür geliefert, dass physiologisches Nesfatin-1 im PVN entscheidend an der Steuerung der Energiehomöostase beteiligt ist. Es übernimmt durch die Regulation der Wärmeabgabe wichtige integrative und koordinative Funktionen bei der Regulation des Energiehaushalts. Auf diese Weise stellt es eine wichtige Schnittstelle für die Verknüpfung von Energieaufnahme und -abgabe dar und trägt damit zur Kontrolle der Energiebilanz bei.

### **4.3 Auswirkungen des NUCB2-Knockdown im PVN auf Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Lipidhaushalt**

Der Knockdown von endogenem NUCB2 führte zu einem gesteigerten Körpergewicht der Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bereits ab der zweiten Woche nach der Virusinjektion war dieser Effekt signifikant.

Beachtet man die bisherigen Erkenntnisse über Nesfatin-1 sowie die in dieser Arbeit bereits dargestellten Ergebnisse, so entspricht diese Beobachtung den Erwartungen. Bereits bei seiner Wiederentdeckung 2006 (37) wurde ein körperlsgewichtssenkender Effekt für Nesfatin-1 postuliert. Hierfür waren wiederholte Injektionen über einen Zeitraum von 10 Tagen notwendig, um einen längerfristigen und nicht bloß einen akuten Effekt zu erzielen. Umgekehrt bedeutet dies aber auch, dass das Fehlen von Nesfatin-1 ein erhöhtes Körpergewicht zur Folge haben sollte. Unsere Arbeitsgruppe hat dies mit Hilfe einer einmaligen Applikation von Nesfatin-1 Antikörpern in den PVN untersucht, konnte jedoch keine signifikanten Effekte beobachten (115). Wiederholte Applikationen, um eine längerfristige Senkung des endogenen Nesfatin-1 zu erreichen, wurden nicht getestet. Das

## Diskussion

---

in der vorliegenden Arbeit gewählte Versuchsmodell des Knockdown ist dagegen geeignet, eine längerfristige Senkung von NUCB2/Nesfatin-1 zu erzielen. Bereits Nakata hatte 2016 mit diesem Ansatz gezeigt, dass der NUCB2-Knockdown ab der vierten Woche post injectionem zu einem gesteigerten Körpergewicht führt (116). Dieses Ergebnis konnten wir replizieren, wobei sich die zeitliche Differenz von zwei Wochen sowohl auf das verwendete AAV, als auch auf die Spezies der Versuchstiere zurückführen lässt. Dies wurde bereits in Kapitel 4.1 ausführlich diskutiert.

Zugrundeliegend für das gesteigerte Körpergewicht der Versuchstiere ist ein gestörter Energiehaushalt, der durch den Mangel an Nesfatin-1 bedingt ist. So bewirkt die Suppression von NUCB2 eine Fehlregulation in Form von gesteigerter Nahrungsaufnahme und verringerter Wärmeabgabe. Die Kombination aus erhöhter Energiezufuhr und verringertem Energieumsatz führt zu einer dauerhaft positiven Energiebilanz. Diese überschüssige Energie wird im Körper in Form von Fett gespeichert. Handelt es sich dabei um einen andauernden Zustand, so manifestiert sich dies als Adipositas.

Um zu überprüfen, ob sich das zusätzliche Körpergewicht der Knockdowngruppe auf eine gesteigerte Fettmenge zurückführen lässt, erfolgte die Quantifizierung der Körperzusammensetzung. Interessanterweise zeigte sich hierbei für die NUCB2-Knockdowntiere eine signifikant höhere Zunahme der Fettmasse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso war ein höherer Anstieg der freien Flüssigkeit gegenüber den Kontrolltieren ersichtlich. Lediglich in Bezug auf die Muskelmasse war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellbar. Alle Versuchstiere zeigten eine Abnahme der Muskelmasse nach sechs Wochen.

Hinsichtlich des Körperfettanteils wies die Knockdowngruppe schon in der zweiten Woche post injectionem eine Steigerung um ~5 % gegenüber dem Ausgangswert auf. Dies deutet auf einen bereits früh einsetzenden NUCB2-Knockdowneffekt hin, welcher sich durch die Beeinflussung der mit Nesfatin-1 vergesellschafteten Systeme erklären lässt. Bereits zu Beginn dieses Kapitels wurde ausführlich beschrieben, dass der Knockdown von NUCB2 ein Ungleichgewicht zwischen Energiezufuhr und Energieumsatz zur Folge hat. Daraus resultiert eine dauerhaft positive Energiebilanz mit einer übermäßigen Akkumulation von Lipiden im Körper. Obwohl zu diesem frühen Zeitpunkt die Unterschiede in Nahrungsaufnahme und Energieumsatz zwischen den Gruppen noch nicht signifikant

waren, spiegeln Körpergewicht und Körperfettanteil den gesamten Energiehaushalt wider. Folglich kommt es zur Akkumulation mehrerer kleiner Veränderungen, die im Einzelnen erst später Signifikanz erlangen, aber in ihrer Gesamtheit bereits zu Beginn nachgewiesen werden können.

Dies beschreibt den wesentlichen Pathomechanismus, welcher über die Entwicklung von Übergewicht schließlich zu Adipositas führt. Eben jene, bereits früh einsetzende, Entwicklung manifestiert sich auch bei den Versuchstieren der vorliegenden Arbeit im weiteren Versuchsverlauf. So wiesen sie über den Beobachtungszeitraum von acht Wochen eine Zunahme der Fettmasse von ~48 % auf, während die Kontrollgruppe im selben Zeitraum eine Zunahme von nur ~17 % zeigte. Auch wenn sich dabei noch nicht von Adipositas sprechen lässt, so weisen die NUCB2-Knockdowntiere definitiv einen Adipositas-ähnlichen Phänotyp auf. Unterstützt wird dies von der Erkenntnis, dass der gesamte Unterschied hinsichtlich des Körpergewichts zwischen den beiden Versuchsgruppen ausschließlich auf die Fettmasse zurückzuführen ist. In der achten Woche nach der Virusinjektion waren die NUCB2-Knockdowntiere 27 g schwerer als die Kontrolltiere, wiesen jedoch gleichzeitig eine um 29 g höhere Fettmasse auf. Es bleibt zu untersuchen, wie sich die Tiere über einen Zeitraum von acht Wochen hinaus entwickeln.

Aus der Literatur sind uns bisher noch keine anderen Daten bekannt, welche NUCB2-Knockdownmodelle mit der Körperzusammensetzung in Verbindung bringen. Die vorliegenden Publikationen zu einem Zusammenhang zwischen Nesfatin-1 und Übergewicht hingegen beziehen sich nur auf peripheres Nesfatin-1. So ist die Serumkonzentration von Nesfatin-1 in Patienten mit metabolischem Syndrom (96,133) und Diabetes Mellitus Typ II (133) erniedrigt. Begleitend sind die Plasmaspiegel von Nesfatin-1 in nüchternen, nicht übergewichtigen Männern mit BMI, relativen und absolutem Körperfett und Blutzuckerspiegel negativ korreliert (38). Im Gegensatz dazu zeigen aber Mäuse, die NUCB2/Nesfatin-1 überexprimieren, eine höhere Anfälligkeit für Adipositas bei Fütterung mit fetthaltiger Nahrung (134). Weiterhin wurden bereits Assoziationen zwischen verschiedenen Polymorphismen im *Nucb2* Gen und BMI, Körpergewicht und Fettmasse aufgezeigt (135). Beispielsweise korreliert der 1012C>G Polymorphismus des *Nucb2* Gens mit einem verringerten Risiko zur Entwicklung des metabolischen Syndroms

(136). Die Hypothese von Nesfatin-1 als wichtigem Regulator in der Entstehung von metabolischen Störungen wird außerdem auf molekularer Ebene unterstützt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe im Anschluss an diese Arbeit zeigten signifikant verringerte mRNA Spiegel der an der Lipolyse beteiligten Enzyme *Hormonsensitive Lipase* und *Adipozyten-Triglycerid-Lipase* sowie signifikant reduzierte mRNA Spiegel des *Cell Death Inducing DFFA Like Effector A* und *Glukosetransporter Typ 4* im epididymalen WAT (eWAT) von PVN NUCB2-Knockdownratten (109). Die hieraus resultierende beeinträchtigte Glukosesensitivität und Lipolyseaktivität deutet auf eine bedeutende Beteiligung von zentralem Nesfatin-1 bei der Entwicklung des metabolischen Syndroms hin.

Die vorliegende Arbeit liefert einen ersten Hinweis darauf, dass zentralnervöses Nesfatin-1 eine protektive Wirkung gegenüber der Entwicklung von Übergewicht und Adipositas ausübt. Welche pathophysiologische Rolle endogenem NUCB2/Nesfatin-1 bei der Entstehung von Adipositas unter nicht-experimentellen Bedingungen zukommt, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt allerdings offen. Weitere Experimente, wie zum Beispiel die Untersuchung endogener *Nucb2/Nesfatin-1* Expression auf mRNA- und Proteinebene an Tieren mit diätinduzierter Adipositas, können hier zur Aufklärung beitragen.

Der auf die Suppression von NUCB2 im PVN zurückzuführende Adipositas-ähnliche Phänotyp lässt sich, wie bereits erläutert, durch die dauerhaft positive Energiebilanz, welche mit einer Ablagerung überschüssiger Lipide in den subkutanen und viszeralen Fettspeichern einhergeht, erklären. Generell sind metabolische Störungen häufig auch mit einem veränderten Lipidmetabolismus vergesellschaftet, was sich in erhöhten Plasmakonzentrationen von Triglyceriden und Low Density Lipoproteinen bei Patienten mit metabolischem Syndrom widerspiegelt (10). Es sind also Veränderungen des Lipidstoffwechsels durch den Knockdown von NUCB2 denkbar. Um diese zu erfassen, wurde mithilfe der Massenspektroskopie eine umfassende Analyse der Lipide im Serum durchgeführt.

Durch die gleichzeitige Quantifizierung der Lipide konnten initial die Konzentrationen von 13 der 99 untersuchten Lipide im Serum der NUCB2-Knockdowntiere als signifikant erhöht identifiziert werden (Sphingomyelin (d32:1), Lysophosphatidylcholin (18:1), Lysophosphatidylethanolamin (18:1), Phosphatidylcholin (31:1, 32:2, 33:1, 35:1, 35:2, 37:1, 37:2) und Phosphatidylinositol (34:1, 36:1, 36:2)). Nach der Korrektur für multiples Testen

erwies sich jedoch keine der einzelnen Lipidkonzentrationen als signifikant verändert. Diese Besonderheit bei der Auswertung des Lipidoms ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. Beispielsweise untersuchten Aherrahrou et al. 234 Lipide im Zusammenhang mit dem Cytochrom P450 Enzym CYP17A1 und identifizierten 28 davon als signifikant verändert. Durch die Anwendung einer korrigierten p-Wert Schwelle aufgrund der Falscherkennungsrate zeigte sich jedoch nur noch ein Lipid als signifikant verändert (105). Ursächlich hierfür sind unter anderem kleine Gruppengrößen sowie nur geringe Veränderungen bei vergleichsweise hoher Variabilität.

Auf die Zusammenfassung der ausgewerteten Lipide zu Lipidklassen wurde im Rahmen dieser Arbeit bewusst verzichtet. Innerhalb einer Klasse wurden nur wenige Lipidspezies gemessen, sodass keine korrekte Aussage über die Gesamtkonzentration möglich ist. Weiterhin sind die Kettenlängen und Doppelbindungen aus biochemischer Sicht äußerst relevant, weshalb es auch innerhalb einer Lipidklasse große Unterschiede bezüglich der Funktionen und Stoffwechselwege gibt. Insgesamt lässt sich dennoch eine Veränderung des Lipidhaushalts in Richtung erhöhter Serumkonzentrationen der Lipide in NUCB2-Knockdowntieren erkennen, auch wenn diese für einzelne Lipide nicht signifikant war.

Die Literatur liefert bereits Hinweise für die Verbindung des nesfatineren Systems mit dem Lipidstoffwechsel. Neben der Mobilisierung von Fettsäuren aus Adipozyten und gesteigerter  $\beta$ -Oxidation durch zentrales Nesfatin-1 bei Mäusen (94), zeigte sich eine erhöhte oxidative Kapazität der Adipozyten gesunder Ratten (137) sowie eine ebenso gesteigerte  $\beta$ -Oxidation in Ratten mit Diabetes Mellitus Typ II (138) nach peripherer Applikation von Nesfatin-1. Weiterhin ist selbiges im Plasma von Diabetes Mellitus Typ II Patienten mit verschiedenen Parametern des metabolischen Syndroms assoziiert (139). Die postulierte Verknüpfung zwischen metabolischen Störungen und nesfatinerem System wird folglich durch den veränderten Lipidhaushalt aufgrund des NUCB2-Knockdown im PVN untermauert. Allerdings steht eine Disruption der Lipidhomöostase selbst im Zusammenhang mit metabolischen Risikofaktoren, kardiovaskulärem Risiko und schwerer Gewebeschädigung. Dies spiegelt sich in der Assoziation verschiedener Lipide mit Diabetes Mellitus Typ II, Insulinresistenz, Dysglykämie, Dyslipidämie, Leberfettgehalt, BMI und

Adipositas (140) sowie der hochregulierten Konzentration von Ceramiden bei Alzheimer Patienten und Entzündungen (90) wider.

An die Auswertung der Massenspektrometrie schloss sich die Frage an, welche der veränderten Lipide im Zusammenhang mit der Entwicklung von Übergewicht stehen. Über die Korrelation aller Lipide mit den phänotypischen Merkmalen Körpergewichtszunahme, Blutzucker und Zunahme der Fettmasse, ließen sich zum Beispiel LPE (18:1) oder PC (33:1) als signifikant identifizieren. Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, welche Moleküle Relevanz für weitere Untersuchungen aufweisen, um auf lange Sicht neue Biomarker zu identifizieren, die über ihre Plasmakonzentration den Fortschritt einer Erkrankung anzeigen.

Während sich einerseits viele Lipidstoffwechselstörungen auf genetisch bedingte Veränderungen der am Metabolismus beteiligten Enzyme zurückführen lassen (141), ist andererseits jedoch häufig unklar, ob es sich bei beschriebenen Lipidveränderungen um die Ursache oder eine Folge bestimmter Krankheitsbilder handelt. Dies ist jedoch von entscheidender Bedeutung. Sollte eine verschobene Lipidkomposition die Ursache einer Erkrankung darstellen, so ist eine kausale Therapie zumindest theoretisch möglich, indem, beispielsweise durch Substitution oder einen Eingriff in den Metabolismus, die physiologische Situation wiederhergestellt wird. Falls eine Lipidverschiebung jedoch nur Folge einer Krankheit ist, dann ist auch maximal eine symptomatische Therapie möglich.

Letztendlich handelt es sich bei der Untersuchung des Lipidoms um ein sehr neues Forschungsfeld (142). Auch wenn schon viele Erkenntnisse gewonnen wurden, ist noch weitaus mehr zu entschlüsseln, wodurch auch die Verknüpfung der verschiedenen molekularen Resultate mit den Krankheitsbildern erschwert ist. Somit ist es auch uns nur gelungen zu zeigen, dass die Suppression von paraventriculärem NUCB2 zu einer gestörten Energiehomöostase führt, was mit einer veränderten Lipidzusammensetzung einhergeht. Inwiefern dies aber zur Pathogenese von Adipositas beiträgt oder nur eine Folge der generell erhöhten Lipidkonzentrationen im Körper ist, lässt sich nicht mit abschließender Gewissheit sagen. Hierzu sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um auch einzelne Stoffwechselwege auf molekularer Ebene zu fokussieren und so ein Gesamtbild zu schaffen, zu dem unsere Ergebnisse einen Beitrag leisten. Dabei wäre die Analyse

verschiedener Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie die Bestimmung der Enzymaktivitäten neben den Lipidkonzentrationen sinnvoll.

Ebenfalls quantifiziert wurde die Muskelmasse der Versuchstiere. Es liegen in der Literatur unseres Wissens nach keine Daten vor, welche einen Einfluss von Nesfatin-1 auf die Muskelmasse zeigen. Daher war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu erwarten, was sich so bestätigt hat. Es war zu erkennen, dass die Versuchstiere, in beiden Gruppen gleichermaßen, mit zunehmendem Alter Muskelmasse verlieren. Dabei handelt es sich um einen normalen, physiologischen Teil des Alterungsprozesses (143).

