

VLOGA HIPOTALAMUSA PRI URAVNAVANJU ENERGETSKEGA RAVNOVESJA IN MIŠJI MODELI ZA PROUČEVANJE DEBELOSTI *

Uršula LODGE ^{a)} in Simon HORVAT ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, mag.
e-pošta: ursula.knuplez@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}: doc., dr., e-pošta: simon.horvat@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 14. oktobra 2002, sprejeto 15. novembra 2002.

Received October 14, 2002, accepted November 15, 2002.

IZVLEČEK

Debelost je kompleksna lastnost, ki jo določa delovanje genetskih dejavnikov in dejavnikov okolja. Genetski dejavniki debelosti so geni, ki imajo vlogo pri vzpostavljanju energetskega ravnovesja, razgrajevanju hranilnih snovi, metabolizmu maščob ter pri različnih vedenjskih lastnostih. Na energetske ravnovesje in telesno maso organizma vpliva centralni živčni sistem. Ključna regija za uravnavanje metabolizma in porabe energije je hipotalamus, ki sproži neuro-humoralni odgovor na zaznane senzorične informacije. Pri tem sodelujejo različni hormoni, neuropeptidi in neurotransmiterji. Genetska osnova za debelost je v večini primerov večgenska, kar pomeni, da razvoj debelosti nadzoruje več kromosomskih regij, imenovanih kvantitativni lokusi. Za razumevanje genetske in fiziološke osnove debelosti so pomembni številni in raznoliki modeli glodalcev za debelost. Znanih je veliko enogenskih mišjih modelov, s katerimi lahko proučujemo vpliv mutacij v enem genu na razvoj debelosti. Za raziskovanje večgenske osnove debelosti pa so zelo primerni večgenski mišji modeli, ki so rezultat dolgoročne selekcije različnih lastnosti, povezanih z debelostjo.

Ključne besede: debelost / energetske ravnovesje / centralni živčni sistem / hipotalamus / leptin / neuropeptidi / neurotransmiterji / enogeni mišji modeli / večgenski mišji modeli / miši

THE ROLE OF HYPOTHALAMUS IN THE REGULATION OF ENERGY BALANCE AND MOUSE MODELS OF OBESITY †

ABSTRACT

Obesity is a complex trait determined by the action of many genetic and environmental factors. The genetic determinants are genes, involved in the control of energy balance, nutrient partitioning, lipid metabolism and behaviour. Central nervous system influences energy balance and body weight. Hypothalamus is a critical region of the brain for regulation of homeostatic processes. The sensory inputs are relayed to regulatory sites in the hypothalamus where the information is integrated and a neuro-humoral response initiated. Various hormones, neuropeptides and neurotransmitters are involved in this regulatory loop. The genetic basis of obesity is mostly polygenic. The development of obesity is controlled by several genomic regions named quantitative trait loci (QTL). Numerous and diverse rodent models of obesity are

* Del tega prispevka izhaja iz magistrskega dela Uršule Lodge (roj. Knuplež) z naslovom 'Iskanje različno izraženih genov v mišjih linijah (*Mus musculus*), ki se razlikujejo v kvantitativnem lokusu za debelost', mentor doc.dr. Simon Horvat.

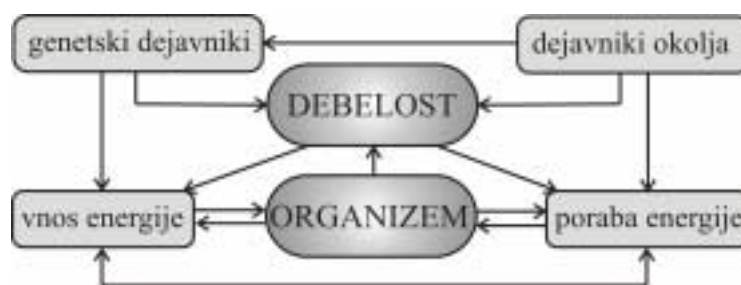
† Part of this article originates from M.Sc. thesis 'Screening for differentially expressed genes in mouse lines differing by an obesity quantitative trait locus', issued by Uršula Lodge, supervisor ass.prof. Simon Horvat, Ph.D.

of great importance for understanding the genetics and physiology of obesity. Several monogenic mouse models have been used successfully to study the effects of single gene mutations on the development of obesity. On the other hand, mouse strains developed by long-term divergent selection for obesity-related traits are very useful models to characterize the complex genetic basis of obesity.

Key words: obesity / energy balance / central nervous system / hypothalamus / leptin / neuropeptides / neurotransmitters / monogenic mouse models / polygenic mouse models / mice

UVOD

Prekomerno nalaganje maščevja (debelost) v zadnjem času postaja velik zdravstveni problem predvsem v razvitih državah, saj posredno ali neposredno povzroča oziroma vpliva na razvoj različnih bolezni, kot so diabetes, bolezni srca in ožilja, bolezni žolčnika, povišan krvni tlak, rak ipd. Pri reji domačih živali je prekomerno nalaganje maščevja tudi nezaželeno tako z gospodarskega vidika reje kot z vidika potrošnikov, ki si želijo hrano z manj maščevja. Na rast in razvoj maščevja vpliva zapletena mreža genetskih dejavnikov, dejavnikov okolja ter njihovih medsebojnih vplivov. Raziskave so usmerjene predvsem v genetske dejavnike, saj bi poznavanje le-teh prispevalo k boljšemu razumevanju molekularnih mehanizmov. V splošnem se debelost razvije zaradi neravnovesja med vnosom energije v organizem ter porabo vnešene energije (slika 1). Vnos energije ne zajema le celokupnega vnosa kalorij, temveč je odvisen tudi od sestave hrane ter apetita oziroma pojava občutka sitosti. Poraba energije pa zajema raven bazalnega metabolizma, toplotni učinek hrane, energetske porabo pri aktivnosti, s temperaturo sproženo termogenezo in druge elemente. Prav tako je pomembna nagnjenost organizma k shranjevanju presežka energije v obliki trigliceridov v maščobnem tkivu ali pa v obliki nemaščobnih tkiv (npr. mišičnine) (Bouchard, 1994). Genetski dejavniki debelosti, ki povzročijo motnje v vnosu ali porabi energije, so geni, ki sodelujejo pri vzpostavljanju energetskega ravnovesja, razgrajevanju hranilnih snovi, metabolizmu maščob in hormona inzulina ter pri različnih vedenjskih lastnostih (Naggert in sod., 1997).



