

**Pharmakologische und genetische Eingriffe in das  
Leptinsystem und in andere an der Regulation  
des Energiehaushalts beteiligte  
Hormonsysteme bei Mäusen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sandra Eiden**

aus Trier

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am 24.07.2002 ..... angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. I. Schmidt

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Heldmaier

Tag der mündlichen Prüfung am 24.07.2002 .....

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DAS LEPTIN-SYSTEM UND SEINE ZENTRALE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Physiologische Regulation des Plasmaleptinspiegels.....	1
<i>1.1.1.1</i> Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse.....	1
<i>1.1.1.2</i> Fettmassenunabhängige Beeinflussung des Plasmaleptinspiegels.....	2
1.1.2 Zentrale Vermittlung der Leptinwirkung.....	4
<i>1.1.2.1</i> Mediatoren der Leptinwirkung – beteiligte Gehirnstrukturen und Neuropeptide.....	4
<i>1.1.2.2</i> NPY als wesentliches orexigenes Neuropeptid bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung.....	5
<i>1.1.2.3</i> $\alpha$ MSH als wesentliches anorexigenes Neuropeptid bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung.....	6
1.1.3 Wirkung von rekombinantem Leptin in Tiermodellen mit genetisch bedingter Adipositas.....	7
<i>1.1.3.1</i> Monogenetische Defekte im Leptin-System von Nagern.....	7
<i>1.1.3.2</i> Wirkung von rekombinantem Leptin bei genetisch adipösen Tieren.....	9
1.1.4 Diätinduzierte Adipositas und funktionelle Leptinresistenz.....	11
<i>1.1.4.1</i> Diätinduzierte Adipositas als dominierende Adipositasform bei Menschen.....	11
<i>1.1.4.2</i> Wirkung von rekombinantem Leptin bei diätinduziert adipösen Tieren.....	12
1.1.5 Komplexe Regulation des Energiehaushaltes.....	13
<b>1.2 DIE HPA-ACHSE UND IHRE MÖGLICHE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Glukokortikoide.....	14
1.2.2 Rolle der HPA-Achse bei der Regulation des Energiehaushaltes.....	14
1.2.3 Knockout-Modelle.....	16
<b>1.3 DAS AMYLIN-SYSTEM UND SEINE MÖGLICHE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES.....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Amylin.....	17
1.3.2 Rolle des Amylin-Systems bei der Regulation des Energiehaushaltes.....	19

1.3.3 Lachs-Calcitonin und seine Interaktion mit dem Amylin-System.....	20
<b>1.4 ZIELE DER ARBEIT.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Versuchsserie A.....	23
1.4.2 Versuchsserie B.....	24
1.4.3 Versuchsserie C.....	24
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
<b>2.1 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE A.....</b>	<b>26</b>
2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	26
2.1.2 Versuchsbeschreibung.....	26
2.1.2.1 Versuchsgruppe A1.....	26
2.1.2.2 Versuchsgruppe A2.....	27
2.1.2.3 Versuchsgruppe A3.....	28
<b>2.2 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE B.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	28
2.2.1.1 Gewebsspezifische Inaktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors (GR).....	28
2.2.1.2 Untersuchte Altersgruppen und Haltungsbedingungen.....	29
2.2.2 Versuchsbeschreibung.....	29
2.2.2.1 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Körpermasse und Körperzusammen- setzung im Entwicklungsverlauf.....	30
2.2.2.2 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Futteraufnahme und Stoffwechsel im Entwicklungsverlauf.....	30
2.2.2.3 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf.....	31
<b>2.3 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE C.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	31
2.3.2 Versuchsbeschreibung.....	32
2.3.2.1 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei pelletierter Standard-Diät.....	32
2.3.2.2 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei attraktiver Zusatzdiät.....	33
2.3.2.3 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei normalgewichtigen und genetisch adipösen Tiermodellen.....	33

2.3.2.4 Auswirkungen einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf den Plasmainsulin- spiegel.....	33
2.3.2.5 Auswirkungen einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf die NPY-mRNA- Konzentration im Nucleus arcuatus.....	34
<b>2.4 UNTERSUCHUNGEN AN LEBENDEN TIEREN DER VERSUCHSSERIEN A-C.....</b>	<b>34</b>
2.4.1 Bestimmung von Futteraufnahme und Körpermasse.....	34
2.4.2 Langzeit-Leptinbehandlung unter Verwendung osmotischer Mini-Pumpen.....	36
2.4.2.1 Funktionsweise der Pumpen.....	36
2.4.2.2 Implantation der Pumpen.....	37
2.4.3 Eintägige Behandlungen mit Leptin bzw. Lachs-Calcitonin.....	38
2.4.3.1 Verabreichung subkutaner Injektionen.....	38
2.4.3.2 Beurteilung des Behandlungs-Effekts anhand der Futteraufnahme.....	39
2.4.4 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs.....	40
2.4.4.1 Versuchsaufbau.....	40
2.4.4.2 Bestimmung der Stoffwechselrate und verwandter Parameter.....	42
2.4.4.3 Bestimmung der Thermoneutralzone.....	43
2.4.5 Plasmagewinnung durch Blutentnahme am lebenden Tier.....	44
<b>2.5 UNTERSUCHUNGEN NACH ENDE DER VERSUCHSSERIEN A-C.....</b>	<b>45</b>
2.5.1 Tötung der Versuchstiere.....	45
2.5.1.1 Plasmagewinnung nach Versuchsende.....	45
2.5.1.2 Präparation der Gehirne.....	45
2.5.1.3 Bestimmung der Körperzusammensetzung.....	46
2.5.1.4 Bestimmung der Leberzusammensetzung.....	46
2.5.2 Immunologische Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Plasma.....	47
2.5.2.1 Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays (RIA).....	47
2.5.2.2 Bestimmung der Plasmaleptin-Konzentration.....	47
2.5.2.3 Bestimmung der Plasmainsulin-Konzentration.....	49
2.5.2.4 Bestimmung der Plasmathyroxin-Konzentration.....	50
2.5.3 <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	50
2.5.3.1 Schneiden der Gehirne.....	51
2.5.3.2 Herstellung der Hybridisierungslösung.....	51
2.5.3.3 Hybridisierung.....	52
2.5.3.4 Posthybridisierung.....	52
2.5.3.5 Filmautoradiographie.....	53

2.5.3.6 Auswertung der Röntgenfilme.....	53
<b>2.6 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG.....</b>	<b>54</b>
2.6.1 Allgemeines.....	54
2.6.2 Regressionsanalysen.....	54
2.6.3 Statistischer Vergleich von Mittelwerten.....	55
2.6.3.1 unpaarer <i>t</i> -Test.....	55
2.6.3.2 Varianzanalysen.....	56
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 VERSUCHSSERIE A: AUSWIRKUNG EINER LEPTIN-INFUSION BEI <i>OB/OB</i>-MÄUSEN.....</b>	<b>57</b>
3.1.1 Auswirkung der Leptin-Infusion auf den Verlauf von Körpermasse, Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch.....	57
3.1.2 Überprüfung der Leptinresponsivität im Infusionsverlauf.....	62
3.1.3 Dosisabhängigkeit der Veränderungen von Körpermasse und Futteraufnahme.....	63
3.1.4 Veränderung der Körperzusammensetzung in Abhängigkeit von der Plasmaleptin- Konzentration.....	67
3.1.5 Auswirkungen der Leptin-Infusion auf die Plasmainsulin-Konzentration.....	70
3.1.6 Veränderung des Leberfettgehaltes im Zuge der Körpermassenabnahme.....	71
<b>3.2 VERSUCHSSERIE B: AUSWIRKUNG EINES ZENTRALEN GLUKOKORTIKOID-REZEPTOR- DEFEKTS BEI MÄUSEN.....</b>	<b>72</b>
3.2.1 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Körpermasse und Körperzusammensetzung im Entwicklungsverlauf.....	72
3.2.2 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Futteraufnahme und Stoffwechsel im Entwicklungsverlauf.....	75
3.2.3 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf.....	80
<b>3.3 VERSUCHSSERIE C: AUSWIRKUNG EINER LACHS-CALCITONIN-BEHANDLUNG BEI MÄUSEN UND RATTEN.....</b>	<b>83</b>
3.3.1 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei pelletierter Standard-Diät.....	84
3.3.2 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei zusätzlichem Angebot einer attraktiven Zusatzdiät.....	85

3.3.3 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei normalgewichtigen und genetisch adipösen Tiermodellen.....	88
3.3.4 Auswirkungen einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf den Plasmainsulinspiegel.....	92
3.3.5 Auswirkung einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf die NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus.....	93
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1 AUSWIRKUNGEN EINER LANGZEIT-LEPTINBEHANDLUNG BEI <i>OB/OB</i>-MÄUSEN.....</b>	<b>98</b>
4.1.1 Leptineffekt auf die Futteraufnahme und die Körpermasse von <i>ob/ob</i> -Mäusen.....	98
4.1.2 Beruht die Abnahme der Körpermasse auf einer selektiven Reduktion der Körperfettmasse?.....	99
4.1.2.1 Leptineffekt auf die Körperfettmasse.....	99
4.1.2.2 Existiert zusätzlich ein Leptineffekt auf die fettfreie Masse?.....	102
4.1.3 Leptineffekt auf den Sauerstoffverbrauch von <i>ob/ob</i> -Mäusen.....	103
4.1.3.1 Einflussgrößen, die bei der Feststellung eines Leptineffekts auf den Sauerstoffverbrauch von <i>ob/ob</i> -Mäusen zu berücksichtigen sind.....	103
4.1.3.2 Befunde der vorliegenden Arbeit.....	106
4.1.4 Dosisabhängigkeit der Leptinwirkung.....	108
4.1.4.1 Zusammenhang zwischen Leptindosis und Plasmaleptinspiegel.....	108
4.1.4.2 Dosisabhängige Leptinwirkung auf die Futteraufnahme, Körpermasse und Körperzusammensetzung von <i>ob/ob</i> -Mäusen.....	109
4.1.4.3 Dosisabhängige Leptinwirkung auf den Plasmainsulinspiegel von <i>ob/ob</i> -Mäusen.....	110
4.1.4.4 Einfluss des Ausgangsgewichts auf die Leptinwirkung bei <i>ob/ob</i> -Mäusen.....	111
4.1.5 Warum kommt es zur Einstellung einer neuen stabilen Körpermasse infolge der Leptinbehandlung bei <i>ob/ob</i> -Mäusen?.....	112
4.1.5.1 Mögliche Ursachen für die Stabilisierung der Körpermasse.....	112
4.1.5.2 Komplexe Regulation des Energiehaushaltes.....	113
<b>4.2 DIE HPA-ACHSE UND IHRE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIE-HAUSHALTES.....</b>	<b>114</b>
4.2.1 Das Modell der GR <sup>NesCre</sup> -Maus.....	114
4.2.1.1 Gewebsspezifität des GR-Defekts.....	115
4.2.1.2 Primäre Störungen der HPA-Achse infolge des zentralen GR-Defekts.....	115

4.2.1.3 Mögliche Beteiligung von Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR) an der Vermittlung der Glukokortikoid-Wirkung.....	116
4.2.2 Auswirkung des zentralen GR-Defekts auf den Energiehaushalt im Entwicklungsverlauf.....	117
4.2.2.1 Auswirkung des zentralen GR-Defekts während der Säuglingsphase.....	117
4.2.2.2 Veränderung der Körperzusammensetzung nach dem Absetzen.....	118
4.2.3 Bemerkungen zur methodischen Vorgehensweise beim Vergleich der Sauerstoffverbrauchsdaten.....	120
4.2.4 Periphere Glukokortikoid-Effekte als mögliche Ursache für die veränderte Körperzusammensetzung von GR <sup>NesCre</sup> -Mäusen.....	122
4.2.4.1 Periphere Glukokortikoid-Effekte auf Knochen und Muskelmasse.....	122
4.2.4.2 Periphere Glukokortikoid-Effekte auf die Fettmasse.....	123
4.2.5 Der Ausfall von zentralen Glukokortikoid-Effekten als mögliche Ursache für die Veränderung der Futteraufnahme von GR <sup>NesCre</sup> -Mäusen.....	123
4.2.6 Die Rolle von Leptin und Insulin bei der Ausbildung des GR <sup>NesCre</sup> -Phänotyps.....	125
4.2.6.1 Auswirkung des zentralen GR-Defekts auf die Funktion des Leptin-Systems.....	125
4.2.6.2 Insulin als wichtiger Gegenspieler der HPA-Achse.....	126
4.2.7 Beurteilung des GR <sup>NesCre</sup> -Knockout-Modells.....	127
<b>4.3 LACHS-CALCITONIN UND SEINE ANOREKTISCHE WIRKUNG.....</b>	<b>128</b>
4.3.1 Unterschiede zwischen Leptin und sCT bei der Beeinflussung der Futteraufnahme....	128
4.3.2 Ist die anorektische sCT-Wirkung die Folge eines unspezifischen Effekts?.....	129
4.3.3 Bemerkungen zur methodischen Vorgehensweise bei der quantitativen Auswertung der anorektischen sCT-Wirkung.....	130
4.3.3.1 Einbeziehung von Vor- und Nachlauf Tagen als Referenzwerte für die Beurteilung des Behandlungseffekts.....	130
4.3.3.2 Berücksichtigung der Körpermasse bei der Angabe der sCT-Dosis.....	130
4.3.4 Quantitative Unterschiede in der sCT-Wirkung bei genetisch adipösen Tiermodellen.	131
4.3.5 Mögliche sekundäre Abnormalitäten als Erklärung für die veränderte sCT-Wirkung bei genetisch bedingter Adipositas.....	133
4.3.5.1 Hyperinsulinämie als Indikator einer Hyperamylinämie?.....	133
4.3.5.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Wirkungsstärke von sCT und der NPY-Konzentration im ARC bei genetisch bedingter Adipositas?.....	135
4.3.6 Worauf beruht die gesteigerte sCT-Wirkung im Sonderfall der diätinduzierten Adipositas?.....	138



4.3.6.1 Plasmakonzentrationen an Insulin und Amylin bei Fütterung einer attraktiven, fettreichen Zusatzdiät.....	138
4.3.6.2 Der NPY-Spiegel in Abhängigkeit von der Nahrungszusammensetzung.....	139
4.3.6.3 Könnte das hypothalamische NPY-System an der Vermittlung der selektiven sCT-Wirkung auf die Zusatzdiät beteiligt sein?.....	142
4.3.7 Beurteilung des Lachs-Calcitonins im Hinblick auf die Therapie von Adipositas.....	144
<b>4.4 FAZIT.....</b>	<b>145</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>147</b>
<b>6 ANHANG.....</b>	<b>150</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>155</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	
<b>ERKLÄRUNG</b>	
<b>LEBENS LAUF</b>	

**ABKÜRZUNGEN & englische bzw. lateinische FACHAUSDRÜCKE**

<sup>14</sup> C.....	radioaktives Kohlenstoff-Isotop
<sup>125</sup> I.....	radioaktives Iod-Isotop
<sup>35</sup> S.....	radioaktives Schwefel-Isotop
+/+.....	homozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens
+/-.....	heterozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens
+/?.....	homozygoter oder heterozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens
-/-.....	homozygoter Träger eines defekten Allels eines Gens
+/ <i>db</i> .....	heterozygoter Träger des <i>db</i> -Gendefektes
+/ <i>fa</i> .....	heterozygoter Träger des <i>fa</i> -Gendefektes
+/ <i>ob</i> .....	heterozygoter Träger des <i>ob</i> -Gendefektes
AC187.....	spezifischer Amylin-Antagonist
ACTH.....	"adrenocorticotropic hormone", Adrenokortikotropes Hormon
<i>ad libitum</i> .....	zur freien Verfügung
AgRP.....	"agouti-related peptide"
AKR/J.....	Name eines Inzucht-Mäusestammes
$\alpha$ MSH.....	" $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone", $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon / Melanokortin
anabol.....	Gewebe-aufbauend
anorektisch / anorexigen.....	appetitthemmend
<i>antisense</i> -Sonde.....	RNA, die die komplementäre Basensequenz zu der im Gewebe nachzuweisenden RNA aufweist
AP.....	Area postrema
ARC.....	Nucleus arcuatus des Hypothalamus
B <sub>0</sub> .....	Leerprobe im Radioimmunoassay
BALB/cJ.....	Name eines Inzucht-Mäusestammes
BMI.....	"body mass index"
bp.....	Basenpaare

C1a.....	Isoform des Calcitonin-Rezeptors mit hoher Affinität gegenüber Lachs-Calcitonin und moderater Affinität gegenüber Säugetier-Calcitonin
C1b.....	Isoform des Calcitonin-Rezeptors mit hoher Affinität gegenüber Lachs-Calcitonin
C3.....	Isoform des Calcitonin-Rezeptors mit hoher Affinität gegenüber Amylin und Lachs-Calcitonin
C57Bl/6J.....	Name eines Inzucht-Mäusestammes
C57Bl/KsJ.....	Name eines Inzucht-Mäusestammes
CART.....	"cocaine and amphetamine regulated transcript"
cDNA.....	zu einer mRNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure-Sequenz
CGRP.....	"calcitonin gene-related peptide"
CreLoxP-System....	System zur Erzeugung eines gewebsspezifischen Knockouts eines Zielgens durch die Flankierung dieses Gens mit zwei LoxP-sites und die zellspezifische Expression der Cre-Rekombinase
CRH.....	"corticotropin-releasing hormone", Kortikotropin-Releasing-Hormon
Cushing-Syndrom..	durch erhöhte Konzentrationen von Kortisol im Plasma gekennzeichnetes Krankheitsbild, vorwiegend durch eine tumoröse Entartung des Hypophysenvorderlappens oder der Nebennierenrinde verursacht
<i>db</i> .....	" <i>diabetic</i> ", Bezeichnung für defektes Allel des Leptinrezeptor-Gens bei Mäusen
<i>db/db</i> .....	homozygoter Träger des <i>db</i> -Gendefektes
DKFZ.....	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMH.....	Nucleus dorsomedialis des Hypothalamus
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
<i>downregulation</i> .....	Wirkungsabnahme eines Rezeptor-Liganden infolge einer Adaptation der Rezeptordichte oder nachgeschalteter Komponenten der Signal-Transduktion
<i>E.coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
<i>fa</i> .....	" <i>fatty</i> ", Bezeichnung für defektes Allel des Leptinrezeptor-Gens bei Ratten
<i>fa/fa</i> .....	homozygoter Träger des <i>fa</i> -Gendefektes
FFDM.....	"fat-free dry-mass", fettfreie Trockenmasse
GH.....	"growth hormone", Wachstumshormon

GR.....	Glukokortikoid-Rezeptor
GR <sup>NesCre</sup> .....	Mäuse, mit einem zentralen Defekt des Glukokortikoid-Rezeptors durch die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin-Promoters in Neuronen und Gliazellen
His <sub>6</sub> -tagged.....	6 Histidinreste (genau: HHHHHHTDP) am N-terminalen Ende des rekombinanten Leptins
HPA-Achse.....	"hypothalamic-pituitary-adrenal", Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
I <sub>1</sub> -I <sub>4</sub> .....	1. bis 4. Pumpenimplantation
IGF-1.....	"insulin-like growth factor 1"
IgG.....	γ-Immunglobuline
<i>in situ</i> .....	"am natürlichen Ort", hier: an anatomisch und morphologisch unversehrten Gefrierschnitten von Mäusegehirnen
<i>in vitro</i> .....	"im (Reagenz-) Glas", d.h. außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i> .....	"am Lebendigen", in einem lebenden Organismus
IOD.....	integrierte optische Dichte
I.U.....	"international unit", internationale Einheit
JAK.....	"janus kinase", Thyrosin-Kinase der Janus-Familie
katabol.....	Gewebe-abbauend
KM.....	Körpermasse
ko.....	Kontrolltiere, Kontrollbehandlung mit PBS (siehe unten)
Kombi.....	Kombinationsbehandlung mit Leptin und Lachs-Calcitonin
Lep.....	Leptinbehandlung
LHA.....	"lateral hypothalamic area", lateraler Hypothalamus
m.....	Männchen
MC3(-R).....	Typ 3 Melanokortin-Rezeptor
MC4(-R).....	Typ 4 Melanokortin-Rezeptor
MC4-r-KO.....	Melanokortin-4-Rezeptor-Knockout
MCH.....	"melanin-concentrating hormone", Melanin-konzentrierendes Hormon

<i>meal-eating</i> .....	Aufnahme der Tagesfuttermenge in einer oder wenigen Portionen im Gegensatz zu einer über die Aktivitätsphase verteilten Aufnahme vieler kleiner Mahlzeiten
MR.....	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA.....	"messenger ribonucleic acid", messenger Ribonukleinsäure
mut.....	Mutanten
M <sub>w</sub> .....	"molecular weight", Molekulargewicht
N.....	Anzahl der Tiere in einer Versuchsgruppe
n.....	Anzahl der Einzelmessungen in einer Stichprobe
NPY.....	Neuropeptid Y
NSB.....	"non specific binding", Kontrollansatz zur Messung der unspezifische Bindung im Radioimmunoassay
NTS.....	Nucleus tractus solitarii
<i>ob</i> .....	" <i>obese</i> ", Bezeichnung für defektes Allel des Leptin-Gens bei Mäusen
<i>ob/ob</i> .....	homozygoter Träger des <i>ob</i> -Gendefektes
Ob-Ra.....	Splicevariante des Leptinrezeptors mit kurzer intrazellulärer Domäne
Ob-Rb.....	Splicevariante des Leptinrezeptors mit langer intrazellulärer Domäne
OKT.....	obere kritische Temperatur der Thermoneutralzone
orexigen.....	appetitsteigernd
OVL.....	"Organum vasculosum laminae terminalis"
P.....	Irrtumswahrscheinlichkeit
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub> .....	14-tägiger Behandlungszeitraum bei implantierter 1., 2., 3. bzw. 4. Pumpe
<i>pair-feeding</i> .....	im Rahmen einer Leptinbehandlung durchgeführtes Kontrollexperiment, bei dem die Tiere eine zu den behandelten Tieren identische Menge an Futter erhalten
PBS.....	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR.....	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
PHF-Diät.....	"palatable, high-fat diet", attraktive, fettreiche Diät
POMC.....	"pro-opiomelanocortin", Proopiomelanokortin

PVN.....	Nucleus paraventricularis des Hypothalamus
r.....	Korrelationskoeffizient
RIA.....	Radioimmunoassay
RQ.....	Respiratorischer Quotient
sCT.....	"salmon calcitonin", Lachs-Calcitonin
SE.....	"standard-error", Standardfehler eines Mittelwertes
<i>sense</i> -Sonde.....	RNA, die die identische Basensequenz der im Gewebe nachzuweisenden RNA aufweist
SFO.....	"Organum subfornicale", Subfornikalorgan
STAT.....	"signal transducers and activators of transcription"
STPD.....	"standard temperature pressure dry", Standardbedingungen: T= 273 K, P=760 mm Hg, P <sub>H<sub>2</sub>O</sub> =0 mm Hg (Trockenheit) zur Bestimmung von Gas-(Luft-)Volumina
T <sub>3</sub> .....	Trijodthyronin
T <sub>4</sub> .....	Thyroxin
<i>template</i> .....	linearisiertes cDNA-Fragment als Vorlage für die Transkription der RNA-Sonde im Rahmen der <i>in situ</i> -Hybridisierung
TO.....	Kontrollansatz zur Messung der Totalaktivität im Radioimmunoassay
tRNA.....	"transfer ribonucleic acid", Transfer-Ribonukleinsäure
UKT.....	untere kritische Temperatur der Thermoneutralzone
VMH.....	Nucleus ventromedialis des Hypothalamus
w.....	Weibchen
wt.....	Wildtyp
Y1.....	Typ 1 Neuropeptid Y-Rezeptor
Y5.....	Typ 5 Neuropeptid Y-Rezeptor

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS LEPTIN-SYSTEM UND SEINE ZENTRALE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES

Obwohl bereits vor mehr als 25 Jahren aufgrund von Parabioseversuchen zwischen genetisch adipösen und normalgewichtigen Mäusen die Existenz eines humoralen Signalstoffes bei der Regulation der Nahrungsaufnahme postuliert worden war (Coleman, 1973), wurde das entsprechende Hormon Leptin erst 1994 durch die Identifizierung und Klonierung des *ob*-Gens entdeckt (Zhang et al., 1994). Die intensive Erforschung dieses Hormons in den nachfolgenden Jahren hat jedoch verdeutlicht, dass die Funktion des Leptins im Organismus weit über die eines Sättigungsfaktors hinausgeht und bezüglich seiner metabolischen Wirkung vielmehr die Charakteristika eines Rückkopplungssignals für die Größe der Fettspeicher aufweist, so dass Leptin heute als "Adipositas-Signal" bezeichnet wird (Woods & Seeley, 2000). Neben seiner zentralen Rolle bei der Regulation des Körperfettgehaltes, auf die im Folgenden näher eingegangen werden wird, übt das Leptin-System vielfältige weitere Funktionen aus (Ahima & Flier, 2000; Harris, 2000; Trayhurn et al., 1999). So spielt Leptin eine Rolle im Zusammenhang mit der Immunabwehr (Lord et al., 1998), der Angiogenese (Sierra-Honigmann et al., 1998), der Hämatopoese und Osteogenese (Pighetti et al., 1999) und der Gehirnentwicklung (Steppan & Swick, 1999; Ahima et al., 1999a), ist ferner maßgeblich am Vorgang der sexuellen Reifung und an den Reproduktionsfunktionen des Körpers beteiligt (Zamorano et al., 1997; Bi et al., 1999; Harris, 2000; Ahima & Flier, 2000) und vermittelt die komplexe Adaptation des Körpers an Hungerperioden (Flier, 1998; Ahima & Flier, 2000).

### 1.1.1 Physiologische Regulation des Plasmaleptinspiegels

#### 1.1.1.1 Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse

Die grundlegende Eigenschaft eines Adipositas-Signals besteht in der engen Korrelation seiner Konzentration im Plasma bzw. am eigentlichen Wirkort mit der gespeicherten Fettmenge. Im Hinblick auf den Plasmaleptinspiegel konnte dieser Zusammenhang in Studien an Menschen und Nagern mehrfach belegt werden (Maffei et al., 1995; Considine & Caro, 1997; Rosenbaum et al., 1996; Eiden et al., 2001). Übereinstimmend mit der Funktion des Leptins als Adipositas-Signal wurde das weiße Fettgewebe als Hauptproduktionsort identifiziert (Zhang et al., 1994). Bisher konnte allerdings noch nicht geklärt werden, ob dabei die Konzentration an Triglyzeriden oder an anderen Metaboliten des Lipidstoffwechsels bzw. die

Richtung der Metaboliten- und Energieströme oder eventuell physikalische Faktoren, die in Zusammenhang mit dem Füllungszustand der Fettzellen stehen, die Leptin-Expression und -Sekretion bestimmen (Ahima & Flier, 2000; Mason et al., 1998; Hamilton et al., 1995). Interessanterweise treten innerhalb des Fettgewebes von Mäusen, Ratten und Menschen regionale Unterschiede in der Leptin-mRNA-Konzentration zwischen den einzelnen Fettdepots auf (Trayhurn et al., 1995; Rousseau et al., 1997; Masuzaki et al., 1995), wobei bisher noch nicht bekannt ist, wie die Leptin-Expression der verschiedenen Fettdepots geregelt und koordiniert wird und inwieweit diese Koordination über zentralnervöse Mechanismen vermittelt wird (Trayhurn et al., 1998).

Eine Leptin-Expression konnte außer im weißen Fettgewebe auch in anderen Geweben und Organen wie der Skelettmuskulatur, dem Magen-Darm-Trakt, dem Milchdrüsenepithel, sowie im braunen Fettgewebe und in der Plazenta nachgewiesen werden (Oliver et al., 2001; Dessolin et al., 1997; Masuzaki et al., 1997b; Bado et al., 1998; Morton et al., 1998; Wang J. et al., 1998a). Zudem existieren Studien, die eine Leptin-Expression innerhalb des Gehirns vermuten lassen (Morash et al., 1999; Wiesner et al., 1999). Über die Beiträge der meisten dieser weiteren Leptinproduktionsorte zum zirkulierenden Plasmaleptinspiegel und über die Faktoren, die sie regulieren, liegen bisher noch keine genauen Informationen vor. Speziell bei juvenilen Tieren konnte allerdings gezeigt werden, dass die Leptin-Expression im braunen Fettgewebe, das im Gegensatz zum weißen Fettgewebe weniger ein Energiedepot als einen Ort der sympathisch vermittelten thermoregulatorischen Thermogenese darstellt, entscheidend die Höhe des Plasmaleptinspiegels mitbestimmt (Zhang et al., 2001).

#### 1.1.1.2 Fettmassenunabhängige Beeinflussung des Plasmaleptinspiegels

Obwohl die Plasmaleptin-Konzentration im Allgemeinen ein zuverlässiger Indikator des Körperfettgehaltes ist (Woods & Seeley, 2000), kann es zu Veränderungen des Plasmaleptinspiegels kommen, die nicht in direktem Zusammenhang mit einer Änderung der Fettspeicher stehen. Neben zu erwähnenden Einflussfaktoren wie Geschlecht, Alter, Tages- und Jahreszeit (Ahrén et al., 1997; Rosenbaum et al., 1996; Ahima et al., 1998; Klingenspor et al., 1996; Drazen et al., 2000) scheinen auch Änderungen des Ernährungsstatus für die fettmassenunabhängige Veränderung der Plasmaleptin-Konzentration verantwortlich zu sein. So steigt die Plasmaleptin-Konzentration bei Nagern innerhalb weniger Stunden nach der Futteraufnahme an (Saladin et al., 1995; Harris et al., 1996), umgekehrt fällt der Plasmaleptinspiegel während des Fastens innerhalb kurzer Zeit bei Menschen und Nagern deutlich ab (Wagner et al., 2000; Kolaczynski et al., 1996; Boden et al., 1997; Frederich et al., 1995;



Ahima et al., 1996; Trayhurn et al., 1995), wobei die Größe dieser Veränderung in keinem Bezug zu der Änderung der Fettmasse in diesem Zeitraum steht. Diese Beobachtung könnte im Zusammenhang mit der Hypothese stehen, dass der Stimulus für die Leptin-Sekretion mehr mit der Stoffwechselaktivität der Fettzelle als mit der aktuell gespeicherten Fettmenge zusammenhängt (Coleman & Herrmann, 1999; Havel et al., 1996 & 1999; Hufnagel, 2001). Als weitere wichtige Einflussgröße muss das sympathische Nervensystem angesehen werden, da die Leptin-Expression im weißen und braunen Fettgewebe einer direkten sympathischen Kontrolle unterliegt (Zhang et al., 2001; Trayhurn et al., 1998; Evans et al., 1999; Giacobino, 1996) und zudem indirekte Einflüsse auf die Leptin-Expression über die sympathisch stimulierte Freisetzung von Katecholaminen aus den Nebennieren angenommen werden (Trayhurn et al., 1998; Gettys et al., 1996; Moinat et al., 1995). Auch die negative Rückkopplung von Leptin auf die eigene Produktion (Wang J. et al., 1999b) könnte über eine zentral vermittelte Wirkung auf das sympathische Nervensystem erfolgen (Slieker et al., 1996; Zhang et al., 2001), wobei in diesem Zusammenhang aber auch ein peripherer, autokriner Mechanismus vermutet wird (Wang J. et al., 1999b; Zhang et al., 1997).

Neben den bisher erwähnten Einflussfaktoren scheint auch die Interaktion mit anderen Hormonsystemen an der fettmassenunabhängigen Veränderung der Plasmaleptinkonzentration beteiligt zu sein. So wird im Hinblick auf die unabhängig vom Körperfettgehalt bestehende enge Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin (Boden et al., 1997; Dagogo-Jack et al., 1996; Kamoda et al., 1998) von einer wechselseitigen Beeinflussung des Leptin- und Insulin-Systems ausgegangen, bei der Insulin die Leptin-Expression und -Sekretion stimuliert (Barr et al., 1997; Wabitsch et al., 1996; Hardie et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996; Leroy et al., 1996; Sivitz et al., 1998; Cusin et al., 1995; Koopmans et al., 1998), während Leptin umgekehrt einen hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion auszuüben scheint (Emilsson et al., 1997; Kulkarni et al., 1997; Kieffer et al., 1997). Trotz eines postulierten direkten Effekts ist die Möglichkeit allerdings nicht auszuschließen, dass die vermutete Interaktion nur ein sekundäres Phänomen aufgrund des für beide Hormone beschriebenen Zusammenhangs mit dem Fettstoffwechsel und der Fettdeposition ist (Harris et al., 2000).

Neben dem Insulin-System scheint auch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-(HPA)-Achse an der Regulation des Plasmaleptinspiegels beteiligt zu sein. So wird von einer generell stimulierenden Wirkung der Glukokortikoide auf die Leptin-Synthese und -Sekretion ausgegangen (Considine et al., 1997; Murakami et al., 1995; Zakrzewska et al., 1999; Elimam

et al., 1998; De Vos et al., 1995; Newcomer et al., 1998). Dabei werden sowohl zentrale wie periphere Mechanismen angenommen, wobei im letzteren Fall vor allem eine indirekte Wirkung über eine Stimulierung der Insulin-Sekretion diskutiert wird (Solano & Jacobson, 1999; Casanueva & Dieguez, 1999; Harris et al., 2000). Leptin zeigt umgekehrt eine hemmende Wirkung auf die Glukokortikoid-Sekretion (Glasow et al., 1998; Bornstein et al., 1997; Pralong et al., 1998), wobei sowohl von einer zentral vermittelten Wirkung über die Beeinflussung von CRH (corticotropin-releasing hormone) als auch von einem direkten Effekt auf die Nebennierenrinde ausgegangen wird (Wauters et al., 2000; Harris et al., 2000).

### **1.1.2 Zentrale Vermittlung der Leptinwirkung**

#### 1.1.2.1 Mediatoren der Leptinwirkung – beteiligte Gehirnstrukturen und Neuropeptide

Eine weitere Voraussetzung für die Klassifizierung als Adipositas-Signal ist die zentrale Vermittlung der Leptinwirkung. Die lange Isoform (Ob-Rb) des Leptinrezeptors, die als einzige der Splicevarianten alle intrazellulären Strukturen besitzt, um als membranständiger Rezeptor eine effiziente Aktivierung der JAK (janus kinase) -STAT (signal transducers and activators of transcription)-Signalkaskade im Zellinneren auszulösen (Bjorbæk et al., 1997; Ghilardi et al., 1996; Vaisse et al., 1996), konnte in einer hohen Konzentration im Hypothalamus, speziell im ventrobasalen und ventromedialen Bereich, nachgewiesen werden (Elmqvist et al., 1998; Fei et al., 1997; Mercer et al., 1996a). Als Strukturen mit einer hohen Rezeptordichte sind dabei vor allem bilateral angelegte Kerngebiete wie der Nucleus arcuatus (ARC), dorsomedialis (DMH), ventromedialis (VMH) und der ventrale Nucleus praemammillaris hervorzuheben. Zusätzlich konnten Leptinrezeptoren auch außerhalb des Hypothalamus wie z.B. im Thalamus und im Cerebellum nachgewiesen werden (Elmqvist et al., 1998; Håkansson et al., 1998; Mercer et al., 1996a), deren Rolle bisher allerdings – auch im Hinblick auf die Erreichbarkeit dieser Strukturen für im Blut zirkulierendes Leptin – noch weitgehend ungeklärt ist (Ahima et al., 2000). Leptinrezeptoren werden auch in verschiedensten peripheren Geweben und Organen wie Lunge, Leber, Herz, Pankreas, Skelettmuskel, Fettgewebe und Gonaden exprimiert (Hoggard et al., 1997; De Matteis et al., 1998; Emilsson et al., 1997). Aufgrund von *in vitro*-Experimenten sind direkte periphere Leptineffekte u.a. auf die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse, die Niere, Nebenniere, Leber, Skelettmuskulatur, braune und weiße Fettzellen sowie die Ovarien nicht auszuschließen (Cohen et al., 1996; Greisen et al., 2000; Siegristkaiser et al., 1997; Cao et al., 1997; Takahashi et al., 1996; Berti et al., 1997; Müller et al., 1997; Poitout et al., 1998). Trotz des Nachweises des Ob-Rb-

Rezeptors in den meisten dieser peripheren Gewebe, spricht nicht zuletzt die im Vergleich dazu deutlich höhere Rezeptordichte in hypothalamischen Kerngebieten, im Speziellen dem Nucleus arcuatus, für eine überwiegend zentrale Vermittlung der wesentlichen Leptinwirkungen im Zusammenhang mit der Regulation des Energiehaushalts.

Leptin-sensitive Neurone im ARC, VMH und DMH exprimieren Neuropeptide, denen eine wichtige Funktion bei der zentralen Regulation des Energiehaushaltes zugeschrieben wird (Ahima & Flier, 2000). So wurde z.B. im ARC eine Coexpression der langen Leptinrezeptorform mit den orexigenen Neuropeptiden NPY (neuropeptide Y) und AgRP (agouti-related peptide) auf der einen Seite, sowie mit dem anorexigenen CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) und POMC (pro-opiomelanocortin), einem Vorläufer des  $\alpha$ MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone), auf der anderen Seite nachgewiesen (Mercer et al., 1996b; Cheung et al., 1997; Baskin et al., 1999; Elmquist et al., 1999; Ahima et al., 2000). Außerdem ist eine Leptinwirkung auf andere Neurotransmitter wie MCH (melanin-concentrating hormone) oder Orexin nicht auszuschließen (Elmquist et al., 1999). NPY und  $\alpha$ MSH wird allerdings eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Leptinwirkung hinsichtlich der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch zugewiesen (Friedman, 1997).

#### 1.1.2.2 NPY als wesentliches orexigenes Neuropeptid bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung

Obwohl NPY-mRNA sowie das entsprechende Peptid in zahlreichen Hirnarealen nachzuweisen sind, scheinen vor allem NPY-erge Neurone im ARC von spezieller Bedeutung für die Kontrolle des Energiehaushalts zu sein (Woods & Seeley, 2000). So synthetisieren diese Neurone als Antwort auf eine negative Energiebilanz mehr NPY-mRNA, was zu einer verstärkten Ausschüttung von NPY im Nucleus paraventricularis (PVN) führt, dem eine wichtige Rolle als Integrationszentrum bei der Regulation des Energiehaushaltes zugeschrieben wird (Williams et al., 2000; Kalra et al., 1991). NPY-Injektionen in die Region des PVN steigern dementsprechend die Nahrungsaufnahme (Stanley & Leibowitz, 1985; Billington et al., 1994). Zusätzlich ist NPY in der Lage, durch eine Verminderung der sympathisch aktivierten thermoregulatorischen Thermogenese den Energieverbrauch zu senken (Billington et al., 1994; Egawa et al., 1991). Dabei scheint vor allem die Bindung an die im PVN zahlreich exprimierten NPY-Typ5-(Y5)-Rezeptoren von Bedeutung zu sein, eine Beteiligung von Y1-Rezeptoren an der Vermittlung der orexigenen Wirkung des NPY wird momentan aber ebenfalls diskutiert (Marsh et al., 1998; Elmquist et al., 1999; Williams et al., 2001).

Das NPY-System wird prinzipiell als Vermittler der biologischen Antwort auf einen niedrigen Leptinspiegel im Zusammenhang mit Hungern angesehen (Friedman, 1997; Williams et al., 2001). Grundsätzlich wird von einer hemmenden Wirkung des Leptins auf die NPY-Expression ausgegangen (Elmqvist et al., 1999). So konnte im ARC von Mäusen, bei denen infolge eines Futterentzugs ein Abfall der Plasmaleptin-Konzentration zu verzeichnen ist, sowie von genetisch adipösen *ob/ob*-Mäusen, die kein funktionelles Leptin synthetisieren können, eine erhöhte NPY-mRNA-Konzentration nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite unterdrückt eine Leptinbehandlung bei Ratten nach einem Nahrungsentzug sowie bei *ad libitum* gefütterten *ob/ob*-Mäusen diese NPY-Überexpression (Stephens et al., 1995; Ahima et al., 1996 & 2000; Schwartz et al., 1996a; Mercer et al., 1997b). Obwohl kein Zweifel an der Rolle des NPY bei der Vermittlung der Leptinwirkung hinsichtlich der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs besteht, zeigen Untersuchungen an NPY-Knockout-Mäusen, dass das NPY-System nicht der alleinige Mediator der Leptinwirkung ist, da eine Ausschaltung des NPY-Gens nicht grundsätzlich mit einer verminderten Nahrungsaufnahme bzw. einer reduzierten Körpermasse einhergeht (Erickson et al., 1996a & b; Ahima et al., 2000). Werden NPY-Knockout-Mäuse mit *ob/ob*-Mäusen gekreuzt, so kann die ansonsten extreme Adipositas der *ob/ob*-Mäuse zwar vermindert werden, die Tiere sind allerdings immer noch schwerer als Wildtyp-Mäuse und weisen weiterhin neuroendokrine Abnormalitäten auf.

### 1.1.2.3 $\alpha$ MSH als wesentliches anorexigenes Neuropeptid bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung

Das Peptidhormon  $\alpha$ MSH gehört zur Familie der Melanokortine und wird aus POMC gebildet, das u.a. in Neuronen des ARC synthetisiert wird.  $\alpha$ MSH ist der Agonist für die beiden im Zentralnervensystem vorherrschenden Melanokortin-Rezeptoren, MC3 und MC4 (Fan et al., 1997; Schiöth et al., 1997). MC3-Rezeptoren werden in verschiedenen Gebieten des Hypothalamus sowie innerhalb des limbischen Systems exprimiert, eine Expression konnte aber auch in der Peripherie wie z.B. im Magen-Darm-Trakt und in der Plazenta nachgewiesen werden (Gantz et al., 1993a; Roselli-Reh fuss et al., 1993). Die Expression der MC4-Rezeptoren ist dagegen nur auf das Gehirn beschränkt, zeigt dort allerdings eine weite Verbreitung und konnte z.B. in Neuronen im PVN, DMH und im lateralen Hypothalamus (LHA) sowie auch in zahlreichen extrahypothalamischen Gehirngebieten wie z.B. dem Thalamus, Cortex und in verschiedenen Bereichen des Stammhirns lokalisiert werden (Gantz et al., 1993b; Mountjoy et al., 1994). Die Beteiligung des Melanokortin-Systems an der

Körpergewichtsregulation konnte in pharmakologischen Studien gezeigt werden, in denen die intracerebroventrikuläre Gabe von  $\alpha$ MSH-Antagonisten die Futteraufnahme von normalgewichtigen und adipösen Tieren steigert, während umgekehrt  $\alpha$ MSH und dessen Agonisten einen anorektischen Effekt auslösen (Fan et al., 1997; Thiele et al., 1998; McMinn et al., 2000). Untersuchungen mit spezifischen MC4-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten unterstreichen dabei die vorrangige Rolle des MC4-Rezeptors bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme (Kask et al., 1998; Seeley et al., 1997). Diese Vermutung wurde durch die Generierung einer adipösen MC4-Rezeptor-Knockout-(MC4-r-KO)-Maus bestätigt (Huszar et al., 1997). Eine zusätzliche Beteiligung des MC3-Rezeptors an der Regulation des Energiehaushalts ist bisher aber nicht auszuschließen (Cummings & Schwartz, 2000). Auch beim Menschen wurde die Bedeutung des Melanokortin-Systems im Zusammenhang mit der Körpergewichtsregulation deutlich, als heterozygote Träger eines Defekts im MC4-Rezeptor-Gen sowie Träger einer Mutation im POMC-Gen bei der Untersuchung eines durch extreme Adipositas auffallenden Patientenkollektivs entdeckt wurden (Krude et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Rankinen et al., 2002).

Prinzipiell wird dem  $\alpha$ MSH/MC4-System eine wichtige Rolle bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung in Zusammenhang mit der endokrinen Antwort auf eine positive Energiebilanz zugewiesen (Friedman, 1997). Aufgrund der Colokalisation von Leptinrezeptoren und POMC in Neuronen des ARC wird davon ausgegangen, dass Leptin einen direkten Einfluss auf die POMC-Expression ausübt (Håkansson & Meister, 1998). Dies bestätigt sich in Untersuchungen an Ratten mit limitiertem Futterzugang sowie an *ad libitum* gefütterten *ob/ob*-Mäusen: sie zeigen eine gegenüber Kontrolltieren deutlich verminderte POMC-Expression im ARC, die durch eine Leptinbehandlung wieder normalisiert werden kann (Schwartz et al., 1997; Thornton et al., 1997; Mizuno et al., 1998). Zudem konnten Untersuchungen zeigen, dass die Hemmung der Futteraufnahme und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems infolge einer Leptinbehandlung durch die gleichzeitige Gabe eines MC4-Rezeptor-Blockers vermindert werden kann (Satoh et al., 1998).

### **1.1.3 Wirkung von rekombinantem Leptin in Tiermodellen mit genetisch bedingter Adipositas**

#### 1.1.3.1 Monogenetische Defekte im Leptin-System von Nagern

In der Vergangenheit konnten mehrere monogenetische Formen von Adipositas bei Nagern identifiziert werden (Rankinen et al., 2002; Campfield et al., 1996), die wesentlich zum

Verständnis des Leptin-Systems und seiner zentralen Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts beigetragen haben:

Die *ob*-Mutation wurde erstmals im Jahre 1950 beschrieben, nachdem sie in der C57Bl/6J-Mäusezucht des Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA) spontan aufgetreten war (Ingalls et al., 1950) und bei homozygoten *ob/ob*-Mäusen mit einer exzessiven Fettdeposition und damit verbundenen sekundären Störungen einherging. Erst mit der Klonierung des Leptin-Gens wurde als genetische Grundlage dieser Störung eine Cytosin→Thymin Punktmutation innerhalb des Leptin-Gens identifiziert, durch die sich bei der Transkription an Position 105 ein Stop-Codon ergibt, so dass *ob/ob*-Mäuse ein verkürztes Peptid synthetisieren, das nicht sezerniert werden kann (Zhang et al., 1994; Rau et al., 1999). Der genetische Hintergrund scheint bei der Ausbildung des *ob/ob*-Phänotyps eine große Rolle zu spielen. So zeigen *ob/ob*-Mäuse auf einem C57Bl/6J-Hintergrund eine milde Form von Diabetes in Kombination mit moderater Hyperglykämie und deutlich erhöhten Plasmainsulinspiegeln, sowie einer Hypertrophie und Hyperplasie der Langerhans'schen Inseln. Später auf einem C57Bl/KsJ-Hintergrund gezüchtete *ob/ob*-Mäuse mit vergleichbarem Adipositasgrad zeichnen sich dagegen durch eine kürzere Lebenserwartung aufgrund eines schweren Diabetes mellitus, mit deutlicher Hyperglykämie und nur vorübergehender Hyperinsulinämie in Kombination mit einer Atrophie der Langerhans'schen Inseln aus (Coleman, 1973). Der Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Ausprägung von Adipositas und Sterilität konnte auch durch die Kreuzung von C57Bl/6J-*ob/ob*-Mäusen mit dem BALB/cJ-Stamm gezeigt werden (Qiu et al., 2001).

Die *db*-Mutation trat ebenfalls im Rahmen der Mäusezucht des Jackson Laboratory auf dem C57Bl/KsJ-Hintergrund spontan auf (Hummel et al., 1966). Erst 1996, nach der Identifizierung des Leptinrezeptors (Tartaglia et al., 1995) konnte gezeigt werden, dass die bei diesen Mäusen auftretende Adipositas auf einer 106 bp langen Insertion innerhalb des Leptinrezeptor-Gens beruht. Diese führt während der Proteinsynthese zur Synthetisierung einer verkürzten Form des Ob-Rb-Rezeptors, bei der – vergleichbar mit der Ob-Ra-Isoform – der größte Teil der für die Aktivierung der Signalkaskade wichtigen intrazellulären Domäne fehlt (Chen et al., 1996; Chua et al., 1996; Lee et al., 1996). Im Gegensatz zu den Leptindefizienten *ob/ob*-Mäusen besitzen *db/db*-Mäuse einen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich erhöhten Plasmaleptinspiegel (Halaas et al., 1995), der nicht allein durch den Anstieg der Körperfettmasse erklärt werden kann (Chung et al., 1998). Um die direkte Möglichkeit eines Vergleiches zwischen *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen zu ermöglichen, wurde auch diese

Mutation auf einen C57Bl/6J-Hintergrund übertragen. Analog zu den *ob/ob*-Mäusen kommt es in Abhängigkeit vom jeweiligen genetischen Hintergrund zu der Ausbildung unterschiedlicher *db/db*-Phänotypen (Coleman, 1973).

1961 wurde erstmals der Phänotyp einer monogenetischen Form von Adipositas bei Ratten beschrieben, die bei Kreuzungen zwischen zwei Rattenstämmen spontan aufgetreten war (Zucker & Zucker, 1961; Bray, 1977). Erst 1996 konnte diese *fa*-Mutation als eine Punktmutation innerhalb des Leptinrezeptor-Gens identifiziert werden, die dazu führt, dass innerhalb der extrazellulären Domäne, die allen bisher bekannten Spliceformen des Rezeptors gemein ist, die Aminosäure Glutamin durch Prolin ersetzt ist (Chua et al., 1996). Dieser Defekt beeinträchtigt erheblich die Translokation des Rezeptors in die Zellmembran (Chua et al., 1996) und führt zu einer verminderten Expression (Crouse et al., 1998; Da Silva et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die totale hypothalamische Leptinbindung in Abhängigkeit von der Gendosis sinkt (Schmidt et al., 2000). In *in vitro*-Untersuchungen wurde eine reduzierte, jedoch nicht vollständig unterbrochene Signalübertragung infolge der *fa*-Mutation nachgewiesen (White et al., 1997; Da Silva et al., 1998). Wie bei den *db/db*-Mäusen konnten auch bei *fa/fa*-Ratten in Bezug auf die Körperfettmasse überproportional erhöhte Plasmaleptin-Konzentrationen nachgewiesen werden, die auf eine Beeinträchtigung dieses Parameters infolge der *fa*-Mutation – unabhängig von der Veränderung des Körperfettgehalts – hindeuten (Zhang et al., 1997 & 2001).

#### 1.1.3.2 Wirkung von rekombinantem Leptin bei genetisch adipösen Tieren

Die Wirkung von rekombinant hergestelltem Leptin konnte zuerst an *ob/ob*-Mäusen gezeigt werden (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Weigle et al., 1995; Stephens et al., 1995; Levin et al., 1996). Aufgrund des fehlenden endogenen Leptins zeigen diese Mäuse eine hohe Sensitivität gegenüber dem exogen applizierten Leptin. So kann eine 1-monatige Leptinbehandlung ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , intraperitoneal) die anfänglich bei etwa 70 g liegende Körpermasse der Tiere um etwa 40% verringern, wobei die Gewichtsreduktion überwiegend auf die Senkung des Körperfettgehalts infolge einer reduzierten Futteraufnahme zurückzuführen ist (Halaas et al., 1995; Pelleymounter, 1995). Eine Leptinwirkung auf den Sauerstoffverbrauch der *ob/ob*-Mäuse konnte anfänglich nicht überzeugend belegt werden (Himms-Hagen, 1997; Pelleymounter et al., 1995; Halaas et al., 1995; Levin et al., 1996), muss aber aufgrund der Normalisierung der zuvor verminderten Körpertemperatur der Mäuse vermutet werden, und zwar im Zuge einer Disinhibierung der sympathisch aktivierten thermoregulatorischen Thermogenese. Durch die Analyse von tagesperiodischen Verlaufskurven des

Sauerstoffverbrauchs konnte schließlich eine Leptinwirkung auf den Energieumsatz von *ob/ob*-Mäusen klar nachgewiesen werden (Hwa et al., 1997). Dass Leptin nicht in der Lage ist, den Sauerstoffverbrauch über eine Disinhibierung hinaus zu steigern, konnte bereits mehrfach am Beispiel von adulten Wildtyp-Mäusen (Döring et al., 1998) und Marsupialiern (Geiser et al., 1998) unter der Voraussetzung eines limitierten Futterzugangs sowie von Wildtyp-Ratten in der Säuglingsphase (Stehling et al., 1996) gezeigt werden.

In Kombination mit einer Reduktion des Adipositasgrads konnten im Fall der *ob/ob*-Mäuse durch die Leptinbehandlung zusätzlich sekundäre Abnormalitäten wie die erhöhten Plasmakonzentrationen an Glukose und Insulin (Halaas et al., 1995; Levin et al., 1996) und die Sterilität normalisiert werden (Chehab et al., 1996). Auch in Folgestudien wurde die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhte Sensitivität der *ob/ob*-Mäuse gegenüber exogen appliziertem Leptin und die dosisabhängige Reduktion der zuvor übersteigerten Futteraufnahme in Kombination mit einer zunehmenden Normalisierung der Körpermasse bestätigt (Schwartz et al., 1996a; Chehab et al., 1996; Pelleymounter, 1997; Harris et al., 1997 & 1998; Mercer et al., 1997b; Huang et al., 1999; Breslow et al., 1999). Aber erst in einer neueren Studie unter thermoneutralen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass sich die Körpermassenabnahme der *ob/ob*-Mäuse während einer Langzeit-Leptinbehandlung über einen Zeitraum von 75 Tagen allmählich verlangsamt und die Körpermasse sich schließlich auf einem niedrigen Wert stabilisiert, obwohl die Leptinbehandlung unverändert fortgesetzt wird (Rafael & Herling, 2000). Ob dieser Befund in einer nachlassenden Leptinresponsivität der *ob/ob*-Mäuse oder in der Beteiligung weiterer der Leptinwirkung entgegenwirkender Faktoren begründet ist, wurde bisher nicht geklärt.

Werden *db/db*-Mäuse mit Leptin behandelt, so kommt es erwartungsgemäß aufgrund des defekten Leptinrezeptors zu keiner Reduktion der Futteraufnahme bzw. der Körpermasse unabhängig davon, ob das rekombinante Leptin peripher oder zentral appliziert wird (Halaas et al., 1995; Campfield et al., 1995). Bei *fa/fa*-Ratten konnte die Wirkung einer peripheren Leptininjektion ebenfalls ausgeschlossen werden (Dryden et al., 1999; Stehling et al., 1997; Kraeft et al., 1999). Die Wirkung einer zentralen Leptininjektion wird gegenwärtig noch diskutiert (Seeley et al., 1996; Dryden et al., 1999; Wang T. et al., 1998; Al-Barazani et al., 1997), da zumindest eine intracerebroventrikuläre Leptingabe in unphysiologisch hohen Dosierungen eine Wirkung auszulösen scheint (Dryden et al., 1999). In jedem Fall ist von einer deutlich verminderten Wirkung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auszugehen. Leptinbehandlungen wurden ebenfalls bei homozygoten (-/-) MC4-r-KO-Mäusen durchgeführt



(Marsh et al., 1999). Dabei konnte zwar bei jungen, noch normalgewichtigen Mäusen ein signifikanter hemmender Leptineffekt auf die Futteraufnahme festgestellt werden, bei einer fortgeschrittenen Adipositas ab einem Alter von drei Monaten zeigten die Tiere allerdings keine signifikante Reaktion mehr.

### **1.1.4 Diätinduzierte Adipositas und funktionelle Leptinresistenz**

#### 1.1.4.1 Diätinduzierte Adipositas als dominierende Adipositasform bei Menschen

Ende 2001 existierten weltweit nur 83 dokumentierte Fälle einer monogenetischen Form von Adipositas beim Menschen, die auf 25 Mutationen in 6 verschiedenen Genen zurückzuführen sind (Rankinen et al., 2002). Dabei sind Mutationen im MC4-Rezeptor die häufigste Ursache, da sie 70 der 83 Fälle zugrunde liegen (Vaisse et al., 2000; Sina et al., 1999; Hinney et al., 1999; Farooqi et al., 2000; Mergen et al., 2001). Hochrechnungen gehen davon aus, dass bis zu 3% der adipösen Patienten eine Haploinsuffizienz im MC4-Rezeptor-Gen aufweisen und somit Mutationen des MC4-Rezeptors die momentan häufigste Form vererbter Adipositas beim Menschen darstellen. Mutationen innerhalb des Leptin-Gens sind bisher nur in 6 Fällen (Montague et al., 1997; Strobel et al., 1998; Farooqi et al., 1999; Ozata et al., 1999), Mutationen im Leptinrezeptor-Gen nur in 3 Fällen beschrieben worden (Clément et al., 1998). Aufgrund der genannten Zahlen und der nur geringen Anzahl an betroffenen Familien ist offensichtlich, dass solche monogenetischen Defekte nur einen Bruchteil der Adipositasprävalenz beim Menschen erklären. Auch wenn die Vererbung von polygenetischen Defekten als Grundlage einer Adipositas-Prädisposition wahrscheinlich ist, müssen vor allem auch Umweltbedingungen und deren Interaktion mit dem jeweiligen Genotyp berücksichtigt werden (Schmidt, 2002; Levin, 2000). Da das Auftreten einer Adipositas sowohl beim Tier wie beim Menschen in den meisten Fällen mit einem erhöhten Plasmaleptinspiegel kombiniert ist (Maffei et al., 1995; Frederich et al., 1995; Sinha & Caro, 1998), dieser aber offensichtlich nicht in der Lage ist, einer weiteren Fettdeposition effizient entgegenzuwirken, muss davon ausgegangen werden, dass sich in solchen Fällen eine funktionelle Leptinresistenz ausgebildet hat (Arch et al., 1998; Wauters et al., 2000). Für die Entstehung dieses weitverbreiteten Typs der Adipositas scheint vor allem die Zusammensetzung und Attraktivität der Nahrung von Bedeutung zu sein (Levin & Dunn-Meynell, 2002). So konnte eine positive Korrelation zwischen dem Fettgehalt der "westlichen" Nahrung und dem Auftreten von Adipositas nachgewiesen werden (Friedman & Halaas, 1998). Gerade in den sogenannten "neu-verwestlichten" Bevölkerungen kommt es mit dem Zugang zu einer fettreichen

Ernährung zu einem vermehrten Auftreten von metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 (Ravussin, 1995).

#### 1.1.4.2 Wirkung von rekombinantem Leptin bei diätinduziert adipösen Tieren

Auch im Tiermodell wurde eine Neigung zu diätinduzierter Adipositas im Zusammenhang mit einer Makronährstoffpräferenz für Fett nachgewiesen (Smith et al., 1997). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass bei Nagern infolge des Zugangs zu attraktivem, hochkalorischem Futter eine Leptinbehandlung fortschreitend an Wirkung verliert. Der dabei beschriebene Zeitrahmen ist allerdings sehr variabel. So wurde bei C57Bl/6J-Mäusen nach 8 Wochen fettreicher Nahrung eine periphere Leptinresistenz ( $120 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  intraperitoneal) beobachtet; nach 19 Wochen kommt es bei zentraler Verabreichung des Leptin ( $6\text{-}120 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) zumindest zu einer deutlichen Wirkungsbeeinträchtigung (Lin et al., 2000b). In einer weiteren Studie konnte bei C57Bl/6J-Mäusen bereits 16 Tage nach dem Angebot einer fettreichen Diät keine Leptinwirkung ( $600 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , intraperitoneal) mehr nachgewiesen werden (Van Heek et al., 1997). Bei einem parallel untersuchten anderen Mäuse-Stamm (AKR/J) konnte dieser Wirkungsausfall erst nach 56 Tagen beobachtet werden, wobei aber weiterhin eine dosisabhängige Reduktion der Futteraufnahme bei zentraler Gabe ( $6\text{-}600 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) festgestellt werden konnte. Halaas et al. (1997) konnten bei AKR/J-Mäusen nach 10-wöchigem Angebot einer fettreichen Diät ebenfalls eine verminderte Responsivität gegenüber intraperitoneal applizierten supraphysiologischen Leptindosen (bis zu  $1500 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) im Vergleich zu normalgewichtigen, auf Standard-Diät gehaltenen Mäusen des gleichen Stammes nachweisen. In einer neueren Studie (Lin et al., 2001) wurde bei zu diätinduzierter Adipositas neigenden Osborne-Mendel-Ratten eine deutliche Abnahme der Responsivität gegenüber einer moderaten Leptindosis ( $30 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  intraperitoneal) bereits nach 5-tägiger Fütterung einer fettreichen Diät beobachtet. Untersuchungen an C57Bl/6J-Mäusen (C. Daniel<sup>1</sup> & I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse) sowie Untersuchungen an Ratten (Widdowson et al., 1997) zeigen zwar, dass bei Versuchstieren nach Entzug der fettreichen Diät bei ausschließlichem Angebot der üblichen kohlenhydrat- und faserreichen, fettarmen Standard-Nagetierdiät die massive Beeinträchtigung der Leptinresponsivität in einem relativ kurzen Zeitraum reversibel ist, der Versuch einer solchen erzwungenen Nahrungsumstellung ist aber bei der Therapie der menschlichen Adipositas langfristig wenig Erfolg versprechend. Zudem zeigen Studien bei Übergewichtigen auch bei reduzierter Energieaufnahme durch die

---

<sup>1</sup> Diplomarbeit C. Daniel, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002

Aufnahme einer ausgewogenen, hypokalorischen Diät nur eine minimale Steigerung des Gewichtsverlustes aufgrund einer zusätzlichen Leptinbehandlung (Heymsfield et al., 1999; Hukshorn et al., 2000).

### **1.1.5 Komplexe Regulation des Energiehaushaltes**

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass der Regulation des Energiehaushalts ein komplexes Netz an neuronalen und humoralen Signalen, die auf verschiedensten Ebenen miteinander interagieren, zugrunde liegt. Auch ohne die volle Funktionstüchtigkeit des Leptin-Systems als einem der zentralen Regulatoren des Körperfettgehaltes scheint eine Kontrolle der Nahrungsaufnahme und eine Regulation des Energieverbrauchs weiterhin zu bestehen (Proietto et al., 2000). Schwartz & Brunzell (1997) weisen auf die Tatsache hin, dass – unabhängig vom Grad der Adipositas – bei Abweichungen vom aktuellen Körperfettgehalt kompensatorische Mechanismen einsetzen, die die Fettspeicher wieder auf den Ausgangswert zurückbringen. Studien an diätinduziert adipösen Ratten belegen die Verteidigung der infolge einer fettreichen Diät erhöhten Körpermasse (Levin & Keesey, 1998; Levin & Dunn-Meynell, 2000). Adipositas scheint also keinesfalls durch eine fehlende Regulation sondern vielmehr durch eine – wenngleich abnorme – Regulation des Körperfettgehaltes auf einem höheren Niveau gekennzeichnet zu sein, dem eine Sollwert-Verschiebung vorausgegangen ist. Ein hoher Fettgehalt der Nahrung scheint in diesem Zusammenhang das regulierte Niveau zu höheren Werten hin zu verschieben und an der Ausbildung einer diätinduzierten Adipositas entscheidend beteiligt zu sein. Inwieweit bei dieser permanenten Sollwert-Verschiebung neuronale Veränderungen, wie veränderte Neurotransmitter-Konzentrationen oder die Bildung neuer synaptischer Verbindungen, eine Rolle spielen, wird gegenwärtig noch diskutiert (Levin, 2000).

Auf der Basis dieser Überlegungen scheint eine Therapie der Adipositas nur möglich zu sein, wenn Faktoren gefunden werden, die das Regelniveau für den Körperfettgehalt wieder zu niedrigeren Werten hin verschieben oder die zumindest die kompensatorische Gegenregulation bei Senkung des Körperfettgehaltes unter dieses erhöhte Regelniveau außer Kraft setzen. Pharmakologische Studien konnten zeigen, dass durch den Einsatz von zentral wirksamen Pharmaka – wie z.B. Sibutramin, einem Noradrenalin- und Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, oder Fenfluramin, einem Stimulator der Serotonin-Ausschüttung – eine Reduktion des zuvor erhöhten Sollwertes erreichbar ist (Levin, 2000). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang allerdings noch nicht geklärt. Erst die Aufdeckung der komplexen

Zusammenhänge bei der Regulation des Energiehaushaltes wird neue gezielte Ansatzmöglichkeiten für eine Adipositas-Therapie bieten können. Bei bestehendem fettreichen Nahrungsangebot und damit einhergehender funktioneller Leptinresistenz muss davon ausgegangen werden, dass eine mögliche Adipositas-Therapie nur auf Basis einer Manipulation anderer ins komplexe Netzwerk der Regulation des Energiehaushaltes eingebundener Systeme erfolgen kann.

## **1.2 DIE HPA-ACHSE UND IHRE MÖGLICHE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES**

### **1.2.1 Glukokortikoide**

Glukokortikoide sind Steroid-Hormone, die von der Nebennierenrinde unter der Kontrolle der HPA-Achse in den Blutkreislauf sezerniert werden. Die Glukokortikoid-Freisetzung wird durch ACTH (adrenocorticotropic hormone) kontrolliert, das im Hypophysenvorderlappen gebildet wird und dessen Freisetzung wiederum durch CRH und Vasopressin gesteuert wird. Die Synthese bzw. die Sekretion von CRH und ACTH stehen unter der negativen Rückkopplungs-Kontrolle des Glukokortikoids Kortisol (beim Menschen) bzw. Kortikosteron (bei Nagern). Glukokortikoide regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen durch die Bindung an zwei eng verwandte, zytoplasmatische Rezeptorproteine, den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR). In beiden Fällen beeinflussen die Hormon-Rezeptor-Komplexe durch direkte Bindung an entsprechende DNA-Segmente bzw. durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen. Glukokortikoid-Bindungsstellen lassen sich u.a. in der Skelett-, Herz- und glatten Muskulatur, im Gehirn, in Magen, Leber, Lunge sowie im Lymph- und Fettgewebe nachweisen (Silbernagel & Despopoulos, 1991). Glukokortikoide sind ebenso wie die bei vielen Tieren sezernierten Mineralokortikoide (z.B. Aldosteron) essentielle Hormone, da ihr völliger Ausfall ohne besondere, u.a. diätische Vorkehrungen nicht mit dem Leben vereinbar ist.

### **1.2.2 Rolle der HPA-Achse bei der Regulation des Energiehaushaltes**

Abgesehen von ihren essentiellen Funktionen steht die Wirkung der Glukokortikoide grundsätzlich im Zusammenhang mit Stressreaktionen des Körpers. So führt ein erhöhter Glukokortikoidspiegel zu einer Erhöhung der Herzleistung und einer Mobilisierung des Energiestoffwechsels. In hohen Konzentrationen wirken sie entzündungshemmend, können

aber auch wegen ihres stimulierenden Einflusses auf die Magensaftsekretion zu Magengeschwüren führen. Es ist seit längerem bekannt, dass Glukokortikoide neben vielen anderen Reaktionen (Baxter & Forsham, 1972) auch die Regulation des Körpergewichts und der Körperfettmasse beeinflussen. So kann bei Patienten mit Cushing-Syndrom – einem auf exzessiver Kortikosteroidbildung beruhenden Krankheitsbild, das vorwiegend durch eine tumoröse Entartung der Nebennierenrinde oder des Hypophysenvorderlappens ausgelöst wird – in Kombination mit dem chronisch erhöhten Glukokortikoidspiegel eine veränderte Fettdeposition mit viszeraler Fettleibigkeit beobachtet werden (Peeke & Chrousos, 1995). Außerdem konnte in mehreren Modellen mit schwerer Adipositas ein Zusammenhang zwischen der übersteigerten Fettdeposition und der Glukokortikoid-Konzentration hergestellt werden (York, 1996). So wurde z.B. für *ob/ob*-Mäuse postuliert, dass eine der primären Abnormalitäten eine gesteigerte zentrale Empfindlichkeit gegenüber Glukokortikoiden ist (Tokuyama & Himms-Hagen, 1989). Durch eine Adrenalectomie kann die übersteigerte Fettdeposition bei adulten *ob/ob*-Mäusen sowie auch bei adulten *fa/fa*-Ratten vermindert werden (Saito & Bray, 1984; Bruce et al., 1982; Freedman et al., 1986a; Marchington et al., 1983; Fletcher, 1986; Bazin et al., 1986; Bray et al., 1992). Die Tatsache, dass eine Adrenalectomie bei juvenilen *fa/fa*-Ratten das Einsetzen einer exzessiven Fettdeposition bis zum 12. Lebensstag nicht verhindern kann (Bazin et al., 1987), zeigt, dass entwicklungsbedingte Unterschiede in der Rolle der Glukokortikoide bei der Regulation des Energiehaushaltes bestehen. Die infolge einer Adrenalectomie beobachtete Verminderung des Adipositasgrads bei adulten Tieren beruht in erster Linie auf einer Reduktion der übersteigerten Futteraufnahme (Smith & Romsos, 1985). Eine künstliche Erhöhung der Glukokortikoid-Konzentration bei bestehender Adrenalectomie kann diese Hemmung der Futteraufnahme wieder rückgängig machen (Freedman et al., 1986a).

Grundsätzlich besitzen Glukokortikoide einen stimulierenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme, dieser wird aber in einem intakten Organismus durch die gleichzeitige Stimulation der Insulin-Sekretion reduziert (Dallman et al., 1993; Freedman et al., 1986b). Erst bei sehr hohen Glukokortikoidspiegeln bzw. bei bestehendem Diabetes, wie es in adipösen Tiermodellen der Fall ist, tritt die stimulierende Wirkung der Glukokortikoide auf die Futteraufnahme in den Vordergrund (Strack et al., 1995; Dallman et al., 1993). Neben dieser Interaktion mit dem Insulin-System konnte auch ein Glukokortikoid-Effekt auf den Plasma-leptinspiegel nachgewiesen werden. So wurde *in vitro* an isolierten Fettzellen eine stimulierende Glukokortikoid-Wirkung auf die Leptin-Synthese und -Sekretion beobachtet (Wabitsch et al., 1996; Hardie et al., 1996; Murakami et al., 1995; Slieker et al., 1996). Diese

Befunde werden durch *in vivo*-Versuche unterstützt, bei denen eine periphere Glukokortikoid-Infusion zu einer gesteigerten Leptin-Expression im Fettgewebe und zu der Ausbildung einer Hyperleptinämie bei Ratten führte (De Vos et al., 1995; Zakrzewska et al., 1999). Bei Patienten mit Cushing-Syndrom ist der Plasmaleptinspiegel bei gegebenem prozentualen Körperfettgehalt signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrollpersonen (Masuzaki et al., 1997a). Da die betroffenen Patienten aber trotz der erhöhten Leptin-Konzentrationen einen gesteigerten Appetit zeigen, ist zu vermuten, dass hohe Glukokortikoidspiegel die Sensitivität gegenüber Leptin hinsichtlich der Regulation der Nahrungsaufnahme herabsetzen (Solano & Jacobson, 1999; Björntorp & Rosmond, 2000).