Abschließend wird für Nesfatin-1 ein hemmender Effekt auf die Flüssigkeitsaufnahme diskutiert, was bereits in Kapitel 4.1 ausführlich dargestellt wurde (49). Folglich führt die Suppression von NUCB2 zu einer gesteigerten Wasseraufnahme (54). Es war uns nicht möglich, die gesteigerte Wasseraufnahme nachzuweisen, was wohl am Ehesten auf den Versuchsaufbau zurückzuführen war (siehe Kapitel 4.1). Gleichwohl liefert die gesteigerte Menge an freier Flüssigkeit in den NUCB2-Knockdowntieren einen Hinweis darauf, dass Nesfatin-1 Einfluss auf die Regulation des Flüssigkeitshaushalts nimmt.

#### **4.4 Auswirkungen des NUCB2-Knockdown im PVN auf die Stressreaktion**

Um die Beteiligung von Nesfatin-1 bei der körperlichen Antwort auf Stress zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Restraint Stress eine Stressreaktion bei den Versuchstieren provoziert und die iBAT Temperatur mittels Infrarot-Thermographie ermittelt. Diese stellt ein Maß für die Thermogenese des braunen Fettgewebes dar, wodurch sich Rückschlüsse auf die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und damit auch die Stärke der Stressreaktion ziehen lassen. Tatsächlich ist für Restraint Stress bereits belegt, dass er einen Anstieg der iBAT Temperatur zur Folge hat (144). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. Bei den Versuchstieren, welche den NUCB2-Knockdown aufwiesen, war der Temperaturanstieg 30 Minuten nach Stressapplikation um ~35 % geringer als in der Kontrollgruppe.

In der Literatur lassen sich von anderen Arbeitsgruppen Ergebnisse finden, welche eine Beteiligung von Nesfatin-1 bei Stress- und Angstreaktionen suggerieren. So zeigte Merali 2008 (77), dass Ratten nach der i.c.v. Injektion von Nesfatin-1 im elevated plus maze (EPM)

## Diskussion

---

Test (Goldstandard zur Überprüfung der ungelerten Angstreaktion) ein verstärktes Angstverhalten zeigen. Dasselbe Ergebnis wurde auch beim fear-potentiated startle (FPS) Test (Überprüfung der erlernten Angstreaktion) erzielt. Weiterhin wiesen die Versuchstiere nach zentraler Nesfatin-1 Gabe, in einer neuen Umgebung, eine längere Latenzzeit bis zur Nahrungsaufnahme sowie eine reduzierte Nahrungsaufnahme auf. Dies stellt einen weiteren Indikator für Angstverhalten dar. Durch Nesfatin-1 werden Verhaltensweisen, die mit Stress und Angst assoziiert sind, gefördert. Gleichzeitig lässt sich das nesfatinerge System auch durch Stress aktivieren (72,75). Zwei weiteren Arbeitsgruppen gelang es, diese Zusammenhänge zwischen dem nesfatinergen System und dem Angstverhalten zu bestätigen (49,145). Beachtet man alle diese Erkenntnisse, so sollte das durch die NUCB2-Suppression ausgelöste Fehlen von Nesfatin-1 zu einer geringer ausgeprägten Stressreaktion führen. Dies müsste sich durch eine geringere Wärmeproduktion des braunen Fettgewebes und damit einem geringeren Temperaturanstieg des iBAT äußern. Die Messzeitpunkte wurden entsprechend des zeitlichen Profils der Plasmakonzentrationen von Corticosteron nach Stressapplikation (74,146,147) gewählt.

Wie bereits beschrieben, konnten wir diese Hypothese mit den vorliegenden Ergebnissen beweisen. Auch die Temperatur des Gehörgangs, die als Maß für die Körperkerntemperatur gilt (102), unterstützt diese Aussage. So führt die geringere Wärmeproduktion des braunen Fettgewebes nach NUCB2-Knockdown auch zu einem geringeren Anstieg der Gehörgangstemperatur, verglichen mit der Kontrollgruppe. Als Gegenregulierungsmaßnahme wäre infolge der gesteigerten Thermogenese eigentlich auch eine erhöhte Schwanztemperatur als Indikator für Vasodilatation und Wärmeabgabe über den Schwanz zu erwarten gewesen. Jedoch ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Schwanztemperatur feststellen.

Die physiologische Stressreaktion des Körpers wird durch zentralnervöse Mechanismen gesteuert, wobei der PVN eine herausragende Rolle bei der Vermittlung dieser Effekte einnimmt. Hierfür bestehen neben indirekten Verbindungen über die HPA-Achse auch direkte Verbindungen vom PVN zum iBAT (148) und WAT (149) über sympathische Fasern. Die sympathisch vermittelte Thermogenese im BAT unterliegt der Kontrolle spezieller Tyrosinhydroxylase-positiver Neuronen im PVN (150). Zusätzlich zu einer reduzierten iBAT Thermogenese in Folge des NUCB2-Knockdown gelang es unserer Arbeitsgruppe im

Anschluss an diese Arbeit zu zeigen, dass die mRNA Level der *Tyrosinhydroxylase* im PVN im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert sind (109). Folglich kann diese Neuronenpopulation im PVN als direkte Verbindung zwischen PVN und iBAT angesehen werden. Der Knockdown von NUCB2 führt daher zu einer Beeinträchtigung dieser Verbindung und beeinflusst dementsprechend die autonome Stressreaktion, was sich in einer reduzierten Thermogenese des iBAT widerspiegelt.

Neben dieser direkten, unter Rekrutierung des Sympathischen Nervensystems stattfindenden, Stressreaktion erfolgt ebenfalls die Aktivierung der HPA-Achse als endokrine Stressantwort. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 erhöhte Plasmaspiegel von ACTH und Corticosteron (72,73) verursacht, was eine Einflussnahme dieses Peptids auf die Aktivität der HPA-Achse vermuten lässt. Diese Hypothese wird von gesteigerter c-Fos Expression in Nesfatin-1-immunoreaktiven Neuronen im PVN, ausgelöst durch Restraint Stress, unterstützt (73). Dennoch ließen sich keine veränderten Corticosteronkonzentrationen im Plasma in Ruhe nachweisen. Anschließende Messungen zeigten auch nach Stressexposition keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (109), wodurch eine normale Funktion der HPA-Achse nahegelegt wird. Interessanterweise bestand aber keine signifikante Korrelation zwischen dem Nebennierengewicht und der Stressantwort, was darauf hindeutet, dass bei einem Versuchstier die endokrine und die autonome Antwort auf Stress nicht in gleichem Maße verändert sind.

Weiterhin führte der Knockdown von NUCB2 im PVN zu einem reduzierten Gewicht der Nebennieren. Dabei erwies sich dieser Unterschied hinsichtlich des absoluten Gewichts als statistischer Trend, während das Nebennierengewicht, verglichen mit den Kontrolltieren in Bezug zum Körpergewicht signifikant reduziert war.

Es gibt bisher nur sehr wenig verfügbare Literatur, die zum Vergleich und zur Interpretation dieses Ergebnisses herangezogen werden kann. Wie bereits in diesem Kapitel berichtet, aktiviert die zentralnervöse Applikation von Nesfatin-1 die HPA-Achse (72,73). Umgekehrt lassen sich nach einer beidseitigen Entfernung der Nebennieren im PVN gesteigerte *Nucb2* mRNA Konzentrationen, möglicherweise als Folge eines fehlenden endokrinen Feedbacks, nachweisen (72). Gleichzeitig führt chronischer Stress, welcher Nesfatin-1 immunoreaktive

## Diskussion

---

Hirnerne (darunter auch der PVN) (75) aktiviert, zu einer Erhöhung des Nebennierengewichtes (74). Die Arbeitsgruppe um Ulrich-Lai zeigte 2006, dass hierbei hauptsächlich der Cortex betroffen ist, denn es ließen sich sowohl Zellhypertrophien, als auch -hyperplasien innerhalb der Zona fasciculata nachweisen (151).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion des Nebennierengewichtes bei der NUCB2-Knockdowngruppe befindet sich somit im Einklang mit den vorherigen Studien anderer Arbeitsgruppen. Dabei bleibt jedoch unklar, worauf diese Reduktion zurückzuführen ist. Obwohl vorherige Ergebnisse (151) eine reduzierte Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und damit eine geringer ausgeprägte endokrine Stressantwort nahelegen, zeigten die NUCB2-Knockdowntiere im Rahmen dieser Arbeit nichtsdestotrotz eine normale Aktivität der HPA-Achse. Nachfolgende molekulare Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten weiterhin, dass die mRNA Level verschiedener Enzyme der Corticosteroidsynthese in den Nebennieren nicht verändert waren (109), was die Hypothese einer normalen Funktion der HPA-Achse unterstützt. Außerdem hatte der Knockdown von NUCB2 im PVN keinen Einfluss auf die *Crf* mRNA Konzentration im PVN (109). Ob das reduzierte Nebennierengewicht auf eine reduzierte Stimulation oder andere indirekte Mechanismen zurückzuführen ist, sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Alles in allem, konnten wir mithilfe der Stress-Infrarot-Thermographie zeigen, dass die autonome Reaktion auf Restraint Stress bei den Versuchstieren, die den NUCB2-Knockdown aufweisen, geringer ausfällt als bei den Kontrolltieren. Die Nebennierenrinde ist an der Vermittlung dieser Reaktion jedoch nicht beteiligt, da die Aktivierung des iBAT über das sympathische Nervensystem und damit über die Medulla vermittelt wird. Es sind also vornehmlich die direkten Verbindungen zwischen PVN und iBAT durch den Knockdown von NUCB2 beeinträchtigt, während die Aktivität der HPA-Achse nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst wird. Um den Versuchsaufbau zu spezifizieren, sollten zwei weitere Versuchsgruppen hinzugefügt werden, die allerdings nicht gestresst werden. So ließe sich das Ergebnis validieren und sicherstellen, dass der Temperaturanstieg wirklich auf den applizierten Stress zurückzuführen ist. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Versuchstieren war dies in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Dennoch sollte es bei der Planung zukünftiger Experimente Beachtung finden. Der Versuch liefert einen weiteren Beleg für

die Involvierung von zentralem NUCB2/Nesfatin-1 in die Vermittlung und Regulation der autonomen Stressantwort.

#### **4.5 Molekularbiologische Charakterisierung des NUCB2-Knockdown im PVN**

Die Versuchstiere wiesen nach dem NUCB2-Knockdown phänotypisch genau die Eigenschaften auf, die zu erwarten waren. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die zu Beginn aufgestellten Hypothesen. Um den gesamten Versuch zu validieren und gleichzeitig die Aussagekraft der Erkenntnisse zu stärken, wurden molekulare Analysen durchgeführt. Für den Nachweis der, durch die RNA-Interferenz ausgelösten, Reduktion der mRNA im PVN, wurden Hirnschnitte angefertigt und aus diesen mithilfe der Laser-Capture Mikrodisektion der PVN isoliert. Aus diesen Proben erfolgte dann die Analyse der mRNA mittels qRT-PCR. Im Gegensatz zu den phänotypischen Ergebnissen ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der *Nucb2* und der *Crf* mRNA Expression nachweisen.

Vergleicht man den Befund zur *Nucb2* mRNA Expression mit den Versuchsergebnissen der anderen Arbeitsgruppen, die bisher einen NUCB2-Knockdown durchgeführt haben, so lässt sich unser Ergebnis unter anderem mit dem späten Messzeitpunkt, acht Wochen nach Virus-Applikation, erklären. Sedbazar (59) konnte vier Tage post injectionem eine signifikante Reduktion der *Nucb2* mRNA im PVN nachweisen. Nach acht Tagen war dieser Effekt allerdings schon nicht mehr vorhanden. Weiterhin hat keine andere Arbeitsgruppe mRNA-Messungen zur Validierung durchgeführt. Stattdessen wurden mittels Western Blot die Protein Level quantifiziert und immunhistochemische Darstellungen der Neurone an Hirnschnitten durchgeführt. Dabei fanden sich bei allen signifikant reduzierte Proteinlevel im PVN (81,6 % (116) und 56 % (117)) und Hypothalamus (66 % (61)).

Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass auch diese Messungen zu deutlich früheren Zeitpunkten stattfanden. Während unsere mRNA Messungen in der neunten Woche nach Virusinjektion durchgeführt wurden, erfolgten diese bei Nakata (116) und Darambazar (117) in der vierten Woche und bei Wu (61) sogar schon drei Tage später. Es ist also durchaus denkbar, dass der Effekt des Knockdown zu unserem Messzeitpunkt schlichtweg nicht mehr vorhanden war. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass die

## Diskussion

---

Messungen ungenau gewesen sein könnten. So kann es sowohl bei der Wahl der Schnittebene, als auch bei der Identifikation der Kerngebiete zu Unregelmäßigkeiten gekommen sein, durch welche die nachfolgende qRT-PCR beeinflusst wurde. Bei einer Gruppengröße von nur sechs Versuchstieren je Gruppe können schon wenige Ausreißer oder ungenau gesammelte Proben die Messungen massiv beeinflussen, worunter folglich auch die statistische Aussagekraft leidet.

Eine weitere Fragestellung, der nachgegangen werden muss, ist die Auswirkung der Suppression von NUCB2 auf die betroffenen Neurone. Andere Versuche unserer Arbeitsgruppe, deren Ergebnisse bisher noch nicht veröffentlicht sind, weisen auf einen Zelltod mit vollständigem Verlust nesfatinerger Neurone nach NUCB2-Knockdown hin. Untermuert wird diese Vermutung dadurch, dass es sich bei NUCB2 nicht nur um das Vorläuferpeptid von Nesfatin-1 handelt. Im Lumen des Golgi-Apparat bindet es mit seiner EF-hand Domäne zweiwertige Calciumionen (36). Viele wichtige Signaltransduktionswege der Zelle sind eng mit  $\text{Ca}^{2+}$  verknüpft, sodass eine, durch das Fehlen von NUCB2 ausgelöste, Störung der Calciumhomöostase möglicherweise nicht kompensiert werden kann. Es wäre daher auch denkbar, dass es zum Zelltod kommt und andere Zellen diesen Platz einnehmen. Zu diesem Zeitpunkt ist es jedoch noch nicht möglich, eine abschließende Aussage hierüber zu treffen. Dafür sind weitere Untersuchungen notwendig, in denen zum Beispiel zu verschiedenen Zeitpunkten und auch bereits deutlich früher nach Virusinjektion mRNA-Messungen durchgeführt werden. Gleichzeitig sollten auch andere Methoden wie Western Blot und Immunohistochemie in Betracht gezogen werden. Nur so kann eine umfassende Charakterisierung erfolgen.

Abschließend lässt sich sagen, dass ein Effekt des NUCB2-Knockdowns vorhanden gewesen sein muss. Dies wurde durch den Phänotyp, welcher sich entwickelte, eindeutig belegt. Leider ist es nicht gelungen, dies auch auf einer molekularen Ebene zu bestätigen.

## 4.6 Erläuterungen zur vorliegenden Publikation

Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ist die Publikation mit dem Titel: „*Knockdown of endogenous NUCB2/nesfatin-1 in the PVN leads to obese-like phenotype and abolishes stress- and metformin-induced thermogenic response in rats*“ von Daniel Stephan, Natalie Taege, Riccardo Dore, Julica Folberth, Olaf Jöhren, Markus Schwaninger, Hendrik Lehnert und Carla Schulz in der Fachzeitschrift „Hormone and Metabolic Research“ (109) hervorgegangen (Im folgenden Abschnitt „Publikation“ genannt). Im Anschluss an die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden weitere Untersuchungen von Natalie Taege durchgeführt. Hierbei wurden zum einen die durch diese Arbeit bereits etablierten Methoden in Teilen wiederholt und zum anderen zusätzliche Parameter gemessen wie beispielsweise die Corticosteronkonzentration im Rahmen der Stressthermographie. Die Publikation ist anschließend als gemeinsame Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus beiden Projekten entstanden. Im folgenden Abschnitt ist dargestellt, inwiefern sich die Publikation von der vorliegenden Arbeit unterscheidet und worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind. Dabei bezieht sich die Nummerierung der Abbildungen auf die Publikation.