Slika 1. Zapletena mreža dejavnikov, ki so udeleženi pri razvoju debelosti.

Figure 1. Complex interactions of factors involved in the development of obesity.

Vzdrževanje energetskega ravnovesja, stalne telesne mase ter količine maščevja v organizmu je torej izredno zapleten proces. Uravnavajo ga geni prek širokega spektra signalov, ki opisujejo stanje prehranjenosti organizma ter njegovo neposredno okolje. Na podlagi dobljenih informacij sprožijo ustrezne odgovore, ki prilagodijo sprejem hrane, porabo energije ter celoten metabolizem. V zadnjem času je pozornost raziskovalcev namenjena predvsem hipotalamusu kot eni najpomembnejših in najbolj raziskanih regij možganov za uravnavanje energetskega ravnovesja (Williams in sod., 2000).

Debelost je večgenska lastnost, kar pomeni, da jo uravnava več genov hkrati. Največji vpliv na razumevanje genetske in fiziološke osnove debelosti so v zgodovini imeli in še imajo številni in raznoliki modeli glodalcev za debelost. Za raziskovanje osnove debelosti so pomembni tako

enogenski kot večgenski mišji modeli. Predvsem v zadnjem času se v sklopu enogenskih pojavlja tudi precej transgenskih mišjih modelov, ki so v pomoč pri odkrivanju dodatnih genov, ki rušijo energetske ravnovesje organizma (Brockmann in Bevova, 2002). Glede na to, da je debelost postala velik zdravstveni problem v razvitih državah, so mišji modeli dobro orodje pri poskušanju omejitve nastanka debelosti pri ljudeh in s tem pri zmanjšanju tveganja nastanka z debelostjo povezanih bolezni. To znanje se seveda lahko s pridom uporabi tudi pri uravnavanju količine maščevja pri reji domačih živali.

VLOGA HIPOTALAMUSA PRI URAVNAVANJU ENERGETSKEGA RAVNOVESJA NA MOLEKULARNEM NIVOJU

V zadnjih letih se je naše razumevanje o tem, kako informacije o energetskega zaloga organizma potujejo do možganov ter se tam prevedejo v vedenjske in metabolične odgovore organizma, močno razširilo. Centralni živčni sistem vpliva na energetske ravnovesje in telesno maso organizma prek treh osnovnih mehanizmov (Spiegelman in Flier, 2001):

- prek učinka na obnašanje, ki vključuje uravnavanje apetita in telesno aktivnost,
- prek vpliva na aktivnost avtonomnega živčnega sistema, ki uravnava porabo energije in metabolizem nasploh ter
- prek vpliva na nevroendokrini sistem, med drugim na izločanje hormonov, kot so rastni hormon, inzulin, spolni steroidi, ščitnični hormoni in kortizol.

Nove informacije o živčnih mrežah in hormonalnemu nadzoru le-teh so pripomogle k boljšemu poznavanju uravnavanja energetskega ravnovesja. Večino tega napredka je mogoče pripisati odkritju specifičnih živčnih celic v arkvatnem jedru hipotalamusa, ki delujejo kot senzori za energetskega status organizma in sprožijo odgovore za vzdrževanje stalne ravni energetskega zaloga. Čeprav je veliko različnih možganskih regij vpletenih v vzdrževanje energetskega ravnovesja, so regulatorne zanke z začetkom v arkvatnem jedru hipotalamusa ene izmed najbolj raziskanih na molekularni ravni. Postopno je namreč postalo jasno, da je to ključno mesto uravnavanja apetita. Znano je, da sta tam dve skupini živčnih celic; ene spodbujajo sprejem hrane in zavirajo porabo energije, druge pa v nasprotju s tem zavirajo sprejem hrane in spodbujajo porabo energije (Barsh in Schwartz, 2002).

Hipotalamus je torej ključna regija možganov za uravnavanje metabolizma in porabe energije (Spiegelman in Flier, 1996). Ta vloga hipotalamusa je bila dokončno potrjena že leta 1940, ko sta Hetherington in Ranson ugotavljala fiziološke posledice elektrolitskih poškodb v različnih predelih hipotalamusa podgan. Podganam s poškodbami v hipotalamusu se je namreč močno povečala telesna masa, in sicer predvsem na račun povečanja količine maščevja (Elmquist in sod., 1999). Geni, vpleteni v vzdrževanje energetskega ravnovesja v telesu, delujejo na osnovi zaznavanja vnosa hrane, razpoložljivih energetskega zaloga v maščobnem tkivu in ravni aktivnosti organizma. Te senzorične informacije se prenašajo do regulatornih mest v hipotalamusu (npr. v že omenjeno arkvatno jedro), ki jih povežejo v celoto in na podlagi tega se sproži nevrohormonalni odgovor na dobljene signale (Naggert in sod., 1997). Hipotalamus na podlagi zaznanih živčnih, endokrinih in metaboličnih signalov sproži točno določene odgovore avtonomnega živčevja, endokrine odgovore in sprememb obnašanja. Pri tem sodelujejo hormoni, neuropeptidi in neurotransmiterji, ki so s svojim delovanjem pomembni sestavni deli sistema za uravnavanje energetskega ravnovesja v organizmu. Preglednica 1 prikazuje nekatere izmed hormonov, neuropeptidov in neurotransmiterjev, ki prek različnih mehanizmov vplivajo na energetske ravnovesje organizma. Pospeševalci spodbujajo, zaviralci pa zavirajo hranjenje in s tem vplivajo na povečanje oziroma zmanjšanje telesne mase. Nekatere molekule se pojavljajo v obeh kategorijah, kar pomeni, da lahko delujejo kot zaviralci ali kot pospeševalci – ponavadi prek različnih receptorjev. Poleg hormonov, neuropeptidov in neurotransmiterjev, navedenih v

preglednici 1, je še množica takih, ki lahko neposredno ali posredno vplivajo na energetske ravnovesje organizma, in sicer s povečevanjem oziroma zmanjševanjem telesne mase, s čimer je povezana tudi količina maščevja v organizmu. Ključni dejavnik uravnavanja energetskega ravnovesja pa je nedavno odkriti hormon maščobnih celic – leptin.