Neben der Interaktion mit Hormonsystemen, die für die Regulation des Energiehaushalts wichtig sind, könnten auch direkte periphere und zentrale Glukokortikoid-Wirkungen bei der Beeinflussung der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen. So wird postuliert, dass die allgemein katabole Wirkung der Glukokortikoide auf die Knochen- und Muskelmasse (Ganong, 1985; Chrousos, 2000; Delany et al., 1994; Hasselgren, 1999; Block & Buse, 1990) zu einem kompensatorischen Anstieg der Nahrungsaufnahme führt (Flatt, 1993). Wahrscheinlicher ist allerdings die Möglichkeit, dass die HPA-Achse in die zentrale Regulation der Nahrungsaufnahme eingreift. Über ihre zentrale Wirkung beeinflussen Glukokortikoide dabei das somatische und autonome Nervensystem hinsichtlich der Kontrolle des Energieverbrauchs und der Energieaufnahme sowie der Freisetzung von Hormonen wie z.B. Insulin (Dallman et al., 1993; Ahima & Osei, 2001). In diesem Zusammenhang konnte für Glukokortikoide eine Wirkung auf wichtige Neurotransmitter nachgewiesen werden (Kalra et al., 1999; Zakrzewska et al., 1999; Dallman et al., 1995). Dabei ist vor allem das CRH hervorzuheben, das neben seiner Rolle bei der Regulation der POMC-Expression im Hypophysenvorderlappen auch als Neurotransmitter eine katabole Wirkung über die Hemmung der Nahrungsaufnahme und/oder die Steigerung des Energieverbrauchs infolge der Aktivierung des sympathischen Nervensystems ausübt (Heinrichs et al., 1993; Tataranni et al., 1996).

### **1.2.3 Knockout-Modelle**

Durch Studien an Patienten mit Cushing-Syndrom konnten bereits frühzeitig Aussagen über die Folgen eines überhöhten Glukokortikoidspiegels gemacht werden. Der umgekehrte Fall, nämlich das Fehlen einer Glukokortikoid-Wirkung, konnte im Tiermodell nach der Durchführung einer Adrenalektomie untersucht werden. Aufgrund der Weiterentwicklung des molekularbiologischen und genetischen Methodenspektrums war es zudem in neuerer Zeit

möglich, die Auswirkungen einer gezielten Ausschaltung der Glukokortikoid-Rezeptoren bei Mäusen zu untersuchen (Cole et al., 1995; Tronche et al., 1998 & 1999). Aufgrund der vielfältigen, über eine Bindung an diese Rezeptoren vermittelten Funktionen der Glukokortikoide führte allerdings die ubiquitäre GR-Inaktivierung zu einer extrem hohen perinatalen Sterblichkeitsrate der homozygoten Mäuse infolge einer deutlich verzögerten Lungenreifung (Cole et al., 1995). Untersuchungen dieser Mäuse zeigten eine – aufgrund der fehlenden negativen Rückkopplung – um mehr als 20-fach erhöhte ACTH-Konzentration im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Dieser erhöhte ACTH-Spiegel führte wiederum zu einem 2-3-fachen Anstieg der Glukokortikoid-Konzentrationen. Erst durch die gewebsspezifische Inaktivierung des GR gelang es, lebensfähige Mäuse zu züchten, bei denen der Ausfall des GR in bestimmten Gewebestrukturen hinsichtlich seiner Folgen auf unterschiedlichste Körperfunktionen untersucht werden konnte (Tronche et al., 1998 & 1999). Die selektive Inaktivierung des GR in Neuronen und Gliazellen ist bereits hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf das Angstverhalten der Mäuse untersucht worden (Tronche et al., 1999). Weiterhin wurde in der genannten Arbeit nachgewiesen, dass diese Mäuse – analog zu Mäusen mit einem kompletten GR-Knockout – erhöhte Glukokortikoidspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen besitzen. Messungen des CRH-Peptid-Spiegels im PVN zeigten zusätzlich eine 8-fache Erhöhung dieses Parameters. Trotz einer erhöhten POMC-Expression im Hypophysenvorderlappen ist die Plasmakonzentration an ACTH infolge der weiterhin bestehenden negativen Rückkopplungs-Wirkung der Glukokortikoide auf die ACTH-Sekretion aber erniedrigt (Tronche et al., 1999). Hinsichtlich der Beteiligung der HPA-Achse an der Regulation des Energiehaushalts ist in diesem Zusammenhang der Befund interessant, dass diese Knockout-Mäuse infolge des zentralen GR-Defekts im Vergleich zu adulten Wildtyp-Mäusen eine verminderte Körpermasse in Kombination mit einem reduzierten Längenwachstum aufweisen (Tronche et al., 1999).

### **1.3 DAS AMYLIN-SYSTEM UND SEINE MÖGLICHE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES**

#### **1.3.1 Amylin**

Amylin ist ein 37 Aminosäuren langes Peptid, das hauptsächlich in den  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird (Westermarck et al., 1986). Prä-Proamylin wird dabei zusammen mit Proinsulin im Golgi-Apparat durch das Enzym Prohormon-Convertase in die jeweils

wirksame Form überführt (Badman et al., 1996). Amylin und Insulin werden anschließend gemeinsam in sekretorischen Granuli gespeichert und infolge der gleichen Nahrungsstimuli cosezerniert (Butler et al., 1990; Pieber et al., 1994; Stridsberg et al., 1993). Trotz dieser engen Verknüpfung zwischen Amylin und Insulin scheint das molare Amylin:Insulin-Verhältnis auf Basis der jeweiligen Plasmakonzentrationen starken Schwankungen zu unterliegen, so dass in der Literatur Werte zwischen 0,003 und 0,39 beschrieben sind (Cooper, 1994). Inwieweit dabei – abgesehen von möglichen Messungenauigkeiten bzw. grundlegenden Unterschieden zwischen den in den jeweiligen Studien untersuchten Versuchstieren – eine Amylinproduktion in anderen Geweben eine Rolle spielt, kann nur vermutet werden. So konnte Amylin in Geweben des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden (Toshimori et al., 1990; Nakazato et al., 1989; Ferrier et al., 1989), inwieweit diese enterale Amylinproduktion die Höhe des Plasmaamylinspiegels beeinflusst, ist allerdings fraglich. Zusätzlich gibt es aber auch Hinweise auf eine Amylinproduktion in der Lunge und in den Hinterhornganglien (Nicholl et al., 1992).

Amylin ruft biologische Effekte in einer Vielzahl von Geweben hervor, wie Skelettmuskulatur, Leber, Bauchspeicheldrüse und Zentralnervensystem (Clausen, 2000; Smith & Bloom, 1995; Castillo et al., 1995), es beeinflusst den Knochen- und Calciumstoffwechsel (MacIntyre, 1989; Zaidi et al., 1990) und das kardiovaskuläre System (Brain et al., 1990). Vorrangig wird Amylin aber als Gegenspieler des Insulins angesehen, da es in der Skelettmuskulatur den Glykogenabbau fördert und gleichzeitig die durch Insulin stimulierte Glukogenese hemmt (Young et al., 1991; Pittner et al., 1994; Dimitriadis et al., 1998). Amylin-Bindungsstellen konnten in peripheren Geweben wie Skelettmuskel, Niere, Darm und Lunge (Wookey et al., 1997; Tomlinson & Poyner, 1996; Aiyar et al., 1995), sowie in verschiedenen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden. Dabei sind aufgrund der hohen Dichte vor allem der mittlere caudale Bereich des Nucleus accumbens, die Amygdala, der Fundus der Stria terminalis, der Nucleus raphe dorsalis, der Locus coeruleus und der Nucleus der Stria medullaris hervorzuheben (Beaumont et al., 1993; Christopoulos et al., 1995; Sexton et al., 1994). Desweiteren konnten Amylin-Bindungsstellen in den meisten hypothalamischen Kerngebieten wie dem PVN, dem medialen und medianen Nucleus preopticus, dem Nucleus periventricularis, dem Nucleus commissurae anterioris und dem dorsomedialen bzw. medialen Nucleus tuberalis nachgewiesen werden (Sexton et al., 1994; Christopoulos et al., 1995). Wie bereits für Insulin, wird im Zusammenhang mit einer zentralen Wirkung auch für Amylin ein Transport über die Blut-Hirn-Schranke postuliert (Banks et al., 1995; Banks & Kastin, 1998). Die z.T. hohe Dichte an Amylin-Bindungsstellen in Gehirnarealen mit durchlässiger Blut-



Hirn-Schranke konnte zudem für einige zirkumventrikuläre Organe wie z.B. die Area postrema (AP), das Organum subfornicale (Subfornikalorgan, SFO) oder das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) gezeigt werden (Sexton et al., 1994; Riediger et al., 2001; Christopoulos et al., 1995).

### 1.3.2 Rolle des Amylin-Systems bei der Regulation des Energiehaushaltes

Woods & Seeley (2000) reihen Amylin neben Insulin und Leptin in die Kategorie der "Adipositas-Signale" ein. Dies beruht zum einen auf der Tatsache, dass sich die Amylin-Sekretion in der Bauchspeicheldrüse proportional zum Körperfettgehalt verhält (Pieber et al., 1994; Butler et al., 1990). Zum anderen wurden in mehreren Studien Amylin-Effekte beschrieben, die in direkten Zusammenhang mit der Regulation des Energiehaushaltes, speziell der Futteraufnahme stehen. So hemmt Amylin Magenentleerung und Magensaftsekretion (Young et al., 1995a; Guidobono, 1998) und kontrolliert neben Insulin den Blutglukosespiegel. Die Gabe von Amylin bei Ratten und Mäusen führt sowohl bei zentraler wie peripherer Applikation zu einer dosisabhängigen Reduktion der Futteraufnahme (Chance et al., 1991; Lutz et al., 1994 & 1998a; Rushing et al., 2000a), die in keinem direkten Zusammenhang mit der Beeinflussung der Magenmotilität zu stehen scheint (Lutz et al., 1995b; Young et al., 1997). Dabei erweist sich sowohl die akute wie kontinuierliche Verabreichung als wirkungsvoll (Rushing et al., 2000a; Arnelo et al., 1996). Neben der kurzzeitigen Wirkung als Sättigungssignal durch eine akute Reduktion der Mahlzeitengröße (Lutz et al., 1995a) bzw. Mahlzeitenanzahl (Arnelo et al., 1996) scheint Amylin über eine zentrale Wirkung auch bei der Langzeit-Regulation von Futteraufnahme und Körpergewicht eine Rolle zu spielen (Rushing et al., 2000b). Dies bestätigen auch Untersuchungen an Amylin-Knockout-Mäusen, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine – wenn auch nur leicht – erhöhte Körpermasse aufweisen (Gebre-Medhin et al., 1998). Der für viele adipöse und/oder insulinresistente Tiermodelle – darunter auch genetisch adipöse *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse (Kreutter et al., 1991; Leckström et al., 1999) sowie *fa/fa* Zucker-Ratten (Tokuyama et al., 1991; Pieber et al., 1994) – beschriebene erhöhte Plasmaamylin Spiegel scheint allerdings keine direkte Folge der Hyperphagie bzw. Adipositas der Tiere zu sein, sondern vielmehr in Zusammenhang mit der sekundär sich entwickelnden Insulinresistenz, der daraus resultierenden Hyperinsulinämie und der damit einhergehenden Hypertrophie und Hyperplasie des Inselzell-Apparats der Bauchspeicheldrüse zu stehen (Cooper, 1994). Auch im Falle einer diätinduzierten Adipositas konnten bei Mäusen erhöhte Plasmakonzentrationen an Amylin nachgewiesen werden

(Mulder et al., 2000). Inwieweit die in Adipositasmodellen zu beobachtende Hyperamylinämie mit einer funktionellen Amylinresistenz einhergeht, kann bislang nur vermutet werden.

Über welche zentralen Systeme speziell die anorektische Wirkung des Amylins vermittelt wird, ist bisher nicht ausreichend bekannt. Auf der Basis von Läsions-Studien wurden Neurone in der AP bzw. im Nucleus tractus solitarii (NTS) als beteiligte Gehirnstrukturen identifiziert (Lutz et al., 1998b & 2000; Rowland & Richmond, 1999). In einigen Studien wird aber auch eine Interaktion zwischen Amylin und NPY auf der Ebene des Hypothalamus postuliert (Morris & Nguyen, 2001; Balasubramaniam et al., 1991). So konnte sowohl infolge einer intracerebroventrikulären wie intrahypothalamischen Amylininjektion eine anorektische Reaktion bei Ratten ausgelöst werden (Balasubramaniam et al., 1991; Chance et al., 1991 & 1992).

### **1.3.3 Lachs-Calcitonin und seine Interaktion mit dem Amylin-System**

Amylin, Calcitonin, CGRP (calcitonin gene-related peptide) und Adrenomedullin sind strukturell und funktionell verwandte Peptide mit unterschiedlichen, z.T. aber auch überlappenden Aktivitäten (Wimalawansa, 1997; Muff et al., 1995; Beeley & Prickett, 1996), deren Wirkung über Rezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt wird (Sexton et al., 1999). Die molekulare Struktur der zugrunde liegenden Rezeptoren sowie die Anzahl der verschiedenen Splicevarianten und deren jeweilige Substratspezifität sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Studien haben aber gezeigt, dass Amylin-Bindungsstellen – als C3-Rezeptoren klassifiziert – im Rattengehirn neben ihrer hohen Affinität für Amylin gleichzeitig eine mindestens ebenso hohe Affinität gegenüber Lachs-Calcitonin (sCT), einem seit langem therapeutisch eingesetzten Substitut für das Knochen-wirksame Calcitonin der Säuger, aufweisen (Beaumont et al., 1993 & 1995; Sexton et al., 1994 & 1999). In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Amylin-Rezeptoren eine Untergruppe der Lachs-Calcitonin-Bindungsstellen bilden (Christopoulos et al., 1995). Im Gegensatz dazu zeigen C3-Rezeptoren nur eine moderate Affinität gegenüber CGRP und eine sehr geringe Affinität zu humanem bzw. Säugetier-Calcitonin (Beaumont et al., 1993 & 1995; Sexton et al., 1994), und auch Calcitonin- bzw. CGRP-Bindungsstellen weisen nur eine geringe Affinität gegenüber Amylin auf (Zimmermann et al., 1997; Sexton et al., 1994). Eine mögliche Erklärung für die außergewöhnlich hohe Affinität der Amylin-Bindungsstellen gegenüber Lachs-Calcitonin könnte die im Vergleich zu CGRP und Säugetier-Calcitonin große Homologie vor allem innerhalb der C-terminalen Region beider Peptide

sowie die vergleichsweise stärker ausgeprägte helikale Struktur des Lachs-Calcitonins sein (Sexton et al., 1994 & 1999; Houssami et al., 1995; Hilton et al., 1995).

Neben seiner primären Funktion im Knochen- und Calciumstoffwechsel, sowie der Beeinflussung von lokomotorischer Aktivität, Schmerzempfindung und Magensaftsekretion (de Beaurepaire & Freed, 1987; Sellami & de Beaurepaire 1993; Morley et al., 1981) ist für Calcitonin bereits seit Beginn der 80er-Jahre des vorigen Jahrhunderts eine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme bekannt (Perlow et al., 1980; Gaggi et al., 1985). Die anorektische Wirkung intracerebroventrikulärer Injektionen deutete dabei schon frühzeitig auf eine zentrale Vermittlung hin (Freed et al., 1979; Twery et al., 1982). Im Rahmen von Klonierungsstudien konnten bei Ratten zwei Isoformen an Calcitonin-Rezeptoren – C1a- und C1b-Rezeptoren – nachgewiesen werden (Sexton et al., 1993; Albrandt et al., 1993), die beide eine hohe Affinität gegenüber Lachs-Calcitonin besitzen, während Säugetier-Calcitonin mit moderater Affinität nur an C1a-Rezeptoren bindet (Hilton et al., 1995). Die Verteilung der beiden Rezeptor-Isoformen im Gehirn ist weitgehend übereinstimmend und umfasst neben den bereits für C3-Rezeptoren beschriebenen Arealen u.a. den NTS, Teile des lateralen Septums, den Nucleus paraventricularis thalamii und den ventralen Anteil des Striatum (Hilton et al., 1995). Zusätzlich konnten Calcitonin-Bindungsstellen in einer Vielzahl von peripheren Geweben wie Niere, Schilddrüse, Lunge, Plazenta und Osteoklasten nachgewiesen werden (Chai et al., 1998; Firsov et al., 1995; Kuestner et al., 1994; Fouchereau-Peron et al., 1981; Hilton et al., 1995; Nicholson et al., 1988; Ikegame et al., 1995; Lee et al., 1995).

Basierend auf Untersuchungen, bei denen Mikroinjektionen von Lachs-Calcitonin in verschiedenste Gehirnareale durchgeführt wurden, werden der Hypothalamus, im Speziellen der PVN und die perifornikale Region, als die wichtigsten Gehirnstrukturen im Zusammenhang mit der anorektischen Wirkung von zentral appliziertem Lachs-Calcitonin angenommen (Chait et al., 1995; Lutz et al., 1999). Bei peripherer Applikation wird dagegen davon ausgegangen, dass die anorektische Wirkung des Lachs-Calcitonins wie die des Amylins über Neurone in der AP bzw. im NTS vermittelt wird (Lutz et al., 1998b & 2000; Rowland & Richmond, 1999). Da die Anwendung des spezifischen Amylin-Antagonisten AC187 die anorektische Wirkung des sCT vermindert, scheint der sCT-Effekt dabei zumindest teilweise über Amylin-Bindungsstellen (C3-Rezeptoren) vermittelt zu werden (Lutz et al., 2000). Dieser Befund wird durch die Tatsache unterstützt, dass die anorektische Wirkung von Säugetier-Calcitonin bedeutend schwächer ausgeprägt ist (Twery et al., 1982; Yamamoto et

al., 1982), so dass eine spezifische Vermittlung über C1a-Calcitonin-Rezeptoren weitgehend auszuschließen ist (Sexton et al., 1999).

Aufgrund der im Vergleich zu einer Amylininjektion deutlich länger anhaltenden anorektischen Wirkung (Gaggi et al., 1985; Lutz et al., 2000) könnte Lachs-Calcitonin einen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Adipositas bieten. Für die der längeren Wirkung zugrunde liegende irreversible Bindung des sCT an die entsprechenden Amylin- und Calcitonin-Bindungsstellen (Houssami et al., 1994; Riediger et al., 1999b; Hilton et al., 2000) wird eine Desensitivierung der Rezeptoren weitgehend ausgeschlossen, da ein dauerhafter Anstieg der entsprechenden "*Second Messengers*" in diesem Zusammenhang zu beobachten ist (Lamp et al., 1981; Stroop & Moore, 1994). Bisher wurde eine hemmende Wirkung auf die übersteigerte Futtermittelaufnahme von adipösen und diabetischen *db/db*- und *ob/ob*-Mäusen nur in Kurzzeit-Experimenten für eine Amylin-Behandlung gezeigt, wobei den Tieren 15-20 Stunden zuvor das Futter entzogen worden war (Morley et al., 1982 & 1994). Inwieweit eine Behandlung mit Lachs-Calcitonin einer Hyperphagie aufgrund eines genetischen Defekts innerhalb des Leptin-Systems unter normalen Fütterungsbedingungen entgegengewirken kann, ist bisher nicht bekannt. Auch bei Tieren, deren Körperfettgehalt aufgrund einer fettreichen Diät erhöht ist, wurde die Auswirkung einer sCT-Behandlung auf die Futtermittelaufnahme noch nicht untersucht.

#### **1.4 ZIELE DER ARBEIT**

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten grundlegende Zusammenhänge hinsichtlich der Rolle des Leptin-Systems bei der komplexen Regulation des Energiehaushaltes erarbeitet werden. Von besonderem Interesse waren dabei die Interaktionen von pharmakologischen und genetischen Manipulationen des Leptin-Systems und anderer mit der Regulation des Energiehaushaltes in Zusammenhang stehender Hormonsysteme in ihren Auswirkungen auf die Energiebilanz unter Berücksichtigung nutritiver Einflüsse. In einer ersten Versuchsreihe wurde zunächst unter einer pharmakologischen Langzeit-Leptinbehandlung der Zusammenhang zwischen Plasmaleptin-Konzentration und Körpermasse bei genetisch adipösen *ob/ob*-Mäusen untersucht (Versuchsserie A). In zwei weiteren Versuchsreihen wurde anschließend beispielhaft die Interaktion des Leptin-Systems mit anderen in die Regulation des Energiehaushaltes eingreifenden Hormonsystemen betrachtet. Hierfür wurden zum einen Mäuse mit einem selektiv im Zentralnervensystem inaktivierten Glukokortikoid-

Rezeptor (GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse) charakterisiert (Versuchsserie B). Diese genetische Manipulation der HPA-Achse war vor allem hinsichtlich ihres Effektes auf den Energiehaushalt der Mäuse von Interesse. Die Untersuchungen im Rahmen der dritten Versuchsreihe beschäftigten sich schließlich mit der Interaktion zwischen dem Leptin- und dem Amylin-System (Versuchsserie C). Durch die Gabe von Lachs-Calcitonin, einem Analogon des Amylins, wurde untersucht, ob Manipulationen dieses Hormonsystems in Fällen eines genetisch gestörten oder durch das Angebot einer attraktiven Nahrung außer Kraft gesetzten Leptin-Systems einen Ansatz für die Therapie der damit einhergehenden Adipositas bieten können.

#### 1.4.1 Versuchsserie A

Aufbauend auf bereits zuvor durchgeführte mehrtägige Leptinbehandlungen bei *ob/ob*-Mäusen, im Speziellen den Untersuchungen von Rafael & Herling (2000) unter thermo-neutralen Bedingungen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Einstellung einer stabilen Körpermasse als Folge einer Langzeit-Leptinbehandlung bei einer für *ob/ob*-Mäuse üblichen Haltungstemperatur von 22°C bestätigt werden. Durch die gleichzeitige Bestimmung von Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch wurde dabei der Zeitverlauf der Leptinwirkung auf die beiden potentiellen Effektorsysteme der Leptinwirkung analysiert. Um zu überprüfen, ob die Einstellung einer stabilen Körpermasse unter der Leptin-Dauerinfusion und der gegen Ende der Behandlung zu beobachtende Anstieg der Futteraufnahme durch eine nachlassende Leptinresponsivität hervorgerufen wird, wurden bei einer Versuchsgruppe neben der eigentlichen Leptininfusion in regelmäßigen Abständen zusätzliche Leptininjektionen verabreicht. Durch die Bestimmung des Leberfettgehalts von mit Leptin behandelten *ob/ob*-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Leptininfusion sollte außerdem die Hypothese überprüft werden, ob es während einer starken Gewichtsabnahme von adipösen Individuen durch die übermäßige Mobilisierung von Speicherfetten vorübergehend zu einer Anreicherung von Fett in der Leber kommt.

Darüber hinaus wurde die Frage untersucht, ob die gegen Behandlungsende eingestellte Körpermasse in Beziehung zu der eingesetzten Leptindosis und/oder zum Ausgangskörpergewicht der *ob/ob*-Mäuse steht. Dies schloss die Prüfung der Alternative ein, dass eine Erhöhung der Leptindosis lediglich zu einer schnelleren Gewichtsabnahme bei gleichbleibendem Endgewicht führen könnte. Aus diesem Grund kamen innerhalb derselben Versuchsgruppe drei unterschiedliche Leptin-Dosierungen zum Einsatz, deren Wirkung auf Körpermasse und Futteraufnahme mit der Auswirkung einer Leptinbehandlung bei zu

Versuchsbeginn deutlich leichteren Tieren verglichen wurden. Ergänzend wurden die Plasmainsulin-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf der Leptininfusion bestimmt und ihre Veränderungen ebenfalls auf eine Dosisabhängigkeit hin untersucht.

#### 1.4.2 Versuchsserie B

Der inhibierende Effekt des hier untersuchten zentralen GR-Defekts auf das Längenwachstum und die Körpermasse der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse wurde bereits von Tronche et al. (1998 & 1999) beschrieben. Diese Befunde basieren jedoch auf dem Vergleich von adulten Mäusen, der Entwicklungsverlauf ist nicht dokumentiert, und sie geben nur bedingt Auskunft über das Verhältnis von Körperfettgehalt und fettfreier Masse als Maß für die Körperproportionen. Durch die Untersuchung der Körperzusammensetzung in verschiedenen Altersstufen sollten hier vor allem Aussagen über den Entwicklungsverlauf dieser Störung gewonnen werden.

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede zwischen GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich Körpermasse und Körperzusammensetzung auf einer veränderten Energieaufnahme und/oder auf einer veränderten Stoffwechselrate beruhten, wurden Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch der Mäuse unmittelbar nach dem Absetzen und im adulten Zustand bei der üblichen Umgebungstemperatur von 22°C bestimmt. Um Unterschiede im Basalstoffwechsel von Unterschieden in der thermoregulatorischen Thermogenese unterscheiden zu können, wurden bei adulten Tieren zusätzlich entsprechende Messungen unter thermoneutralen Bedingungen durchgeführt. Ergänzend erfolgte eine Bestimmung der Plasmathyroxin-Konzentration unter beiden Versuchsbedingungen.

Eine mögliche Erklärung für die Beeinflussung von Körpermasse und Körperzusammensetzung infolge des zentralen GR-Defekts könnte die Interaktion zwischen der HPA-Achse und anderen für die Regulation des Energiehaushaltes wichtigen Hormonsystemen sein. Aufgrund dieser Überlegungen wurden die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf untersucht und in Relation zum Körperfettgehalt der Tiere betrachtet.

#### 1.4.3 Versuchsserie C

Ziel dieses Versuchsteiles war es, die relative Wirkungsstärke zweier anorektisch wirkender Peptidhormone – Lachs-Calcitonin, als Analogon des Amylins, und Leptin – hinsichtlich ihres hemmenden Effekts auf die Futteraufnahme zu vergleichen. So wurde zunächst die Wirkungsstärke beider Substanzen bei C57Bl/6J-Mäusen unter normalen Haltungsbedin-

gungen, d.h. bei Fütterung einer pelletierten Standard-Nagetierdiät, miteinander verglichen. Durch die zeitgleiche Behandlung mit Leptin und sCT sollte eine mögliche Interaktion des Leptin- und Amylin-Systems bei der Beeinflussung der Futteraufnahme untersucht werden. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Versuche wurde anschließend die Wirkung einer sCT-Behandlung bei C57Bl/6J-Mäusen getestet, die infolge eines hochkalorischen, fettreichen Zusatzfutters in Form von Schokolade über einen Zeitraum von mehr als 50 Tagen eine periphere Leptinresistenz in Kombination mit einer moderaten diätinduzierten Adipositas entwickelt hatten.

Anhand von Dosis-Wirkungskurven wurde schließlich auch die Wirkung einer sCT-Behandlung auf die Futteraufnahme von genetisch adipösen Tieren im Vergleich zu normalen C57Bl/6J-Mäusen untersucht. Als Tiermodell dienten dabei zum einen *ob/ob*-Mäuse, zum anderen homozygote (-/-) MC4-r-KO-Mäuse. Ein Unterschied zwischen den drei Mäusestämmen wäre ein Hinweis auf eine mögliche Abhängigkeit der sCT-Wirkung von einem funktionierenden Leptin-System. Unterschiede zwischen *ob/ob*- und -/- MC4-r-KO-Mäusen könnten zudem Auskunft darüber geben, auf welcher Ebene die beiden Hormonsysteme miteinander interagieren. Ergänzend dazu wurden Vergleiche zwischen Wildtyp- und *fa/fa*-Zucker-Ratten durchgeführt, um auch diese Form einer Störung des Leptin-Systems in den Vergleich mit einzubeziehen.

Um eine Erklärung für potentielle Unterschiede in der sCT-Wirkung zwischen den untersuchten Tiermodellen zu finden, wurden zum einen die jeweiligen Plasmainsulin-Konzentrationen bestimmt. Da sowohl die diätinduzierte wie genetisch bedingte Adipositas in den meisten Fällen mit einer Hyperinsulinämie einhergeht, könnte eine unterschiedlich starke Ausprägung dieser sekundären Störung einen Einfluss auf die sCT-Wirkung ausüben. Da das NPY-System neben dem  $\alpha$ MSH/MC4-System der zweite wichtige zentrale Reaktionsweg des Leptin-Systems ist und somit eine potentielle Beteiligung des NPY an der Vermittlung der anorektischen sCT-Wirkung durch Störungen im Leptin-System beeinflusst werden könnte, wurde zum anderen die relative NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus der jeweiligen Mausmodelle untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE A

#### 2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Untersuchungen wurden an 3 Versuchsgruppen (A1-A3) adulter *ob/ob*-Mäuse durchgeführt. Die Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, BRD) bezogen und nach dem Eintreffen in Einzelkäfigen bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 45% in einem 12:12 Licht:Dunkel-Zyklus mit Wasser und pelletierter Standard-Diät (Altromin, 1324, Lage, BRD) *ad libitum* gehalten.

#### 2.1.2 Versuchsbeschreibung

Die *ob/ob*-Mäuse wurden – nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens 10 Tagen sowie einer in die Auswertung mit einbezogenen Vorlaufphase – durch die Implantation von osmotischen Mini-Pumpen über 44-59 Tage kontinuierlich mit Leptin unterschiedlicher Dosierungen behandelt (Tab. 1). Die Pumpen wurden dabei jeweils nach einer Laufzeit von 15 Tagen durch neue ersetzt. Während des Versuchszeitraumes wurden täglich Körpermasse und Futteraufnahme bestimmt. In regelmäßigen Abständen während der Leptinbehandlung bzw. am Versuchsende wurde ein Teil der Mäuse etwa 2,5-5 h nach Beginn der Lichtphase getötet. Um Verfälschungen bei der späteren Bestimmung der Plasmainsulin-Konzentrationen zu vermeiden, wurde den Tieren etwa 3 h vor der Tötung das Futter entzogen. Nach dem Tod der Mäuse erfolgte die Bestimmung der Körper- bzw. Leberzusammensetzung sowie die Messung der Plasmaparameter.

##### 2.1.2.1 Versuchsgruppe A1

Neben der Bestimmung der Futteraufnahme und der Veränderung der Körpermasse wurde bei den 2 Monate alten *ob/ob*-Mäusen der Versuchsgruppe A1 der Sauerstoffverbrauch während des Vorlaufs und des Infusionszeitraumes von maximal 7 Tieren gemessen. Zur Überprüfung der Leptinresponsivität erhielten die Tiere neben der Dauerinfusion in regelmäßigen Abständen insgesamt 8 zusätzliche subkutane Leptininjektionen. Durch eine retroorbitale Blutentnahme am narkotisierten Tier wurden zudem vor Versuchsbeginn und beim Auswechseln der Pumpen die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin bestimmt (Tab. 1). Aufgrund der zunächst angewandten Narkosemethode bei der Implantation der Pumpen (siehe 2.4.2.2) kam es während des Versuchsverlaufs zu Tierverlusten. Die Körperzusammen-



setzung dieser Tiere wurde mit der von Tieren verglichen, die bereits vor Versuchsbeginn getötet worden waren.

Versuchsgruppe	N	Geschlecht	Alter bei Behandlungsbeginn [Monate]	KM bei Behandlungsbeginn [g]	Leptindosis [pmol/d]	N I <sub>1</sub>	N I <sub>2</sub>	N I <sub>3</sub>	N I <sub>4</sub>
A1	14	m	2	34 ± 1	210	10	9	7	4
A2	29	m	5-5,5	59 ± 1	116	5	5	5	4
					233	4	4	4	3
A3	20	m	3,5	48 ± 1	461	13	7	7	7
					376	16	8	2	-

Versuchsgruppe	untersuchte Parameter (N)				
	Zeitpunkt der Bestimmung	Körperzusammensetzung	Leberzusammensetzung	Plasma-Leptin	Plasma-Insulin
A1	Baseline	4	-	4	4
	I <sub>2</sub>	1	-	10	9
	I <sub>3</sub>	2	-	9	9
	I <sub>4</sub>	3	-	7	5
A2	Baseline	6	-	26	15
	P <sub>1</sub>	-	6	6	5
	I <sub>2</sub>	-	-	17	17
	I <sub>3</sub>	-	-	17	10
	I <sub>4</sub>	2	-	16	16
A3	P <sub>4</sub>	10	4	14	14
	Baseline	-	4	-	-
	P <sub>1</sub>	-	8	-	-
	P <sub>2</sub>	-	3	-	-
	P <sub>3</sub>	-	2	-	-

**Tabelle 1:** Versuchsübersicht für die Untersuchungen im Rahmen einer Langzeit-Leptinbehandlung bei ob/ob-Mäusen (Versuchsserie A). N= Anzahl der Tiere; m=Männchen; Baseline=unbehandelte Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe, die vor Behandlungsbeginn getötet wurden. Bei A2 wurde zusätzlich bei 20 bzw. 9 Tieren vor Behandlungsbeginn der Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel bestimmt. I<sub>1</sub>=Implantation der ersten Pumpe, entsprechend I<sub>2</sub>-I<sub>4</sub>; P<sub>1</sub>= 14-tägiger Behandlungszeitraum bei implantierter 1. Pumpe, entsprechend P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>.

### 2.1.2.2 Versuchsgruppe A2

In dieser Versuchsgruppe wurde der Verlauf von Futteraufnahme und Körpergewicht im Rahmen einer Leptininfusion an ausgewachsenen, deutlich schwereren ob/ob-Mäusen im Vergleich zu Versuchsgruppe A1 untersucht. Dabei wurden drei unterschiedliche Leptindosierungen angewandt, die hinsichtlich der Reduktion der Futteraufnahme und der erreichten Körpermasse am Ende des Behandlungszeitraumes miteinander verglichen wurden. Wie schon in Versuchsgruppe A1 wurden die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin sowie die Körperzusammensetzung im Versuchsverlauf bestimmt und mit Werten von bereits vor

Versuchsbeginn getöteten Tieren verglichen. Ein Teil der Tiere wurde am Anfang und in der Endphase der Leptinbehandlung getötet, um Gewebeproben für andere Untersuchungen zu entnehmen. Aus diesem Grund konnten für die vorliegende Studie nur die Leberzusammensetzung und die Plasmaparameter dieser Tiere bestimmt werden (Tab. 1).

### 2.1.2.3 Versuchsgruppe A3

In dieser Versuchsgruppe sollte eine mittlere Alters- bzw. Gewichtsgruppe von *ob/ob*-Mäusen hinsichtlich ihrer Reaktion auf eine Langzeit-Leptinbehandlung untersucht werden. Die Mehrzahl der Tiere wurde im Behandlungsverlauf getötet, um Gewebeproben für andere Untersuchungen zu entnehmen, von diesen wurden – wie bereits in Versuchsgruppe A2 – nur die Leberzusammensetzung und die Plasmaparameter bestimmt (Tab. 1). Von zwei über einen Zeitraum von 44 Tagen mit Leptin behandelten Tieren wurde zudem die in der Endphase der Leptinbehandlung erreichte Körpermasse in die Versuchsgruppen-übergreifende Auswertung mit einbezogen.

## **2.2 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE B**

### **2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

#### 2.2.1.1 Gewebsspezifische Inaktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors (GR)

Die in dieser Versuchsserie untersuchten Mäuse entstammten einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Günther Schütz am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg, BRD). Der gewebsspezifische Knockout des GR wurde unter Anwendung des CreLoxP-Systems durch die Verpaarung von zwei Mauslinien erzeugt. Die detaillierte Vorgehensweise zur Erzeugung des hier untersuchten Mausmodells ist von Tronche et al. (1999) beschrieben und soll hier nur kurz zusammengefasst werden. Bei den Mäusen der ersten Linie ( $Gr11^{loxP}$ -Linie) war auf beiden Allelen das GR-Gen von zwei LoxP-sites flankiert. Bei der zweiten Mauslinie (Nestin-Cre-Linie) wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Nestin Promoters und eines im 2. Intron des Nestin-Gens gelegenen, Nervensystem-spezifischen Enhancers exprimiert. Durch Kreuzung entstanden Mäuse, die einen selektiv in Neuronen und Gliazellen inaktivierten Glukokortikoid-Rezeptor besaßen, während dessen Funktion in den übrigen Geweben nicht gestört war. Diese im folgenden als Mutanten oder  $GR^{NesCre}$ -Mäuse bezeichneten Tiere konnten bereits ab der 2. Lebenswoche anhand ihres Phänotyps identifiziert werden: so fielen sie in ihrem Körperwachstum immer deutlicher

hinter den Wildtyp-Geschwistern zurück und zeichneten sich durch eine verdickte Halsregion, eine kürzere Schnauze, einen dünneren Schwanz und eine geringere Felldichte aus. Wegen der noch relativ schwachen Ausprägung dieser Merkmale bei den Jungtieren, wurde bei diesen neben der Phänotypisierung zusätzlich eine PCR zur Bestimmung des Genotyps durchgeführt. Die zum Vergleich herangezogenen Wildtyp-Mäuse zeichneten sich zwar gegenüber normalen Wildtyp-Mäusen durch die Insertion zweier LoxP-sites aus, das alleinige Einfügen der beiden LoxP-sites hat aber keinerlei Einfluss auf die Expression des flankierten Gens.

### 2.2.1.2 Untersuchte Altersgruppen und Haltungsbedingungen

Die vergleichenden Untersuchungen an GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen wurden im Alter von 10, 21 und 35 Tagen sowie im adulten Zustand durchgeführt. Die Mäuse wurden – mit Ausnahme des Thermoneutralversuchs bei den adulten Tieren – bei einer Umgebungstemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 45% in einem 12:12 Licht:Dunkel-Rhythmus mit Wasser und pelletierter Standard-Diät (Altromin, 1314, Lage, BRD) *ad libitum* gehalten.

Die Jungtiere entstammten in Bad Nauheim geborenen, hinsichtlich Genotyp und Geschlecht gemischten Würfen, bei denen ein für das "gefloخته" Exon 3 des GR-Gens homozygotes Weibchen mit einem männlichen Mutanten verpaart wurde. Sie wurden bis zum Zeitpunkt des Absetzens im Alter von 21 Tagen im Wurfverband bei der Mutter, anschließend in Gruppen von zwei bis drei Tieren gleichen Geschlechts gehalten oder im Falle einer Sauerstoffmessung auf Einzelkäfige verteilt. Die adulten Tiere wurden direkt vom DKFZ (Heidelberg, BRD) bezogen und für die Bestimmung von Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch in Einzelkäfigen untergebracht. Die Tiere der Gruppe I waren etwa 4 Monate alt, bei Gruppe II und III betrug das Alter etwa 9 Monate. Trotz dieses Altersunterschiedes ergab sich in keinem der hier untersuchten Parameter ein signifikanter Gruppenunterschied, so dass alle adulten Gruppen gemeinsam ausgewertet wurden.

### **2.2.2 Versuchsbeschreibung**

Bei allen Tieren dieser Versuchsserie wurden während des Versuchszeitraumes täglich die Körpermasse und – mit Ausnahme der Säuglinge – die Futteraufnahme bestimmt. Am Versuchsende wurden die Tiere grundsätzlich etwa 2-3 Stunden vor dem Ende der Lichtphase getötet, da in diesem Fall ohne zusätzlichen Futterentzug von Nüchternwerten für die Plasma-

hormonbestimmungen ausgegangen werden kann. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der Körperzusammensetzung sowie die Messung der Plasmaparameter.

### 2.2.2.1 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Körpermasse und Körperzusammensetzung im Entwicklungsverlauf

Von Säuglingen aus 3 Würfen wurde zunächst die Entwicklung der Körpermasse während der 2. und 3. Lebenswoche verfolgt. Nach der Tötung von Mäusen im Alter von 10, 21 und 35 Tagen sowie im adulten Zustand wurde außerdem die Körperzusammensetzung im Entwicklungsverlauf bestimmt und auf Unterschiede zwischen GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen hin untersucht.

Alter [d]	Wurf / Gruppe	N gesamt	N mut/wt	untersuchte Parameter (N mut/wt)					
				Körperzusammensetzung	Plasma-Leptin	Plasma-Insulin	Plasma-Thyroxin	Futteraufnahme	O <sub>2</sub>
10	A	9	5 / 4	5 / 4	5 / 4	5 / 4			
	B	5	3 / 2	3 / 2	3 / 2	3 / 2	-	-	-
	C	11	3 / 8	3 / 8	3 / 8	-			
	D	6	3 / 4	3 / 4	2 / 4	-			
21	E	6	3 / 3	3 / 3	3 / 3	0 / 3			
	F	8	4 / 4	4 / 4	4 / 4	3 / 4			
	G	12	6 / 6	6 / 6	6 / 6	2 / 6	-	-	-
	H	6	2 / 4	2 / 4	1 / 3	1 / 3			
	J	6	5 / 1	5 / 1	5 / 1	4 / 1			
35	K	8	5 / 3	5 / 3	5 / 3	4 / 3	-	4 / 3	4 / 3
	L	11	3 / 8	3 / 8	3 / 8	3 / 8		-	-
adult	I	6	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	-	3 / 3	3 / 3
	II	29	14 / 15	12 / 15	8 / 9	7 / 9	26 / 26 (22°C) 0 / 10 (34°C)	0 / 7	0 / 7
	III	10	10 / 0	7 / 0	-	-	5 / 0 (36°C)	7 / 0	7 / 0

**Tabelle 2:** Versuchsübersicht für die vergleichenden Untersuchungen an GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen (Versuchsserie B). Für die Bestimmung der Plasmathyroxin-Konzentration ist die zum Zeitpunkt der Blutentnahme herrschende Umgebungstemperatur in Klammern angegeben; bei 22°C wurden von F. Tronche (DKFZ, Heidelberg, BRD) erhobene Daten mit in die Auswertung einbezogen (Kellendonk et al., 2002). N=Anzahl der Tiere, mut= Mutanten, wt=Wildtypen, O<sub>2</sub>=Sauerstoffverbrauch.

### 2.2.2.2 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Futteraufnahme und Stoffwechsel im Entwicklungsverlauf

Bei der üblichen Haltungstemperatur von 22°C wurden bei 7 Absetzlingen im Alter von 21 bis 35 Tagen sowie bei 6 adulten Mäusen über mehrere Wochen täglich Futteraufnahme und Körpermasse sowie kontinuierlich der Sauerstoffverbrauch registriert (Tab. 2). Nach der Bestimmung der jeweiligen Thermoneutralzone (siehe 2.4.4.3) wurden diese Untersuchungen bei allen drei adulten Gruppen (N=20) unter für beide Genotypen thermoneutralen Bedin-

gungen wiederholt. Das bei der Tötung bzw. mittels retroorbitaler Blutentnahme gewonnene Blut der adulten bei 22°C und unter thermoneutralen Bedingungen gehaltenen Versuchstiere wurde außerdem hinsichtlich des Plasmathyroxin-Gehaltes untersucht. Dabei wurden für die Auswertung bei 22°C von F. Tronche (DKFZ, Heidelberg, BRD) erhobene Daten mit in die Auswertung einbezogen (Kellendonk et al., 2002).

### 2.2.2.3 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf

Um zu überprüfen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Veränderung der Körperzusammensetzung und dem Plasmaleptin- bzw. Plasmainsulinspiegel besteht, wurden bei GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen im Alter von 10, 21 und 35 Tagen sowie bei adulten Tieren die Plasmakonzentrationen dieser beiden Hormone im Anschluss an die Tötung bestimmt (Tab. 2). Diese wurden sowohl im Entwicklungsverlauf als auch in Relation zum Körperfettgehalt der Tiere betrachtet.

## **2.3 VERSUCHSPROTOKOLL FÜR VERSUCHSSERIE C**

### **2.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Die Untersuchungen wurden an adulten C57Bl/6J, *ob/ob*- und homozygoten (-/-) MC4-r-KO-Mäusen durchgeführt. Die C57Bl/6J- und die *ob/ob*-Mäuse wurden in der Regel von Harlan Winkelmann (Borchen, BRD) bezogen. 5 *ob/ob*-Mäuse sowie alle hier untersuchten -/- MC4-r-KO-Mäuse entstammten hauseigenen Zuchtkolonien, die auf Zuchtpaare von Harlan Winkelmann bzw., im Falle der MC4-r-KO-Mäuse, auf freundlicherweise von Dennis Huszar (Millenium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA, USA) zur Verfügung gestellte Zuchtpaare zurückzuführen sind. Die für Vergleichsexperimente herangezogenen Wildtyp- und *fa/fa*-Zucker-Ratten entstammten ebenfalls einer seit Jahren am MPI Bad Nauheim geführten Zuchtkolonie. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 45% in einem 12:12 Licht:Dunkel-Zyklus mit Wasser und pelletierter Standard-Diät (Altromin, 1324, Lage, BRD) *ad libitum* gehalten. Drei Versuchsgruppen von C57Bl/6J-Mäusen wurde neben dieser Standard-Diät eine attraktive, fettreiche Zusatznahrung (palatable high-fat = PHF-Diät) in Form von weißer Schokolade angeboten (Wissoll, Mühlheim, BRD).

### 2.3.2 Versuchsbeschreibung

Bei allen Tieren dieser Versuchsserie wurden während des Versuchszeitraumes täglich Körpermasse und Futteraufnahme bestimmt. Am Versuchsende wurden die Tiere in der Regel etwa 2-3 Stunden vor dem Ende der Lichtphase getötet, da in diesem Fall ohne zusätzlichen Futterentzug von Nüchternwerten für die Plasmainsulin-Bestimmung ausgegangen werden kann. Zur Untersuchung des akuten sCT-Effekts fand die Tötung allerdings aufgrund der festgelegten Injektionszeiten innerhalb der ersten Stunde der Dunkelphase statt, anschließend erfolgte die Bestimmung der Körperzusammensetzung sowie die Messung des Plasma-insulinspiegels. Da dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tötungszeitpunkten auftrat, konnten alle Tiere gemeinsam ausgewertet werden.

Tiermodell und Diät	N (w/m)	Alter [Monate]	mittlere KM [g]	n Leptin-Behandl. (Lep/ko)	n sCT-Behandl. (sCT/ko)	n sCT+Lep-Behandl. (Kombi/ko)	N NPY mRNA (sCT/ko)	N Plasma-Insulin (sCT/ko)
C57Bl/6J-Mäuse Standard-Diät	32 / 9	3-8	24 ± 1	13 / 14	61 / 42	14 / 14	5 / 5	5 / 15
C57Bl/6J-Mäuse Standard- plus PHF-Diät	29 / 0	7-10	31 ± 2	10 / 10	14 / 15	-	4 / 5	5 / 25
-/- MC4-r-KO-Mäuse Standard-Diät	8 / 8	3-10	60 ± 2	-	35 / 38	-	6 / 6	6 / 13
ob/ob-Mäuse Standard-Diät	13 / 4	6-9	65 ± 2	-	18 / 17	-	5 / 5	3 / 26
fa/fa-Ratten Standard-Diät	4 / 0	8	530 ± 11	-	16 / 16	-	-	0 / 6
Wildtyp-Ratten Standard-Diät	4 / 0	8-12	278 ± 10	-	16 / 16	-	-	0 / 22

**Tabelle 3:** Versuchsübersicht für vergleichende Untersuchungen mit Leptin und Lachs-Calcitonin an verschiedenen Tiermodellen (Versuchsserie C). Die Körpermassen sind über den Versuchszeitraum gemittelt. Bei der Bestimmung der Plasmainsulin-Konzentrationen wurden Insulinmessungen von zusätzlichen Tieren (I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse) mit in die Auswertung einbezogen. PHF=palatable, high-fat (attraktiv, fettreich), N=Anzahl der Tiere; w=Weibchen, m=Männchen, KM=Körpermasse, n= Anzahl der Einzel-Behandlungen, Lep=Leptin, sCT=Lachs-Calcitonin, Kombi= Kombinationsbehandlung mit Leptin und Lachs-Calcitonin, ko=Kontrollbehandlung mit PBS (phosphate buffered saline=steril filtrierter 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH~7,4) in physiologischer Kochsalzlösung), NPY mRNA=Neuropeptid Y mRNA-Expression im Nucleus arcuatus.

#### 2.3.2.1 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei pelletierter Standard-Diät

Um die Wirkungsstärken der beiden Substanzen zunächst unter normalen Haltungsbedingungen, d.h. bei Fütterung einer pelletierten Standard-Diät, miteinander zu vergleichen,

wurden bei 2 Gruppen von C57Bl/6J-Mäusen eintägige Behandlungen mit Leptin, sCT oder einer Kombination aus beiden Substanzen durchgeführt. Zur Beurteilung des Behandlungseffektes wurden Futteraufnahme und Körpermasse im Versuchsverlauf registriert.

#### 2.3.2.2 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin- und Lachs-Calcitonin bei attraktiver Zusatzdiät

10 C57Bl/6J-Mäusen wurde für insgesamt mehr als 50 Tage neben der pelletierten Standard-Diät ein attraktives, fettreiches Zusatzfutter (PHF-Diät) in Form von Schokolade angeboten. Unter Beibehaltung dieses Futterregimes wurden dann eintägige Behandlungen mit Leptin oder sCT durchgeführt. Bei der Beurteilung des Behandlungseffektes wurde die Energieaufnahme für beide Diäten getrennt betrachtet. Die Ergebnisse wurden mit den eintägigen Behandlungen bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung (2.3.2.1) verglichen. Die Ergebnisse einer sCT-Behandlung bei einer weiteren Gruppe von Mäusen (N(sCT/ko)=5/5), denen die PHF-Diät über einen Zeitraum von 84 Tagen angeboten wurde, sollten die Befunde absichern.

#### 2.3.2.3 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei normalgewichtigen und genetisch adipösen Tiermodellen

Mittels Durchführung von eintägigen Behandlungen mit verschiedenen sCT-Dosierungen wurde bei normalgefütterten C57Bl/6J-Mäusen eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Diese wurde mit entsprechenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei zwei genetisch adipösen Tiermodellen, *ob/ob*- und *-/-* MC4-r-KO-Mäusen, verglichen. Auf der Basis von Dosis-Wirkungs-Kurven wurde zusätzlich die sCT-Wirkung bei *fa/fa*-Ratten mit der bei Wildtyp-Ratten verglichen.

#### 2.3.2.4 Auswirkungen einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf den Plasmainsulinspiegel

Für alle in dieser Versuchsserie untersuchten Tiermodelle wurde nach der Tötung der entsprechenden Tiere der durchschnittliche Plasmainsulinspiegel bestimmt. Um eine ausreichend große N-Zahl zu gewährleisten, wurden in die Messung weitere nicht behandelte Tiere miteinbezogen (I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse, Tab. 3). Im Falle der *ob/ob*-Mäuse wurde auf die in Versuchsserie A erhobenen Daten zurückgegriffen. Alter und Gewicht der zusätzlich untersuchten Tiere entsprachen ungefähr den in Tabelle 3 angegebenen Werten. Um zu testen, ob eine sCT-Behandlung kurzfristig die Insulinkonzentration im Blut beeinflusst, wurden bei den untersuchten Mausmodellen Tiere am Tötungstag mit sCT bzw. PBS behandelt und exakt 1 h nach Verabreichung der zweiten Injektion getötet (siehe 2.4.3.1).

### 2.3.2.5 Auswirkung einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf die NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus

Bei den im Rahmen einer sCT-Behandlung getöteten Mäusen wurde unmittelbar nach der Tötung das Gehirn entnommen. Die NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus wurde anschließend mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung semi-quantitativ bestimmt (Tab. 3). Die Daten wurden sowohl auf Unterschiede zwischen behandelten und Kontroll-Tieren wie auch auf Unterschiede zwischen den einzelnen Mäusegruppen hin untersucht. Der Körperfettgehalt zum Tötungszeitpunkt wurde dabei ebenfalls berücksichtigt.

## **2.4 UNTERSUCHUNGEN AN LEBENDEN TIEREN DER VERSUCHSSERIEN A-C**

### **2.4.1 Bestimmung von Futteraufnahme und Körpermasse**

Die Tiere wurden täglich etwa 1h vor dem Ende der Lichtphase versorgt. Neben einem allgemeinen Gesundheitscheck und dem regelmäßigen Reinigen der Käfige wurde dabei die Körpermasse der Tiere und – mit Ausnahme der Säuglinge – deren tägliche Futteraufnahme bestimmt, indem die Differenz zwischen dem Futterrest und der vor 24 h eingewogenen Futtermenge errechnet wurde. Die Menge des daraufhin erneut eingewogenen frischen Futters war so bemessen, dass die Tiere unter *ad libitum* Bedingungen fressen konnten. In den zu Anfang durchgeführten Versuchen wurden die Futterpellets auf den Boden des Käfigs gelegt. Dabei kam es aber zu Verfälschungen des Futterverbrauchswertes durch den Verlust von Krümeln. In späteren Versuchen wurden aus diesem Grund speziell entwickelte Futterhalterungen mit integriertem Auffanggefäß eingesetzt, die in der Werkstatt des W.G. Kerckhoff-Instituts hergestellt wurden und den Krümelverlust auf ein Minimum reduzierten. Erhielten die Tiere neben der pelletierten Standard-Diät weiße Schokolade als attraktives, fettreiches Zusatzfutter (Versuchsserie C), so wurde diese grundsätzlich auf den Käfigboden gelegt. Die dabei in geringer Anzahl auftretenden Krümel wurden bei der täglichen Futterwiege vom Käfigboden aufgesammelt und mitberücksichtigt. Futterverbrauchswerte wurden für beide Futtersorten getrennt bestimmt.

Für die Berechnung der Gesamtenergieaufnahme wurde in Versuchsserie A und C die umsetzbare Energie für die jeweiligen Diäten herangezogen (Tabelle 4). Obwohl die umsetzbare Energie nur als Näherungswert mit Hilfe von Lehrbuchangaben zur Verdaulichkeit und zum physiologischen Brennwert der jeweiligen Nahrungskomponenten ermittelt werden konnte, ist diese der Bruttoenergie vorzuziehen, da Unterschiede im Energieverlust über den



Harn sowie unterschiedliche Ballaststoffanteile zwischen den jeweiligen Diäten berücksichtigt werden. Im Rahmen anderer Examensarbeiten durchgeführte bombenkalorimetrische Bestimmungen des Kot-Energiegehaltes<sup>2</sup> von adulten C57Bl/6J-Mäusen bestätigten außerdem die errechneten Werte hinsichtlich der angenommenen verdaulichen Energie. Zudem wurden in einer unabhängigen Studie übereinstimmende Werte für die metabolisierbare Energie der hier verwendeten Standard-Diät ermittelt (Rafael & Herling, 2000).

Futtersorte	Zusammensetzung [Gewichts-%]	Bruttoenergie [kJ/g]	umsetzbare Energie [kJ/g]	Versuchsserie	
pelletierte Standard-Diät I (Altromin 1324)	Protein:	20	16,2	13,4	A, C
	N-freie Extraktstoffe:	53			
	Fett:	4			
	Rohfaser:	6			
	Asche:	7			
	Wasser:	10			
pelletierte Standard-Diät II (Altromin 1314)	Protein:	23	16,6	13,7	B
	N-freie Extraktstoffe:	50			
	Fett:	5			
	Rohfaser:	5			
	Asche:	7			
	Wasser:	10			
PHF-Diät (weiße Schokolade)	Protein:	5	24,5	23,0	C
	Kohlenhydrate:	58			
	Fett:	35			
	Wasser:	2			

**Tabelle 4:** Zusammensetzung, Brutto- und umsetzbare Energie für die in dieser Arbeit verwendeten Diäten. Die Zusammensetzung beruht auf Herstellerangaben. Brutto- und umsetzbare Energie wurden auf Basis von Lehrbuchangaben für die einzelnen Nahrungskomponenten errechnet. Der angegebene Wassergehalt gilt bei einer Umgebungstemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 45%.

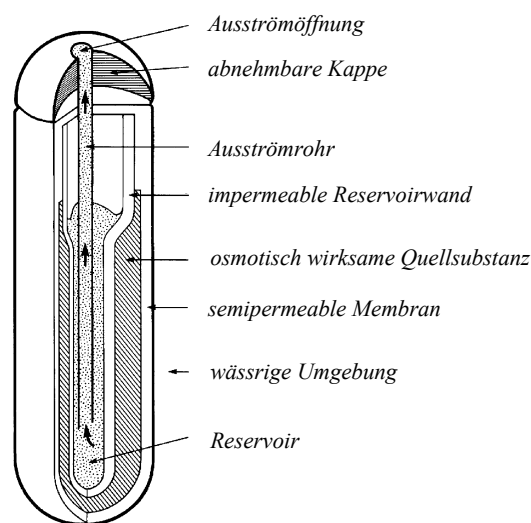
Für die in Versuchsserie B verwendete pelletierte Standard-Diät (Pellet-Diät II) lagen zwar die Angaben zur umsetzbaren Energie vor (Tabelle 4), diese wurden aber bei der Auswertung der Versuchsdaten nicht berücksichtigt. Die Futteraufnahme wurde stattdessen in g/d erhoben. Dies beruhte auf der Tatsache, dass bei der Untersuchung von Jungtieren nicht automatisch die für adulte Tiere ermittelten Werte für die Verdaulichkeit der Nahrung herangezogen werden können. Zudem wurden in dieser Versuchsserie Mäuse mit einem stark erhöhten Glukokortikoid-Spiegel untersucht, für die eine veränderte Nahrungsresorption nicht auszuschließen ist.

<sup>2</sup> Diese wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Edgar Weigand am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

## 2.4.2 Langzeit-Leptinbehandlung unter Verwendung osmotischer Mini-Pumpen

### 2.4.2.1 Funktionsweise der Pumpen

Die hier für die Langzeit-Leptinbehandlung verwendeten osmotischen Mini-Pumpen des Modells 1002 (Alza Corporation, Palo Alto, CA, USA) sind so konstruiert, dass die sich im Pumpeninneren befindliche Lösung – nach einer anfänglichen Latenzzeit – über einen Zeitraum von maximal 16 Tagen mit einer konstanten Ausflussrate an die Umgebung abgegeben wird. Die extrem hohe Natriumchlorid-Konzentration in der äußeren Kammer und der damit verbundene osmotische Gradient bewirken nach der Implantation der Pumpe ein Eindringen von Körperflüssigkeit in den Pumpenmantel. Da dessen Außenmembran zwar semipermeabel aber gleichzeitig auch starr ist, kann der sich durch die einströmende Flüssigkeit aufbauende Druck nur auf die innere Membran einwirken, die sich im Gegensatz zur äußeren Wand durch Flexibilität und Impermeabilität auszeichnet. Die Innenmembran wölbt sich folglich proportional zur Volumenzunahme im Pumpenmantel nach innen, so dass die im Reservoir enthaltene Flüssigkeit durch die Ausstromöffnung der Pumpe ins umliegende Gewebe gepresst wird (Abb. 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung einer Alzet® osmotischen Mini-Pumpe. Das hier verwendete Modell 1002 hat eine Länge von 1,7 cm und einen Durchmesser von 0,6 cm bei einem Leergewicht von 0,35 g.

Für die einzelnen Pumpenchargen sind vom Hersteller Werte für Laufzeit, Fassungsvermögen und Ausstromrate ( $\mu\text{l/h}$ ) angegeben. Zur Überprüfung dieser Angaben wurde am Versuchsende das Volumen des in der Pumpe verbliebenen Flüssigkeitsrestes bestimmt, so dass die im gesamten Versuchszeitraum ausgeflossene Flüssigkeitsmenge bekannt war, die dann auf die

Zeiteinheit von einer Stunde umgerechnet werden konnte. Es zeigte sich jedoch, dass die vom Hersteller angegebenen Werte sehr genau sind, so dass bei anschließenden Berechnungen trotz kleinerer individueller Unterschiede ohne weiteres von den theoretischen Werten ausgegangen werden kann.

#### 2.4.2.2 Implantation der Pumpen

Die osmotischen Mini-Pumpen des Modells 1002 wurden mindestens 10 h vor der eigentlichen Operation mit sterilem PBS gefüllt, wobei die Pufferlösung für die Behandlungsgruppe eine definierte Menge an gelöstem His<sub>6</sub>-tagged-Leptin<sup>3</sup> (M<sub>w</sub>=17560 Da) enthielt. Da bei diesem Pumpenmodell mit einer Latenzzeit von 4-6 Stunden bis zum Einsetzen der maximalen Pumpleistung gerechnet werden muss, wurde durch eine Vorinkubation in 30-37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung sichergestellt, dass die Pumpen zum Zeitpunkt der Operation bereits die maximale Pumpleistung aufwiesen. Bei der Einteilung von Kontroll- und Behandlungsgruppe(n) wurde darauf geachtet, dass initial die Gruppenmittelwerte für Körpermasse und Futteraufnahme ausgeglichen waren.

Die Implantation der Pumpen bei Mäusen der Versuchsserie A fand während der ersten Hälfte der Lichtphase statt. Anfänglich (Versuchsgruppe A1) wurden die Tiere durch die Injektion eines Ketamin/Xylazin-Gemisches (Ketavet®, Rompun®) narkotisiert, diese Methode führte jedoch zum Tod einiger Versuchstiere. Aus diesem Grund wurde bei den späteren Versuchen eine Halothan-Begasung (Fluothane®) durchgeführt. Während die Narkose allmählich zu wirken begann, wurde der Bereich der späteren Schnittstelle sorgfältig rasiert und desinfiziert. Zur besseren Schmerzausschaltung wurde zusätzlich zur Narkose das Lokalanästhetikum Lidocain (Xylocain® 1%) unter die Haut injiziert. Durch einen etwa 1,5 cm langen Schnitt quer zur Körperlängsachse wurde die Rückenhaut im Bereich der hinteren Rückenpartie geöffnet. Nachdem mit einer stumpfen Schere die Haut von dem darunterliegenden Bindegewebe abgehoben worden war, wurde die Pumpe in cranialer Richtung unter die Haut geschoben. Dabei war zu beachten, dass die Ausstromöffnung vom Schnitt weg zeigte. Die Wunde wurde anschließend vernäht und die Tiere, die nach dem Einatmen von normalem Luftsauerstoff sehr schnell wieder das Bewusstsein erlangten, in ihren Käfig zurückgesetzt. Dabei wurde – wie auch während der Operation – durch den Einsatz einer Wärmelampe darauf geachtet, dass die Tiere nicht auskühlten. Weitere postoperative Maßnahmen waren nicht nötig, da die Tiere nach Abklingen der Narkose auch bei direkter Berührung der Nähte

---

<sup>3</sup> Das His<sub>6</sub>-tagged Leptin wurde freundlicherweise von Aventis Pharma, Frankfurt a.M., zur Verfügung gestellt.

keine Schmerzreaktionen zeigten und sich von diesem Eingriff sehr schnell erholten. Die Naht sowie der Sitz der Pumpe wurden während des Behandlungszeitraumes täglich überprüft.

Nach einem Behandlungszeitraum von 15 Tagen wurde – um die Behandlung fortführen zu können – die erste Pumpe durch eine neue ersetzt. Um nicht die bereits weitgehend verheilte alte Wunde erneut zu öffnen, wurde nach Narkotisierung der Mäuse der zweite Hautschnitt ca. 1 cm weiter cranial angesetzt. Durch diese Öffnung wurde zunächst die alte Pumpe aus dem Tier entnommen, was bei optimalem Sitz und freier Beweglichkeit der Pumpe im Gewebe durch einfaches Herausdrücken geschah. In Einzelfällen traten kleinere Verwachsungen auf, die für das jeweilige Tier notiert wurden. Schwerwiegendere Komplikationen wie z.B. eitrige Entzündungen waren in keinem Fall zu beobachten. Die neue Pumpe wurde anschließend – wie schon die vorherige – in cranialer Richtung unter die Haut geschoben, so dass sie kaum Kontakt mit der alten Narbe hatte. Aufgrund des Versetzens der Schnittstelle konnten den Tieren bis zu 4 Pumpen im 15-Tages-Abstand implantiert werden. Die Leptinkonzentration in den jeweils aufeinanderfolgenden Pumpen war dabei identisch. Basierend auf der für die Pumpen angegebenen bzw. durch die Kontrolle der Pumpen ermittelten Ausstromrate und der Leptinkonzentration im Pumpeninhalt ließ sich die durchschnittlich verabreichte Leptindosis in pmol/d für den gesamten Behandlungszeitraum berechnen. Durch das Einbeziehen der Anfangskörpermasse wurde zusätzlich die massenspezifische Leptindosis am Versuchsbeginn errechnet.

### **2.4.3 Eintägige Behandlungen mit Leptin bzw. Lachs-Calcitonin**

#### **2.4.3.1 Verabreichung subkutaner Injektionen**

Bei den eintägigen Leptinbehandlungen wurden subkutane Injektionen angewandt. In Versuchsserie A wurde den Mäusen dabei His<sub>6</sub>-tagged-Leptin injiziert. In Versuchsgruppe C wurde dagegen ein kommerziell erhältliches Leptin mit einem Molekulargewicht von 16 kDa verwendet (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, BRD). In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass sich zwischen rekombinantem murinen Leptin der Molmasse 16 kDa und dem His<sub>6</sub>-tagged-Leptin keine signifikanten Unterschiede in der Wirkung zeigen (Schmidt et al., 1997). Basierend auf der Körpermasse und der Futteraufnahme des Vortages wurden die Mäuse einer Versuchsgruppe so in Kontroll- und Behandlungsgruppe eingeteilt, dass die entsprechenden Gruppenmittelwerte annähernd gleich waren. Am Behandlungstag ca. 2 h nach Beginn sowie ca. 30 min vor Ende der Lichtphase wurden den behandelten Tieren jeweils 50 (Versuchsserie A) bzw. 100 pmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Leptin (Versuchsserie C) subkutan injiziert, die

Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen an PBS. Die Berechnung der verwendeten Leptindosis basierte auf der mittleren Körpermasse der Behandlungsgruppe.

Lachs-Calcitonin (sCT, Calcitonin-ratiopharm®50,  $M_w=3432$  Da, 1 I.U. = 0,167  $\mu\text{g}$ ) wurde in Dosen zwischen 0,05 und 18,5  $\text{pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  injiziert (Versuchsserie C). Während der Anfangsphase wurden sowohl subkutane wie intraperitoneale Injektionen angewandt und die Tagesdosis auf zwei Injektionen verteilt, wobei die beiden Injektionen – in Anlehnung an die Studie von Freed (1979) – 5 bzw. 1 h vor dem Ende der Lichtphase verabreicht wurden. Im Rahmen der Untersuchung des akuten sCT-Effekts auf den Plasmainsulinspiegel und die NPY-Konzentration im ARC erfolgte innerhalb einer Versuchsgruppe die zweite sCT-Injektion im 5-Minuten-Abstand und die Mäuse wurden in der gleichen Reihenfolge genau 1 h später getötet. Da sich herausstellte, dass auch bei einmaliger Injektion der Tagesdosis ein vergleichbarer Effekt auf die Futteraufnahme erzielt werden kann und auch der Applikationsweg keinen nachweisbaren Einfluss auf die Wirkungsstärke der sCT-Behandlung ausübte, wurde in späteren Versuchen die komplette Tagesdosis 1 h vor dem Ende der Lichtphase subkutan injiziert. Im Falle einer Kombinationsbehandlung mit Leptin und sCT wurden Applikationsweg und -zeit der Einzelbehandlungen beibehalten.

#### 2.4.3.2 Beurteilung des Behandlungs-Effekts anhand der Futteraufnahme

Vorhergehende Studien (Döring, 2000) zeigten, dass sich die Wirkung einer eintägigen Leptinbehandlung bei den beiden verwendeten Dosierungen nur auf die Futteraufnahme in den auf den Behandlungstag folgenden 24 h beschränkte. Dieser Zeitraum wird im folgenden als "Effekttag" bezeichnet. Auch für sCT ließ sich diese Beobachtung bestätigen. So wurde zur Beurteilung des Behandlungs-Effekts jeweils ein Zeitraum von 6 Tagen herangezogen, der aus den zwei Tagen vor dem eigentlichen Behandlungstag (=Vorlauf), dem Behandlungstag, dem daran anschließenden Effekttag und den zwei auf den Effekttag folgenden Tagen (=Nachlauf) bestand. An jedem der 6 Tage des Auswertungszeitraumes wurde zunächst die individuelle Differenz zwischen der Futteraufnahme der behandelten Tiere und dem Mittelwert der Kontrolltiere gebildet. Die auf diese Weise für die 4 Kontrolltage (Vorlauf plus Nachlauf) errechneten Differenzen wurden für jedes Tier gemittelt. Durch die Korrektur der am Effekttag zu beobachtenden Differenz mit diesem Wert ergab sich für jedes behandelte Tier die tatsächliche Reduktion der Futteraufnahme infolge der eintägigen Behandlung. Die Werte am Behandlungstag selbst wurden nicht bei der Auswertung berücksichtigt. Dies beruhte auf der Tatsache, dass die Injektionen erst nach dem Ende der Aktivitätsphase und somit der hauptsächlichen Futteraufnahme dieses Tages verabreicht

wurden, so dass zwangsläufig zu der üblichen Wiegezeit am Ende der Lichtphase noch kein aussagekräftiger Leptineffekt auf die Futteraufnahme feststellbar war (Döring, 2000).

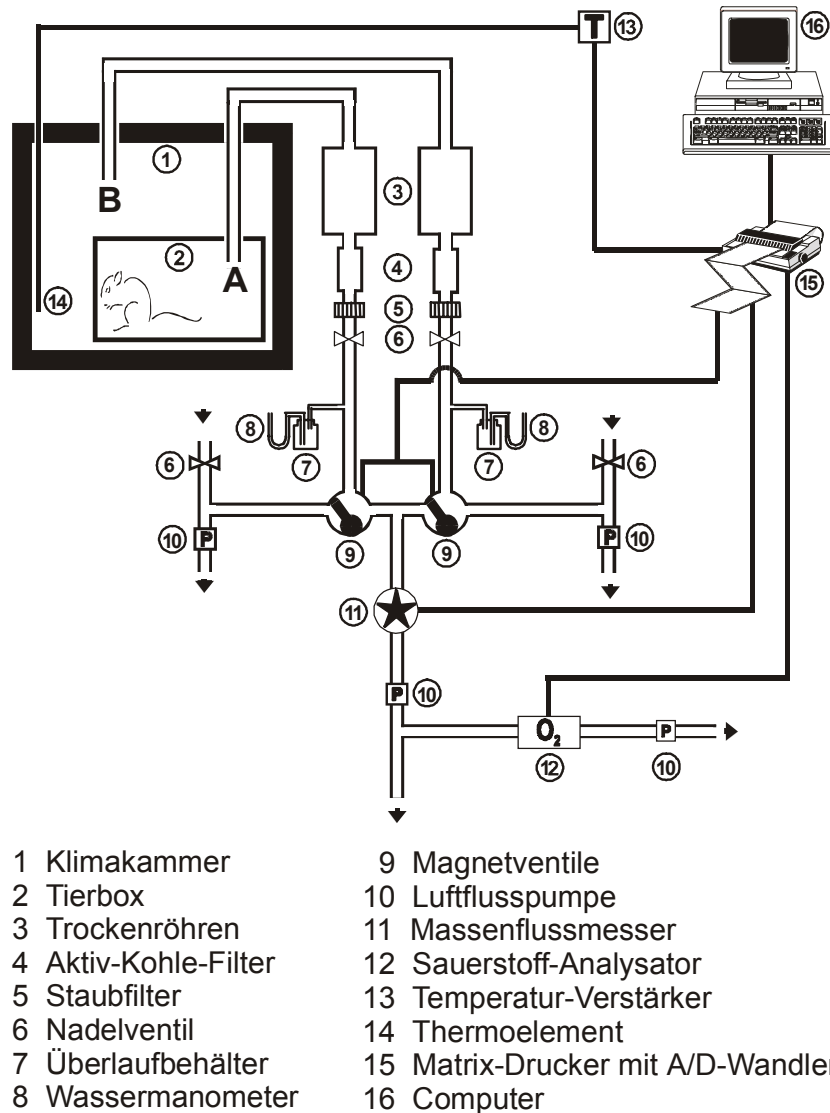
Im Falle der Versuchsgruppe A1, bei der alle Tiere der Versuchsgruppe Leptininjektionen erhielten, wurde für jedes Tier stattdessen die Differenz zwischen der Futteraufnahme am Effekttag und seinem eigenen Mittelwert während des Vor- und Nachlaufs gebildet werden. Um bei Vergleichen zwischen verschiedenen Tiermodellen (Versuchsserie C) unterschiedlich hohe Ausgangswerte in der Energieaufnahme zu berücksichtigen, wurde in diesen Fällen die Reduktion der Futteraufnahme in Prozent der Futteraufnahme im Vorlauf ausgedrückt.