- **Abbildung 1:** Die dargestellten Ergebnisse sind unverändert aus der vorliegenden Arbeit übernommen worden. Lediglich in Bezug auf Körpergewicht (A) und Nahrungsaufnahme (B) wurde für die Publikation ein kürzerer Zeitraum gewählt, da der Knockdown-Effekt von vorrangigem Interesse war, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit der zeitliche Verlauf über die Dauer des ganzen Versuches, unter anderem aufgrund der Etablierung der Knockdown-Methode, von Bedeutung war. (Entspricht folgenden Abbildungen der vorliegenden Arbeit: 14, 17, 29, 30, 31, 32, 34)
- **Abbildung 2:** Die vorliegenden Daten zur direkten Kalorimetrie und Thermographie sind identisch und wurden unverändert aus der vorliegenden Promotionsarbeit in die Publikation übernommen. (Entspricht folgenden Abbildungen der vorliegenden Arbeit: 20, 23, 24, 25)
- **Abbildung 3:** Die Durchführung der i.c.v. Injektionen von Metformin war nicht Teil dieser Promotionsarbeit. Es handelt sich um die Ergebnisse der Untersuchungen von Natalie Taege.

## Diskussion

---

- Abbildung 4: Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen im PVN und NTS wurden bezüglich ihrer Aussagekraft bereits in Kapitel 4.5. ausführlich diskutiert. In den Untersuchungen von Natalie Taege wurden die Analysen um zusätzliche Gene erweitert, weshalb diese Ergebnisse für die Publikation herangezogen wurden.
- Abbildung 5: Genexpressionsanalysen aus dem Fettgewebe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Es handelt sich in der Publikation um die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Natalie Taege.
- Abbildung 6: Die Ergebnisse der Thermographie (A) sind unverändert aus der vorliegenden Arbeit übernommen worden. Die Messung der Corticosteronkonzentration im Serum (B) wurde erst im Anschluss, nach zusätzlicher Genehmigung (siehe Anhang), durch Natalie Taege durchgeführt. Um ein Verzerrern der Daten zu verhindern und stark schwankende Gruppengrößen zu vermeiden, sind die in der Publikation dargestellten Ergebnisse des Nebennierengewichts (C) und der Genexpressionsanalysen (D) ebenso ausschließlich auf die Untersuchungen von Natalie Taege zurückzuführen. (Entspricht folgenden Abbildungen der vorliegenden Arbeit: 35)

## 5 Zusammenfassung

Jeder Organismus muss sich ununterbrochen der hochkomplexen Aufgabe stellen, seinen Energiehaushalt zu regulieren. Dabei muss ein Gleichgewicht zwischen zugeführter und aufgewendeter Energie herrschen, sonst kommt es zu einer Energiedysbalance. Eine dauerhaft positive Energiebilanz führt in der Folge zu Übergewicht und Adipositas. Diese Krankheit wird durch weitere Risikofaktoren wie Störungen der circadianen Rhythmik, Stress oder genetische Prädispositionen begünstigt.

Obwohl es sich, unabhängig von der Stärke der Ausprägung, um eine eigentlich vermeidbare Krankheit handelt, nimmt die Prävalenz drastisch zu und stellt damit nicht nur eine erhebliche Gefahr für die individuelle Gesundheit der Patienten, sondern auch ein ökonomisches Risiko für die Gesundheitssysteme dar. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Pathogenese besser zu verstehen, wofür genaue Kenntnisse über die Regulation der Energiehomöostase erforderlich sind.

Ein äußerst wichtiges zentralnervöses Kontrollzentrum dafür ist der PVN im Hypothalamus. Er verarbeitet und integriert die Informationen verschiedener energieregulierender Signalwege. Wie 2006 entdeckt wurde, ist hierbei das aus dem Vorläufermolekül NUCB2 gebildete Nesfatin-1 beteiligt. Nesfatin-1 ist ein anorexigenes Peptid, das die Nahrungsaufnahme reduziert und unter Rekrutierung des Melanocortinsystems die Thermogenese des interskapularen braunen Fettgewebes und damit auch die Wärmeabgabe steigert. Weiterhin ist es an der Vermittlung der Stressantwort beteiligt und zeigt einen tageszeitlichen Rhythmus seiner Konzentrationen.

Während die meisten Studien, aufgrund des bisher noch nicht identifizierten Rezeptors, auf pharmakologische Versuchsmodelle zurückgreifen, so war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Erforschung der Funktionen von endogenem Nesfatin-1 innerhalb der Energiehomöostase und Stressreaktion. Dafür wurde im PVN von sechs Versuchstieren mithilfe eines AAV die *Nucb2* mRNA ausgeschaltet, während bei sechs weiteren Versuchstieren die Injektion eines Kontroll-AAV in den PVN erfolgte. Dies sollte zu einem Phänotyp führen, bei dem die Versuchstiere im Vergleich zur pharmakologischen Applikation von Nesfatin-1 gegenteilige Veränderungen des Energiestoffwechsels zeigen.

## Zusammenfassung

---

Der Knockdown von NUCB2 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme mit gestörter Tagesrhythmik bei gleichzeitig verringertem Energieumsatz. Beides zusammen resultiert in einem erhöhten Körpergewicht sowie einer gesteigerten Zunahme an Körperfett mit einem veränderten Lipidhaushalt im Serum und gesteigertem Blutzuckerspiegel. Insgesamt manifestierte sich ein Adipositas-ähnlicher Phänotyp. Weiterhin zeigten die NUCB2-Knockdowntiere eine gedämpfte autonome Stressantwort. Zusätzlich hierzu waren ihre Nebennieren kleiner, allerdings ohne Veränderung der Corticosteronkonzentration im Plasma. Alle diese Ergebnisse waren statistisch signifikant. Interessanterweise wurden das Trinkverhalten und die Wärmeproduktion des iBAT im Ruhezustand nicht von dem Knockdown beeinflusst. Zusammenfassend führte der Knockdown von NUCB2 zu dem erwarteten Phänotyp, obgleich die Validierung des Knockdowns nicht gelang und sich hinsichtlich der *Nucb2* mRNA im PVN keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen nachweisen ließen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen, dass paraventriculäres, endogenes NUCB2/Nesfatin-1 im physiologischen Zustand ein wichtiger Bestandteil der zentralnervösen Regulation der Energiehomöostase ist. Seine Suppression führt zu einem fehlregulierten Energiehaushalt sowie einer Störung der circadianen Rhythmik. In der Folge kommt es zur Ausbildung von Adipositas. Damit liefert diese Arbeit weitere Erkenntnisse zur Pathogenese von Adipositas, in der Nesfatin-1 eine protektive Funktion einnimmt. Aufgrund seiner vermutlich neuroprotektiven Eigenschaften und der Beteiligung von NUCB2 bei der Calciumhomöostase, bleibt jedoch abzuwarten, inwiefern Nesfatin-1 ein Target für zukünftige Therapien darstellen kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Obesity and overweight [Internet]. [zitiert 26. April 2020]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, u. a. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts*. Dezember 2015;8(6):402–24.
3. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 8. Januar 2003;289(2):187–93.
4. Cawley J, Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *J Health Econ*. Januar 2012;31(1):219–30.
5. Keating CL, Peeters A, Swinburn BA, Magliano DJ, Moodie ML. Utility-based quality of life associated with overweight and obesity: the Australian diabetes, obesity, and lifestyle study. *Obesity (Silver Spring)*. März 2013;21(3):652–5.
6. Lehnert T, Streltchenia P, Konnopka A, Riedel-Heller S, König HH. Health burden and costs of obesity and overweight in Germany: an update. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care*. 8. November 2014;16.
7. Bray GA, Flatt JP, Volaufova J, DeLany JP, Champagne CM. Corrective responses in human food intake identified from an analysis of 7-d food-intake records. *Am J Clin Nutr*. Dezember 2008;88(6):1504–10.
8. Stevenson RJ, Francis HM. The hippocampus and the regulation of human food intake. *Psychol Bull*. Oktober 2017;143(10):1011–32.
9. Jr DP, Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 6. April 2000;404(6778):661.
10. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 16. April 2005;365(9468):1415–28.
11. Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. Juni 2014;15(6):367–78.
12. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci*. März 2011;14(3):351–5.
13. Cone RD. Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System. *Endocr Rev*. 1. Dezember 2006;27(7):736–49.
14. Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H. Endogenous ACTH, not only  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 17. November 2009;298(2):E237–44.
15. Dore R, Levata L, Gachkar S, Jöhren O, Mittag J, Lehnert H, u. a. The thermogenic effect of nesfatin-1 requires recruitment of the melanocortin system. *J Endocrinol*. November 2017;235(2):111–22.
16. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1. Dezember 1994;372(6505):425–32.
17. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, u. a. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1. Februar 1996;334(5):292–5.
18. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Jr DP. Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine*. Mai 1996;2(5):589–93.

19. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 6. April 2000;404(6778):661–71.
20. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, u. a. The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron*. 20. Februar 2003;37(4):649–61.
21. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. Dezember 2001;25 Suppl 5:S63–67.
22. Hill JW. PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab*. Dezember 2012;16(Suppl 3):S627–36.
23. Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 1994;342(2):299–319.
24. Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC, Loewy AD. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol*. 1. Mai 2010;518(9):1460–99.
25. Rogers RC, Kita H, Butcher LL, Novin D. Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. *Brain Res Bull*. August 1980;5(4):365–73.
26. Hosoya Y, Sugiura Y, Okado N, Loewy AD, Kohno K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp Brain Res*. 1991;85(1):10–20.
27. Cao Q, Jing J, Cui X, Shi H, Xue B. Sympathetic nerve innervation is required for beigeing in white fat. *Physiol Rep*. 2019;7(6):e14031.
28. François M, Torres H, Huesing C, Zhang R, Saurage C, Lee N, u. a. Sympathetic innervation of the interscapular brown adipose tissue in mouse. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1454(1):3–13.
29. Weingarten HP, Chang PK, McDonald TJ. Comparison of the metabolic and behavioral disturbances following paraventricular- and ventromedial-hypothalamic lesions. *Brain Res Bull*. Juni 1985;14(6):551–9.
30. Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*. 1. Dezember 1980;194(3):555–70.
31. Sofroniew MV. Morphology of Vasopressin and Oxytocin Neurons and Their Central and Vascular Projections. In: Cross BA, Leng G, Herausgeber. *Progress in Brain Research* [Internet]. Elsevier; 1983 [zitiert 30. April 2020]. S. 101–14. (The Neurohypophysis: Structure, Function and Control; Bd. 60). Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308643782>
32. L W Swanson, Sawchenko and PE. Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Annual Review of Neuroscience*. 1983;6(1):269–324.
33. Roland BL, Sawchenko PE. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*. 1. Juni 1993;332(1):123–43.
34. Csáki A, Kocsis K, Halász B, Kiss J. Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [3H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience*. 2000;101(3):637–55.
35. Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, Henkel T, Karabinos A, Kratzin H, u. a. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein.

- Biol Chem Hoppe-Seyler. August 1994;375(8):497–512.
36. Taniguchi N, Taniura H, Niinobe M, Takayama C, Tominaga-Yoshino K, Ogura A, u. a. The Postmitotic Growth Suppressor Necdin Interacts with a Calcium-binding Protein (NEFA) in Neuronal Cytoplasm. *J Biol Chem*. 13. Oktober 2000;275(41):31674–81.
  37. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, u. a. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 12. Oktober 2006;443(7112):709–12.
  38. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, u. a. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clinical Endocrinology*. 1. Oktober 2010;73(4):484–90.
  39. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, u. a. Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology*. 1. Oktober 2007;148(10):5088–94.
  40. Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A, Taché Y. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res*. 17. Juni 2011;1396C:20–34.
  41. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, u. a. Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology*. 1. Januar 2009;150(1):232–8.
  42. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 17. April 2009;381(4):643–8.
  43. Kim J, Chung Y, Kim H, Im E, Lee H, Yang H. The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse [Internet]. *Development & Reproduction*. 2014 [zitiert 23. November 2017]. Verfügbar unter: [http://www.ksdb.org/archive/view\\_article?pid=dr-18-4-301](http://www.ksdb.org/archive/view_article?pid=dr-18-4-301)
  44. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood–brain barrier without saturation. *Peptides*. 1. November 2007;28(11):2223–8.
  45. Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M, Shimizu H, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca<sup>2+</sup> influx through N-type channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 18. Dezember 2009;390(3):958–62.
  46. Brailoiu GC, Deliu E, Tica AA, Rabinowitz JE, Tilley DG, Benamar K, u. a. Nesfatin-1 activates cardiac vagal neurons of nucleus ambiguus and elicits bradycardia in conscious rats. *J Neurochem*. September 2013;126(6):739–48.
  47. Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, u. a. Nesfatin-1 Induces the Phosphorylation Levels of cAMP Response Element-Binding Protein for Intracellular Signaling in a Neural Cell Line. *PLOS ONE*. 6. Dezember 2012;7(12):e50918.
  48. Sedbazar U, Ayush E amar, Maejima Y, Yada T. Neuropeptide Y and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport*. 17. Dezember 2014;25(18):1453–8.
  49. Yosten GLC, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. August 2009;297(2):R330–6.
  50. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, u. a. Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway. *Cell Metabolism*. 4. November

2009;10(5):355–65.

51. Guvenc-Bayram G, Altinbas B, Iqbal A, Cerci E, Udum D, Yilmaz MS, u. a. Intracerebroventricularly injected nesfatin-1 activates central cyclooxygenase and lipoxigenase pathways. *Auton Neurosci*. 17. April 2020;226:102670.
52. Rojczyk E, Pałasz A, Wiaderkiewicz R. Effect of short and long-term treatment with antipsychotics on orexigenic/anorexigenic neuropeptides expression in the rat hypothalamus. *Neuropeptides*. 1. Juni 2015;51(Supplement C):31–42.
53. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Shimasaki T, Mitsutomi K, u. a. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem*. 1. Januar 2013;124(1):90–9.
54. Yosten GLC, Redlinger L, Samson WK. Evidence for a Role of Endogenous Nesfatin-1 in the Control of Water Drinking. *Journal of Neuroendocrinology*. 1. Juli 2012;24(7):1078–84.
55. García-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Pineda R, u. a. The Anorexigenic Neuropeptide, Nesfatin-1, Is Indispensable for Normal Puberty Onset in the Female Rat. *J Neurosci*. 9. Juni 2010;30(23):7783–92.
56. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, u. a. Peripheral Administration of Nesfatin-1 Reduces Food Intake in Mice: The Leptin-Independent Mechanism. *Endocrinology*. 1. Februar 2009;150(2):662–71.
57. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, u. a. Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology*. 1. Juli 2010;151(7):3169–80.
58. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, u. a. Nesfatin-1 Neurons in Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Rat Hypothalamus Coexpress Oxytocin and Vasopressin and Are Activated by Refeeding. *Endocrinology*. 1. März 2008;149(3):1295–301.
59. Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10. Mai 2013;434(3):434–8.
60. Dore R, Krotenko R, Reising JP, Murru L, Sundaram SM, Di Spiezio A, u. a. Nesfatin-1 decreases the motivational and rewarding value of food. *Neuropsychopharmacology*. 30. April 2020;
61. Wu D, Yang M, Chen Y, Jia Y, Ma ZA, Boden G, u. a. Hypothalamic Nesfatin-1/NUCB2 Knockdown Augments Hepatic Gluconeogenesis That Is Correlated With Inhibition of mTOR-STAT3 Signaling Pathway in Rats. *Diabetes*. 1. April 2014;63(4):1234–47.
62. Yang M, Zhang Z, Wang C, Li K, Li S, Boden G, u. a. Nesfatin-1 Action in the Brain Increases Insulin Sensitivity Through Akt/AMPK/TORC2 Pathway in Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*. 1. August 2012;61(8):1959–68.
63. Chen X, Dong J, Jiang ZY. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regulatory Peptides*. 20. August 2012;177(1):21–6.
64. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1. Januar 2010;391(1):1039–42.
65. Li Z, Gao L, Tang H, Yin Y, Xiang X, Li Y, u. a. Peripheral Effects of Nesfatin-1 on Glucose Homeostasis. *PLOS ONE*. 15. August 2013;8(8):e71513.
66. Zhang Z, Li L, Yang M, Liu H, Boden G, Yang G. Increased Plasma Levels of

- Nesfatin-1 in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Februar 2012;120(02):91–5.
67. Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. *Regulatory Peptides*. 8. Januar 2010;159(1):72–7.
68. Copeptin and Nesfatin-1 are interesting interrelated biomarkers playing a role in the pathogenesis of insulin resistance in Chinese obese children - Abstract - Europe PMC [Internet]. [zitiert 1. Mai 2020]. Verfügbar unter: <https://europepmc.org/article/ppr/ppr124822>
69. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, u. a. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes*. Dezember 2012;36(12):1514–21.
70. Wernecke K, Lamprecht I, Jöhren O, Lehnert H, Schulz C. Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity*. 1. Juli 2014;22(7):1662–8.
71. Levata L, Dore R, Jöhren O, Schwaninger M, Schulz C, Lehnert H. Nesfatin-1 Acts Centrally to Induce Sympathetic Activation of Brown Adipose Tissue and Non-Shivering Thermogenesis. *Horm Metab Res*. Oktober 2019;51(10):678–85.
72. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp RS, Palkovits M, u. a. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in rats. *Neurochemistry International*. 1. Oktober 2010;57(3):189–97.
73. Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, u. a. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)*. 12. Oktober 2010;2(11):775–84.
74. Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger–Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience*. 13. Oktober 2010;170(2):478–88.
75. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Research*. 10. November 2009;1300(Supplement C):114–24.
76. Ma Q, Li X, Yan Z, Jiao H, Wang T, Hou Y, u. a. Xiaoyaosan Ameliorates Chronic Immobilization Stress-Induced Depression-Like Behaviors and Anorexia in Rats: The Role of the Nesfatin-1-Oxytocin-Proopiomelanocortin Neural Pathway in the Hypothalamus. *Front Psychiatry*. 2019;10:910.
77. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology*. 1. November 2008;201(1):115.
78. Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jegou S, Shimizu H, Hashimoto K, u. a. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience*. 31. Juli 2008;155(1):174–81.
79. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 1. Januar 2014;53:124–44.
80. Shimizu T. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2009;49(1):123–50.
81. Saliba AE, Vonkova I, Gavin AC. The systematic analysis of protein–lipid interactions comes of age. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Dezember 2015;16(12):753–61.
82. Resh MD. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Progress in*

Lipid Research. 1. Juli 2016;63:120–31.