Preglednica 1. Nekateri hormoni, neuropeptidi in neurotransmiterji, ki vplivajo na energetske ravnovesje organizma

Table 1. Some hypothalamic neuropeptides and neurotransmitters that effect energy balance in the organism

Pospeševalci	Zaviralci
neuropeptid Y (NPY)	melanokortin (α -MSH)
agoutiju soroden peptid (AGRP)	hormon sproščanja kortikotropina (CRH)
hormon sproščanja rastnega hormona (GHRH)	s kokainom in amfetaminom uravnani transkript (CART)
melanin-koncentrirajoči hormon (MCH)	noradrenalin (receptor β)
noradrenalin (receptor α)	histamin
γ -aminobutirična kislina (GABA)	serotonin
opioidi	nevrotenzin
galanin	hormon sproščanja tirotropina (TRH)
oreksini	bombesin
grelin	amilin
glutamat	dopamin
dinorfin	adrenomedulin
	polipeptid trebušne slinavke (PP)
	oksitocin
	anorektin
	enterostatin
	glukagon
	glukagonu podoben peptid 1 (GLP-1)
	holecistokinin (CCK)
	kisli fibroblastni rastni faktor
	interleukin 1β

Leptin in uravnavanje energetskega ravnovesja prek nekaterih neuropeptidov in neurotransmiterjev hipotalamusa

S proučevanjem vloge hipotalamusa pri uravnavanju energetskega ravnovesja organizmov so odkrili več procesov v centralnem živčnem sistemu, ki lahko vplivajo na energetske ravnovesje. Eno izmed najpomembnejših odkritij za povečanje razumevanja uravnavanja energetskega ravnovesja prek centralnega živčnega sistema je bilo odkritje osnov sindromov debelosti *ob/ob* in *db/db* miši. Predvidevali so (Coleman, 1973; Coleman, 1978), da je pri *ob/ob* miših odsoten ključni signal sitosti, pri *db/db* miših pa njegov receptor. To so potrdili s pozicijskim kloniranjem tega signala, ki so ga poimenovali leptin (Zhang in sod., 1994), kmalu pa tudi s kloniranjem njegovega receptorja (Tartaglia in sod., 1995). Leptin se izloča predvsem iz maščobnih celic (pod določenimi pogoji pa tudi iz nekaterih drugih tipov celic kot npr. placentalnih, želodčnih parietalnih ter skeletnih mišičnih) in po krvnem obtoku potuje do možganov, kjer spodbuja ali zavira sproščanje neurotransmiterjev oziroma neuropeptidov. Je aferentni signal iz periferije do možganov v povratni regulatorni zanki, ki uravnava količino maščevja (Ziotopoulou in sod., 2000; Inui, 2000; Chehab, 2000; Elmquist in sod., 1999).

Receptorji za leptin so izraženi v večini regij hipotalamusa in vključujejo:

- jedra, ki uravnavajo izločanje hormonov hipofize (paraventricularno jedro),
- jedra, ki uravnavajo delovanje parasimpatičnega in simpatičnega živčnega sistema,
- ventromedialne centre sitosti ter
- lateralne centre za uravnavanje apetita.

Število odkritih neuropeptidov in nevrotransmiterjev v različnih regijah hipotalamusa, ki lahko vplivajo na energetske ravnovesje organizma prek različnih mehanizmov (npr. uravnavanja sitosti, apetita, porabe energije ipd.) iz leta v leto narašča. V splošnem lahko te peptide razdelimo na tiste, ki lahko vplivajo na telesno maso (npr. neuropeptid Y) in tiste, ki lahko uravnavajo le velikost obroka hrane, nimajo pa dolgoročnega učinka na količino maščevja. Nekateri pospešujejo, drugi zavirajo apetit ter s tem povečujejo oziroma zmanjšujejo telesno maso in količino maščevja (North, 1999).

Glavna tarča delovanja leptina je neuropeptid Y (NPY), ki sam spodbuja hranjenje in zavira porabo energije, s čimer pospešuje razvoj debelosti. Najvišja raven izražanja NPY je v arkvatnem jedru hipotalamusa, kjer je tudi mesto uravnavanja prehranjevanja. Leptin zavira izločanje NPY, kar povzroči zaviranje sprejema hrane ter spodbudi termogenezo in telesno aktivnost pri glodalcih (slika 2) (Houseknecht in Portocarrero, 1998; Spiegelman in Flier, 1996; Friedman in Halaas, 1998). Hkrati leptin spodbuja izločanje hormona sproščanja kortikotropina (CRH; imenovan tudi CRF – dejavnik sproščanja kortikotropina) v paraventricularnem jedru hipotalamusa, ki sicer zvišuje porabo energije ter zavira hranjenje. S pospeševanjem izločanja CRH se ta učinek še stopnjuje (slika 2) (Buchanan in sod., 1998). Oba načina delovanja leptina pripomoreta k pomiku energetskega ravnovesja v porabo energije, kar povzroči zmanjšanje telesne mase in količine maščevja.

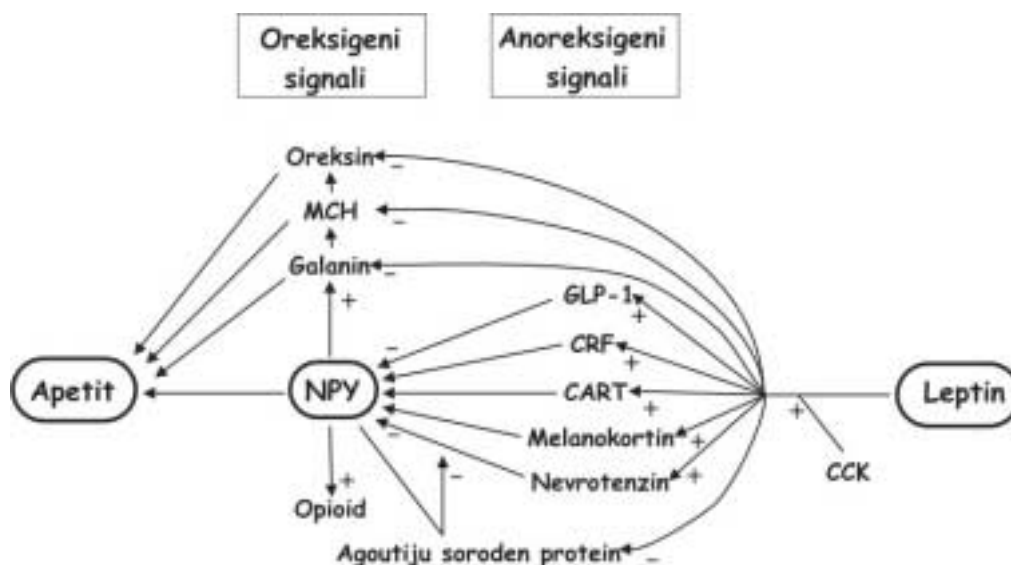
Pomemben sekundarni obveščevalec signaliziranja leptina je tudi melanokortinski sistem hipotalamusa (slika 2). Leptin pospešuje izločanje proopiomelanokortina (POMC), ki je prav tako kot NPY izražen v arkvatnem jedru hipotalamusa. S cepitvijo POMC nastane nekaj peptidov, med drugim hormon melanokortin (α -MSH), ki prek melanokortinskega 4 receptorja (MC4-R) v hipotalamusu zavira sprejem hrane in pospešuje porabo energije. α -MSH pa ni edini ligand za MC4-R. Kot antagonist MC4-R deluje agoutiju soroden peptid (AGRP; angl. agouti-related peptide), ki povzroči povečan sprejem hrane in zmanjšano porabo energije. Leptin zavira izražanje tega peptida (slika 2) (Flier in Maratos-Flier, 1998; Inui, 1999; Forbes in sod., 2001).