#### **2.4.4 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs**

##### 2.4.4.1 Versuchsaufbau

Der Sauerstoffgehalt der aus den Tierbehältern und der Umgebung abgesaugten Luft wurde mit Hilfe eines elektrochemisch arbeitenden Zwei-Kanal-Sauerstoff-Analysators (S-3A111, Ametek, Pittsburgh, USA) im offenen Flusssystem gemessen. Während einer der Analysator-kanäle ständig den Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft maß, wurde mit dem zweiten Analysator kanal abwechselnd für jeweils 5 min der Sauerstoffgehalt von 7 Tierboxen und der Umgebungsluft im zyklischen Durchlauf gemessen. Die Luft in jedem dieser 8 Messkanäle wurde dabei durch Membranpumpen über mit Calciumsulfat gefüllte Trockenröhren und durch leere 500 ml-Flaschen abgesaugt. Wegen des großen Volumens der Flaschen traten die unmittelbar am Absaugrohr herrschenden starken Schwankungen im Sauerstoffgehalt der Tierluft am Messgerät nicht mehr auf. Nach Durchströmen von Aktivkohlefiltern, die zur Absorption organischer Moleküle dienten, wurden Staubpartikel mit Hilfe von Membranfiltern abgefangen. Durch Magnetventile, die mit einem Zeitgeber verbunden waren, wurde die angesaugte Luft entweder zu einem Massenflussmesser (FM 360, Tylan General, Eching, BRD) und von dort zum Sauerstoffanalysator geleitet, oder durch Bypasspumpen in den Raum entlassen. Damit die Luft zu den Zeiten, in denen ein Tier nicht in Messposition war, mit derselben Flussrate abgesaugt wurde wie in Messposition und ein gleichmäßiger Luftaustausch in den Tierboxen gewährleistet war, waren zwischen den beiden Ventilen Wasser manometer zur optischen Druckdifferenz-Kontrolle eingebaut. Über Nadelventile wurde der Luftfluss in Bypass- und Messposition mehrmals täglich abgeglichen. Die Flussrate, mit der die Luft abgesaugt wurde, hing von dem Alter der Tiere und der Umgebungstemperatur ab und betrug zwischen 140 und 270 ml/min. Grundsätzlich wurde der Wert so gewählt, dass die Sauerstoffextraktion aus der Tierboxenluft kontinuierlich bei ca. 0,5% lag. Der Sauerstoff-

gehalt beider Analysatorkanäle, ebenso eine Kennung zur Identifizierung desjenigen Kanals, der sich gerade in Messposition befand, sowie der Luftfluss durch diesen Kanal wurden simultan durch einen Mehrkanal-Punktdrucker und einen Computer aufgezeichnet.



**Abb.2:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die im 5-Minuten-Takt alternierende Bestimmung der Stoffwechselrate von 7 Mäusen und einem Referenzkanal mittels indirekter Kalorimetrie. Am Beispiel eines Tieres ist die Messung des Sauerstoffgehaltes der Tier-Atemluft in Messposition gezeigt (A). Der zweite dargestellte Kanal zeigt die Referenzmessung der Umgebungsluft, die sich gerade – wie die anderen 6 Tierkanäle – in Bypass-Position befindet (B). Der ständig mit Umgebungsluft gespeiste zweite Analysatorkanal ist nicht dargestellt (nach Döring, 2000).

Die Kalibrierung des Sauerstoffanalysators im gewünschten Messbereich erfolgte durch Gasgemische mit definierten Sauerstoffkonzentrationen zwischen 20 und 21%. Die Messgenauigkeit lag in diesem Bereich unter 0,01%. Zur Kalibrierung des Massenflussmessers

wurde nach Einstellung eines konstanten Luftflusses die Zeit gestoppt, in der ein Seifenfilm eine markierte Strecke in einem Plexiglasrohr zurücklegte. Die im Raum herrschende Temperatur und die Luftfeuchte sowie der Luftdruck wurden gleichzeitig bestimmt, um das Luftvolumen des markierten Bereichs der Plexiglassäule auf Standardbedingungen (STPD = 273 K, 760 mm Hg, 0% rel. Luftfeuchte) umrechnen zu können. Der errechnete Luftfluss wurde gegen die am Massenflussmesser eingestellte Spannung aufgetragen und so bei unterschiedlichen Flussraten eine Kennlinie ermittelt, die die Grundlage für die PC-gestützte Auswertung bildete.

#### 2.4.4.2 Bestimmung der Stoffwechselrate und verwandter Parameter

Die in 12 s-Intervallen aufgezeichneten Daten wurden mit Hilfe von speziell entwickelten Fortran-Programmen<sup>4</sup> zunächst für jedes 5 min-Messintervall gemittelt. Dabei wurden von den jeweils 5-minütigen Messperioden nur die letzten 2,5 min ausgewertet, um Fehler durch noch im Messsystem befindliche Restluft des zuvor gemessenen Kanals auszuschließen. Die Ermittlung der Stoffwechselrate basierte gemäß der oben beschriebenen Sauerstoffmessmethode auf ca. 35 solcher Mittelwerte pro Tier und Tag. Zur Berechnung des Sauerstoffverbrauches der Tiere wurde zunächst der Unterschied im prozentualen Sauerstoffgehalt zwischen Tierluft und Referenzluft ermittelt. Aus dieser Differenz und der auf Standardbedingungen (STPD) normierten Luftflussrate wurde nach der Gleichung für das offene System von Withers (1977) der Sauerstoffverbrauch pro Minute berechnet. Üblicherweise wurde dabei ein Mittelwert über 24 Stunden – parallel zu dem Zeitintervall der Futterbestimmung – gebildet. In Versuchsserie A wurden zusätzlich 2-Stunden-Mittelwerte errechnet, um auf deren Basis den tagesrhythmischen Verlauf des Sauerstoffverbrauchs darstellen zu können. Bei der getrennten Auswertung der Tagesmaxima und -minima des Sauerstoffverbrauchs im Rahmen der Bestimmung der Thermoneutralzone (2.4.4.3) in Versuchsserie B wurde nur der jeweils höchste bzw. niedrigste 3-Stunden-Mittelwert eines Versuchstages ausgewertet.

Für alle Tiere wurde aufgrund der Zusammensetzung der pelletierten Standard-Diät ein respiratorischer Quotient (RQ) von 0,85 angenommen. Für die Bestimmung der Stoffwechselrate anhand des Sauerstoffverbrauchs der Tiere wurde entsprechend ein Umrechnungsfaktor von 0,34 W pro ml O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup> zugrunde gelegt, was einem kalorischen Äquivalent von 20,4 J pro ml O<sub>2</sub> entspricht. Basierend auf der so errechneten Stoffwechselrate konnte der Gesamt-

---

<sup>4</sup> Diplomarbeit M. Schubert, Fachhochschule Gießen-Friedberg, 1991



Energieverbrauch [kJ] während der Versuchsdauer ermittelt werden. Durch die Berechnung des Körperenergiegehaltes an Versuchsanfang und Versuchsende konnte die deponierte Energie und – nach deren Subtraktion vom Gesamtenergieverbrauch – die metabolisierte Energie in diesem Zeitraum errechnet werden.

Der im Folgenden verwandte Begriff "Sauerstoffverbrauch" bezeichnet grundsätzlich den Sauerstoffverbrauch pro Tier. Eine Division durch die individuelle Körpermasse der Tiere während des Messzeitraumes ergab zusätzlich den massenspezifischen O<sub>2</sub>-Verbrauch, der in den entsprechenden Abbildungen als solcher kenntlich gemacht ist. Eine Variation dieses Parameters stellte der O<sub>2</sub>-Verbrauch pro Körpermasse<sup>2/3</sup> dar (Bartels, 1980), bei dessen Berechnung berücksichtigt wird, dass die Stoffwechselrate weniger eine Funktion der Körpermasse als eine Funktion des Volumen-Oberflächen-Verhältnisses eines Tieres ist, wobei vor allem bei kleineren Tieren die vergleichsweise große Körperoberfläche in Kombination mit dem unabhängig von der Körpergröße relativ konstanten Wärmedurchgang pro Flächeneinheit als maßgebender Faktor diskutiert wird. Auf experimenteller Basis erstellte Formeln zur Beschreibung dieses Zusammenhangs erreichten nie Allgemeingültigkeit und beschrieben für die Körpermasse Exponenten zwischen 0,42 und 0,82 (Kleiber, 1947; Bartels, 1980; Wieser, 1984). Für den Vergleich zwischen den GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen der Versuchsserie B – unter den Wärmeabgabe-Bedingungen bei üblicher Haltungstemperatur einerseits und Thermoneutralität andererseits – wurde daher als Exponent ein vergleichsweise mittlerer Wert gewählt und der O<sub>2</sub>-Verbrauch (sowie auch die Futteraufnahme) pro Körpermasse<sup>2/3</sup> errechnet.

#### 2.4.4.3 Bestimmung der Thermoneutralzone

Die Thermoneutralzone ist prinzipiell als der Bereich der Umgebungstemperatur definiert, in dem eine nur geringfügige thermische Anpassung erforderlich ist, die ausschließlich mittels vasomotorischer und pilomotorischer Änderungen der Wärmeabgabe erfolgt. Die Thermoneutralzone wird von der unteren (UKT) und der oberen kritischen Temperatur (OKT) begrenzt (Eckert, 1993). Die UKT stellt einen Grenzbereich dar, in dem ein endothermes Lebewesen gerade noch in der Lage ist, seine Körpertemperatur ohne Erhöhung seiner metabolischen Wärmeproduktion in Form von Zittern bzw. zitterfreier Thermogenese aufrecht zu erhalten. Darunter steigt die metabolische Rate linear zur abfallenden Temperatur an (Mount, 1973, Eckert, 1993, Hensel et al., 1973). Bei Erreichen der OKT setzen dagegen verstärkt Mechanismen zur Vermeidung einer Hyperthermie ein und es kommt zu einem Anstieg der evaporativen Wärmeabgabe durch Schwitzen, Hecheln oder Befeuchten des

Haarkleides mit Speichel. Folglich wird sowohl bei Über- als auch bei Unterschreiten der Thermoneutralzone ein Anstieg in der Stoffwechselrate verzeichnet (Withers 1992), während diese innerhalb des thermoneutralen Bereichs einen Minimalwert erreicht (McBride et al., 1983, Christopherson & Young, 1986). Da die Thermoneutraltemperatur u.a. von der Größe bzw. Oberfläche des Tieres abhängt, wurde die Bestimmung der Thermoneutralzone bei den Tieren der Versuchsserie B aufgrund des zu erwartenden Unterschieds nach Genotypen getrennt durchgeführt. Entgegen der beim Menschen gebräuchlichen Vorgehensweise, bei der die Messung des Sauerstoffverbrauchs bei physischer Ruhe und psychischer Entspannung (Hensel et al., 1973) sowie nach einer mehrstündigen Fastenzeit außerhalb der tagesperiodischen Schlafphase (Encyclopædia Britannica, 1994) stattfindet, wurde in der vorliegenden Arbeit die Messung des Sauerstoffverbrauchs unter den üblichen Haltungsbedingungen mit unbeschränktem Futterzugang durchgeführt und im kompletten Tagesverlauf ausgewertet. Dabei wurde für beide Genotypen die Umgebungstemperatur schrittweise verändert, wobei anstelle des täglichen Gesamtsauerstoffverbrauchs die Veränderung von Tagesminimum und Tagesmaximum des O<sub>2</sub>-Verbrauchs bei der Beurteilung ausgewertet wurden. Zur Absicherung des oberen Grenzbereiches wurden außerdem Körpermasse und Futteraufnahme beobachtet. Die Veränderung der Umgebungstemperatur betrug in einem Schritt maximal 1,5°C, wobei die jeweilige Temperaturstufe in der Regel für mindestens 1,5 Tage beibehalten wurde, so dass mindestens ein voller Tag für die Auswertung zur Verfügung stand.

#### **2.4.5 Plasmagewinnung durch Blutentnahme am lebenden Tier**

In den Versuchsreihen A und B war es zum Teil nötig, bereits während des laufenden Versuches eine Aussage über die Konzentration relevanter Hormone im Plasma der Mäuse machen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Tiere im zweiten (Versuchsserie A) bzw. letzten Drittel (Versuchsserie B) der Lichtphase durch Inhalation eines CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>-Gemisch im Verhältnis 3:1 für wenige Sekunden betäubt. Während dieser kurzen Narkose wurden mit einer 10 µl-Kapillarpipette (minicap, EMH, BRD) über den medio-rostralen Augenwinkel aus den Blutgefäßen des orbitalen Sinus maximal 10 mittelgroße Tropfen Blut (ca. 200 µl, das entspricht schätzungsweise < 10% des Blutvolumens) entnommen, die in einem Eppendorf-Cup mit 5 µl Heparin (Liquemin 5000®) aufgefangen, durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes durchmischt und sofort auf Eis gekühlt wurden. Die Proben wurden anschließend bei 5500 U/min und einer Temperatur von 4°C für 12 min zentrifugiert. Nachdem die Fraktion der festen Blutbestandteile vom Plasma getrennt worden war, war es möglich, durch Wiegen der festen und flüssigen Phase das Plasmavolumen und damit das Plasma:Heparin-Verhältnis

zu bestimmen. Der resultierende Verdünnungsfaktor diente zur Korrektur der Messwerte bei der späteren Bestimmung der Plasmahormonspiegel (siehe 2.5.2). Bis zur Messung wurde das Plasma in Aliquots von 10 bzw. 30 µl bei -80°C gelagert.

## **2.5 UNTERSUCHUNGEN NACH ENDE DER VERSUCHSSERIEN A-C**

### **2.5.1 Tötung der Versuchstiere**

#### 2.5.1.1 Plasmagewinnung nach Versuchsende

Zum jeweiligen Tötungszeitpunkt wurden die Mäuse in der Regel für ca. 30 Sekunden mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das nach der Dekapitierung aus dem Torso austretende Blut wurde in Heparin aufgefangen und sofort eisgekühlt (Blut-Heparin-Volumen-Verhältnis etwa 10:1). Die Tiere der Versuchsgruppe A2 und A3, denen für andere Untersuchungen Gewebeproben entnommen wurden, wurden statt mit CO<sub>2</sub> mit Äther betäubt. Die Blutentnahme erfolgte in diesem Fall unmittelbar vor der Dekapitierung retroorbital (siehe 2.4.5) am betäubten Tier. Die Weiterverarbeitung des Blutes ist bereits in 2.4.5 beschrieben.

#### 2.5.1.2 Präparation der Gehirne

In Versuchsserie C wurde nach der Dekapitierung der Tiere sofort – parallel zur Blutentnahme – mit der Präparation des Gehirns begonnen. Nach der Entfernung der Kopfhaut wurde mit einer spitzen Schere die Schädeldecke kreisförmig eröffnet. Dabei musste besonders darauf geachtet werden, dass das Gehirn selbst nicht durch die Scherenbewegungen oder zu tiefe Schnitte verletzt wurde. Nach dem vollständigen Ablösen der Schädeldecke von den Meninges konnte das Gehirn mit Hilfe eines feinen Spatels vorsichtig aus der Schädelkapsel gelöst werden, wobei es nach dem Durchtrennen der Nervi optici und trigemini und dem Durchschneiden des Hirnstamms vorsichtig mit der Großhirnrinde nach unten auf eine Glasplatte gelegt wurde. Nach dem Ausrichten der Symmetrie wurde das Gehirn mit Hilfe einer Pinzette in pulverisiertes Trockeneis eingebettet, wo es nach vollständigem Bedecken nach maximal 10 min vollständig durchgefroren war. Durch eine zweifache Schicht aus Parafilm und Alufolie vor dem Austrocknen geschützt, wurde es anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.5.1.3 Bestimmung der Körperzusammensetzung

Zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde zunächst der Magen-Darm-Trakt entnommen. Hierzu wurde nach dem Öffnen der Bauchhöhle die Milz stumpf von der großen Krümmung des Magens freipräpariert. Durch die anschließende Durchtrennung des Ösophagus und des Ligamentum hepatogastricum konnten der Magen und der craniale Teil des Dünndarms entfernt werden. Die Harnblase wurde eröffnet und deren Inhalt nach außen entleert. Anschließend wurde der restliche Darm vom Gekröse getrennt und aus dem Tierkörper entnommen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass alles Fettgewebe im Tierkörper verblieb.

Nach der Entfernung des Magen-Darm-Traktes wurden die Tierkörper gewogen und so die Feuchtmasse bestimmt, wobei das zuvor entnommene Blut mit berücksichtigt wurde. Die Feuchtmasse ist, da Variationen im Füllungszustand von Magen und Darm wegfallen, eine besonders genaue Bezugsgröße für die Berechnung der prozentualen Körperzusammensetzung. Deren Bestimmung erfolgte nach einem mehrfach beschriebenen Verfahren (Markewicz et al., 1993; Olbort, 1998). Die Tierkörper wurden in einem Trockenschrank bei 75°C in Aluminiumschalen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch Körperwasser und Trockenmasse der Tiere bestimmt werden konnten. Anschließend wurden die mumifizierten Tierkörper sorgfältig in stabiles, fettfreies Filterpapier verpackt, welches durch Heftklammern verschlossen wurde. Durch stumpfen Druck wurden die Tierkörper in der Papierhülle zerkleinert und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur einer ca. 24-stündigen Chloroform-Extraktion unterzogen. Die vollständig entfetteten Körperfragmente wurden von dem Filterpapier befreit, wobei sorgfältig jeder Substanzverlust vermieden wurde, und erneut in Aluminiumschalen im Trockenschrank getrocknet. Das Endgewicht stellte die fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat-free dry-mass) dar. Zusätzlich wurden für Körperfettmasse, Körperwasser und FFDM deren prozentualer Anteil an der Feuchtmasse errechnet. Zur Berechnung des Energiegehaltes wurde für die Fettmasse ein kalorisches Äquivalent von 38 kJ pro Gramm angenommen, die Umrechnung der FFDM basierte auf einem Wert von 20 kJ pro Gramm (Grodzinski et al., 1975).

### 2.5.1.4 Bestimmung der Leberzusammensetzung

Bei einigen Tieren der Versuchsserie A wurde die Zusammensetzung der Leber untersucht. Dazu wurde das Frischgewicht der Leber nach Entnahme aus dem Tierkörper bestimmt und die Leber anschließend – nach Entnahme einer Gewebeprobe für andere Untersuchungen – in

einer bereits vorgewogenen Aluminiumschale bei 75°C getrocknet. Die Bestimmung des Fettgehaltes und der FFDM erfolgte wie unter 2.5.1.3 beschrieben.

## 2.5.2 Immunologische Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Plasma

### 2.5.2.1 Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays (RIA)

Radioimmunoassays ermöglichen die quantitative Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten wie etwa dem Blutplasma. Das Hormon aus einer extrahierten Plasmaprobe, welches das zu bestimmende Antigen bei dieser immunologischen Reaktion darstellt, tritt dabei in eine komplexe Wechselwirkung mit gegen das Antigen gerichteten, spezifischen Antikörpermolekülen ( $\gamma$ -Immunglobuline, IgG). Durch die gleichzeitige oder zeitversetzte Zugabe einer bekannten Konzentration an radioaktiv markiertem Hormon ("Tracer") kommt es zu einer kompetitiven Austauschreaktion, wobei radioaktiv markiertes und unmarkiertes Hormon um die Bindungsstellen an den Antikörpermolekülen konkurrieren; steigende Mengen an unmarkiertem Antigen führen so zu verminderter Radioligandenbindung. Die Erstellung einer Standardkurve ist die Voraussetzung zur Quantifizierung der jeweiligen Hormonkonzentrationen in den zu untersuchenden Plasmaextrakten. Dabei wird eine definierte Menge an Antikörpermolekülen mit einer definierten Menge an "Tracer" zusammengebracht, so dass maximal 50% der radioaktiven Hormonmoleküle an die Antikörper binden ( $B_0$ -Wert). Steigende Konzentrationen an unmarkiertem Hormon unter identischen Inkubationsbedingungen führen zu einer dosisabhängigen Freisetzung des Radioliganden von den spezifischen Antikörperbindungsstellen. Anhand der Eichkurve kann dann die unbekannte Hormonkonzentration in einer extrahierten Plasmaprobe bestimmt werden.

### 2.5.2.2 Bestimmung der Plasmaleptin-Konzentration

Zur quantitativen Ermittlung des Leptingehalts in den zu untersuchenden Plasmaproben wurde ein kommerzieller Kit (Maus-Leptin RIA-Kit, Linco Research Inc., St. Charles, USA) verwendet. Für jeden einzelnen Assay wurde eine Eichkurve errechnet, die auf Doppelbestimmungen 7 verschiedener Leptinstandards im Bereich von 0,5 bis 20 ng/ml (Bestandteil des Kits) basierte. Zur Bewertung der gemessenen Radioaktivität waren außerdem drei Kontrollansätze notwendig: Der erste (TO) enthielt nur das radioaktiv markierte Antigen, folglich 100% der eingesetzten Radioaktivität. Der zweite (NSB) enthielt zusätzlich Puffer. Dieser Ansatz zeigte an, wieviel Prozent der eingesetzten Radioaktivität durch unspezifische Bindungen an den Puffer und an die Gefäßwandung verloren gehen. Der NSB/TO-Wert lag in allen durchgeführten RIAs, wie erforderlich, unter 5%. Der dritte Ansatz (Leerprobe =  $B_0$ )

enthielt zusätzlich den spezifischen Antikörper, aber kein unmarkiertes Antigen. Er zeigt die maximale Bindung des *Tracers* an den Antikörper und lag – wie empfohlen – in der Regel zwischen 40 und 45%.

Die Plasmaproben sowie die Bestandteile des RIA-Kits wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Je nach zu erwartendem Leptingehalt wurden zwischen 10 und 100 µl der einzelnen Plasmaproben für den RIA eingesetzt (Einfachbestimmung). Dies ist notwendig, damit die Leptinwerte möglichst im mittleren linearen Bereich der Eichkurve liegen; durch den sigmoiden Verlauf der Eichkurve können ansonsten z.B. kleine Pipettierfehler bei der Probenbearbeitung den Endwert in den Randbereichen der Kurve überproportional stark verzerren, vor allem wenn der lineare Bereich nach oben hin überschritten wird. Die einzelnen Proben wurden zunächst mit Assay-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Nach der Zugabe von 100 µl Antikörper-Lösung wies jede Probe somit ein Volumen von 300 µl auf und wurde nach Durchmischung über Nacht (20-24 h) bei 4 °C inkubiert. Während dieser ersten Inkubationsphase enthielt der NSB-Kontrollansatz 300 µl Assay-Puffer, die Leerprobe (B<sub>0</sub>) 200 µl des Puffers sowie 100 µl der Antikörper-Lösung.

Nach dieser Primärinkubation wurde zu jedem Röhrchen (auch zu dem bisher noch leeren TO-Kontrollansatz) 100µl an [<sup>125</sup>I]Maus-Leptin, gelöst in Puffer, pipettiert, und die Inkubation für weitere 24h bei 4°C fortgesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die an die Antikörper gebundene Radioaktivität (IgG – [<sup>125</sup>I]Leptin) von der ungebundenen getrennt, wobei die Antigen-Antikörper-Komplexe, durch Zugabe von 1 ml "Precipitating Reagent" (auf 4°C gekühlt) in die Röhrchen (außer TO), ausgefällt wurden. Nach kurzem Durchmischen, 20-minütiger Inkubation bei 4°C und Zentrifugation für 20 min bei 3000 x g (außer den beiden TO-Kontrollansätzen) wurde der Überstand unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (wiederum außer TO) und die gebundene Radioaktivität im präzipitierten Protein-Pellet, welches die gefällten IgG-Moleküle enthielt, im Gamma-Counter quantitativ erfasst.

In jedem RIA wurde eine Dreifachbestimmung des Leptingehaltes eines Plasmapools durchgeführt, die Aufschluss über die Variabilität innerhalb eines RIAs (in allen Fällen unter 5%) sowie zwischen den verschiedenen RIAs geben sollte. Diese zusätzlichen Proben sowie die 7 verschiedenen Leptinstandards für die Erstellung der Eichkurve wurden auf die gleiche Weise behandelt wie die zu untersuchenden Plasmaproben.

Die anhand der Eichkurve errechneten Rohwerte wurden vor der statistischen Auswertung durch die Anwendung von Korrekturfaktoren berichtigt: durch die Berücksichtigung der Verdünnung des Plasmas durch das Auffangen des Blutes in Heparin bzw. durch die eventuelle Verdünnung mit Assaypuffer wurde zunächst – unter Zuhilfenahme einer selbsterstellten Eichkurve – die Hormonkonzentration für 1 ml reines Plasma errechnet. Die Messung des Plasmapools wurde zudem dazu genutzt, Messungen in verschiedenen RIAs durch die Berücksichtigung von Unterschieden zwischen den einzelnen Assays miteinander abzugleichen.

Im Gegensatz zu den Erwartungen (Zhang et al., 1994; Friedman & Halaas, 1998) kann bei der RIA-Messung auch im Plasma von unbehandelten *ob/ob*-Mäusen Leptin nachgewiesen werden (Harris et al., 1998). Aufgrund der Mutation innerhalb des Leptin-Gens muss dieser Wert aber als physiologisch wirkungslos angesehen werden. Bei den mit Leptin behandelten *ob/ob*-Mäusen wurde daher dieser "Nullwert" in Höhe von 0,8-1,1 ng/ml von der jeweiligen im RIA gemessenen Leptinkonzentration abgezogen.

#### 2.5.2.3 Bestimmung der Plasmainsulin-Konzentration

Die Plasmainsulin-Konzentration wurde mit Hilfe eines kommerziellen RIA-Kits (Serono Diagnostics, Freiburg, BRD) bestimmt. Bei der Verwendung dieses ursprünglich für den Nachweis von humanem Insulin konzipierten Kits, wurde statt des mitgelieferten humanen Standards ein Ratteninsulinstandard zur Erstellung der Eichkurve verwendet (Novo Industries Laboratories, Bagsvaerde, DK). Das eigentliche Verfahren unterschied sich nur minimal von der unter 2.5.2.2 beschriebenen Durchführung: so wurden die Proben hier nur einmal für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, da Antikörper und *Tracer* zum gleichen Zeitpunkt zugesetzt wurden. Das gebundene Antigen wurde anschließend unter der Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) als Antikörper-Antigen-PEG-Komplex ausgefällt.

Für die Bewertung der Qualität des RIAs wurden auch hier die in 2.5.2.2 beschriebenen Kontrollansätze mitgemessen, wobei die maximale Bindungsfähigkeit des *Tracers* an den Antikörper in der Regel zwischen 40 und 45% lag. Die Variabilität innerhalb des RIAs wurde durch eine Dreifachbestimmung des Insulingehaltes eines Plasmapools bestimmt. Die Intra-Assay-Variabilität lag in allen Fällen unter 5%. Die Verdünnung des Plasmas infolge des Heparinzusatzes und der Pufferverdünnung – es wurden Volumina zwischen 5 und 30 µl eingesetzt – wurde auch hier berücksichtigt und die Werte entsprechend korrigiert. Wurden Messungen in verschiedenen RIAs durchgeführt, so wurden ebenfalls Unterschiede zwischen den Assays berücksichtigt.

Bei der Beurteilung der Insulinwerte sollte berücksichtigt werden, dass die Verwendung eines Rattenstandards infolge einer möglicherweise unterschiedlichen Bindungsaffinität des humanen Antikörpers an Ratten- bzw. Maus-Insulin eventuell zu Verzerrungen der Absolutwerte geführt haben könnte. Dabei ist aber davon auszugehen, dass das relative Verhältnis der Insulinkonzentrationen nicht verfälscht ist, so dass die vergleichenden Untersuchungen zwischen verschiedenen Mäusegruppen ohne weiteres durchgeführt werden können. Der Vergleich zwischen Mäusen und Ratten hinsichtlich der gemessenen Plasmainsulinspiegel erfolgte entsprechend nur anhand der relativen Abweichungen der untersuchten Tier-Modelle von der Plasmainsulin-Konzentration der Wildtyp-Tiere.

#### 2.5.2.4 Bestimmung der Plasmathyroxin-Konzentration

Für die Bestimmung der Plasmathyroxin ( $T_4$ )-Konzentration bei Mäusen der Versuchsserie C wurde ein kommerzieller RIA-Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim, BRD) für den Nachweis von humanem Thyroxin verwendet. Da bei dieser Untersuchung nur die relativen Thyroxinkonzentrationen von Mäuseplasma interessierten, war eine Verfälschung der Absolutwerte durch die Verwendung eines humanen Antikörpers und Thyroxinstandards nicht von Bedeutung. Im Unterschied zur Leptin- und Insulinmessung wurden die zu bestimmenden Plasmaproben in mit Anti- $T_4$ -Antikörper beschichtete Röhrchen pipettiert. Nach dem sofortigen Zugabe des radioaktiv markierten [ $^{125}I$ ] $T_4$  erfolgte eine 60-minütige Inkubation. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Röhrchen vor der Messung im Gammacounter 3x mit Waschpuffer ausgeschwenkt. Für alle Proben erfolgte eine Einfachbestimmung innerhalb desselben RIA-Assays. Bei Einbeziehung von in Heidelberg erhobenen Thyroxin-Daten (Kellendonk et al., 2002) wurde die entsprechende Variabilität zwischen den Assays durch die Berücksichtigung des Faktors "RIA-Assay" bei der statistischen Auswertung korrigiert (siehe 2.6.3.3). Eine Verdünnung durch Assay-Puffer fand nicht statt, da bei allen Proben vorschriftsmäßig 25  $\mu$ l eingesetzt wurden. Die Verdünnung des Plasmas infolge des Heparinzusatzes wurde aber berücksichtigt und die Werte entsprechend korrigiert.

#### **2.5.3 *In situ*-Hybridisierung**

Die radioaktive *in situ*-Hybridisierung stellt eine etablierte Methode zur Lokalisation und Semi-Quantifizierung von DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und sogar intrazellulären Strukturen dar. Dabei bindet eine einsträngige Sonde radioaktiv markierter Nukleinsäuren spezifisch an die komplementäre einsträngige mRNA-Zielsequenz, wodurch sich ein stabiles, doppelsträngiges Hybrid-Molekül bildet, das durch die radioaktive



Markierung detektiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer Pilotstudie auf Basis einer RNA:RNA-*in situ*-Hybridisierung die relative NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus von Mäusen der Versuchsserie C bestimmt und hinsichtlich der Auswirkung einer der Tötung vorausgehenden Lachs-Calcitonin-Behandlung miteinander verglichen. Das hier durchgeführte Verfahren ist in seinen Grundzügen von Simmons et al. (1989) beschrieben worden und wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Julian G. Mercer am Rowett Research Institute (Aberdeen, Schottland, UK) für den Nachweis von NPY-mRNA in Nagergehirnen modifiziert (Mercer et al., 1995). Die genaue Herstellung bzw. die Bezugsfirmen für die im Folgenden aufgeführten Lösungen und Chemikalien sind im Anhang aufgelistet.

#### 2.5.3.1 Schneiden der Gehirne

Von den nach der Tötung entnommenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Mäusegehirnen wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (HM 500 O, Microm International GmbH, Walldorf, BRD) Frontalschnitte von 20  $\mu\text{m}$  Dicke von rostral nach caudal angefertigt und – verteilt auf 8 Serien – auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mit dem Auftreten des ARC, entsprechend Bregma -1,22 mm, wurde mit der Aufnahme der Schnitte begonnen (Figure 41, Franklin & Paxinos, 1997). Die Aufnahme wurde kurz bevor sich der ventrale Teil des 3. Ventrikels verschloss, entsprechend Bregma -2,54 mm (Figure 52), beendet.

#### 2.5.3.2 Herstellung der Hybridisierungslösung

Das DNA-*Template* für die Herstellung der radioaktiven NPY-Sonde wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. J.G. Mercer am Rowett Research Institute (Aberdeen, UK) mit Genehmigung des Erst-Herstellers zur Verfügung gestellt, nachdem das entsprechende Plasmid dort in E.coli-Zellen transformiert, durch deren Anzucht vervielfältigt, isoliert und linearisiert worden war. Das Plasmid pBLNPY-1 wurde ursprünglich von der Arbeitsgruppe um S.L. Sabol hergestellt (Higuchi et al., 1988). Dieser Bluescribe M13(-)-Vektor enthält innerhalb der EcoRI-Region eine 511 bp große Insertion, die den größten Teil der cDNA des prepro-Neuropeptid Y von Ratten beinhaltet.

Mittels *in vitro*-Transkription wurde unter Verwendung des DNA-*Templates* eine  $^{35}\text{S}$ -markierte RNA-Sonde hergestellt. Die notwendige Überprüfung der Spezifität der Sonde unter Verwendung einer *sense*-Sonde war bereits zuvor von der schottischen Arbeitsgruppe gezeigt worden (Mercer et al., 1998; J.G. Mercer, persönliche Mitteilung).

Herstellung der *antisense*-Sonde:

2,5 µl	DEPC-Wasser
5 µl	5x Transkriptionspuffer
7,5 µl	DNA-Template (= 1 µg)
3 µl	rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP)
1 µl	0,75 M DTT
1 µl	RNase Block I (= 38 I.U.)
4 µl	<sup>35</sup> S-UTP (=50 µCi)
1 µl	RNA-Polymerase (T3) (= 17 I.U.)

Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C inklusive der Zugabe von DNase 30 min vor Inkubationsende wurde die Sonde isoliert und deren Aktivität bestimmt, die im vorliegenden Fall 576 000 counts/min für 1 µl der unverdünnten Probe betrug.

Herstellung des Hybridisierungspuffers:

2,5 ml	Formamid
300 µl	5M NaCl
100 µl	50x Denhardts-Lösung
50 µl	1M TRIS (pH8)
10 µl	0,5M EDTA (pH8)
40 µl	DEPC-Wasser
1 ml	Dextran-Sulfat

Beim Ansetzen der Hybridisierungslösung wurden 2800 µl des Hybridisierungspuffers mit 177 µl DEPC-Wasser, 35 µl DTT (1M), 448 µl tRNA (3,9 mg/ml) sowie 40 µl der *antisense*-Sonde vermischt. Die Sonde wurde zuvor für 10 min einer Temperatur von 65°C ausgesetzt, damit eventuell gebildete Doppelstränge denaturiert wurden. Die Aktivitätsmessung ergab 9000 counts/min pro µl Hybridisierungslösung.

### 2.5.3.3 Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Gehirnschnitte für 20 min in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend getrocknet. Nach der Beschichtung mit jeweils 70 µl der Hybridisierungslösung und dem Abdichten der Deckgläschen mit DPX wurden die Objektträger über Nacht (~18 h) bei 58°C in den Hybridisierungsofen gestellt.

### 2.5.3.4 Posthybridisierung

Nach dem Ablösen der Deckgläschen durch das Einweichen der Objektträger in 4xSSC und einer anschließenden viermaligen Waschung mit 4xSSC erfolgte eine 30-minütige RNase-Inkubation bei 37°C. Die RNase-Lösung bestand dabei aus 444 ml destilliertem Wasser, 50 ml NaCl, 5 ml Tris (1M, pH8), 1 ml EDTA (0,5M) und 1 ml RNase (0,1 mg/ml). Im

Anschluss wurden mehrere Waschungen mit absteigenden Konzentrationen an SSC (2-0,1xSSC) durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend getrocknet.

#### 2.5.3.5 Filmautoradiographie

Das Hybridisierungsmuster wurde unter Verwendung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Gemeinsam mit jeweils einem  $^{14}\text{C}$ -Standard (Autoradiographic [ $^{14}\text{C}$ ] micro-scales, Code RPA 5041, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) wurden die Objektträger in zwei Expositionskassetten sortiert und die Röntgenfilme (Hyperfilm  $\beta$ -max, Amersham) anschließend für 6,5 Tage exponiert. Die beiden Filme wurden schließlich entwickelt und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.5.3.6 Auswertung der Röntgenfilme

Die Röntgenfilme wurden zunächst unter Verwendung eines Durchlichtscanners (PowerLookII, Umax Systems GmbH, Willich, BRD) und eines speziellen Scanprogrammes (MagicScan, Umax Systems GmbH) eingescannt. Helligkeit und Kontrast wurden dabei so eingestellt, dass mindestens 6 der 8 Felder der  $^{14}\text{C}$ -Skala in ihrem Schwarzheitsgrad zu unterscheiden waren. Für beide Filme galten identische Einstellungen. Die quantitative Auswertung des Hybridisierungssignals erfolgte mit Hilfe des Programms Image ProPlus (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA). Dabei wurde bei jedem auszuwertenden Schnitt die Fläche des Hybridisierungssignals und deren optische Dichte innerhalb der ARC-Region gemessen. Durch den Vergleich des schwächsten und stärksten Signals auf dem jeweiligen Film wurde ein für alle Schnitte akzeptabler "Range" eingestellt. Basierend auf der mit Hilfe der  $^{14}\text{C}$ -Skala erstellten Eichkurve errechnete das Programm für jedes Schnittpräparat einen Wert für die "integrierte optische Dichte" (IOD), bei der Fläche, Schwarzheitsgrad und die Korrektur der Hintergrundfärbung berücksichtigt wurden. Grundsätzlich fallen bei dem Verteilen der Gehirnschnitte auf 8 Serien maximal 5 auswertbare ARC-Schnitte pro Serie an, da ein für die spätere Auswertung quantifizierbares Hybridisierungssignal nur im medialen Bereich des Nucleus arcuatus entsprechend Bregma -2,30 bis Bregma -1,58 auftritt. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Tier im Durchschnitt zwei Schnitte ausgewertet. Dies beruhte auf einer ungünstigen Anordnung der Schnitte auf dem Objektträger, wobei fast jeder 3. Schnitt zu nah am Deckgläschenrand zu liegen kam und aus diesem Grund keine optimalen Hybridisierungsbedingungen vorlagen. Durch die Beschränkung auf zwei optimale Schnitte pro Tier wurde dieser methodische Mangel umgangen und trotzdem ein aussagekräftiger Vergleich zwischen den untersuchten Tiergruppen ermöglicht. Indem die IOD-Werte aller

auswertbaren Schnitte eines Gehirns gemittelt wurden, ergab sich die relative NPY-mRNA-Konzentration im ARC jedes untersuchten Tieres.

## **2.6 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene statistische Verfahren angewandt, die sich aus dem jeweiligen Datenpool bzw. der gewählten Darstellungsart ergaben und die im Folgenden näher beschrieben werden. Um dabei die Zuordnung zu den jeweiligen Abbildungen zu erleichtern, wird in Klammern auf die entsprechende Abbildung im nachfolgenden Ergebnisteil verwiesen.

### **2.6.1 Allgemeines**

Mit Ausnahme des Vergleichs zweier Regressionsgeraden, für den ein hauseigenes Statistikprogramm herangezogen wurde, wurden alle statistischen Tests mit Hilfe des Windowsprogramm SigmaStat (SPSS Corporation, Chicago, USA) durchgeführt. Bei allen angewandten statistischen Verfahren wurde ein Mindest-Signifikanzniveau von  $P < 0,05$  angenommen. Bei der Durchführung von Varianzanalysen in Sigma-Stat wurden die vorliegenden Daten zunächst routinemäßig auf Normalverteilung (nach Kolmogorov-Smirnov) und gleiche Varianzen (Levene-Median-Test) hin geprüft. War eine der Bedingungen nicht erfüllt, so wurde die Rangordnung der Werte bestimmt und die Varianzanalyse mit diesen Rangwerten ausgeführt (Bortz, 1989). Trat bei dem Vergleich zweier Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied auf, so wurde dieser mit \* für  $P < 0,05$ , \*\* für  $P < 0,01$  und \*\*\* für  $P < 0,001$  kenntlich gemacht.

Für die Darstellung von Verlaufskurven für Körpermasse, Futteraufnahme und  $O_2$ -Verbrauch (Abb. 3, 4, 14, 16, 22) sowie bei dem statistischen Vergleich zweier Versuchsgruppen ohne einflussnehmende Faktoren wurden arithmetische Mittelwerte ( $\pm SE$ ) errechnet. Mussten zusätzliche Faktoren bei der Mittelwertbildung berücksichtigt werden, so wurden stattdessen gewichtete Mittelwerte ( $\pm SE$ ) mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse errechnet.

### **2.6.2 Regressionsanalysen**

Zur Ermittlung von Korrelationskoeffizienten wurden gängige Standardverfahren zur Bestimmung von Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate herangezogen

und deren Signifikanz gegen Null bestimmt (Sachs, 1997). Sind Konfidenzintervalle dargestellt, so begrenzen diese den Bereich, in dem ein beliebiger Datenpunkt mit 95%iger Wahrscheinlichkeit lokalisiert ist.

Bei dem Vergleich zweier Regressionsgeraden in Versuchsserie B wurden diese bei Anwendung des hauseigenen Statistikprogramms zunächst auf Parallelität, anschließend – bei statistisch nicht auszuschließender Parallelität – auf Unterschiede im y-Achsenabschnitt hin untersucht (Brownlee, 1965). Zur Untersuchung der Altersabhängigkeit der Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin, wurden dabei sowohl die beiden Genotypen innerhalb einer Altersstufe als auch verschiedene Altersstufen miteinander verglichen (Abb. 19, 20). In Versuchsserie C wurde innerhalb der beiden genetisch adipösen Tiermodelle die Abhängigkeit der NPY-mRNA-Konzentration im ARC vom Körperfettgehalt der Mäuse auf Unterschiede zwischen behandelten und Kontroll-Tieren überprüft (Abb. 29).

In Versuchsserie C wurde zudem ein Regressionsgeradenvergleich auf der Basis einer multiplen linearen Regressionsanalyse (SigmaStat) durchgeführt (Abb. 26, 27). Dabei wurde für die untersuchten 3 Mäuse- bzw. 2 Ratten-Modelle der Einfluss der Stammeszugehörigkeit bzw. des Genotyps auf die dosisabhängige Reduktion der Energieaufnahme analysiert, indem diese neben der sCT-Dosis als unabhängige Variablen berücksichtigt wurden.

### **2.6.3 Statistischer Vergleich von Mittelwerten**

#### 2.6.3.1 unpaarer t-Test

Dieses statistische Testverfahren zum Vergleich von Mittelwerten ( $\pm$ SE) wurde nur in Versuchsserie A angewandt. Für die Beurteilung der Wirkung der Leptininjektionen bei Versuchsgruppe A1 wurde in Ermangelung von Kontrolltieren für Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch der jeweilige Mittelwert aller Tiere während der Vor- und Nachlaufphase mit dem Mittelwert am entsprechenden Effekttag verglichen (Abb. 5). Die Wirkung der Leptininfusion auf den Plasmainsulinspiegel in Versuchsgruppe A1 und A2 wurde durch den Vergleich der Plasmainsulin-Konzentration vor Infusionsbeginn mit den gemessenen Werten nach 15 Tagen beurteilt (Abb. 10). Bei Versuchsgruppe A1 wurde außerdem der Körpermassenanstieg vor Versuchsbeginn mit dem während der Nachlaufphase verglichen. FFDM und Körperfett von unbehandelten Mäusen sowie die entsprechenden Daten am Versuchsende wurden ebenfalls mit Hilfe des *t*-Tests auf statistische Unterschiede hin untersucht.

### 2.6.3.2 Varianzanalysen

Innerhalb der Versuchsserie A wurde die Dosisabhängigkeit des Leptineffekts auf den Plasmainsulinspiegel (Abb. 10) sowie die Körperzusammensetzung zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mittels einfaktorieller Varianzanalysen untersucht.

Innerhalb der Versuchsserie B wurden grundsätzlich zweifaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Neben dem für die Versuchsauswertung interessanten Faktor Genotyp wurden bei den Jungtieren wie mehrfach zuvor beschrieben (Schwarzer et al., 1997; Kraeft et al., 1999) sowohl Wurfzugehörigkeit wie Geschlecht berücksichtigt, indem ein kombinierter Wurf-Geschlechts-Faktor in den Test mit einbezogen wurde (Abb. 12, 13, 18). Der Versuch, zwischen Wurf- und Geschlechts-Effekt zu unterscheiden, war in der vorliegenden Arbeit nicht von Interesse. Wurden nur Tiere eines Wurfes untersucht, wurden Genotyp und Geschlecht als Faktoren berücksichtigt (Abb. 15). Da die untersuchten adulten Mäuse alle das gleiche Geschlecht aufwiesen, wurde bei der statistischen Auswertung neben dem Genotyp nur die Versuchsgruppe als weiterer Faktor berücksichtigt (Abb. 12, 13, 18), bei Betrachtung einer einzelnen adulten Versuchsgruppe wurde folglich eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (Abb. 15, 17). Im Falle der Thyroxindaten, wo – neben den eigenen adulten Gruppen – von F. Tronche (DKFZ, Heidelberg, BRD) durchgeführte Messungen bei 22°C mit in die Auswertung einbezogen wurden, wurde als zweiter Faktor "RIA-Assay" in der Auswertung berücksichtigt (Abb. 17).

Bei der statistischen Auswertung der in Versuchsserie C erhobenen Daten wurde grundsätzlich der Unterschied zwischen behandelten und Kontroll-Tieren untersucht. Dies geschah mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem Faktor Behandlung, wenn sich die Auswertung auf einen Behandlungstag innerhalb einer Versuchsgruppe beschränkte (Abb. 23, 26, 27, 29, Tab. 5). Wurden mehrere Behandlungstage innerhalb einer Versuchsgruppe und/oder mehrere Versuchsgruppen in die Auswertung einbezogen, so wurde diese Tatsache durch die Durchführung einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Behandlung und Versuchstag bzw. Versuchsgruppe berücksichtigt (Abb. 21, 24, 26, 27, 29). Sollte die Wirkung der gleichen Substanz bei unterschiedlichen Diäten verglichen werden, wurde neben der Behandlung die Diät als zweiter Faktor in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse berücksichtigt (Abb. 24).

### 3 ERGEBNISSE

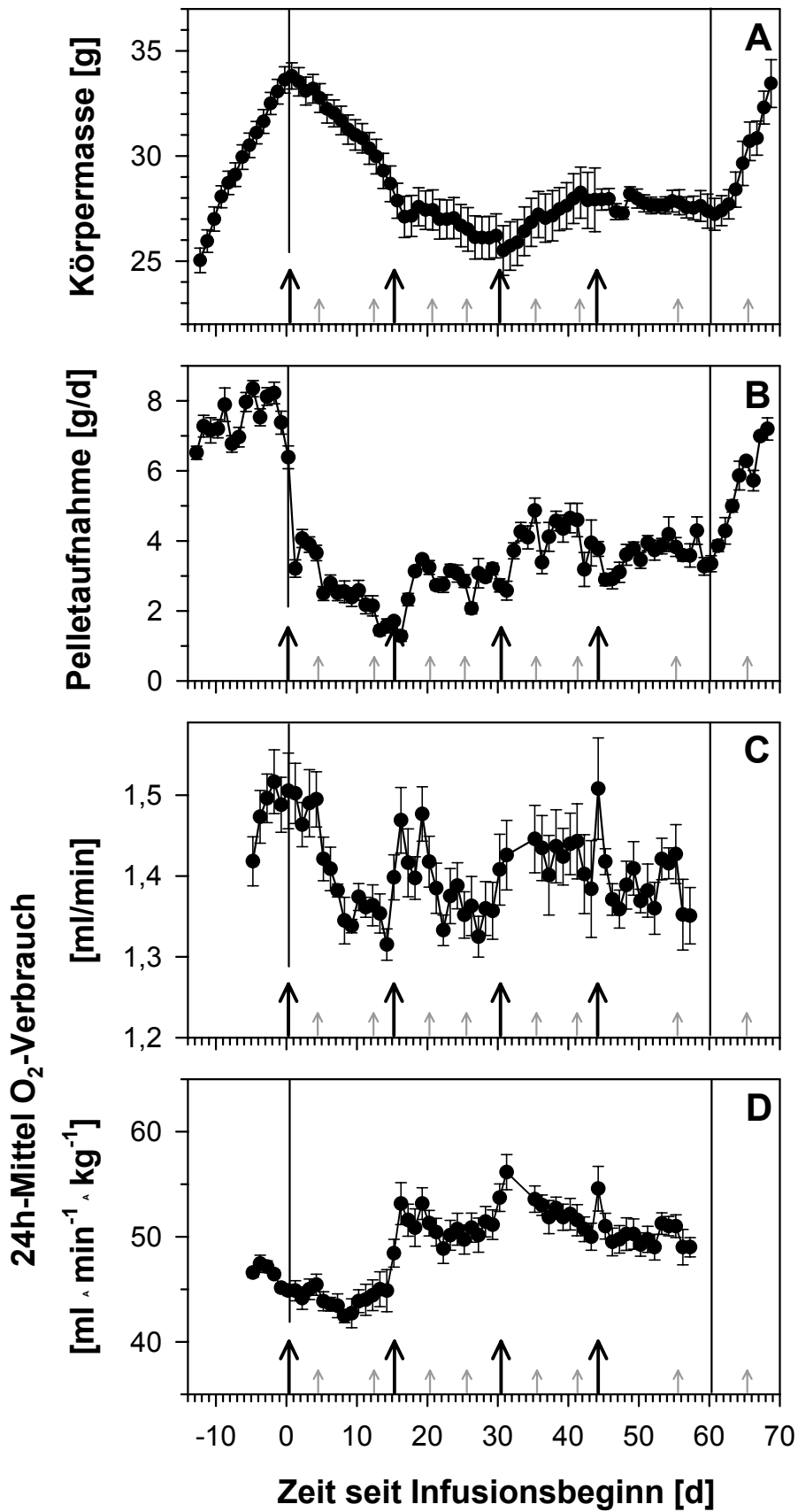
#### 3.1 VERSUCHSSERIE A: AUSWIRKUNG EINER LEPTIN-INFUSION BEI *OB/OB*-MÄUSEN

##### 3.1.1 Auswirkung der Leptin-Infusion auf den Verlauf von Körpermasse, Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch

Die Verlaufskurve der Körpermasse während der 60-tägigen Infusion von 210 pmol/d Leptin bei Versuchsgruppe A1 ist in Abb. 3A dargestellt. Der starke Körpermassenanstieg während der Vorlaufphase (0,67 g/d) zeigt, dass sich die *ob/ob*-Mäuse im Alter von 2 Monaten noch immer in einer deutlichen Wachstumsphase befinden. Mit Einsetzen der Leptinwirkung kommt es aber nicht nur zu einem Stagnieren des Körpermassenwachstums, sondern zu einer starken Abnahme der Körpermasse, die sich in den ersten 15 Tagen der Leptininfusionsphase auf etwa -0,40 g/d beläuft. Die Körpermasse pendelt sich schließlich – nach relativ starken individuellen Schwankungen zwischen dem 15. und 45. Behandlungstag – auf einen mittleren Wert von etwa 28 g ein. Das Nachlassen dieser Schwankungen könnte dabei zumindest zum Teil auf dem Tod von 3 Tieren bei der 4. Pumpenimplantation (vgl. Tab. 1) beruhen. Sobald die Leptinbehandlung abgebrochen wird, beginnt die Körpermasse sofort wieder anzusteigen. Dabei übertrifft die tägliche Zunahme von 0,96 g/d die Körpermassenzunahme vor Behandlungsbeginn ( $P < 0,01$ ).

Bei Betrachtung der Futteraufnahme (Abb. 3B) zeigt sich mit Einsetzen der Leptinwirkung eine sofortige Reduktion der Pelletaufnahme von ursprünglich beinahe 8 auf unter 4 g/d. Die Reduktion der Pelletaufnahme erreicht ihr Maximum nach ca. 2 Wochen, wenn die Tiere im Mittel weniger als 2 g der Standard-Diät zu sich nehmen. Während des 60-tägigen Behandlungszeitraumes unterliegt die Pelletaufnahme relativ starken Schwankungen, die zum Teil durch die zusätzlichen Leptininjektionen verursacht sein könnten. Zusätzlich scheint es aber mit jedem Pumpenwechsel zu einer sprunghaften Veränderung der Pelletaufnahme auf ein neues relativ stabiles Niveau zu kommen. Da die verabreichte Leptin-Konzentration und die Funktionstüchtigkeit der Pumpen unverändert waren, lässt sich für diesen Effekt keine methodische Erklärung erkennen. Abgesehen von der Sprunghaftigkeit der Veränderung stimmt der Verlauf der Pelletaufnahme im Allgemeinen mit den Beobachtungen von Rafael & Herling (2000) überein. Die sich am Ende der Behandlungsphase infolge einer Leptininfusion

von 210 pmol/d im Mittel bei etwa 3,8 g/d einpendelnde Pelletaufnahme beträgt bei dieser Versuchsgruppe etwa 50% der Ausgangsmenge.



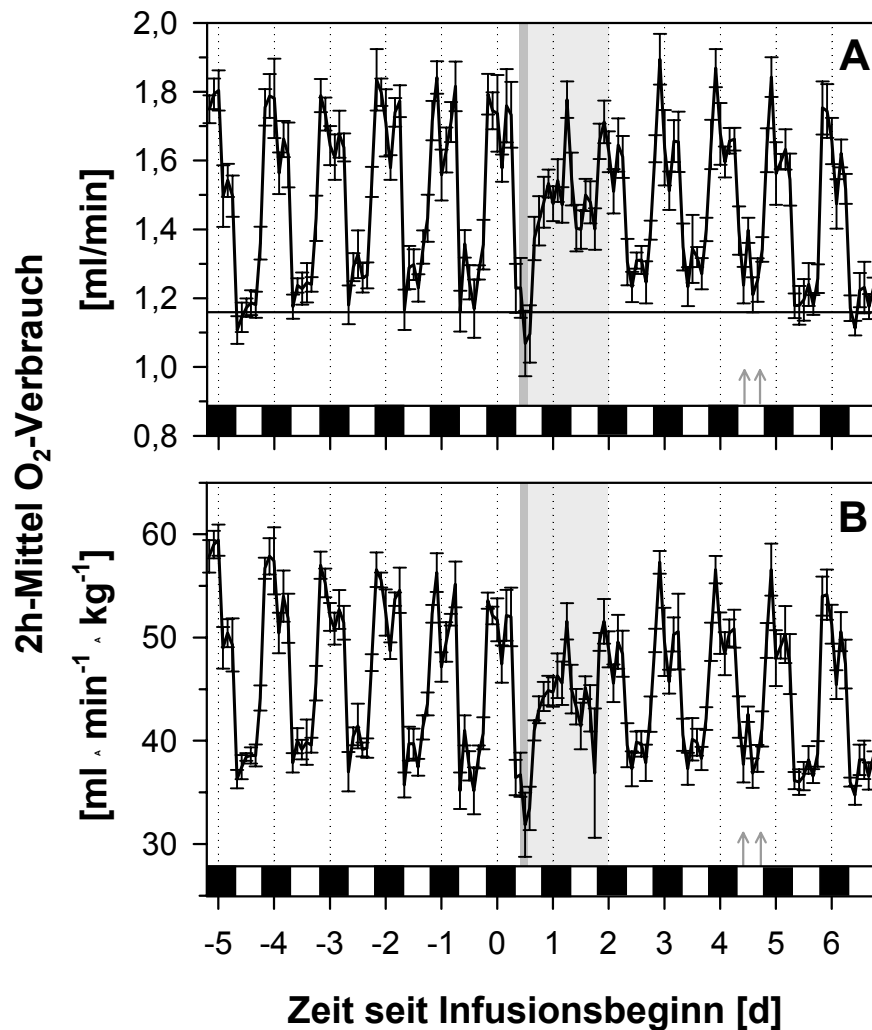


**Abb.3 (vorherige Seite):** Verlaufskurven für Körpermasse (A), Pelletaufnahme (B), Sauerstoffverbrauch (C) und massenspezifischen Sauerstoffverbrauch (D) während des 13-tägigen Vorlaufs, der 60-tägigen Behandlungsphase und des 8-tägigen Nachlaufs von Mäusen der Versuchsgruppe A1. Über subkutane osmotische Mini-Pumpen wurde Leptin in einer Dosis von 210 pmol/d infundiert. Gezeigt sind 24-Stunden-Mittelwerte ( $\pm$ SE) von 4-10 (A, B) bzw. 4-7 Tieren (C, D). Genaue N-Zahlen im Versuchsverlauf siehe Tab. 1. Schwarze Pfeile markieren Pumpenimplantationen. Graue Pfeile geben die Tage an, an denen zusätzliche Leptininjektionen ( $2 \times 50 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) durchgeführt wurden.

Für den Sauerstoffverbrauch ergibt sich ein unklares Bild (Abb. 3C). Prinzipiell folgt der Sauerstoffverbrauch in seinem Gesamtverlauf jedoch der Futteraufnahme. Interessanterweise kommt es aber – im Gegensatz zu dem Verlauf der Futteraufnahme – erst am 5. Behandlungstag zu einem klaren Abfall des Sauerstoffverbrauchs unter das Niveau der Vorlaufphase. Etwa 2 Wochen nach Beginn der Leptininfusion erreicht der Sauerstoffverbrauch ein Minimum von etwa 1,32 ml/min, was einer Reduktion um etwa 12% entspricht. Der weitere Verlauf ist sehr großen Schwankungen unterworfen, wobei auch hier die Pumpenwechsel eine Rolle zu spielen scheinen. Verglichen mit den relativ niedrigen Werten am Ende der ersten Pumpenphase scheint sich der Sauerstoff gegen Ende der Infusionsphase auf einem etwas höheren Wert einzupendeln, der etwa 93% des Ausgangswertes entspricht. Verglichen mit der prozentualen Reduktion der Futteraufnahme im Verlauf der Leptinbehandlung ist die Veränderung des Sauerstoffverbrauchs deutlich schwächer. So zeigt die Betrachtung auf energetischer Basis, dass der mittlere Energieverbrauch der Tiere während des gesamten Versuchszeitraums einschließlich der Vorlaufphase zwischen 38 und 45 kJ/d beträgt, sich also in einem relativ engen Bereich bewegt. Die Energieaufnahme sinkt dagegen von anfänglich 110 kJ/d auf bis zu 17 kJ/d infolge der Leptinbehandlung und beeinflusst so die Energiebilanz deutlich stärker. Obwohl die Abnahme der Körpermasse somit energetisch nur durch die verminderte Futteraufnahme zu erklären ist, da durch die leichte Reduktion des Sauerstoffverbrauchs im Versuchsverlauf sogar noch Energie eingespart wird, kann die Frage, ob die Reduktion des Energieverbrauchs schwächer ist, als aufgrund der starken Reduktion der Futteraufnahme zu erwarten wäre, ohne den direkten Vergleich mit einer "Pair-feeding"-Gruppe nicht untersucht werden.

Bei Betrachtung des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs (Abb. 3D) zeigt sich ein anderes Bild. Während innerhalb der ersten 15 Behandlungstage eine minimale Abnahme zu beobachten ist, kommt es mit dem ersten Pumpenwechsel bei gleichzeitig abflachendem Verlauf der Körpermassenabnahme zu einem sprunghaften Anstieg des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs auf im Mittel etwa 109% des Vorlaufwertes. Abgesehen von dem

wiederum sichtbaren Einfluss der weiteren Pumpenwechsel hält sich dieses erhöhte Niveau relativ stabil bis zum Versuchsende. Im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch pro Gesamttier fällt die geringere Streuung des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs auf. Es ist jedoch offensichtlich, dass die Änderung der Körpermasse und die des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs nicht den gleichen Zeitverlauf zeigen.



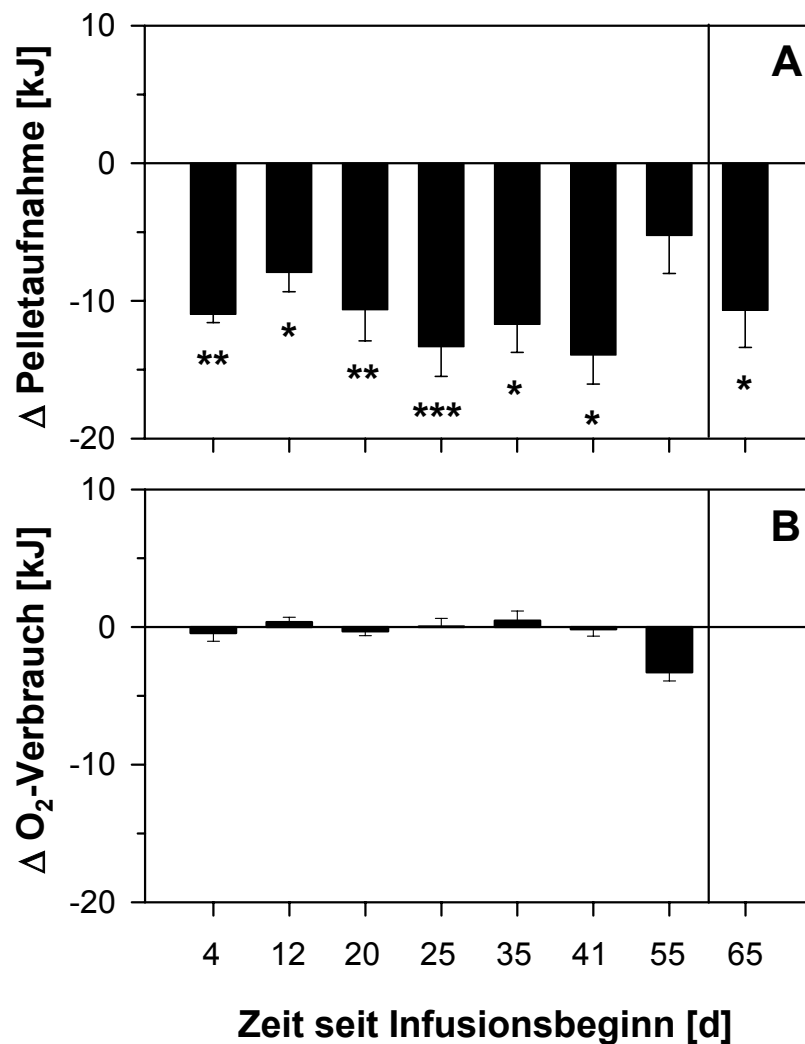
**Abb. 4:** Tagesperiodischer Verlauf des Sauerstoffverbrauchs (A) und des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs (B) während 5 Vorlauf Tagen, dem 1. Operationstag (Tag 0) und den ersten 6 Tagen der Behandlungsphase von Mäusen der Versuchsgruppe A1. Über subkutane osmotische Mini-Pumpen wurde Leptin in einer Dosis von 210 pmol/d infundiert. Gezeigt sind 2-Stunden-Mittelwerte ( $\pm$ SE) über 7 Tiere. Der Operationszeitpunkt und der erste postoperative Tag sind jeweils grau hervorgehoben. Der Licht:Dunkel-Rhythmus ist durch den schwarz-weißen Balken dargestellt. Graue Pfeile markieren zusätzliche Leptininjektionen ( $2 \times 50 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

Um nähere Informationen über die Veränderung des Sauerstoffverbrauchs zu erhalten, wurden die tagesrhythmischen Änderungen im Sauerstoffverbrauch während des Vorlaufs

und der ersten 6 Behandlungstage auf der Basis von 2-Stunden-Mittelwerten analysiert (Abb. 4). Grundsätzlich zeigt sich dabei, dass die Tiere einen ausgeprägten Tagesrhythmus im Sauerstoffverbrauch aufweisen, mit einem Maximum während der Dunkelphase und einem Minimum während der für Mäuse üblichen Ruheperiode während der Lichtphase. Der relativ unregelmäßige Verlauf des Sauerstoffverbrauchs in den 36 Stunden unmittelbar nach der Pumpenimplantation scheint auf die Nachwirkungen der Operation zurückzuführen sein. Sowohl die Aktivitäts- wie die Ruhephasen während des Vorlaufs zeichnen sich durch eine Zweigipfeligkeit im Sauerstoffverbrauch aus, wobei während des jeweils früheren Peaks in der Regel der Maximal- bzw. Minimalwert im Sauerstoffverbrauch erreicht wird, während die jeweils nachfolgenden Peaks tendenziell schwächer ausgeprägt sind. Der erste Peak in der jeweiligen Ruhephase könnte eine – wenn auch nur relativ schwach ausgeprägte – torporartige Absenkung darstellen, die aufgrund von Literaturbefunden im Zusammenhang mit der Hypothermie der *ob/ob*-Mäuse angenommen werden muss (Himms-Hagen, 1985; Webb, 1982). Gemäß dieser Studien treten deutlich ausgeprägte torporartige Absenkungen allerdings in der Regel erst bei limitiertem Futterzugang auf. Zudem sollte beachtet werden, dass hier Mittelwerte über 7 Tiere gezeigt sind, wobei bei Betrachtung der Einzelwerte zu erkennen war, dass der Sauerstoffverbrauch jeweils nur von maximal zwei der sieben hier untersuchten Tiere zu diesem Zeitpunkt auf Werte von unter 0,9 ml/min fiel (nicht gezeigt), so dass auch dies die geringe Ausprägung der torporartigen Absenkungen in der Abb. 4 mit erklärt.

Der Vergleich der tagesrhythmischen Veränderung des Sauerstoffverbrauchs im Vorlauf und nach dem Einsetzen der Leptinwirkung lässt eine leichte stoffwechselsteigernde Wirkung des Leptins auf den Sauerstoffverbrauch in den ersten Tagen nach Behandlungsbeginn vermuten. So scheint es am 2. und 3. postoperativen Tag zu einem leichten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in der Ruhephase zu kommen, da die torporartigen Absenkungen zu Beginn der Lichtphase weniger stark ausgeprägt sind als vor Behandlungsbeginn. Ab dem 4. Behandlungstag erreicht der Sauerstoffverbrauch aber wieder die im Vorlauf zu beobachtenden Minimumwerte. Ab dem 2. postoperativen Tag ist zudem der Unterschied zwischen dem ersten und zweiten Peak der Aktivitätsphase vergrößert und es kommt in den folgenden Tagen – parallel zu dem erneuten Absinken des Tagesminimums – zu einer fortschreitenden Reduktion des Sauerstoffverbrauchs in der Aktivitätsphase, in Übereinstimmung mit dem Absinken des Tagesmittelwertes für den Sauerstoffverbrauch ab diesem Zeitpunkt (Abb. 3C). Für die beiden zusätzlichen Leptininjektionen am 5. Behandlungstag ist kein Effekt auf den tagesrhythmischen Verlauf des Sauerstoffverbrauchs der *ob/ob*-Mäuse erkennbar.