83. Horvath SE, Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res.* Oktober 2013;52(4):590–614.
84. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Februar 2008;9(2):112–24.
85. Atilla-Gokcumen GE, Muro E, Relat-Goberna J, Sasse S, Bedigian A, Coughlin ML, u. a. Dividing Cells Regulate Their Lipid Composition and Localization. *Cell.* 30. Januar 2014;156(3):428–39.
86. Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, u. a. Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nature Cell Biology.* Mai 2012;14(5):542–7.
87. da Silveira dos Santos AX, Riezman I, Aguilera-Romero MA, David F, Piccolis M, Loewith R, u. a. Systematic lipidomic analysis of yeast protein kinase and phosphatase mutants reveals novel insights into regulation of lipid homeostasis. *Mol Biol Cell.* 15. Oktober 2014;25(20):3234–46.
88. Pinot M, Vanni S, Pagnotta S, Lacas-Gervais S, Payet LA, Ferreira T, u. a. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science.* 8. August 2014;345(6197):693–7.
89. Wang J, Wang C, Han X. Tutorial on lipidomics. *Anal Chim Acta.* 11. Juli 2019;1061:28–41.
90. Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research.* 1. Januar 2012;51(1):50–62.
91. Wang DD, Toledo E, Hruby A, Rosner BA, Willett WC, Sun Q, u. a. Plasma Ceramides, Mediterranean Diet, and Incident Cardiovascular Disease in the PREDIMED Trial. *Circulation.* 23. Mai 2017;135(21):2028–40.
92. Stegemann C, Drozdov I, Shalhoub J, Humphries J, Ladroue C, Didangelos A, u. a. Comparative lipidomics profiling of human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet.* Juni 2011;4(3):232–42.
93. Kulkarni H, Meikle PJ, Mamtani M, Weir JM, Barlow CK, Jowett JB, u. a. PLASMA LIPIDOMIC PROFILE SIGNATURE OF HYPERTENSION IN MEXICAN AMERICAN FAMILIES: SPECIFIC ROLE OF DIACYLGLYCEROLS. *Hypertension.* September 2013;62(3):621–6.
94. Liu Y, Chen X, Qu Y, Song L, Lin Q, Li M, u. a. Central nesfatin-1 activates lipid mobilization in adipose tissue and fatty acid oxidation in muscle via the sympathetic nervous system. *Biofactors.* 3. Januar 2020;
95. Gonzalez R, Perry RLS, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Ceddia RB, u. a. Nutrient responsive nesfatin-1 regulates energy balance and induces glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Endocrinology.* Oktober 2011;152(10):3628–37.
96. Aksu O, Aydın B, Doguç DK, İlhan I, Oztürk O, Altuntas A, u. a. The evaluation of Nesfatin-1 levels in patients with OSAS associated with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* April 2015;38(4):463–9.
97. Kaiyala KJ, Ramsay DS. Direct Animal Calorimetry, the Underused Gold Standard for Quantifying the Fire of Life. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* März 2011;158(3):252–64.
98. Wesolowski T, Schaarschmidt B, Lamprecht I. A poor man's calorimeter (PMC) for small animals. *Journal of Thermal Analysis.* 1. November 1985;30(6):1403–13.
99. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 1. Dezember 2017;8:87–104.
100. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 30. März 2007;59(2–3):75–86.

101. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition*. 6. Aufl. Elsevier Academic Press; 2006. 451 S.
102. Vogel B, Wagner H, Gmoser J, Wörner A, Löschberger A, Peters L, u. a. Touch-free measurement of body temperature using close-up thermography of the ocular surface. *MethodsX*. 9. Mai 2016;3:407–16.
103. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. September 1993;11(9):1026–30.
104. Dore R, Iemolo A, Smith KL, Wang X, Cottone P, Sabino V. CRF Mediates the Anxiogenic and Anti-Rewarding, But Not the Anorectic Effects of PACAP. *Neuropsychopharmacology*. Oktober 2013;38(11):2160–9.
105. Aherrahrou R, Kulle AE, Alenina N, Werner R, Vens-Cappell S, Bader M, u. a. CYP17A1 deficient XY mice display susceptibility to atherosclerosis, altered lipidomic profile and atypical sex development. *Sci Rep*. 29. Mai 2020;10(1):8792.
106. Karsai G, Kraft F, Haag N, Korenke GC, Hänisch B, Othman A, u. a. DEGS1-associated aberrant sphingolipid metabolism impairs nervous system function in humans. *J Clin Invest*. 1. März 2019;129(3):1229–39.
107. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, u. a. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*. 2. Juli 2018;46(W1):W486–94.
108. Pang Z, Chong J, Zhou G, de Lima Morais DA, Chang L, Barrette M, u. a. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res*. 2. Juli 2021;49(W1):W388–96.
109. Stephan D, Taege N, Dore R, Folberth J, Jöhren O, Schwaninger M, u. a. Knockdown of endogenous NUCB2/nesfatin-1 in the PVN leads to obese-like phenotype and abolishes stress- and metformin-induced thermogenic response in rats. *Horm Metab Res.*; Publikation zur Veröffentlichung akzeptiert am 11. August 2022; Manuscript ID HMR-2022-05-0140.R1
110. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*. 15. Oktober 2008;156(3):563–79.
111. Roh E, Song DK, Kim MS. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*. März 2016;48(3):e216.
112. Yosten GLC, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1. Juni 2010;298(6):R1642–7.
113. Nesselhut J, Jurgan U, Onken E, Götz H, Barnikol HU, Hirschfeld G, u. a. Golgi retention of human protein NEFA is mediated by its N-terminal Leu/Ile-rich region. *FEBS Letters*. 14. Dezember 2001;509(3):469–75.
114. Wilz AM, Wernecke K, Appel L, Kahrs J, Dore R, Jöhren O, u. a. Endogenous NUCB2/Nesfatin-1 Regulates Energy Homeostasis Under Physiological Conditions in Male Rats. *Horm Metab Res*. September 2020;52(9):676–84.
115. Wilz AM. Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Nesfatin-1 und dem melanocortinergen System auf die Energiehomöostase. [Lübeck]: Universität zu Lübeck; 2015.
116. Nakata M, Gantulga D, Santoso P, Zhang B, Masuda C, Mori M, u. a. Paraventricular NUCB2/Nesfatin-1 Supports Oxytocin and Vasopressin Neurons to

- Control Feeding Behavior and Fluid Balance in Male Mice. *Endocrinology*. 1. Juni 2016;157(6):2322–32.
117. Darambazar G, Nakata M, Okada T, Wang L, Li E, Shinozaki A, u. a. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 24. Januar 2015;456(4):913–8.
118. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obesity*. 1. November 2009;17(11):2100–2.
119. Zhang G, Cai D. Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. November 2011;301(5):E1004–12.
120. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, u. a. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science*. 13. Mai 2005;308(5724):1043–5.
121. Tousson E, Meissl H. Suprachiasmatic Nuclei Grafts Restore the Circadian Rhythm in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *J Neurosci*. 24. März 2004;24(12):2983–8.
122. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem Rev*. Mai 2005;26(2):19–39.
123. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med J*. Juli 2012;27(4):269–73.
124. Foo KS, Brauner H, Östenson CG, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *Journal of Endocrinology*. 1. März 2010;204(3):255–63.
125. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca<sup>2+</sup> influx through L-type channels in mouse islet  $\beta$ -cells. *Endocrine Journal*. 2011;58(4):305–13.
126. Riva M, Nitert MD, Voss U, Sathanoori R, Lindqvist A, Ling C, u. a. Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2 diabetic subjects. *Cell Tissue Res*. 1. Dezember 2011;346(3):393–405.
127. Yang Y, Zhang B, Nakata M, Nakae J, Mori M, Yada T. Islet  $\beta$ -cell-produced NUCB2/nesfatin-1 maintains insulin secretion and glycemia along with suppressing UCP-2 in  $\beta$ -cells. *J Physiol Sci*. September 2019;69(5):733–9.
128. Tanida M, Gotoh H, Yamamoto N, Wang M, Kuda Y, Kurata Y, u. a. Hypothalamic Nesfatin-1 Stimulates Sympathetic Nerve Activity via Hypothalamic ERK Signaling. *Diabetes*. 1. November 2015;64(11):3725–36.
129. Yilmaz MS, Altinbas B, Guvenc G, Erkan LG, Avsar O, Savci V, u. a. The role of centrally injected nesfatin-1 on cardiovascular regulation in normotensive and hypotensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 1. Dezember 2015;193:63–8.
130. Yuan J hua, Chen X, Dong J, Zhang D, Song K, Zhang Y, u. a. Nesfatin-1 in the Lateral Parabrachial Nucleus Inhibits Food Intake, Modulates Excitability of Glucosensing Neurons, and Enhances UCP1 Expression in Brown Adipose Tissue. *Front Physiol* [Internet]. 2017 [zitiert 26. August 2018];8. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00235/full>
131. Weir G, Ramage LE, Akyol M, Rhodes JK, Kyle CJ, Fletcher AM, u. a. Substantial Metabolic Activity of Human Brown Adipose Tissue during Warm Conditions and Cold-Induced Lipolysis of Local Triglycerides. *Cell Metabolism*. 5. Juni 2018;27(6):1348–1355.e4.
132. Millington GW. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond)*. 1. September 2007;4:18.

133. Algul S, Ozkan Y, Ozcelik O. Serum nesfatin-1 levels in patients with different glucose tolerance levels. *Physiol Res.* 13. Dezember 2016;65(6):979–85.
134. Shimizu H, Tanaka M, Osaki A. Transgenic mice overexpressing nesfatin/nucleobindin-2 are susceptible to high-fat diet-induced obesity. *Nutr Diabetes.* März 2016;6(3):e201.
135. Zegers D, Beckers S, Mertens IL, Gaal LFV, Hul WV. Association between polymorphisms of the Nesfatin gene, NUCB2, and obesity in men. *MGM.* 1. Juli 2011;103(3):282–6.
136. Wang R, Wang J, Wan X. Association of the Polymorphism in Nucleobindin 2 Gene and the Risk of Metabolic Syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers.* Januar 2016;20(1):49–52.
137. Gonzalez R, Reingold BK, Gao X, Gaidhu MP, Tsushima RG, Unniappan S. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet  $\beta$ - and MIN6 cells. *J Endocrinol.* März 2011;208(3):R9–16.
138. Dong J, Xu H, Xu H, Wang P fei, Cai G ju, Song H feng, u. a. Nesfatin-1 stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in STZ-induced type 2 diabetic mice. *PLoS One.* 2013;8(12):e83397.
139. Gallaly D, Mohammad N, Ch M. SERUM NESFATIN-1 IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS: A CROSS SECRIONAL STUDY. 30. Januar 2020;
140. Yin X, Willinger CM, Keefe J, Liu J, Fernández-Ortiz A, Ibáñez B, u. a. Lipidomic profiling identifies signatures of metabolic risk. *EBioMedicine.* Januar 2020;51:102520.
141. Lamari F, Mochel F, Sedel F, Saudubray JM. Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis.* 1. Mai 2013;36(3):411–25.
142. Harayama T, Riezman H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Mai 2018;19(5):281–96.
143. Siparsky PN, Kirkendall DT, Garrett WE. Muscle Changes in Aging. *Sports Health.* Januar 2014;6(1):36–40.
144. Ootsuka Y, Blessing WW, Nalivaiko E. Selective blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors attenuates the increased temperature response in brown adipose tissue to restraint stress in rats. *Stress.* 1. Januar 2008;11(2):125–33.
145. Ge JF, Xu YY, Qin G, Pan XY, Cheng JQ, Chen FH. Nesfatin-1, a potent anorexic agent, decreases exploration and induces anxiety-like behavior in rats without altering learning or memory. *Brain Research.* 10. Dezember 2015;1629:171–81.
146. Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress.* 1. Juli 2013;16(4):452–60.
147. Xu YY, Ge JF, Qin G, Peng YN, Zhang CF, Liu XR, u. a. Acute, but not chronic, stress increased the plasma concentration and hypothalamic mRNA expression of NUCB2/nesfatin-1 in rats. *Neuropeptides.* 1. Dezember 2015;54:47–53.
148. Bamshad M, Song CK, Bartness TJ. CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol.* Juni 1999;276(6):R1569-1578.
149. Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol.* Juli 1998;275(1):R291-299.
150. Shi YC, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G, u. a. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab.* 5. Februar 2013;17(2):236–48.
151. Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman

JP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1. November 2006;291(5):E965–73.

152. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. August 1985;14(3):149–67.