Melanin-koncentrirajoči hormon (MCH), izražen v lateralnem hipotalamusu, je prav tako tarča delovanja leptina. Močno povišana koncentracija MCH v *ob/ob* miših in v stradajočih miših divjega tipa nakazuje, da ima ta peptid pomembno vlogo pri uravnavanju energetskega ravnovesja (Qu, 1996). Ugotovili so, da MCH sam po sebi spodbuja hranjenje, ob dodatku leptina pa se ta učinek izniči. Leptin namreč zavira izražanje tega hormona in s tem povzroči zmanjšanje telesne mase (slika 2) (Inui, 1999; Lawrence in sod., 1999). V nasprotju s temi ugotovitvami poročajo tudi o spodbujevalnem učinku leptina na MCH. To bi lahko bil mehanizem izravnave učinka leptina, ki v osnovi deluje v smeri zmanjševanja telesne mase in količine maščevja (Huang in sod., 1999).

V splošnem obstajajo so tri možnosti, da bi spremembe regulatorne zanke leptina lahko vodile v debelost (Friedman in Halaas, 1998; Bowles in Kopelman, 2001):

- nezmožnost sinteze leptina kot npr. v *ob/ob* miših,
- prenizka raven izločanja leptina iz maščobnih celic, kar bi povzročilo povečanje števila maščobnih celic do te mere, da bi bila raven leptina normalna ter
- relativna ali absolutna neobčutljivost na leptin na mestih njegovega delovanja; vzrok je lahko mutacija receptorja za leptin (kot npr. pri *db/db* miših) ali katerega izmed genov, ki sodelujejo v signaliziranju leptina, prav tako pa je neobčutljivost na leptin lahko tudi pridobljena iz do sedaj še neznanih razlogov.

Slika 2 prikazuje zapleteno mrežo vzajemnega delovanja leptina z najpomembnejšimi neuropeptidi oziroma nevrottransmitterji hipotalamusa. Leptin je del povratne zanke (angl. feedback loop), ki vzdržuje energetske ravnovesje in s tem stalno količino maščevja. Zmanjšanje količine maščevja povzroči znižanje ravni leptina in aktivirajo se oreksigene molekule (molekule, ki spodbujajo vnos energije). Nasprotno pa povečanje količine maščevja sproži povišanje ravni leptina, ki aktivira anoreksigene molekule (molekule, ki zavirajo vnos energije). Ključni molekuli pri tem uravnavanju sta NPY in melanokortin.



Slika 2. Poenostavljen kaskadni model interakcij leptina z neuropeptidnimi efektorskimi molekulami hipotalamusa. Na sliki so prikazane le nekatere izmed možnih interakcij. Lahko so spodbujevalne (+) ali zaviralne (-) (Inui, 2000).

Figure 2. A simplified cascade model for the interactions of leptin with hypothalamic neuropeptidergic effector molecules. Only some out of possible interactions are shown. They can be stimulatory (+) or inhibitory (-) (Inui, 2000).

Leptin je torej v povezavi z neuropeptidi in nevrottransmitterji hipotalamusa ključni dejavnik uravnavanja energetskega ravnovesja. Toda zaradi raznovrstnosti in zapletenosti možnih motenj v vnosu, porabi in porazdelitvi energije, povezanih z debelostjo, je težko ugotoviti, katere nepravilnosti so neposredno odgovorne za pojav debelosti (Inui, 2000). Tako je vsaka novo odkrita signalna pot hipotalamusa potencialno tarčno mesto za razvoj novih zdravil proti debelosti. Toda naraščajoče število novih signalnih molekul kaže na to, da je energetske ravnovesje uravnavano z zelo zapletenim procesom, v katerem sodeluje veliko število dejavnikov, od katerih vseh zagotovo še ne poznamo (Schwartz in sod., 2000).

MIŠJI MODELI ZA PROUČEVANJE DEBELOSTI

Genetska osnova za debelost je v večini primerov večgenska, kar pomeni, da ni le pod vplivom enega gena. Razvoj debelosti namreč nadzoruje več kromosomskih regij, imenovanih kvantitativni lokusi. Te regije so lahko med seboj popolnoma neodvisne in ležijo na različnih kromosomih. Ocenjujejo, da se debelost v 30 do 70 odstotkih deduje (Stunkard in sod., 1986). Razlog za pojav debelosti je lahko mutacija enega ali več genov, ključnih za vzdrževanje energetskega ravnovesja. Do sedaj je bilo odkritih ali povzročenih že veliko število takih mutacij pri živalskih modelih debelosti, med katerimi največji delež zavzemajo različni modeli glodalcev

ter med njimi mišji modeli. Kljub nekaterim pomanjkljivostim so to zelo dragoceni eksperimentalni modeli za ugotavljanje mehanizma nalaganja maščevja, poleg tega pa jih lahko genetsko manipuliramo na različne načine.

V splošnem obstajata dve pomembni skupini mišjih modelov:

- enogenski mišji modeli, ki so rezultat spontanah ali ciljanih mutacij posameznih genov ter
- večgenski mišji modeli, ki so rezultat združenega delovanja velikega števila kvantitativnih lokusov (Pomp, 1999).

Enogenski mišji modeli

Kloniranje in opis genov petih enogenskih mišjih modelov za debelost, ki so se pojavili spontano, je prispevalo k napredku pri razumevanju uravnavanja energetskega ravnovesja. Ti modeli so: »*obese*«, »*diabetes*«, »*agouti-yellow*«, »*tubby*« in »*fat*« (vse angl.). Mutirane gene so tudi izolirali in ti predstavljajo najtrdnjše genetski dokaz za specifične metabolične poti, ki neposredno uravnavajo telesno maso in nalaganje maščobnega tkiva (Robinson in sod., 2000; Naggert in sod., 1997).