## 3.1.2 Überprüfung der Leptinresponsivität im Infusionsverlauf



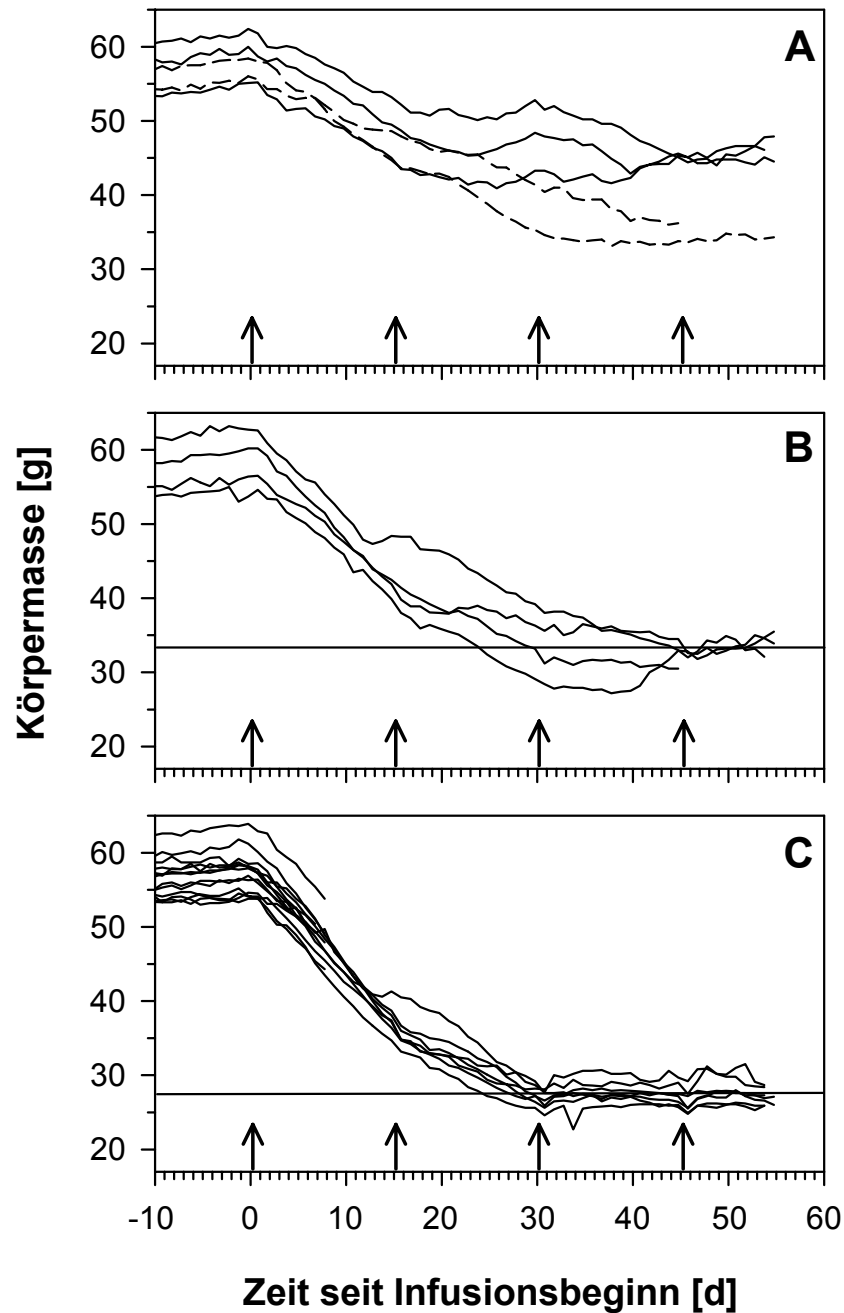
**Abb. 5:** Wirkung von zusätzlichen Leptininjektionen ( $2 \times 50 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) auf die Energieaufnahme (A) und den Energieverbrauch (B) von Mäusen der Versuchsgruppe A1 in Abhängigkeit von der Infusionsdauer (210 pmol/d Leptin). Gezeigt sind gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die Differenz in der Pelletaufnahme bzw. im Sauerstoffverbrauch zwischen dem Effekttag und dem individuellen Mittelwert über Vor- und Nachlauf (=Null-Linie). Ausgewertet wurde die Pelletaufnahme von 4-10 bzw. der Sauerstoffverbrauch von 4-7 Tieren. Genaue N-Zahlen im Versuchsverlauf siehe Tab. 1. Für den 65. Tag nach Infusionsbeginn liegen keine Sauerstoffdaten vor. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Um zu überprüfen, ob sich im Verlauf der Leptininfusion die Leptinresponsivität der *ob/ob*-Mäuse verändert, wurden den Tieren der Versuchsgruppe A1 neben der eigentlichen Leptininfusion in regelmäßigen Abständen (siehe auch Abb. 3) zusätzliche Leptininjektionen verabreicht. Diese wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf Energieaufnahme und Energieverbrauch ausgewertet (Abb. 5). Aufgetragen sind in diesem Fall die mittleren Abweichungen der Futterraufnahme bzw. des Sauerstoffverbrauchs am Effekttag von dem Mittelwert der

jeweiligen Vor- und Nachlaufphase. Fielen Operationen in die Nachlaufphase (d12 und d41), so wurden diese Tage nicht in die Auswertung einbezogen. Die Daten lassen keine Abnahme der Leptinresponsivität im Versuchsverlauf erkennen. Eine Wirkung der zusätzlichen Leptininjektionen auf den Sauerstoffverbrauch tritt nicht auf. Zu allen untersuchten Zeitpunkten – einschließlich der Phase nach Beendigung der Leptininfusion – bewirkt die zusätzliche Leptininjektion aber eine signifikante Reduktion der Pelletaufnahme am Effekttag. Für die nicht signifikante Reaktion am 55. Infusionstag sind keine physiologischen Gründe erkennbar, eine mögliche Ursache könnte die Verminderung der N-Zahl auf nur 4 Tiere zu diesem Zeitpunkt sein, wodurch zufällige Schwankungen in der Nahrungsaufnahme die Feststellung eines Leptineffekts erschweren. Auffällig zu diesem Zeitpunkt ist allerdings die gleichzeitige relativ stark ausgeprägte wenn auch nicht signifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauchs durch die in der Summe der Effekt der Leptininjektion auf die Energiebilanz zusätzlich vermindert wird. Da aber die Stabilisierung der Körpermasse und der Futteraufnahme schon zu einem früheren Zeitpunkt eintritt (Abb. 3A und B), zu dem die Leptinresponsivität unverändert besteht, ist nicht anzunehmen, dass dieser Einzelbefund an 4 Tieren Zeichen einer verminderten Leptinresponsivität ist.

### **3.1.3 Dosisabhängigkeit der Veränderungen von Körpermasse und Futteraufnahme**

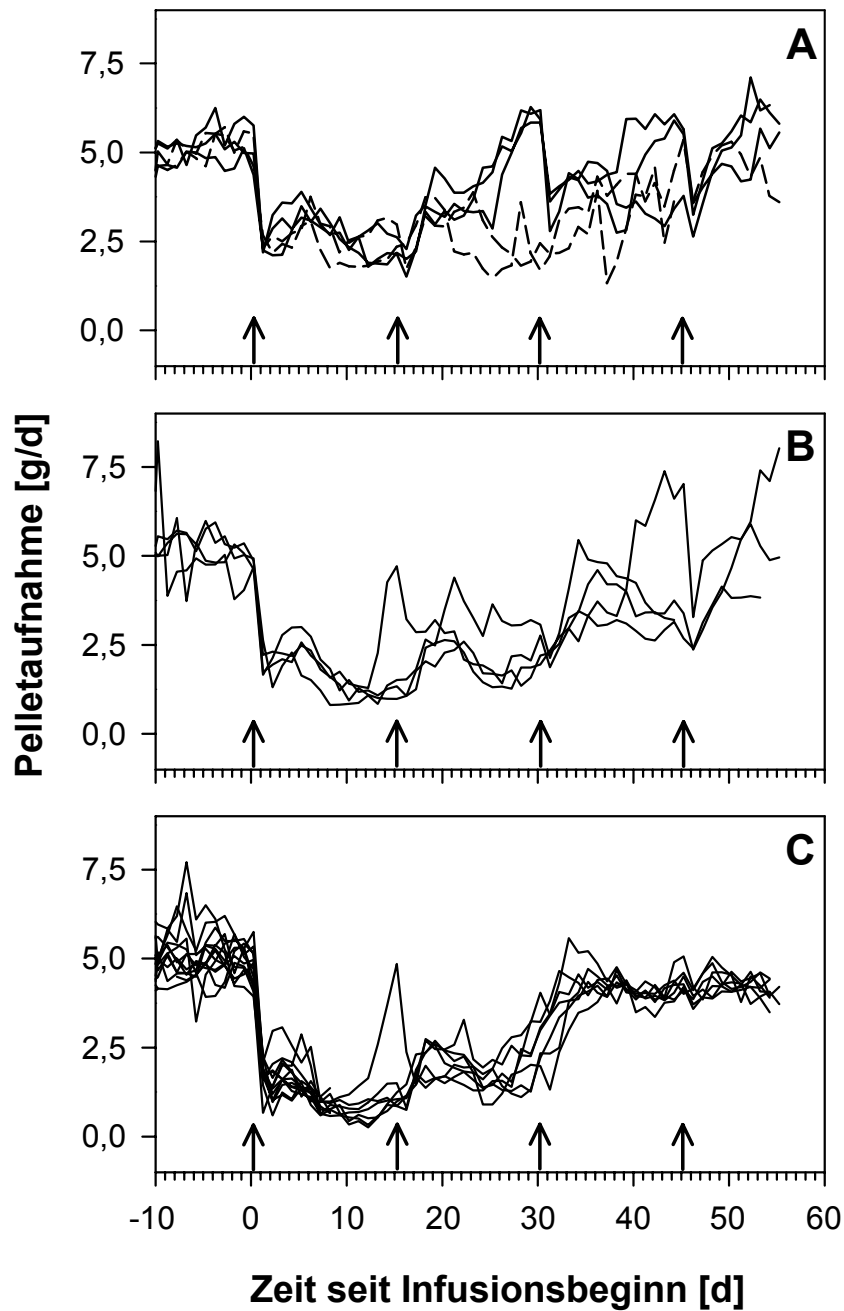
Durch die Anwendung drei verschiedener Leptin-Dosierungen innerhalb der Versuchsgruppe A2 sollte die Reduktion der Körpermasse infolge der Leptinbehandlung auf eine eventuelle Dosisabhängigkeit hin untersucht werden. In den Abbildungen 6 und 7 sind Einzeltiere dargestellt, um die individuellen Unterschiede deutlich zu machen. Bei Betrachtung des Körpermassenverlaufs (Abb. 6) zeigt sich, dass die Höhe der letztlich stabilisierten Körpermasse abhängig von der Leptindosis ist. Während die Körpermasse von Tieren, die zu Behandlungsbeginn im Mittel  $59 \pm 1$  g wogen, infolge einer Leptininfusion in Höhe von 461 pmol/d auf etwa 27 g zurückgeht, stellt sich bei einer Leptindosis von 233 pmol/d nur ein Wert von etwa 34 g ein. Bei einer weiteren Halbierung der Dosis kommt es zu einem etwas unklaren Bild, da 2 der 5 Tiere um etwa 10 g unter das Niveau der anderen fallen, die sich bei einer Körpermasse von etwa 45 g einpendeln. Für diesen Befund ist keine methodische Erklärung erkennbar. Generell scheinen sich aber individuelle Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppe mit steigender Leptindosis zu verringern.



**Abb. 6:** Individuelle Körpermassenverläufe während des 10-tägigen Vorlaufs und der 54-tägigen Behandlungsphase von Mäusen der Versuchsgruppe A2. Über subkutane osmotische Mini-Pumpen wurde Leptin in drei verschiedenen Dosen infundiert: **A)** 116 pmol/d, N=5; **B)** 233 pmol/d, N=4; **C)** 461 pmol/d, N=7-13. Genaue N-Zahlen im Versuchsverlauf siehe Tab. 1. Schwarze Pfeile markieren Pumpenimplantationen. Linien (**B**, **C**) markieren die in der Endphase erreichte mittlere Körpermasse. 2 Tiere in **A**, die sich auf einem abweichenden Körpermassenniveau stabilisieren sind durch ---- Linien hervorgehoben.

Die Reduktion der Körpermasse während der ersten 10 Behandlungstage zeigt ebenfalls eine Dosisabhängigkeit. So steigt die Gewichtsabnahme pro Tag bei einer jeweiligen Verdopplung der Dosis von -0,72 g/d auf -1,20 g/d und schließlich auf -1,46 g/d an. Im Gegensatz dazu

scheint die Zeitdauer bis zum Erreichen einer neuen stabilen Körpermasse aber dosisunabhängig zu sein, die Gewichtsabnahme ist in allen drei Fällen nach etwa 30 Tagen Leptininfusion weitgehend abgeschlossen. Wie aber zuvor schon für die Mäuse der Versuchsgruppe A1 beschrieben, kommt es im Falle der beiden niedrigen Leptin-Dosierungen zunächst zwischen dem 15. und 45. Tag der Leptininfusion zu relativ ausgeprägten individuellen Schwankungen in der Körpermasse, so dass sich erst gegen Ende der 3. Pumpenphase die Körpermasse der einzelnen Tiere in einem relativ engen Bereich einpendelt.



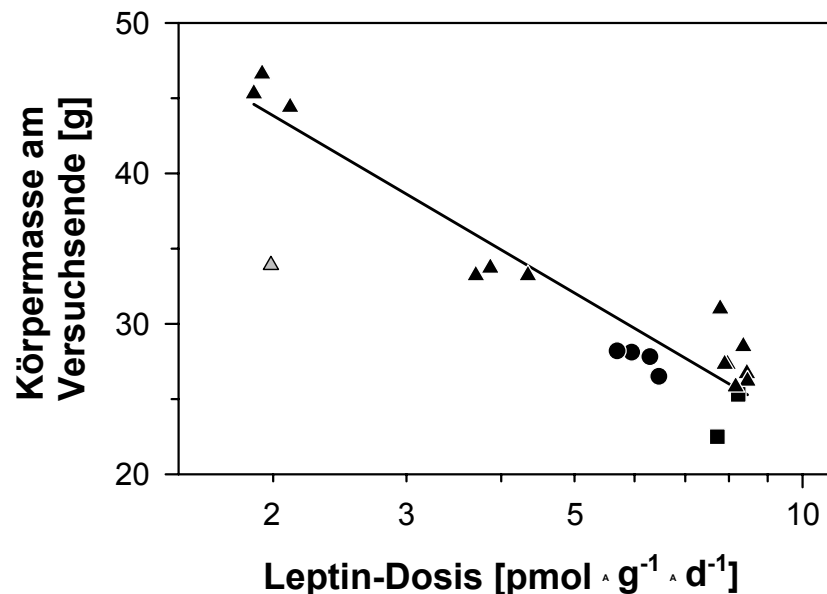
**Abb. 7 (vorherige Seite):** Individuelle Verläufe der Pelletaufnahme während des 10-tägigen Vorlaufs und der 54-tägigen Behandlungsphase von Mäusen der Versuchsgruppe A2. Über subkutane osmotische Mini-Pumpen wurde Leptin in drei verschiedenen Dosen infundiert: **A)** 116 pmol/d, N=5; **B)** 233 pmol/d, N=4; **C)** 461 pmol/d, N=7-13. Genaue N-Zahlen im Versuchsverlauf siehe Tab. 1. Schwarze Pfeile markieren Pumpenimplantationen. 2 Tiere in **A**, die sich auf einem abweichenden Körpermassenniveau stabilisieren (siehe Abb. 6) sind durch ---- Linien hervorgehoben.

Bei Betrachtung der Futteraufnahme (Abb. 7) zeigt sich zunächst mit 5 g/d ein deutlich niedriger Ausgangswert als bei den jüngeren *ob/ob*-Mäusen der Versuchsgruppe A1. Hinsichtlich der individuellen Streuung ergibt sich die gleiche Tendenz wie bei dem Verlauf der Körpermasse, auch hier zeigen die Mäuse, die mit der höchsten Leptindosis behandelt wurden, ein deutlich uniformeres Bild als dies für die beiden niedrigeren Dosierungen der Fall ist. Des Weiteren zeigt sich eine klare Dosisabhängigkeit in der Stärke der Futterreduktion. Ausgehend von dem für alle drei Gruppen gleichen Ausgangswert von etwa 5 g/d sinkt die Futteraufnahme während der 1. Pumpenphase unter der niedrigen Leptindosis auf einen minimalen Wert von im Mittel etwa 2,3 g/d. Für die mittlere und hohe Dosis ergeben sich zum gleichen Zeitpunkt Werte von etwa 1,1 und 0,8 g/d. Trotz der teilweise starken Streuung ist erkennbar, dass die Futteraufnahme, wie bereits in Versuchsgruppe A1 beobachtet (siehe Abb. 3B), mit fortschreitender Leptininfusion wieder ansteigt. Bei der höchsten Leptindosis – für die eine genauere Auswertung aufgrund der relativ geringen Streuung möglich ist – pendelt sich die Futteraufnahme schließlich auf einem Wert von etwa 4 g/d ein, was etwa 80% des Ausgangswertes entspricht. Innerhalb der Gruppe mit der niedrigsten Leptindosis fällt auf, dass die beiden Tiere, deren Körpermasse in der Mitte der zweiten Pumpenphase beginnt, unter das Niveau der anderen 3 Tiere zu fallen (siehe Abb. 6A), einen übereinstimmenden Verlauf der Futteraufnahme mit auffallend niedrigen Werten zu diesem Zeitpunkt zeigen.

Insgesamt zeichnen sich somit im zeitlichen Verlauf der Leptininfusion bei *ob/ob*-Mäusen drei Phasen ab. Zunächst nimmt die Körpermasse in Kombination mit einer stark unterdrückten Futteraufnahme rapide ab. Dann kommt es zu einem allmählichen Anstieg der Futteraufnahme bei Verlangsamung der Körpermassenreduktion. Schließlich pendelt sich die Futteraufnahme auf einem mittleren Niveau ein, während die Körpermasse auf einem niedrigen Niveau stabil gehalten wird. Dass die Körpermasse in der Endphase der Leptininfusion von der Leptindosis abhängt, wird durch die enge Korrelation dieser beiden Größen belegt (Abb. 8). Um für die drei untersuchten Versuchsgruppen einen gemeinsamen Zusammenhang darstellen zu können, musste dabei jedoch die unterschiedliche Anfangskörpermasse der Tiere durch Angabe der massenspezifischen Leptindosis berücksichtigt werden. Der gleiche



Regressionsverlauf ergibt sich nach Normierung der Leptindosis auf die jeweils mittlere Körpermasse im Behandlungsverlauf (nicht gezeigt). Ein Tier aus Versuchsgruppe A2, das mit der niedrigsten Leptindosis behandelt wurde und bereits in den Abb. 6 und 7 gemeinsam mit einem hier nicht dargestellten weiteren Tier vom dem Rest der Gruppe abgewichen ist, fällt auch in dieser Abbildung durch einen von der Regression abweichenden Wert auf.

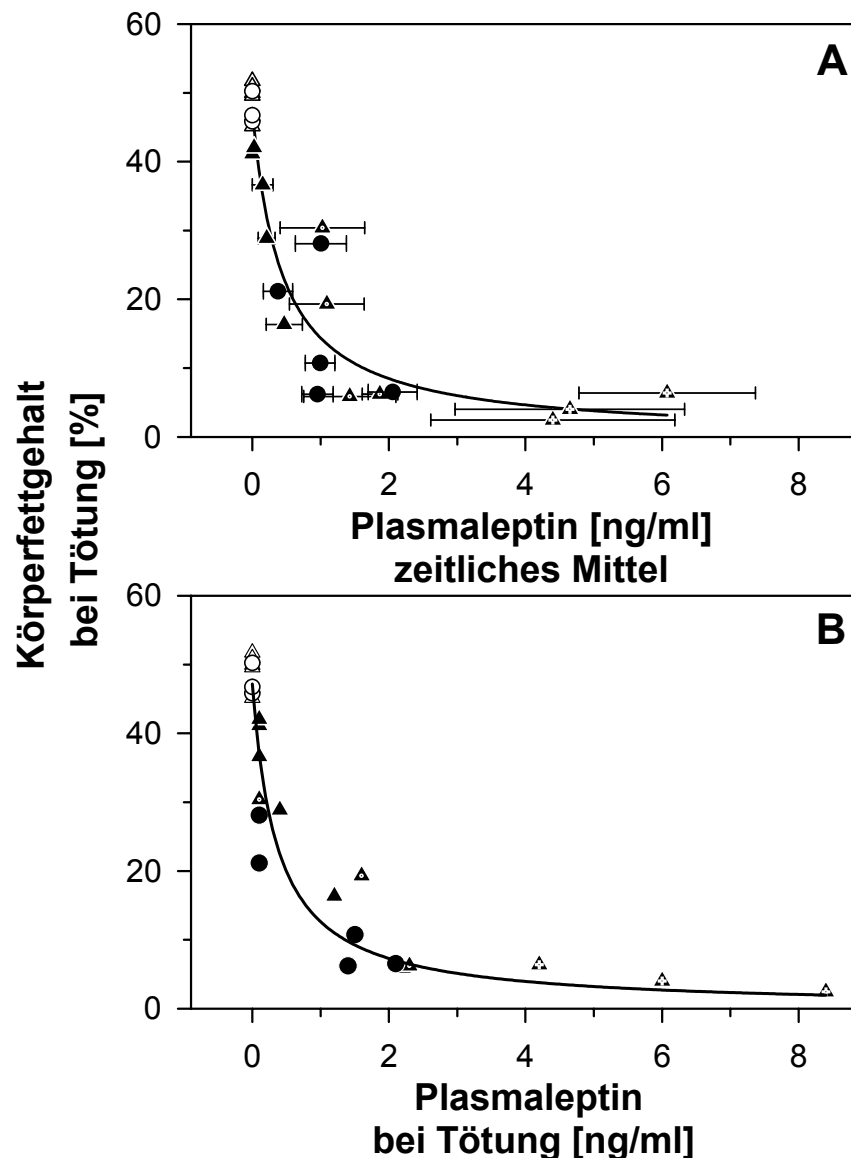


**Abb. 8:** Korrelation zwischen der Leptindosis und der gegen Ende des Behandlungszeitraums (<50 Tage) stabilisierten Körpermasse für Tiere der Versuchsgruppe A1 (Kreise, N=4), A2 (Dreiecke; N=14) und A3 (Quadrate, N=2). Die massenspezifische Leptindosis wurde auf Basis der individuellen Körpermassen zu Versuchsbeginn errechnet: A1:  $34 \pm 1$  g, A2:  $48 \pm 1$  g, A3:  $59 \pm 1$  g. Die Regression ( $r = -0,95$ ,  $P < 0,001$ ) wurde ohne Berücksichtigung eines Ausreißerwertes (grau) erstellt.

### 3.1.4 Veränderung der Körperzusammensetzung in Abhängigkeit von der Plasmaleptin-Konzentration

Wird eine genauere Untersuchung des in Abb. 8 dargestellten Zusammenhangs auf Basis des Körperfettgehalts anstelle der Körpermasse sowie des Plasmaleptinspiegels anstelle der Leptindosis durchgeführt, so ergibt sich ebenfalls ein enger Zusammenhang (Abb. 9). Dargestellt sind alle Tiere der Versuchsgruppen A1 und A2, deren Körperzusammensetzung nach mehr als 30 Tagen Leptininfusion bestimmt worden ist. Zusätzlich sind als Nullwert Körperfettgehalte von Tieren angegeben, die bereits vor Versuchsbeginn getötet worden sind. Bei einem Vergleich des Plasmaleptinspiegels zum Zeitpunkt der Tötung mit dem zeitlichen Mittel desselben – errechnet aus den Leptin-Konzentrationen des bei Pumpenwechsel retroorbital entnommenen Blutes – zeigen sich minimale Unterschiede, die aber keinen Einfluss auf die bestehende Korrelation haben. Die Kennzeichnung der verschiedenen Leptin-Dosierungen in

Versuchsgruppe A2 bestätigt, dass es grundsätzlich bei Erhöhung der Leptindosis zu einer Erhöhung der Leptin-Konzentration im Plasma kommt, interessanterweise gibt es aber auch Überschneidungen zwischen den Dosierungsgruppen und z.T. relativ große zeitliche Schwankungen der Plasmaleptin-Konzentration eines Tieres, die vor allem bei der höchsten Leptindosis aufzutreten scheinen (Abb. 9A).

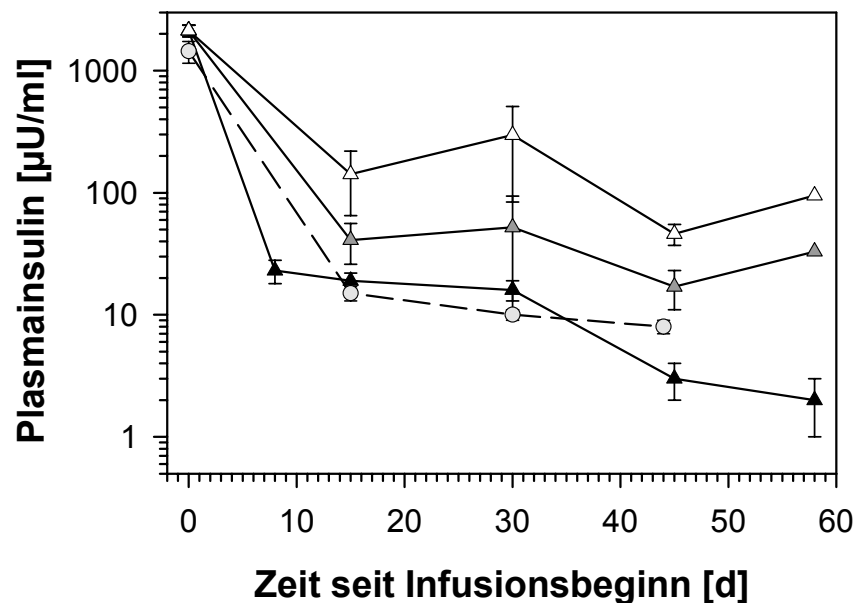


**Abb. 9:** Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt am Versuchsende und der Plasmaleptin-Konzentration von Mäusen der Versuchsgruppe A1 (Kreise, Leptindosis: 210 pmol/d) und A2 (Dreiecke, 116, Dreiecke mit Punkt, 233, Dreiecke mit Kreuz, 461 pmol/d). Gezeigt sind Daten von Tieren, die nach mehr als 30 Tagen Leptininfusion getötet wurden, d.h. deren Körpermasse sich bereits annähernd auf einem neuen Niveau stabilisiert hat (schwarz). Zusätzlich sind Werte von vor Behandlungsbeginn getöteten Tieren aus beiden Versuchsgruppen dargestellt (weiß). **A)** zeitliches Mittel ( $\pm$ SE) der Plasmaleptin-Konzentration, errechnet aus den Ergebnissen der retroorbitalen Blutentnahmen zum Zeitpunkt der Pumpenimplantationen,  $r=-0,87$ ,  $P<0,001$ ; **B)** Plasmaleptin-Konzentration zum Tötungszeitpunkt,  $r=-0,91$ ,  $P<0,001$ . Die Korrelationskoeffizienten wurden auf der Grundlage der logarithmisch konvertierten Leptinkonzentrationen ermittelt.

Ob neben dieser klaren dosisabhängigen Reduktion des Körperfettgehaltes auch die FFDM von *ob/ob*-Mäusen durch die Leptininfusion beeinflusst wird, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden. Bei den jüngeren Mäusen der Versuchsgruppe A1 kann eine Reduktion der FFDM durch die Leptinbehandlung ausgeschlossen werden. Die Tötung von 4 Kontrolltieren am Tag des Behandlungsbeginns zeigt, dass die *ob/ob*-Mäuse zu diesem Zeitpunkt bei einer durchschnittlichen Körpermasse von etwa 34 g eine FFDM von  $3,8 \pm 0,3$  g besitzen. Die Bestimmung der Körperzusammensetzung von 5 weiteren Mäusen, die am 30. bzw. 44. Infusionstag durchgeführt wurde, ergibt bei einer Körpermasse von etwa 28 g eine signifikant höhere FFDM von  $5,0 \pm 0,2$  g ( $P < 0,05$ ). Durch die Leptinbehandlung wird folglich das Wachstum der FFDM nicht blockiert. Die Körpermassenreduktion kann in diesem Fall also nur durch die Reduktion der Fettmasse infolge der Leptinwirkung erklärt werden. Bei den ausgangsmäßig deutlich schwereren *ob/ob*-Mäusen der Versuchsgruppe A2 zeigt sich allerdings ein anderes Ergebnis. Tiere, die zu Behandlungsbeginn eine FFDM von im Durchschnitt  $7,6 \pm 0,1$  g aufwiesen ( $N=6$ ), besitzen nach 59 Tagen Leptininfusion eine signifikant geringere FFDM ( $P < 0,001$ ). Dabei zeigt sich eine Dosisabhängigkeit ( $P < 0,001$ ): bei einer Leptindosis von 166 pmol/d sinkt die FFDM im Behandlungsverlauf auf  $6,8 \pm 0,2$  g, bei der mittleren Leptindosis von 233 pmol/d auf  $6,3 \pm 0,1$  g und bei der höchsten hier applizierten Dosis von 461 pmol/d schließlich auf  $5,4 \pm 0,2$  g. Dosisunabhängig beruhen etwa 6% der im Versuchsverlauf zu beobachtenden Körpermassenabnahme auf der Reduktion der FFDM, ca. 80% auf einer Reduktion der Körperfettmasse.

Unabhängig von der Richtung der Veränderung fallen Unterschiede in der FFDM neben der vergleichsweise großen Reduktion der Körperfettmasse energetisch kaum ins Gewicht: Bei Versuchsgruppe A1 ergibt sich aufgrund der Fettmassenreduktion von  $13,2 \pm 0,7$  g auf  $3,7 \pm 1,4$  g ( $P < 0,001$ ) abzüglich des FFDM-Wachstums ein Netto-Energieverlust von etwa 340 kJ. Bei den *ob/ob*-Mäusen der Versuchsgruppe A2 werden die ausgangsmäßig vorhandenen  $26,8 \pm 1,4$  g Fett dosisabhängig ( $P < 0,001$ ) auf  $13,7 \pm 3,1$ ,  $5,8 \pm 2,6$  und  $0,9 \pm 0,3$  g reduziert, was inklusive der Veränderung der FFDM einem Netto-Energieverlust von etwa 510, 820 bzw. 1030 kJ entspricht. Eine genaue Energiebilanz war bei der Versuchsgruppe A2 aufgrund der fehlenden Sauerstoffmessung nicht möglich, bei A1 wurde zwar die Sauerstoffmessung durchgeführt, die Tiere aber nicht in der Endphase der Leptinbehandlung getötet.

### 3.1.5 Auswirkungen der Leptin-Infusion auf die Plasmainsulin-Konzentration

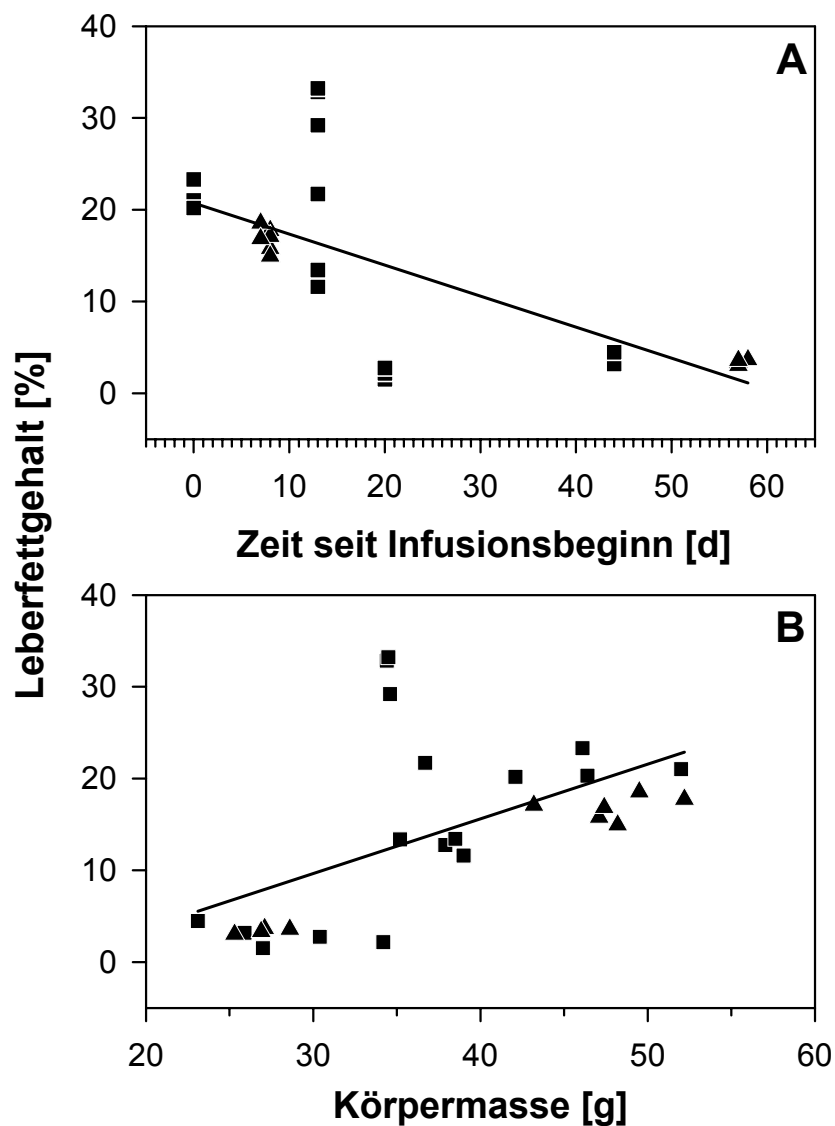


**Abb. 10:** Verlauf der in logarithmischem Maßstab dargestellten Plasmainsulin-Konzentration vor Versuchsbeginn und während der Behandlungsphase von Mäusen der Versuchsgruppe A2 (Dreiecke, —). Über subkutane osmotische Mini-Pumpen wurde Leptin in drei verschiedenen Dosen infundiert: 116 pmol/d (weiß); 233 pmol/d (grau); 461 pmol/d (schwarz). Gezeigt sind Mittelwerte ( $\pm$ SE) von 3-9 Tieren. Mittelwerte ohne SE beruhen auf einem N=2. Zum Vergleich sind Mittelwerte ( $\pm$ SE) von 4-9 Tieren aus Versuchsgruppe A1 (Kreise, - - -) bei Infusion von 210 pmol/d Leptin dargestellt.

Um zu überprüfen, ob und in welchem Zeitrahmen sich bei dem beobachteten Rückgang der Adipositas auch der Plasmainsulinspiegel der *ob/ob*-Mäuse ändert, wurde bei Mäusen der Versuchsgruppen A1 und A2, bei denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Leptininfusion retroorbital Blut entnommen wurde, die Plasmainsulin-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 10 dargestellt. Bereits 8 bzw. 15 Tage nach Beginn der Leptinbehandlung zeigt sich bei allen behandelten Tieren eine drastische Reduktion der Plasmainsulin-Konzentration um den Faktor 10 bis 100 ( $P < 0,01$ ). Dabei lässt sich eine klare Dosisabhängigkeit erkennen, bei der allerdings auch der Ausgangswert eine Rolle zu spielen scheint. So konnte der Insulinspiegel bei einer Infusion von 210 pmol/d Leptin bei den *ob/ob*-Mäusen der Versuchsgruppe A1 innerhalb der ersten 2 Behandlungswochen auf nur 1% der vor Behandlungsbeginn gemessenen  $1442 \pm 292$   $\mu$ U/ml ( $N=4$ ) reduziert werden. Bei den Mäusen der Versuchsgruppe A2 liegen bei einem Ausgangswert von  $2129 \pm 233$   $\mu$ U/ml ( $N=9$ ) die vergleichbaren Werte bei steigender Dosis bei 6,7, 1,9 und 0,9%. Obwohl die Körpermasse weiterhin stark reduziert wird (siehe Abb. 3 und 6),

verändert sich der Insulinspiegel zwischen dem 15. und 30. Infusionstag bei allen Dosisgruppen nur noch geringfügig. Dann aber kommt es – zumindest innerhalb der Versuchsgruppe A2 – bei bestehender Dosisabhängigkeit zu einer weiteren Absenkung zwischen dem 30. und 45. Behandlungstag, wobei aber nur bei der hohen Dosis das Signifikanzniveau erreicht wird ( $P < 0,001$ ). Dies ist besonders interessant im Zusammenhang mit dem Befund, dass die Körpermasse in dieser Phase bereits ihren Endwert erreicht hat und zusätzlich die Futteraufnahme wieder auf einen höheren Wert angestiegen ist.

### 3.1.6 Veränderung des Leberfettgehaltes im Zuge der Körpermassenabnahme



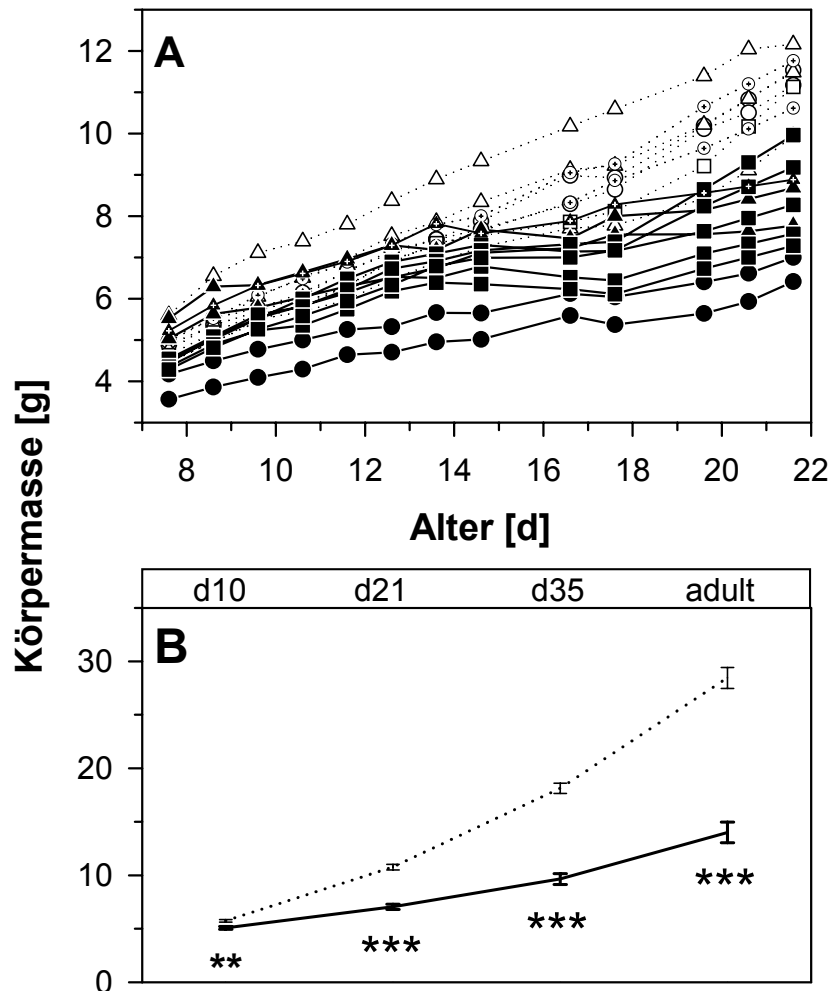
**Abb. 11:** Prozentualer Leberfettgehalt in Abhängigkeit von der Infusionsdauer (A) bzw. der Körpermasse zum Tötungszeitpunkt (B) von Mäusen der Versuchsgruppe A2 (Dreiecke, Leptindosis: 461 pmol/d) und A3 (Quadrate, 376 pmol/d). A)  $r = -0,68$ ,  $P < 0,001$ , B)  $r = 0,56$ ,  $P < 0,01$ .

Von Mäusen der Versuchsgruppe A2 und A3 wurde der Leberfettgehalt zu verschiedenen Zeitpunkten der Leptininfusion bestimmt. Abb. 11 zeigt, dass der prozentuale Fettanteil in der Leber grundsätzlich mit der Länge der Leptininfusion (Abb. 11A) bzw. mit der damit einhergehenden zunehmenden Verringerung der Körpermasse (Abb. 11B) sinkt. Dabei wird aber offensichtlich ein Minimalwert von  $3,1 \pm 0,3\%$  nicht unterschritten, der bei einer Körpermasse von etwa 33 g erreicht wird (Abb. 11B). Ob es während des Infusionszeitraumes tatsächlich zu einem vorübergehenden Anstieg des Leberfettgehaltes kommt, lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten weder verneinen noch bestätigen. 3 von 8 Tieren der Versuchsgruppe A2, die am 13. Behandlungstag – also einen Zeitpunkt an dem die Körpermassenreduktion noch stark voranschreitet – getötet worden sind, weichen in beiden Abbildungsteilen aufgrund eines zu diesem Zeitpunkt überhöhten Leberfettgehaltes von der Regression ab.

## **3.2 VERSUCHSSERIE B: AUSWIRKUNG EINES ZENTRALEN GLUKOKORTIKOID-REZEPTOR-DEFEKTS BEI MÄUSEN**

### **3.2.1 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Körpermasse und Körperzusammensetzung im Entwicklungsverlauf**

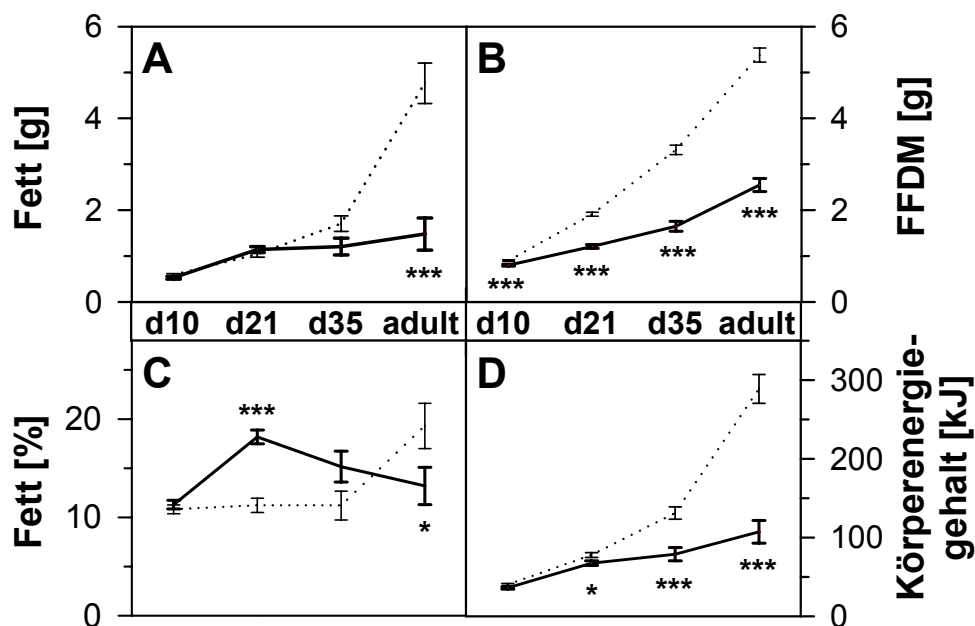
Um den Beginn der Wachstumshemmung infolge des zentralen GR-Defektes zu untersuchen, wurden die Wachstumskurven von GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen aus 3 Würfen während der Säuglingsphase miteinander verglichen (Abb. 12A). Bereits zu Beginn der zweiten Lebenswoche fallen die Mutanten, unabhängig vom Geschlecht, in ihrem Körpermassenwachstum zurück. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist auf dieser Datenbasis ab dem 10. Lebenstag zu verzeichnen (Abb. 12B), wobei das Signifikanzniveau durch Erhöhung der N-Zahl bereits in einem früheren Alter erreicht werden kann (Kellendonk et al., 2002). Die Körpermasse von adulten (>4 Monate) GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen beträgt schließlich nur noch 50% der Körpermasse von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen ( $14 \pm 1$  g vs.  $28 \pm 1$  g, Abb. 12B).



**Abb. 12:** *A*) Individuelle Körpermassenverläufe von  $GR^{NesCre-}$  (schwarz) und Wildtyp-Mäusen (weiß) der Würfe E (Kreise), H (Dreiecke) und J (Quadrate) während der 2. und 3. Lebenswoche. Weibchen sind durch + gekennzeichnet. *B*) Gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die Körpermasse von  $GR^{NesCre-}$  (—) und Wildtyp-Mäusen (·····) im Alter von 10, 21 und 35 Tagen und im adulten Zustand.  $N$  (mut/wt): 15/17 (d10), 20/18 (d21), 8/11 (d35), 22/18 (adult). \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Als Ursache für die reduzierte Körpermasse ist in erster Linie ein vermindertes Längenwachstum anzusehen (Kellendonk et al., 2002), was bei der Untersuchung der Körperzusammensetzung in einer reduzierten FFDM zum Ausdruck kommt (Abb. 13B). Nachdem die FFDM bei 10 Tage alten  $GR^{NesCre-}$ -Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern bereits um 11% reduziert ist, weisen adulte Mutanten nur noch 50% der bei den Wildtypen zu verzeichnenden FFDM auf. Während die Wachstumshemmung der fettfreien Masse bereits in der 1. Lebenswoche beginnt und progressiv ist, trifft dies für die Entwicklung der Fettmasse allerdings nicht zu (Abb. 13A). Während der Säuglingsphase zeigen die Mutanten eine normale Fettdeposition, erst nach dem Absetzen beginnt die Zunahme der Fettmasse hinter

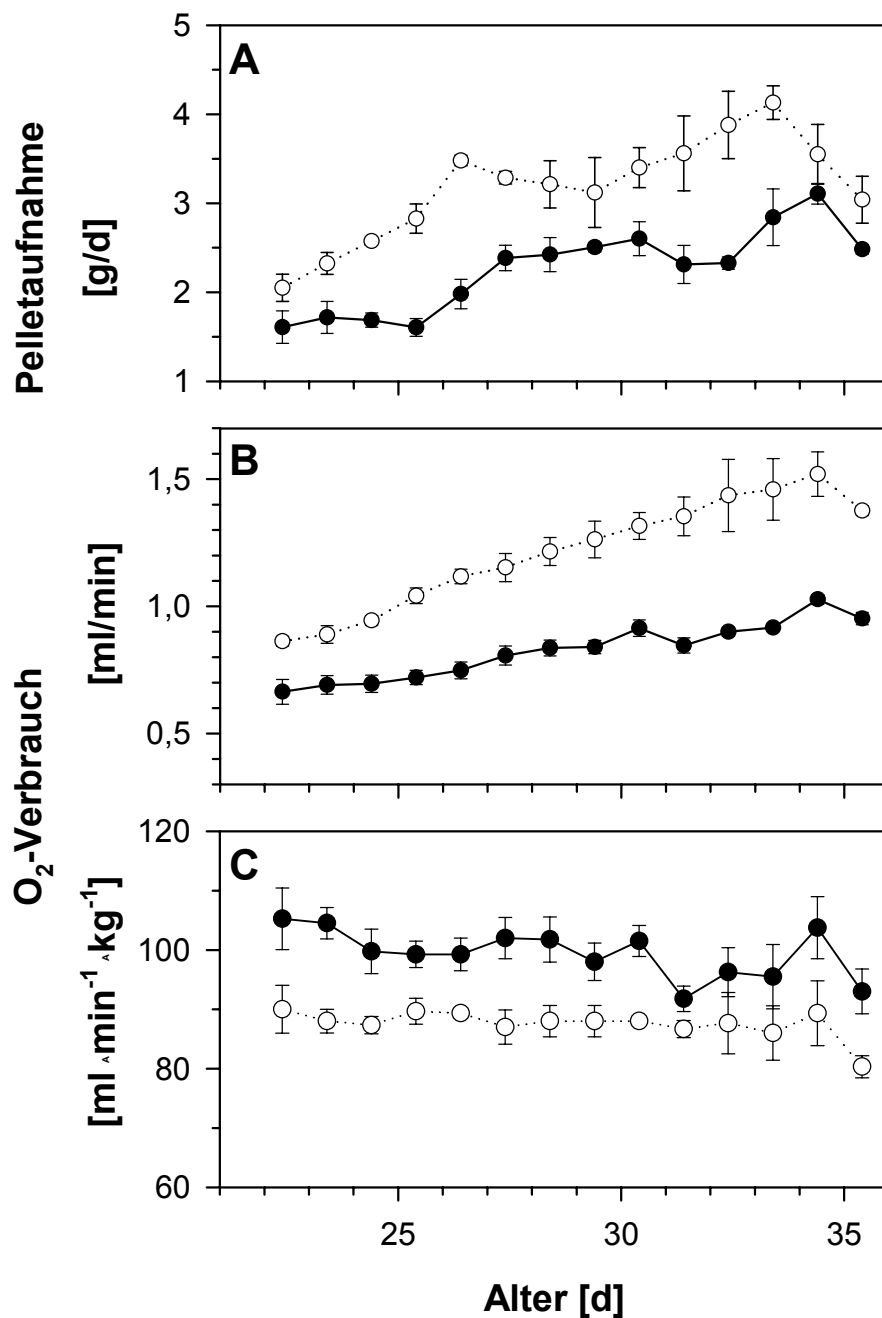
die der Wildtyp-Mäuse zurückzufallen. Neben diesem zeitlichen Unterschied zeigt sich zusätzlich ein quantitativer Unterschied in der Beeinträchtigung beider Parameter. Während die FFDM stetig aber im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren langsamer anwächst, ist die Fettdeposition zunächst unbeeinträchtigt. Nach dem Absetzen wird sie dann aber fast vollständig unterdrückt, so dass zwischen der Fettmasse von 21 Tage alten und adulten  $GR^{NesCre}$ -Mäusen kein statistisch signifikanter Unterschied besteht ( $P < 0,05$ ). Aufgrund der Beeinträchtigung der Fettdeposition vorausgehenden Reduktion des FFDM-Wachstums kommt es zwischenzeitlich zu einem vorübergehenden Anstieg des prozentualen Fettgehalts (Abb. 13C). Erst im adulten Zustand sind die  $GR^{NesCre}$ -Mäuse sowohl kleiner als auch magerer als gleichaltrige Wildtyp-Mäuse. Unabhängig von der Veränderung der Körperzusammensetzung im Entwicklungsverlauf deponieren  $GR^{NesCre}$ -Mäuse in ihrem Körper von Geburt an weniger Energie als Wildtyp-Mäuse, so dass adulte Mutanten nur 46% des Körperenergiegehaltes von Wildtyp-Mäusen besitzen (Abb. 13D).



**Abb. 13:** Gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für Körperfettmasse (A), fettfreie Trockenmasse (FFDM, B), prozentualen Körperfettgehalt (C) und Körperenergiegehalt (D) von  $GR^{NesCre}$ - (—) und Wildtyp-Mäusen (·····) im Alter von 10, 21 und 35 Tagen und im adulten Zustand. Der Körperenergiegehalt basiert auf einem Energie-Äquivalent von 38 kJ/g Fett und 20 kJ/g FFDM. N (mut/wt): 15/17 (d10), 20/18 (d21), 8/11 (d35), 22/18 (adult). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .



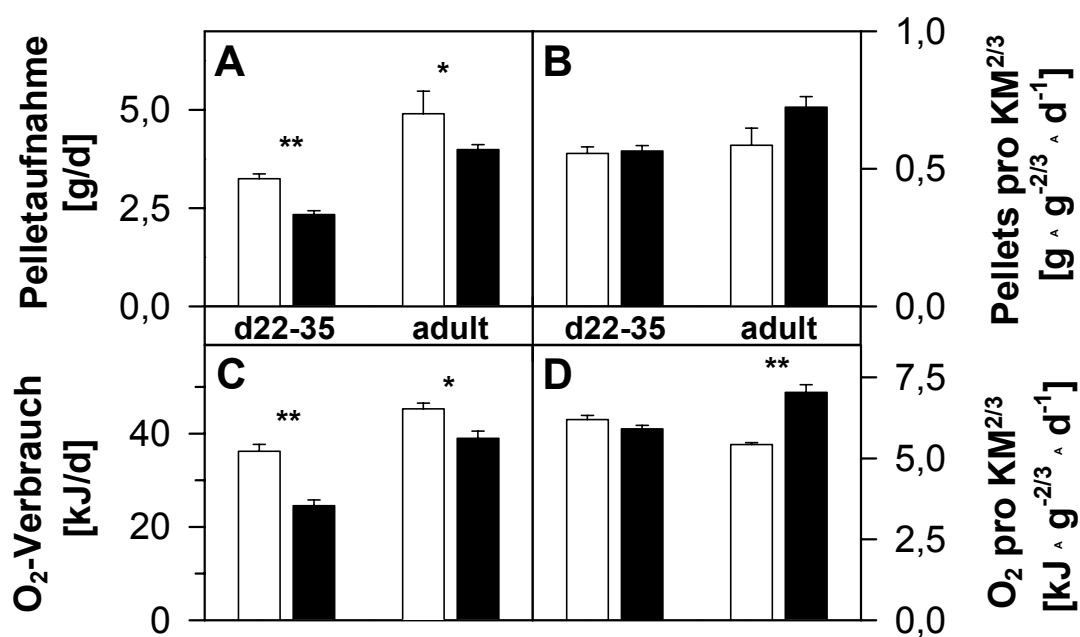
### 3.2.2 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf Futteraufnahme und Stoffwechsel im Entwicklungsverlauf



**Abb. 14:** Verlaufskurven für Futteraufnahme (A), Sauerstoffverbrauch (B) und massenspezifischen Sauerstoffverbrauch (C) von  $GR^{NesCre}$ -Mäusen (schwarz) und ihren Wildtyp-Geschwistern (weiß) aus Wurf K während der 4. und 5. Lebenswoche. Gezeigt sind 24-Stunden-Mittelwerte ( $\pm SE$ ) über 4 bzw. 3 Tiere (mut/wt). Das Geschlecht der Tiere wurde bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt.

Ob sich der Unterschied in der Energiedeposition zwischen  $GR^{NesCre}$ - und Wildtyp-Mäusen aufgrund einer geringeren Energieaufnahme und/oder eines gesteigerten Energieverbrauchs

ergibt, sollten die vergleichenden Bestimmungen von Sauerstoffverbrauch und Futteraufnahme zeigen. In Abb. 14 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen an  $GR^{NesCre}$ - und Wildtyp-Mäusen während der 4. und 5. Lebenswoche, also im Zeitraum unmittelbar nach dem Absetzen der Tiere, dargestellt. Die Mutanten zeigen bereits im Alter von 21 Tagen sowohl eine verringerte Futteraufnahme als auch eine reduzierte Stoffwechselrate (Abb. 14A und B), wobei sich der Unterschied zwischen den Genotypen im Sauerstoffverbrauch mit zunehmendem Alter durch den langsameren Anstieg bei den Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen vergrößert. Es ist folglich davon auszugehen, dass die beobachteten Unterschiede in beiden Parametern bereits in der Säugephase ihren Anfang nehmen. Zum Vergleich ist in Abb. 14C der massenspezifische Sauerstoffverbrauch dargestellt. Im Gegensatz zum Sauerstoffverbrauch pro Gesamttier zeigt sich dabei ein inverses Bild: die Werte für die Mutanten liegen durchgehend über denen der Wildtyp-Mäuse.



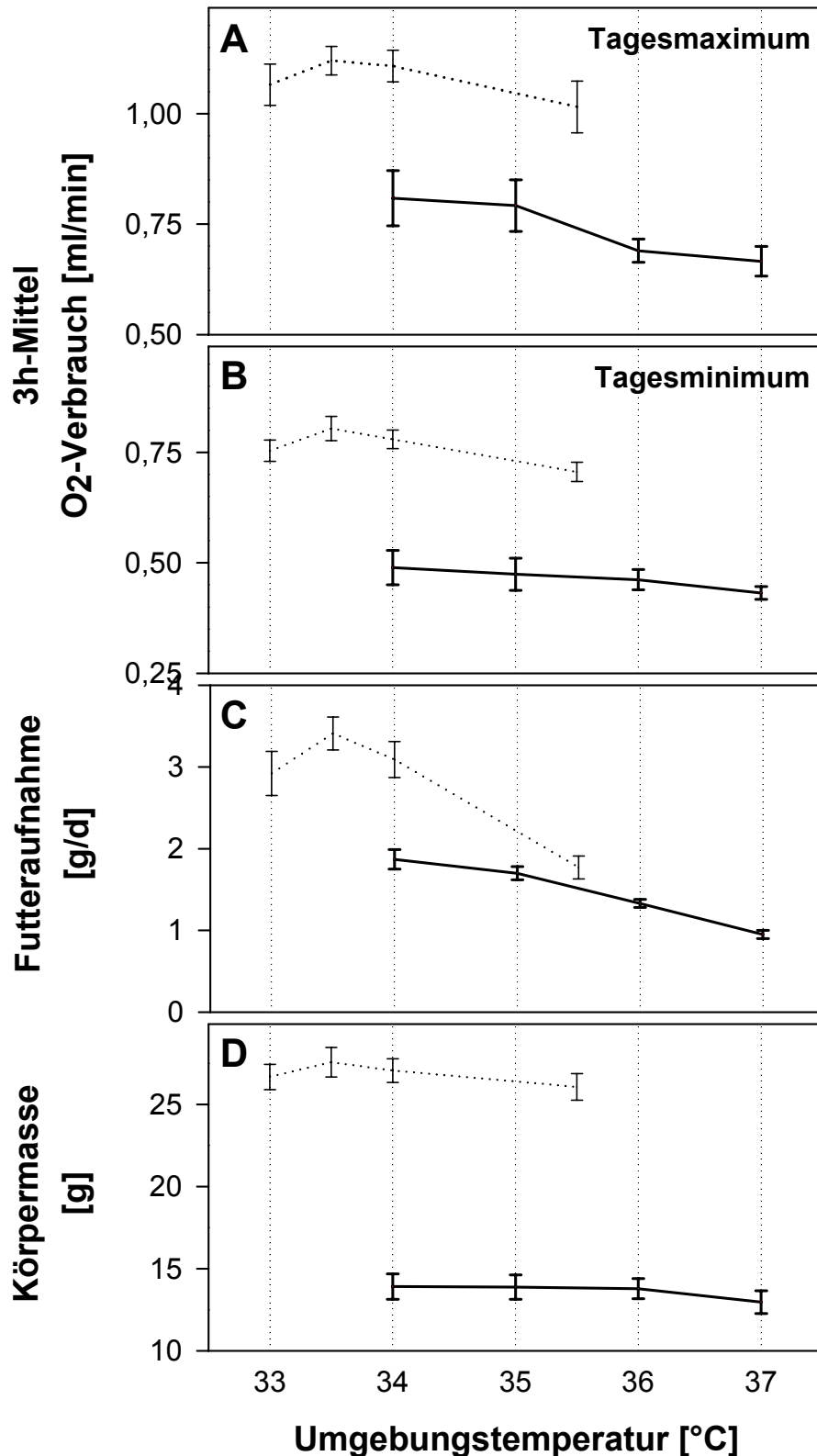
**Abb. 15:** Vergleich von Futteraufnahme und Sauerstoffverbrauch von  $GR^{NesCre}$ - (schwarz) und Wildtyp-Mäusen (weiß). Gezeigt sind gewichtete Mittelwerte ( $\pm SE$ ) für 22-35 Tage alte Mäuse (Wurf K; N (mut/wt): 4/3) sowie arithmetische Mittelwerte über einen 10-tägigen Versuchszeitraum bei adulten Mäusen (Gruppe I; N: 3/3). **A)** Futteraufnahme; **B)** Futteraufnahme pro Körpermasse ( $KM^{2/3}$ ); **C)**  $O_2$ -Verbrauch; **D)**  $O_2$ -Verbrauch pro Körpermasse ( $KM^{2/3}$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

Über den gesamten Versuchszeitraum ergibt sich sowohl für Futteraufnahme wie Sauerstoffverbrauch der Absetzlinge eine signifikante 30%ige Reduktion infolge des zentralen GR-Defekts (Abb. 15A und C). Durch den Vergleich der mit Hilfe der Populationsdaten für die

Körperzusammensetzung (siehe Abb. 13) und der individuellen Körpermasse der Absetzlinge ermittelten Körperzusammensetzung zu Beginn des Versuches mit der Körperzusammensetzung am Versuchsende, konnte unter Berücksichtigung des individuellen Sauerstoffverbrauchs die in dem Versuchszeitraum insgesamt metabolisierte und die dabei deponierte Energie errechnet werden. Die Mutanten metabolisieren dabei etwa 30% und deponieren etwa 50% weniger Energie im Vergleich zu den Wildtypen ( $350 \pm 16$  kJ vs.  $530 \pm 18$  kJ,  $P < 0.001$ ;  $30 \pm 7$  kJ vs.  $58 \pm 8$  kJ,  $P < 0.05$ ). Das Verhältnis von deponierter zu verbrauchter Energie ist somit bei GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen tendenziell ungünstiger als bei Wildtyp-Mäusen, da ihre Energieausnutzung, sprich der Anteil von deponierter an insgesamt metabolisierter Energie, um 25% herabgesetzt ist ( $8.3 \pm 1.5\%$  vs.  $11.0 \pm 1.5\%$ ,  $P = 0.27$ ). Ein Grund für diesen Effekt könnte eine gesteigerte Thermogenese der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse bei der üblichen Haltungstemperatur von 22°C im Vergleich zu den größeren Wildtyp-Mäusen sein, die auf einem ungünstigeren Oberflächen-Volumen-Verhältnis der deutlich kleineren Mutanten beruht. Der Unterschied in Futterraufnahme und O<sub>2</sub>-Verbrauch lässt sich in der Tat eliminieren, wenn diese beiden Parameter nicht absolut sondern in Relation zur entsprechenden Körpermasse<sup>2/3</sup> betrachtet werden (Abb. 15B und D).

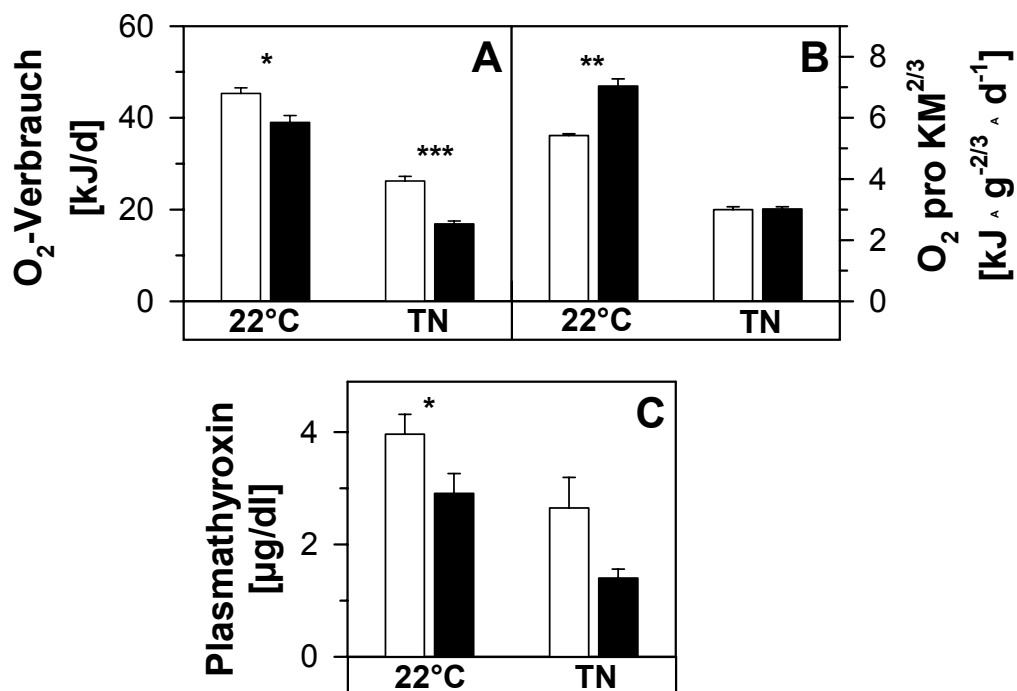
Ein Vergleich mit adulten Tieren zeigt, dass die Situation hinsichtlich der absoluten Werte von Futterraufnahme und Sauerstoffverbrauch identisch ist (Abb. 15A und C), wobei die prozentuale Abnahme beider Parameter gegenüber den Werten der Wildtypen aufgrund der grundsätzlich erhöhten Ausgangswerte geringer ist (19 bzw. 14%). Bei der Berücksichtigung des Volumen-Oberflächen-Verhältnisses ergeben sich aber – im Falle des Sauerstoffverbrauchs sogar signifikant – erhöhte Werte für die Mutanten (Abb. 15B und D).

Die bisher beschriebenen Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurden bei der üblichen Haltungstemperatur von 22°C durchgeführt, was einer moderaten Kältebelastung für Mäuse entspricht. Um Unterschiede in der Thermoregulation als einflussnehmenden Faktor auf den Sauerstoffverbrauch ausschließen zu können, wurde in einem zweiten Versuch durch graduelle Erhöhung der Umgebungstemperatur die Thermoneutralzone von adulten GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen bestimmt (Abb. 16). Aufgrund der vorliegenden Daten wurde im Falle der Wildtyp-Mäuse eine Thermoneutraltemperatur von 34°C angenommen. Obwohl der Sauerstoffverbrauch sowohl im Tagesmaximum wie im Tagesminimum bei Überschreitung von 34°C weiterhin sank, wurde als ausschlaggebender Parameter bei der Bestimmung des oberen Grenzbereiches der Thermoneutralzone die Futterraufnahme gewertet, die sich bei einem Temperaturanstieg über 34°C sprunghaft um nahezu 40% verringerte.



**Abb. 16:** Mittelwerte ( $\pm$ SE) für Sauerstoffverbrauch (**A**, **B**), Futteraufnahme (**C**) und Körpermasse (**D**) von adulten GR<sup>NesCre</sup>- (—) und Wildtyp-Mäusen (·····) der Gruppe I (N (mut/wt): 3/3) in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur. In den Abb. **A-C** wurden für jede Temperatur die Daten von mindestens 4 Versuchstagen gemittelt, die Werte der Körpermasse beziehen sich auf das Ende jeder Temperaturstufe (**D**). Für den O<sub>2</sub>-Verbrauch ist das Tagesminimum (**A**) bzw. -maximum (**B**) auf der Basis eines 3-Stunden-Mittelwertes angegeben.

Da dieser Abfall zudem mit einer Reduktion der Körpermasse einherging (Abb. 16C und D), wurde dies trotz des weiter geringfügig sinkenden Sauerstoffverbrauchs als Zeichen für einsetzenden Hitzestress gewertet. Bei den  $GR^{NesCre}$ -Mäusen wurde dagegen eine Thermo-neutraltemperatur von  $36^{\circ}\text{C}$  angenommen, da es erst bei Überschreiten dieses Grenzwertes zu einer Abnahme der Körpermasse kam (Abb. 16D). Die so festgelegten Umgebungstemperaturen erlaubten die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs bei minimalem Energieverbrauch für thermoregulatorische Reaktionen ohne Anzeichen von Hitzestress.



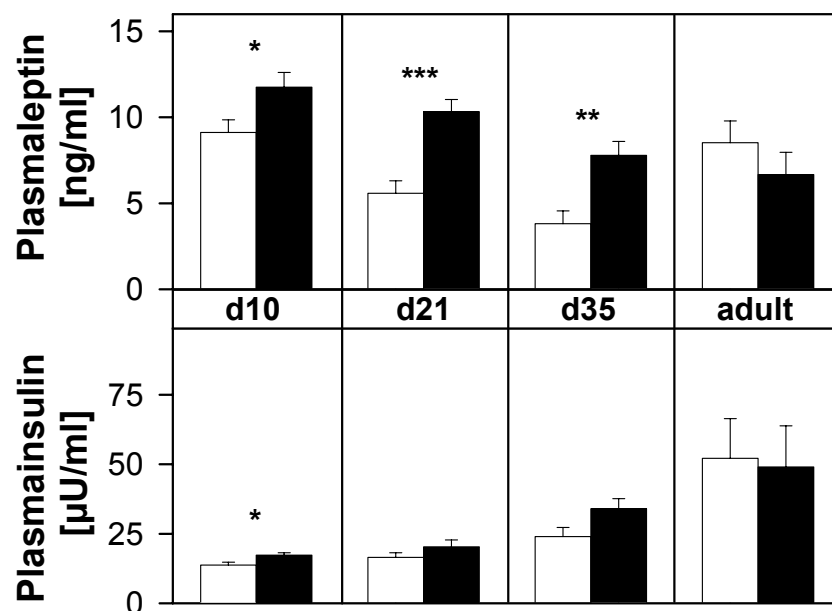
**Abb. 17:** Gewichtete Mittelwerte ( $\pm\text{SE}$ ) für Sauerstoffverbrauch und Plasmathyroxin-Konzentration von  $GR^{NesCre}$ - (schwarz) und Wildtyp-Mäusen (weiß) aller drei adulten Gruppen (I-III) bei Kältebelastung ( $22^{\circ}\text{C}$ , 10 d) und unter thermoneutralen Bedingungen (TN, 4 d). **A)**  $\text{O}_2$ -Verbrauch pro Gesamttier, N (mut/wt): 3/3 ( $22^{\circ}\text{C}$ ), 10/10 (TN); **B)**  $\text{O}_2$ -Verbrauch pro Körpermasse  $(\text{KM})^{2/3}$ , N: 3/3 ( $22^{\circ}\text{C}$ ), 10/10 (TN); **C)** Plasmathyroxin-Konzentration, N: 26/26 ( $22^{\circ}\text{C}$ ), 5/10 (TN). Bei  $22^{\circ}\text{C}$  wurden von F. Tronche (DKFZ, Heidelberg, BRD) erhobene Daten mit ausgewertet. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Die Auswertung der Sauerstoffmessungen unter für beide Genotypen thermoneutralen Bedingungen zeigt, dass das Tagesmittel des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs in beiden Fällen (definitions-gemäß) niedriger ist als bei  $22^{\circ}\text{C}$ , wobei aber der Unterschied zwischen den Genotypen bestehen bleibt (Abb. 17A). Bei Berücksichtigung des Volumen-Oberflächen-Verhältnisses kann dieser Unterschied jedoch – im Gegensatz zu den Ergebnissen bei  $22^{\circ}\text{C}$  – vollständig eliminiert werden (Abb. 17B). Neben der geringeren Größe und des daher ungünstigeren Volumen-Oberflächen-Verhältnisses scheint die geringere Felldichte der Mutanten (siehe

2.2.1.1), die vor allem bei adulten Mäusen offensichtlich wird, bei 22°C zusätzlich eine gesteigerte Thermogenese notwendig zu machen, da die geringere Fellisolation einen höheren Wärmeverlust pro Flächeneinheit bedingt. Ein veränderter Basalstoffwechsel infolge des zentralen GR-Defektes scheint aufgrund dieser Messungen eher unwahrscheinlich.

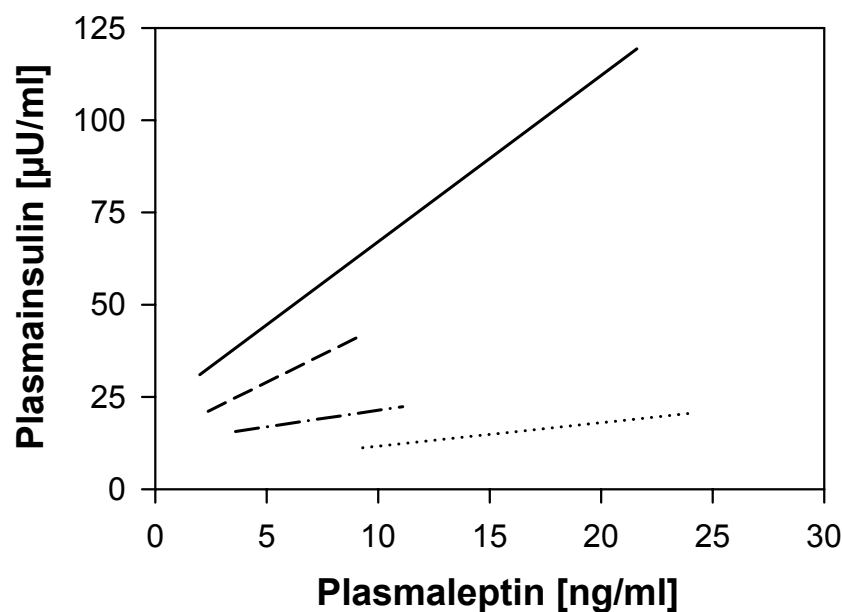
Um weitere Aufschlüsse über die thermoregulatorischen Fähigkeiten der Mäuse zu erhalten, wurde bei adulten Tieren die Plasmakonzentration an Thyroxin ( $T_4$ ) bei moderater Kältebelastung (22°C) und unter thermoneutralen Bedingungen bestimmt. Als Vorläufer des Trijodthyroxins ( $T_3$ ) ist  $T_4$  bei der metabolischen Kälteabwehr essentiell. Dass sowohl bei den Wildtypen als auch bei den Mutanten der  $T_4$ -Spiegel bei 22°C gegenüber der Messung bei thermoneutralen Bedingungen erhöht ist (Abb. 17C), spricht für eine in beiden Fällen normale Antwort der Schilddrüse auf Kältestimulation. Die generell niedrigeren  $T_4$ -Spiegel bei den Mutanten könnten den Einfluss der erhöhten Glukokortikoid-Konzentrationen auf die Hypophysen-Schilddrüsen-Achse widerspiegeln (Re et al., 1976).