153. Davis M, Falls WA, Campeau S, Kim M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. *Behav Brain Res*. 20. Dezember 1993;58(1–2):175–98.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: VERSUCHSTIER EINGESPANNT IM STEREOTAKTISCHEN APPARAT .....	26
ABBILDUNG 2: VERSUCHSTIER MIT ERÖFFNETER KOPFHAUT; DARSTELLUNG DES ORIENTIERUNGSPUNKTES BREGMA .....	26
ABBILDUNG 3: STEREOTAKTISCHE INJEKTION DES AAV IN DEN RECHTEN PVN .....	26
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MESSZEITPUNKTE FÜR DAS 24-STUNDEN-PROFIL DER NÄHRUNGS-AUFNAHME .....	27
ABBILDUNG 5: VERSUCHSTIER IM KALORIMETER .....	28
ABBILDUNG 6: INFRAROTBILD DER INTERSKAPULARREGION .....	30
ABBILDUNG 7: INFRAROTBILD DES GEHÖRGANGS .....	30
ABBILDUNG 8: INFRAROTBILD DES SCHWANZES .....	30
ABBILDUNG 9: GEHIRN, BEFESTIGT AN SCHNITTPLATTFORM IM KRYOSTAT .....	31
ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG DER mCHERRY EXPRESSION IM PVN IN DER FLUORESCENZMIKROSKOPIE (10-FACHE VERGRÖßERUNG) .....	32
ABBILDUNG 11: DARSTELLUNG DER mCHERRY EXPRESSION IN DER FLUORESCENZMIKROSKOPIE NACH DER ENTFERNUNG BEIDER PVN MITTELS LCM (10-FACHE VERGRÖßERUNG) .....	32
ABBILDUNG 12: PVN BEIDSEITIG VON SCHABLONE UMRANDET .....	33
ABBILDUNG 13: BEIDSEITIG AUSGESCHNITTENER PVN NACH LASER-MIKRODISSEKTION .....	33
ABBILDUNG 14: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE NÄHRUNGS-AUFNAHME; N = 3 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION) .....	39
ABBILDUNG 15: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DAS ZEITLICHE PROFIL DER NÄHRUNGS-AUFNAHME; N = 3 (IN WOCHE SIEBEN NACH VIRUSINJEKTION) .....	40
ABBILDUNG 16: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE WASSERAUFNAHME; N = 3 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION.) .....	41
ABBILDUNG 17: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE BLUTGLUKOSEKONZENTRATION, N = 6 .....	41
ABBILDUNG 18: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE NICHT-EVAPORATIVE WÄRMEABGABE IN WOCHE ZWEI NACH VIRUSINJEKTION; N = 6 (A: STÜNDLICH; B: DURCHSCHNITTLICH VON STUNDE ZWEI BIS ACHT) .....	42
ABBILDUNG 19: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE NICHT-EVAPORATIVE WÄRMEABGABE IN WOCHE VIER NACH VIRUSINJEKTION; N = 6 (A: STÜNDLICH; B: DURCHSCHNITTLICH VON STUNDE ZWEI BIS ACHT) .....	43
ABBILDUNG 20: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE NICHT-EVAPORATIVE WÄRMEABGABE IN WOCHE SECHS NACH VIRUSINJEKTION; N = 6; 5 (A: STÜNDLICH; B: DURCHSCHNITTLICH VON STUNDE ZWEI BIS ACHT) .....	43
ABBILDUNG 21: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE NICHT-EVAPORATIVE WÄRMEABGABE IN WOCHE ACHT NACH VIRUSINJEKTION; N = 6 (A: STÜNDLICH; B: DURCHSCHNITTLICH VON STUNDE ZWEI BIS ACHT) .....	44
ABBILDUNG 22: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KORRELATION DER NICHT-EVAPORATIVEN WÄRMEABGABE MIT DEM KÖRPERGEWICHTSVERLUST IM KALORIMETER (A: KONTROLLGRUPPE, N = 24, B: NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE, N = 23) .....	44
ABBILDUNG 23: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE IBAT-TEMPERATUR NACH VIRUSINJEKTION (A: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GETRENNT, N = 6; B: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GEMEINSAM, N = 12) .....	45
ABBILDUNG 24: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE GEHÖRGANGSTEMPERATUR NACH VIRUSINJEKTION (A: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GETRENNT, N = 6; B: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GEMEINSAM, N = 12) .....	46
ABBILDUNG 25: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE SCHWANZTEMPERATUR NACH VIRUSINJEKTION (A: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GETRENNT, N = 6; B: KONTROLL- UND NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE GEMEINSAM, N = 12) .....	47

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

ABBILDUNG 26: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KORRELATION VON IBAT- UND GEHÖRGANGSTEMPERATUR (A: KONTROLLGRUPPE, N = 24; B: NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE, N = 24) .....	47
ABBILDUNG 27: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KORRELATION VON IBAT- UND SCHWANZTEMPERATUR (A: KONTROLLGRUPPE, N = 24; B: NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE, N = 24) .....	48
ABBILDUNG 28: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KORRELATION VON GEHÖRGANGS- UND SCHWANZTEMPERATUR (A: KONTROLLGRUPPE, N = 24; B: NUCB2-KNOCKDOWNGRUPPE, N = 24) .....	48
ABBILDUNG 29: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DAS KÖRPERGEWICHT, N = 6 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION) .....	49
ABBILDUNG 30: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE MUSKELMASSE, N = 4 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION.) .....	50
ABBILDUNG 31: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE FREIE FLÜSSIGKEIT, N = 4 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION.) .....	50
ABBILDUNG 32: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE FETTMASSE, N = 4 (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER VIRUSINJEKTION.) .....	51
ABBILDUNG 33: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE LIPIDKONZENTRATIONEN IM SERUM ZEHN WOCHEN NACH VIRUSINJEKTION. DIE DARSTELLUNG DER DURCHSCHNITTSWERTE ERFOLGT ALS HEATMAP FÜR ALLE 99 ANALYSIERTEN LIPIDE, N = 6 .....	52
ABBILDUNG 34: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE LIPIDKONZENTRATIONEN IM SERUM ZEHN WOCHEN NACH VIRUSINJEKTION. DARGESTELLT SIND ALLE WERTE BEIDER GRUPPEN ALS HEATMAP FÜR DIE 13 INITIAL ALS SIGNIFIKANT VERÄNDERT IDENTIFIZIERTEN LIPIDE, N = 6 .....	53
ABBILDUNG 35: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE STRESSINDUZIERTER THERMOGENESE DES IBAT, N = 6 (A: TEMPERATUR ABSOLUT (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER STRESSAPPLIKATION.); B: TEMPERATUR RELATIV ZUM AUSGANGSWERT) .....	54
ABBILDUNG 36: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE GEHÖRGANGSTEMPERATUR BEI STRESSINDUZIERTER THERMOGENESE, N = 6 (A: TEMPERATUR ABSOLUT (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER STRESSAPPLIKATION.); B: TEMPERATUR RELATIV ZUM AUSGANGSWERT) .....	55
ABBILDUNG 37: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE SCHWANZTEMPERATUR BEI STRESSINDUZIERTER THERMOGENESE, N = 6 (A: TEMPERATUR ABSOLUT (DER PFEIL SYMBOLISIERT DEN ZEITPUNKT DER STRESSAPPLIKATION.); B: TEMPERATUR RELATIV ZUM AUSGANGSWERT) .....	56
ABBILDUNG 38: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DAS NEBENNIERENGEWICHT, N = 6 (A: IN G; B: IN % DES KÖRPERGEWICHTS) .....	56
ABBILDUNG 39: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KORRELATION VON NEBENNIERENGEWICHT UND STRESSANTWORT FÜR ALLE VERSUCHSTIERE, N=12 (A: IBAT TEMPERATUR ABSOLUT; B: IBAT TEMPERATUR RELATIV ZUM AUSGANGSWERT) .....	57
ABBILDUNG 40: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE KONZENTRATION VON CORTICOSTERON IM PLASMA, N = 4; 6 .....	57
ABBILDUNG 41: EFFEKT DES NUCB2-KNOCKDOWN AUF DIE MRNA-EXPRESSION IM PVN, N = 6; 5 .....	58
ABBILDUNG 42: VEKTORKARTE NUCB2 SHRNA AAV .....	99
ABBILDUNG 43: VEKTORKARTE SCRAMBLE SHRNA AAV (KONTROLLVIRUS) .....	100
ABBILDUNG 44: NAHRUNGS-AUFNAHME VOR VIRUSINJEKTION, N = 3 .....	102
ABBILDUNG 45: WASSER-AUFNAHME VOR VIRUSINJEKTION, N = 3 .....	102
ABBILDUNG 46: KÖRPERGEWICHT VOR VIRUSINJEKTION, N = 6 .....	102

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MESSRHYTHMUS .....	27
TABELLE 2: PRIMERSEQUENZEN FÜR QRT-PCR .....	35
TABELLE 3: VEKTORKOMPONENTEN, VECTORBUILDER ID: VB160923-1095TCZ .....	100
TABELLE 4: VEKTORKOMPONENTEN, VECTORBUILDER ID: VB170608-1007XYN.....	101
TABELLE 5: VERWENDETE GERÄTE .....	104
TABELLE 6: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	105
TABELLE 7: CDNA PRIMER MIX .....	106
TABELLE 8: CDNA MASTERMIX.....	106
TABELLE 9: QRT-PCR MASTERMIX .....	106
TABELLE 10: TNT EXTRAKTIONSPUFFER.....	106
TABELLE 11: ZUSAMMENFASSUNG STATISTISCHE AUSWERTUNG (ANOVA).....	110
TABELLE 12: ZUSAMMENFASSUNG KORRELATIONEN (AUßER LIPIDOM) .....	112
TABELLE 13: ÜBERSICHT DER KORRELATIONEN VON LIPIDOM UND PHÄNOTYP .....	114
TABELLE 14: AUFLISTUNG ALLER KORRELATIONEN VON LIPIDOM UND PHÄNOTYP .....	120
TABELLE 15: ZUSAMMENFASSUNG STATISTISCHE AUSWERTUNG (POST-HOC HOLM SIDAK ODER STUDENT'S T-TEST) .....	127

## 9 Anhang

### 9.1 Überprüfung der Stressreaktion

#### 9.1.1 *Elevated plus maze test (EPM)*

Der EPS-Test stellt den Goldstandard zur Überprüfung der nicht-erlernten Angstreaktion dar. Hierfür wird eine plusförmige (+) Platte ca. 50 cm über dem Boden aufgestellt. Zwei Arme der Platte sind dabei durch Seitenwände geschlossen, während die anderen beiden zu den Seiten offen sind und somit nur aus einem Boden bestehen.

Der Test selbst basiert auf der natürlichen Aversion zu offenen Flächen, welche Nagetiere (Der Test ist für Ratten und Mäuse validiert) aufweisen. Somit weisen die Versuchstiere eine Präferenz für die durch Seitenwände geschützten Seitenarme auf.

Durch die Erfassung der Zeit, die in den offenen oder geschlossenen Seitenarmen verbracht wird sowie der Anzahl des Betretens von selbigen und deren Relationen zueinander, können Rückschlüsse auf die Angstreaktion gewonnen werden (152).

#### 9.1.2 *Fear-potentiated startle*

Bei der Überprüfung der erlernten Angstreaktion findet der FPS-Test Anwendung. In der Regel wird hierbei mittels Konditionierung ein neutraler Reiz mit einem angstausslösenden Reiz verknüpft (häufig auditive Reize und elektrische Stromschläge). Anschließend kann die ausgelöste Stressreaktion gemessen werden (z.B. Herzfrequenz oder Lidschlagrate) (153).

## 9.2 Vektorkarten

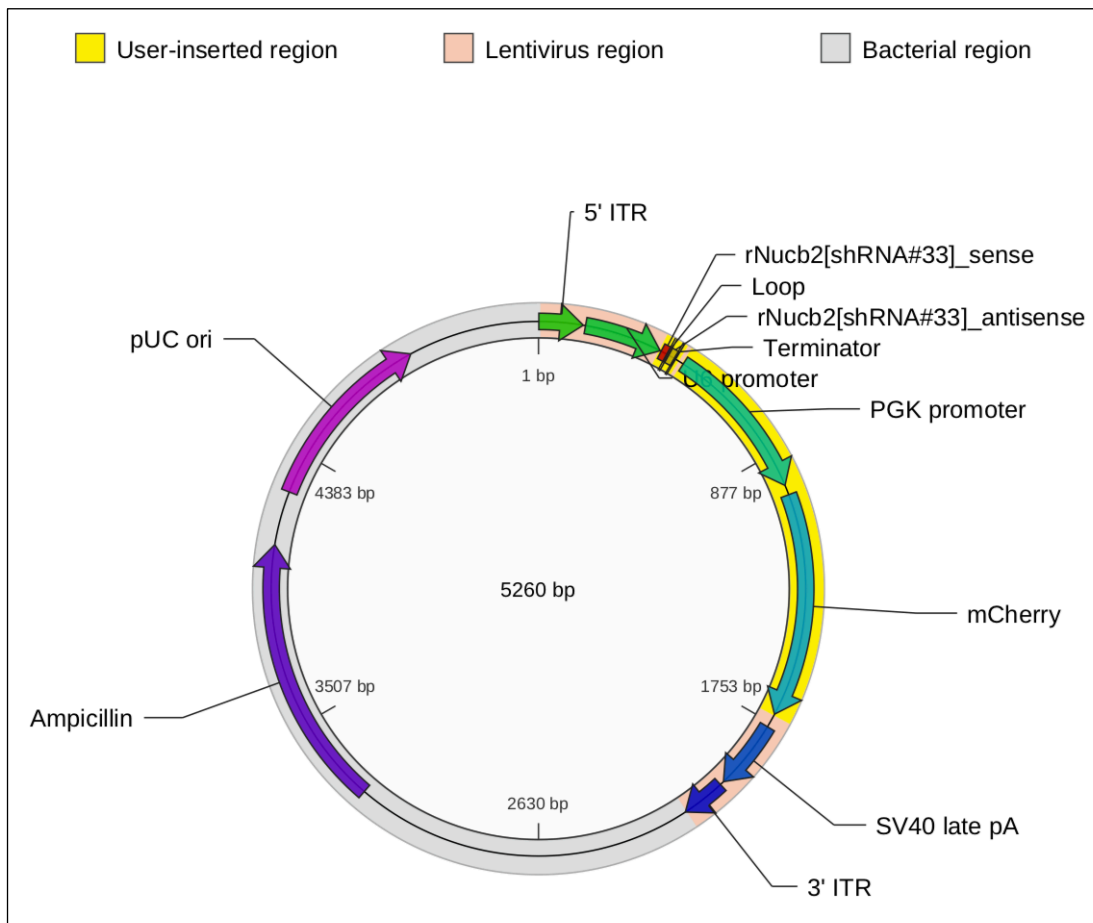


Abbildung 42: Vektorkarte Nucb2 shRNA AAV

Bezeichnung	Nukleotid Position	Vollständiger Name	Beschreibung
5' ITR	1-141	5' inverted terminal repeat	Serve as the origin of viral genome replication.
U6 promoter	148-396	Human U6 promoter	Allows high-level expression of shRNA in mammalian cell lines.
rNucb2 [shRNA#33]_sense	399-419	rNucb2 [shRNA#33]_sense	Compound entered by user
Loop	420-425	Loop	Compound entered by user
rNucb2 [shRNA#33]_antisense	426-446	rNucb2 [shRNA#33]_antisense	Compound entered by user
Terminator	447-451	Terminator	Compound entered by user

## Anhang

Bezeichnung	Nukleotid Position	Vollständiger Name	Beschreibung
PGK Promoter	479-983	Human phosphoglycerate kinase promoter	Allows high-level expression of the selection marker in mammalian cell lines.
mCherry	1014-1724	mCherry reporter gene	Allows to select stable expression clones through monitoring with mCherry fluorescent.
SV40 late PA	1769-1990	SV40 late polyadenation signal	Allows transcription termination and polyadenylation of mRNA.
3' ITR	2003-2143	3' inverted terminal repeat	Serves as the origin of viral genome replication.
Ampicillin	3224-4084	Ampicillin resistance gene	Allows selection of the plasmid in E. coli.
pUC ori	4255-4843	pUC origin of replication	Permits high-copy replication and maintenance in E. coli.