»*Obese*« je bila prva opisana izmed zgoraj navedenih mutacij. Opisali so jo že pred dobrimi petdesetimi leti (Coleman 1978; citirano po Ingalls in sod., 1950) in od takrat jo vzdržujejo v C57BL/6J liniji miši. To je avtosomna recesivna mutacija *ob* gena, ki kodira leptin (OB beljakovina), kar povzroča motnje pri sintezi leptina oziroma nastanek okrnjene beljakovine. Gen za leptin so uspeli klonirati šele pred nekaj leti (Zhang in sod., 1994), ko so mu tudi določili zaporedje. Miši, homozigotne za »*obese*« mutacijo (*ob/ob* miši), imajo značilne znake stradanja (Coleman, 1978), ki se kaže v:

- hiperfagiji (nenadzorovano hranjenje), ki povzroča debelost in diabetes,
- zelo zmanjšani porabi energije, vključno z zmanjšano aktivnostjo,
- neplodnost (mutacijo vzdržujejo s parjenjem heterozigotov in miši divjega tipa),
- oslabljen imunski sistem ter zavrti rast nemaščobnega tkiva.

Če tem mišim injiciramo leptin intraperitonealno ali v možganske ventrikle, se jim telesna masa in apetit precej zmanjšata, njihova telesna aktivnost pa se poveča. Takoj ko prenehamo z dodajanjem leptina, se vsi znaki, ki jih povzroča mutacija, povrnejo (Halaas in sod., 1995).

Miši, homozigotne za »*diabetes*« mutacijo (*db/db* miši), imajo zelo podoben fenotip kot *ob/ob* miši. Coleman (1973, 1978) je pokazal, da sta fenotipa *ob/ob* in *db/db* miši skoraj identična, če sta mutaciji prisotni na istem genetskem ozadju. »*Diabetes*« mutacija se je pojavila v C57BL/KsJ liniji miši, kjer so opazili debelost, hiperfagijo in hud diabetes z izrazito hiperglikemijo (Coleman, 1978; citirano po Hummel in sod., 1966). Predvidevali so, da te miši nimajo receptorja za produkt *ob* gena (kasneje opisani leptin) ali pa je ta receptor okvarjen za razliko od *ob/ob* miši, kjer sam signal sitosti ni prisoten. To so potrdili s pozicijskim kloniranjem *db* gena (Tartaglia in sod., 1995). »*Diabetes*« je avtosomna recesivna mutacija *db* gena, ki kodira receptor za leptin. Do sedaj je bilo opisanih vsaj pet različno velikih mRNK za mišji leptinski receptor. Tako raznolikost povzroči alternativno izrezovanje različnih eksonov na 3' koncu gena. Največji delež leptinskih receptorjev v možganih in hipotalamusu predstavlja oblika z dolgo znotrajcelično domeno, ki sproži znotrajcelično signalno transdukcijo. »*Diabetes*« mutacija je v bistvu točkovna mutacija, ki povzroči premik bralnega okvirja, da se ne tvori več oblika receptorja z dolgo znotrajcelično domeno. Samo odsotnost te oblike receptorja je dovolj za pojav odpornosti na leptin in s tem povezane debelosti. *db/db* miši se namreč na injekcijo leptina v možganske ventrikle ne odzovejo tako kot *ob/ob* miši (Leibel in sod., 1997; Chen in sod., 1996).

Debelost pri miših z »*agouti-yellow*«, »*tubby*« ali »*fat*« mutacijo se razvije počasneje kot pri *ob/ob* in *db/db* miših. »*Agouti-yellow*« je avtosomen dominanten sindrom debelosti pri miših s hiperfagijo, diabetesom, odpornostjo na inzulin in rumeno barvo kožuščka. Poročajo tudi o

povečani linearni rasti (Yen in sod., 1994). To je bila prva spontana mutacija od zgoraj omenjenih, ki so jo klonirali (Bultman in sod., 1992). Znanih je šest avtosomnih dominantnih »yellow« mutacij *agouti* gena. Vse so promotorske mutacije. *Agouti* lokus kodira *agouti*-signalna beljakovina (ASP), ki je normalno izražena le v lasnih foliklih in modih. Zanimivo je, da je človeški homolog ASP izražen v maščobnem tkivu. Pri »*agouti-yellow*« mutantnih miših je ta beljakovina ektopično izražena v mnogih tkivih, med drugim tudi v hipotalamusu, vendar se sama struktura beljakovine ne spremeni, kot se to zgodi pri npr. *db/db* miših. Prekomerno izražanje ASP se pojavi zaradi izbrisa ali vstavitve transpozonskega elementa v nekodirajoče nukleotidno zaporedje. Prekomerno izražen ASP povzroči spremembo barve kože, ker je antagonist delovanja melanokortina (MSH), ki sicer prek melanokortinskega 1 receptorja (MC1-R) sproži sintezo evmelanina v lasnih foliklih. Debelost pa se razvije zaradi nenormalnega izražanja ASP v možganih. To povzroči motnje signaliziranja MSH prek melanokortinskega 4 receptorja (MC4-R), ki sicer v hipotalamusu zavira apetit in spodbuja porabo energije (Leibel in sod., 1997; Naggert in sod., 1997).

»*Tubby*« je bila zadnja izmed zgoraj navedenih spontanah mutacij, ki so jo klonirali (Kleyn in sod., 1996). Je avtosomna recesivna mutacija, povzroča pa slepost z apoptozo receptorskih celic, gluhost in razvoj debelosti. Pri tem je debelost bolj blaga v primerjavi z drugimi mutantnimi mišmi in ne pojavi se hiperglicemija (Leibel in sod., 1997). Fiziološki mehanizem nastanka debelosti pri teh mutantnih miših še ni znan. Poročajo le o možni vlogi ščitničnega hormona, ki naj bi uravnaval izražanje *tubby* gena. Ta gen kodira visoko ohranjeno beljakovino in pri mutantnih miših je njegov karboksi-terminalni del izbrisan. Visoka raven izražanja te beljakovine je v mrežnici in v hipotalamusu. Glede na to je eden izmed možnih vzrokov za razvoj debelosti morda apoptoza določenih celic v jedrih hipotalamusa, ki uravnavajo hranjenje in porabo energije (Leibel in sod., 1997; Naggert in sod., 1997).