### 3.2.3 Einfluss des zentralen GR-Defekts auf die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf



**Abb. 18:** Gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die Plasmaleptin- (**oben**) und Plasmainsulin-Konzentrationen (**unten**) von  $GR^{NesCre}$ - (schwarz) und Wildtyp-Mäusen (weiß) im Alter von 10, 21 und 35 Tagen und im adulten Zustand. N (mut/wt): 13/18 + 8/6 (d10), 19/17 + 10/17 (d21), 8/11 + 7/11 (d35), 11/12 + 10/12 (adult). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

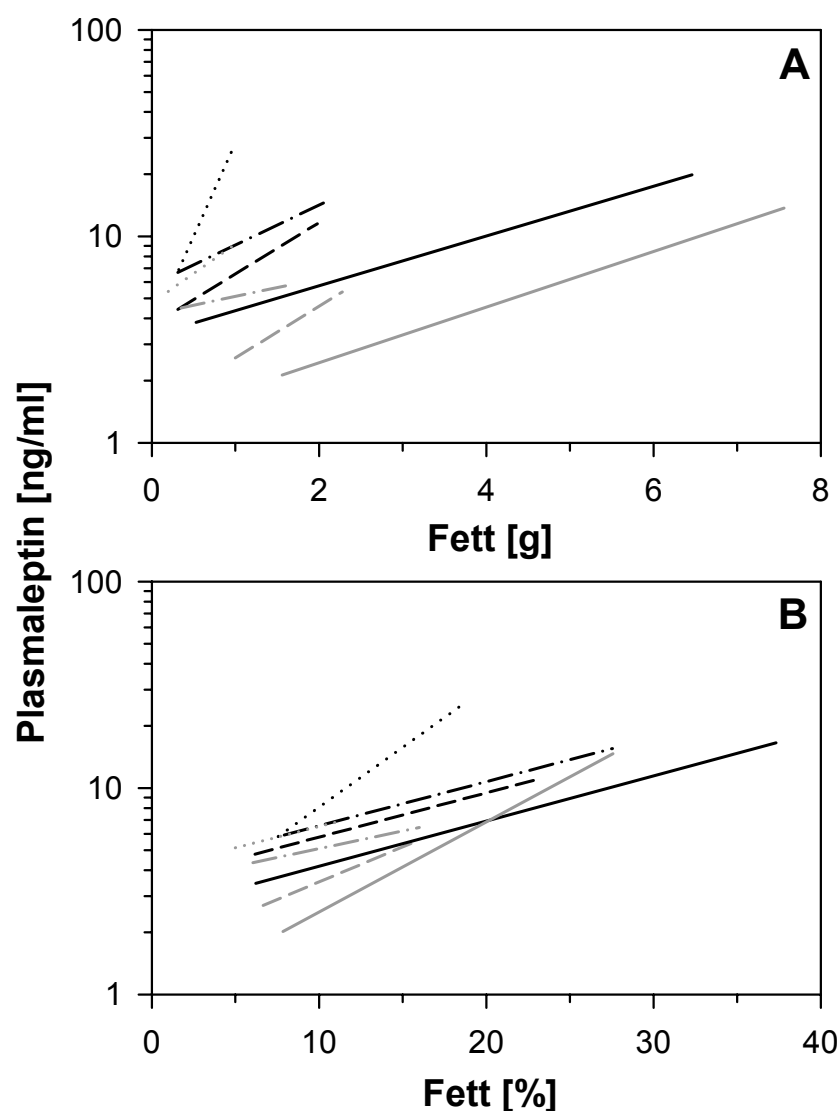
Neben der Körperzusammensetzung wurden im Entwicklungsverlauf parallel die Plasmakonzentrationen an Leptin und Insulin bei GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen verschiedener Altersstufen bestimmt. Bei Betrachtung der Wildtypen fällt zunächst die gegenläufige Entwicklung der beiden Hormonkonzentrationen während der ersten 5 Lebenswochen auf (Abb. 18A und B): während der Plasmaleptinspiegel langsam sinkt, kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Plasmainsulin-Konzentration, wobei sich diese Entwicklung – im Gegensatz zu der Situation beim Leptin – auch im adulten Alter fortsetzt. Im Vergleich zu den Wildtypen zeigen die Mutanten während der ersten 5 Lebenswochen einen signifikant erhöhten Plasmaleptinspiegel. Hinsichtlich des Insulins ist die gleiche Tendenz zu beobachten, allerdings wird nur bei dem Vergleich von 10 Tage alten GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen das Signifikanzniveau erreicht. Im Gegensatz zu den Jungtieren ist bei adulten Mäusen allerdings kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Genotypen nachzuweisen, wobei aber zumindest für Leptin der Mittelwert der Mutanten klar unter dem der Wildtypen liegt.



**Abb. 19:** Korrelation zwischen dem Plasmainsulin- und Plasmaleptinspiegel. Dargestellt sind Regressionen für 10 (.....,  $r=0,69$ ,  $P<0,01$ ), 21 (-·-·-,  $r=0,39$ ,  $P<0,05$ ) und 35 Tage alte (- - -,  $r=0,50$ ,  $P<0,05$ ) sowie adulte (—,  $r=0,54$ ,  $P<0,01$ ) Mäuse. Da nur im Alter von 10 Tagen ein minimaler Genotyp-Unterschied besteht, sind die beiden Genotypen jeweils in einer Regression zusammengefasst.  $N$  (mut/wt): 8/6 (d10), 9/17 (d21), 7/11 (d35), 10/12 (adult).

In Abb. 19 wurden die Plasmakonzentrationen von Leptin und Insulin gegeneinander aufgetragen. Da sich nur bei den 10 Tage alten Tieren die Regressionen für GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen signifikant im y-Achsenabschnitt unterschieden ( $P<0,05$ , nicht gezeigt), wurden in den verschiedenen Altersgruppen jeweils beide Genotypen in einer Regression

zusammengefasst, wobei der jeweilige Korrelationskoeffizient signifikant von Null verschieden ist ( $P < 0,05$ ). Das Verhältnis zwischen den beiden Hormonen scheint also weitgehend genotypunabhängig zu sein. Es zeigt sich allerdings eine Altersabhängigkeit. Die Regression für die 21 Tage alten Tiere ist im Vergleich zu den 10 Tage alten Mäusen signifikant zu höheren Insulin-Werten hin verschoben ( $P < 0,01$ ). Bei dem Vergleich von 21 und 35 Tage alten Tieren ist dies ebenfalls der Fall ( $P < 0,001$ ). Auch wenn sich die Regressionen für 35 Tage alte und adulte Mäuse statistisch nicht voneinander unterscheiden ( $P > 0,05$ ), scheint die allgemeine Tendenz zu bestehen, dass mit zunehmendem Alter der Wert für das Insulin:Leptin-Verhältnis steigt.

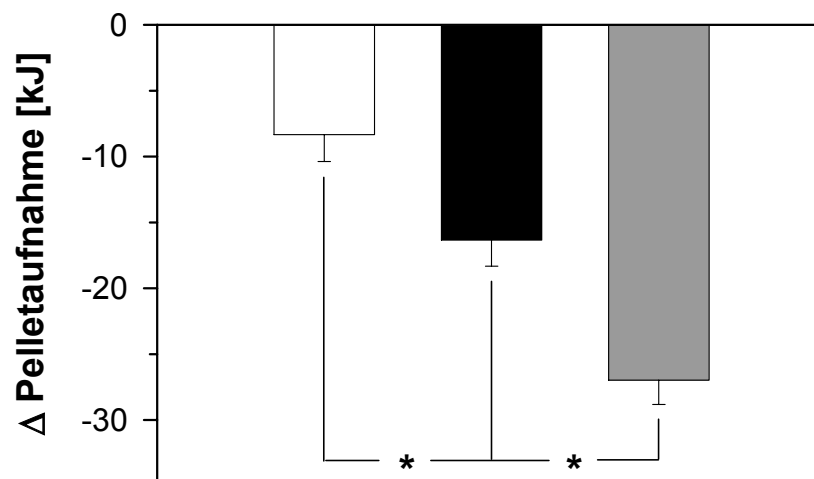


**Abb. 20:** Plasmaleptin-Konzentrationen als Funktion der Körperfettmasse (A) bzw. des prozentualen Körperfettgehalts (B). Gezeigt sind in semi-logarithmischer Darstellung Regressionen für 10 (.....,  $0,29 < r < 0,77$ ), 21 (— · — ·,  $0,32 < r < 0,80$ ) und 35 Tage alte (----,  $0,72 < r < 0,83$ ) sowie adulte (—,  $0,78 < r < 0,90$ )  $GR^{NesCre}$ - (schwarz) und Wildtyp-Mäuse (grau). N (mut/wt): 15/16 (d10), 20/18 (d21), 8/11 (d35), 12/12 (adult). Außer bei den 10 und 21 Tage alten Wildtypen unterscheiden sich alle Regressionen signifikant von Null.



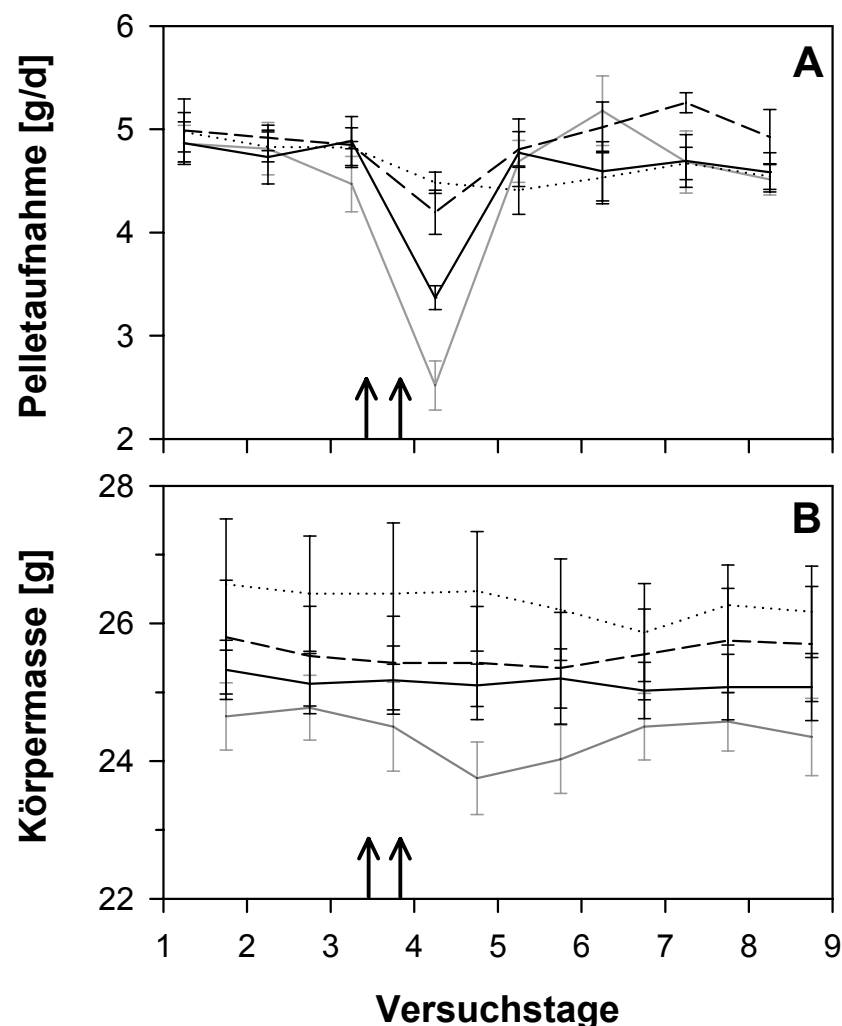
Da der Plasmaleptinspiegel üblicherweise sehr stark mit dem Fettgehalt der Tiere korreliert, wurden diese beiden Variablen für die unterschiedlichen Altersgruppen und Genotypen gegeneinander aufgetragen, wobei für Leptin eine logarithmische Skala gewählt wurde (Abb. 20). Da zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt ist, ob der Plasmaleptinspiegel enger mit der Gesamtkörperfettmasse oder mit dem prozentualen Fettgehalt zusammenhängt, wurde die Plasmaleptin-Konzentration in Bezug zu beiden Größen gesetzt. Prinzipiell zeigt sich auch hier in beiden Fällen eine Altersabhängigkeit, da die Steigungen der Regressionsgeraden – unabhängig vom Genotyp der Tiere – mit zunehmendem Alter sinken. Bei einem Vergleich der Genotypen innerhalb jeder Altersstufe ergibt sich eine Parallelverschiebung der Regressionen mit einem jeweils signifikanten Unterschied im y-Achsenabschnitt. Die einzige Ausnahme bildet die Beziehung zwischen prozentualem Körperfettgehalt und Plasmaleptin bei den 10 Tage alten Mäusen, wo das Signifikanzniveau beim Vergleich der beiden Genotypen nicht erreicht wird ( $P > 0,05$ ). Die Regulation der Plasmaleptin-Konzentration scheint bei den Mutanten unabhängig vom Alter der Tiere durchgehend zu höheren Werten verschoben zu sein.

### 3.3 VERSUCHSSERIE C: AUSWIRKUNG EINER LACHS-CALCITONIN-BEHANDLUNG BEI MÄUSEN UND RATTEN



**Abb. 21:** Wirkung einer eintägigen Behandlung mit Leptin ( $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), sCT ( $2,1 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) und einer Kombination beider Substanzen auf C57Bl/6J-Mäuse bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung. Gezeigt ist die Differenz (gewichtete Mittelwerte  $\pm$ SE) in der Energieaufnahme zwischen behandelten und Kontroll-Tieren am Effekttag. Es wurden 4 unabhängige Behandlungstage ausgewertet. Leptin: weiß,  $n=13$ ; sCT: schwarz,  $n=13$ ; Kombination: grau,  $n=8$ ; PBS-Kontrolle (Null-Linie):  $n=14$ . \* $P < 0,05$ .

### 3.3.1 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin und Lachs-Calcitonin bei pelletierter Standard-Diät



**Abb. 22:** Wirkung einer eintägigen Behandlung mit Leptin ( $200 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), sCT ( $2,1 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) und einer Kombination beider Substanzen auf C57Bl/6J-Mäuse bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung. Gezeigt sind für die einzelnen Behandlungsgruppen Mittelwerte ( $\pm\text{SE}$ ) für den Verlauf der Pelletaufnahme (A) und der Körpermasse (B) am Beispiel eines Behandlungstages. Leptin: - - -,  $N=4$ ; sCT: — schwarz,  $N=4$ ; Kombination: — grau,  $N=4$ ; PBS-Kontrolle: ·····,  $N=3$ . Pfeile markieren Injektionszeitpunkte.

Werden C57Bl/6J-Mäuse bei ausschließlichem Angebot der pelletierten Standard-Diät mit Leptin, sCT oder einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt, zeigen sich signifikante Unterschiede in der jeweiligen Reaktion (Abb. 21). So reduziert sich die am Effekttag aufgenommene Pelletmenge infolge einer eintägigen Behandlung mit  $200 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  Leptin signifikant um  $0,6 \text{ g}$ , was etwa  $13\%$  der Pelletaufnahme im Vorlauf entspricht ( $P<0,05$ ). Im Vergleich dazu hat eine ungefähr 100-fach niedrigere molare Dosis an sCT ( $2,1 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) einen deutlich stärkeren Effekt und führt zu einer Verdoppelung der

Reduktion der Pelletaufnahme (1,2 g bzw. 26%,  $P < 0,001$ ). Werden beide Peptide in Kombination verabreicht, führt dies zu einer Abnahme in der Pelletaufnahme um 2 g bzw. 43% ( $P < 0,001$ ), die beiden Einzelreaktionen scheinen sich folglich zu addieren. In Abb. 21 sind die entsprechenden Werte auf der Basis der metabolisierbaren Energie angegeben.

Bei Betrachtung des Verlaufs der absoluten Pelletaufnahme am Beispiel eines Behandlungstages (Abb. 22A) zeigt sich als Bestätigung des hier angewandten Auswertverfahrens, dass die Wirkung der beiden Substanzen auf den Effekttag beschränkt ist. Bereits am darauffolgenden Tag hat die Pelletaufnahme ihr Ausgangsniveau erreicht, lediglich die Streuung hat sich vergrößert. Ein kompensatorisches Überschießen während der Nachlaufphase ist – zumindest bei den hier zur Anwendung gekommenen Dosierungen – nicht zu beobachten. Hinsichtlich der Körpermasse kommt es nur bei der kombinierten Gabe zu einer leichten Reduktion, die sich nach dem Normalisieren der Pelletaufnahme wieder umkehrt (Abb. 22B).

### **3.3.2 Vergleich der Wirkungsstärken von Leptin- und Lachs-Calcitonin bei zusätzlichem Angebot einer attraktiven Zusatzdiät**

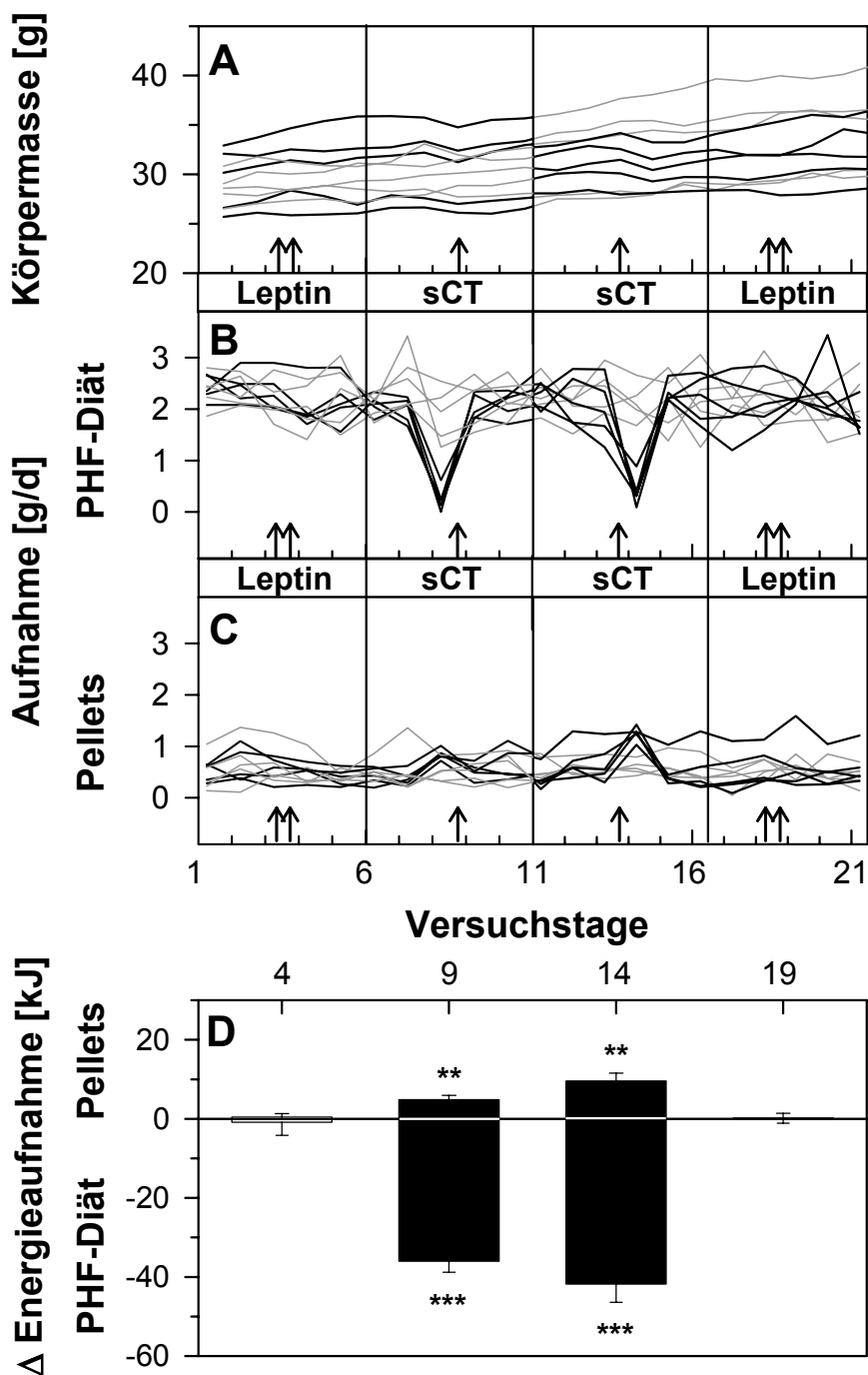
Wird C57Bl/6J-Mäusen neben der pelletierten Standard-Diät weiße Schokolade als attraktive, fettreiche Zusatzdiät (PHF-Diät) angeboten (Abb. 23), so steigt die tägliche Energieaufnahme an (C. Daniel<sup>5</sup> und I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei den hier untersuchten Mäusen sinkt dabei die Aufnahme der Standard-Diät auf unter 15% der bei alleiniger Fütterung aufgenommenen Menge ( $0,57 \pm 0,07$  vs.  $3,82 \pm 0,09$  g/d,  $P < 0,001$ ).  $88 \pm 1\%$  der metabolisierbaren Energie entstammen nun der PHF-Diät. Die Körpermasse steigt infolge der leicht erhöhten Energieaufnahme kontinuierlich an (Abb. 23A).

Nach insgesamt mehr als 50 Tagen auf dieser Zusatzdiät erfolgt auf die Gabe der gleichen Leptindosis, die bei Mäusen mit ausschließlicher Standarddiät-Fütterung eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme auslöst (siehe Abb. 21 und 22), keine Reaktion (Abb. 23B-D, links). Im Gegensatz dazu führt die Gabe einer mehr als 100-fach niedrigeren Dosis an sCT ( $1,6 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), die im Abstand von 5 Tagen zunächst der einen, dann der anderen Hälfte der Tiere verabreicht wurde, zu einer deutlichen Reduktion der Schokoladenaufnahme (Abb. 23B und D, Mitte). Interessanterweise kommt es aber infolge der sCT-Behandlung nicht zur gleichzeitigen Reduktion, sondern vielmehr zu einer leichten, aber signifikanten Steigerung

---

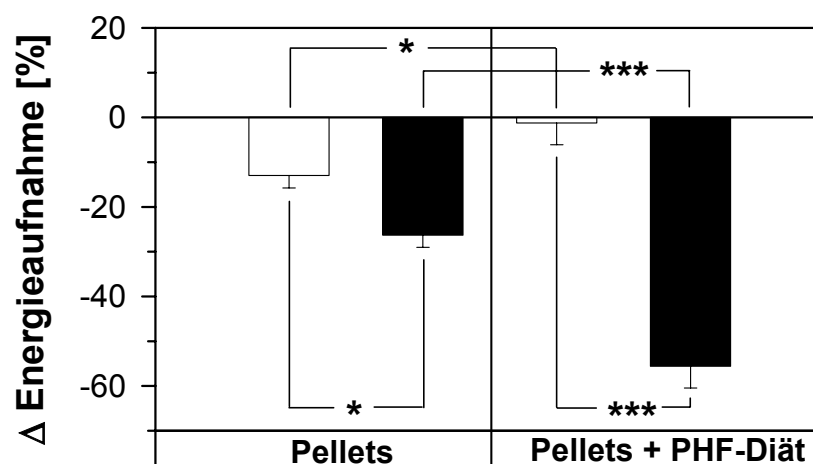
<sup>5</sup> Diplomarbeit C. Daniel, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002

der Pelletaufnahme (Abb. 23C und D, Mitte), die allerdings energetisch die Abnahme der Schokoladenaufnahme nicht kompensiert. Eine Wiederholung der Leptinbehandlung am Ende des Versuchszeitraumes bestätigt den kompletten Ausfall der Leptinwirkung auf die Energieaufnahme bei diesem Nahrungsangebot (Abb. 23A-D, rechts). Wie bereits in Abb. 22 für die alleinige Fütterung der Standard-Diät gezeigt, löst die Veränderung der Futtermittelaufnahme infolge der Leptin- bzw. sCT-Behandlung auch bei diesem Nahrungsangebot keinen kompensatorischen Effekt während der Nachlaufphase aus. Ein Vergleich zwischen behandelten und Kontroll-Tieren ergibt weder für die Gesamtenergieaufnahme noch für die einzelnen Diät-komponenten einen signifikanten Unterschied im Nachlauf ( $P > 0,05$ ).



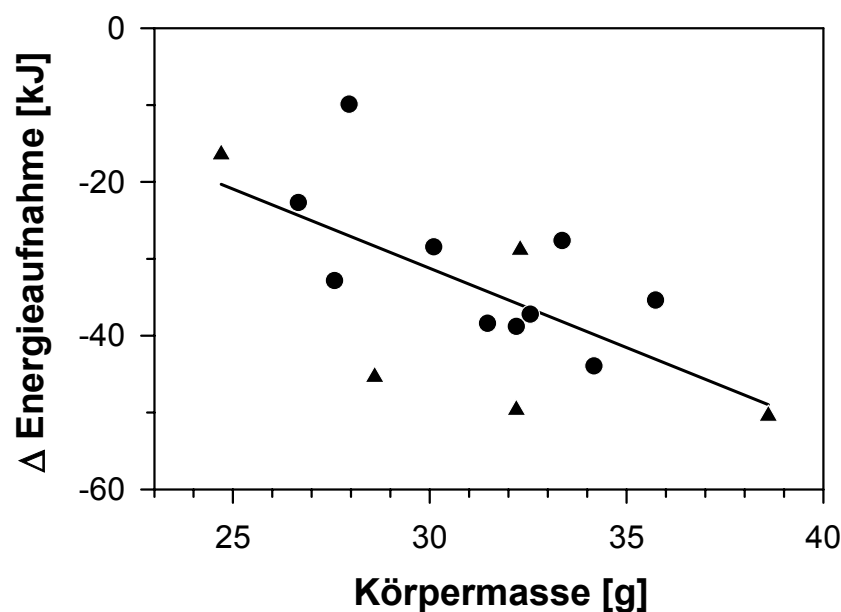
**Abb. 23 (vorherige Seite):** Wirkung eintägiger Behandlungen mit Leptin ( $200 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) und sCT ( $1,6 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) auf C57Bl/6J-Mäuse bei zusätzlichem Angebot von Schokolade (PHF-Diät) seit mehr als 50 Tagen. Gezeigt sind die individuellen Verläufe der Körpermasse (A), der Schokoladen-Aufnahme (B) und der Pellet-Aufnahme (C) von behandelten (schwarz,  $N=5$ ) und Kontroll-Tieren (grau,  $N=5$ ). Nach der ersten sCT-Behandlung wurden die Behandlungsgruppen getauscht. Pfeile markieren Injektionszeitpunkte. D) Differenz (Mittelwerte  $\pm$ SE) in der Energieaufnahme zwischen behandelten und Kontroll-Tieren (Null-Linie) am jeweiligen Effekttag. Pellet- und Schokoladenaufnahme sind getrennt dargestellt. Leptin: weiß (außen), sCT: schwarz (innen). \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$ .

Abb. 24 stellt die Änderungen in der Energieaufnahme infolge einer Leptin- bzw. sCT-Behandlung in Abhängigkeit von der angebotenen Nahrung gegenüber. Um die Unterschiede in der Gesamtenergieaufnahme zu berücksichtigen, ist die Veränderung der Energieaufnahme in Prozent der unbeeinflussten Energieaufnahme im jeweiligen Vorlauf angegeben. Im Gegensatz zu dem bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung deutlichen Leptineffekt ( $P<0,05$ ) ist nach mehr als 50 Tagen zusätzlicher Schokoladenfütterung kein Unterschied zwischen den behandelten und den Kontroll-Tieren zu verzeichnen ( $P=0,99$ ). Der anorektische Effekt des sCT dagegen, der bereits bei Standarddiät-Fütterung signifikant stärker als der Leptineffekt ist, hat sich durch die Schokoladen-Fütterung verdoppelt, obwohl bei identischer Dosis pro Tier die massenspezifische sCT-Dosis durch die erhöhte Körpermasse infolge der Schokoladenfütterung (Tab. 3) sogar etwas niedriger ist. Die Bestimmung des Körperfettgehalts dieser Mäuse zeigt, dass sie infolge der Schokoladenfütterung ihren Körperfettgehalt mit  $32\pm 2\%$  im Vergleich zu normalen Mäusen etwa verdoppelt haben.



**Abb. 24:** Vergleich der Wirkung einer eintägigen Behandlung mit Leptin (weiß) bzw. sCT (schwarz) bei C57Bl/6J-Mäusen bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung (links) bzw. bei zusätzlichem Angebot einer PHF-Diät (rechts). Gezeigt sind gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die Differenz in der Energieaufnahme am Effekttag zwischen behandelten und Kontroll-Tieren (Null-Linie). Aufgrund unterschiedlicher Ausgangswerte ist die Differenz in Prozent der Energieaufnahme im Vorlauf angegeben.  $n$ -Zahlen und Dosisangaben siehe Abb. 21 und 23. \* $P<0,05$ , \*\*\* $P>0,001$ .

Um die Vermutung zu widerlegen, dass die sCT-Wirkung bei länger anhaltender Schokoladenfütterung eventuell nachlässt, wurde zusätzlich eine sCT-Behandlung bei einer zweiten Versuchsgruppe von C57Bl/6J-Mäusen durchgeführt, denen zuvor insgesamt für etwa 3 Monate die PHF-Diät angeboten worden war. Diese Tiere reagierten in gleichem Maße auf eine ähnliche sCT-Dosis und reduzierten ihre Energieaufnahme am Effekttag um durchschnittlich  $38 \pm 7$  kJ ( $=50 \pm 7\%$ ,  $N=5/5$ ). Die in Abb. 25 dargestellte Korrelation zwischen der sCT-Wirkung und der Körpermasse der behandelten Mäuse aus beiden Versuchsgruppen vermittelt den Eindruck, dass die anorektische Wirkung des sCT sogar mit steigender Körpermasse zunimmt.

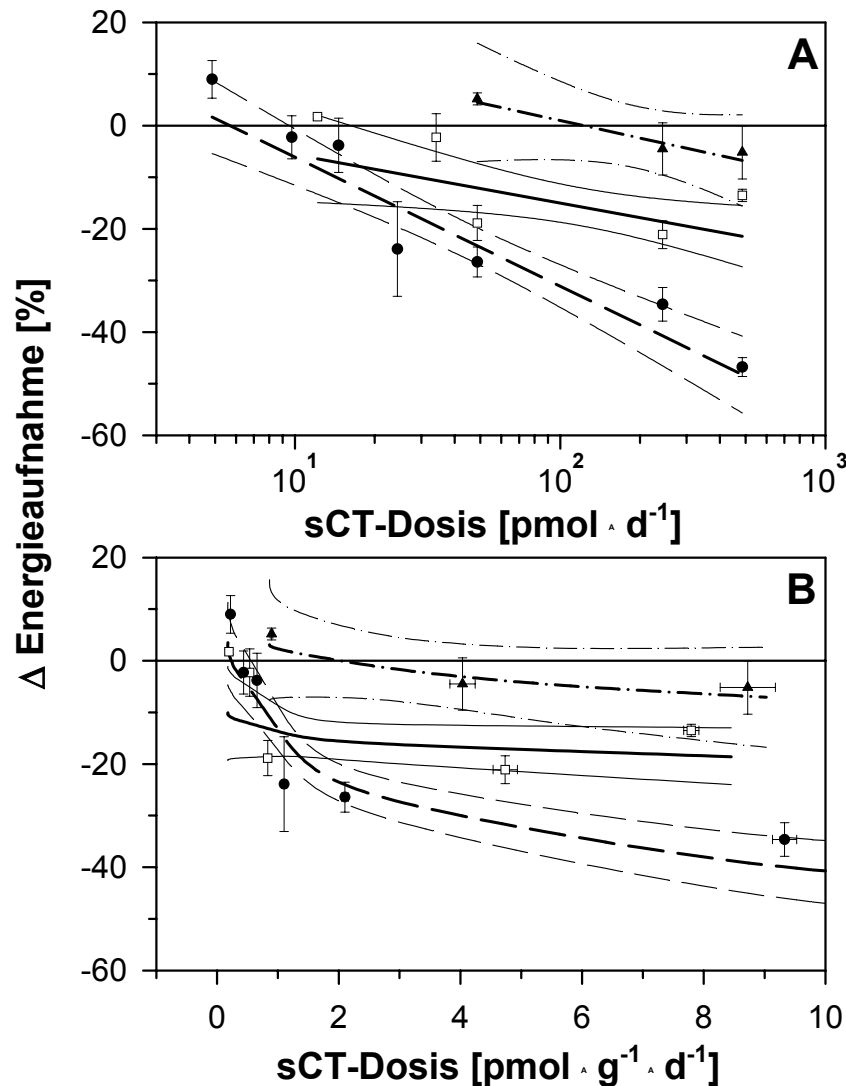


**Abb. 25:** Korrelation zwischen der Körpermasse am Behandlungstag und der individuellen Abweichung der Energieaufnahme der mit sCT behandelten Mäuse vom Mittelwert der Kontroll-Tiere am Effekttag (Null-Linie) nach mehrwöchigem zusätzlichem Angebot einer PHF-Diät. Gezeigt sind Einzeldaten plus Regression ( $r=-0,60$ ,  $P<0,05$ ) für die in Abb. 23 dargestellten Tiere an zwei sCT-Behandlungstagen (Dosis:  $1,6 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , Kreise,  $N=10$ ) sowie von Mäusen, die nach 84 d Schokoladenfütterung mit sCT behandelt wurden (Dosis:  $1,5 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , Dreiecke,  $N=5$ ).

### 3.3.3 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei normalgewichtigen und genetisch adipösen Tiermodellen

Neben den Untersuchungen an Mäusen mit diätinduzierter Adipositas wurde die Wirksamkeit einer sCT-Behandlung auch bei genetisch adipösen Tieren getestet und mit der Wirkung bei Wildtyp-Tieren verglichen (Abb. 26 und 27). Die Adipositas der hier untersuchten Tiere beruht in zwei Fällen auf einer Störung des Leptin-Systems: während *ob/ob*-Mäuse kein

funktionelles Leptin synthetisieren können, weisen *fa/fa*-Ratten einen defekten Leptinrezeptor auf. Bei den *-/-* MC4-r-KO-Mäusen ist die zentrale Signaltransmission im Leptin-System gestört, da der MC4-Rezeptor und damit das auf die Futteraufnahme inhibitorisch wirkende  $\alpha$ MSH/MC4-System ausgeschaltet ist, dem eine wichtige Rolle bei der zentralen Vermittlung der Leptinwirkung zugesprochen wird.



**Abb. 26:** Vergleich der Wirkung einer eintägigen sCT-Behandlung bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung bei C57Bl/6J-, *-/-* MC4-r-KO- und *ob/ob*-Mäusen. Gezeigt ist die Differenz in der Energieaufnahme am Effekttag zwischen behandelten und Kontroll-Tieren (Null-Linie). Aufgrund unterschiedlicher Ausgangswerte ist die Differenz in Prozent der Energieaufnahme im Vorlauf angegeben. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die untersuchten Dosierungen sowie Regressionen plus 95%-Konfidenzintervalle über die Einzelwerte bei logarithmischer Auftragung der sCT-Dosis pro Tier (A) bzw. bei linearisierter Auftragung der massenspezifischen sCT-Dosis (B). C57Bl/6J-Mäuse: - - - , Kreise,  $n=61$ ,  $r=-0,72$ ,  $P<0,001$ . *-/-* MC4-r-KO-Mäuse: — , Quadrate,  $n=33$ ,  $r=-0,40$ ,  $P<0,05$ . *ob/ob*-Mäuse: - · - · , Dreiecke,  $n=12$ ,  $r=-0,42$ ,  $P>0,05$ .  $n$ -Zahlen geben die Anzahl der individuellen sCT-Behandlungen an. Korrelationskoeffizienten beziehen sich auf Teil A.

Um trotz der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen einen Vergleich auf Basis der Futteraufnahme zu ermöglichen, wurde auch hier die Veränderung der Pelletaufnahme infolge der sCT-Behandlung in Prozent der Energieaufnahme im Vorlauf dargestellt. Da außerdem nicht vollständig geklärt ist, ob bei einem Vergleich der relativen Ansprechbarkeit der verschiedenen Tiermodelle die sCT-Dosen als Absolutwerte oder aber aufgrund der stark unterschiedlichen Körpermassen massenspezifisch angegeben werden sollten, wurden in Abb. 27A und B beide Alternativen berücksichtigt. Die gleiche Art der Darstellung wurde für den Vergleich zwischen Wildtyp- und *fa/fa*-Ratten gewählt. Diese wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in gesonderten Graphen (Abb. 27A und B) dargestellt.

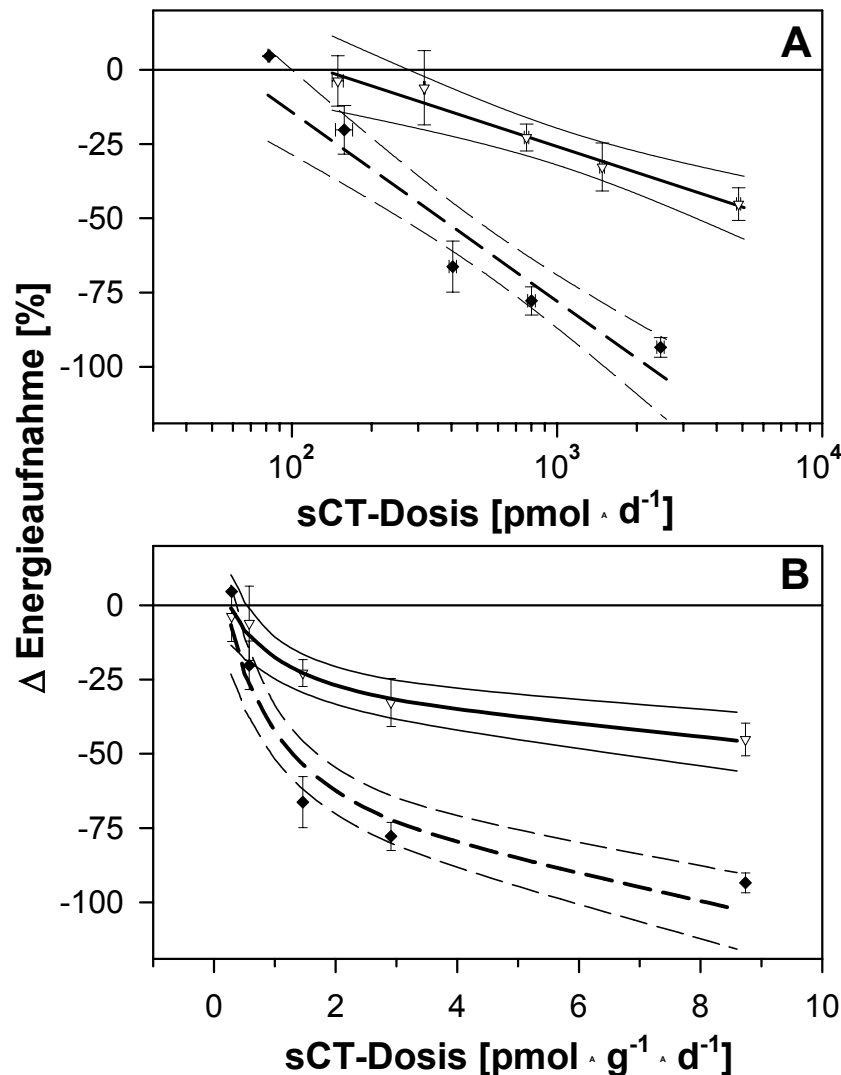
C57Bl/6J-Mäuse zeigen eine deutliche Dosisabhängigkeit in der sCT-Reaktion. Ab einer sCT-Dosis von  $49 \text{ pmol}\cdot\text{d}^{-1}$  bzw.  $2,1\pm 0,1 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und Kontroll-Tieren nachweisen ( $P<0,001$ ), wobei sich die Signifikanzgrenze durch Erhöhung der N-Zahlen bei den niedrigeren hier angewandten sCT-Dosierungen vermutlich nach unten verschieben ließe. In dem hier getesteten Dosisbereich lässt sich die Energieaufnahme der C57Bl/6J-Mäuse bis auf 50% der Vorlaufaufnahme reduzieren.

Der genetische Defekt wirkt sich in allen drei Fällen negativ auf die sCT-Wirkung aus. Werden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei C57Bl/6J- und *-/-* MC4-r-KO-Mäusen mit Hilfe einer multiplen linearen Regressionsanalyse auf Basis der linearen Regressionen in Abb. 26A verglichen, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied ( $P<0,001$ ). Auf Basis der massenspezifischen sCT-Dosis (Abb. 26B) bei halblogarithmischer Auftragung (nicht gezeigt) ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $P<0,05$ ). Die *-/-* MC4-r-KO-Mäuse zeigen folglich gegenüber der gleichen sCT-Dosis im Vergleich zu den C57Bl/6J-Mäusen eine verminderte Reaktion. Dieser Befund scheint nicht darauf zu beruhen, dass bei den *-/-* MC4-r-KO-Mäusen generell der Schwellenwert zu höheren Dosen hin verschoben ist. Die Durchführung einer Varianzanalyse auf Basis der Einzelmesswerte ergibt nämlich – wie bereits für die C57Bl/6J-Mäuse – einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und Kontroll-Tieren ab einer sCT-Dosis von  $49 \text{ pmol}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $=0,83\pm 0,02 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Für die *ob/ob*-Mäuse ergibt sich bei Durchführung einer Varianzanalyse bei keiner der drei in der Abbildung dargestellten sCT-Dosierungen ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den Kontroll-Tieren. Erst bei Applikation einer sCT-Dosis von  $18 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $=1363\pm 31 \text{ pmol}\cdot\text{d}^{-1}$ ), einer Verdopplung der massenspezifischen bzw. einer Ver-



dreifachung der absoluten Dosis, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Energieaufnahme um  $17 \pm 3\%$  ( $P < 0,01$ ,  $n(\text{ko/sCT}) = 6/6$ , nicht gezeigt). Die Regressionsanalyse ergibt folglich unabhängig von der Wahl der Dosisangabe einen signifikanten Unterschied sowohl zu den C57Bl/6J- als auch zu den -/- MC4-r-KO-Mäusen (jeweils  $P < 0,001$ ). Die *ob/ob*-Mäuse zeigen sich somit deutlich insensitiver gegenüber sCT als die beiden anderen untersuchten Mausmodelle.



**Abb. 27:** Vergleich der Wirkung einer eintägigen sCT-Behandlung bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung bei Wildtyp- und *fa/fa*-Ratten. Gezeigt ist die Differenz in der Energieaufnahme am Effektag zwischen behandelten und Kontroll-Tieren (Null-Linie). Aufgrund unterschiedlicher Ausgangswerte ist die Differenz in Prozent der Energieaufnahme im Vorlauf angegeben. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$ SE) für die untersuchten Dosierungen sowie Regressionen plus 95%-Konfidenzintervalle über die Einzelwerte bei logarithmischer Auftragung der sCT-Dosis pro Tier (A) bzw. bei linearisierter Auftragung der massenspezifischen sCT-Dosis (B). *fa/fa*-Ratten: —, Dreiecke,  $n=16$ ,  $r=-0,79$ ,  $P < 0,001$ . Wildtyp-Ratten: - - -, Raute,  $n=16$ ,  $r=-0,91$ ,  $P < 0,001$ .  $n$ -Zahlen geben die Anzahl der individuellen sCT-Behandlungen an. Korrelationskoeffizienten beziehen sich auf Teil A.

Wildtyp-Ratten scheinen prinzipiell eine höhere Empfindlichkeit gegenüber sCT aufzuweisen, da deren Pelletaufnahme durch die Gabe einer massenspezifischen sCT-Dosis, die bei Wildtyp-Mäusen zu einer 40%igen Reduktion führt, um über 90% reduziert werden kann (Abb. 27B). Auch der Vergleich auf Basis der absoluten Dosis scheint diese Tatsache zu bestätigen: wird die Regression für die C57Bl/6J-Mäuse in Abb. 28A bis zu einer Dosis von  $2,5 \cdot 10^3 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  verlängert, was der höchsten sCT-Dosis bei den Wildtyp-Ratten entspricht, so würde diese Dosis nur einer etwa 70%igen Reduktion der Energieaufnahme bei den C57Bl/6J-Mäusen entsprechen. Auf die statistische Analyse dieses Unterschiedes wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da – trotz der Angabe der Veränderung der Energieaufnahme in Prozent der Vorlaufaufnahme – ein direkter Vergleich zwischen Mäusen und Ratten kritisch zu beurteilen ist.

Die *fa/fa*-Ratten zeigen im Vergleich zu den Wildtyp-Ratten eine signifikant verminderte Reaktion auf eine gegebene sCT-Dosis ( $P < 0,001$  in Regressionsanalyse, Abb. 27A und B). Wie schon für die Mäuse angesprochen, ergibt sich dieser Unterschied nicht durch eine Schwellenverschiebung, bei beiden Ratten-Genotypen wird das Signifikanzniveau bei dem Vergleich von behandelten und Kontroll-Tieren bei einer Dosis von  $1,5 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  erreicht. Der Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber sCT zeigt sich vielmehr in einer geringeren Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurven. Trotz der offensichtlich verminderten sCT-Wirkung im Vergleich zu den Wildtyp-Ratten zeigen *fa/fa*-Ratten aber interessanterweise eine immer noch deutlich stärkere Reaktion als *ob/ob*-Mäuse ( $P < 0,05$  für Abb. 27A;  $P < 0,001$  für Abb. 27B), obwohl bei beiden Tiermodellen das Leptin-System ausgefallen und deren Adipositas in etwa gleichem Maße ausgeprägt ist.

### **3.3.4 Auswirkung einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf den Plasmainsulinspiegel**

Bei einem Vergleich der Plasmainsulin-Konzentrationen unbehandelter Tiere ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Tab. 5). Verglichen mit den Befunden bei ausschließlichem Angebot der pelletierten Standard-Diät zeigen C57Bl/6J-Mäuse nach zusätzlicher Fütterung der PHF-Diät einen 3-4-fachen Anstieg ihres Plasmainsulinspiegels. Im Vergleich dazu ist allerdings der Anstieg infolge eines genetischen Defektes innerhalb des Leptin- bzw. des  $\alpha\text{MSH}/\text{MC4}$ -Systems deutlich größer. Dabei treten allerdings graduelle Abstufungen auf. Während die Plasmainsulin-Konzentration von *-/-* MC4-r-KO-Mäusen bereits um mehr als das 20-fache im Vergleich zu C57Bl/6J-Mäusen

auf Standard-Diät angestiegen ist, besitzen *ob/ob*-Mäuse einen Plasmainsulinspiegel der um noch einmal das 5-fache höher liegt als der bei *-/-* MC4-r-KO-Mäusen. *fa/fa*-Ratten dagegen liegen hinsichtlich ihres Insulinspiegels eher im Bereich der *-/-* MC4-r-KO-Mäuse, was im Vergleich zu Wildtyp-Ratten einer 10-fachen Erhöhung entspricht.

Tiermodell	Diät	Plasma Insulin [ $\mu$ U/ml]		P	N (ko/sCT)
		Kontrolle	nach sCT- Behandlung		
C57Bl/6J-Mäuse	Standard-Diät	20 +/- 2	8 +/- 1	P<0,05	15 / 5
	Standard- plus PHF-Diät	70 +/- 7	17 +/- 4	P<0,01	25 / 5
<i>-/-</i> MC4-r-KO-Mäuse	Standard-Diät	489 +/- 43	230 +/- 50	P<0,05	13 / 6
<i>ob/ob</i> -Mäuse	Standard-Diät	2348 +/- 270	556 +/- 73	P=0,06	26 / 3
Wildtyp-Ratten	Standard-Diät	36 +/- 5	-	-	6 / 0
<i>fa/fa</i> -Ratten	Standard-Diät	453 +/- 108	-	-	22 / 0

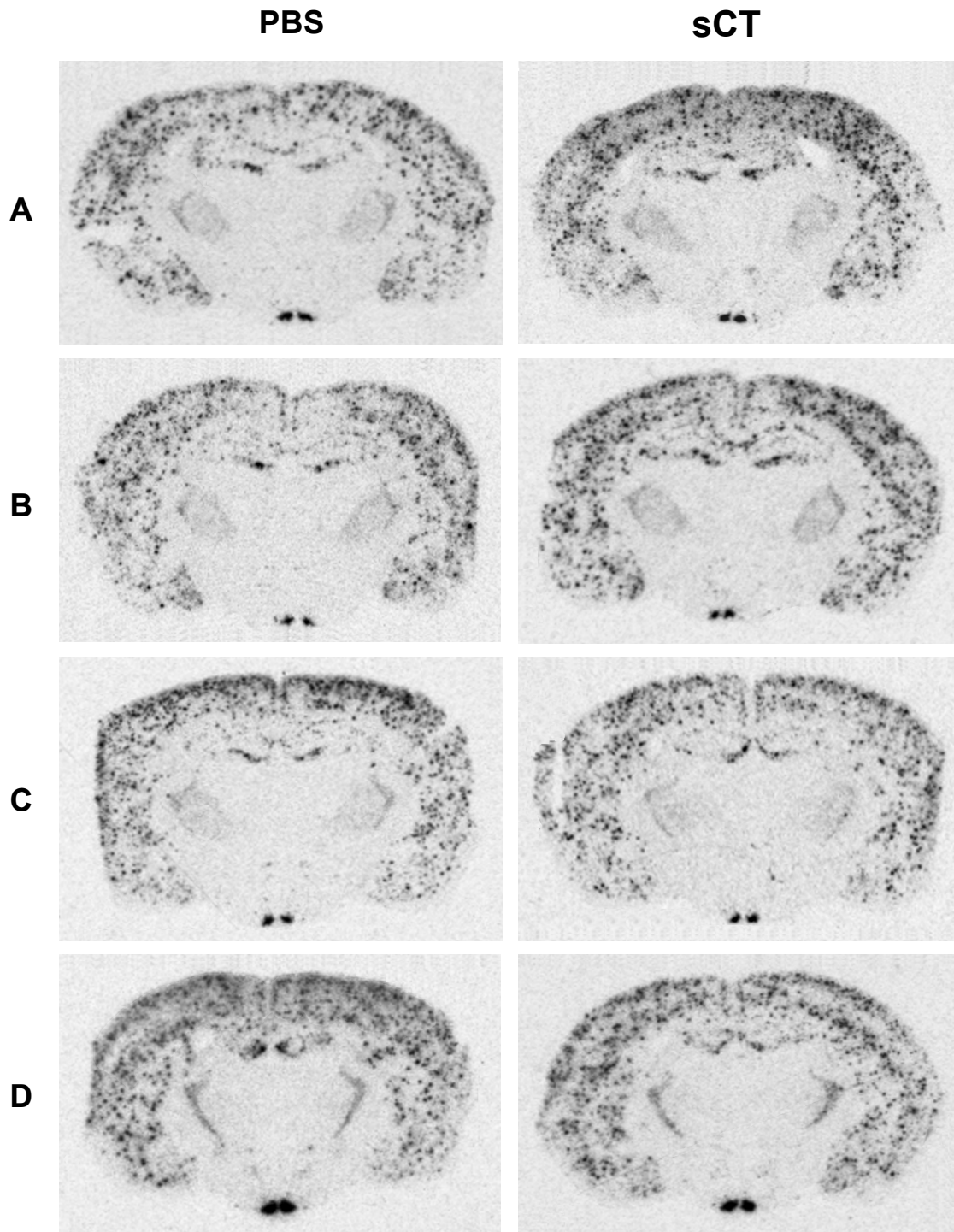
**Tabelle 5:** Plasmainsulin-Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Mäuse- und Rattenmodelle. Kontrollwerte und die entsprechenden N-Zahlen (ko) beziehen sich auf mit PBS behandelte bzw. unbehandelte Tiere. Die übrigen Mäuse wurden 5h nach nach Verabreichung der ersten bzw. 1h nach Verabreichung der zweiten Lachs-Calcitonin (sCT)-Injektion (490 pmol/d) getötet. PHF=palatable, high-fat (attraktiv, fettreich).

Wie erste Messungen zeigen, führt trotz der unterschiedlichen Ausgangswerte eine sCT-Behandlung innerhalb von 5 Stunden bei allen 4 untersuchten Maus-Modellen zu einer deutlichen Senkung des Plasmainsulinspiegels um 50-80%. Das Signifikanzniveau wird dabei nur im Falle der *ob/ob*-Mäuse – vermutlich aufgrund der geringen N-Zahl der mit sCT behandelten Tiere – knapp verfehlt. Obwohl die Änderung der Plasmainsulin-Konzentration infolge der sCT-Behandlung bei den *ob/ob*-Mäusen mit Abstand am größten ist, bleibt der Unterschied zwischen den einzelnen Mäusegruppen aber trotz des sCT-Einflusses weiterhin bestehen.

### 3.3.5 Auswirkung einer Behandlung mit Lachs-Calcitonin auf die NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus

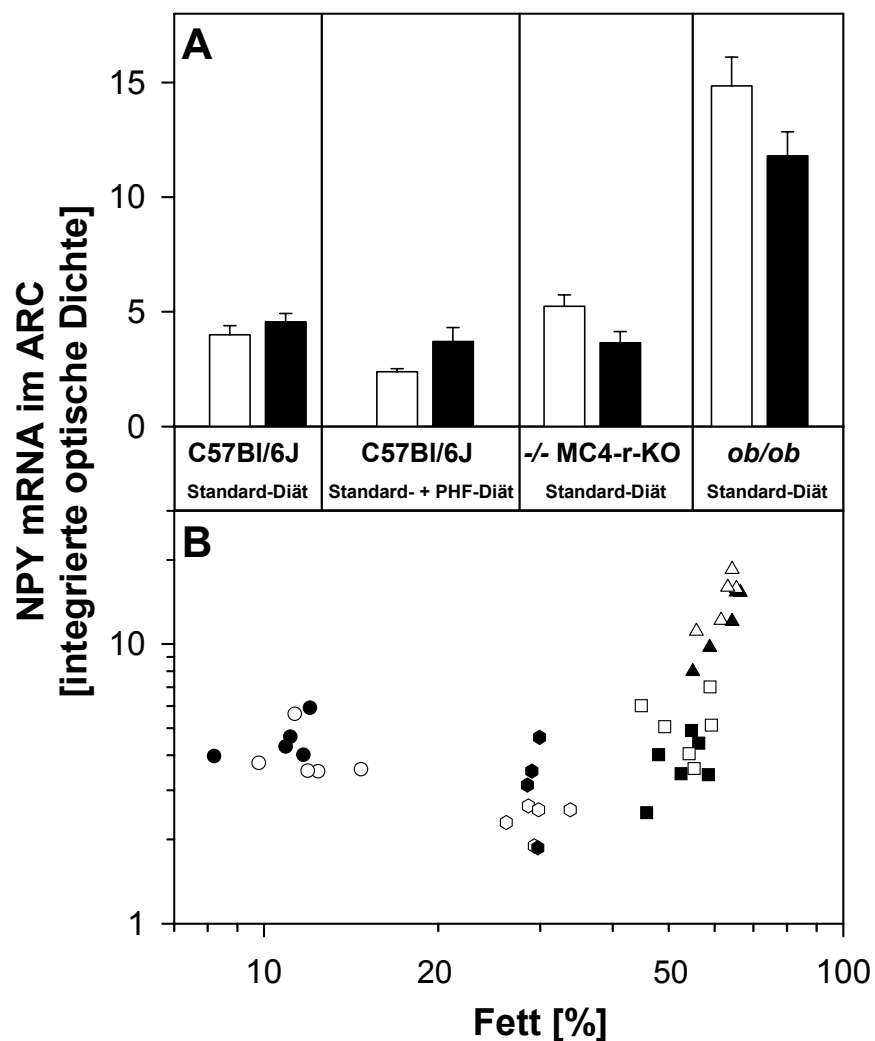
Infolge der beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiermodellen hinsichtlich ihrer Reaktion auf die subkutane Gabe von sCT wurden neben dem Plasmainsulinspiegel weitere Einflussfaktoren in Betracht gezogen. Abb. 28 und 29 zeigen die Ergebnisse einer *in situ*-

Hybridisierung zur quantitativen Bestimmung der NPY-mRNA-Konzentration im ARC bei mit sCT behandelten und Kontroll-Tieren.



**Abb. 28:** NPY-mRNA-Expression in 20 µm-Frontalschnitten der Gehirne von C57Bl/6J- (A), -/- MC4-r-KO- (C) und ob/ob-Mäusen (D) bei ausschließlicher Fütterung der pelletierten Standard-Diät sowie von C57Bl/6J-Mäusen bei zusätzlichem Angebot der PHF-Diät (B). Gezeigt ist – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven in situ-Hybridisierung auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit sCT (rechts) bzw. PBS behandelten (links) Mäusen. Für die spätere quantitative Auswertung wurde nur die integrierte optische Dichte des markanten Hybridierungssignals im Nucleus arcuatus (ARC) quantitativ bestimmt.

Abb. 28 zeigt dabei am Beispiel repräsentativer Tiere jeder Versuchsgruppe das Hybridisierungsmuster, das auf den Autoradiographien zu erkennen war. Basierend auf diesen Einzelwerten wurde für das Hybridisierungssignal im ARC zunächst ein Mittelwert über alle auszuwertenden Schnitte für jedes Tier gebildet. Darauf aufbauend wurden schließlich Mittelwerte für jede Versuchsgruppe errechnet und statistisch miteinander verglichen (Abb. 29A). Zusätzlich wurde die gemessene NPY-mRNA-Konzentration in Beziehung zum individuellen Körperfettgehalt gesetzt (Abb. 29B). Grundsätzlich unterscheiden sich alle vier Mausmodelle in ihrem Körperfettgehalt, wobei die erhöhten Werte bei den drei adipösen Modellen in jedem Fall mit einer gesteigerten Energieaufnahme kombiniert sind. Zumindest für die beiden genetisch adipösen Mausmodelle scheint eine positive Korrelation zwischen der NPY-mRNA-Konzentration im ARC und dem Körperfettgehalt der Mäuse zu existieren, wobei jedoch auf Basis der Regressionsgeraden (nicht gezeigt) keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen mit sCT behandelten und Kontroll-Tieren auftreten ( $P > 0,05$ ).



**Abb. 29 (vorherige Seite):** NPY-mRNA-Expression im Nucleus arcuatus (ARC) von C57Bl/6J- (Kreise), -/- MC4-r-KO- (Quadrate) und ob/ob-Mäusen (Dreiecke) bei ausschließlicher Standarddiät-Fütterung sowie von C57Bl/6J-Mäusen bei zusätzlichem Angebot der PHF-Diät (Fünfecke). Dargestellt sind die Ergebnisse der IOD-Messung. Die dargestellte Einheit dient nur dem relativen Vergleich. **A)** arithmetische und gewichtete Mittelwerte ( $\pm$ SE) für mit sCT behandelte (schwarz, 490 pmol/d) und Kontroll-Tiere (weiß). **B)** individuelle Werte für die Korrelation zum prozentualen Körperfettgehalt, doppelt-logarithmische Darstellung. N=4-6 für jede Behandlungsgruppe.

Die statistische Auswertung der mittleren NPY-Expression im ARC ergibt in keiner der Mäusegruppen einen signifikanten Unterschied zwischen den mit sCT behandelten Mäusen und den zugehörigen Kontrolltieren. Tendenziell ergibt sich für die C57Bl/6J-Mäuse bei beiden Diäten aber ein Anstieg der NPY-mRNA-Konzentration im ARC infolge der sCT-Behandlung, während es im Gegensatz dazu bei den genetisch adipösen Tieren eher zu einer verminderten NPY-Expression kommt (Abb. 29A). Innerhalb jeder Behandlungsgruppe unterscheiden sich die Werte für die ob/ob-Mäuse jeweils signifikant von denen der drei anderen Tiermodelle ( $P < 0,001$ ). Zusätzlich führt die Fütterung PHF-Diät bei unbehandelten C57Bl/6J-Mäusen im Vergleich zu der ausschließlichen Standarddiät-Fütterung zu einer signifikanten 48%igen Reduktion der NPY-mRNA-Konzentration im ARC ( $P < 0,01$ ). Durch diesen fütterungsbedingten Abfall der NPY-mRNA-Konzentration bei den C57Bl/6J-Mäusen ergibt sich schließlich auch ein signifikanter Unterschied zu den Werten von unbehandelten -/- MC4-r-KO-Mäusen ( $P < 0,01$ ).

## 4 DISKUSSION

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten grundlegende Zusammenhänge hinsichtlich der Rolle des Leptin-Systems bei der komplexen Regulation des Energiehaushaltes erarbeitet werden. Von besonderem Interesse war dabei die Interaktion von pharmakologischen und genetischen Manipulationen des Leptin-Systems und anderer mit der Regulation des Energiehaushaltes in Zusammenhang stehender Hormonsysteme. Eine Langzeit-Leptinbehandlung bei genetisch adipösen, Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen konnte durch die Anwendung verschiedener Leptin-Dosierungen zeigen, dass in Abhängigkeit von der Höhe des exogen manipulierten Plasmaleptinspiegels eine Reduktion der Körpermasse, Futteraufnahme und des Plasmainsulinspiegels der Tiere eintritt. Als entscheidender Befund dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es gegen Ende der Leptinbehandlung zur dosisabhängigen Stabilisierung eines neuen, niedrigen Körpermasse-Niveaus bei gleichbleibender Leptinresponsivität kommt, was als eindeutiger Beweis für die Existenz weiterer an der redundanten Absicherung der Regulation des Energiehaushalts beteiligter und die Größe der Körperfettspeicher signalisierender Systeme gewertet werden muss. Aufbauend auf diesem Befund wurde in zwei weiteren Versuchsserien exemplarisch untersucht, welche weiteren Hormonsysteme möglicherweise mit dem Leptin-System interagieren.  $GR^{NesCre}$ -Mäuse, die aufgrund eines Knockouts einen Defekt der Glukokortikoid-Rezeptoren im Zentralnervensystem aufweisen, zeigen eine Beeinträchtigung ihres Wachstums mit einer altersabhängigen Veränderung der Körperzusammensetzung. In Kombination mit einem bezogen auf die Körperfettmasse überproportional hohen Plasmaleptinspiegel, muss somit von einer Beteiligung der HPA-Achse an der Regulation des Energiehaushalts und von einer Interaktion mit dem Leptin-System ausgegangen werden. Im Rahmen einer weiteren Versuchsserie konnte schließlich gezeigt werden, dass Lachs-Calcitonin-Injektionen selbst in Fällen eines genetisch oder durch das Angebot einer attraktiven Nahrung in seiner Funktion gestörten Leptin-Systems zu einer Reduktion der Futteraufnahme führen. Die anorektische Wirkung des Lachs-Calcitonins, bei deren Vermittlung dem Amylin-System eine vorrangige Rolle zugesprochen wird, wird dabei durch genetische Defekte innerhalb des Leptin- bzw.  $\alpha$ MSH/MC4-Systems vermindert, interessanterweise aber im Falle einer diätinduzierten Leptinresistenz infolge des Angebots einer attraktiven, fettreichen Zusatzdiät gesteigert.

## 4.1 AUSWIRKUNGEN EINER LANGZEIT-LEPTINBEHANDLUNG BEI *OB/OB*-MÄUSEN

Bereits die ersten Studien nach der Entdeckung des Leptins (Zhang et al., 1994) und dessen rekombinanter Herstellung beschäftigten sich mit der Auswirkung einer Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen (Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Campfield et al., 1995; Weigle et al., 1995; Stephens et al., 1995). Obwohl diese Pionier-Arbeiten in den folgenden Jahren durch weitere Studien zu diesem Thema ergänzt wurden (Levin et al., 1996; Schwartz et al., 1996a; Chehab et al., 1996; Pelleymounter, 1997; Harris et al., 1997 & 1998; Mercer et al., 1997b; Huang et al., 1999; Breslow et al., 1999), beschränkten sich die durchgeführten Behandlungen in den meisten Fällen auf einen Zeitraum von 2-4 Wochen, so dass Informationen über die Langzeit-Wirkung der Behandlung fehlen. Einzig Rafael & Herling (2000) untersuchten die Auswirkung einer peripheren Leptininfusion (380 pmol/d) über einen Zeitraum von 75 Tagen und konnten die Einstellung eines Gleichgewichts gegen Ende der Leptinbehandlung mit der Stabilisierung eines neuen, niedrigen Körpermasse-Niveaus feststellen. Aufbauend auf diesen ersten Untersuchungen unter thermoneutralen Bedingungen wurde in der vorliegenden Arbeit ein ähnlicher Versuchsansatz bei normalen Haltungsbedingungen gewählt. Dabei sollte vorrangig durch die Anwendung von verschiedenen Leptin-Dosierungen und die regelmäßige Gabe von zusätzlichen Leptininjektionen die Ursache für die Einstellung einer stabilen Körpermasse in der Endphase der Leptininfusion untersucht werden.

### 4.1.1 Leptineffekt auf die Futteraufnahme und die Körpermasse von *ob/ob*-Mäusen

Anhand der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Verläufe von Körpermasse und Futteraufnahme lässt sich die Langzeit-Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen grundsätzlich in drei Phasen einteilen. Zunächst nimmt die Körpermasse in Kombination mit einer stark unterdrückten Futteraufnahme rapide ab. Dann kommt es zu einem allmählichen Anstieg der Futteraufnahme bei Verlangsamung der Körpermassenreduktion. Schließlich pendelt sich die Futteraufnahme auf einem mittleren Niveau ein, während die Körpermasse auf einem erniedrigten Niveau stabil gehalten wird. In der Studie von Rafael & Herling (2000) konnte ein mit den hier erhobenen Daten vergleichbarer Verlauf der Körpermasse nachgewiesen werden. So zeigten die Mäuse ab etwa dem 30. Behandlungstag eine Stabilisierung der Körpermasse auf ein neues, niedriges Niveau, wobei allerdings die Frage offen blieb, inwieweit die gewählte Leptindosis die Höhe dieses Niveaus beeinflusst. Auch in dieser Studie zeigte sich nach einem sehr uniformen Bild während der ersten 3 Behandlungswochen



ein deutlicher Anstieg der Streuung zwischen dem 32. und 53. Behandlungstag. Die Übereinstimmung mit den hier erhobenen Befunden lässt vermuten, dass diese individuellen Schwankungen in der Mitte der Behandlungsperiode nicht auf methodische Mängel zurückzuführen sind. Zudem traten diese größeren Schwankungen in einer weiteren Studie, bei der *ob/ob*-Mäuse über einen Zeitraum von 30 Tagen intraperitoneale Leptininjektionen (29 nmol/d) erhielten, ebenfalls zwischen dem 10. und 25. Behandlungstag auf (Chehab et al., 1996). Die eigenen Daten weisen außerdem darauf hin, dass diese Schwankungen sich mit steigender Dosis verringern.

Auch die Futteraufnahme der in der Arbeit von Rafael & Herling (2000) unter thermoneutralen Bedingungen mit Leptin behandelten *ob/ob*-Mäuse zeigt prinzipiell einen ähnlichen Verlauf wie die hier gezeigten Ergebnisse, mit dem Erreichen eines Minimums gegen Ende der zweiten Behandlungswoche sowie einem langsamen Anstieg bis zum Erreichen eines stabilen Endwertes. Die anfängliche starke Reduktion der Futteraufnahme konnte außerdem in weiteren Studien bestätigt werden, bei denen *ob/ob*-Mäuse über einen Zeitraum von 28-32 Tagen intraperitoneale bzw. subkutane Leptininjektionen (6-20 nmol/d) erhielten (Pelley-mounter et al., 1995; Halaas et al., 1995; Stephens et al., 1995). Auffällig bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten ist allerdings, dass der im weiteren Behandlungsverlauf erneute Anstieg der Futteraufnahme im Gegensatz zu dem sehr gleichmäßigen Verlauf bei Rafael & Herling (2000) einen deutlichen Einfluss der Pumpenimplantationen erkennen lässt. Ein leichter Rückgang der Futteraufnahme am Operationstag und ein kompensatorischer Anstieg an ein oder zwei darauffolgenden Tagen bzw. eine Latenzzeit bis zum Einsetzen der vollen Leptinwirkung gerade bei der ersten Pumpenimplantation ist nicht ungewöhnlich. Die hier untersuchten Tiere zeigen allerdings zudem einen sprunghaften Anstieg ihrer Futteraufnahme im Anschluss an fast jede der weiteren Pumpenimplantationen. Eine Erklärung dafür ist nicht erkennbar. Grundsätzlich beinhaltete eine neu implantierte Pumpe Leptin in identischer Konzentration zur vorhergehenden Pumpe. Das verwendete Leptin entstammte der gleichen Produktionscharge und wurde jeweils erst unmittelbar vor dem Befüllen der Pumpen bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Sitz der Pumpen wurde täglich kontrolliert und auf Verkapselungen oder Entzündungen, die die Funktion der Pumpe beeinträchtigen könnten, hin abgetastet. Auch die Volumenbestimmung des in den Pumpen verbliebenen Restes nach Entnahme der Pumpen ergab keinen Hinweis auf Unterschiede in der Ausstromrate. Die beiden einzigen erkennbaren Unterschiede zu der Studie von Rafael & Herling (2000) sind die Umgebungstemperatur und die Wahl des Narkosemittels. Für beide Parameter ist fraglich, inwiefern sie den sprunghaften Verlauf der Futteraufnahme erklären könnten. Im Fall der

Narkose muss zudem erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Narkoseverfahren zum Einsatz kamen, so dass spezifische Nebenwirkungen der Narkotika – wie zum Beispiel eine potentielle lebertoxische Wirkung des Halothans – als einflussnehmende Faktoren eher auszuschließen sind. Abschließend soll erwähnt werden, dass ein sprunghafter Anstieg der Futteraufnahme auch bei Gabe von intraperitonealen Leptininjektionen (20 nmol/d) in einer der anderen mehrwöchigen Studien am 19. Behandlungstag auftrat (Halaas et al., 1995).

#### **4.1.2 Beruht die Abnahme der Körpermasse auf einer selektiven Reduktion der Körperfettmasse?**

##### 4.1.2.1 Leptineffekt auf die Körperfettmasse

Grundsätzlich wird Leptin als adipostatiches Hormon klassifiziert (Woods & Seeley, 2000), das über einen vorwiegend zentralen Wirkmechanismus die Größe der körpereigenen Energiereserven und somit vorrangig die Größe der Fettspeicher kontrolliert. So besteht eine enge Korrelation zwischen dem endogenen Plasmaleptinspiegel und der Körperfettmasse (Maffei et al., 1995; Frederich et al., 1995; Considine et al., 1996; Rosenbaum et al., 1996) sowie zwischen der applizierten Leptindosis und der resultierenden Abnahme der Körperfettmasse sowohl bei *ob/ob*-Mäusen (Harris et al., 1998) als auch bei juvenilen Wildtyp-Tieren (Eiden et al., 2001). In *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Leptin seine lipolytische Wirkung über eine Hemmung der Triglyzeridsynthese und einen steigernden Effekt auf die Fettoxidation ausübt (Shimabukuro et al., 1997; Picard et al., 1998; Frühbeck et al., 1997 & 1998; Bryson et al., 1999). Unabhängig davon, ob diese Effekte zentral vermittelt werden oder auf einer direkten, peripheren Leptinwirkung beruhen, kommt es infolge einer Leptinbehandlung zu einer Veränderung des Stoffwechsels, indem anstelle von Kohlenhydraten vorwiegend körpereigene Fettreserven für die Bereitstellung von Energie metabolisiert werden. Rafael & Herling (2000) konnten auf der Basis von Berechnungen zeigen, dass bei einer 15-tägigen Behandlung von *ob/ob*-Mäusen mit einer Leptindosis von 380 pmol/d 86% des Energieverbrauchs durch den Abbau von endogenen Substraten gedeckt werden, wobei wiederum 96% davon über den selektiven Abbau der Körperfettmasse erklärt werden. Der relative Anstieg des Fettstoffwechsels während einer Leptinbehandlung wird auch durch die Abnahme des RQ deutlich. Dies konnte sowohl bei Ratten (Wang T. et al., 1999; Chen & Heiman, 2000) wie bei *ob/ob*-Mäusen (Hwa et al., 1996 & 1997) gezeigt werden. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass in der vorliegenden Arbeit trotz der Leptinbehandlung durchgehend ein RQ von 0,85 angenommen wurde; der daraus

resultierende, maximale potentielle Fehler bei der Berechnung des Energieverbrauchs beträgt allerdings weniger als 4%.