Tabelle 3: Vektorkomponenten, VectorBuilder ID: VB160923-1095tcz

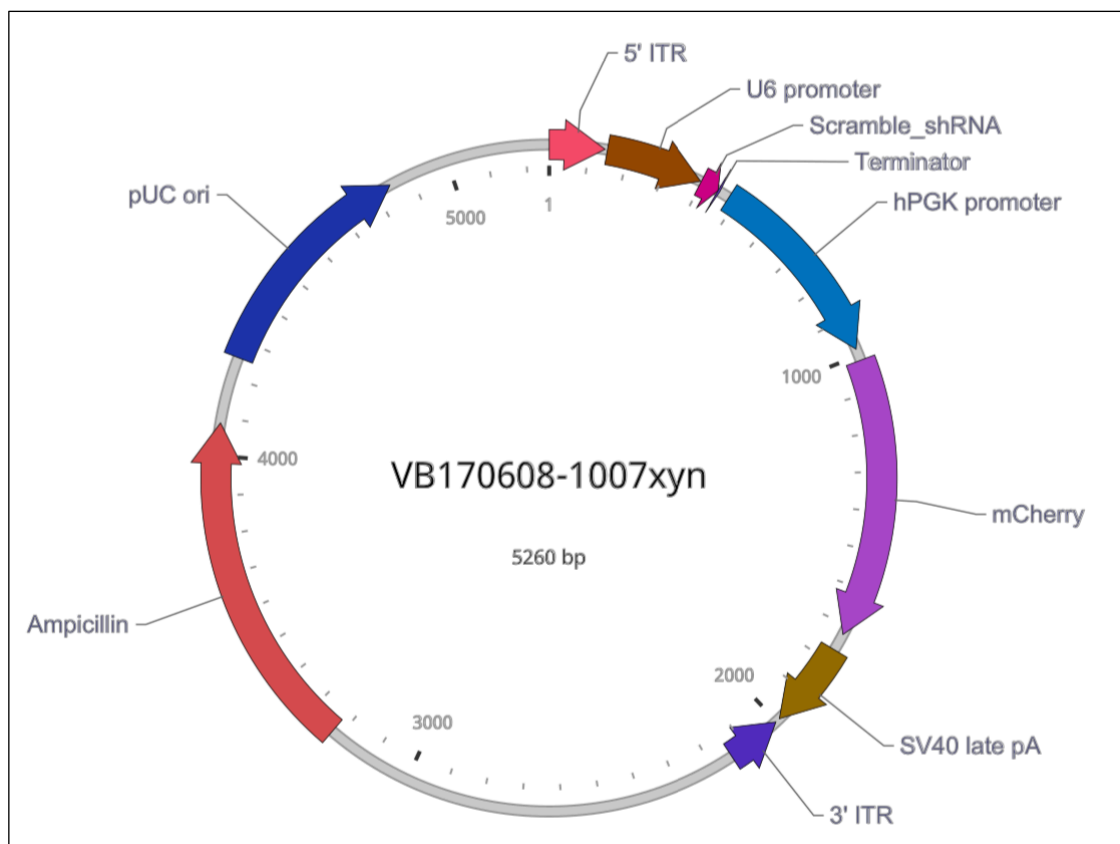


Abbildung 43: Vektorkarte scramble shRNA AAV (Kontrollvirus)

Bezeichnung	Nukleotid Position	Vollständiger Name	Beschreibung
5' ITR	1-141	AAV 5' inverted terminal repeat	Allows replication of the viral genome and its packaging into virus.
U6 promoter	148-396	Human U6 small nuclear 1 promoter	Pol III promoter; drives expression of small RNAs.
Scramble_shRNA	399-446	None	Target: None in human and mouse.
Terminator	447-451	Pol III transcription Terminator	Allows transcription termination of small RNA transcribed by Pol III RNA polymerase.
hPGK Promoter	479-983	Human phosphoglycerate kinase 1 promoter	Medium-strength promoter.
mCherry	1014-1724	Variant of mRFP1 generated by mutagenesis	Commonly used red fluorescent protein; fast maturation compared to its predecessor, mRFP1.
SV40 late PA	1769-1990	Simian virus 40 late polyadenylation signal.	Allows transcription termination and polyadenylation of mRNA transcribed by Pol II RNA polymerase.
3' ITR	2003-2143	AAV 3' inverted terminal repeat	Allows replication of the viral genome and its packaging into virus.
Ampicillin	3224-4084	Ampicillin resistance gene	Allows E. coli to be resistant to ampicillin.
pUC ori	4255-4843	pUC origin of replication	Facilitates plasmid replication in E. coli; regulates high-copy plasmid number (500-700).

Tabelle 4: Vektorkomponenten, VectorBuilder ID: VB170608-1007xyn

### 9.3 Nahrungsaufnahme, Wasseraufnahme und Körpergewicht vor Virusinjektion

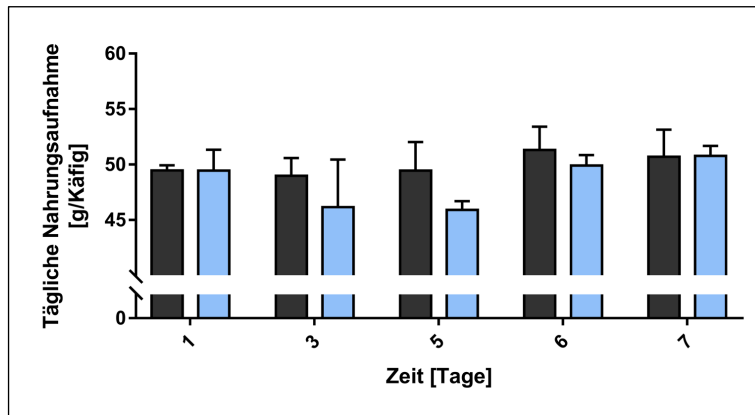


Abbildung 44: Nahrungsaufnahme vor Virusinjektion, n = 3

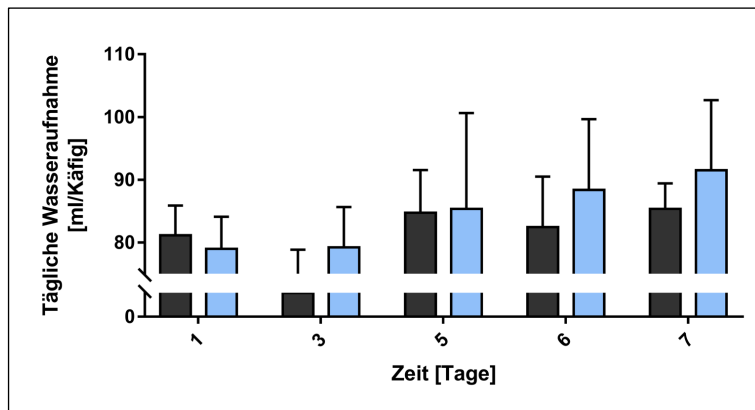


Abbildung 45: Wasseraufnahme vor Virusinjektion, n = 3

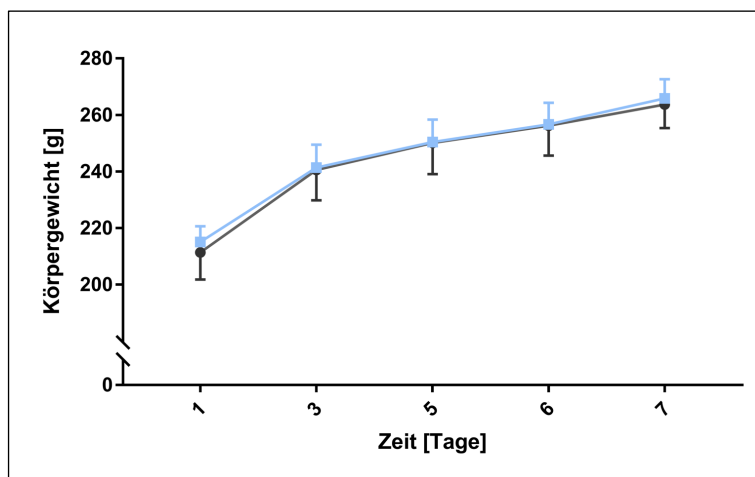


Abbildung 46: Körpergewicht vor Virusinjektion, n = 6

## 9.4 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Modell / Art / Handelsname	Hersteller / Lieferant	Ort	Land
Versuchstiere	Männliche Wistar Ratten	Charles River Laboratories	Sulzfeld	Deutschland
ICV Kunststoffkäfige	GR 1800 Doppeldecker	TECNIPLAST S.p.A.	Buguggiate	Italien
Futter für Nagetiere	Altromin TM 1324	Altromin	Lage	Deutschland
Stereotaktischer Apparat		Kopf Instruments	Tujunga, CA	USA
Wärmematte	Thermolux TM Wärmeunterlagen	Witte + Sutor GmbH	Murrhardt	Deutschland
Bohrer	Dremel 200	Dremel Europe, Robert Bosch Power Tools GmbH	Leinfelden-Echteringen	Deutschland
Infrarot-Thermographie Kamera	FLIR A65	FLIR Systems Inc.	Wilsonville	USA
Rasierer	Aesculap Spezial GT416	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	Deutschland
MRT	The Minispec LF110	Bruker Biospin GmbH	Rheinstetten	Deutschland
Voltmeter	Voltcraft 820	Conrad Electronic SE	Hirschberg	Deutschland
Spannungsquelle	Bio-Rad PowerPac TM Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	Deutschland
Membranpumpe	M2K3 Deluxe	Schemel & Goetz GmbH	Offenbach am Main	Deutschland
Durchflussmesser	TSI4140 Flowmeter mit LCD	Driesen + Kern GmbH	Bad Bramstedt	Deutschland
Blutzuckermessgerät	Accu Check TM Aviva	Roche Diabetes Care Deutschland GmbH	Mannheim	Deutschland
Kryostat	Leica CM 3050S	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch	Deutschland
Laser-Mikroskop	PALM Robo 4.8 Pro	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland
Laser-Mikroskop	PALM Micro Beam	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Deutschland

## Anhang

Bezeichnung	Modell / Art / Handelsname	Hersteller / Lieferant	Ort	Land
Zentrifuge	Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Thermocycler	Tgradient	Biometra GmbH	Göttingen	Deutschland
Thermocycler	ABI PRISM TM 7000 Sequence Detection System, Sequence Detection Software 1.2.3.	Applied Biosystems	Darmstadt	Deutschland
LC mit Massenspektrometer	Thermo Scientific Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap	Fisher Scientific GmbH	Schwerte	Deutschland
Schüttelinkubator	Eppendorf Thermomixer TM	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Vakuumkonzentrator	Savant TM SPD131DDA SpeedVac TM -Konzentrator	Fisher Scientific GmbH	Hamburg	Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific Germany BV&CoKG	Karlsruhe	Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMI AF6000	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar	Deutschland

*Tabelle 5: Verwendete Geräte*

Bezeichnung	Artikel / Art / Handelsname	Hersteller	Ort	Land
AAV Serotyp 2 (Nucb2)	Item: VB160923-1095tcz	VectorBuilder	Neu-Isenburg	Deutschland
AAV Serotyp 2 (scramble)	Item: VB170608-1007xyn	VectorBuilder	Neu-Isenburg	Deutschland
NucleoBond TM Xtra Maxi	Nr.: 740414.100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland
NucleoBond TM Xtra Column Filter		Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland

Bezeichnung	Artikel / Art / Handelsname	Hersteller	Ort	Land
Sepharose Säule	AVB Sepharose High Performance, 28-4112-11	VWR International GmbH	Hannover	Deutschland
Amicon Ultra 4 Centrifugal Filter		Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Acrodisc TM Syringe Filter		Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Ketamin	Ketamin 10 %	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH	Ascheberg	Deutschland
Xylazin	Xylazin 2 %	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH	Ascheberg	Deutschland
Emla Creme	25mg/g Lidocain + 25mg/g Prilocain	EMRA-MED Arzneimittel GmbH	Trittau	Deutschland
Einbettmedium	Tissue-Tek O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek Europe	Alphen aan den Rijn	Niederlande
Membranobjektträger	MembranSlide 1.0 PEN	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Göttingen	Deutschland
Objektträger	Superfrost TM Plus Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG	Braunschweig	Deutschland
Absolutly RNA Nanoprep Kit		Agilent Technologies Deutschland GmbH	Waldbronn	Deutschland
cDNA Synthese Kit	Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit Part. No. 12328.pps	Invitrogen	Darmstadt	Deutschland
Radioimmunoassay	Corticosterone Double Antibody RIA Kit	MP Biomedicals	Eschwege	Deutschland

*Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien*

## 9.5 Pipettierschemata

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
Oligo(dt)20-Primer	1,0	5x cDNA Synthesis	4,0
RNA	9,0	Buffer	
10 mM dNTP Mix	2,0	0,1 M DTT	1,0
		RNaseOUT™	1,0
		DEPC-treated Water	1,0
		Clones AMV RT (15 units/ $\mu$ l)	1,0

*Tabelle 7: cDNA Primer Mix*

*Tabelle 8: cDNA Mastermix*

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Komponente	Volumen [ml]
Platinum® SYBR®	25,0	1 M TRIS-HCl (ph 7,5)	20
Green qRT-PCR		1 M NaCl	150
SuperMix UDG		1 M MgCl <sub>2</sub>	10
Vorwärts-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	10 % Triton X-100	100
Rückwärts-Primer (10 $\mu$ M)	1,0	Wasser	720
DEPC-Wasser	13,0		

*Tabelle 10: TNT Extraktionspuffer*

*Tabelle 9: qRT-PCR Mastermix*

## 9.6 Herstellung 2x BBS, TE und DEPC

2x BBS:

- 1,7 g BES, 50 mM
- 1,63 g NaCl, 280 mM
- 0,0267 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,5 mM
- 100 ml Wasser
- 15 Minuten rühren

- Zugabe von NaOH bis pH 6,95
- 15 Minuten rühren
- Steril filtrieren

Tris-EDTA- (TE-) Puffer:

- Lösen von 1,21 g Trizma<sup>®</sup> Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, MERCK Darmstadt) in 80 ml DEPC-Wasser (rühren)
- Zugabe 1 M HCl bis pH = 7,5
- Lösen 3,72 g EDTA (Sigma) in 100 ml Wasser (rühren)
- Zugabe von 1 M HCl bis pH = 8,0
- Mischen beider Lösungen
- pH-Wert bestimmen, Zugabe von 1 M HCl bis pH = 7,4
- Mit DEPC-Wasser auf 1 l auffüllen

DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) Wasser:

- 500 µl DEPC unter Abzug in 500 ml Aqua bidest. geben und gut schütteln
- Einen Tag lang verschlossen im Abzug stehen lassen
- Bei 121 °C 20 Minuten lang autoklavieren

## 9.7 Statistische Auswertung

	Abb. Nr.	Zeitpunkt	Statistischer Test	n	Genotyp			Zeit			Interaktion		
					F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
Nahrungsaufnahme	44	vor Virusinjektion	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 2,27	0,2061	n.s	F(4,16) = 3,95	0,0204	s.	F(4,16) = 1,10	0,3887	n.s.
	14	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 4,66	0,0970	n.s	F(7,28) = 17,84	< 0,0001	s.	F(7,28) = 3,91	0,0043	s.
Zeitliches Profil der Nahrungsaufnahme	15	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 2,03	0,2279	n.s	F(7,28) = 26,15	< 0,0001	s.	F(7,28) = 1,27	0,2994	n.s
	15	Dunkelphase	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 0,23	0,6592	n.s	F(3,12) = 18,82	< 0,0001	s.	F(3,12) = 0,18	0,9105	n.s
	15	Hellphase	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 2,38	0,1978	n.s	F(3,12) = 18,56	< 0,0001	s.	F(3,12) = 3,48	0,0505	n.s
Wasseraufnahme	45	vor Virusinjektion	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 0,22	0,6613	n.s	F(4,16) = 9,23	0,0005	s.	F(4,16) = 1,45	0,2636	n.s
	16	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	3	F(1,4) = 0,48	0,5277	n.s	F(7,28) = 5,37	0,0006	s.	F(7,28) = 0,78	0,6073	n.s
Direkte Kalorimetrie Woche 2	18	Stunde 2 - 8	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,56	0,4697	n.s	F(6,60) = 7,96	< 0,0001	s.	F(6,60) = 2,59	0,0270	s.