Tudi »*fat*« je avtosomna recesivna mutacija tako kot ostale štiri razen »*agouti-yellow*«. Miši, homozigotne za »*fat*« mutacijo, razvijejo debelost s hudo hiperinzulinemijo ter neplodnostjo (Coleman in Eicher, 1990). Razlog za ta sindrom je točkovna mutacija, ki zamenja eno aminokislino karboksipeptidazi E (CPE), kar uniči skoraj celotno aktivnost tega encima v različnih nevroendokrinih tkivih (Naggert in sod., 1995). CPE je sicer potrebna za razvrščanje in proteolitsko procesiranje različnih prohormonov, med drugim tudi inzulina in POMC. To je razlog za hiperinzulinemijo in verjetno tudi debelost. Ker je CPE izražena v centralnem živčnem sistemu, je možno, da motnje v procesiranju različnih neuropeptidov in nevrotransmiterjev sprožijo debelost pri mutantnih miših. (Naggert in sod., 1997; Cool in sod., 1997).

Preglednica 2. Nekaj primerov nekaterih novejših enogenskih mišjih modelov z izničeni gen in transgenskih mišjih modelov debelosti (Brockmann in Bevova, 2002)

Table 2. Some recent knockout and transgenic mouse models of obesity (Brockmann and Bevova, 2002)

Gen	Beljakovina	Debelost*	Funkcija gena
Dgat1	diacilglicerol 0-aciltransferaza	-	razvoj hipotalamusa
Gabt1	GABA-A transporter 1	+	centralni signalni prenos
Hert	hipokretin (oreksin)	+	nevrotransmitter
Hsd11b1	hidroksisteroid 11- β dehidrogenaza 1	+	sinteza trigliceridov
Insr	receptor za inzulin	+	signaliziranje inzulina
Pmch	pro-melanin-koncentrirajoči hormon	-/+	uravnavanje telesne mase
Fabp4	maščobne kisline vezujoča beljakovina	+	metabolizem lipidov in glukoze
Ikbkb	inhibitor kapa B kinaze beta	-	odpornost na inzulin
Nos2	sintaza dušikovega oksida 2	-	odpornost na inzulin
Plin	perilipin	-	modifikacija hormonsko občutljive lipaze

* = Učinek modela na razvoj debelosti: +, povečanje debelosti; -, zmanjšanje debelosti.

Po uspešnem pozicijskem kloniranju in karakterizaciji genov omenjenih spontanah mutacij debelosti, se je pričelo pojavljati veliko mišjih modelov z izničeni gen (angl. »knockout«) ter transgenskih mišjih modelov debelosti, anoreksije ali odpornosti na debelost. Nekateri izmed najnovejših so prikazani v preglednici 2. Ti modeli dokazujejo, da lahko iničenje funkcije različnih genov, vpletenih v širok spekter fizioloških procesov, ki sodelujejo pri uravnavanju energetskega ravnovesja, povzroči debelost, anoreksijo ali odpornost na debelost (Robinson in sod., 2000). Metode transgeneze nam torej omogočajo, da lahko na različne načine spreminjamo energetskega ravnovesje in nato proučujemo pomembnost posameznih komponent določenih metaboličnih poti pri uravnavanju energetskega ravnovesja (Brockmann in Bevova, 2002).

Večgenski mišji modeli

Za razliko od redkih lastnosti, ki so pod kontrolo enega samega gena, je večina lastnosti pod vplivom delovanja mnogih dejavnikov in ima večgensko osnovo – med njimi je tudi debelost. Pri debelosti so le redke mutacije, kjer je okvara posameznega gena odgovorna za razvoj ekstremnega fenotipa (glej prejšnje poglavje). Pri lastnostih, ki imajo večgensko osnovo, posameznikov v populaciji ne moremo uvrstiti v ločene skupine fenotipov, temveč te lastnosti kažejo kontinuirano porazdelitev. Tako tudi količina maščevja kaže raznolikost vrednosti in je približno normalno porazdeljena tako pri ljudeh kot pri živalskih populacijah. Vzrok take porazdelitve so različne oblike mnogih genov z majhnim ali zmernim učinkom v povezavi z negenetskimi dejavniki. Zaradi vedno večjega števila visoko polimorfni molekularni označevalci in različni eksperimentalni pristopi lahko danes s temeljitim pregledom modelnih organizmov poiščemo posamezne gene ali kvantitativne lokuse, ki nadzorujejo merljive večgenske lastnosti, kot je debelost (Pomp, 1997). Rankinen s sodelavci (2002) navaja, da je bilo pri živalskih modelih za debelost do sedaj objavljenih že 165 različnih kvantitativnih lokusov, ki vplivajo na količino maščevja. Pravi tudi, da lahko lokuse, ki domnevno vplivajo na razvoj debelosti, najdemo na vseh kromosomih razen kromosoma Y. Genov, markerjev in kromosomskih regij, povezanih z debelostjo ljudi, pa je bilo do sedaj omenjenih več kot 250.

Glavna in najpomembnejša prednost uporabe živalskih modelov za raziskovanje večgenskih lastnosti, na katere vpliva kopica dejavnikov, je nadzor. Nadzorujemo lahko genetsko raznolikost, parjenja ter opravimo določene biokemijske in fiziološke analize na podlagi znanih in nespremenljivih dejavnikov okolja. Uporabimo lahko širok spekter fenotipov različnih v sorodstvu parjenih linij, ki nam omogočajo raziskovanje številnih različnih lastnosti. Vse to omogoča direktno identifikacijo osnovnih genetskih lokusov za debelost, kloniranje specifičnih genov, odgovornih za pojav debelosti, ter testiranje hipotez o vzrokih in preprečevanju debelosti pri živalskih modelih (Warden in Fislser, 1994).

Mišji modeli so dobro orodje za analizo zapletenih večgenskih lastnosti iz več razlogov:

- pri miših je prisotna visoka stopnja genetske raznolikosti, ki je osnova za odkritje kvantitativnih lokusov za določeno lastnost;
- miši imajo kratek generacijski interval, parjenja lahko načrtujemo, pri čemer je parjenje v sorodstvu možno, stroški vzdrževanja mišjih kolonij so nizki, ipd.;
- za miši je na voljo veliko število visoko polimorfni molekularni označevalci;
- miši so dober model za primerjalno kartiranje (homologija med mišjimi in človeškimi kromosomi je dobro definirana, tako da je pogosto možno določiti kromosomsko lokacijo gena pri ljudeh s pomočjo kartiranja pri miših).