Unbehandelte *ob/ob*-Mäuse weisen aufgrund ihrer extremen Adipositas in Kombination mit einer exzessiven Futterraufnahme eine Fettleber auf. Eine solche Fettleber ist durch die Ansammlung von Triglyzeriden in den parenchymalen Leberzellen charakterisiert (Tobe et al., 1999), wobei deren Gewichtsanteil 5% der Lebermasse überschreitet (Ueno et al., 1997). Bei den hier untersuchten *ob/ob*-Mäusen betrug der Leberfettgehalt ausgangsmäßig mehr als 20%. Grundsätzlich muss davon ausgegangen werden, dass es im Verlauf der Leptinbehandlung durch den allgemein verstärkten Fettabbau auch zu einer Reduktion des Lebergewichts, im Speziellen des Leberfettgehaltes, kommt. Dies konnte für die *ob/ob*-Mäuse in der vorliegenden Arbeit sowie in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden (Harris et al., 1998; Levin et al., 1996; Picard et al., 1998). Im Hinblick auf die starke lipolytische Leptinwirkung und die rasante Körpermassenabnahme der *ob/ob*-Mäuse wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Hypothese überprüft, ob es während der Leptinbehandlung aufgrund der übermäßigen Mobilisierung von Speicherfetten vorübergehend zu einer Anreicherung von Fett in der Leber kommt. Diese Hypothese wird unterstützt durch die von Rafael & Herling (2000) aufgeworfene Überlegung, dass die primäre Leptinwirkung eine exzessive Energieversorgung durch endogene Ressourcen sein könnte, infolgedessen die Futterraufnahme erst sekundär reduziert wird. Durch die verstärkte Lipolyse im Fettgewebe könnte es dabei zwischenzeitlich zu einer durch den verstärkten Antransport von Fettsäuren verursachten Überlastung der ohnehin geschwächten Leber und somit zu einem Anstieg des Leberfettgehaltes kommen. *In vitro* konnte in isolierten Rattenlebern infolge einer kurzzeitigen Leptininfusion ein dosisabhängiger Anstieg des Triglyzeridgehaltes beobachtet werden (Roden et al., 2000). Die hier erhobenen Befunde lassen allerdings einen vorübergehenden Anstieg des Fettgehaltes im Verlauf der Leptinbehandlung von *ob/ob*-Mäusen eher ausschließen. Die Reduktion des Leberfettgehaltes verhält sich zu jedem untersuchten Zeitpunkt weitgehend proportional zu der Veränderung der Körpermasse. Allerdings sind die vorliegenden Ergebnisse nicht ganz eindeutig, da die Werte von 3 von 8 Tieren am 13. Behandlungstag von der ansonsten engen Korrelation zwischen Leberfettgehalt und Körpermasse deutlich nach oben abweichen. Weitere Untersuchungen mit einer größeren N-Zahl und einer engmaschigeren Überprüfung des Leberfettgehaltes innerhalb der ersten 20 Tage der Leptinbehandlung könnten eventuell zur Absicherung dieses Befundes beitragen.

#### 4.1.2.2 Existiert zusätzlich ein Leptineffekt auf die fettfreie Masse?

Hinsichtlich der Beeinflussung der FFDM durch die Langzeit-Leptinbehandlung ergibt sich bei den verschiedenen hier untersuchten Altersgruppen ein unterschiedliches Bild. Bei etwa 2 Monate alten *ob/ob*-Mäusen, die sich in diesem Alter noch im Wachstum befinden, kommt es im Verlauf der Leptinbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der FFDM. Die im gleichen Zeitraum beobachtete Körpermassenreduktion muss folglich durch einen selektiven, Leptin-induzierten Rückgang der Fettmasse erklärt werden. Die Leptinbehandlung könnte allerdings zusätzlich einen hemmenden Effekt auf das FFDM-Wachstum ausüben. So kann in Ermangelung von unbehandelten *ob/ob*-Mäusen im Alter von 3-4 Monaten die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass das unbeeinträchtigte FFDM-Wachstum im gleichen Zeitraum größer ist, als dies hier für die mit Leptin behandelten Tiere gezeigt werden konnte. Ein deutlicher Hinweis, dass es unter Leptinwirkung auch zu einer Reduktion der FFDM kommt, ergibt sich aufgrund des analogen Versuchs bei älteren, ausgewachsenen *ob/ob*-Mäusen. Hierbei zeigt sich eine signifikante Abnahme der FFDM infolge einer 59 Tage andauernden Leptinbehandlung im Vergleich zu bei Versuchsbeginn getöteten Kontrolltieren. Die Zuverlässigkeit dieses Befundes wird dadurch unterstützt, dass eine klare Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden kann. Dabei kommt es bei der höchsten hier angewandten Leptindosis von 461 pmol/d zu einer signifikanten 29%igen Reduktion der FFDM innerhalb des 59-tägigen Behandlungszeitraumes, die immerhin 7% der Körpermassenabnahme in diesem Zeitraum erklärt. Aufgrund dieser Ergebnisse muss – trotz des nicht nachzuweisenden Effekts der Leptinbehandlung auf die FFDM der noch wachsenden, jüngeren *ob/ob*-Mäuse – neben der generell akzeptierten lipolytischen Leptinwirkung zusätzlich von einer Reduktion der FFDM im Verlauf der Leptinbehandlung ausgegangen werden.

Der Rückgang der fettfreien Masse bzw. der FFDM infolge einer Leptinbehandlung konnte auch in anderen Studien an *ob/ob*-Mäusen sowie Wildtyp-Tieren nachgewiesen werden. So wurde bereits nach einer 7- bzw. 12-tägigen intraperitonealen Leptininfusion (62-2600 pmol/d) bei *ob/ob*-Mäusen für diverse Organe wie Herz, Nieren, Bauchspeicheldrüse und Nebennieren ein Gewichtsrückgang beobachtet (Harris et al., 1998; Levin et al., 1996). Halaas et al. (1995) wiesen am Ende einer 32-tägigen Behandlung mittels intraperitonealer Leptininjektionen (20 nmol/d) bei *ob/ob*-Mäusen einen 76%igen signifikanten Rückgang der Fettmasse nach, wobei die gleichzeitige 10%ige Reduktion der fettfreien Masse allerdings aufgrund der großen Streuung das Signifikanzniveau nicht erreichte. In der Studie von Rafael & Herling (2000) wurde dagegen bei einer 15-tägigen Leptininfusion (380 pmol/d) das Signifikanzniveau hinsichtlich der Reduktion der fettfreien Masse (7%) erreicht, auch hier

beruhen aber 74% der Körpermassenabnahme auf einer Reduktion der Körperfettmasse. Aufgrund der im Vergleich zur deutlich nachweisbaren Reduktion der Fettmasse relativ schwachen Reduktion der FFDM infolge einer Leptinbehandlung wird deutlich, warum in Studien an juvenilen und adulten Wildtyp-Tieren das Signifikanzniveau bei der statistischen Auswertung dieser Veränderung selten erreicht wird (Döring, 2000; Eiden et al., 2001; Kraeft et al., 1999; Stehling et al., 1997; Chen & Heiman, 2000).

Die Frage, ob der mehrfach beobachtete Rückgang der FFDM infolge einer Leptinbehandlung auf einen zentral vermittelten oder möglicherweise direkten peripheren Leptineffekt zurückzuführen oder lediglich als sekundäre Veränderung einzustufen ist, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht abschließend beantwortet werden. Ein direkter Effekt der Leptinbehandlung dürfte aber eher unwahrscheinlich sein. Weitaus wahrscheinlicher erscheint die Überlegung, dass aufgrund der infolge der Leptinbehandlung stark verminderten Futteraufnahme in Kombination mit dem Abbau des Fettgewebes als endogenem Energiespeicher ein Glukosemangel auftritt, dem durch den Abbau von körpereigenen Proteinen entgegengewirkt wird. Zusätzlich könnte bei den extrem adipösen *ob/ob*-Mäusen eine Entlastung des Skeletts und der Muskulatur sowie verschiedener Organe im Zuge der starken Körpermassenabnahme eine Rolle spielen. Diese Überlegungen werden durch die Studie von Rafael & Herling (2000) gestützt, in der zwar während der ersten 2 Wochen der Leptinbehandlung eine deutliche Reduktion der FFDM beobachtet wurde, die allerdings in den nachfolgenden 60 Tagen nur noch sehr langsam voranschritt.

#### **4.1.3 Leptineffekt auf den Sauerstoffverbrauch von *ob/ob*-Mäusen**

##### 4.1.3.1 Einflussgrößen, die bei der Feststellung eines Leptineffekts auf den Sauerstoffverbrauch von *ob/ob*-Mäusen zu berücksichtigen sind

Bei Wildtyp-Tieren kann eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs infolge einer Leptinbehandlung nur unter Bedingungen beobachtet werden, unter denen es bei unbehandelten Tieren im Tagesverlauf zu einer vorübergehenden Absenkung der sympathisch aktivierten thermoregulatorischen Thermogenese kommt, wie dies für die Säuglingsphase von Ratten (Stehling et al., 1996) und für adulte Mäuse und Marsupialier bei limitierter Futterversorgung (Döring et al., 1998; Döring, 2000; Geiser et al., 1998) gezeigt werden konnte. Dabei scheint Leptin grundsätzlich nicht in der Lage zu sein, den Stoffwechsel über das Normalniveau hinaus zu erhöhen; es kann nur energetisch bedingte Stoffwechseleinsparungen aufheben (Schmidt et al., 1997). Die metabolischen, hormonellen und neuroendokrinen Abnormalitäten,

die bei den Leptin-defizienten *ob/ob*-Mäusen zu beobachten sind, ähneln den Symptomen eines anhaltenden Hungerzustandes (Bray & York, 1979; Coleman, 1978). Dabei zeigen diese Mäuse u.a. bei einer normalen Haltungstemperatur von 22-26°C eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erniedrigte Körpertemperatur (Himms-Hagen et al., 1986; Pelley-mounter et al., 1995). Als Ursache dafür ist – ähnlich wie bei Wildtyp-Mäusen mit limitiertem Futterzugang (Döring et al., 1998; Döring, 2000) – eine verminderte thermoregulatorische Thermogenese infolge von torporartigen Absenkungen des Sauerstoffverbrauchs innerhalb der täglichen Ruhephase anzusehen (Himms-Hagen, 1985; Webb, 1982). Durch die Aufhebung dieser Stoffwechseleinsparungen dürfte folglich eine Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen in der Lage sein, neben der Reduktion der Futterraufnahme den täglichen Energieumsatz zu steigern.

Bereits in den ersten Studien, die sich mit der Leptinwirkung bei *ob/ob*-Mäusen beschäftigten, wurde ein steigernder Leptineffekt auf den Energieverbrauch dieser Mäuse postuliert (Pelley-mounter et al., 1995; Halaas et al., 1995). Bei den zugrunde liegenden Messungen sind allerdings verschiedene Einflussfaktoren zu berücksichtigen, die den eindeutigen Nachweis einer stoffwechselsteigernden Leptinwirkung erschweren. Grundsätzlich führen Kurzzeit-Messungen ohne ausreichende Adaptation der Tiere zu Fehlaussagen aufgrund der stressbedingten Veränderung des Sauerstoffverbrauchs, zusätzlich zu der Vernachlässigung der Veränderung der Messgröße im Tagesverlauf, die gerade im Hinblick auf die Leptinwirkung von besonderer Bedeutung ist. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund eine kontinuierliche Sauerstoffmessung durchgeführt, mit der erst nach einer 6-tägigen Adaptation an die Haltungsbedingungen in der Klimakammer begonnen wurde. Obwohl somit methodisch bedingte Verfälschungen der Sauerstoffmessdaten weitgehend vermieden wurden, ergaben sich aufgrund der starken Veränderungen von Futterraufnahme und Körpermasse im Verlauf der Leptinbehandlung weitere Probleme. So kommt es im Zuge einer verminderten Energieaufnahme zwangsläufig zu einer Reduktion der obligatorischen diätinduzierten Thermogenese (Kleiber, 1975; Garrow, 1994; Rothwell & Stock, 1983). Im Gegensatz zur fakultativen sympathisch vermittelten diätinduzierten Thermogenese kann diese unregulierte Stoffwechselkomponente naturgemäß nicht durch eine Leptinbehandlung beeinflusst werden.

Dass nicht nur die Futtermenge sondern auch der zeitliche Verlauf der Futterraufnahme einen Einfluss auf die Stoffwechselrate ausüben, muss im Hinblick auf die häufig zur Kontrolle durchgeführten "*pair-feeding*"-Experimente erwähnt werden. In den meisten Studien, in denen ein stoffwechselsteigernder Leptineffekt beschrieben wird, beruht diese Aussage auf dem Vergleich zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und "*pair-fed*"-Tieren, die

definitionsgemäß eine zu den behandelten Tieren identische Menge an Futter erhalten (Rafael & Herling, 2000; De Souza et al., 2000; Levin et al., 1996). Auf diese Weise scheint ein Einfluss der unterschiedlichen Futteraufnahme auf den Stoffwechsel der Tiere ausgeschlossen zu werden. Allerdings ist seit längerem bekannt, dass das dabei auftretende "*meal eating*", d.h. der komplette Verzehr der reduzierten Futtermenge innerhalb weniger Stunden zu Beginn der Aktivitätsphase gefolgt von einer anschließenden Hungerphase, zu einer Veränderung des Stoffwechsels führt (Spangler & Johnson, 1981). Breslow et al. (1999) konnten zudem zeigen, dass das "*pair-feeding*" von *ob/ob*-Mäusen zu einer im Vergleich zu der Leptinbehandlung qualitativ unterschiedlichen Veränderung der Körperzusammensetzung bei vergleichbarer Körpermassenabnahme führt, so dass dieser Versuchsansatz nicht zu einer Klärung der Leptinwirkung auf den Stoffwechsel der Tiere herangezogen werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund auf einen solchen Vergleich verzichtet.

Die während einer starken Körpermassenabnahme auftretende Veränderung der Körperzusammensetzung führt zu Veränderungen des Basalstoffwechsels. Dazu trägt vermutlich nur zu einem geringen Teil die Reduktion der Körperfettmasse bei, da dieses Gewebe als relativ Stoffwechsel-inaktiv angesehen wird (Jequier & Tappy, 1999). Einen deutlich größeren Einfluss hat prinzipiell die Veränderung der Stoffwechsel-aktiven fettfreien Masse. Bei den hier untersuchten sich noch im Wachstum befindlichen *ob/ob*-Mäusen nahm diese allerdings im Versuchsverlauf sogar noch um 25% zu, so dass eine Reduktion des Basalstoffwechsels eher auszuschließen ist.

Neben dem Einfluss der Futteraufnahme- und Körpermassen-Veränderung muss schließlich auch der zeitliche Aspekt berücksichtigt werden. So ist es durchaus vorstellbar, dass sich die Qualität der Leptinwirkung im Behandlungsverlauf ändert, in dem Maße wie sich die Abnormalitäten der *ob/ob*-Mäuse normalisieren. Letztendlich müssen als weitere sekundäre Einflussgrößen, die allerdings zu einer dem Leptineffekt gleichgerichteten Veränderung des Stoffwechsels beitragen dürften, auch der größere Wärmeverlust (Breslow et al., 1999) infolge der zunehmenden Normalisierung der Körpermasse der *ob/ob*-Mäuse sowie die Zunahme der zuvor deutlich verminderten lokomotorischen Aktivität (Pelleymounter et al., 1995; Dauncey, 1986) erwähnt werden. Da bei lokomotorischer Aktivität allerdings der Energieaufwand proportional zum Gewichtsverlust abnimmt, könnte eine tatsächliche Steigerung des Energieverbrauchs nur durch die parallele Untersuchung von Aktivität und Sauerstoffverbrauch sicher nachgewiesen werden. Aufgrund der Vielzahl der genannten Einflussfaktoren erscheint es durchaus vorstellbar, dass ein steigender Leptineffekt auf den

Sauerstoffverbrauch der *ob/ob*-Mäuse durch eine gegenläufige Stoffwechselreduktion, bedingt durch den starken Rückgang der Futterraufnahme und der Körpermasse, überdeckt sein könnte und aus diesem Grund nicht nachweisbar ist.

#### 4.1.3.2 Befunde der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte kein steigender Leptineffekt auf die Stoffwechselrate von *ob/ob*-Mäusen nachgewiesen werden, der energetisch neben der reduzierten Futterraufnahme zu der rapiden Körpermassenabnahme der Tiere beigetragen hätte. Der beobachtete Anstieg des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs scheint allein auf der gewählten Normierung auf der Basis der stark zurückgehenden Körpermasse zu beruhen (Himms-Hagen, 1997; Breslow et al., 1999). Interessanterweise ist gerade beim massenspezifischen Sauerstoffverbrauch – wie schon für die Futterraufnahme besprochen (4.1.1) – ein Einfluss der Pumpenimplantationen zu erkennen, der in diesem Fall eventuell mit einem vorübergehenden operationsbedingten Körpermassenverlust zusammenhängen könnte. Bei Betrachtung des energetisch ausschlaggebenden Sauerstoffverbrauchs pro Gesamttier zeigt sich dagegen, dass es im Laufe der Leptinbehandlung zu einer leichten Abnahme des Sauerstoffverbrauchs kommt. Dabei ist wie schon für die Futterraufnahme ein leichter Anstieg im Behandlungsverlauf erkennbar, so dass in der zweiten Hälfte der Behandlungsperiode der Unterschied zu den während des Vorlaufs gemessenen Werten nur mehr -7% beträgt.

Um eine Veränderung der Körpermasse bzw. Körperzusammensetzung als Einflussgröße auf den Sauerstoffverbrauch sowie eine mögliche zeitliche Veränderung der Qualität der Leptinwirkung weitgehend auszuschließen, wurden die Tagesverläufe des Sauerstoffverbrauchs während des Vorlaufs und der ersten Tage nach Behandlungsbeginn miteinander verglichen. Der leichte Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in der Ruhephase des 2. und 3. postoperativen Tages lässt einen Leptineffekt vermuten, ab dem 4. Behandlungstag erreicht der Sauerstoffverbrauch aber wieder die im Vorlauf zu beobachtenden Minimumwerte. Bei Betrachtung der Vorlauf-Mittelwerte muss erwähnt werden, dass die Tiere zu Beginn der Ruhephase eine torporartige Absenkung im Sauerstoffverbrauch zeigen, die allerdings – in Übereinstimmung mit Literaturbefunden (Webb et al., 1982) – unter der *ad libitum*-Fütterung relativ schwach ausgeprägt war. Da zudem bei Betrachtung der Einzelwerte zu erkennen war, dass diese geringe Ausprägung auch darauf beruhte, dass der Sauerstoffverbrauch nur von maximal zwei der sieben untersuchten Tiere zu diesem Zeitpunkt auf Werte von unter 0,9 ml/min fiel, stellt sich die Frage, ob die vermutete stimulierende Leptinwirkung auf den Sauerstoffverbrauch unter diesen Bedingungen ausreichend detektierbar ist.



Interessanterweise hält sich der Tagesmittelwert des Sauerstoffverbrauchs während der ersten 4 Behandlungstage trotz der sofort einsetzenden Futterreduktion und der somit zwangsläufig reduzierten obligatorischen diätinduzierten Thermogenese zunächst auf einem relativ stabilen hohen Niveau. Da für eine Leptinbehandlung bei Wildtyp-Tieren bisher niemals eine eindeutige Stoffwechselsteigerung über das Normalniveau sondern nur eine Disinhibierung einer sympathisch vermittelten Stoffwechselreduktion nachgewiesen werden konnte (Stehling et al., 1996; Döring et al., 1998; Döring, 2000; Geiser et al., 1998; Schmidt et al., 1997), gibt es für diesen Befund zur Zeit keine hinreichende Erklärung. Die Frage, ob Leptin in diesem Zusammenhang in der Lage ist, die sympathisch vermittelte fakultative diätinduzierte Thermogenese in einem quantitativ ausschlaggebenden Ausmaß zu steigern, wurde bisher noch nicht untersucht. Inwieweit in den ersten Behandlungstagen bei noch relativ hoher Körpermasse bereits eine aktivitätsbedingte Steigerung des Sauerstoffverbrauchs eintritt, kann auf der Basis von Studien, die eine Veränderung dieses Parameters zu einem späteren Zeitpunkt der Leptinbehandlung beobachtet haben (Pellemounter et al., 1995), nur vermutet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse einen direkten Leptineffekt auf den Sauerstoffverbrauch der *ob/ob*-Mäuse in den ersten Behandlungstagen – auf der Basis einer Disinhibierung der torporartigen Absenkungen des Sauerstoffverbrauchs in der Ruhephase – vermuten lassen. Der tagesrhythmische Verlauf des Sauerstoffverbrauchs an den nachfolgenden Tagen scheint einen solchen Leptineffekt im weiteren Versuchsverlauf aber weitgehend auszuschließen. Im Hinblick auf die gezielte Untersuchung der Leptinwirkung auf den Sauerstoffverbrauch dieses Mäusestammes müsste der Versuch an ausgewachsenen Tieren mit einer größeren N-Zahl wiederholt werden, wobei sich durch eine längere Aufzeichnung des Vorlaufs und den Wegfall der zusätzlichen Leptininjektionen möglicherweise ein klarerer Befund für die Leptin-spezifische Veränderung des Sauerstoffverbrauchs während einer Langzeit-Behandlung von *ob/ob*-Mäusen ergibt, die in eintägigen Versuchen auf der Basis von tagesperiodischen Verlaufskurven mittlerweile klar nachgewiesen werden konnte (Hwa et al., 1997). Unabhängig von einem solchen Leptineffekt muss aber im Hinblick auf die massive Körpermassenabnahme der *ob/ob*-Mäuse während der Leptinbehandlung klar festgehalten werden, dass es bei den hier untersuchten Mäusen selbst in den ersten Tagen nie zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs im Tagesmittel kam, so dass energetisch der starke Gewichtsverlust der Tiere allein auf die reduzierte Futterraufnahme zurückzuführen ist, während Leptinwirkungen auf den Energieumsatz in diesem Zusammenhang nicht ins Gewicht fallen.

#### 4.1.4 Dosisabhängigkeit der Leptinwirkung

##### *4.1.4.1 Zusammenhang zwischen Leptindosis und Plasmaleptinspiegel*

Die Verwendung von osmotischen Mini-Pumpen in der vorliegenden Arbeit bietet gegenüber Bolusinjektionen den Vorteil, dass es zu einer gleichmäßigen Erhöhung des Plasmaleptinspiegels kommt, dessen Höhe zu jedem beliebigen Zeitpunkt durch die Entnahme einer Blutprobe und die anschließende Bestimmung der Plasmaleptin-Konzentration mit Hilfe eines Radioimmunoassays festgestellt und in Bezug zu der applizierten Leptindosis gesetzt werden kann. Grundsätzlich liegen die durch die Infusion von rekombinantem Leptin erzielten Plasmaleptin-Konzentrationen von bis zu 9 ng/ml in einem Bereich, der bei unbehandelten Wildtyp-Tieren bei Standarddiät-Fütterung beobachtet werden kann (Döring, 2000), die hier angewandten Leptin-Dosierungen sind somit als "physiologisch" anzusehen. Wie zu erwarten spiegeln sich Unterschiede in der verabreichten Leptindosis unabhängig von der Versuchsgruppe in den Plasmaleptin-Konzentrationen wider (Harris et al., 1998; Eiden et al., 2001; Halaas et al., 1997; Ahima et al., 1999b; Cumin et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit ist dabei allerdings eine klare Dosisabgrenzung aufgrund der relativ großen Streuung innerhalb einer Dosisgruppe vor allem bei den niedrigen Dosierungen nicht immer gegeben (siehe Abb. 9). Die sich trotz der zum Teil unscharfen Trennung zwischen den verschiedenen Dosisgruppen ergebende enge Korrelation zwischen dem Plasmaleptinspiegel und dem Körperfettgehalt der Mäuse am Versuchsende zeigt allerdings, dass die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Plasmaleptin-Konzentrationen sehr gut mit der tatsächlich wirksamen Konzentration übereinzustimmen scheinen, so dass Messfehler bei der Plasmaleptin-Bestimmung als Ursache für die beobachtete Überlappung der verschiedenen Dosisbereiche weitgehend auszuschließen sind. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass der in der Arbeitsgruppe seit Jahren etablierte Radioimmunoassay erfahrungsgemäß sehr zuverlässige und präzise Ergebnisse liefert.

Neben den interindividuellen Schwankungen kommt es im zeitlichen Verlauf der Leptinbehandlung zu Schwankungen des Plasmaleptinspiegels der Einzeltiere, die mit steigender Dosis zuzunehmen scheinen. Durch die bereits zuvor (4.1.1) erwähnte Überprüfung der Lage und des Restinhaltes der Pumpe ist eine unterschiedliche Ausflussrate als Ursache für die inter- und intraindividuellen Unterschiede im Plasmaleptinspiegel eher unwahrscheinlich. Auch eine Konzentrationsverminderung des Pumpeninhaltes infolge bakterieller Zersetzung bei Tieren mit einem relativ niedrigen resultierenden Plasmaleptinspiegel ist aufgrund der sterilen Befüllung der Pumpen weitgehend ausgeschlossen. Zudem konnte durch eine

Kontroll-Behandlung von zwei Tieren mit den gepoolten Pumpenresten aus drei nach der üblichen Zeit entnommenen Pumpen der Versuchsgruppe A3 eine normale Futterreduktion bei Wildtyp-Tieren erzielt werden (nicht gezeigt). Inwieweit individuell unterschiedliche Eliminationsraten als Ursache für die Variationen im Plasmaleptinspiegel zwischen Tieren der gleichen Dosisgruppe in Betracht gezogen werden müssen, kann hier nur vermutet werden. Bisher konnte allerdings keine spezifische Kontrolle der renalen Leptin-clearance nachgewiesen werden, sie scheint lediglich eine Funktion der Leptin-Konzentration im Plasma zu sein (Cumin et al., 1996 & 1997). Inwieweit die Veränderung der Körperzusammensetzung bzw. anderer Parameter im Verlauf der Leptinbehandlung die Eliminationsrate beeinflussen, ist fraglich und die ungerichtete zeitliche Veränderung der Plasmaleptin-Konzentrationen spricht gegen einen solchen Zusammenhang.

#### 4.1.4.2 Dosisabhängige Leptinwirkung auf die Futteraufnahme, Körpermasse und Körperzusammensetzung von *ob/ob*-Mäusen

Grundsätzlich ist die Dosisabhängigkeit der Leptinwirkung auf die Futteraufnahme bzw. auf die Abnahme von Körpermasse und Körperfettgehalt bereits in mehreren Studien beschrieben worden, wobei die zugrunde liegenden Untersuchungen sowohl an Wildtyp-Tieren (Eiden et al., 2001; Halaas et al., 1997; Ahima et al., 1999b) wie an *ob/ob*-Mäusen durchgeführt wurden (Pellemounter et al., 1995; Harris et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch zum ersten Mal die dosisabhängige Stabilisierung einer neuen Körpermasse gegen Ende einer Langzeit-Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen gezeigt werden. Durch die Studie von Rafael & Herling (2000) war bereits vor Versuchsbeginn bekannt, dass es im Verlauf der Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen zu der Einstellung eines Gleichgewichts kommt, in dem die Körpermasse sich auf einem niedrigen Wert stabilisiert und die Futteraufnahme im Vergleich zum Vorlaufwert moderat erniedrigt ist. Bei der Wiederholung dieses Versuchsansatzes unter normalen Haltungsbedingungen und unter Anwendung drei verschiedener Leptin-Dosierungen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Höhe dieses neuen Körpermasse-Niveaus dosisabhängig ist. Interessanterweise ist dabei der zeitliche Verlauf dosisunabhängig. So wird der Endwert in allen drei Dosisgruppen nach etwa 30 Tagen erreicht. Der Dosisunterschied zeigt sich allein in der Stärke der Futterreduktion und in der Körpermassenabnahme pro Zeiteinheit, wie dies bereits in den kürzeren Studien gezeigt werden konnte (Pellemounter et al., 1995; Harris et al., 1998).

#### 4.1.4.3 Dosisabhängige Leptinwirkung auf den Plasmainsulinspiegel von ob/ob-Mäusen

Neben der Normalisierung der Körpermasse führt eine Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen zu der Normalisierung weiterer Parameter, wobei es u.a. auch zu einer deutlichen Abnahme des zuvor extrem erhöhten Plasmainsulinspiegels in Kombination mit einer Normalisierung der Hyperglykämie kommt (Halaas et al., 1995; Levin et al., 1996; Stephens et al., 1995; Weigle et al., 1996; Picard et al., 1998; Huang et al., 1999). Die Dosisabhängigkeit zeigt sich dabei im Grad der Normalisierung (Pellemounter et al., 1995; Harris et al., 1998). Hinsichtlich der Frage, ob diese Veränderung der Plasmainsulin-Konzentrationen ein direkter Leptineffekt ist oder als sekundäre Veränderung infolge der Reduktion der Futteraufnahme und der resultierenden Abnahme der Körpermasse/des Körperfettgehaltes einzustufen ist, ist der hier erhobene Befund interessant, dass es bereits innerhalb der ersten 8 Tage zu einer massiven Reduktion des Plasmainsulinspiegels kommt (siehe Abb. 10), die im weiteren Verlauf der Leptinbehandlung nur noch wenig voranschreitet, obwohl die Körpermasse – zumindest bis zum 30. Behandlungstag – weiterhin abnimmt. Damit übereinstimmend konnten Pellemounter et al. (1995) als Folge von intraperitonealen Injektionen in einer Dosis von 0,1 mg/kg, die keine Abnahme der Körpermasse induzierten, eine signifikante Verminderung des Seruminsulin- und Serumglukosespiegels feststellen. Eine alleinige sekundäre Veränderung des Plasmainsulinspiegels aufgrund der Abnahme der Körpermasse, im Speziellen der Fettmasse, scheint somit eher unwahrscheinlich. Nach der anfänglich starken Reduktion könnte der allmähliche Anstieg der Futteraufnahme im Behandlungsverlauf für die relative Stabilität des Plasmainsulinspiegels nach dem 15. Behandlungstag verantwortlich sein.

Dass zudem direkte Leptineffekte auf die Insulin-Expression bzw. -Sekretion eine zusätzliche Rolle spielen müssen, lassen Studien vermuten, die innerhalb von 2 Stunden nach der Leptininjektion eine deutliche Veränderung des Plasmainsulinspiegels feststellen konnten (Cases et al., 2001; Nowak et al., 1998). Allerdings sind die in der Literatur beschriebenen Befunde zu der Existenz bzw. Art eines direkten Leptineffekts auf die Insulin-Sekretion sehr widersprüchlich. So beschreibt die Mehrzahl der *in vitro*-Studien zwar einen hemmenden Leptineffekt auf die Insulin-Sekretion, der vermutlich über Leptinrezeptoren innerhalb der Bauchspeicheldrüse vermittelt wird (Emilsson et al., 1997; Kulkarni et al., 1997; Kieffer et al., 1997). *In vivo* führt eine Leptinbehandlung bei Mäusen zu einem Abfall des Plasmainsulinspiegels in Kombination mit einem Anstieg der Plasmaglukose-Konzentration (Kulkarni et al., 1997; Harris et al., 1998). Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass die vermutete Interaktion nur ein sekundäres Phänomen aufgrund der für beide Hormone beschriebenen Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel und die Fettdeposition ist (Harris et

al., 2000). Zudem können die Ergebnisse von Untersuchungen an Wildtyp-Tieren nicht direkt auf die Situation bei *ob/ob*-Mäusen übertragen werden (Poitout et al., 1998), so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine gesicherte Aussage über die Mechanismen der Leptin-induzierten Reduktion des Plasmainsulinspiegels und der Wiederherstellung der Insulinresponsivität bei *ob/ob*-Mäusen gemacht werden kann.

#### 4.1.4.4 Einfluss des Ausgangsgewichts auf die Leptinwirkung bei *ob/ob*-Mäusen

Interessanterweise zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass die Stärke der Leptin-induzierten Veränderung der untersuchten Parameter von der Situation vor Behandlungsbeginn abhängt. So kann eine klare Dosisabhängigkeit nur bei dem Vergleich von *ob/ob*-Mäusen gleichen Alters und ausgangsmäßig gleicher Körpermasse festgestellt werden. Werden zusätzlich die Ergebnisse der Leptinbehandlung bei 3 Monate jüngeren, deutlich leichteren und sich noch im Wachstum befindlichen Mäusen in den Vergleich mit einbezogen, zeigt sich, dass die Leptinbehandlung bei diesen jüngeren Mäusen eine im Verhältnis zur Leptindosis "zu starke" Reaktion auslöst. Dies gilt sowohl für die Stärke der Futterreduktion nach Behandlungsbeginn wie für die gegen Ende der Leptinbehandlung erreichte Körpermasse und die Normalisierung der Plasmainsulin-Konzentrationen. Im Falle der Körpermasse zu Versuchsende konnte ein Versuchsgruppen-unabhängiger Zusammenhang erst durch die Auftragung gegen die massenspezifische Dosis – durch Berücksichtigung der Körpermasse vor Behandlungsbeginn – hergestellt werden. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen machte sich zudem in der Behandlungsdauer bis zur Stabilisierung des neuen Körpermasse-Niveaus bemerkbar, da dieser Zeitpunkt bei den jüngeren Mäusen bereits nach ca. 15 Behandlungstagen, bei der älteren Gruppe dosisunabhängig erst nach etwa 30 Tagen erreicht war. Die Messung des Plasmaleptinspiegels konnte zeigen, dass dieser Unterschied nicht darauf beruht, dass es bei der gleichen Leptindosis pro Tier aufgrund der geringeren Körpermasse oder einer veränderten Pharmakokinetik bei den jüngeren Mäusen zu einem überproportional erhöhten Plasmaleptinspiegel kommt. Auf der Basis des Plasmaleptinspiegels und des bei Versuchsende erreichten Körperfettgehalts der Tiere kann schließlich auch eine klare, altersunabhängige Korrelation nachgewiesen werden (siehe Abb. 9).

Auch nach über 7 Jahren der intensiven Leptinforschung ist bislang nicht vollständig geklärt, welcher Parameter die Zielgröße für die Regulation durch Leptin ist. Grundsätzlich schien die absolute Fettmenge eine geeignete regulierbare Größe zu sein, was durch Studien unterstützt wurde, die einen engen Zusammenhang zwischen dem Plasmaleptinspiegel und der Körperfettmasse herstellen konnten (Frederich et al., 1995; Rosenbaum et al., 1996). Während der

Wachstumsphase erscheint es allerdings wenig sinnvoll, die absolute Größe der körpereigenen Fettspeicher zu kontrollieren, ohne dass diese in Bezug zu dem Rest des Körpers gesetzt werden. Für Wildtyp-Ratten konnte gezeigt werden, dass eine gemeinsame Regression für 24 und 34 Tage alte Tiere nur erstellt werden kann, wenn der Plasmaleptinspiegel gegen den prozentualen Körperfettgehalt aufgetragen wird, bei einem Bezug auf die absolute Fettmasse sind die Plasmaleptin-Werte für die jüngeren Ratten jedoch signifikant nach oben verschoben (Eiden et al., 2001). Auch in anderen Studien wurde der enge Zusammenhang zwischen dem endogenen Plasmaleptinspiegel und dem prozentualen Körperfettgehalt gezeigt (Considine et al., 1996). Umgekehrt konnte in der vorliegenden Arbeit ein ebenfalls altersunabhängiger Zusammenhang zwischen dem durch die Leptinbehandlung erhöhten Plasmaleptinspiegel und dem prozentualen Körperfettgehalt am Ende der Behandlungsphase gezeigt werden. Obwohl also die Leptin-induzierte Veränderung einzelner Parameter stark von ihrem Ausgangsniveau abhängt, kann die Dosisabhängigkeit klar auf Basis des resultierenden Körperfettgehaltes nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist es eher unwahrscheinlich, dass das Alter, die Entwicklungsphase bzw. der Ausprägungsgrad der metabolischen, hormonellen und neuroendokrinen Abnormalitäten der *ob/ob*-Mäuse einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität und Quantität der Leptinwirkung bei der Regulation des Körperfettgehaltes ausüben.

#### **4.1.5 Warum kommt es zur Einstellung einer neuen stabilen Körpermasse infolge der Leptinbehandlung bei *ob/ob*-Mäusen?**

##### 4.1.5.1 Mögliche Ursachen für die Stabilisierung der Körpermasse

Rafael & Herling (2000) postulieren, dass die Einstellung einer stabilen Körpermasse am Ende der Leptinbehandlung die Folge der geleerten endogenen Fettspeicher sei, infolgedessen die Futterraufnahme gezwungenermaßen wieder auf ein mittleres Niveau ansteigt und so eine weitere Abnahme der Körpermasse unterbunden wird. Auch in zwei anderen Studien wird diese Theorie vertreten (Halaas et al., 1997; Friedman & Halaas, 1998). Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde, kann diese Hypothese klar widerlegt werden. Durch die Anwendung verschiedener Leptin-Dosierungen konnte gezeigt werden, dass es auch bei der niedrigen Leptindosis (116 pmol/d) zu der Stabilisierung einer neuen Körpermasse kommt, die allerdings mit etwa 45 g bei weitem noch nicht das Niveau von gleichaltrigen, normalgewichtigen Wildtyp-Mäusen desselben Stamms erreicht, das maximal 28 g beträgt (eigene Beobachtungen). Wie bereits die Körpermasse vermuten lässt, zeigt die Überprüfung der Körperzusammensetzung am Versuchsende, dass die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch einen Körperfettgehalt von 34% besitzen, was etwa einer Verdopplung im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen entspricht. Die endogenen Fettspeicher sind folglich noch nicht vollständig geleert. Es müssen somit andere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass es während der Langzeit-Leptinbehandlung zu einer kompensatorischen "*downregulation*" der entsprechenden Leptinrezeptoren und somit zu einer Abnahme der Leptinresponsivität im Behandlungsverlauf kommt. Grundsätzlich konnte für unbehandelte *ob/ob*-Mäuse eine erhöhte Konzentration an Leptinrezeptor-mRNA im Hypothalamus festgestellt werden (Huang et al., 1997). In dieser Studie wird als mögliche Ursache ein fehlender negativer Rückkopplungs-Mechanismus durch die Bindung von Leptin an diese Rezeptoren angesprochen. Durch die exogene Zufuhr von funktionellem Leptin könnte folglich diese Hemmung wiederhergestellt werden und so die Rezeptordichte abnehmen. Auf der Basis von *in vitro*-Versuchen konnte eine "*downregulation*" der Leptinrezeptor-Zahl infolge einer Leptin-Inkubation beobachtet werden (Uotani et al., 1999). Dieser Effekt fand allerdings innerhalb der ersten 2 Stunden nach Beginn des Versuches statt. Auch wenn dieser Befund nicht direkt auf *in vivo*-Bedingungen übertragen werden kann, muss davon ausgegangen werden, dass sich eine mögliche Leptin-induzierte "*downregulation*" der Rezeptordichte – bzw. eine Normalisierung im Fall der *ob/ob*-Mäuse – innerhalb der ersten Stunden bzw. Tage nach Beginn der Leptinbehandlung abspielt. Um die Existenz eines längerfristigen Mechanismus zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit während der Langzeit-Leptininfusion zusätzliche Leptininjektionen durchgeführt. Die Wirkung dieser Injektionen wurde auf der Basis der Futteraufnahme und des Sauerstoffverbrauchs ausgewertet. Obwohl durch die Dynamik dieser beiden Parameter infolge der Leptininfusion die Auswertung der Zusatzinjektionen etwas problematisch ist, lässt der – bis auf eine Ausnahme – durchgehende Nachweis eines signifikanten Unterschieds in der Futteraufnahme (siehe Abb. 5) zwischen dem jeweiligen Effekttag und den entsprechenden Vor- und Nachlauftagen die Aussage zu, dass sich die Leptinresponsivität der *ob/ob*-Mäuse im Verlauf der Leptinbehandlung nicht verringert. Eine Verminderung der Leptinrezeptor-Dichte als Ursache für die Einstellung eines stabilen Körpermasse-Niveaus gegen Ende der Leptinbehandlung ist folglich eher unwahrscheinlich.

#### 4.1.5.2 Komplexe Regulation des Energiehaushaltes

In Parabiose-Versuchen zwischen *db/db*-Mäusen und Wildtyp-Mäusen starb der vormals normalgewichtige Partner im Versuchsverlauf durch Verhungern (Coleman & Hummel, 1969). Der gleiche Befund ergab sich, wenn *ob/ob*-Mäuse mit *db/db*-Mäusen operativ verbunden wurden (Coleman, 1978). Obwohl methodische Probleme bei dieser Technik

durchaus wahrscheinlich sind, wurde zunächst die extreme Hyperleptinämie der *db/db*-Mäuse und deren "maßlose" Wirkung bei dem jeweiligen Partnertier mit intakten Leptinrezeptoren als Ursache für diesen Befund angesehen. Diese Erklärung genügt allerdings im Hinblick auf die mittlerweile durchgeführten Leptinbehandlungen bei adipösen und Wildtyp-Tieren, die in keinem Fall zu dem Tod der behandelten Tiere führten, nicht mehr. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass ein oder mehrere weitere Faktoren existieren, die in den Parabiose-Experimenten das übliche Nachlassen der Leptinwirkung verhindern und so zu dem Tod der Tiere führen (Halaas et al., 1997; Friedman & Halaas, 1998). Unabhängig von dieser auf die methodisch nicht unumstrittenen Parabiose-Versuche gestützten Theorie, muss aufgrund der Wichtigkeit einer adäquaten Regulation des Energiehaushalts für das Überleben eines Individuums von einer redundanten Absicherung des Leptin-Systems ausgegangen werden. Diese Absicherung sollte vor allem bei einem längerfristigen Auftreten einer negativen Energiebilanz greifen und ein Verhungern verhindern (Ahima et al., 1996). Dass diese Gegenregulation – wie dies in der vorliegenden Arbeit im Fall der mit Leptin behandelten *ob/ob*-Mäuse beobachtet werden konnte – bereits deutlich früher einsetzt, als dass die reale Gefahr eines Verhungerns gegeben wäre, und zudem eine Abhängigkeit von der Höhe des exogen manipulierten Plasmaleptinspiegels zeigt, ist in diesem Zusammenhang besonders interessant. Die Befunde der vorliegenden Arbeit sind somit ein klarer Beweis für die Existenz weiterer, neben dem Leptinsystem aktiv in die Regulation des Energiehaushalts eingreifender und die Größe der Körperfettspeicher signalisierender Systeme. Die Identität und Anzahl dieser Systeme sowie die genauen Mechanismen, die der komplexen Interaktion zugrunde liegen, können im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur im Ansatz erarbeitet werden. Im Folgenden werden daher exemplarisch zwei Systeme, zum einen das Glukokortikoid-System, zum anderen das Amylin-System, und ihre Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes eingehender betrachtet.

## **4.2 DIE HPA-ACHSE UND IHRE ROLLE BEI DER REGULATION DES ENERGIEHAUSHALTES**

### **4.2.1 Das Modell der GR<sup>NesCre</sup>-Maus**

Um die Funktion der HPA-Achse, im Speziellen der zentralen Glukokortikoid-Rezeptoren, bei der Körpergewichtsregulation zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse untersucht, die aufgrund eines gewebsspezifischen Knockouts einen GR-Defekt innerhalb des



Zentralnervensystems aufweisen. Infolge dieses genetischen Defekts unterscheiden sich die GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse in ihrer postnatalen Entwicklung von ihren Wildtyp-Geschwistern und zeigen eine durchgehende Wachstumshemmung, die allerdings während der Säuglingsphase mit einem Anstieg des prozentualen Fettgehaltes und erst nach dem Absetzen mit einer reduzierten Fettdeposition kombiniert ist. Bei der Analyse der Ursachen dieser Störung sind neben den unmittelbaren Auswirkungen des zentralen GR-Defekts auf die HPA-Achse und den damit verbundenen primären Störungen ebenso sekundäre neuroendokrine Änderungen zu berücksichtigen, die zudem möglicherweise mit Umweltfaktoren interagieren und in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand der Tiere auftreten. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sowohl während der Säuglingsphase wie bei adulten Mäusen durchgeführt und neben der Betrachtung der Körperzusammensetzung verschiedene für die körperliche Entwicklung relevante Parameter in die Auswertung mit einbezogen.

#### 4.2.1.1 Gewebsspezifität des GR-Defekts

Die Spezifität und Effektivität der GR-Inaktivierung bei den hier untersuchten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen wurde von Tronche et al. (1999) mittels immunohistochemischer Methoden nachgewiesen, indem ein Antikörper gegen das aminoternale Ende des GR-Proteins eingesetzt wurde. Dabei konnte kein GR-Protein im Gehirn von GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen nachgewiesen werden, die Verteilung des GR-Proteins in anderen nicht-neuronalen Geweben wie dem Hypophysenvorderlappen, der Niere und der Nebennierenrinde unterschied sich dagegen nicht von den Befunden bei den zugehörigen Kontrolltieren. Diese Kontrollmäuse zeichneten sich zwar durch die Insertion von LoxP-sites aus, die Expression des GR-Gens war dadurch aber nicht gestört und die Tiere zeigten einen im Vergleich zu normalen Wildtyp-Mäusen identischen Phänotyp.

#### 4.2.1.2 Primäre Störungen der HPA-Achse infolge des zentralen GR-Defekts

Die primäre Auswirkung der zentralen GR-Inaktivierung ist die Störung der HPA-Achse, da die negative Rückkopplungs-Wirkung der Glukokortikoide auf die CRH-Produktion und Sekretion auf der Ebene des Hypothalamus ausgeschaltet ist. Die weiterhin bestehende Rückkopplung zum Hypophysenvorderlappen als nicht-neuronalem Gewebe ist dabei nicht ausreichend, um den peripheren Glukokortikoidspiegel auf einem Normalniveau zu halten. So konnte bei GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine deutliche Erhöhung der Glukokortikoid-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen werden, wobei allerdings der circadiane Rhythmus beibehalten wird. Zusätzlich führt der zentrale GR-Defekt zu einer

8-fachen Erhöhung der CRH-Peptid-Konzentration im PVN der Mäuse (Kellendonk et al., 2002; Tronche et al., 1999). Die erhöhte CRH-Produktion stimuliert wiederum verstärkt die Expression von POMC, dem Vorläufer des ACTH. Aufgrund der Rückkopplungs-Hemmung der Glukokortikoide in Bezug auf die ACTH-Freisetzung ist bei den GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen die Plasmakonzentration an ACTH aber im Vergleich zu der von Wildtyp-Mäusen sogar leicht erniedrigt (Tronche et al., 1999).

Alle an GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen beobachtbaren Veränderungen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren können theoretisch auf 3 unmittelbare Konsequenzen des primären genetischen Defekts zurückgeführt werden, den Wegfall der zentralen Glukokortikoid-Wirkung, die gesteigerte periphere Glukokortikoid-Wirkung und die infolge der fehlenden Rückkopplung erhöhte CRH-Konzentration im PVN.

#### 4.2.1.3 Mögliche Beteiligung von Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR) an der Vermittlung der Glukokortikoid-Wirkung

Eine Problematik bei der künstlichen Inaktivierung des GR ist die hohe Affinität der MR gegenüber Glukokortikoiden, so dass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass eine verstärkte Bindung an diese den Ausfall der GR zumindest teilweise kompensieren könnte. Trotz der höheren Affinität der MR wird die Meinung vertreten, dass die Mehrzahl der physiologischen Glukokortikoid-Effekte über GR vermittelt werden. Dies gilt insbesondere für die Rückkopplungs-Hemmung der CRH-Freisetzung durch erhöhte Glukokortikoidspiegel (Kretz et al., 1999). GR werden im Gegensatz zu MR weitläufiger exprimiert und sind stärkere Transkriptions-Aktivatoren (Reul & Kloet, 1985; Orth et al., 1992; Rupprecht et al., 1993). Außerdem ist zumindest für die Niere und den Dünndarm nachgewiesen worden, dass die Spezifität der Mineralokortikoide für MR durch die Aktivität des Enzyms 11 $\beta$ -HSDII gewährleistet wird (Funder et al., 1988). Dieses Enzym inaktiviert Glukokortikoide und wurde auch in definierten Bereichen des Gehirns wie dem Hippocampus, Cortex, der medialen präoptischen Region, dem NTS und dem ventrolateralen ventromedialen Hypothalamus, im Speziellen dem ARC, nachgewiesen (Roland et al., 1995; Moisan et al., 1990). Für die Mehrzahl dieser Gebiete konnte übereinstimmend mit der physiologischen Rolle dieses Enzyms eine verminderte Affinität gegenüber Kortikosteron gezeigt werden (Moisan et al., 1990). Im Gehirn von GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen konnte zudem keine veränderte MR-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (O. Kretz, unveröffentlichte Ergebnisse). Mäuse mit einem ubiquitären GR-Defekt, die mit Dexamethason behandelt wurden, zeigten außerdem eine vollständige Glukokortikoid-

Resistenz (Cole et al., 2001). Es ist folglich davon auszugehen, dass eine kompensatorische Vermittlung der Glukokortikoid-Wirkung über Mineralokortikoid-Rezeptoren bei den hier untersuchten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen eher unwahrscheinlich ist.

#### **4.2.2 Auswirkung des zentralen GR-Defekts auf den Energiehaushalt im Entwicklungsverlauf**

##### 4.2.2.1 Auswirkung des zentralen GR-Defekts während der Säuglingsphase

Die Daten zur Körperzusammensetzung von GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen im Alter von 10 Tagen zeigen, dass es bereits in der ersten Lebenswoche zu einer Wachstumsverzögerung und einer verminderten Energiedeposition kommt, die aber nur das Wachstum der FFDM betreffen, während die Fettdeposition der Tiere zunächst nicht gestört ist. Ob diese Veränderung bereits pränatal ihren Anfang nimmt ist unklar, allerdings kann bei einer genügend großen N-Zahl bereits am 2. Lebenstag ein signifikanter Unterschied in der Körpermasse zwischen GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (Kellendonk et al., 2002). Zudem wurden bei Mäusen mit einem ubiquitären GR-Defekt bereits bei der Geburt und sogar während der Embryogenese deutlich erhöhte Glukokortikoid- und CRH-Konzentrationen festgestellt, so dass zumindest die primäre Störung der HPA-Achse pränatal einsetzt (Reichardt & Schütz, 1996; Cole et al., 1995 & 2001).

Ob die im Vergleich zu Wildtypen weniger positive Energiebilanz der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse während der Säuglingsphase auf einer verminderten Nahrungsaufnahme und/oder einem gesteigerten Energieverbrauch beruht, konnte in der vorliegenden Arbeit experimentell nicht untersucht werden. Zur sorgfältigen Bestimmung dieser beiden Parameter hätte eine künstliche Aufzucht durchgeführt werden müssen, die bei juvenilen Mäusen nicht etabliert ist. Alternative kurzzeitige Trennungen der Jungtiere von der Mutter wurden als nicht aussagekräftig erachtet. Aufgrund von Befunden bei künstlicher Aufzucht von Ratten ab dem 4. Lebenstag (Schmidt, 2001) lässt sich allerdings die Vermutung aufstellen, dass bei den hier untersuchten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen eine reduzierte Nahrungsaufnahme vorliegt, während eine gesteigerte Stoffwechselrate eher auszuschließen ist. Diese Vermutung stützt sich auf Untersuchungen an künstlich aufgezogenen, juvenilen +/+, +/fa und fa/fa-Zucker-Ratten. fa/fa-Ratten zeichnen sich während der Säuglingsphase durch einen verminderten Sauerstoffverbrauch bei normaler Nahrungsaufnahme aus, was bei einem normalen Wachstum der FFDM zu einem Anstieg des Körperfettgehalts im Vergleich zu Wildtyp-Tieren führt (Markewicz et al., 1993; Zhang et al., 2001). Methodisch sollte dabei erwähnt werden, dass

die Körperzusammensetzung von künstlich aufgezogenen Tieren zwar von der von natürlich aufgezogenen Säuglingen abweicht, der Genotypunterschied in der Körperzusammensetzung aber bei gleicher thermischer Belastung von der Art der Aufzucht unbeeinflusst bleibt. Der umgekehrte Fall, d.h. ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach einer Behandlung mit Noradrenalin führt in Untersuchungen an künstlich aufgezogenen heterozygoten und Wildtyp-Zucker-Ratten – bei entsprechend des gesteigerten Energieumsatzes erhöhter Nahrungszufuhr – zu einer selektiven Abnahme der Körperfettmasse, ohne dass das Wachstum der FFDM beeinträchtigt wird (Schmidt, 2001; Körtner et al., 1994; Meierfrankenfeld, 1996). Der gleiche Zusammenhang zwischen einer Steigerung der thermoregulatorischen Thermogenese und der selektiven Reduktion der Körperfettmasse im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren konnte bei normalgewichtigen (+/+ bzw. +/-) Zucker-Ratten infolge einer Leptinbehandlung während der zweiten Lebenswoche (Stehling et al., 1997) festgestellt werden. Nur für die Bedingung einer Unter- bzw. Überernährung bei unveränderter metabolischer Kälteabwehr konnte bisher eine gleichzeitige Reduktion bzw. Zunahme sowohl der fettfreien Masse als auch des Körperfettgehaltes beobachtet werden (Fiorotto et al., 1991; Schmidt et al., 2001). Aus diesen Befunden bei Ratten lässt sich die Hypothese ableiten, dass die während der Säuglingsphase stattfindende Veränderung der Körperzusammensetzung der  $GR^{NesCre}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern darauf beruht, dass zum einen die Nahrungsaufnahme herabgesetzt ist, zum anderen aber auch die Thermogenese unterdrückt ist und somit die Fettdeposition weitgehend unbeeinträchtigt bleibt, obwohl das Wachstum der FFDM durch die verminderte Nahrungsaufnahme stark verlangsamt wird.

#### 4.2.2.2 Veränderung der Körperzusammensetzung nach dem Absetzen

Es ist bekannt, dass das Absetzen ein einschneidender Prozess ist, der neben der Nahrungsumstellung durch eine Vielzahl von enzymatischen und hormonellen Veränderungen charakterisiert ist, wobei auch die HPA-Achse betroffen ist (Henning, 1981). Bei juvenilen *fa/fa*-Ratten kann eine Adrenalektomie am 4. Lebenstag das Einsetzen einer exzessiven Fettdeposition bis zum 12. Lebenstag nicht verhindern (Bazin et al., 1987). Dagegen führt eine Adrenalektomie in späteren Entwicklungsphasen zu einer Verminderung des Adipositasgrades, wie mehrfach bei Absetzlingen und adulten *fa/fa*-Ratten gezeigt worden ist (Marchington et al., 1983; Fletcher, 1986; Bazin et al., 1986; Bray et al., 1992). Bereits von anderen Modellen mit einer Störung des Energiehaushalts ist bekannt, dass sich durch das Absetzen die relative Beteiligung von Veränderungen in der Futteraufnahme und im Energieverbrauch an der Ausprägung dieser Störung ändern kann. So zeigen Nager, die mit Mono-

sodiumglutamat behandelt wurden, vor dem Absetzen einen gesteigerten Energieverbrauch in Kombination mit einem reduzierten Körperfettgehalt, anschließend aber sinkt der Sauerstoffverbrauch unter das Niveau der Kontrolltiere und die Tiere werden, ohne Hyperphagie zu zeigen, adipös (Schölch, 2001; Tokuyama & Himms-Hagen, 1986). Bei *fa/fa*-Ratten tritt während der Säuglingsphase bei normaler Futteraufnahme (Stern & Johnson, 1977) eine Hypometabolie infolge der Reduzierung der sympathisch vermittelten thermoregulatorischen Thermogenese auf (Kaul et al., 1985). In der Absetzphase normalisieren sich die thermoregulatorischen Reaktionen, so dass die exzessive Fettdeposition nach dem Absetzen energetisch in erster Linie auf einer übersteigerten Futteraufnahme beruht (Kaul et al., 1985; Stern & Johnson, 1977).

Im Fall der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse zeigt sich das – vermutlich infolge einer verminderten Futteraufnahme – seit Beginn der Säuglingsphase verlangsamte Wachstum der FFDM von dem Prozess des Absetzens unbeeinflusst, was den primären Charakter dieser Veränderung unterstreicht. Der Befund, dass die Fettdeposition der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse erst nach dem Absetzen hinter die der Wildtyp-Mäuse zurückzufallen beginnt, weist dagegen auf eine sekundäre Ursache hin. Naheliegend erscheint hierbei die Notwendigkeit einer gesteigerten thermoregulatorischen Thermogenese im Vergleich zu den Wildtypen infolge der bereits zum Zeitpunkt des Absetzens signifikant niedrigeren Körpermasse der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse und des folglich ungünstigeren Volumen-Oberflächen-Verhältnisses, wie durch die Eliminierung des Genotyp-Unterschiedes durch die Normierung des Sauerstoffverbrauchs auf die Körpermasse<sup>2/3</sup> gezeigt werden konnte. Inwieweit dabei enzymatische und hormonelle Veränderungen während des Absetzprozesses oder allein die veränderten Umweltbedingungen durch die Isolierung der Tiere von Mutter und Wurfgeschwistern das Auftreten dieser gesteigerten Thermogenese hervorrufen, kann nur vermutet werden. Neben dem ungünstigeren Volumen-Oberflächen-Verhältnis der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Tieren lassen die Versuche bei adulten Tieren eine weitere Einflussgröße auf den Sauerstoffverbrauch vermuten, da erst durch die Durchführung der vergleichenden Untersuchungen unter jeweils thermoneutralen Bedingungen der Genotyp-Unterschied auf der Basis des Sauerstoffverbrauchs pro Körpermasse<sup>2/3</sup> eliminiert werden kann. Dieser Befund deutet auf die äußere Wärmeisolation als Einflussgröße hin, denn adulte GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse zeichnen sich durch eine geringere Felddichte im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren aus.

Die Fähigkeit von adulten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen, die T<sub>4</sub>-Ausschüttung unter Kältebelastung zu aktivieren, spricht dafür, dass die metabolische Thermoregulation durch den zentralen GR-

Defekt nicht grundsätzlich gestört ist. Die Tatsache, dass die T<sub>4</sub>-Konzentrationen im Plasma von GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen unabhängig von der Umgebungstemperatur generell niedriger als bei Wildtyp-Mäusen sind, könnte auf einer generellen hemmenden Wirkung der erhöhten Glukokortikoidspiegel auf die Hypophysen-Schilddrüsen-Achse beruhen (Re et al., 1976; Chrousos, 2000; Kühn et al., 1998).

#### **4.2.3 Bemerkungen zur methodischen Vorgehensweise beim Vergleich der Sauerstoffverbrauchsdaten**

Obwohl die diskutierten Befunde eine in sich schlüssige Interpretation erlauben, muss darauf hingewiesen werden, dass sowohl die Bestimmung der Thermoneutralzone bei Mäusen wie das Normieren des Sauerstoffverbrauchs durch die Berücksichtigung des Volumen-Oberflächen-Verhältnisses kritisch zu betrachten sind, da es in beiden Fällen keine standardisierte Vorgehensweise gibt. Im Gegensatz zu anderen Studien, bei denen das vorrangige Ziel die möglichst genaue Bestimmung der Thermoneutralzone einer bestimmten Spezies ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die Sauerstoffmessungen unter annähernd thermoneutralen Bedingungen nur als Mittel genutzt, um – abgesehen von der thermoregulatorischen Thermogenese – mögliche Stoffwechsel-Unterschiede zwischen GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen zu finden, die energetisch zur verminderten Energiedeposition der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse unter normalen Haltungsbedingungen beitragen könnten. Da dabei nicht nur eine Veränderung des Basalstoffwechsels, sondern auch potentielle Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität und indirekt die verminderte Futteraufnahme durch eine Veränderung der obligatorischen diätinduzierten Thermogenese an der reduzierten Energiedeposition der Mäuse beteiligt sein könnten, wurde der Sauerstoffverbrauch der Tiere – entgegen der gebräuchlichen Vorgehensweise einer Sauerstoffmessung bei physischer Ruhe und psychischer Entspannung (Hensel et al., 1973) sowie nach einer mehrstündigen Fastenzeit (Encyclopædia Britannica, 1994) – im kompletten Tagesverlauf und bei normalen Fütterungsbedingungen beobachtet. Dies lässt sich auch damit begründen, dass bei sehr kleinen Warmblütern die von Untersuchungen an größeren Tieren abgeleitete Definition eines Grund- oder Ruheumsatzes grundsätzlich problematisch ist (Bartels, 1980).

Für die Ermittlung der unteren Grenze der Thermoneutralzone gemäß der hier verwendeten Definition wurde vor allem der Sauerstoffverbrauch in der Ruhephase betrachtet, der sich mit ansteigender Umgebungstemperatur einem Minimalwert näherte. Im Hinblick darauf, dass bei Nagetieren einsetzender Hitzestress nicht immer zu einem Anstieg der Stoffwechselrate führt

(Hart, 1971), wurden für die Ermittlung der oberen Grenze der Thermoneutralzone – neben dem Sauerstoffverbrauch in der Ruhe- und Aktivitätsphase – die Futteraufnahme und die Veränderung der Körpermasse als ergänzende Kriterien zur Beurteilung herangezogen. Da sich Stress (einschließlich Hitzestress) u.a. in einer reduzierten Nahrungsaufnahme in Kombination mit einer Abnahme der Körpermasse äußert (Mitchell & Carlisle, 1992), wurde ein abrupter Abfall der beiden Parameter bei Überschreitung einer Umgebungstemperatur von 34°C (Wildtyp-Mäuse) bzw. 36°C (GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse) als Zeichen für einsetzenden Hitzestress und somit Überschreiten der oberen Grenze der Thermoneutralzone gewertet, auch wenn der Sauerstoffverbrauch – entgegen der eigentlichen Definition der Thermoneutralzone (Withers, 1992; McBride et al., 1983; Christopherson & Young, 1986) – sogar noch weiter absank. Auf diese Weise wurde für die vergleichenden Messungen des Sauerstoffverbrauchs eine Umgebungstemperatur gewählt, bei der die GR<sup>NesCre</sup>- bzw. Wildtyp-Mäuse weitgehend stressfrei minimale energieverbrauchende thermoregulatorische Reaktionen zeigten.

Ein weiterer Punkt der – in Ermangelung einer standardisierten Vorgehensweise – angesprochen werden muss, ist die Normierung des Sauerstoffverbrauchs. Die Berücksichtigung des Volumen-Oberflächen-Verhältnisses bei dem Vergleich von Tieren, die sich in ihrer Größe deutlich unterscheiden, ist üblich und die Zweckdienlichkeit dieses Parameters bei der Normierung von Sauerstoffverbrauchswerten konnte in mehreren experimentellen Studien nachgewiesen werden (Kleiber, 1947; Feldman & McMahon, 1983; Bartels, 1980; Wieser, 1984). Die Schwierigkeit liegt allerdings in der Festlegung des Exponenten. Wäre allein die im Vergleich zur Körpermasse unproportional veränderte Wärmeabgabe der Grund für diesen Effekt müsste ein Exponent von 0,67 angenommen werden. Einige Studien weisen aber darauf hin, dass der Exponent eher im Bereich von 0,75 liegt und die Einbeziehung von einzelligen sowie exothermen Organismen in diese Untersuchungen deutet darauf hin, dass neben der Wärmeabgabe auch die Größe von verschiedenen Organen wie z.B. Lunge oder Gastrointestinaltrakt oder selbst die Zellgröße die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Oberfläche des jeweiligen Organismus mit bestimmen (Schmidt-Nielsen, 1997). Generell lassen sich in der Literatur Werte für den Exponenten zwischen 0,42 und 0,82 finden. Ohne einen wertenden Standpunkt in dieser Diskussion beziehen zu wollen, wurde in dieser Arbeit mit einem Exponenten von 0,67 gerechnet. Das Ergebnis ist aber auch bei der Anwendung eines Exponenten von 0,75 nicht wesentlich anders. Prinzipiell sollte im Zusammenhang mit der Wahl des Exponenten erwähnt werden, dass die den Berechnungen zugrunde liegenden allometrischen Überlegungen von einer normalen Körperzusammensetzung ausgehen, und so

auf Tiere, deren Körperfettgehalt abnormal hoch oder niedrig ist, nicht ohne weiteres übertragbar sind (Breslow et al., 1999; Armitage et al., 1984).

#### **4.2.4 Periphere Glukokortikoid-Effekte als mögliche Ursache für die veränderte Körperzusammensetzung von GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen**

Von den zahlreichen peripheren Effekten der Glukokortikoide können einige in direktem Zusammenhang mit der Verzögerung des FFDM-Wachstums und der verminderten Energie-deposition bei GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen stehen.

##### 4.2.4.1 Periphere Glukokortikoid-Effekte auf Knochen und Muskelmasse

Bei adulten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen wurden erniedrigte Plasmakonzentrationen an IGF-1 (insulin-like growth factor 1) bei unveränderten GH-(growth hormone)-Spiegeln gemessen (Kellendonk et al., 2002). Übereinstimmend zeigen auch IGF-1-Knockout-Mäuse ein reduziertes Wachstum (Liu et al., 2000), so dass die inhibierende Wirkung der Glukokortikoide auf die IGF-1-Synthese, die *in vitro* nachgewiesen werden konnte (McCarthy et al., 1990; Okazaki et al., 1994), eine Rolle bei der Wachstumsverzögerung spielen könnte. Trotzdem ist aber auch von einer direkten Wirkung der Glukokortikoide auf die entsprechenden Gewebe auszugehen. So führen erhöhte Glukokortikoidspiegel zur Abnahme von Knochenmasse als Ergebnis einer verminderten Knochenformation infolge einer Hemmung der Osteoblastenaktivität in Kombination mit einer gesteigerten Knochenresorption. Dabei bewirkt der übersteigerte Proteinkatabolismus den Abbau von bereits vorhandener Knochenmatrix. Im gleichen Zusammenhang steigern Glukokortikoide die glomeruläre Filtrationsrate und damit die Calciumexkretion. Als Folge dieser multiplen Aktionen kommt es zwangsläufig zu einem Verlust von Knochenmasse (Ganong, 1985; Chrousos, 2000; Delany et al., 1994). Die wachstumshemmende Wirkung der Glukokortikoide ist aber nicht nur auf das Skelettsystem beschränkt, die generell katabole Wirkung in der Peripherie beeinflusst auch die Muskelmasse. So reduzieren Glukokortikoide die Verfügbarkeit von Glukose im Skelettmuskel, indem sie die Insulinsensitivität dieses Gewebes herabsetzen (Goodman, 1992). Durch den in der Folge verstärkten Proteinabbau und eine verminderte Proteinsynthese im Muskel kommt es zu einem deutlichen Proteinverlust (Hasselgren, 1999; Block & Buse, 1990). Insgesamt legen es die diskutierten Befunde nahe, dass bei erhöhten Glukokortikoidspiegeln während der Entwicklung prinzipiell von einem reduzierten Wachstum des Knochenskeletts und der Muskelmasse ausgegangen werden muss, was sich bei den hier untersuchten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen in deren reduziertem Längenwachstum und der Verminderung der FFDM widerspiegelt.



#### 4.2.4.2 Periphere Glukokortikoid-Effekte auf die Fettmasse

Während der reduzierende, katabole Einfluss der Glukokortikoide auf die fettfreie Masse vielfach belegt ist, gibt es hinsichtlich ihrer direkten peripheren Wirkung auf die Fettmasse widersprüchliche Befunde. So wird zum einen von einer allgemeinen katabolen Wirkung der Glukokortikoide in der Peripherie ausgegangen, bei der auch im Fettgewebe in Kombination mit einer gesteigerten Fettmobilisierung durch eine höhere Lipolyserate eine verminderte Insulinsensitivität angenommen wird (Goodman, 1992; Orth et al., 1992). Auf der anderen Seite konnte aber ein anaboler Effekt der Glukokortikoide durch eine steigernde Wirkung auf die Adipozyten-Differenzierung (Hauner et al., 1987) und auf die Lipoproteinlipase-Aktivität (Rebuffe-Scrive et al., 1988) im Fettgewebe gezeigt werden. Dallmann et al. (1993) weisen darauf hin, dass es bei adäquater Futtermittelaufnahme zwar zu einem Anstieg der Insulin-Sekretion und der Fettmasse bei einer Glukokortikoid-Behandlung von Ratten kommt, die Fettdepots aber im Gegensatz dazu eher geleert werden, wenn dem Anstieg des Insulinspiegels durch starkes Fasten bzw. durch die Entstehung eines Diabetes entgegengewirkt wird (Dubuc, 1992). Adulte  $GR^{NesCre}$ -Mäuse zeigen mehrere Symptome, die auch bei Patienten mit Cushing-Syndrom beobachtet werden, sind aber im Gegensatz zu diesen nicht adipös, obwohl in beiden Fällen eine Umverteilung der Fettdepots mit einer Fettanreicherung im Nacken, zwischen den Schultern und im Abdomen auftritt (Tronche et al., 1999; Peeke & Chrousos, 1995). Ob die infolge des zentralen GR-Defektes verminderte Futtermittelaufnahme der  $GR^{NesCre}$ -Mäuse im Gegensatz zu dem gesteigerten Appetit der Patienten mit Cushing-Syndrom für diesen Unterschied verantwortlich ist, bleibt zu klären. Auch die Ursache für die Umverteilung der Fettdepots in Zusammenhang mit einem erhöhten Glukokortikoidspiegel ist bisher nur ungenügend geklärt, ein Grund könnte die erhöhte Anzahl von Glukokortikoid-Rezeptoren in abdominalen Fettdepots sein (Björntorp, 1991).