	Abb. Nr.	Zeitpunkt	Statistischer Test	n	Genotyp			Zeit			Interaktion		
					F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
<b>Direkte Kalorimetrie Woche 4</b>	19	Stunde 2 - 8	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,05	0,8307	n.s	F(6,60) = 3,16	0,0093	s.	F(6,60) = 0,25	0,9576	n.s
<b>Direkte Kalorimetrie Woche 6</b>	20	Stunde 2 - 8	ANOVA mit Messwiederholungen	6; 5	F(1,9) = 28,4	0,0005	s.	F(6,54) = 9,31	< 0,0001	s.	F(6,54) = 0,26	0,9535	n.s
<b>Direkte Kalorimetrie Woche 8</b>	21	Stunde 2 - 8	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,18	0,6844	n.s	F(6,60) = 5,10	0,0003	s.	F(6,60) = 1,31	0,2676	n.s
<b>Infrarot-Thermographie iBAT</b>	23 A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,08	0,7829	n.s	F(3,30) = 40,61	< 0,0001	s.	F(3,30) = 0,69	0,5671	n.s
<b>Infrarot-Thermographie Gehörgang</b>	24 A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 1,84	0,2043	n.s	F(3,30) = 19,89	< 0,0001	s.	F(3,30) = 0,19	0,9051	n.s
<b>Infrarot-Thermographie Schwanz</b>	25 A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,37	0,5541	n.s	F(3,30) = 17,01	< 0,0001	s.	F(3,30) = 0,46	0,7105	n.s
<b>Körpergewicht</b>	46	vor Virusinjektion	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,09	0,7650	n.s	F(4,40) = 1075,8	< 0,0001	s.	F(4,40) = 1,40	0,2513	n.s
	29	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 5,68	0,0384	s.	F(10,100) = 426,8	< 0,0001	s.	F(10,100) = 4,51	< 0,0001	s.
<b>Muskelmasse</b>	30	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	4	F(1,6) = 0,23	0,6476	n.s	F(4,24) = 29,13	< 0,0001	s.	F(4,24) = 0,89	0,4845	n.s

Anhang

	Abb. Nr.	Zeitpunkt	Statistischer Test	n	Genotyp			Zeit			Interaktion		
					F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
<b>Freie Flüssigkeit</b>	31	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	4	F(1,6) = 26,11	0,0022	s.	F(4,24) = 43,21	< 0,0001	s.	F(4,24) = 1,86	0,1502	n.s
<b>Fettmasse</b>	32	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	4	F(1,6) = 12,17	0,0130	s.	F(4,24) = 26,34	< 0,0001	s.	F(4,24) = 4,62	0,0066	s.
<b>Stressthermo. iBAT (absolut)</b>	35A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 12,18	0,0058	s.	F(3,30) = 3,78	0,0205	s.	F(3,30) = 1,61	0,2064	n.s
<b>Stressthermo. Gehörgang (absolut)</b>	36A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 10,56	0,0087	s.	F(3,30) = 8,17	0,0004	s.	F(3,30) = 1,66	0,1959	n.s
<b>Stressthermo. Schwanz (absolut)</b>	37A	gesamter Versuch	ANOVA mit Messwiederholungen	6	F(1,10) = 0,08	0,7813	n.s	F(3,30) = 3,56	0,0257	s.	F(3,30) = 1,07	0,3756	n.s

*Tabelle 11: Zusammenfassung statistische Auswertung (ANOVA)*

Gruppe	Korrelation	Abb. Nr.	Koeffizient	r-Wert	95 % Konfidenzintervall	r <sup>2</sup> -Wert	p-Wert	Signifikanz	n
Kontrolle	Körpergewichtsverlust - Wärmeproduktion (Stunde 1-8)	keine	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,2667	-0,1532 - 0,605	0,07111	0,2078	n.s.	24
	Körpergewichtsverlust - Wärmeproduktion (Stunde 2-8)	22 A	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,2095	-0,2118 - 0,5651	0,0439	0,3258	n.s.	24
NUCB2-Knockdown	Körpergewichtsverlust - Wärmeproduktion (Stunde 1-8)	keine	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,6881	0,3852 - 0,8572	0,4735	0,0003	s.	23
	Körpergewichtsverlust - Wärmeproduktion (Stunde 2-8)	22 B	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,678	0,3689 - 0,8521	0,4597	0,0004	s.	23
Kontrolle	iBAT-Temperatur - Gehörgangstemperatur	26 A	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,5205	0,1482 - 0,7636	0,2709	0,0091	s.	24
	iBAT-Temperatur - Schwanztemperatur	27 A	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,4224	0,02289 - 0,7056	0,1784	0,0398	s.	24
	Gehörgangstemperatur - Schwanztemperatur	28 A	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,323	-0,09249 - 0,6426	0,1043	0,1237	n.s.	24
NUCB2-Knockdown	iBAT-Temperatur - Gehörgangstemperatur	26 B	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,5463	0,1833 - 0,7782	0,2984	0,0057	s.	24

Anhang

Gruppe	Korrelation	Abb. Nr.	Koeffizient	r-Wert	95 % Konfidenzintervall	r <sup>2</sup> -Wert	p-Wert	Signifikanz	n
	iBAT-Temperatur - Schwanztemperatur	27 B	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,5519	0,191 - 0,7813	0,3046	0,0052	s.	24
	Gehörgangstemperatur - Schwanztemperatur	28 B	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,3815	-0,02586 - 0,6802	0,1456	0,0658	n.s.	24
Alle Tiere	Nebennierengewicht - iBAT Temperaturanstieg (absolut) 30 min nach Stress	47 A	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,3334	-0,2974 - 0,7616	0,1112	0,2896	n.s.	12
	Nebennierengewicht - iBAT Temperaturanstieg (relativ) 30 min nach Stress	47 B	Pearsons Korrelationskoeffizient	0,4561	-0,1596 - 0,8163	0,208	0,1362	n.s.	12

*Tabelle 12: Zusammenfassung Korrelationen (außer Lipidom)*

Lipid	Zunahme des Körpergewichts				Zunahme der Fettmasse				Blutglukosekonzentration			
	n	Anzahl analysierter Lipide	Anzahl signifikanter r-Werte	%	n	Anzahl analysierter Lipide	Anzahl signifikanter r-Werte	%	n	Anzahl analysierter Lipide	Anzahl signifikanter r-Werte	%
Acylcarnitine	12	5	1	20	12	5	0	0	12	5	0	0
Cholesterylester	12	3	0	0	12	3	0	0	12	3	0	0
Ceramide	12	6	4	67	12	6	0	0	12	6	0	0
Glucosylceramide	12	3	0	0	12	3	0	0	12	3	0	0
Lysophosphatidylcholine	12	19	3	16	12	19	2	11	12	19	3	16
Lysophosphatidylethanolamine	12	5	3	60	12	5	1	20	12	5	3	60
Phosphatidylcholine	12	32	20	63	12	32	9	28	12	32	12	38
Phosphatidylethanolamine	12	5	1	20	12	5	0	0	12	5	0	0
Phosphatidylinositole	12	6	2	33	12	6	2	33	12	6	3	50
Sphingomyeline	12	15	4	27	12	15	0	0	12	15	1	7

Tabelle 13: Übersicht der Korrelationen von Lipidom und Phänotyp

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
<b>Acylcarnitine</b>									
AcCa (14:0)	-0,0023	0,9943	ns	0,3413	0,4079	ns	0,08117	0,802	ns
AcCa (16:0)	-0,4144	0,1805	ns	-0,01659	0,9689	ns	-0,3368	0,2844	ns
AcCa (16:1)	0,1834	0,5684	ns	0,6945	0,0559	ns	0,3212	0,3086	ns
AcCa (18:0)	-0,4875	0,1079	ns	-0,2067	0,6234	ns	-0,2281	0,4759	ns
AcCa (24:0)	-0,5909	0,0431	*	-0,4098	0,3134	ns	-0,2111	0,5102	ns
<b>Cholesterylester</b>									
CE (18:1)	0,1247	0,6993	ns	0,2278	0,5873	ns	0,3407	0,2786	ns
CE (18:2)	-0,0041	0,9898	ns	0,248	0,5537	ns	0,1138	0,7247	ns
CE (20:4)	-0,4628	0,1298	ns	-0,4255	0,2933	ns	-0,3196	0,3112	ns
<b>Ceramide</b>									
Cer (d40:1) (d18:1/22:0)	0,5416	0,069	ns	0,3192	0,4409	ns	0,2064	0,5198	ns

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
Cer (d42:1) (d18:1/24:0)	0,6055	0,0369	*	0,4007	0,3252	ns	0,3075	0,3308	ns
Cer (d42:2) (d18:1/24:1)	0,6824	0,0145	*	0,4684	0,2417	ns	0,3342	0,2884	ns
Cer (d42:3) (d18:1/24:2)	0,7563	0,0044	**	0,4141	0,3077	ns	0,3205	0,3098	ns
Cer (d42:3) (d18:2/24:1)	0,7566	0,0044	**	0,4135	0,3085	ns	0,3205	0,3098	ns
Cer (t42:0) (t18:0/24:0)	0,4613	0,1312	ns	0,1206	0,776	ns	0,496	0,101	ns
<b>Glucosylceramide</b>									
CerG (d40:1) (d18:1/22:0)	0,2739	0,389	ns	0,2158	0,6078	ns	0,217	0,4981	ns
CerG (d41:1) (d18:1/23:0)	0,3632	0,2459	ns	0,2337	0,5775	ns	0,3346	0,2878	ns
CerG (d42:1) (d18:1/24:0)	0,2224	0,4873	ns	0,1838	0,6631	ns	0,2223	0,4874	ns
<b>Lysophosphatidyl- choline</b>									
LPC (14:0)	0,3965	0,202	ns	0,288	0,4891	ns	0,5011	0,097	ns
LPC (14:1)	0,5756	0,0502	ns	0,5055	0,2013	ns	0,4711	0,1221	ns

Anhang

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
LPC (15:1)	0,0673	0,8353	ns	-0,3276	0,4283	ns	0,07858	0,8082	ns
LPC (16:0)	0,2567	0,4206	ns	-0,1389	0,743	ns	0,3651	0,2432	ns
LPC (16:1)	0,6685	0,0175	*	0,7136	0,0468	*	0,602	0,0383	*
LPC (17:0)	-0,0898	0,7813	ns	-0,3159	0,4459	ns	0,112	0,729	ns
LPC (18:0)	0,03303	0,9188	ns	-0,0545	0,8981	ns	0,177	0,5821	ns
LPC (18:1)	0,6234	0,0303	*	0,6224	0,0994	ns	0,6571	0,0203	*
LPC (18:2)	0,6171	0,0326	*	0,8206	0,0126	*	0,6213	0,031	*
LPC (19:0)	-0,1521	0,637	ns	-0,2568	0,5393	ns	0,156	0,6283	ns
LPC (19:1)	0,1162	0,7191	ns	-0,2551	0,542	ns	0,3122	0,3233	ns
LPC (20:1)	-0,1506	0,6403	ns	-0,4026	0,3227	ns	0,09249	0,775	ns
LPC (20:4)	-0,0903	0,7802	ns	-0,5942	0,1203	ns	0,0398	0,9023	ns
LPC (22:0)	-0,0058	0,9858	ns	-0,05264	0,9015	ns	0,2944	0,3529	ns
LPC (22:6)	0,3119	0,3236	ns	-0,4211	0,2988	ns	0,2863	0,3669	ns
LPC (24:0)	-0,1798	0,576	ns	-0,2645	0,5267	ns	0,08143	0,8014	ns

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
LPC (24:1)	-0,4089	0,1869	ns	-0,3275	0,4284	ns	-0,0521	0,8723	ns
LPC (24:5)	0,4234	0,1702	ns	-0,4358	0,2805	ns	0,3623	0,2472	ns
LPC (24:6)	0,5655	0,0553	ns	0,4887	0,2191	ns	0,4778	0,1162	ns
<b>Lysophosphatidyl-ethanolamine</b>									
LPE (16:0)	0,7955	0,002	**	0,6979	0,0543	ns	0,6475	0,0228	*
LPE (18:1)	0,8181	0,0011	**	0,7696	0,0255	*	0,6982	0,0116	*
LPE (18:2)	0,736	0,0064	**	0,6596	0,0751	ns	0,5863	0,0451	*
LPE (20:4)	0,2589	0,4164	ns	0,116	0,7844	ns	-0,0091	0,9776	ns
LPE (22:6)	0,1849	0,565	ns	-0,4137	0,3083	ns	0,1121	0,7287	ns
<b>Phosphatidylcholine</b>									
PC (30:0)	0,7733	0,0032	**	0,5432	0,1641	ns	0,5114	0,0893	ns
PC (30:1)	0,6997	0,0113	*	0,6081	0,1097	ns	0,4739	0,1196	ns
PC (30:2)	0,658	0,02	*	0,6471	0,0828	ns	0,4652	0,1275	ns
PC (31:1)	0,7836	0,0026	**	0,8074	0,0154	*	0,6132	0,034	*
PC (32:0)	0,7994	0,0018	**	0,2978	0,4737	ns	0,5709	0,0525	ns
PC (32:1)	0,7031	0,0108	*	0,6808	0,0631	ns	0,4918	0,1044	ns
PC (32:2)	0,7402	0,0059	**	0,6868	0,0599	ns	0,6359	0,0262	*

Anhang

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
PC (33:1)	0,7813	0,0027	**	0,8517	0,0073	**	0,6387	0,0254	*
PC (33:2)	0,1648	0,6087	ns	-0,0079	0,9852	ns	0,2175	0,4971	ns
PC (34:0)	0,6857	0,0138	*	0,3167	0,4447	ns	0,4935	0,103	ns
PC (34:1)	0,8603	0,0003	***	0,7856	0,0208	*	0,6416	0,0245	*
PC (34:2)	0,8112	0,0014	**	0,6118	0,107	ns	0,5218	0,0818	ns
PC (34:3)	0,6843	0,0141	*	0,6501	0,081	ns	0,5236	0,0806	ns
PC (34:4)	0,4758	0,1179	ns	0,01252	0,9765	ns	0,4139	0,181	ns
PC (35:1)	0,7374	0,0062	**	0,8272	0,0113	*	0,6682	0,0175	*
PC (35:2)	0,4416	0,1506	ns	0,4379	0,2779	ns	0,4487	0,1434	ns
PC (36:0)	0,4258	0,1675	ns	0,2107	0,6164	ns	0,3014	0,3411	ns
PC (36:1)	0,5912	0,0429	*	0,7018	0,0523	ns	0,4363	0,1562	ns
PC (37:1)	0,6945	0,0122	*	0,7706	0,0252	*	0,6462	0,0232	*
PC (37:2)	0,5702	0,0529	ns	0,6241	0,0982	ns	0,5927	0,0423	*
PC (37:4)	-0,1082	0,7379	ns	-0,5341	0,1727	ns	-0,06559	0,8395	ns
PC (40:1)	0,8208	0,0011	**	0,7479	0,0329	*	0,7156	0,0089	**
PC (40:2)	0,8205	0,0011	**	0,7849	0,021	*	0,7442	0,0055	**
PC (40:8)	0,0503	0,8767	ns	-0,3071	0,4594	ns	-0,0010	0,9975	ns
PC (41:2)	0,6893	0,0132	*	0,8297	0,0108	*	0,6678	0,0176	*
PC (42:10)	0,0778	0,81	ns	-0,2289	0,5856	ns	0,0241	0,9407	ns

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
PC (42:2)	0,8082	0,0015	**	0,7885	0,0201	*	0,7477	0,0052	**
PC (42:3)	0,864	0,0003	***	0,6789	0,0641	ns	0,8191	0,0011	**
PC (42:9)	0,3735	0,2317	ns	0,2541	0,5437	ns	0,3261	0,3009	ns
PC (44:12)	-0,0496	0,8783	ns	-0,06662	0,8755	ns	-0,186	0,5628	ns
PC (44:4)	0,1199	0,7106	ns	-0,2407	0,5658	ns	0,1066	0,7416	ns
PC (44:5)	0,0899	0,7811	ns	-0,4481	0,2655	ns	0,1138	0,7246	ns
<b>Phosphatidyl-ethanolamine</b>									
PE (36:1)	0,6745	0,0161	*	0,241	0,5653	ns	0,508	0,0917	ns
PE (36:2)	0,5036	0,0951	ns	0,1022	0,8097	ns	0,344	0,2736	ns
PE (36:4)	0,0891	0,7831	ns	0,02024	0,9621	ns	-0,0544	0,8666	ns
PE (38:4)	0,1498	0,6422	ns	-0,3221	0,4365	ns	0,0815	0,8013	ns
PE (38:5)	0,1402	0,6638	ns	-0,1656	0,6951	ns	0,1313	0,6841	ns
<b>Phosphatidylinositole</b>									
PI (34:1)	0,7285	0,0072	**	0,8222	0,0122	*	0,6324	0,0273	*
PI (34:2)	0,1416	0,6606	ns	-0,158	0,7087	ns	0,0938	0,7718	ns
PI (36:1) (18:0/18:1)	0,7985	0,0018	**	0,7486	0,0326	*	0,7912	0,0022	**
PI (36:2)	0,5384	0,0709	ns	0,6271	0,0961	ns	0,6056	0,0369	*
PI (37:4)	-0,4237	0,1699	ns	-0,3167	0,4447	ns	-0,3005	0,3426	ns