Za razvoj takih modelov je na voljo širok spekter različnih strategij, ki jih lahko združimo v štiri glavne skupine:

- z vplivi okolja, t.j. z različnimi prehranskimi režimi sprožena večgenska debelost;
- epistatično sprožena večgenska debelost, kjer se debelost pojavi kot rezultat specifičnih interakcij med lokusi, ki vplivajo na debelost;

- naraven pojav različnih oblik večgenske debelosti pri parjenju mišjih linij v sorodstvu;
- z dolgoročno selekcijo sprožena večgenska debelost (Pomp, 1997).

Za raziskovanje kvantitativne genetike debelosti so zelo primerni modeli, pridobljeni z zadnjo omejeno strategijo, torej tisti, ki so rezultat dolgoročne selekcije različnih lastnosti, povezanih z debelostjo (Pomp, 1999). Med njimi je znanih tudi precej mišjih modelov, ki kažejo večgensko osnovo za debelost ali bolezni, povezane z debelostjo, kot so npr. diabetes, hipertenzija in ateroskleroza. Le nekateri izmed mnogih so navedeni v preglednici 3.

Preglednica 3. Nekaj primerov večgenskih mišjih modelov debelosti (prirejeno po Brockmann in Bevova, 2002)

Table 3. Some examples of polygenic mouse models of obesity (adapted from Brockmann and Bevova, 2002)

Križanci	Lastnosti mišje linije	Kvantitativni lokusi
F × L	selekcija na visoko (F) oziroma nizko (L) količino maščevja.	<i>Fob</i> (F-line obesity QTL)
SM/J × A/J	SM/J: selekcija v manjšo telesno maso, A/J: selekcija v večjo telesno maso.	<i>Bwq</i> (Body weight QTL)
MH/BL MH/ML	selekcija v visoko (MH) in nizko (ML) izgubo toplote BL: linija z nizko izgubo toplote.	<i>Batq</i> (Brown fat QTL) <i>Fatq</i> (Percent fat QTL) <i>Hlq</i> (Heat loss QTL)
SWR/J × ARK/J	SWR/J: debele ob krmi, bogati z maščobami, ARK/J: suhe ob krmi, bogati z maščobami.	<i>Dob</i> (Dietary obesity)

ZAKJUČEK

Že pred mnogimi leti so ugotovili, da je hipotalamus ključna regija možganov za uravnavanje energetskega ravnovesja. Z odkrivanjem vedno novih molekularnih posrednikov (mediatorjev) ter regulatornih poti za uravnavanje hranjenja in telesne mase se naše razumevanje molekularnih mehanizmov, udeleženih pri vzdrževanju energetskega ravnovesja, iz leta v leto povečuje. Večino tega napredka lahko pripišemo prepoznavi pomembnosti leptina pri vzdrževanju energetskega ravnovesja. Nasploh so večino komponent regulatornih zank, vpletenih v ta izredno zapleteni proces, odkrili pri pozicijskem kloniranju genov spontanih mutacij debelosti miši. Po odkritju teh prvih genov debelosti se je pojavilo veliko število mišjih modelov z izničnimi geni in tudi transgenskih mišjih modelov debelosti, anoreksije ali odpornosti na debelost. Za raziskovanje večgenske osnove debelosti pa so razvili precej mišjih modelov, ki kažejo večgensko osnovo za debelost ali bolezni, povezane z debelostjo, kot so npr. diabetes, hipertenzija in ateroskleroza. Ker so miši dober model za primerjalno kartiranje, lahko razkrije osnovnih mehanizmov uravnavanja energetskega ravnovesja pri miših v prihodnosti pripomore k omejevanju nastanka debelosti pri ljudeh in s tem k zmanjšanju tveganja nastanka z debelostjo povezanih bolezni. Hkrati bi to znanje lahko prenesli še v živinorejo in tako omogočili tudi uravnavanje količine maščevja pri reji domačih živali.

CONCLUSION

The role of the hypothalamus as a key brain region in regulating energy balance was established many years ago. In recent years novel molecular mediators and regulatory pathways for feeding and body weight regulation have been identified. Therefore, our understanding of the molecular mechanisms that regulate energy homeostasis has been greatly increased. Much of this progress is due to recognition of the importance of leptin in the regulation of energy balance.

Most of the components of homeostatic circuits, involved in this extremely complex process, have been identified through the positional cloning of spontaneous mouse obesity mutations. Since the characterization of these first obesity genes a large number of transgenic and knockout mouse models with obesity, anorexia or obesity resistance have been created. Several mouse models with a polygenic basis of obesity and diseases associated with obesity (e.g. diabetes, hypertension and atherosclerosis) have also been developed to dissect the polygenic basis of obesity. Knowledge about basic mechanisms of energy balance regulation in the mouse could be transferred to obesity research in humans and farm animals. This could improve the prognosis and treatment of obesity-related diseases in humans such as diabetes, heart defects etc., whereas in livestock species it could allow manipulation of fat to improve growth and meat quality characteristics.