#### **4.2.5 Der Ausfall von zentralen Glukokortikoid-Effekten als mögliche Ursache für die Veränderung der Futtermittelaufnahme von $GR^{NesCre}$ -Mäusen**

Trotz der zahlreichen katabolen Glukokortikoid-Effekte in der Peripherie, kann eine verminderte Energiedeposition nur im Rahmen einer weniger positiven Energiebilanz auftreten, bei der die Energieaufnahme den Energieverbrauch nur minimal überschreitet. Einige Arbeitsgruppen postulieren in diesem Zusammenhang einen peripheren Effekt der Glukokortikoide auf die Futtermittelaufnahme. Flatt (1993) stellte dabei zusätzlich die Hypothese auf, dass die erhöhte Futtermittelaufnahme in Zusammenhang mit einer Glukokortikoid-Behandlung nur eine indirekte Folge des stimulierenden peripheren Glukokortikoid-Effekts auf die

Glukose-Oxidation sei, als Mittel zur Aufrechterhaltung des Kohlenhydratgleichgewichts. Durch das Modell der GR<sup>NesCre</sup>-Maus kann diese Hypothese widerlegt werden. Trotz der bestehenden peripheren Glukokortikoid-Effekte kommt es nämlich zu einer Reduktion der Futteraufnahme, die nur über einen zentral vermittelten Mechanismus erklärt werden kann. Ein möglicher zusätzlicher stimulierender Einfluss auf die Futteraufnahme durch die peripher erhöhten Glukokortikoidspiegel kann dabei nicht vollständig ausgeschlossen werden, kann aber offensichtlich die zentral vermittelte Hemmung der Futteraufnahme nicht ausgleichen. Aufgrund des zentralen GR-Defektes können direkte zentrale Glukokortikoid-Wirkungen, die über Glukokortikoid-Rezeptoren vermittelt werden, ausgeschlossen werden. Auf Basis dieser Überlegungen scheint die erhöhte CRH-Konzentration in parvozellulären Neuronen des PVN (Kellendonk et al., 2002) die Hauptrolle bei der Beeinflussung der Futteraufnahme von GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen zu spielen. Neben seiner Funktion bei der Regulation der HPA-Achse übt CRH als Neurotransmitter durch die Reduktion der Futteraufnahme und/oder durch die Steigerung des Energieverbrauchs infolge der Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine katabole Wirkung aus (Heinrichs et al., 1993; Tataranni et al., 1996).

Bei *ob/ob*-Mäusen wird postuliert, dass die Hemmung der CRH-Produktion durch erhöhte Glukokortikoidspiegel ein wichtiger Faktor für die Ausbildung der Hyperphagie und der verminderten Thermogenese im braunen Fettgewebe ist (Tokuyama & Himms-Hagen, 1989). Durch eine Adrenalektomie kann die übersteigerte Fettdeposition bei adulten *ob/ob*-Mäusen sowie auch bei *fa/fa*-Ratten vermindert werden (Tokuyama & Himms-Hagen, 1989; Saito & Bray, 1984; Bruce et al., 1982; Freedman et al., 1986a). Dieser Effekt beruht in erster Linie auf einer Reduktion der übersteigerten Futteraufnahme (Smith & Romsos, 1985). Eine künstliche Erhöhung der Glukokortikoid-Konzentration bei bestehender Adrenalektomie kann diese Hemmung der Futteraufnahme durch die Unterdrückung der CRH-Expression wieder rückgängig machen (Freedman et al., 1986a). Da der zentrale GR-Defekt der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse hinsichtlich der zentralen CRH-Konzentration mit einer Adrenalektomie vergleichbar ist, ist die verminderte Energiedeposition dieser Mäuse nicht überraschend. In Übereinstimmung mit der erhöhten CRH-Konzentration ist die Futteraufnahme der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse kontinuierlich niedriger als die der Wildtyp-Mäuse.

Werden die Konzentrationen von weiteren bei der Regulation des Energiehaushalts wichtigen Neuropeptiden im Hypothalamus von adulten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen gemessen, kann nur für NPY ein Anstieg im ARC und PVN festgestellt werden, während kein Unterschied zu Wildtyp-Mäusen hinsichtlich der Peptidkonzentrationen von MCH, Orexin A und Orexin B beobachtet

werden kann (Kellendonk et al., 2002). Im Hinblick auf die reduzierte Futtermittelaufnahme und die erhöhten CRH-Konzentrationen der  $GR^{NesCre}$ -Mäuse scheint dies überraschend, da NPY bekanntermaßen eine starke orexigene Wirkung besitzt. Die einzige Erklärung für diesen Befund scheint ein gegenregulatorischer Mechanismus zu sein, der vorrangig durch periphere Stimuli ausgelöst zu sein scheint, wobei unter Umständen auch andere Hormonsysteme beteiligt sind (Kellendonk et al., 2002). Auch gibt es Hinweise darauf, dass NPY seine orexigene Wirkung nur unter der Voraussetzung einer nicht erhöhten zentralen CRH-Bildung entfalten kann (Heinrichs et al., 1993).

#### **4.2.6 Die Rolle von Leptin und Insulin bei der Ausbildung des $GR^{NesCre}$ -Phänotyps**

##### 4.2.6.1 Auswirkung des zentralen GR-Defekts auf die Funktion des Leptin-Systems

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte NPY-Konzentration im ARC und PVN könnte eine bestehende Leptinresistenz sein, bei der die ansonsten hemmende Leptinwirkung auf die NPY-Expression wegfällt. Tatsächlich muss aufgrund der vorliegenden Daten von einer Leptinresistenz bei  $GR^{NesCre}$ -Mäusen ausgegangen werden, da während der Säuglingsphase die erhöhten Plasmaleptin-Konzentrationen nicht in der Lage sind, das Fettmassenwachstum zugunsten eines normalen FFDM-Wachstums zu verhindern. Auch bei Patienten mit Cushing-Syndrom ist der erhöhte Leptinspiegel nicht in der Lage, den durch die zentrale Glukokortikoid-Wirkung gesteigerten Appetit zu bremsen (Leal-Cerro et al., 1998). Bei C57Bl/6J-Mäusen konnte nach einer Adrenalectomie eine negative Korrelation zwischen der Höhe des substituierten Glukokortikoidspiegels und der Stärke der Wirkung von exogen appliziertem Leptin nachgewiesen werden (Solano & Jacobson, 1999). Diese Beobachtungen lassen eine hemmende Glukokortikoid-Wirkung auf die Leptinsensitivität vermuten (Solano & Jacobson, 1999; Björntorp & Rosmond, 2000). Obwohl bei adulten  $GR^{NesCre}$ -Mäusen keine Hyperleptinämie mehr nachzuweisen ist, besteht während des ganzen Lebens eine bezogen auf die Körperfettmasse überproportionale Leptin-Produktion, die weder durch das Absetzen noch durch die zweiphasige Entwicklung des Körperfettgehaltes beeinflusst wird. Ein überproportional erhöhter Plasmaleptinspiegel konnte auch bei Patienten mit Cushing-Syndrom gefunden werden (Masuzaki et al., 1997a), so dass fettmassenunabhängige Beeinflussungen der Leptin-Produktion in Betracht gezogen werden müssen.

Eine direkte Interaktion zwischen der HPA-Achse und dem Leptin-System konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. So stimulieren Glukokortikoide *in vitro* und *in vivo* die Expression und Sekretion von Leptin, unabhängig von ihren Effekten auf die

Futteraufnahme (Zakrzewska et al., 1999; Elimam et al., 1998; De Vos et al., 1995; Halleux et al., 1998; Slieker et al., 1996). Dieser Effekt scheint auf einer direkten Wirkung der Glukokortikoide als Transkriptionsfaktor über die Bindung an Glukokortikoid-responsive Elemente des Leptinpromoters zu beruhen (Gong et al., 1996). Umgekehrt wird für Leptin eine hemmende Wirkung auf die HPA-Achse angenommen, wobei sowohl die CRH-Freisetzung im PVN wie die Kortisolsekretion in der Nebennierenrinde durch Leptin unterdrückt wird (Casanueva & Dieguez, 1999; Pralong et al., 1998, Woods et al., 1998). Trotz der Interaktion zwischen den beiden Hormonsystemen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, welche zentralen oder peripheren Mechanismen für die Glukokortikoid-induzierte Leptinresistenz verantwortlich sind (Solano & Jacobson, 1999). Auf zentraler Ebene kommt im Hinblick auf die GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse nur die Veränderung der CRH-Konzentration in Frage, obwohl andere Autoren die Meinung vertreten, dass die Beteiligung des CRH an diesem Effekt eher unwahrscheinlich ist, und so Glukokortikoid-Effekte auf andere neuronale Systeme wie z.B. das Melanokortin-System bei der Beeinträchtigung der Leptinwirkung in Betracht gezogen werden müssen (Solano & Jacobson, 1999).

#### 4.2.6.2 Insulin als wichtiger Gegenspieler der HPA-Achse

Grundsätzlich müssen bei der Beeinträchtigung der Leptinwirkung durch Glukokortikoide auch periphere Mechanismen berücksichtigt werden. Neben der direkten Beeinflussung der Leptin-Expression und -Sekretion könnte auch indirekt der Glukokortikoid-Effekt auf den Plasmainsulinspiegel und dessen Wirkung in peripheren Geweben eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Leptinresistenz spielen (Solano & Jacobson, 1999; Widjaja et al., 1998; Berneis et al., 1996). Bei den hier untersuchten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen zeigt sich ein überraschend enger Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen von Leptin und Insulin im Entwicklungsverlauf. Bei Patienten mit Cushing-Syndrom konnte der Seruminsulinspiegel im Vergleich zum BMI (body mass index) und zur Kortisol-Konzentration im Serum als einflussreichster Faktor auf den Serumleptinspiegel identifiziert werden (Widjaja et al., 1998).

Die enge Kopplung zwischen dem Insulin-System und der HPA-Achse ist unumstritten. So wurde neben der Verminderung der Insulinsensitivität in Muskel- und Fettmasse ein direkter stimulierender Glukokortikoid-Effekt auf die Insulin-Sekretion nachgewiesen (Delaunay et al., 1997). Von einigen Autoren wird die Meinung vertreten, dass Glukokortikoide und Insulin Komponenten eines bihormonellen Systems sind, das langfristig die Energiespeicherung reguliert (Dallmann et al., 1995; Strack et al., 1995). In diesem Zusammenhang wird auf die antagonistische Wirkung der beiden Hormonsysteme hinsichtlich der Energie-

speicherung in der Peripherie und der Regulation der Energieaufnahme auf zentraler Ebene hingewiesen. Ein Anstieg der Plasmainsulin-Konzentration in Kombination mit einer Erhöhung des Glukokortikoidspiegels könnte Ausdruck einer natürlichen Gegenregulation sein. Aufbauend auf diesen Überlegungen scheint es naheliegend, dass sich bei einem Eingreifen in diese Regulation, wie es bei den GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen aufgrund des zentralen GR-Defekts der Fall ist, infolge der chronisch erhöhten Glukokortikoidspiegel ein Diabetes-ähnlicher Zustand ausbildet, der zunächst durch eine Hyperinsulinämie gekennzeichnet ist, bis die funktionellen Reserven der Bauchspeicheldrüse erschöpft sind und es zu einem Absinken der Plasmainsulin-Konzentration kommt (Lenzen & Bailey, 1984). Aufgrund der mehrfach nachgewiesenen Interaktion des Insulin- und Leptin-Systems (Wauters et al., 2000; Considine & Caro, 1997) könnte die primäre Hyperinsulinämie in Kombination mit einer peripher verminderten Insulin-Insensitivität zu der sekundären Ausbildung einer Leptinresistenz entscheidend beitragen.

#### 4.2.7 Beurteilung des GR<sup>NesCre</sup>-Knockout-Modells

Letztendlich ist davon auszugehen, dass durch den zentralen GR-Defekt eine Vielzahl von primären und sekundären Störungen ausgelöst wurden, die in Kombination mit den Umweltbedingungen den komplexen Phänotyp der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse verursachen. Aufgrund dieser Komplexität ist die Auswertung von Ursache-Wirkungs-Beziehungen mit großen Schwierigkeiten verbunden. Selbst durch den Beginn dieser Untersuchungen in einem sehr frühen Alter, muss davon ausgegangen werden, dass entscheidende Veränderungen aufgrund des Knockouts bereits zu einem früheren Zeitpunkt, in den ersten Lebenstagen oder sogar pränatal, stattgefunden haben, die sich, obwohl später unter Umständen nicht mehr detektierbar, auf das erwachsene Tier auswirken. Diese frühe Prägung konnte z.B. für hohe Glukokortikoidspiegel zum Zeitpunkt der Geburt nachgewiesen werden (Anisman et al., 1998; Seckl, 1997).

Dass die HPA-Achse in die Regulation des Energiehaushalts eingreift, konnte anhand der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse bestätigt werden. Für die vollständige Aufdeckung der energetischen bzw. neuro-endokrinen Grundlagen dieses Effektes ist selbst das durch die gezielte Ausschaltung des zentralen Glukokortikoid-Rezeptors generierte Tiermodell noch zu komplex, da sich zusätzlich zu dem primären Defekt multiple endokrine Störungen entwickeln. In weiterführenden Untersuchungen wäre es lohnend, durch Manipulation des ACTH-Kortisol-Systems zunächst den peripheren Hyperkortikosteronismus zu kontrollieren und somit die Effekte des zentralen GR-Knockouts auf das Zentralnervensystem zu beschränken. Auf diese

Weise ließe sich klären, wie die beiden anderen, für die Regulation des Energiehaushalts wesentlichen endokrinen Systeme, das Leptin- und das Insulin-System, durch den zentralen GR-Defekt als solchen beeinflusst werden. Von besonderer Wichtigkeit wäre dabei der Nachweis, in welchem Maße diese beiden primär durch metabolische Parameter – also unabhängig vom Zentralnervensystem – kontrollierten Systeme in ihrer Funktion intakt oder gestört sind.

### **4.3 LACHS-CALCITONIN UND SEINE ANOREKTISCHE WIRKUNG**

#### **4.3.1 Unterschiede zwischen Leptin und sCT bei der Beeinflussung der Futtermittelaufnahme**

Die anorektische Wirkung von sCT konnte bereits frühzeitig nachgewiesen werden (Freed, 1979; Gaggi et al., 1985; Plata-Salaman & Oomura, 1987; Twery et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit sowie in einer Studie von Mollet et al. (2001) konnte zudem in einem direkten Vergleich gezeigt werden, dass die sCT-Wirkung auf Basis der molaren Dosisangabe die anorektische Wirkung von Leptin bei Wildtyp-Tieren deutlich übertrifft. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen allerdings zum ersten Mal, dass sich die Wirkungen von Leptin und sCT auf die Futtermittelaufnahme von C57Bl/6J-Mäusen bei Fütterung der üblichen Standard-Diät addieren. Da sCT hinsichtlich seines anorektischen Effekts als Amylin-Analogon betrachtet wird (Lutz et al., 2000), lassen diese Befunde vermuten, dass auch Leptin und Amylin selbst als endogene Adipositas-Signale additiv wirken könnten. Von herausragender Bedeutung ist jedoch die Tatsache, dass Nahrungseinflüsse die sCT-Wirkung selbst dann nicht beeinträchtigen, wenn sie gleichzeitig die anorektische Wirkung des Leptins vollständig aufheben. Eine durch die mehrwöchige Gabe eines attraktiven, fettreichen Zusatzfutters ausgelöste funktionelle Leptinresistenz (Lin et al., 2000b; Van Heek et al., 1997; Lin et al., 2001) und moderate diätinduzierte Adipositas führen bei C57Bl/6J-Mäusen, im Gegenteil, sogar zu einem stärkeren anorektischen sCT-Effekt. Durch die Untersuchung der sCT-Wirkung bei C57Bl/6J-Mäusen, denen die Zusatzdiät für mehr als 3 Monate angeboten wurde, konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die sCT-Wirkung mit steigendem Adipositasgrad nachlässt. Im Gegenteil besteht sogar die Vermutung, dass die sCT-Wirkung unter diesen Ernährungsbedingungen mit steigender Körpermasse noch weiter zunimmt (siehe Abb. 25).

Neben diesem quantitativen Unterschied zwischen der Leptin- und sCT-Wirkung, zeigt sich bei dieser Fütterungsbedingung zusätzlich ein qualitativer Unterschied. So führt eine eintägige sCT-Behandlung nur zu einer verminderten Aufnahme des attraktiven, fettreichen Zusatz-

futters, während parallel die Aufnahme der pelletierten Standard-Diät sogar ansteigt. Im Gegensatz dazu führt eine Leptinbehandlung in der Anfangsphase der Zusatzfütterung, in der die Mäuse noch Leptin-responsiv sind, zu der gleichzeitigen Reduktion beider Nahrungskomponenten (C. Daniel<sup>6</sup> und I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). Leptin scheint folglich die Futterraufnahme im Allgemeinen zu unterdrücken, während der Schwerpunkt der sCT-Wirkung im Falle einer zusammengesetzten Nahrung auf der Unterdrückung der attraktiveren, fettreicheren, süßeren und energiedichteren Komponente liegt. Dieser Befund konnte auch in einem ersten Versuch an homozygoten (-/-) MC4-r-KO-Mäusen bestätigt werden, bei denen die hemmende sCT-Wirkung auf die Energieaufnahme ( $0,8 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  im Vergleich zu  $0,2\text{-}8 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in der vorliegenden Arbeit) bei dem zusätzlichen Angebot von weißer Schokolade mehr als verdoppelt wird, wobei auch in diesem Fall spezifisch die Schokoladenaufnahme unterdrückt wird und der Anteil der Pellets an der insgesamt verminderten Gesamtenergieaufnahme ansteigt (I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). Um eine genauere Aussage über das die sCT-Wirkung bestimmende Qualitätsmerkmal der Nahrungskomponente machen zu können, wären allerdings differenziertere Versuche mit unterschiedlichen Nahrungszusammensetzungen erforderlich. Untersuchungen in einer parallel durchgeführten Dissertation (M. Socher), bei denen die Saccharose in der weißen Schokolade durch Stärke ersetzt wurde, lassen bereits vermuten, dass zumindest die Süße der Nahrung keine entscheidende Rolle bei der bevorzugten sCT-Wirkung auf die Zusatzdiät spielt.

#### 4.3.2 Ist die anorektische sCT-Wirkung die Folge eines unspezifischen Effekts?

Aufgrund der im Vergleich zu Amylin stärkeren bzw. länger anhaltenden anorektischen Wirkung des sCT (Gaggi, 1985; Lutz et al., 2000) könnte vermutet werden, dass sCT aufgrund einer Bindung an nicht-spezifische Chemorezeptoren (Carpenter et al., 1983) Übelkeit auslöst und es infolge dessen zu einer unspezifischen Reduktion der Nahrungsaufnahme kommt. Diese Vermutung kann allein durch die Tatsache, dass *ob/ob*-Mäuse infolge einer sCT-Injektion, die bei C57Bl/6J-Mäusen zu einer starken Reaktion führt, keine messbar verminderte Futterraufnahme zeigen, widerlegt werden. Auch der Anstieg der Pelletaufnahme nach einer sCT-Injektion bei C57Bl/6J-Mäusen mit attraktiver Zusatzdiät spricht gegen einen unspezifischen Effekt des sCT. Zudem konnte für diese übelkeitsauslösenden Chemorezeptoren bei Ratten gezeigt werden, dass sie nicht identisch mit Glukose-responsiven Rezeptoren sind, die als vorwiegende Mediatoren des Sättigungsgefühls

---

<sup>6</sup> Diplomarbeit C. Daniel, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002

angesehen werden (Adachi et al., 1991). Da mehr als 90% der Neurone in der Area postrema, die durch Amylin erregt werden, Glukose-sensitiv sind (Riediger et al., 1999a) und diese Neurone ebenfalls als Vermittler der anorektischen Wirkung des sCT, als Amylin-Analogon, angesehen werden (Lutz et al., 2000; Christopoulos et al., 1995), scheint das Auslösen einer Übelkeit infolge einer sCT-Behandlung sehr unwahrscheinlich. Im Falle einer Amylin-behandlung konnte ein allgemeines Unwohlsein (Morley et al., 1997) bzw. eine "*conditioned taste aversion*" bei Ratten (Morley et al., 1997; Lutz et al., 1995a; Chance et al., 1992) in entsprechenden standardisierten Tests sowohl bei zentraler wie bei peripherer Gabe als Ursache für die verminderte Futteraufnahme ausgeschlossen werden.

### **4.3.3 Bemerkungen zur methodischen Vorgehensweise bei der quantitativen Auswertung der anorektischen sCT-Wirkung**

#### 4.3.3.1 Einbeziehung von Vor- und Nachlauf Tagen als Referenzwerte für die Beurteilung des Behandlungseffekts

Als Mittel zur quantitativen Auswertung des Behandlungseffektes wurde in der vorliegenden Arbeit ein spezielles Auswertungsverfahren angewandt, bei der die Futteraufnahme jedes behandelten Tieres am Effekttag mit der mittleren Futteraufnahme der Kontrolltiere verglichen und zusätzlich mit bereits bestehenden Unterschieden während der 4-tägigen Vor- und Nachlaufphase korrigiert wurde. Dieses Auswertungsverfahren setzte grundsätzlich zwei Bedingungen voraus. Zum einen musste die anorektische Wirkung der jeweiligen eintägigen Behandlung auf die nachfolgende 24-Stunden-Periode, den Effekttag, beschränkt sein. Für Leptin konnte dies bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden (Döring, 2000), für sCT zeigen dies die in dieser Arbeit dargestellten Futteraufnahme-Verläufe. Zum anderen musste gewährleistet sein, dass es in den auf den Effekttag folgenden Nachlauf Tagen zu keinem kompensatorischen Überschießen der Futteraufnahme kommt. Auch dies konnte in der Arbeit von Döring (2000) für Leptin bzw. aufgrund der vorliegenden Daten für sCT bestätigt werden. Die einzige vergleichbare Arbeit, bei der die Futteraufnahme von einmalig mit sCT behandelten Ratten ( $2 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  im Vergleich zu  $0,3\text{-}9 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in der vorliegenden Arbeit) ebenfalls über einen Zeitraum von 6 Tagen beobachtet wurde, bestätigt zusätzlich die hier festgestellten Verläufe (Twery et al., 1982).

#### 4.3.3.2 Berücksichtigung der Körpermasse bei der Angabe der sCT-Dosis

Im Rahmen der bisher veröffentlichten Studien zur Wirkung einer sCT- bzw. Amylin-Injektion wurde die verwendete Dosis überwiegend in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  angegeben. Dies gilt auch für



den Vergleich zwischen adipösen *ob/ob*-Mäusen und heterozygoten Tieren desselben Stammes (Morley et al., 1994), obwohl sich diese deutlich in ihrer Körpermasse unterscheiden. Dabei sollte allerdings beachtet werden, dass eine 60 g schwere *ob/ob*-Maus bei gleicher massenspezifischer Dosis insgesamt die 3-fache Menge an sCT im Vergleich zu einer 20 g schweren C57Bl/6J-Maus erhält. In diesem Fall sowie auch bei einem Vergleich zwischen unterschiedlichen Spezies sollte aufgrund der großen Körpermassenunterschiede der Bezug auf die massenspezifische Dosis kritisch betrachtet werden. So konnten bisher keine gesicherten Aussagen gemacht werden, inwieweit sich die Pharmakokinetik und die zentrale Bioverfügbarkeit einer applizierten Substanz streng reziprok zur Körperfettmasse verhalten. Um diesem Problem gerecht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit der Vergleich zwischen normalgewichtigen und genetisch adipösen Mäusen und Ratten sowohl auf der Basis der massenspezifischen sCT-Dosis als auch auf Basis der sCT-Dosis pro Tier durchgeführt. Somit waren beide Extrema hinsichtlich der Normierung der Dosis berücksichtigt, und gleichgerichtete signifikante Unterschiede bei beiden Dosisangaben konnten in jedem Fall als zutreffend angenommen werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen sCT, Amylin und Leptin zu gewährleisten, wurde die Dosis im Hinblick auf die unterschiedlichen Molekulargewichte außerdem konsequent in pmol angegeben.

#### **4.3.4 Quantitative Unterschiede in der sCT-Wirkung bei genetisch adipösen Tiermodellen**

Im Unterschied zu den Ergebnissen bei Mäusen mit moderater Adipositas infolge einer attraktiven, fettreichen Zusatzdiät ist die sCT-Wirkung bei Tieren mit genetisch bedingter Adipositas vermindert. Dabei ist allerdings der sCT-Effekt je nach Tiermodell unterschiedlich stark unterdrückt. So zeigen *-/-* MC4-r-KO-Mäuse mit ihrem funktionell gestörten  $\alpha$ MSH/MC4-System verglichen mit C57Bl/6J-Mäusen eine deutlich verminderte sCT-Responsivität. Bei *ob/ob*-Mäusen, die kein funktionelles Leptin produzieren können, kann sogar innerhalb des untersuchten Dosisbereiches kein messbarer sCT-Effekt auf die Futteraufnahme nachgewiesen werden. Erst wenn die sCT-Dosis pro Körpermasse auf die maximal verabreichte Dosis bei C57Bl/6J-Mäusen angehoben wird, zeigen die *ob/ob*-Mäuse eine leichte Reaktion auf die sCT-Behandlung. Interessanterweise zeigen *fa/fa*-Ratten, die durch den Leptinrezeptor-Defekt ebenfalls eine direkte Störung des Leptin-Systems aufweisen, zwar eine deutlich verminderte Reaktion auf die sCT-Behandlung im Vergleich zu Wildtyp-Ratten. Im Gegensatz zu den *ob/ob*-Mäusen ist die Reaktion in dem untersuchten Dosisbereich aber deutlich messbar und ist eher mit der Reaktion der *-/-* MC4-r-KO-Mäuse vergleichbar. Ob

diese im Vergleich zu den *ob/ob*-Mäusen nur moderate Reduktion der sCT-Responsivität bei den *fa/fa*-Ratten auf den Befund zurückzuführen ist, dass Ratten generell deutlich sensitiver gegenüber sCT zu reagieren scheinen als Mäuse, wie bei dem Vergleich der Wildtyp-Tiere zu erkennen ist (siehe Abb. 26 & 27), oder ob dieser Unterschied direkt mit der Qualität des genetischen Defekts zusammenhängt, kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

Bisher gibt es keine vergleichbare Studie, in der die relative Wirkung von sCT bei genetisch adipösen Mäuse- bzw. Rattenstämmen getestet wurde. Grundsätzlich wurden die wenigen Untersuchungen zur sCT-Wirkung bei Wildtyp-Ratten durchgeführt, wobei sCT überwiegend zentral, teilweise subkutan verabreicht und die Veränderung der Futteraufnahme in den meisten Fällen nur in den ersten Stunden nach der sCT-Injektion beobachtet wurde (Freed, 1979; Gaggi et al., 1985; Plata-Salaman & Oomura, 1987). Auch eine Amylinbehandlung liegt für die *-/-* MC4-r-KO-Mäuse nicht vor. Bei *ob/ob*- und *db/db*-Mäusen wurden zwar in zwei Studien die Auswirkungen von subkutanen Amylininjektionen auf die Futteraufnahme im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren beider Tiermodelle untersucht (Morley et al., 1982 & 1994), diese Untersuchungen sind allerdings kritisch zu betrachten. So wurde in beiden Fällen nur die kurzfristige Beeinflussung der Futteraufnahme innerhalb der ersten Stunde nach der Amylininjektion untersucht. Zudem wurde den Tieren vor der Behandlung für 15-20 h das Futter entzogen. Der Antrieb zur Nahrungsaufnahme, der sich während des Futterentzugs aufgebaut hat, könnte gerade in den ersten Stunden nach erneutem Futterzugang zu Verzerrungen des Ergebnisses führen. Dass von diesem Versuchsansatz nicht auf die hier durchgeführten Untersuchungen unter normalen Haltungsbedingungen geschlossen werden kann, zeigt sich allein an der Tatsache, dass die während der ersten 60 min nach der Kontrollinjektion festgestellte Futteraufnahme der als hyperphag charakterisierten *ob/ob*-Mäuse unter der der heterozygoten Tiere liegt. Ein weiterer Kritikpunkt liegt in der Tatsache, dass in beiden Studien keine klare Dosisabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, so dass der Vergleich der Empfindlichkeit der *ob/ob*- bzw. *db/db*-Mäuse mit der der jeweiligen Kontrolltiere insgesamt kritisch zu betrachten ist. Zudem ist bekannt, dass sich die heterozygoten Tiere beider Mäusestämme deutlich von den entsprechenden Wildtyp-Tieren unterscheiden (Chung et al., 1998). Auf der Basis dieser Überlegungen können die Schlussfolgerungen der Autoren, dass *ob/ob*- bzw. *db/db*-Mäuse eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Amylin zeigen, den in der vorliegenden Arbeit klar dokumentierten Befund einer stark bzw. moderat verminderten sCT-Responsivität der *ob/ob*-Mäuse bzw. *fa/fa*-Ratten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nicht entkräften.

#### 4.3.5 Mögliche sekundäre Abnormalitäten als Erklärung für die veränderte sCT-Wirkung bei genetisch bedingter Adipositas

Die vergleichenden Untersuchungen der sCT-Wirkung bei Wildtyp-Tieren und genetisch adipösen Tiermodellen sowie bei Mäusen mit einer ernährungsbedingten funktionellen Leptinresistenz zeigen sowohl unterschiedlich stark ausgeprägte wie auch in ihrer Richtung unterschiedliche Veränderungen der sCT-Wirkung. Diese Änderungen scheinen nicht mit dem Ausmaß der Störung des Leptin-Systems zu korrelieren. Folglich müssen sekundäre Änderungen in Betracht gezogen werden. Dabei scheint die veränderte Wirkungsstärke der sCT-Behandlung bei diätinduzierter und genetisch bedingter Adipositas aber weder vom Adipositasgrad, noch von den erhöhten Triglyzeridspiegeln oder von der Hyperphagie bestimmt zu werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf zwei Ebenen nach möglichen Ursachen für die veränderte sCT-Wirkung gesucht. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass neben dem gestörten Leptin-System andere Hormonsysteme verändert sind, die für die sCT-Wirkung entscheidend sind. Zum anderen könnten veränderte Konzentrationen von an der Regulation des Energiehaushalts beteiligten Neuropeptiden einen Einfluss auf die zentral vermittelte sCT-Wirkung ausüben.

##### 4.3.5.1 Hyperinsulinämie als Indikator einer Hyperamylinämie?

Alle in dieser Arbeit untersuchten genetisch adipösen Tiermodelle sind im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in Übereinstimmung mit Literaturbefunden hyperinsulinämisch (Huszar et al., 1997; Fan et al., 2000; Leckström et al., 1999; Pieber et al., 1994). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten parallelen Insulinmessungen erlauben zusätzlich eine Aussage über die relative Ausprägung dieser Hyperinsulinämie. So zeigt sich eine deutliche Abstufung der Plasmainsulin-Konzentrationen mit einem mittleren Ausprägungsgrad bei den *-/-* MC4-r-KO-Mäusen und den *fa/fa*-Ratten, sowie einer extremen Hyperinsulinämie bei den *ob/ob*-Mäusen. Ob der jeweilige Anstieg der Plasmainsulin-Konzentration in direktem Zusammenhang mit dem genetischen Defekt steht oder sich sekundär durch die Hyperphagie und Adipositas der Tiere entwickelt, ist noch nicht vollständig geklärt. Grundsätzlich zeigt sich bei einem Vergleich zwischen mit sCT behandelten und Kontroll-Tieren ein hemmender sCT-Effekt auf den Plasmainsulinpiegel, unabhängig vom jeweiligen Ausgangswert, dem Adipositasgrad, der Stärke der sCT-induzierten Futterreduktion oder dem zugrunde liegenden genetischen Defekt bei den untersuchten Mausmodellen. Obwohl bisher keine direkt vergleichbaren Untersuchungen mit sCT durchgeführt worden sind, wird dieser Befund durch Studien unterstützt, die einen hemmenden Effekt einer Amylinbehandlung auf die Insulin-Sekretion

postulieren (Young, 1994; Ohsawa et al., 1989; Silvestre et al., 1997). Zudem konnte bei Ratten und Menschen nach einer peripheren sCT-Injektion eine verminderte postprandiale Insulin-Freisetzung beobachtet werden (Young et al., 1995b; Jonderko et al., 1990). Der Befund, dass eine zentrale Applikation von sCT im Gegensatz dazu die Glukose-stimulierte Insulin-Freisetzung verbessert (Greeley et al., 1989), lässt bei den in der vorliegenden Arbeit beobachteten erniedrigten Plasmainsulin-Konzentrationen einen direkten peripheren sCT-Effekt auf die Insulin-Sekretion vermuten.

Neben der Beeinflussung des Plasmainsulinspiegels durch eine sCT-Behandlung lassen die hier gezeigten Ergebnisse umgekehrt auch eine Beeinflussung der sCT-Wirkung durch den Plasmainsulinspiegel vermuten. So scheint sich unabhängig von der Art des genetischen Defekts bzw. der Ursache der Hyperinsulinämie die sCT-Responsivität der hier untersuchten genetisch adipösen Tiere umgekehrt proportional zum Grad ihrer Hyperinsulinämie zu verhalten. Da Amylin und Insulin cosezerniert werden (Young, 1994; Castillo et al., 1995) und zudem die anorektische Wirkung des sCT vorwiegend über Amylinrezeptoren vermittelt zu sein scheint (Lutz et al., 2000), könnte eine Hyperinsulinämie Indikator einer Hyperamylinämie sein, die in Kombination mit einer möglichen Amylinresistenz einen hemmenden Einfluss auf die sCT-Wirkung ausübt. Eine direkte Bestimmung der Plasmaamylin-Konzentrationen bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren wurde aufgrund des Fehlens eines standardisierten und aussagekräftigen kommerziellen Radioimmunoassays (Cooper, 1994; T. Riediger, persönliche Mitteilung) nicht durchgeführt. Dass die graduelle Abstufung der Plasmainsulin-Konzentrationen zwischen den einzelnen genetisch adipösen Tiermodellen sich aber in ähnlicher Weise in den jeweiligen Plasmaamylin-Konzentrationen widerspiegelt, kann aufgrund von Literaturbefunden vermutet werden (Cooper, 1994). So konnte bei *fa/fa*-Ratten *in vitro* eine Hypersekretion von Amylin aus der Bauchspeicheldrüse (Inoue et al., 1993) sowie *in vivo* ein 7-10-fach erhöhter Plasmaamylin Spiegel festgestellt werden (Pieber et al., 1994). Bei altersmäßig den hier untersuchten Tieren entsprechenden *ob/ob*-Mäusen wurde im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrolltieren (*+/ob* bzw. *+/+*) ein 25-facher Anstieg der Plasmaamylin-Konzentration nachgewiesen (Leckström et al., 1999). Im Hinblick auf die Ähnlichkeit des genetischen Defektes zwischen *db/db*-Mäusen und *fa/fa*-Ratten und deren vergleichbarer Hyperinsulinämie ist zudem der Befund von Tokuyama et al. (1993) interessant, der in der Bauchspeicheldrüse von *ob/ob*-Mäusen deutlich höhere Konzentrationen an Amylin und Insulin nachweisen konnte als bei *db/db*-Mäusen. Obwohl bisher keine Studien zur Plasmaamylin-Konzentration bei *-/-* MC4-r-KO-Mäusen existieren, ist im Hinblick auf die erhöhten Plasmainsulinspiegel eine Hyperamylinämie ebenfalls zu erwarten.

Inwieweit diese erhöhten Amylinspiegel Ausdruck einer Amylinresistenz sind und in welchem Maße sie einen direkten Einfluss auf die über Amylinrezeptoren vermittelte anorektische Wirkung des sCT ausüben können, bleibt in Folgestudien zu klären.

#### 4.3.5.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Wirkungsstärke von sCT und der NPY-Konzentration im ARC bei genetisch bedingter Adipositas?

Zu den wohl wichtigsten an der zentralen Vermittlung des Leptinsignals und somit an der Regulation des Energiehaushalts beteiligten Neurotransmittern gehören NPY und  $\alpha$ MSH (Schwartz et al., 1996b; Woods & Seeley, 2000; Broberger & Hökfelt, 2001). Eine Coexpression der langen Leptinrezeptor-Isoform (Ob-Rb) mit NPY bzw. POMC, als dem Vorläufer des  $\alpha$ MSH, konnte in definierten Neuronenpopulationen des ARC nachgewiesen werden (Elmquist et al., 1999). Grundsätzlich wird von einer hemmenden Wirkung des Leptins auf die NPY-Expression (Stephens et al., 1995; Schwartz et al., 1996b) sowie einer stimulierenden Wirkung auf die POMC-Expression ausgegangen (Mizuno et al., 1998; Thornton et al., 1997). In den hier untersuchten genetisch adipösen Tiermodellen treten aufgrund der genetischen Defekte innerhalb des Leptin- bzw.  $\alpha$ MSH/MC4-Systems veränderte zentrale Konzentrationen beider Neurotransmitter im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf. Hinsichtlich der Fragestellung, inwieweit eine solche Veränderung die sCT-Wirkung beeinflussen könnte, wurden entsprechende Untersuchungen und Überlegungen in der vorliegenden Arbeit auf das NPY-System beschränkt, da die trotz des vollständigen Ausfalls des  $\alpha$ MSH/MC4-Systems relativ gute sCT-Responsivität der  $-/-$  MC4-r-KO-Mäuse eine Beteiligung des POMC bzw.  $\alpha$ MSH als vom Nucleus arcuatus aszendierender Signalweg bei der Modulation der sCT-Wirkung eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

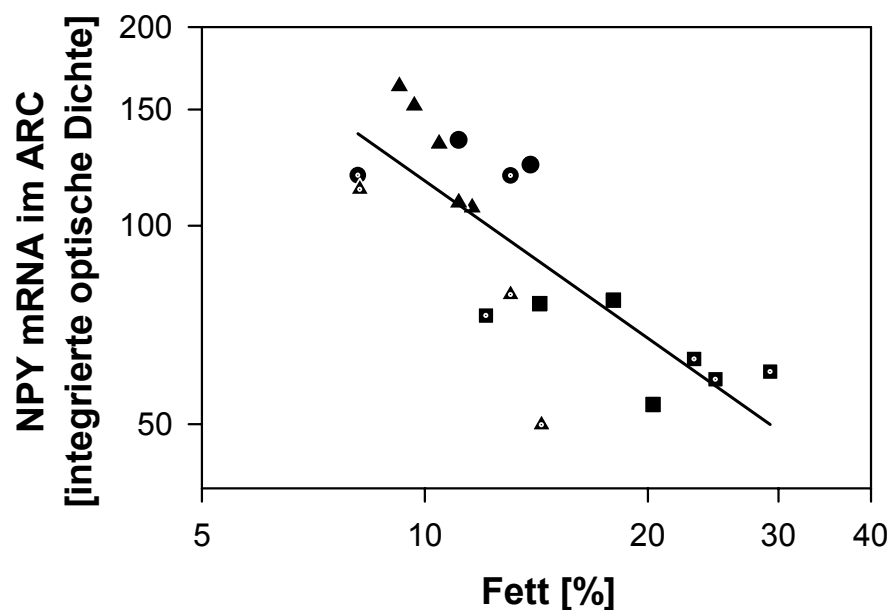
Die hier mittels *in situ*-Hybridisierung erhobenen Befunde hinsichtlich der NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus der Kontrolltiere decken sich mit Ergebnissen aus unabhängigen Studien. So konnten im Hypothalamus von *ob/ob*-Mäusen ebenfalls 2- bis 5-fach erhöhte NPY-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden (Stephens et al., 1995; Wilding et al., 1993; Qu et al., 1996). Dieser deutliche Anstieg reflektiert den Ausfall der inhibitorischen Leptinwirkung infolge des genetischen Defekts. Die NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus von  $-/-$  MC4-r-KO-Mäusen unterscheidet sich dagegen nicht von dem bei Wildtyp-Mäusen festgestellten Wert (Huszar et al., 1997). Trotz des Ausfalls des  $\alpha$ MSH/MC4-Systems und der damit einhergehenden Hyperphagie und Hyperleptinämie (Huszar et

al., 1997) scheint es zu keinem gegenregulatorischen Abfall der NPY-Konzentration zu kommen.

Hinsichtlich der Wirkung einer sCT- bzw. Amylin-Behandlung auf die NPY-mRNA- bzw. Peptid-Konzentration im Nucleus arcuatus von genetisch adipösen Mäusen liegen bisher keine vergleichbaren Studien vor. Die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung für die C57Bl/6J-Mäuse bei Standarddiät-Fütterung scheinen allerdings mit Literaturbefunden zu einer Amylinbehandlung bei Wildtyp-Ratten übereinzustimmen. So führte eine 6-tägige intracerebroventrikuläre Injektion von  $0,5 \text{ nmol} \cdot \text{d}^{-1}$  Amylin bei Sprague-Dawley-Ratten ebenfalls zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des NPY-Peptidspiegels im ARC (Morris & Nguyen, 2001). Bei einer 5-tägigen subkutanen Infusion von  $25 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  Amylin bei Wistar-Ratten erreichte die Erhöhung der NPY-Peptid-Konzentration im Gesamthypothalamus das Signifikanzniveau (Arnelo et al., 2000). Trotz dieser Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten, muss allerdings beachtet werden, dass die Konzentrationen von mRNA und Peptid in funktioneller Hinsicht nicht zwangsläufig vergleichbar sind. Zudem kann von der NPY-Konzentration im ARC nicht unmittelbar auf die Peptid-Konzentration im PVN geschlossen werden (Giraud et al., 1994). Die Befunde von Morris & Nguyen (2001) lassen so z.B. trotz der tendenziell erhöhten NPY-Konzentration im ARC einen erniedrigten NPY-Spiegel im PVN vermuten, der die anorektische Wirkung des Amylins erklären könnte.

Bei Betrachtung der hier erhobenen Daten zur NPY-mRNA-Konzentration im ARC fallen vor allem die hohen Werte für die *ob/ob*-Mäuse auf. Im Hinblick auf die stark verminderte sCT-Wirkung bei diesen Mäusen könnte für die genetisch adipösen Tiermodelle die Hypothese aufgestellt werden, dass mit ansteigendem NPY-Spiegel die sCT-Wirkung nachlässt. Dabei müsste allerdings davon ausgegangen werden, dass der sCT-Effekt entweder über eine Hemmung des NPY-Systems selbst vermittelt wird oder aber der erhöhte NPY-Spiegel die über ein anderes System vermittelte anorektische sCT-Wirkung kompensiert. Prinzipiell ist eine Interaktion zwischen dem NPY- und dem Amylin-System aufgrund von efferenten und afferenten Projektionen zwischen der AP/NTS-Region, als dem Hauptwirkort des Amylins (Lutz et al., 1998b; Rowland & Richmond, 1999), und dem Hypothalamus, im Speziellen dem PVN, vorstellbar (Norgren, 1978; Hyde & Miselis, 1983; Larsen et al., 1997; Rowland et al., 1997; Kotz et al., 2000). Basierend auf Studien, die die anorektische sCT-Wirkung in direkten Bezug zu Amylinrezeptoren in der AP setzen (Lutz et al., 2000), könnte folglich auch der Behandlungseffekt von sCT durch Veränderungen des zentralen NPY-Spiegels moduliert werden. Eine andere Möglichkeit könnte die direkte Interaktion auf der Ebene des

Hypothalamus sein, da Mikroinjektionen mit sCT in diese Region eine anorektische Wirkung gezeigt haben (Chait et al., 1995), so dass die sCT-Wirkung zumindest zum Teil durch Rezeptoren in hypothalamischen Kerngebieten vermittelt sein könnte. Eine direkte Vermittlung der sCT-Wirkung über eine Hemmung der NPY-Expression im Hypothalamus erscheint allerdings aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten nicht signifikanten und unterschiedlich gerichteten Veränderungen der NPY-mRNA-Konzentrationen im ARC von mit sCT behandelten Mäusen eher unwahrscheinlich. Allerdings könnte die Vergrößerung der N-Zahl zu einem aussagekräftigeren Ergebnis führen. Dass neben der Veränderung des NPY-Spiegels jedoch auch andere Einflussfaktoren auf die sCT-Wirkung existieren müssen, zeigt die Behandlung bei *fa/fa*-Ratten, die eine mit *-/-* MC4-r-KO-Mäusen vergleichbare sCT-Responsivität zeigen, obwohl im Hypothalamus ein 2-3-facher Anstieg des preproNPY-Spiegels nachgewiesen werden konnte (Sanacora et al., 1990).



**Abb. 30:** Genotypunabhängige Korrelation (doppelt-logarithmische Darstellung) zwischen der NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus (ARC) und dem prozentualen Körperfettgehalt von *+/+* (Kreise), *+/-* (Dreiecke) und *-/-* (Quadrate) Mäusen des MC4-r-KO-Stamms im Alter von 5 (ohne Punkt,  $N=10$ ) bzw. 8 Wochen ( $N=9$ ). Die gemeinsame Regression ( $r=-0,78$ ) unterscheidet sich signifikant von Null ( $P<0,001$ ). I. Schmidt, S. Eiden & J.G. Mercer, unveröffentlichte Ergebnisse.

Hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung sollte erwähnt werden, dass dies Pilotstudien in Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Julian G. Mercer am Rowett Research Institute in Aberdeen, Schottland waren. Aufgrund der dort in jahrelanger Forschung entwickelten Expertise auf diesem Gebiet, sind methodische Mängel bei der Durchführung der *in situ*-Hybridisierung sehr unwahrscheinlich (Mercer et al.,

1995, 1997a & b; Kozak et al., 1998; Williams et al., 1999). Obwohl die *in situ*-Hybridisierung als semiquantitative Methode betrachtet wird, konnte z.B. in gemeinsamen Studien an MC4-r-KO-Mäusen (I. Schmidt, S. Eiden & J.G. Mercer, unveröffentlichte Ergebnisse) gezeigt werden, dass bei sorgfältiger und standardisierter Durchführung dieser Nachweismethode eine äußerst präzise Korrelation zwischen der NPY-mRNA-Konzentration im ARC und dem Körperfettgehalt der Tiere zu erwarten ist, die durchaus statistisch auswertbar ist (Abb. 30). Die mangelnde eigene Erfahrung bei dem Schneiden der Gehirnpräparate könnte allerdings einen Einfluss auf die Genauigkeit der Messung gehabt haben. So führte z.B. die gewählte Anordnung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern zu einer Reduktion der auswertbaren Schnitzzahl pro Tier und somit eventuell zu einer größeren Streubreite der Daten, so dass in Kombination mit der relativ geringen N-Zahl pro Versuchsgruppe mögliche signifikante Unterschiede eventuell nicht als solche zu erkennen waren.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Pilotstudie ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine abschließende Beurteilung des Zusammenhangs zwischen der sCT-Wirkung und dem NPY-System möglich ist. Weiterführende Studien können eventuell durch die Vergrößerung der N-Zahl zu einem klareren Ergebnis beitragen. Zudem könnte mit Hilfe eines Zeitverlaufs der bestmögliche Zeitpunkt für die Gehirnentnahme ermittelt werden. Um eine direkte sCT-Wirkung auf die NPY-Expression im ARC von einem indirekten Einfluss durch die infolge der Behandlung reduzierte Futterraufnahme unterscheiden zu können, könnte dabei auch ein Futterentzug vor der Gehirnentnahme hilfreich sein. Außerdem sollte die Bestimmung der NPY-mRNA-Konzentration im ARC sinnvollerweise mit dem immunohistochemischen Nachweis der NPY-Peptid-Konzentration im PVN kombiniert werden, um so ein aussagekräftigeres Ergebnis über die Veränderung des NPY-Spiegels im Hypothalamus zu erhalten.

#### **4.3.6 Worauf beruht die gesteigerte sCT-Wirkung im Sonderfall der diätinduzierten Adipositas?**

##### 4.3.6.1 Plasmakonzentrationen an Insulin und Amylin bei Fütterung einer attraktiven, fettreichen Zusatzdiät

Bezüglich der Veränderung des Plasmainsulinspiegels infolge einer fettreichen Nahrung sind in den letzten Jahren mehrere Studien an Nagern durchgeführt worden. Dabei konnte in jedem Fall ein Anstieg dieses Parameters beobachtet werden, das Ausmaß dieser Erhöhung variierte allerdings. So beschreiben Surwit et al. (1997) nach 8-monatiger Fütterung einer fettreichen



Diät eine Verdopplung des Plasmainsulinspiegels bei 9 Monate alten C57Bl/6J-Mäusen. Bei dem gleichen Mäusestamm konnte bei 12 Monate alten Tieren nach einem 11-monatigen Zugang zu einer fettreichen Diät ein 3,3-facher Anstieg der Plasmainsulin-Konzentrationen nachgewiesen werden (Mulder et al., 2000). In einer weiteren Studie führte eine 18-monatige fettreiche Diät zu einem 2,5-fachen Anstieg dieses Parameters (Ahrén & Scheurink, 1998). Bergen et al. (1999) konnten bereits nach 2-wöchiger Fütterung einer fettreichen Diät eine 10-fache Erhöhung des Plasmainsulinspiegels beobachten. Bei 3 Monate alten C57Bl/6J-Mäusen zeigte sich nach einem 2-monatigen Angebot einer fettreichen Nahrung ein 1,6-facher Anstieg des Plasmainsulinspiegels (Ahrén et al., 1997). Nach einem mit den vorliegenden Daten vergleichbaren Zeitraum von 7 Wochen führte das Angebot einer fett- und saccharosereichen Diät zu einem 1,8-fachen Anstieg der Plasmainsulin-Konzentration bei 3,5 Monate alten Mäusen (Harte et al., 1999). Inwieweit Unterschiede in der Zusammensetzung bzw. Attraktivität der fettreichen Diäten, die Dauer des Angebots oder das Alter der Mäuse eine Rolle bei der Variabilität der erhobenen Befunde innerhalb des gleichen Mäusestamms spielen, kann nur vermutet werden. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete 3- bis 4-fache Anstieg der Plasmainsulin-Konzentrationen infolge des zusätzlichen Angebots von weißer Schokolade über einen Zeitraum von mehr als 50 Tagen liegt im Vergleich zu den hier aufgeführten Literaturbefunden in einem mittleren Bereich.

Auch bei ernährungsbedingt adipösen Tieren scheint eine Erhöhung des Plasmainsulinspiegels mit einem Anstieg der Plasmaamylin-Konzentrationen einherzugehen. So konnten Mulder et al. (2000) bei C57Bl/6J-Mäusen in Kombination mit dem 3,3-fach erhöhten Insulinspiegel einen 1,6-fachen Anstieg des Plasmaamylinspiegels beobachten. Folglich müsste bei den hier untersuchten Mäusen eine milde Hyperamylinämie zu erwarten sein. Diese diätinduzierte Hyperamylinämie steht allerdings nicht in einem Zusammenhang mit einer Abschwächung der sCT-Wirkung auf die Futteraufnahme wie dies für die vermutete Hyperamylinämie bei den genetisch adipösen Tiermodellen zu beobachten war. Wenngleich der hemmende Einfluss eines erhöhten Amylinspiegels auf die anorektische Wirkung des sCT damit nicht vollständig ausgeschlossen ist, so liegt angesichts dieser Beobachtungen die Vermutung nahe, dass Veränderungen der Plasmakonzentrationen an Insulin und Amylin nicht die alleinigen Faktoren bei der Modifikation der sCT-Wirkung sein können.

#### 4.3.6.2 Der NPY-Spiegel in Abhängigkeit von der Nahrungszusammensetzung

Die hier untersuchten C57Bl/6J-Mäuse zeigen bei dem Angebot von weißer Schokolade eine deutliche Präferenz für diese Diät, so dass nach einer anfänglichen Umstellungsphase

kontinuierlich mehr als 85% der aufgenommenen Energie über die Zusatzdiät gedeckt werden. Diese Beobachtung stimmt mit Literaturbefunden überein, die für diesen Mäusestamm eine im Vergleich zu anderen Stämmen mittlere bis hohe Präferenz für eine fettreiche Diät (Smith et al., 2000) bzw. eine Neigung zu diätinduzierter Adipositas nachgewiesen haben (Surwit et al., 2000; West et al., 1992; Watson et al., 2000). Hinsichtlich der Auswirkung der Nahrungszusammensetzung auf den NPY-Spiegel in hypothalamischen Kerngebieten konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass eine wechselseitige Beeinflussung zwischen dem Kohlenhydratgehalt der Nahrung und dem NPY-Spiegel im ARC und PVN existiert. Prinzipiell scheint es zu einem Anstieg der NPY-Expression und NPY-Peptid-Produktion im ARC und im PVN zu kommen, wenn der Kohlenhydratanteil in der Nahrung überwiegt (Akabayashi et al., 1994; Shor-Posner et al., 1991; Tempel & Leibowitz, 1994). So konnte bei Ratten mit freiem Zugang zu den drei Makronährstoffen eine positive Korrelation zwischen der Kohlenhydrataufnahme und der NPY-Peptid-Konzentration im ARC und in parvocellulären Neuronen des PVN nachgewiesen werden (Jhanwar-Uniyal et al., 1993). Wang J. et al. (1999a) konnten sogar zeigen, dass nach der Aufnahme einer einzigen kohlenhydratreichen Mahlzeit im ARC und PVN von Ratten erhöhte Konzentrationen an NPY-mRNA und -Peptid im Vergleich zu einer fettreichen Mahlzeit bzw. einer Mahlzeit mit nur moderatem Kohlenhydratgehalt auftreten. Ob in diesem Zusammenhang die Art der Kohlenhydrate – komplex oder rasch resorbierbar – eine Rolle bei der Beeinflussung des NPY-Spiegels spielt, wurde bisher nicht untersucht.

Im umgekehrten Fall ist die Aufnahme einer ausgewogenen bzw. fettreichen Nahrung mit reduzierten oder zumindest unveränderten NPY-Spiegeln gekoppelt (Wang J. et al., 1998; Giraudo et al., 1994; Stricker-Krongrad et al., 1998). Dabei scheint allerdings nicht der hohe Fettgehalt, sondern der konsequenterweise niedrige Kohlenhydratanteil der ausschlaggebende Faktor zu sein. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Fettaufnahme einen hemmenden Einfluss auf die NPY-Konzentration ausübt, konnte bisher in Korrelationsstudien kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nachgewiesen werden (Wang J. et al., 1998; Jhanwar-Uniyal et al., 1993). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass auch ein niedriger Proteingehalt zu einem Anstieg der NPY-Expression zu führen scheint (White et al., 1994), allerdings kann auch bei gleichbleibendem Proteingehalt ein signifikanter Unterschied in der NPY-Expression zwischen einer fettreichen- und kohlenhydratreichen Diät nachgewiesen werden (Wang J. et al., 1998; Giraudo et al., 1994).

Die hier angebotene Zusatzdiät in Form von weißer Schokolade besteht energetisch zu 39% aus Kohlenhydraten (KH), 56% aus Fett (F) und 5% aus Proteinen (P), kann folglich als fettreiche, proteinarme Nahrung mit mittlerem Kohlenhydratgehalt klassifiziert werden. Durch die Tatsache, dass die hier untersuchten Mäuse dieser Diät zu mehr als 85% den Vorzug gegenüber der pelletierten Standard-Diät (KH: 62%, F: 10%, P: 28%) geben, ist zudem die Attraktivität dieser Zusatznahrung klar dokumentiert. Aufgrund der relativen Anteile der drei Makronährstoffe müsste im Hinblick auf die oben angeführten Literaturbefunde bei den hier untersuchten C57Bl/6J-Mäusen eine erniedrigte NPY-mRNA-Konzentration im ARC im Vergleich zu der ausschließlichen Fütterung der kohlenhydratreichen Standard-Diät zu erwarten sein. Die bei Zusatzdiät-Fütterung um 48% signifikant niedrigere NPY-mRNA-Konzentration im ARC von mit PBS behandelten C57Bl/6J-Mäusen bestätigt diese Annahme. Inwieweit dabei der niedrige Proteingehalt der Schokolade eventuell zu einer Verringerung dieses Unterschiedes beigetragen hat, kann hier nur vermutet werden. Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass einige Studien existieren, die in Kombination mit einer attraktiven bzw. fettreichen Diät anstatt erniedrigter NPY-Spiegel, unveränderte oder sogar erhöhte NPY-Konzentrationen im Hypothalamus beschreiben (Wilding et al., 1992; Kim et al., 1998; Levin & Dunn-Meynell, 1997). Inwieweit diese widersprüchlichen Befunde auf Veränderungen im Kohlenhydratanteil bzw. in der Art der Kohlenhydrate im Vergleich zu den Kontrolldiäten beruhen, bleibt zu untersuchen. Abgesehen von der Zusammensetzung der Nahrung scheinen allerdings auch Stammesunterschiede einen Einfluss auf die Veränderung des NPY-Spiegels infolge einer attraktiven Diät zu haben (Levin & Dunn-Meynell, 1997; Levin, 1999). So konnten in einer vergleichenden Studie unterschiedlich starke Reduktionen der NPY-mRNA-Konzentrationen im Hypothalamus von Tieren aus drei Mäusestämmen als Folge der Fütterung einer fettreichen Diät festgestellt werden, wobei bei C57Bl/6J-Mäusen der Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen am geringsten ausfiel (Bergen et al., 1999). Dass auch der zeitliche Aspekt nicht zu unterschätzen ist, zeigen die Ergebnisse einer weiteren Studie an C57Bl/6J-Mäusen, bei denen erst nach 8-wöchigem Angebot einer fettreichen Diät eine signifikante Abnahme der NPY-Expression im ARC nachgewiesen werden konnte (Lin et al., 2000a). Ziotopoulou et al. (2000) fanden im gleichen Mäusestamm nach 1-tägigem Angebot einer fettreichen Nahrung eine nicht signifikante Reduktion der hypothalamischen NPY-Expression, das Signifikanzniveau wurde am 2. Tag schließlich erreicht, nach einer Woche zeigte sich allerdings ein wiederum nicht signifikanter Anstieg in der NPY-Expression.

Obwohl offensichtlich ein starker Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Nahrung und dem NPY-Spiegel in zentralen Kerngebieten existiert, ergibt sich innerhalb einer Gruppe mit gleicher Nahrungszusammensetzung zudem ein positiver Zusammenhang zwischen der NPY-Expression im ARC und der Körperfettmasse der Tiere. Dies konnte sowohl bei der Untersuchung von MC4-r-KO-Mäusen bei Standarddiät-Fütterung (vgl. Abb. 30) als auch in einer unabhängigen Studie bei Ratten mit ähnlicher Makronährstoffpräferenz nachgewiesen werden (Wang J. et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit lässt sich zumindest bei den beiden genetisch adipösen Mausmodellen ein solcher Zusammenhang erkennen, wobei jedoch keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen mit sCT behandelten und Kontroll-Tieren auftreten.

#### 4.3.6.3 Könnte das hypothalamische NPY-System an der Vermittlung der selektiven sCT-Wirkung auf die Zusatzdiät beteiligt sein?

Neben dem Einfluss der Nahrung auf den endogenen NPY-Spiegel scheint im Gegenzug eine NPY-Injektion die Aufnahme der drei Makronährstoffe ebenfalls unterschiedlich stark zu beeinflussen. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass speziell die Kohlenhydrataufnahme infolge einer zentralen NPY-Injektion ansteigt (Morley et al., 1987; Stanley et al., 1985; Tempel & Leibowitz, 1990). Außerdem konnte für die natürliche Futteraufnahme bei Ratten gezeigt werden, dass die anfängliche Kohlenhydratpräferenz mit einem Peak im endogenen NPY-Spiegel im PVN kombiniert ist, während im weiteren Verlauf in Kombination mit einem Abfall der NPY-Konzentration die Aufnahme von Proteinen und Fetten ansteigt (Akabayashi et al., 1994; Shor-Posner et al., 1991; Tempel & Leibowitz, 1994; Jahnwar-Uniyal et al., 1990). Die Spezifität der NPY-Wirkung auf die Kohlenhydrataufnahme, unabhängig von der Attraktivität der Nahrung, wird durch Befunde unterstützt, die zeigen, dass der Anstieg der Futteraufnahme um mehr als 50% vermindert werden kann, wenn das Angebot von Kohlenhydraten entzogen wird, der Entzug von Protein oder Fett hat dagegen keinen Einfluss (Stanley et al., 1985). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die bevorzugte Stimulation der Kohlenhydrataufnahme infolge einer NPY-Injektion auch beobachtet werden kann, wenn diese der am wenigsten bevorzugte Makronährstoff sind und die Aufnahme von Fett und Proteinen einen weitaus größeren Teil der Gesamtfutteraufnahme ausmacht (Tempel & Leibowitz, 1990). Bei Abweichungen von der üblichen Standard-Diät scheint aber auch die individuelle Nahrungspräferenz des Tieres im Vorfeld eine modulierende Rolle bei der Selektivität der NPY-Wirkung zu spielen (Welch et al., 1994). So konnte bei Ratten, die eine Präferenz für Fett entwickelt hatten, eine Steigerung der

Fettaufnahme durch eine NPY-Injektion in den PVN beobachtet werden (Stanley et al., 1989; Welch et al., 1993). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass durch eine NPY-Injektion trotz der relativen Selektivität grundsätzlich auch die Aufnahme von Fett und Proteinen gesteigert wird, selbst wenn dies in deutlich geringerem Ausmaße im Vergleich zu der Steigerung der Kohlenhydrataufnahme stattfindet (Welch et al., 1994).

Trotz des vermuteten Zusammenhangs zwischen NPY und spezifischen Nahrungskomponenten kann eine Vermittlung der sCT-Wirkung über das hypothalamische NPY-System – wie schon für die genetisch adipösen Tiermodelle angesprochen – weitgehend ausgeschlossen werden, da auf Basis der Literaturbefunde eine selektiv verminderte Schokoladenaufnahme ohne die gleichzeitige Reduktion der Standarddiät-Aufnahme als kohlenhydratreicherer Nahrungskomponente in Zusammenhang mit einer Hemmung der orexigenen NPY-Wirkung eher unwahrscheinlich ist. Zudem müsste der NPY-Spiegel dann infolge einer sCT-Injektion absinken, die hier erhobenen Befunde lassen aber vielmehr einen Anstieg der NPY-Expression im ARC vermuten. Auch in einer Studie, die die Auswirkung einer intracerebroventrikulären Amylininjektion auf die NPY-Peptid-Konzentration in verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten untersuchte, konnte ein vergleichbarer tendenzieller Anstieg der NPY-Konzentration im ARC festgestellt werden (Morris & Nguyen, 2001). Eine mögliche Erklärung für den tendenziellen Befund in der vorliegenden Arbeit könnte ein gegenregulatorischer Mechanismus als Reaktion auf die starke anorektische sCT-Wirkung sein, wie es auch im Falle der erhöhten NPY-Peptid-Konzentrationen bei den hypophagen  $GR^{NesCre}$ -Mäuse zu vermuten ist. In diesem Fall ist es durchaus vorstellbar, dass es dabei zu einem leichten Anstieg der kohlenhydratreichen Standarddiät-Aufnahme kommt. Ein ebenfalls nicht auszuschließender NPY-induzierter Anstieg der Schokoladenaufnahme könnte durch die primäre selektive, stark anorektische sCT-Wirkung überdeckt sein. Welche zentralen Systeme an der Vermittlung dieser selektiven sCT-Wirkung beteiligt sein könnten, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht definitiv beurteilt werden. Vorstellbar wäre z.B. eine Beteiligung des Opioid-Systems. So konnte aufgrund von Studien mit Opioid-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten ein Zusammenhang zwischen diesem System und der Aufnahme von attraktiver Nahrung hergestellt werden (Cooper, 1983; Levine & Atkinson, 1987; Lynch & Libby, 1983; Giraudo et al., 1999). C-Fos-Studien lassen zudem eine tonische inhibitorische Wirkung des Opioid-Systems auf die Area postrema vermuten, die normalerweise zu einer erhöhten Aufnahme von attraktiver Nahrung führen könnte (Gestreau et al., 2000; Edwards & Ritter, 1981; Hyde & Miselis, 1983). Würde eine sCT-Wirkung durch die Aktivierung von Neuronen in der Area postrema die postulierte tonische Hemmung dieser

Neuronen kompensieren, könnte dies ein Erklärungsansatz für die selektive Wirkung der sCT-Injektion auf die Aufnahme der attraktiven Zusatzdiät sein.

#### 4.3.7 Beurteilung des Lachs-Calcitonins im Hinblick auf die Therapie von Adipositas

Grundsätzlich zeichnet sich Lachs-Calcitonin als potentiell Pharmakon bei der Behandlung einer Hyperphagie in Zusammenhang mit einer Adipositas durch zwei entscheidende Charakteristika aus. So zeigt es seine anorektische Wirkung auch in Fällen eines gestörten Leptin-Systems. Dabei wäre im Hinblick auf die Situation beim Menschen vor allem die starke anorektische Wirkung in Fällen einer diätinduzierten Adipositas von Bedeutung. Im Tierexperiment führt auch bei dem kompletten Ausfall des  $\alpha$ MSH/MC4-Systems die sCT-Behandlung zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, wobei in Fällen einer analogen Störung beim Menschen für das heterozygote Auftreten dieses Defektes in Kombination mit einer hochkalorischen Ernährung eine Steigerung der anorektischen sCT-Wirkung zu erwarten wäre. Die relativ schwache Wirkung in Zusammenhang mit dem *ob/ob*-Defekt dürfte aufgrund der Seltenheit eines analogen Defektes beim Menschen bei therapeutischen Überlegungen eine nur untergeordnete Rolle spielen. Der zweite, besonders interessante Aspekt ist der Befund, dass es bei einer attraktiven, energiedichten und fettreichen Zusatznahrung, die leicht auf die Ernährungssituation des Menschen in den westlichen Industrienationen übertragen werden kann, zu einer selektiven Reduktion dieser Nahrungskomponente kommt, währenddessen der Konsum der ballaststoffreichen, "gesunden" Standard-Diät sogar leicht zunimmt.

Aufbauend auf diesen ersten Befunden muss in weiterführenden Studien überprüft werden, inwieweit sich eine sCT-Behandlung hinsichtlich seiner anorektischen Wirkung über einen längeren Zeitraum hin bewährt. Dabei sind vor allem "Nebenwirkungen" des Lachs-Calcitonins zu untersuchen, die neben der hier untersuchten anorektischen Wirkung aufgrund der strukturellen Homologie zu endogenem Amylin, Calcitonin, CGRP und Adrenomedullin (Wimalawansa, 1997; Muff et al., 1995; Sexton et al., 1999) zu erwarten sind. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Lachs-Calcitonin-Wirkung wurde ein bereits zugelassenes Medikament zur Regulation des Calciumstoffwechsels und zur Behandlung von Osteoporose verwendet (Calcitonin-ratiopharm® 50), so dass die Verträglichkeit für den Menschen nachgewiesen zu sein scheint. Inwieweit dieses Medikament über die eigentliche Indikation hinaus bei der Therapie von Adipositas eingesetzt werden kann, müssen weiterführende Studien zeigen. Dabei müssen zunächst die genauen Mechanismen bei

der Vermittlung der sCT-Wirkung erforscht werden, wobei neben den ersten Studien, die einen Zusammenhang zwischen der sCT-Wirkung und dem Amylin-System vermuten lassen (Lutz et al., 2000) weitere Studien in Hinblick auf die Verbindung zu anderen Systemen nötig sind, die die Selektivität der sCT-Wirkung auf bestimmte Nahrungskomponenten erklären könnten.

#### 4.4 Fazit

Die adäquate Regulation des Energiehaushaltes ist für das Überleben eines Organismus essentiell. Auch wenn die Entstehung einer Adipositas, als Folge der Entgleisung dieser Regulation im oberen Bereich, im Gegensatz zu der möglichen Gefahr des Verhungerns, keine unmittelbaren lebensbedrohlichen Konsequenzen hat, so treten auch in diesem Fall eine Vielzahl von sekundären Störungen auf, die langfristig die Lebenserwartung herabsetzen. Als Ursache für die Entstehung einer Adipositas muss innerhalb der westlichen Industrienationen vor allem die überhöhte Aufnahme von attraktiver, energiedichter und fettreicher Nahrung in Kombination mit einer diätinduzierten Leptinresistenz angesehen werden. Da unter diesen Bedingungen eine direkte Beeinflussung des Leptin-Systems für die Therapie der Adipositas wenig aussichtsreich erscheint, müssen Alternativen in Erwägung gezogen werden. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass der Regulation der Nahrungsaufnahme ein komplexes Netz an neuronalen und humoralen Signalen, die auf verschiedensten Ebenen miteinander interagieren, zugrunde liegt. So zeigen nicht zuletzt die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche bei *ob/ob*-Mäusen, dass neben dem zentralen Leptin-System weitere Systeme existieren müssen, die an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt sind. Obwohl im Falle der *ob/ob*-Mäuse nur gezeigt werden konnte, dass die redundante Absicherung des Energiehaushaltes im unteren Bereich funktioniert, könnte die Identifizierung dieser gegenregulatorischen Systeme und der zugrundeliegenden Wirkmechanismen neue therapeutische Ansätze für die Behandlung von Adipositas liefern.

Die in diesem Zusammenhang durchgeführte Charakterisierung der GR<sup>NesCre</sup>-Maus konnte zeigen, dass die HPA-Achse prinzipiell an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt ist und mit dem Leptin-System interagiert. Die Komplexität dieses Knockout-Modells erschwerte allerdings die Aufdeckung der zugrunde liegenden Ursache-Wirkungs-Beziehungen und machte deutlich, dass Manipulationen der HPA-Achse aufgrund der vielfältigen Funktionen dieses Systems vermutlich nicht geeignet sind, einen gezielten

Angriffspunkt für die Therapie von Adipositas zu bieten. Eine weitaus bessere Möglichkeit scheint dagegen die Behandlung mit Lachs-Calcitonin zu sein. Obwohl der genaue zentrale Wirkmechanismus noch zu klären ist, ist dabei vor allem der Befund interessant, dass es zu einer selektiven Reduktion der Aufnahme der attraktiven, energiedichten und fettreichen Nahrungskomponente kommt, während die "gesunde" Standard-Diät von den behandelten Mäusen sogar vermehrt gefressen wird – unabhängig von einer genetischen oder diät-induzierten Störung im Leptin-System. Inwieweit hiermit ein potentieller Therapieansatz für die Bekämpfung der Adipositas beim Menschen eröffnet ist, müssen Folgestudien zeigen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Analyse grundlegender Zusammenhänge hinsichtlich der Rolle des Leptin-Systems bei der komplexen Regulation des Energiehaushaltes. Im Hinblick auf einen möglichen Ansatz für die Adipositas-therapie wurde dabei der Schwerpunkt auf pharmakologische und genetische Manipulationen des Leptin-Systems und anderer mit der Regulation des Energiehaushalts in Zusammenhang stehender Hormonsysteme gelegt.