Anhang

Lipid (n = 12)	Zunahme des Körpergewichts			Zunahme der Fettmasse			Blutglukosekonzentration		
	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz	r-Wert	p-Wert	Signifikanz
PI (38:4) (18:0/20:4)	-0,0421	0,8967	ns	-0,2407	0,5659	ns	-0,2323	0,4675	ns
<b>Sphingomyeline</b>									
SM (d32:1)	0,4173	0,1771	ns	0,4718	0,2379	ns	0,4791	0,1151	ns
SM (d34:1)	-0,0301	0,9261	ns	0,2629	0,5293	ns	0,06958	0,8299	ns
SM (d34:2)	0,2927	0,3559	ns	0,4453	0,2688	ns	0,2958	0,3506	ns
SM (d35:1)	-0,5833	0,0465	*	-0,1817	0,6667	ns	-0,3834	0,2186	ns
SM (d36:1)	0,07703	0,8119	ns	0,4756	0,2335	ns	0,1045	0,7466	ns
SM (d38:1)	0,3372	0,2838	ns	0,5735	0,1372	ns	0,3065	0,3326	ns
SM (d39:1)	0,3517	0,2622	ns	0,1132	0,7895	ns	0,3572	0,2544	ns
SM (d40:1)	0,6339	0,0269	*	0,5646	0,1449	ns	0,5227	0,0813	ns
SM (d41:1)	0,5193	0,0836	ns	0,4872	0,2208	ns	0,4746	0,119	ns
SM (d41:2)	0,3863	0,2149	ns	0,5905	0,1233	ns	0,2964	0,3496	ns
SM (d42:1)	0,4885	0,1071	ns	0,6189	0,1018	ns	0,4179	0,1765	ns
SM (d42:2)	0,6001	0,0391	*	0,5934	0,121	ns	0,5564	0,0603	ns
SM (d42:3)	0,03793	0,9068	ns	0,1421	0,737	ns	-0,01169	0,9712	ns
SM (d44:1)	-0,568	0,054	ns	0,1273	0,7638	ns	-0,1286	0,6905	ns
SM (t42:1)	0,5935	0,0419	*	0,6275	0,0958	ns	0,6512	0,0218	*

Tabelle 14: Auflistung aller Korrelationen von Lipidom und Phänotyp

**Nahrungsaufnahme***Zeitraum vor der Virusinjektion (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 3)*

Zeit [Tage]	1	3	5	6	7
p-Wert	0,9991	0,3868	0,2393	0,8101	0,9991

*Gesamter Versuch (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 3)*

Zeit [Woche]	0	2	3	4	5	6	7	8
p-Wert	0,5675	0,2619	0,0070	0,1258	0,1251	0,5361	0,3657	0,5361

*Zeitliches Profil der Nahrungsaufnahme (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 3)*

Zeit [Tageszeit]	18	20	23	5	6	8	11	17
p-Wert	0,9776	0,9776	0,9776	0,9776	0,9538	0,9538	0,8971	0,0108

**Wasseraufnahme***Zeitraum vor der Virusinjektion (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 3)*

Zeit [Tage]	1	3	5	6	7
p-Wert	0,9431	0,9116	0,9431	0,9116	0,9116

## Anhang

*Gesamter Versuch (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 3)*

Zeit [Woche]	0	2	3	4	5	6	7	8
p-Wert	0,9795	0,9597	0,6389	0,9360	0,9252	>0,9999	>0,9999	0,9967

### Blutglukosekonzentration

*Zum Zeitpunkt der Tötung (unabhängiger T-Test, zweiseitig, n = 6)*

Zeit [Minute]	0
p-Wert	0,0434

### Direkte Kalorimetrie

*(Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [h]	2	3	4	5	6	7	8	2-8
Woche 2	0,8208	0,8958	0,8208	0,8208	0,6808	0,8208	0,8208	0,4679
Woche 4	0,9913	0,9998	0,9998	0,9998	0,9998	0,9998	0,9993	0,8285
Woche 6 (n = 6; 5)	0,0038	0,0031	0,0031	0,0004	0,0012	0,0031	0,0031	0,0004
Woche 8	0,8994	0,9302	0,9302	0,9931	0,9931	0,9931	0,9931	0,6866

### Infrarot-Thermographie

*iBAT (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Woche]	2	4	6	8
p-Wert	0,8265	0,8396	0,8265	0,9355

*Gehörgang (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Woche]	2	4	6	8
p-Wert	0,9675	0,6324	0,9675	0,9675

*Schwanz (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Woche]	2	4	6	8
p-Wert	0,9007	0,7946	0,8792	0,9007

*iBAT, Gehörgang und Schwanz (Dunnett's multiple comparison, n = 6)*

Woche	2 vs. 4	2 vs. 6	2 vs. 8	4 vs. 6	4 vs. 8	6 vs. 8
iBAT	0,0280	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0058
Gehörgang	< 0,0001	0,0341	0,2961	0,0001	< 0,0001	0,1333
Schwanz	0,0558	0,2862	0,0003	0,0411	0,0001	0,0792

## Körpergewicht

*Zeitraum vor der Virusinjektion (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Tage]	1	3	5	6	7
p-Wert	0,9564	0,9977	0,9977	0,9977	0,9880

## Anhang

---

*Gesamter Versuch (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Wochen]	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8
p-Wert	0,9918	0,9918	0,9918	0,9736	0,4556	0,1523	0,0416	0,0416	0,0231	0,0099	0,0065

### **Körperzusammensetzung**

*Fett (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 4)*

Zeit [Woche]	0	2	4	6	8
p-Wert	< 0,9999	0,1338	0,0069	0,0069	0,0015

*Flüssigkeit (Holm-Sidak Post-hoc Test, n =4)*

Zeit [Woche]	0	2	4	6	8
p-Wert	< 0,9999	0,1533	0,0219	0,0181	0,0106

*Muskel (Holm-Sidak Post-hoc Test, n =4)*

Zeit [Woche]	0	2	4	6	8
p-Wert	< 0,9999	0,9674	0,9902	0,8438	0,6544

**Lipidom***(unabhängiger T-Test, zweiseitig, vor der Korrektur für multiples Testen)*

<b>Lipid</b>	<b>AcCa (14:0)</b>	<b>AcCa (16:0)</b>	<b>AcCa (16:1)</b>	<b>AcCa (18:0)</b>	<b>AcCa (24:0)</b>	<b>CE(18:1)</b>	<b>CE(18:2)</b>	<b>CE(20:4)</b>	<b>Cer (d40:1) (d18:1/22: 0)</b>	<b>Cer (d42:1) (d18:1/24: 0)</b>	<b>Cer (d42:2) (d18:1/24: 1)</b>
<b>p-Wert</b>	0,5262	0,7349	0,1705	0,8866	0,3128	0,1370	0,5355	0,9467	0,6277	0,5990	0,2843
<b>Lipid</b>	<b>Cer (d42:3) (d18:1/24: 2)</b>	<b>Cer (d42:3) (d18:2/24: 1)</b>	<b>Cer (t42:0) (t18:0/24: 0)</b>	<b>CerG (d40:1) (d18:1/22: 0)</b>	<b>CerG (d41:1) (d18:1/23: 0)</b>	<b>CerG (d42:1) (d18:1/24: 0)</b>	<b>LPC (14:0)</b>	<b>LPC (14:1)</b>	<b>LPC (15:1)</b>	<b>LPC (16:0)</b>	<b>LPC (16:1)</b>
<b>p-Wert</b>	0,2464	0,2470	0,7153	0,9560	0,7436	0,9263	0,0944	0,3457	0,2874	0,5163	0,2009
<b>Lipid</b>	<b>LPC (17:0)</b>	<b>LPC (18:0)</b>	<b>LPC (18:1)</b>	<b>LPC (18:2)</b>	<b>LPC (19:0)</b>	<b>LPC (19:1)</b>	<b>LPC (20:1)</b>	<b>LPC (20:4)</b>	<b>LPC (22:0)</b>	<b>LPC (22:6)</b>	<b>LPC (24:0)</b>
<b>p-Wert</b>	0,4191	0,8011	0,0311	0,0609	0,4184	0,1450	0,5622	0,8468	0,6784	0,5353	0,9869
<b>Lipid</b>	<b>LPC (24:1)</b>	<b>LPC (24:5)</b>	<b>LPC (24:6)</b>	<b>LPE (16:0)</b>	<b>LPE (18:1)</b>	<b>LPE (18:2)</b>	<b>LPE (20:4)</b>	<b>LPE (22:6)</b>	<b>PE (36:1)</b>	<b>PE (36:2)</b>	<b>PE (36:4)</b>
<b>p-Wert</b>	0,7738	0,2992	0,2742	0,1703	0,0141	0,2984	0,6649	0,9077	0,5521	0,9347	0,6879
<b>Lipid</b>	<b>PE (38:4)</b>	<b>PE (38:5)</b>	<b>PI (34:1)</b>	<b>PI (34:2)</b>	<b>PI (36:1) (18:0/18:1 )</b>	<b>PI (36:2)</b>	<b>PI (37:4)</b>	<b>PI (38:4) (18:0/20:4 )</b>	<b>SM (d32:1)</b>	<b>SM (d34:1)</b>	<b>SM (d34:2)</b>
<b>p-Wert</b>	0,7108	0,5823	0,0258	0,0917	0,0406	0,0342	0,6443	0,6043	0,0335	0,4091	0,2656
<b>Lipid</b>	<b>SM (d35:1)</b>	<b>SM (d36:1)</b>	<b>SM (d38:1)</b>	<b>SM (d39:1)</b>	<b>SM (d40:1)</b>	<b>SM (d41:1)</b>	<b>SM (d41:2)</b>	<b>SM (d42:1)</b>	<b>SM (d42:2)</b>	<b>SM (d42:3)</b>	<b>SM (d44:1)</b>
<b>p-Wert</b>	0,9692	0,8184	0,3840	0,0951	0,4062	0,1409	0,2881	0,4615	0,1126	0,1938	0,7641

## Anhang

Lipid	SM (t42:1)	PC (30:0)	PC (30:1)	PC (30:2)	PC (31:1)	PC (32:0)	PC (32:1)	PC (32:2)	PC (33:1)	PC (33:2)	PC (34:0)
p-Wert	0,0516	0,1678	0,3995	0,1324	0,0392	0,1705	0,3666	0,0316	0,0175	0,1226	0,2569

Lipid	PC (34:1)	PC (34:2)	PC (34:3)	PC (34:4)	PC (35:1)	PC (35:2)	PC (36:0)	PC (36:1)	PC (37:1)	PC (37:2)	PC (37:4)
p-Wert	0,0897	0,2570	0,1446	0,1044	0,0075	0,0347	0,6311	0,1948	0,0343	0,0210	0,6002

Lipid	PC (40:1)	PC (40:2)	PC (40:8)	PC (41:2)	PC (42:10)	PC (42:2)	PC (42:3)	PC (42:9)	PC (44:12)	PC (44:4)	PC (44:5)
p-Wert	0,0533	0,1015	0,7098	0,0915	0,6140	0,1117	0,0903	0,1864	0,8757	0,5083	0,7455

### Stress-Infrarot-Thermographie

*iBAT (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Minute]	0	5	35	80	35 (%)
p-Wert	0,2207	0,3195	0,0033	0,0435	0,0316

*Gehörgang (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Minute]	0	5	35	80	35 (%)
p-Wert	0,1410	0,6637	0,0075	0,0996	0,2814

*Schwanz (Holm-Sidak Post-hoc Test, n = 6)*

Zeit [Minute]	0	5	35	80	35 (%)
p-Wert	0,7846	0,7846	0,7846	0,7846	0,9546

**Gewicht der Nebennieren**

Zum Zeitpunkt der Tötung (unabhängiger T-Test, zweiseitig, n = 6)

	[mg]	[%]
p-Wert	0,0525	0,0196

**Corticosteronkonzentration**

Zum Zeitpunkt der Tötung (unabhängiger T-Test, zweiseitig, n = 4; 6)

	[ng / ml]
p-Wert	0,5705

**mRNA**

Zum Zeitpunkt der Tötung (unabhängiger T-Test, zweiseitig, n = 6; 5)

mRNA	<i>Crf</i>	<i>Nucb2</i>
p-Wert	0,2654	0,3862

*Tabelle 15: Zusammenfassung statistische Auswertung (Post-Hoc Holm Sidak oder Student's T-Test)*

---

## 10 Publikation

## 11 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die fachlichen Anmerkungen bedanken. Nur so war es möglich, diese Arbeit anzufertigen, welche einen wichtigen Teil meines persönlichen, beruflichen und akademischen Werdegangs darstellt.

An dieser Stelle auch noch einen Dank an Prof. Dr. Dr. Hendrik Lehnert unter dessen Leitung die Versuche zu dieser Arbeit noch in der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck begonnen wurden.

Besonderer Dank gilt Dr. Carla Schulz für die hervorragende Betreuung. Von der Planung über die Durchführung und Auswertung bis hin zur Fertigstellung hat sie die gesamte Dissertation begleitet und stand mir immer helfend mit Rat und Tat zur Seite.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Riccardo Dore für die Einarbeitung in Tierversuche sowie die stetige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Ebenso danke ich Dr. Sandro Catzeddu für die gute Zusammenarbeit und Angela Oldörp für jegliche Hilfestellungen im Labor.

Die von der Universität zu Lübeck geschaffenen Strukturen ermöglichen eine gute Kommunikation sowie einen engen Austausch mit anderen Arbeitsgruppen, wodurch es mir möglich war, unkompliziert auf Unterstützung, Fertigkeiten und Geräte zurückzugreifen.

So möchte ich mich beim Institut für Anatomie für die Bereitstellung der LCM-Anlage bedanken. Weiterhin danke ich dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Dr. Jan Wenzel ermöglichte mir die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops und Julica Folberth die Massenspektrometrie. Prof. Dr. Olaf Jöhren und Christine Eichholz halfen mir bei allen molekularen Fragestellungen sowohl theoretisch als auch praktisch weiter.

Ohne diese Unterstützung wäre die Durchführung der Experimente deutlich beschwerlicher gewesen.

Abschließend möchte ich mich noch einmal besonders bei meinen Eltern und meinen Brüdern bedanken. Ohne meine Familie wäre ich nie so weit gekommen. Auch über die Dissertation hinaus kann ich mich immer auf ihre Unterstützung verlassen.

## 12 Lebenslauf

Name: Daniel Stephan  
Geburtsdatum: 16.08.1995  
Geburtsort: Wiesbaden



### Berufserfahrung

04/2022 - heute **Universitätsmedizin Mainz**  
Facharztweiterbildung in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

### Ausbildung

10/2021 - heute **Johannes Gutenberg-Universität Mainz**  
Studium der Zahnmedizin

10/2014 - 11/2021 **Universität zu Lübeck**  
Studium der Humanmedizin

01/2019 - 06/2019 **London South Bank University**  
Studium der Sport- und Trainingswissenschaften

09/2005 - 03/2014 **Gymnasium zu St. Katharinen Oppenheim**

### Praktische Erfahrung

11/2020 - 10/2021 **Praktisches Jahr**

- Sana Kliniken Lübeck**  
Chirurgie (Viszeral-, Unfall-, Gefäßchirurgie, Notaufnahme)
- Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck**  
Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie
- Universitätsmedizin Mainz**  
Innere Medizin (Intensivmedizin, Notaufnahme, Hämato-Onkologie)

### Wissenschaftliche Tätigkeit / Veröffentlichungen

02/2022 - heute **Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**  
Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks auf die Vitalität von freien mikrovaskulären Gewebetransplantaten im Großtiermodell

- 
- 09/2017 - 08/2022      **Universität zu Lübeck**  
Promotionsarbeit: Beteiligung von paraventriculärem, endogenen NUCB2/Nesfatin-1 bei der physiologischen Regulation der Energiehomöostase und Stressreaktion
- 08/2022      **Stephan, D., Taege, N., Dore, R., Folberth, J., Jöhren, O., Schwaninger, M., Lehnert, H., Schulz, C.:** Knockdown of endogenous NUCB2/nesfatin-1 in the PVN leads to obese-like phenotype and abolishes and metformin- and stress-induced thermogenic response in rats, Horm Metab Res.; Publikation zur Veröffentlichung akzeptiert am 11. August 2022; Manuscript ID HMR-2022-05-0140.R1
- 07/2018      **Stephan, D., Dore, R., Catzeddu, S., Jöhren, O., Lehnert, H., Schulz, C.:** Knockdown of endogenous NUCB2/nesfatin-1 in the paraventricular nucleus leads to increased body weight and fat mass in rats. 11<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience. Federation of European Neurosciences Societies. Berlin, 07. - 11.07.2018
- 03/2019      **Catzeddu, S., Stephan, D., Wilz, A.-M., Dore, R., Jöhren, O., Lehnert, H., Schulz, C.:** Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus for the anorexigenic and thermogenic effects of NUCB2/nesfatin-1. 2<sup>nd</sup> Adipocyte-Brain Crosstalk Symposium. Lübeck, 14. - 15.03.2019
- 06/2019      **Role of Nesfatin-1 in Homeostatic and Hedonic Feeding: Presentation by MSc Sandro Catzeddu.** Gemeinsame Jahrestagung SAE /DGAE 2019. Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie. Nürnberg, 28. - 29.06.2019