VIRI

- Barsh, G.S./ Schwartz, M.W. Genetic approaches to studying energy balance, perception and integration. *Nature Rev Gen*, 3(2002), 589–600.
- Bouchard, C. Genetics of Human Obesity: Introductory Notes. V: The genetics of obesity (ur.: Bouchard, C.). London, CRC Press, 1994, 1–15.
- Bowles, L./ Kopelman, P. Leptin: of mice and men? *J Clin Pathol*, 54(2001), 1–3.
- Brockmann, G.A./ Bevova, M. Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *TIG*, 18(2002)7, 367–376.
- Buchanan, C./ Mahesh, V./ Zamorano, P./ Brann, D. Central Nervous System Effects of Leptin. *TEM*, 9(1998)4, 146–150.
- Bultman, S.J./ Michaud, E.J./ Woychik R.P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71(1992), 1195–1204.
- Chen, H./ Charlat, O./ Tartaglia, L.A./ Woolf, E.A./ Weng, X./ Ellis, S.J./ Lakey, N.D./ Culpepper, J./ Moore, K.J./ Breitbart, R.E./ Duyk, G.M./ Tepper, R.I./ Morgenstern, J.P. Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice. *Cell*, 84(1996), 491–495.
- Chehab, F.F. Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *TIPS*, 2(2000)1, 309–314.
- Coleman, D.L. Effects of Parabiosis of Obese with Diabetes and Normal Mice. *Diabetologia*, 9(1973), 294–298.
- Coleman, D.L. Obese and Diabetes: Two Mutant Genes Causing Diabetes – Obesity Syndromes in Mice. *Diabetologia*, 14(1978), 141–148.
- Coleman, D.L./ Eicher, E.M. Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered*, 88(1990), 424–427.
- Cool, D.R./ Normant, E./ Shen, F./ Chen, H./ Pannell, L./ Zhang, Y./ Loh, Y.P. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe/fat mice. *Cell*, 88(1997), 73–83.
- Elmqvist, J.K./ Elias, C.F./ Clifford, B.S. From Lesions to Leptin: Hypothalamic Control of Food Intake and Body Weight. *Neuron*, 22(1999), 221–232.
- Flier, J.S./ Maratos-Flier, E. Obesity and the Hypothalamus: Novel Peptides for New Pathways. *Cell*, 92(1998), 437–440.
- Forbes, S./ Bui, S./ Robinson, B.R./ Hochgeschwender, U./ Brennan, M.B. Integrated control of appetite and fat metabolism by the leptin-proopiomelanocortin pathway. *PNAS*, 98(2001)7, 4233–4237.
- Friedman, J.M./ Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(1998), 763–770.
- Halaas, J.L./ Gajiwala, K.S./ Maffei, M./ Cohen, S.L./ Chait, B.T./ Rabinowitz, D./ Lallone, R.L./ Burley, S.K./ Friedman, J.M. Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the obese Gene. *Science*, 269(1995), 543–546.
- Houseknecht, K.L./ Portocarrero, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol*, 6(1998), 457–475.
- Huang, Q./ Viale, A./ Picard, F./ Nahon, J.L./ Richard, D. Effects of Leptin on Melanine-Concentrating Hormone Expression in the Brain of Lean and Obese Lepob/Lepob Mice. *Neuroendocrinol*, 69(1999), 145–153.
- Inui, A. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides – mediation of the action of leptin. *TINS*, 22(1999)2, 62–67.
- Inui, A. Transgenic Approach to the Study of Body Weight Regulation. *Pharm Rev*, 52(2000)1, 35–61.
- Kleyn, P.W./ Fan, W./ Kovats, S.G./ Lee, J.J./ Pulido, J.C./ Wu, Y./ Berkemeier, L.R./ Misumi, D.J./ Holmgren, L./ Charlat, O./ Woolf, E.A./ Tayber, O./ Brody, T./ Shu, P./ Hawkins, F./ Kennedy, B./ Baldini, L./ Ebeling, C./ Alperin, G.D./ Deeds, J./ Lakey, N.D./ Culpepper, J./ Chen, H./ Glucksmann-Kuis, M.A./ Moore, K.J.

- Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family. *Cell*, 85(1996)2, 281–290.
- Lawrence, C.B./ Turnbull, A.V./ Rothwell, N. Hypothalamic control of feeding. *Curr Op Neurobiol*, 9(1999), 778–783.
- Leibel, R.L./ Chung, W.K./ Chua Jr., S.C. The Molecular Genetics of Rodent Single Gene Obesities. *J Biol Chem*, 272(1997)51, 31937–31940.
- Naggert, J.K./ Fricker, L.D./ Varlamov, O./ Nishina, P.M./ Rouille, Y./ Steiner, D.F./ Carroll, R.J./ Paigen, B.J./ Leiter, E.H. Hyperproinsulinemia in obese *fat/fat* mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*, 10(1995), 135–142.
- Naggert, J./ Harris, T./ North, M. The genetics of obesity. *Curr Op Gen Dev*, 7(1997), 398–404.
- North, M.A. Advances in the molecular genetics of obesity. *Curr Op Gen Dev*, 9(1999), 283–288.
- Pomp, D. Genetic Dissection of Obesity in Polygenic Animal Models. *Behavior Gen*, 27(1997), 285–306.
- Pomp, D. Animal models of obesity. *Mol Med Today*, 5(1999), 459–460.
- Qu, D./ Ludwig, D.S./ Gammeltoft, S./ Piper, M./ Pelleymounter, M.A./ Cullen, M.J./ Mathes, W.F./ Przypek, J./ Kanarek, R./ Maratos-Flier, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(1996), 243–247.
- Rankinen, T./ Perusse, L./ Weisnagel, S.J./ Snyder, E.E./ Chagnon, Y.C./ Bouchard, C. The Human Obesity Gene Map: The 2001 Update. *Obes Res*, 10(2002)3, 196–243.
- Robinson, S.W./ Dinulescu, D.M./ Cone, R.D. Genetic Models of Obesity and Energy Balance in the Mouse. *Annu Rev Genet*, 34(2000), 687–745.
- Schwartz, M.W./ Woods, S.C./ Porte Jr, D./ Seeley, R.J./ Baskin, D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(2000), 661–671.
- Spiegelman, B.M./ Flier, J.S. Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell*, 87(1996), 377–389.
- Spiegelman, B.M./ Flier, J.S. Obesity and the Regulation of Energy Balance. *Cell*, 104(2001), 531–543.
- Stunkard, A.J., Foch, T.T., Hrubec, Z. A twin study of human obesity. *JAMA*, 256(1986)1, 51–54.
- Tartaglia, L.A./ Dembski, M./ Weng, X./ Deng, N./ Culpepper, J./ Devos, R./ Richards, G.J./ Camfield, L.A./ Clark, F.T./ Deeds, J./ Muir, C./ Seanker, S./ Moriarty, A./ Moore, K.J./ Smutko, J.S./ Mays, G.G./ Woolf, E.A./ Monroe, C.A./ Tepper, R.I. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell*, 83(1995), 1263–1271.
- Warden, C.H./ Fisler, J.S. Identification of Genes Underlying Polygenic Obesity in Animal Models. The genetics of obesity, (ur.: Bouchard, C.). London, CRC Press, 1994, 181–197.
- Williams, G./ Harrold, J.A./ Cutler, D.J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc*, 59(2000), 385–396.
- Zhang, Y./ Proenca/ R., Maffei/ M./ Barone, M./ Leopold, L./ Froedman, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(1994), 425–432.
- Ziotopoulou, M./ Mantzoros, C.S./ Hileman, S.M./ Flier, J.S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279(2000), E838–E845.
- Yen, T.Y./ Gill, A.M./ Frigeri, L.G./ Barsh, G.S./ Wolff, G.L. Obesity, diabetes and neoplasia in yellow *Avy*^{-/-} mice: ectopic expression of the *agouti* gene. *FASEB*, 8(1994), 479–488.