In einer ersten Versuchsserie wurde durch die Anwendung von subkutanen osmotischen Mini-Pumpen eine Langzeit-Leptininfusion bei *ob/ob*-Mäusen durchgeführt, die vor allem hinsichtlich der Stabilisierung eines neuen, niedrigen Körpermasse-Niveaus gegen Ende des Behandlungszeitraumes von Interesse war. Durch die Anwendung verschiedener Leptin-Dosierungen und die zusätzliche Gabe subkutaner Leptininjektionen sollten die Ursachen für die nachlassende Reaktion der Tiere auf die Leptininfusion untersucht werden. Neben der kontinuierlichen Aufzeichnung der Körpermasse, der Futteraufnahme und – im Rahmen einer Versuchsgruppe – des Sauerstoffverbrauchs wurde die Dosisabhängigkeit auch anhand der Bestimmung der Körper- bzw. Leberzusammensetzung und des Plasmainsulinspiegels im Versuchsverlauf überprüft und zudem – durch die Untersuchung zwei verschiedener Altersgruppen von *ob/ob*-Mäusen – in Abhängigkeit von den Ausgangsbedingungen betrachtet.

Die Langzeit-Leptininfusion führt bei den *ob/ob*-Mäusen zu einer Reduktion aller untersuchten Parameter, wobei innerhalb einer Altersgruppe eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen ist. Versuchsgruppen-übergreifend kann zudem eine Dosisabhängigkeit auf der Basis einer Korrelation zwischen dem Plasmaleptinspiegel und der Körperfettmasse am Versuchsende beobachtet werden. Die Einstellung eines stabilen Körpermasse-Niveaus am Versuchsende ist weder in einer nachlassenden Leptinresponsivität der Tiere begründet, noch ist sie die Folge einer vollständigen Leerung der Körperfettspeicher. Die vorliegenden Untersuchungen sind folglich ein klarer Beweis für die Existenz redundanter, die Größe der Körperfettspeicher signalisierender Systeme. Aufbauend auf diesem Befund wurde in zwei weiteren Versuchsserien exemplarisch untersucht, welche weiteren Hormonsysteme in diesem Zusammenhang möglicherweise mit dem Leptin-System interagieren.

Die zweite Versuchsserie beschäftigte sich mit der Charakterisierung der GR<sup>NesCre</sup>-Maus, einem Knockout-Modell, bei dem die Funktion des Glukokortikoid-Rezeptors gewebespezifisch in Neuronen und Gliazellen ausgeschaltet ist. Diese genetische Manipulation der

HPA-Achse war vor allem hinsichtlich ihres inhibierenden Effekts auf das Wachstum der Mäuse von Interesse. Durch die Untersuchung von Körperzusammensetzung, Plasmaleptin- und Plasmainsulinspiegel in verschiedenen Altersstufen sollten Aussagen über den Entwicklungsverlauf dieser Störung gewonnen werden. Durch die vergleichende Bestimmung der Futteraufnahme und des Energieverbrauchs bei Absetzlingen und adulten GR<sup>NesCre</sup>- und Wildtyp-Mäusen wurden zudem die energetischen Ursachen für die verminderte Energiedeposition der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse untersucht.

Infolge des zentralen Glukokortikoid-Rezeptor-Defekts unterscheiden sich die GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse in ihrer postnatalen Entwicklung von ihren Wildtyp-Geschwistern und zeigen eine kontinuierliche Wachstumshemmung, die während der Säuglingsphase mit einem Anstieg des prozentualen Fettgehaltes und erst nach dem Absetzen mit einer reduzierten Fettdeposition kombiniert ist. Die verminderte Energiedeposition der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse ist verbunden mit einer altersunabhängigen, im Hinblick auf den Körperfettgehalt überproportionalen Erhöhung des Plasmaleptinspiegels mit einer gleichgerichteten Veränderung der Plasmainsulin-Konzentrationen. Während aufgrund von Befunden an juvenilen Ratten von der Hypothese auszugehen ist, dass die Veränderung der Körperzusammensetzung der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse während der Säuglingsphase sowohl auf eine reduzierte Futteraufnahme als auch auf eine verminderte thermoregulatorische Thermogenese zurückzuführen ist, lassen die Sauerstoffmessungen bei Absetzlingen und adulten GR<sup>NesCre</sup>-Mäusen bei weiterhin reduzierter Futteraufnahme eine gesteigerte Thermogenese im Erwachsenenalter vermuten. Am Beispiel der GR<sup>NesCre</sup>-Mäuse wird somit ein Eingreifen der HPA-Achse in die Regulation des Energiehaushalts und eine – möglicherweise über die Beeinflussung des Insulin-Systems vermittelte – Interaktion mit dem Leptin-System demonstriert. Die Auswirkungen des zentralen Glukokortikoid-Rezeptor-Defekts sind allerdings zu komplex, um die energetischen und neuroendokrinen Grundlagen dieser Glukokortikoid-Wirkung vollständig aufdecken zu können.

Im Rahmen der dritten Versuchsserie wurde die anorektische Wirkung von Lachs-Calcitonin (sCT), einem Amylin-Analogen, untersucht. Dabei wurde zunächst die Wirkung von sCT und Leptin bzw. einer Kombinationsgabe beider Substanzen bei C57Bl/6J-Mäusen unter normalen Fütterungsbedingungen (Angebot einer Standard-Nagetierdiät) auf der Basis von eintägigen subkutanen Injektionen miteinander verglichen. Um zu testen, ob eine durch das Angebot einer attraktiven, fettreichen Nahrung ausgelöste funktionelle Leptinresistenz einen Einfluss auf die Wirkungsstärke der sCT-Behandlung ausübt, wurden vergleichend eintägige sCT-

Injektionen nach einem mehrwöchigen Zusatzangebot von Schokolade durchgeführt. Die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei C57Bl/6J-, -/- MC4-r-KO- und *ob/ob*-Mäusen sowie bei Wildtyp- und *fa/fa*-Ratten unter normalen Fütterungsbedingungen sollte zudem zeigen, ob ein genetischer Defekt innerhalb des Leptin-Systems bzw. seiner zentralen Signaltransmission zu einer Wirkungsbeeinträchtigung führt. Durch die vergleichenden Untersuchungen des Plasmainsulinspiegels bzw. der NPY-mRNA-Konzentration im Nucleus arcuatus von mit sCT behandelten und Kontroll-Tieren der genannten Tiermodelle sollten mögliche Ursachen für die unterschiedliche Wirkung der sCT-Behandlung analysiert werden.

Die Kombinationsbehandlung mit Leptin und sCT zeigt, dass sich die Wirkungen beider Substanzen hinsichtlich der Reduktion der Futtermittelaufnahme addieren. Infolge eines genetischen Defekts innerhalb des Leptin- bzw.  $\alpha$ MSH/MC4-Systems kommt es zu einer Verminderung der anorektischen sCT-Wirkung, wobei die sCT-Responsivität der MC4-r-KO-Mäuse und *fa/fa*-Ratten moderat, die der *ob/ob*-Mäuse stark vermindert ist. Im Falle einer diät-induzierten Leptinresistenz infolge des Angebots einer attraktiven, fettreichen Zusatzdiät bei Wildtyp-Tieren tritt dagegen eine deutliche Wirkungssteigerung im Vergleich zu der sCT-Wirkung unter normalen Fütterungsbedingungen auf. Dabei wird selektiv die Aufnahme der attraktiven, fettreichen Diätkomponente unterdrückt, während die Aufnahme der Standard-Diät sogar leicht zunimmt. Die Messungen des Plasmainsulinspiegels ergeben zwar eine der sCT-Wirkung entsprechende graduelle Erhöhung der Plasmainsulin-Konzentrationen bei den einzelnen genetisch adipösen Tiermodellen, lassen aber keinen direkten Zusammenhang mit der Wirkungssteigerung bei der Zusatzdiät-Fütterung erkennen. Auch Unterschiede in der NPY-mRNA-Konzentration scheinen keinen Einfluss auf die Wirkungsstärke der sCT-Injektion auszuüben, so dass eine Vermittlung der sCT-Wirkung über dieses Neuropeptid-System eher auszuschließen ist. Welche Systeme im Speziellen an der Vermittlung der selektiven sCT-Wirkung auf die Zusatzdiät beteiligt sind, wird in Folgestudien geklärt werden müssen.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit geben einen Einblick in die komplexe Regulation des Energiehaushalts und konnten – ausgehend von der zentralen Rolle des Leptin-Systems – zeigen, dass die Beteiligung weiterer Hormonsysteme und die Aufdeckung der dieser Interaktion zugrunde liegenden Mechanismen einen potentiellen Ansatz für die Adipositas-therapie bieten, was gerade im Hinblick auf die hohe Prävalenz der, mit einer funktionellen Leptinresistenz einhergehenden, diätinduzierten Form dieser Störung von Bedeutung sein könnte.

## 6 ANHANG – verwendete Chemikalien und Lösungen

### 6.1 Pharmakologische Behandlung der Versuchstiere

- physiologische Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., BRD)
- PBS= phosphate buffered saline:
  - 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH~7,4) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)
  - in physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., BRD)
- rekombinantes Leptin
  - a)  $M_w=16000$  Da (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, BRD)
  - b)  $M_w=17560$  Da (His<sub>6</sub>-tagged-Leptin) (Aventis Pharma, Frankfurt a.M., BRD)
- Ketavet® (Pharmacia & Upjohn AG, Dübendorf, BRD)
- Rompun® (Provet AG, Lyssach b. Burgdorf, BRD)
- Fluothane® (Zeneca GmbH, Plankstadt, BRD)
- Xylocain® 1% (Astra Chemicals GmbH, Wedel, BRD)
- Lachs-Calcitonin (sCT)=Calcitonin-ratiopharm®50 (Ratiopharm, Ulm, BRD)

### 6.2 Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Plasma

- Liquemin 5000® (Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH)
- Maus-Leptin RIA-Kit (Linco Research Inc., St. Charles, MO, USA)
- Insulin-RIA-Kit (Serono Diagnostics, Freiburg, BRD)
- Ratten-Insulin-Standard (Novo Industries Laboratories, Bagsvaerde, DK)
- Thyroxin-RIA-Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim, BRD)

### 6.3 *In situ*-Hybridisierung

#### 6.3.1 Beschichten der Objektträger

- Herstellen von DEPC-Wasser:
  - dest. Wasser
  - 0,1% Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)
  - über Nacht im Abzug stehen lassen, so daß RNasen inaktiviert werden
  - durch anschließendes Autoklavieren wird das DEPC-Molekül in sich verflüchtendes CO<sub>2</sub> und Ethanol gespalten

- Ansetzen der 0,5%igen Gelatine-Lösung:
  - 1,5 g Gelatine (G-2500, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)
  - 300 ml DEPC-Wasser
  - 0,15 g  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (VWR International, Poole, UK)
- Ansetzen der Poly-L-Lysin-Lösung:
  - 25 mg Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)
  - 300 ml DEPC-Wasser
  - 3 ml 1M TRIS (pH 8) (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)

### 6.3.2 Schneiden der Gehirne

- Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL)
- Ethanol vergällt (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

### 6.3.3 Herstellung der radioaktiv markierten RNA-Sonde (Transkription)

- Herstellen von 0,75 M Dithiothreitol (DTT)
  - 2,32 g DTT (Promega Ltd., Southampton, UK)
  - 20 ml 0,01M Natriumacetat (pH 5,2, mit DEPC-Wasser angesetzt) (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)

→ bei  $-20^\circ\text{C}$  als Aliquot gelagert
- 5x Transkriptionspuffer, Bestandteil des Promega Transkriptions-Kits (Promega Ltd., Southampton, UK), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- linearisierte Plasmid-DNA (0,13  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP; jede Base ausgangsmäßig: 10mM) (Promega Ltd., Southampton, UK), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- RNase Block I (38,2 U/ $\mu\text{l}$ ) (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- $^{35}\text{S}$ -UTP (12,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) (NEN Life Science Products, Zaventem, B), im Kühlschrank gelagert
- RNA-Polymerase T3 (17 U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega Ltd., Southampton, UK), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- DEPC-Wasser
- DNase, (1 U/ $\mu\text{l}$ ), Bestandteil des Promega Transkriptions-Kits (Promega Ltd., Southampton, UK), bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert
- Szintillationsflüssigkeit, (Perkin Elmer, Inc., Boston, MA, USA)

#### 6.3.4 Herstellung des Hybridisierungspuffers

- Herstellen des Dextransulfats:
  - 1,5 ml DEPC-Wasser
  - 1g Dextran-Sulfat (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - ohne zu durchmischen zunächst auf 55-60°C erwärmen, nach 1 h stark vortexen, nach einer weiteren ½ h erneut, dann sollte das Dextran-Sulfat gelöst sein
- Herstellen von 5M NaCl:
  - 29,22g NaCl (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 100 ml dest. Wasser
  - über Nacht mit DEPC behandeln
  - bei -20°C als Aliquot gelagert
- Herstellen von 1M TRIS (pH8):
  - 12,11g TRIS (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 80 ml DEPC-Wasser
  - vorkalibriertes pH-Meter mit DEPC über Nacht behandeln, den pH-Wert mit HCl einstellen und auf 100 ml auffüllen, anschließend autoklavieren
  - bei -20°C als Aliquot gelagert
- Herstellen von 0,5M EDTA (pH8):
  - 18,61g EDTA (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 80 ml dest. Wasser
  - den pH-Wert mit NaOH einstellen, auf 100 ml auffüllen und anschließend mit DEPC behandeln
  - bei -20°C als Aliquot gelagert
- Formamid (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK), bei -20°C als Aliquot gelagert
- 50x Denhardts-Lösung (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK), bei -20°C gelagert
- DEPC-Wasser

#### 6.3.5 Ansetzen der Hybridisierungslösung

- Herstellen von 1M DTT:
  - 3,09 g DTT (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 20 ml 0,01M Natriumacetat (pH 5,2, mit DEPC-Wasser angesetzt) (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - bei -20°C als Aliquot gelagert
- tRNA (3,9 mg/ml) (Boehringer Ingelheim Ltd., Bracknell, UK) bei -20°C gelagert
- *antisense*-Sonde, Herstellung siehe 2.5.3.2

- Hybridisierungspuffer, Herstellung siehe 2.5.3.2
- DEPC-Wasser

### 6.3.6 Hybridisierung

- Herstellen von 0,2M Phosphatpuffer (PB):
  - 11,36 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 45,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 2 l dest. Wasser
  - über Nacht mit DEPC behandeln
  - bei Raumtemperatur gelagert
  - zur Herstellung von 0,1M PB 1:1 mit DEPC-Wasser verdünnt
- Herstellen von 4%igem Paraformaldehyd:
  - 24 g Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 300 ml DEPC-Wasser
  - 24 Tropfen 10N NaOH (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - unter Rühren auf 60°C erhitzen, erst dann das NaOH zugeben bis die Lösung klar ist
  - nach dem Abkühlen 1:2 mit 0,2M PB verdünnen und auf Eis stellen
- Herstellen der aufsteigenden Alkoholreihe: (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
 

50% EtOH:	250 ml abs. Alkohol	+	250 ml DEPC-Wasser
70% EtOH:	350		150
95% EtOH:	476		24
100% EtOH:	500		
- Hybridisierungslösung siehe 7.3.5
- DPX (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK)

### 6.3.7 Posthybridisierung

- Herstellen von 20xSSC (NaCl/Natriumcitrat-Puffer):
  - 175,3 g NaCl (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 88,2 g Trisodiumcitrat (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  - 1 l dest. Wasser
  - über Nacht mit DEPC behandeln
  - bei Raumtemperatur gelagert
  - für die Herstellung von 4xSSC 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt

- Ansetzen der SSC-Verdünnungen:

2xSSC	= 500	ml	4xSSC	+	500	ml	dest. Wasser	+	1	ml	DTT
1xSSC	= 125				375				0,5		
0,5xSSC	= 62,5				437,5				0,5		
0,1xSSC	= 25				975				1		

- 5M NaCl , siehe 7.3.4
- 1M Tris (pH 8), siehe 7.3.4
- 0,5M EDTA, siehe 7.3.4
- dest. Wasser
- RNase, 10 mg/ml, 1:100 verdünnt (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK) bei -20°C als Aliquot gelagert

### 6.3.8 Filmentwicklung

- Entwickler: Kodak GBX developer (Kodak Limited, Hemel Hempstead, UK)
- Fixierer: Kodak GBX fixer (Kodak Limited, Hemel Hempstead, UK)



---

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, A., Kobashi, M., Miyoshi, N. & G. Tsukamoto (1991).** Chemosensitive neurons in the area postrema of the rat and their possible functions. *Brain Res Bull* 26: 137-140.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. & J.S. Flier (1996).** Role of leptin and the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D. & J.S. Flier (1998).** Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. *J Clin Invest* 101: 1020-1027.
- Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Osei, S. & J.S. Flier (1999a).** Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140: 2755-2762.
- Ahima, R.S., Kelly, J., Elmquist, J.K. & J.S. Flier (1999b).** Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140: 4923-4931.
- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S. & J.K. Elmquist (2000).** Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21: 263-307.
- Ahima, R.S. & J.S. Flier (2000).** Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437.
- Ahima, R.S. & S.Y. Osei (2001).** Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Mol Med* 7: 205-213.
- Ahrén, B., Mansson, S., Gingerich, R.L. & P.L. Havel (1997).** Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 273: R113-R120.
- Ahrén, B. & A.J.W. Scheurink (1998).** Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. *Eur J Endocrinol* 139: 461-467.
- Aiyar, N., Baker, E., Martin, J., Patel, A., Stadel, J.M., Willette, R.N. & F.C. Barone (1995).** Differential calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin binding sites in nucleus accumbens and lung - potential models for studying CGRP/amylin receptor subtypes. *J Neurochem* 65: 1131-1138.
- Akabayashi, A., Levin, N., Paez, X., Alexander, J.T. & S.F. Leibowitz (1994).** Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light/dark cycle and circulating corticosterone. *Mol Cell Neurosci* 5: 210-218.
- Al-Barazanji, K.A., Buckingham, R.E., Arch, J.R.S., Haynes, A., Mossakowska, D.E., McBay, D.L., Holmes, S.D., McHale, M.T., Wang, X.M. & I.S. Gloger (1997).** Effects of intracerebroventricular infusion of leptin in obese Zucker rats. *Obes Res* 5: 387-394.
- Albrandt, K., Mull, E., Brady, E.M.G., Herich, J., Moore, C.X. & K. Beaumont (1993).** Molecular cloning of two receptors from rat brain with high affinity for salmon calcitonin. *FEBS Lett* 325: 225-230.
- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J. & Z. Merali (1998).** Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci* 16: 149-164.
- Arch, J.R.S., Stock, M.J. & P. Trayhurn (1998).** Leptin resistance in obese humans: does it exist and what does it mean? *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1159-1163.

- Armitage, G., Harris, R.B.S., Hervey, G.R. & G. Tobin (1984).** The relationship between energy expenditure and environmental temperature in congenitally obese and non-obese Zucker rats. *J Physiol* 350: 197-207.
- Arnelo, U., Permert, J., Adrian, T.E., Larsson, J., Westermark, P. & R.D. Reidelberger (1996).** Chronic infusion of islet amyloid polypeptide causes anorexia in rats. *Am J Physiol* 271: R1654-R1659.
- Badman, M.K., Shennan, K.I., Jermany, J.L., Docherty, K. & A. Clark (1996).** Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the pro-hormone convertase PC2. *FEBS Lett* 378: 227-231.
- Bado, A., Lévassieur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. & M.J. Lewin (1998).** The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.
- Balasubramaniam, A., Renugopalakrishnan, V., Stein, M., Fischer, J.E. & W.T. Chance (1991).** Syntheses, structures and anorectic effects of human and rat amylin. *Peptides* 12: 919-924.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Maness, L.M., Huang, W. & J.B. Jaspan (1995).** Permeability of the blood-brain-barrier to amylin. *Life Sci* 57: 1993-2001.
- Banks, W.A. & A.J. Kastin (1998).** Differential permeability of the blood-brain-barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin. *Peptides* 19: 883-889.
- Barr, V.A., Malide, D., Zarnowski, M.J., Taylor, S.I. & S.W. Cushman (1997).** Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 138: 4463-4472.
- Bartels, H. (1980).** Aspekte des Gastransports bei Säugetieren mit hoher Stoffwechselrate. *Verh Dtsch Zool Ges, G. Fischer Verlag, Stuttgart*. 188-201.
- Baskin, D.G., Hahn, T.M. & M.W. Schwartz (1999).** Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm Metab Res* 31: 345-350.
- Baxter, J.D. & P.H. Forsham (1972).** Tissue effects of glucocorticoids. *Am J Med* 53: 573-589.
- Bazin, R., Krief, S., Dupuy, F. & M. Lavau (1986).** Effect of adrenalectomy on the capacity of brown adipose tissue for thermogenesis and the development of obesity in the *fa/fa* Zucker rat. *Reprod Nutr Dev* 26 (2B): 643-648.
- Bazin, R., Planche, E., Dupuy, F., Krief, S. & M. Lavau (1987).** Deprivation of corticosterone does not prevent onset of obesity in Zucker *fa/fa* pups. *Am J Physiol* 252: E461-E466.
- Beaumont, K., Kenney, M.A., Young, A.A. & T.J. Rink (1993).** High affinity amylin binding sites in rat brain. *Mol Pharmacol* 44: 493-497.
- Beaumont, K., Moore, C.X., Pittner, R.A., Prickett, K.S., Gaeta, L.S., Rink, T.J. & A.A. Young (1995).** Differential antagonism of amylin's metabolic and vascular actions with amylin receptor antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1025-1029.
- Beeley, N.R.A. & K.S. Prickett (1996).** The amylin, CGRP, and calcitonin family of peptides. *Exp Opin Ther Patents* 6: 555-567.
- Bergen, H.T., Mizuno, T., Taylor, J. & C.V. Mobbs (1999).** Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus. *Brain Res* 851: 198-203.

- Berneis, K., Vosmeer, S. & U. Keller (1996).** Effects of glucocorticoids and of growth hormone on serum leptin concentrations in man. *Eur J Endocrinol* 135: 663-665.
- Berti, L., Kellerer, M., Capp, E. & H.U. Haring (1997).** Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes - evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40: 606-609.
- Bi, S., Gavrilova, O., Gong, D.W., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M. & M.L. Reitman (1999).** Leptin and reproduction. *J Clin Ligand Assay* 22: 236-238.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Harker, S., Grace, M. & A.S. Levine (1994).** Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266: R1765-R1770.
- Bjorbæk, C., Uotani, S., da Silva, B. & J.S. Flier (1997).** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272: 32686-32695.
- Björntorp, P. (1991).** Adipose tissue distribution and function. *Int J Obes Relat Metab Disord* 15 (Suppl 2): 67-81.
- Björntorp, P. & R. Rosmond (2000).** Obesity and cortisol. *Nutrition* 16: 924-936.
- Block, K.P. & M.G. Buse (1990).** Glucocorticoid regulation of muscle branched-chain amino acid metabolism. *Med Sci Sports Exerc* 22: 316-324.
- Boden, G., Chen, X., Kolaczynski, J.W. & M. Polansky (1997).** Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 100: 1107-1113.
- Bornstein, S.R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M. & W.A. Scherbaum (1997).** Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: Leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46: 1235-1238.
- Bortz, J. (1989).** Statistik für Sozialwissenschaftler, 3. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Brain, S.D., Wimalawansa, S., MacIntyre, I. & T.J. Williams (1990).** The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rat. *Am J Pathol* 136: 487-490.
- Bray, G.A. (1977).** The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 36: 148-153.
- Bray, G.A. & D.A. York (1979).** Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* 59: 719-790.
- Bray, G.A., Stern, J.S. & T.W. Castonguay (1992).** Effect of adrenalectomy and high-fat diet on the fatty Zucker rat. *Am J Physiol* 262: E32-E39.
- Breslow, M.J., Min-Lee, K., Brown, D.R., Chacko, V.P., Palmer, D. & D.E. Berkowitz (1999).** Effect of leptin deficiency on metabolic rate in *ob/ob* mice. *Am J Physiol* 276: E443-E449.
- Broberger, C. & T. Hökfelt (2001).** Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* 74: 669-682.
- Brownlee, K.A. (1965).** Statistical theory and methodology in science and engineering. J. Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.
- Bruce, B.K., King, B.M., Phelps, G.R. & M.C. Veitia (1982).** Effects of adrenalectomy and corticosterone administration on hypothalamic obesity in rats. *Am J Physiol* 243: E152-E157.

- Bryson, J.M., Phuyal, J.L., Swan, V. & I.D. Caterson (1999).** Leptin has acute effects on glucose and lipid metabolism in both lean and gold thioglucose-obese mice. *Am J Physiol* 277: E417-E422.
- Butler, P.C., Chu, J., Carter, W.B., Wang, Y.N., Bu, B.H., Chang, D., Chang, J.K. & R.A. Rizza (1990).** Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes* 39: 752-756.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. & P. Burn (1995).** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 456-459.
- Campfield, L.A., F.J. Smith & P. Burn (1996).** The ob protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res* 28: 619-632.
- Cao, G.Y., Considine, R.V. & R.B. Lynn (1997).** Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat. *AM J Physiol* 36: E448-E452.
- Carpenter, D.O., Briggs, D.B. & N. Strominger (1983).** Responses of neurons of canine area postrema to neurotransmitters and peptides. *Cell Mol Neurobiol* 3: 113-126.
- Casanueva, F.F. & C. Dieguez (1999).** Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 20: 317-363.
- Cases, J.A., Gabriely, I., Ma, X.H., Yang, X.M., Michaeli, T., Fleischer, N., Rossetti, L. & N. Barzilai (2001).** Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. *Diabetes* 50: 348-352.
- Castillo, M.J., Scheen, A.J. & P.J. Lefebvre (1995).** Amylin/islet amyloid polypeptide: biochemistry, physiology, patho-physiology. *Diabet Metab* 21: 3-25.
- Chai, S.Y., Christopoulos, G., Cooper, M.E. & P.M. Sexton (1998).** Characterization of binding sites for amylin, calcitonin, and CGRP in primate kidney. *Am J Physiol* 274: F51-F62.
- Chait, A., Suaudeau, C. & R. de Beaurepaire (1995).** Extensive brain mapping of calcitonin-induced anorexia. *Brain Res Bull* 36: 467-472.
- Chance, W.T., Balasubramaniam, A., Zhang, F.S., Wimalawansa, S.J. & J.E. Fischer (1991).** Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. *Brain Res* 539: 352-354.
- Chance, W.T., Balasubramaniam, A., Chen, X. & J.E. Fischer (1992).** Tests of adipsia and conditioned taste aversion following the intrahypothalamic injection of amylin. *Peptides* 13: 961-964.
- Chehab, F.F., Lim, M.E. & R. Lu (1996).** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12: 318-320.
- 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. & J.P. Morgenstern (1996).** Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* 84: 491-495.
- Chen, Y. & M.L. Heiman (2000).** Chronic leptin administration promotes lipid utilization until fat mass is greatly reduced and preserves lean mass of normal female rats. *Regul Pept* 92: 113-119.

- Cheung, C.C., Clifton, D.K. & R.A. Steiner (1997).** Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138: 4489-4492.
- Christopherson, R.J. & B.A. Young (1986).** Effect of cold environments on domestic animals. In: *Grazing Research at Northern Latitudes*. Gudmundsson, O. (ed.), NATO ASI Series, Plenum Press, New York. 247-257.
- Christopoulos, G., Paxinos, G., Huang, X.F., Beaumont, K., Toga, A.W. & P.M. Sexton (1995).** Comparative distribution of receptors for amylin and the related peptides calcitonin gene related peptide and calcitonin in rat and monkey brain. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1037-1041.
- Chrousos, G.P. (2000).** The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 (Suppl 2): S50-55.
- Chua, S.C.Jr., White, D.W., Wu-Peng, X.S., Liu, S.M., Okada, N., Kershaw, E.E., Chung, W.K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Tartaglia, L.A. & R.L. Leibel (1996).** Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (*Lepr*). *Diabetes* 45: 1141-1143.
- Chung, W.K., Belfi, K., Chua, M., Wiley, J., Mackintosh, R., Nicolson, M., Boozer, C.N. & R.L. Leibel (1998).** Heterozygosity for *Lep<sup>ob</sup>* or *Lep<sup>db</sup>* affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol* 274: R985-R990.
- Clausen, T. (2000).** Effects of amylin and other peptide hormones on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport and contractility in rat skeletal muscle. *J Physiol* 527: 121-130.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. & B. Guy-Grand (1998).** A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401.
- Cohen, B., Novick, D. & M. Rubenstein (1996).** Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274: 1185-1188.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. & G. Schütz (1995).** Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9: 1608-1621.
- Cole, T.J., Myles, K., Purton, J.F., Brereton, P.S., Solomon, N.M., Godfrey, D.I. & J.W. Funder (2001).** GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant. *Mol Cell Endocrinol* 173: 193-202.
- Coleman, D.L. & K.P. Hummel (1969).** Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 217: 1298-1304.
- Coleman, D.L. (1973).** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9: 294-298.
- Coleman, D.L. (1978).** Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-148.
- Coleman, R.A. & T.S. Herrmann (1999).** Nutritional regulation of leptin in humans. *Diabetologia* 42: 639-646.

- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. & J.F. Caro (1996).** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.
- Considine, R.V. & J.F. Caro (1997).** Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1255-1272.
- Considine, R.V., Nyce, M.R., Kolaczynski, J.W., Zhang, P.L., Ohannesian, J.P., Morre, J.H., Fox, J.W. & J.F. Caro (1997).** Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *J Cell Biochem* 65: 254-258.
- Cooper, G.J.S. (1994).** Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* 15: 163-201.
- Cooper, S.J. (1983).** Effects of opiate agonists and antagonists on fluid intake and saccharin choice in the rat. *Neuropharmacology* 22: 323-328.
- Crouse, J.A., Elliott, G.E., Burgess, T.L., Chiu, L., Bennett, L., Moore, J., Nicolson, M. & R.E. Pacifici (1998).** Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J Biol Chem* 273: 18365-18373.
- Cumin, F., Baum, H.P. & N. Levens (1996).** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: 1120-1126.
- Cumin, F., Baum, H.P. & N. Levens (1997).** Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J Endocrinol* 155: 577-585.
- Cummings, D.E. & M.W. Schwartz (2000).** Melanocortins and body weight: a tale of two receptors. *Nat Genet* 26: 8-9.
- Cusin, I., Sainsbury, A., Doyle, P., Rohner-Jeanrenaud, F. & B. Jeanrenaud (1995).** The *ob* gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes* 44: 1467-1470.
- Da Silva, B.A., Bjorbaeck, C., Uotani, S. & J.S. Flier (1998).** Functional properties of leptin receptor isoforms containing the Gln→Pro extracellular domain mutation of the fatty rat. *Endocrinology* 139: 3681-3690.
- Dagogo-Jack, S., Fanelli, C., Paramore, D., Brothers, J. & M. Landt (1996).** Plasma leptin and insulin relationships in obese and nonobese humans. *Diabetes* 45: 695-698.
- Dallman, M.F., Strack, A.M., Akana, S.F., Bradbury, M.J., Hanson, E.S., Scribner, K.A. & M. Smith (1993).** Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* 14: 303-347.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Strack, A.M., Hanson, E.S. & R.J. Sebastian (1995).** The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann N Y Acad Sci* 771: 730-742.
- Dauncey, M.J. (1986).** Activity-induced thermogenesis in lean and genetically obese (*ob/ob*) mice. *Experientia* 42: 547-549.
- De Beaurepaire, R. & W.J. Freed (1987).** Regional localization of the antagonism of amphetamine-induced hyperactivity by intracerebral calcitonin injections. *Pharmacol Biochem Behav* 27: 183-186.

- De Matteis, R., Dashtipour, K., Ognibene, A. & S. Cinti (1998).** Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry. *Proc Nutr Soc* 57: 441-448.
- De Souza, C.J., Commins, S.P., Gagen, K., Chen, W. & T.W. Gettys (2000).** Leptin does not increase energy expenditure in *ob/ob* mice but prevents the compensatory decrease associated with reductions in food intake (Abstract). *Obes Res* 8 (Suppl 1): PF44 .
- De Vos, P., Saladin, R., Auwerx, J. & B. Staels (1995).** Induction of *ob* gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270: 15958-15961.
- Delany, A.M., Dong, Y. & E. Canalis (1994).** Mechanisms of glucocorticoid action in bone cells. *J Cell Biochem* 56: 295-302.
- Delaunay, F., Khan, A., Cintra, A., Davani, B., Ling, Z.C., Andersson, A., Östenson, C.G., Gustafsson, J.A., Efendic, S. & S. Okret (1997).** Pancreatic  $\beta$ -cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest* 100: 2094-2098.
- Dessolin, S., Schalling, M., Champigny, O., Lonnqvist, F., Ailhaud, G., Dani, C. & D. Ricquier (1997).** Leptin gene is expressed in rat brown adipose tissue at birth. *FASEB J* 11: 382-387.
- Dimitriadis, G., Crowne, E., Clark, A. & D.B. Dunger (1998).** Islet amyloid polypeptide decreases the effects of insulinlike growth factor-1 on glucose transport and glycogen synthesis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 1039-1046.
- Döring, H. (2000).** Wirkung von rekombinantem Leptin auf den Energiehaushalt von Mäusen in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Döring, H., Schwarzer, K., Nuesslein-Hildesheim, B. & I. Schmidt (1998).** Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 82-88.
- Drazen, D.L., Kriegsfeld, L.J., Schneider, J.E. & R.J. Nelson (2000).** Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod. *Am J Physiol* 278: R1401-R1407.
- Dryden, S., King, P., Pickavance, L., Doyle, P. & G. Williams (1999).** Divergent effects of intracerebroventricular and peripheral leptin administration on feeding and hypothalamic neuropeptide Y in lean and obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Clin Sci London* 96: 307-312.
- Dubuc, P.U. (1992).** Interactions between insulin and glucocorticoids in the maintenance of genetic obesity. *Am J Physiol* 263: E550-E555.
- Eckert, R. (1993).** Tierphysiologie, 2. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, New York. Kapitel 16: 651-652.
- Edwards, G.L. & R.C. Ritter (1981).** Ablation of the area postrema causes exaggerated consumption of preferred foods in the rat. *Brain Res* 216: 265-276.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H. & G.A. Bray (1991).** Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260: R328-R334.
- Eiden, S., Preibisch, G. & I. Schmidt (2001).** Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J Physiol* 530: 131-139.
- Elimam, A., Knutsson, U., Bronnegard, M., Stierna, P., Albertsson-Wikland, K. & C. Marcus (1998).** Variations in glucocorticoid levels within the physiological range affect plasma leptin levels. *Eur J Endocrinol* 139: 615-620.

- Elmqvist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S. & C.B. Saper (1998).** Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395: 535-547.
- Elmqvist, J.K., Elias, C.F. & C.B. Saper (1999).** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.
- Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A., Morton, N.M. & M. Davenport (1997).** Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46: 313-316.
- The new **Encyclopædia Britannica (1994).** Mikropædia, Ready Reference, Band 1, 15. Auflage. Encyclopædia Britannica Inc., 930.
- Erickson, J.C., Clegg, K.E. & R.D. Palmiter (1996b).** Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381: 415-421.
- Erickson, J.C., Hollopeter, G. & R.D. Palmiter (1996a).** Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274: 1704-1707.
- Evans, B.A., Agar, L. & R.J. Summers (1999).** The role of the sympathetic nervous system in the regulation of leptin synthesis in C57Bl/6 mice. *FEBS Lett* 444: 149-154.
- Fan, W., Boston, B., Kesterson, R., Hruby, V. & R. Cone (1997).** Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168.
- Fan, W., Dinulescu, D.M., Butler, A.A., Zhou, J., Marks, D.L. & R.D. Cone (2000).** The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141: 3072-3079.
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A. & S. O'Rahilly (1999).** Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341: 879-884.
- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheetham, T. & S. O'Rahilly (2000).** Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106: 271-279.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R. & J.M. Friedman (1997).** Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7001-7005.
- Feldman, H.A. & T.A. McMahon (1983).** The  $\frac{3}{4}$  mass exponent for energy metabolism is not a statistical artifact. *Respir Physiol* 52: 149-163.
- Ferrier, G.J., Pierson, A.M., Jones, P.M., Bloom, S.R., Girgis, S.I. & S. Legon (1989).** Expression of the rat amylin (IAPP/DAP) gene. *J Mol Endocrinol* 3: R1-R4.
- Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Perez, M. & P.J. Reeds (1991).** Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol* 260: R1104-R1113.
- Firsov, D., Bellanger, A.C., Marsy, S. & J.M. Elalouf (1995).** Quantitative RT-PCR analysis of calcitonin receptor mRNAs in the rat nephron. *Am J Physiol* 269: F702-F709.
- Flatt, J.P. (1993).** Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance. *Ann N Y Acad Sci* 683: 122-140.
- Fletcher, J.M. (1986).** Effects of adrenalectomy before weaning in the genetically obese Zucker rat (*fa/fa*). *Br J Nutr* 56: 141-151.



- Flier, J.S. (1998).** What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1407-1413.
- Fouchereau-Peron, M., Moukhtar, M.S., Benson, A.A. & G. Milhaud (1981).** Characterization of specific receptors for calcitonin in porcine lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3973-3975.
- Franklin, K.B.J. & G. Paxinos (1997).** *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B.B. & J.S. Flier (1995).** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1: 1311-1314.
- Freed, W.J., Perlow, M.J. & R.J. Wyatt (1979).** Calcitonin: inhibitory effect on eating in rats. *Science* 206: 850-852.
- Freedman, M.R., B.A. Horwitz & J.S. Stern (1986a).** Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am J Physiol* 250: R595-R606.
- Freedman, M.R., Stern, J.S., Reaven, G.M. & C.E. Mondon (1986b).** Effect of adrenalectomy on in vivo glucose metabolism in insulin resistant Zucker obese rats. *Horm Metab Res* 18: 296-298.
- Friedman, J.M. (1997).** The alphabet of weight control. *Nature* 385: 119-120.
- Friedman, J.M. & J.L. Halaas (1998).** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Frühbeck, G., Aguado, M. & J.A. Martinez (1997).** In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes - evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 590-594.
- Frühbeck, G., Aguado, M., Gomezambrosi, J. & J.A. Martinez (1998).** Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and *ob/ob* mice, but not *db/db* mice. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 99-102.
- Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R. & A.I. Smith (1988).** Mineralocorticoid action: Target tissue specificity is enzyme, not receptor mediated. *Science* 242: 583-585.
- Gaggi, R., Beltrandi, E., Dall'Olio, R. & S. Ferri (1985).** Relationships between hypocalcaemic and anorectic effect of calcitonin in the rat. *Pharmacol Res Commun* 17: 209-215.
- Ganong, W.F. (1985).** *Review of Medical Physiology*, 12. Auflage. Lange Medical Publications, Los Altos, CA, USA. Kapitel 20: 293-317.
- Gantz, I., Konda, Y., Tashiro, T., Shimoto, Y., Miwa, H., Munzert, G., Watson, S.J., DelValle, J. & T. Yamada (1993a).** Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 8246-8250.
- Gantz, I., Miwa, H., Konda, Y., Shimoto, Y., Tashiro, T., Watson, S.J., DelValle, J. & T. Yamada (1993b).** Molecular cloning, expression and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 15174-15179.
- Garrow, J.S. (1994).** *Energy balance and obesity in man*, 125. American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
- Gebre-Medhin, S., Mulder, H., Pekny, M., Westermark, G., Tornell, J., Westermark, P., Sundler, F., Ahren, B. & C. Betsholtz (1998).** Increased insulin secretion and glucose tolerance in mice lacking islet amyloid polypeptide (amylin). *Biochem Biophys Res Commun* 250: 271-277.

- Geiser, F., Kortner, G. & I. Schmidt (1998).** Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *Am J Physiol* 275: R1627-R1632.
- Gestreau, C., Le Guen, S. & J.M. Besson (2000).** Is there tonic activity in the endogenous opioid system? A c-Fos study in the rat central nervous system after intravenous injection of naloxone or naloxone-methiodide. *J Comp Neurolo* 427: 285-301.
- Gettys, T.W., Harkness, P.J. & P.M. Watson (1996).** The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137: 4054-4057.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H. & R.C. Skoda (1996).** Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6231-6235.
- Giacobino, J.P. (1996).** Role of the beta(3)-adrenoceptor in the control of leptin expression. *Horm Metab Res* 28: 633-637.
- Giraud, S.Q., Kotz, C.M., Grace, M.K., Levine, A.S. & C.J. Billington (1994).** Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets. *Am J Physiol* 266: R1578-R1583.
- Giraud, S.Q., Grace, M.K., Billington, C.J. & A.S. Levine (1999).** Differential effects of neuropeptide Y and the  $\mu$ -agonist DAMGO on 'palatability' vs. 'energy'. *Brain Res* 834: 160-163.
- Glasow, A., Haidan, A., Hilbers, U., Breidert, M., Gillespie, J., Scherbaum, W.A., Chrousos, G.P. & S.R. Bornstein (1998).** Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4459-4466.
- Gong, D.W., Bi, S., Pratley, R.E. & B.D. Weintraub (1996).** Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271: 3971-3974.
- Goodman, H.M. (1992).** Adrenal Glands. In: *Essential Medical Physiology*. Johnson, L.R. (ed.), Raven Press, New York, NY, USA. Kapitel 43: 577-604.
- Greeley, G.H.Jr., Cooper, C.W., Jeng, Y.J., Eldridge, J.C. & J.C. Thompson (1989).** Intracerebroventricular administration of calcitonin enhances glucose-stimulated release of insulin. *Regul Pept* 24: 259-268.
- Greisen, S., Ledet, T., Moller, N., Jorgensen, J.O.L., Christiansen, J.S., Petersen, K., & P. Ovesen (2000).** Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79: 931-935.
- Grodzinski, W., Klekowiski, R.Z. & A. Duncan (eds.) (1975).** IBP Handbook Nr. 24: Methods for ecological bioenergetics. Backwell, Oxford.
- Guidobono, F. (1998).** Amylin and gastrointestinal activity. *Gen Pharmacol* 31: 173-177.
- Håkansson, M.L. & B. Meister (1998).** Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68: 420-427.
- Håkansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C. & B. Meister (1998).** Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18: 559-572.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. & J.M. Friedman (1995).** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.

- Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A. & J.M. Friedman (1997).** Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8878-8883.
- Halleux, C.M., Servais, I., Reul, B.A., Detry, R. & S.M. Brichard (1998).** Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 902-910.
- Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y.M. & M. Deitel (1995).** Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1: 953-956.
- Hardie, L.J., Guilhot, N. & P. Trayhurn (1996).** Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28: 685-689.
- Harris, R.B.S. (2000).** Leptin - much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 20: 45-75.
- Harris, R.B., Ramsay, T.G., Smith, S.R. & R.C. Bruch (1996).** Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest* 97: 2020-2026.
- Harris, R.B.S., Zhou, J., Weigle, D.S. & J.L. Kuijper (1997).** Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium. *Am J Physiol* 272: R1800-R1808.
- Harris, R.B.S., Zhou, J., Redmann, S.M.Jr., Smagin, G.N., Smith, S.R., Rodgers, E. & J.J. Zachwieja (1998).** A leptin dose-response study in obese (*ob/ob*) and lean (+/?) mice. *Endocrinology* 139: 8-19.
- Hart, J.S. (1971).** Rodents. In: *Comparative Physiology of Thermoregulation, Band II*. Whittow, G.C. (ed.), Academic Press, Inc., New York, London. Kapitel 1X: 127-130.
- Harte, R.A., Kirk, E.A., Rosenfeld, M.E. & R.C. LeBoeuf (1999).** Initiation of hyperinsulinemia and hyperleptinemia is diet dependent in C57Bl/6J mice. *Horm Metab Res* 31: 570-575.
- Hasselgren, P.O. (1999).** Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2: 201-205.
- Hauner, H., Schmid, P. & E.F. Pfeiffer (1987).** Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 832-835.
- Havel, P.J., Kasim-Karakas, S., Mueller, W., Johnson, P.R., Gingerich, R.L. & J.S. Stern (1996).** Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4406-4413.
- Havel, P.J. (1999).** Mechanisms regulating leptin production: implications for control of energy balance. *Am J Clin Nutr* 70: 305-306.
- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Hauger, R.L. & G.F. Koob (1993).** Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 611: 18-24.
- Henning, S.J. (1981).** Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol* 241: G199-G214.
- Hensel, H., Brück, K. & P. Raths (1973).** Homeothermic organisms. In: *Temperature and Life*. Precht, H., Christophersen, J., Hensel, H. & W. Larcher (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Kapitel IV C: 532-536.

- Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J.A., Patane, J., Self, B., Hunt, P. & M. McCanish (1999).** Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *J Am Med Assoc* 282: 1568-1575.
- Higuchi, H., Yang, H.Y. & S.L. Sabol (1988).** Rat neuropeptide Y precursor gene expression. mRNA structure, tissue distribution, and regulation by glucocorticoids, cyclic AMP, and phorbol ester. *J Biol Chem* 263: 6288-6295.
- Hill, R.A., Margetic, S., Pegg, G.G. & C. Gazzola (1998).** Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 765-770.
- Hilton, J.M., Chai, S.Y. & P.M. Sexton (1995).** In vitro autoradiographic localization of the calcitonin receptor isoforms, C1a and C1b, in rat brain. *Neuroscience* 69: 1223-1237.
- Hilton, J.M., Dowton, M., Houssami, S. & P.M. Sexton (2000).** Identification of key components in the irreversibility of salmon calcitonin binding to calcitonin receptors. *J Endocrinol* 166: 213-226.
- Himms-Hagen, J. (1985).** Food restriction increases torpor and improves brown adipose tissue thermogenesis in *ob/ob* mice. *Am J Physiol* 248: E531-E539.
- Himms-Hagen, J., Hogan, S. & G. Zaror-Behrens (1986).** Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (*ob/ob*) mice fed a palatable diet. *Am J Physiol* 250: E274-E281.
- Himms-Hagen, J. (1997).** On raising energy expenditure in *ob/ob* mice. *Science* 276: 1132-1133.
- Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibult, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Gorg, T., Mayer, H., Siegfried, W., Fichter, M., Remschmidt, H. & J. Hebebrand (1999).** Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1483-1486.
- Hoggard, N., Mercer, J.G., Rayner, D.V., Moar, K., Trayhurn, P. & L.M. Williams (1997).** Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 383-387.
- Houssami, S., Findlay, D.M., Brady, C.L., Myers, D.E., Martin, T.J. & P.M. Sexton (1994).** Isoforms of the rat calcitonin receptor: consequences for ligand binding and signal transduction. *Endocrinology* 135: 183-190.
- Houssami, S., Findlay, D.M., Brady, C.L., Martin, T.J., Epand, R.M., Moore, E.E., Murayama, E., Tamura, T., Orłowski, R.C. & P.M. Sexton (1995).** Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation. *Mol Pharmacol* 47: 798-809.
- Huang, Q., Viale, A., Picard, F., Nahon, J.L. & D. Richard (1999).** Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese *Lep<sup>ob</sup>/Lep<sup>ob</sup>* mice. *Neuroendocrinology* 69: 145-153.
- Huang, X.F., Lin, S. & R. Zhang (1997).** Upregulation of leptin receptor mRNA expression in obese mouse brain. *Neuroreport* 8: 1035-1038.
- Hufnagel, C. (2001).** Ontogenetische Veränderung des Plasmaleptinspiegels und seine Regulation bei 10 Tage alten Ratten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Hukshorn, C.J., Saris, W.H.M., Westerterp, M.S., Farid, A.R., Smith, F.J. & L.A. Campfield (2000).** Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4003-4009.

- Hummel, K., Dickie, M.M. & P.L. Coleman (1966).** Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153: 1127-1128.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P. & F. Lee (1997).** Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.
- Hwa, J.J., Ghibaudi, L., Compton, D., Fawzi, A.B. & C.D. Strader (1996).** Intracerebroventricular injection of leptin increases thermogenesis and mobilizes fat metabolism in *ob/ob* mice. *Horm Metab Res* 28: 659-663.
- Hwa, J.J., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Ghibaudi, L., Williams, P., Van Heek, M., Davis, H., Rudinski, M., Sybertz, E. & C.D. Strader (1997).** Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in *ob/ob* mice. *Am J Physiol* 272: R1204-R1209.
- Hyde, T.M. & R.R. Miselis (1983).** Effects of area postrema/caudal medial nucleus of solitary tract lesions on food intake and body weight. *Am J Physiol* 244: R577-R587.
- Ikegame, M., Rakopoulos, M., Zhou, H., Houssami, S., Martin, T.J., Moseley, J.M. & D.M. Findlay (1995).** Calcitonin receptor isoforms in mouse and rat osteoclasts. *J Bone Miner Res* 10: 59-65.
- Ingalls, A.M., Dickie, M.M. & G.D. Snell (1950).** Obese, new mutation in the mouse. *J Hered* 41: 317-318.
- Inoue, K., Hiramatsu, S., Hisatomi, A., Umeda, F. & H. Nawata (1993).** Hypersecretion of amylin from the perfused pancreas of genetically obese (*fa/fa*) rats and its alteration with aging. *Metabolism* 42: 654-658.
- Jequiér, E. & L. Tappy (1999).** Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 79: 451-480.
- Jhanwar-Uniyal, M., Beck, B., Burlet, C. & S.F. Leibowitz (1990).** Diurnal rhythm of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nuclei and other hypothalamic sites. *Brain Res* 536: 331-334.
- Jhanwar-Uniyal, M., Beck, B., Jhanwar, Y.S., Burlet, C. & S.F. Leibowitz (1993).** Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res* 631: 97-106.
- Jonderko, K., Jonderko, G. & T. Golab (1990).** Effect of calcitonin on gastric emptying and on serum insulin and gastrin concentrations after ingestion of a mixed solid-liquid meal in humans. *J Clin Gastroenterol* 12: 22-28.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P. & P.S. Kalra (1991).** Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10931-10935.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L. & P.S. Kalra (1999).** Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100.
- Kamoda, T., Saitoh, H., Nakahara, S., Izumi, I., Hirano, T. & A. Matsui (1998).** Serum leptin and insulin concentrations in prepubertal lean, obese and insulin-dependent diabetes mellitus children. *Clin Endocrinol* 49: 385-389.

- Kask, A., Rago, L., Wikberg, J.E. & H.B. Schioth (1998).** Evidence for the involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight. *Eur J Pharmacol* 360: 15-19.
- Kaul, R., Schmidt, I. & H. Carlisle (1985).** Maturation of thermoregulation in Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 9: 401-409.
- Kellendonk, C., Eiden, S., Kretz, O., Schütz, G., Schmidt, I., Tronche, F. & E. Simon (2002).** Inactivation of the GR in the nervous system affects energy accumulation. *Endocrinology* 143: 2333-2340.
- Kieffer, T.J., Heller, R.S., Leech, C.A., Holz, G.G. & J.F. Habener (1997).** Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 46: 1087-1093.
- Kim, E.M., Welch, C.C., Grace, M.K., Billington, C.J. & A.S. Levine (1998).** Effects of palatability-induced hyperphagia and food restriction on mRNA levels of neuropeptide-Y in the arcuate nucleus. *Brain Res* 806: 117-121.
- Kleiber M. (1947).** Body size and metabolic rate. *Physiol Rev* 27: 511-541.
- Kleiber, M. (1975).** *The fire of life*, 179. R.E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York.
- Klingenspor, M., Dickopp, A., Heldmaier, G. & S. Klaus (1996).** Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS Lett* 399: 290-294.
- Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Considine, R.V., Boden, G., Nolan, J.J., Henry, R., Mudaliar, S.R., Olefsky, J. & J.F. Caro (1996).** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45: 699-701.
- Koopmans, S.J., Frolich, M., Gribnau, E.H., Westendorp, R.G. & R.A. De Fronzo (1998).** Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *Am J Physiol* 274: E998-E1001.
- Körtner, G., Petrova, O., Vogt, S. & I. Schmidt (1994).** Sympathetically and nonsympathetically mediated onset of excess fat deposition in Zucker rats. *Am J Physiol* 267: E947-E953.
- Kotz, C.M., Glass, M.J., Levine, A.S. & C.J. Billington (2000).** Regional effect of naltrexone in the nucleus of the solitary tract in blockade of NPY-induced feeding. *Am J Physiol* 278: R499-R503.
- Kozak, R., Mercer, J.G., Burlet, A., Moar, K.M., Burlet, C. & B. Beck (1998).** Hypothalamic neuropeptide Y content and mRNA expression in weanling rats subjected to dietary manipulations during fetal and neonatal life. *Regul Pept* 75-76: 397-402.
- Kraeft, S., Schwarzer, K., Eiden, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Preibisch, G. & I. Schmidt (1999).** Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (*fa*) in newborn rats. *Am J Physiol* 276: E836-E842.
- Kretz, O., Reichardt, H.M., Schütz, G. & R. Bock (1999).** Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level. *Brain Res* 818: 488-491.
- Kreutter, D., Orena, S.J., Torchia, A.J., Soeller, W. & R.W. Stevenson (1991).** Amylin mRNA and plasma peptide levels in animal models of NIDDM (Abstract). *Diabetes* 40 (Suppl 1): 159A.

- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G. & A. Gruters (1998).** Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19: 155-157.
- Kuestner, R.E., Elrod, R.D., Grant, F.J., Hagen, F.S., Kuijper, J.L., Matthewes, S.L., O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Stroop, S.D. & D.L. Thompson (1994).** Cloning and characterization of an abundant subtype of the human calcitonin receptor. *Mol Pharmacol* 46: 246-255.
- Kühn, E.R., Geris, K.L., van der Geyten, S., Mol, K.A. & V.M. Darras (1998).** Inhibition and activation of the thyroidal axis by the adrenal axis in vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 120: 169-174.
- Kulkarni, R.N., Wang, Z.L., Wang, R.M., Hurley, J.D., Smith, D.M., Ghatgei, M.A., Withers, D.J., Gardiner, J.V., Bailey, C.J. & S.R. Bloom (1997).** Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 100: 2729: 2736.
- Lamp, S.J., Findlay, D.M., Moseley, J.M. & T.J. Martin (1981).** Calcitonin induction of a persistent activated state of adenylate cyclase in human breast cancer cells (T 47D). *J Biol Chem* 256: 12269-12274.
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Holst, J.J., & C. Orskov (1997).** Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 77: 257-270.
- Leal-Cerro, A., Considine, R.V., Peino, R., Venegas, E., Astorga, R., Casanueva, F.F. & C. Dieguez (1998).** Serum immunoreactive-leptin levels are increased in patients with Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* 28: 711-713.
- Leckström, A., Lundquist, I., Ma, Z. & P. Westermark (1999).** Islet amyloid polypeptide and insulin relationship in a longitudinal study of the genetically obese (*ob/ob*) mouse. *Pancreas* 18: 266-273.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. & J.M. Friedman (1996).** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.
- Lee, S.K., Goldring, S.R. & J.A. Lorenzo (1995).** Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* 136: 4572-4581.
- Lenzen, S. & C.J. Bailey (1984).** Thyroid hormones, gonadal and adrenocortical steroids and the function of the islets of Langerhans. *Endocr Rev* 5: 411-434.
- Leroy, P., Dessolin, S., Villageois, P., Moon, B.C., Friedman, J.M., Ailhaud, G. & C. Dani (1996).** Expression of *ob* gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 271: 2365-2368.
- Levin, B.E. (1999).** Arcuate NPY neurons and energy homeostasis in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol* 276: R382-R387.
- Levin, B.E. (2000).** The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obesity Research* 8: 342-347.
- Levin, B.E. & A.A. Dunn-Meynell (1997).** Dysregulation of arcuate nucleus preneuropeptide Y mRNA in diet-induced obese rats. *Am J Physiol* 272: R1365-R1370.

- Levin, B.E. & A.A. Dunn-Meynell (2000).** Sibutramine alters the central mechanisms regulating the defended body weight in diet-induced obese rats. *Am J Physiol* 279: R2222-R2228.
- Levin, B.E. & A.A. Dunn-Meynell (2002).** Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol* 282: R46-R54.
- Levin, B.E. & R.E. Keeseey (1998).** Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol* 274: R412-R419.
- Levin, N., Nelson, C., Gurney, A., Vandlen, R. & F. De Sauvage (1996).** Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1726-1730.
- Levine, A.S. & R.L. Atkinson (1987).** Opioids in the regulation of food intake and energy expenditure. *Fed Proc* 46: 159-162.
- Lin, L., Martin, R., Schaffhauser, A.O. & D.A. York (2001).** Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition. *Am J Physiol* 280: R504-R509.
- Lin, S., Storlien, L.H. & X.F. Huang (2000a).** Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 875: 89-95.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H. & X.F. Huang (2000b).** Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 639-646.
- Liu, J.L., Yakar, S. & D. LeRoth (2000).** Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 344-351.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R. & R.I. Lechler (1998).** Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394: 897-901.
- Lutz, T.A., Del Prete, E. & E. Scharrer (1994).** Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiol Behav* 55: 891-895.
- Lutz, T.A., Geary, N., Szabady, M.M., Del Prete, E. & E. Scharrer (1995a).** Amylin decreases meal size in rats. *Physiol Behav* 58: 1197-1202.
- Lutz, T.A., Del Prete, E. & E. Scharrer (1995b).** Subdiaphragmatic vagotomy does not influence the anorectic effect of amylin. *Peptides* 16: 457-462.
- Lutz, T.A., Rossi, R., Althaus, J., Del Prete, E. & E. Scharrer (1998a).** Amylin reduces food intake more potently than calcitonin gene-related peptide (CGRP) when injected into the lateral brain ventricle in rats. *Peptides* 19: 1533-1540.
- Lutz, T.A., Senn, M., Althaus, J., Del Prete, E., Ehrensperger, F. & E. Scharrer (1998b).** Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. *Peptides* 19: 309-317.
- Lutz, T.A., Tschudy, S. & E. Scharrer (1999).** Anorectic potency of amylin injected into the fourth brain ventricle (Abstract). *Proc Society for the Study of Ingestive Behavior*, Clearwater, FL, USA: 20.
- Lutz, T.A., Tschudy, S., Rushing, P.A. & E. Scharrer (2000).** Amylin receptors mediate the anorectic action of salmon calcitonin (sCT). *Peptides* 21: 233-238.
- Lynch, W.C. & L. Libby (1983).** Naloxone suppresses intake of highly preferred saccharin solutions in food deprived and satiated rats. *Life Sci* 33: 1909-1914.



- MacIntyre, I. (1989).** Amylinamide, bone conservation, and pancreatic  $\beta$ -cells. *Lancet* 2: 1026-1027.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Ranganathan, S., Kern, P.A. & J.M. Friedman (1995).** Leptin in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161.
- Marchington, D., Rothwell, N.J., Stock, M.J. & D.A. York (1983).** Energy balance, diet-induced thermogenesis and brown adipose tissue in lean and obese (*fa/fa*) Zucker rats after adrenalectomy. *J Nutr* 113: 1395-1402.
- Markewicz, B., Kuhmichel, G. & I. Schmidt (1993).** Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis. *Am J Physiol* 265: E478-E486.
- Marsh, D.J., Hollopeter, G., Kafer, K.E. & R.D. Palmiter (1998).** Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med* 4: 718-721.
- Marsh, D.J., Hollopeter, G., Huszar, D., Laufer, R., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P. & R.D. Palmiter (1999).** Response of melanocortin-4-receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21: 119-122.
- Mason, M.M., He, Y., Chen, H., Quon, M.J. & M. Reitman (1998).** Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139: 1013-1022.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T. & K. Nakao (1995).** Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44: 855-858.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hosoda, K., Miyawaki, T., Hanaoka, I., Hiraoka, J., Yasuno, A., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Nishi, S. & K. Nakao (1997a).** Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans: elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2542-2547
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T. & K. Nakao (1997b).** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3: 1029-1033.
- McBride, G.E., Christopherson, R.J. & W. Sauer (1983).** Metabolic rate and thyroid hormone concentrations of mature horses in response to changes in ambient temperature. *Can J Animal Sci* 65: 375-382.
- McCarthy, T.L., Centrella, M. & E. Canalis (1990).** Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor I in skeletal cells. *Endocrinology* 126: 1569-1575.
- McMinn, J.E., Wilkinson, C.W., Havel, P.J., Woods, S.C. & M.W. Schwartz (2000).** Effect of intracerebroventricular  $\alpha$ -MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol* 279: R695-R703.
- Meierfrankenfeld, B. (1996).** Kontrolle des Energiestoffwechsels im Säuglingsalter: Vergleich genetisch fettsüchtiger und normaler Ratten. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Mercer, J.G., Lawrence, C.B., Beck, B., Burlet, A., Atkinson, T. & P. Barrett (1995).** Hypothalamic NPY and prepro-NPY mRNA in Djungarian hamsters: effects of food deprivation and photoperiod. *Am J Physiol* 269: R1099-R1106.

- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T. & P. Trayhurn (1996a).** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387: 113-116.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Morgan, P.J. & P. Trayhurn (1996b).** Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 8: 733-735.
- Mercer, J.G., Lawrence, C.B., Moar, K.M., Atkinson, T. & P. Barrett (1997a).** Short-day weight loss and effect of food deprivation on hypothalamic NPY and CRF mRNA in Djungarian hamsters. *Am J Physiol* 273: R768-R776.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Rayner, D.V., Trayhurn, P. & N. Hoggard (1997b).** Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (*ob/ob*) and cold-exposed lean mice. *FEBS Letters* 402: 185-188.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Findlay, P.A., Hoggard, N. & C.L. Adam (1998).** Association of leptin receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 gene expression in the ovine and murine brainstem. *Regul Pept* 75-76: 271-278.
- Mergen, M., Mergen, H., Ozata, M., Oner, R. & C. Oner (2001).** A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3448.
- Mitchell, M.A. & A.J. Carlisle (1992).** The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 101: 137-142.
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A. & C.V. Mobbs (1998).** Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting in *ob/ob* and *db/db* mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47: 294-297.
- Moinat, M., Deng, C., Muzzin, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Dulloo, A.G. & J.P. Giacobino (1995).** Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett* 373: 131-134.
- Moisan, M.P., Seckl, J.R. & C.R. Edwards (1990).** 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology* 127: 1450-1455.
- Mollet, A., Lutz, T.A., Meier, S., Riediger, T., Rushing, P.A. & E. Scharrer (2001).** Histamine H<sub>1</sub> receptors mediate the anorectic action of the pancreatic hormone amylin. *Am J Physiol* 281: R1442-R1448.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B. & S. O'Rahilly (1997).** Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-908.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M. & E. Ur (1999).** Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140: 5995-5998.
- Morley, J.E., Levine, A.S. & S.E. Silvis (1981).** Intraventricular calcitonin inhibits gastric acid secretion. *Science* 214: 671-673.
- Morley, J.E., Levine, A.S., Brown, D.M. & B.S. Handwerger (1982).** The effect of calcitonin on food intake in diabetic mice. *Peptides* 3: 17-20.

- Morley, J.E., Levine, A.S., Gosnell, B.A., Kneip, J. & M. Grace (1987).** Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* 252: R599-R609.
- Morley, J.E., Flood, J.F., Horowitz, M., Morley, P.M. & M.J. Walter (1994).** Modulation of food intake by peripherally administered amylin. *Am J Physiol* 267: R178-R184.
- Morley, J.E., Suarez, M.D., Mattamal, M. & J.F. Flood (1997).** Amylin and food intake in mice: effects on motivation to eat and mechanism of action. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 123-129.
- Morris, M.J. & T. Nguyen (2001).** Does neuropeptide Y contribute to the anorectic action of amylin? *Peptides* 22: 541-546.
- Morton, N.M., Emilsson, V., Liu, Y.L. & M.A. Cawthorne (1998).** Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273: 26194-26201.
- Mount, L.E. (1973).** The concept of thermal neutrality. In: *Heat Loss from Animals and Man – Assessment and Control*. Monteigh, J.L. & L.E. Mount (eds.). Butterworths, London. 425-435.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B. & R.D. Cone (1994).** Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8: 1298-1308.
- Muff, R., Born, W. & J.A. Fischer (1995).** Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin - homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Eur J Endocrinol* 133: 17-20.
- Mulder, H., Mårtensson, H., Sundler, F. & B. Ahrén (2000).** Differential changes in islet amyloid polypeptide (amylin) and insulin mRNA expression after high-fat diet-induced insulin resistance in C57Bl/6J mice. *Metabolism* 49: 1518-1522.
- Müller, G., Ertl, J., Gerk, M. & G. Preibisch (1997).** Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272: 10585-10593.
- Murakami, T., Iida, M. & K. Shima (1995).** Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1260-1267.
- Nakazato, M., Asai, J., Kangawa, K., Matsukura, S. & H. Matsuo (1989).** Establishment of radioimmunoassay for human islet amyloid polypeptide and its tissue content and plasma concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 394-399.
- Newcomer, J.W., Selke, G., Melson, A.K., Gross, J., Vogler, G.P. & S. Dagogo-Jack (1998).** Dose-dependent cortisol-induced increases in plasma leptin concentration in healthy humans. *Arch Gen Psychol* 55: 995-1000.
- Nicholl, C.G., Bhatavdekar, J.M., Mak, J., Girgis, S.I. & S. Legon (1992).** Extra-pancreatic expression of the rat islet amyloid polypeptide (amylin) gene. *J Mol Endocrinol* 9: 157-163.
- Nicholson, G.C., D'Santos, C.S., Evans, T., Moseley, J.M., Kemp, B.E., Michelangeli, V.P. & T.J. Martin (1988).** Human placental calcitonin receptors. *Biochem J* 250: 877-882.
- Norgren, R. (1978).** Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3: 207-218.
- Nowak, K.W., Mackowiak, P., Nogowski, L., Szkudelski, T. & L.K. Malendowicz (1998).** Acute leptin action on insulin blood level and liver insulin receptor in the rat. *Life Sci* 63: 1347-1352.

- Ohsawa, H., Kanatsuka, A., Yamaguchi, T., Makino, H. & S. Yoshida (1989).** Islet amyloid polypeptide inhibits glucose-stimulated insulin secretion from isolated rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 961-967.
- Okazaki, R., Riggs, B.L. & C.A. Conover (1994).** Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein expression in normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 134: 126-132.
- Olbort, M. (1998).** Auswirkungen von einer und zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes *fa* (*fatty*) auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Ratten im Säuglingsalter. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Oliver, P., Pico, C. & A. Palou (2001).** Ontogenesis of leptin expression in different adipose tissue depots in the rat. *Eur J Physiol* 442: 383-390.
- Orth, D.N., Kovacs, W.J. & C.R. DeBold (1992).** The adrenal cortex. In: Williams Textbook of Endocrinology, 8. Auflage. Wilson, J.D. & D.W. Foster (eds.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA. Kapitel 9: 489-619.
- Ozata, M., Ozdemir, I.C. & J. Licinio (1999).** Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated effects. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3686-3695.
- Peeke, P.M. & G.P. Chrousos (1995).** Hypercortisolism and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 771: 665-676.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. & F. Collins (1995).** Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 269: 540-543.
- Pelleymounter, M.A. (1997).** Leptin and the physiology of obesity. *Curr Pharmaceutical Design* 3: 85-98.
- Perlow, M.J., Freed, W.J., Carman, J.S. & R.J. Wyatt (1980).** Calcitonin reduces feeding in man, monkey, and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 609-612.
- Picard, F., Richard, D., Huang, Q. & Y. Deshaies (1998).** Effects of leptin on adipose tissue lipoprotein lipase in the obese *ob/ob* mouse. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1088-1095.
- Pieber, T.R., Roitelman, J., Lee, Y., Luskey, K.L. & D.T. Stein (1994).** Direct plasma radioimmunoassay for rat-amylin-(1-37): concentrations with acquired and genetic obesity. *Am J Physiol* 267: E156-E164.
- Pighetti, G.M., Hitt, D.C. & J.M. Gimble (1999).** Leptin: its role in hematopoiesis and bone formation. *J Clin Ligand Assay* 22: 239-241.
- Pittner, R.A., Albrandt, K., Beaumont, K., Gaeta, L.S., Koda, J.E., Moore, C.X., Rittenhouse, J. & T.J. Rink (1994).** Molecular physiology of amylin. *J Cell Biochem* 55 (Suppl): 19-28.
- Plata-Salaman, C.R. & Y. Oomura (1987).** Calcitonin as a feeding suppressant: localization of central action to the cerebral III ventricle. *Physiol Behav* 40: 501-513.
- Poitout, V., Rouault, C., Guerremillo, M. & G. Reach (1998).** Does leptin regulate insulin secretion. *Diabetes Metab* 24: 321-326.

- Pralong, F.P., Roduit, R., Waeber, G., Castillo, E., Mosimann, F., Thorens, B. & R.C. Gaillard (1998).** Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139: 4264-4268.
- Proietto, J., Fam, B.C., Ainslie, D.A. & A.W. Thorburn (2000).** Novel anti-obesity drugs. *Exp Opin Invest Drugs* 9: 1317-1326.
- Qiu, J., Ogus, S., Mounzih, K., Ewart-Toland, A. & F.F. Chehab (2001).** Leptin-deficient mice backcrossed to the BALB/cJ genetic background have reduced adiposity, enhanced fertility, normal body temperature, and severe diabetes. *Endocrinology* 142: 3421-3425.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, J., Kanarek, R. & E. Maratos-Flier (1996).** A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Rafael, J. & A.W. Herling (2000).** Leptin effect in *ob/ob* mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation. *Am J Physiol* 278: R790-R795.
- Rankinen, T., Pérusse, L., Weisnagel, S.J., Snyder, E.E., Chagnon, Y.C. & C. Bouchard (2002).** The human obesity gene map: the 2001 update. *Obesity Research* 10: 196-243.
- Rau, H., Reaves, B.J., O'Rahilly, S. & J.P. Whitehead (1999).** Truncated human leptin ( $\Delta 133$ ) associated with extreme obesity undergoes proteasomal degradation after defective intracellular transport. *Endocrinology* 140: 1718-1723.
- Ravussin, E. (1995).** Metabolic differences and the development of obesity. *Metabolism* 9: 12-14.
- Re, R.N., Kourides, I.A., Ridgway, E.C., Weintraub, B.D. & F. Maloof (1976).** The effect of glucocorticoid administration on human pituitary secretion of thyrotropin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 43: 338-346.
- Rebuffe-Scrive, M., Krotkiewsky, M., Elfverson, J. & P. Björntorp (1988).** Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 67: 1122-1128.
- Reichardt, H.M. & G. Schütz (1996).** Feedback control of glucocorticoid production is established during fetal development. *Mol Med* 2: 735-744.
- Reul, J.M. & E.R. Kloet (1985).** Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.
- Riediger, T., Rauch, M., Jurat, G. & H.A. Schmid (1999a).** Central nervous targets for pancreatic amylin (Abstract). *Eur J Physiol* 437: R142.
- Riediger, T., Schmid, H.A., Young, A.A. & E. Simon (1999b).** Pharmacological characterisation of amylin-related peptides activating subfornical organ neurons. *Brain Res* 837: 161-168.
- Riediger, T., Lutz, T.A., Schmid, H.A. & E. Scharrer (2000).** The area postrema as a major target for peptides controlling food intake (Abstract). *Soc Neurosci Abstr* 26: 369.10.
- Riediger, T., Schmid, H.A., Lutz, T.A., Simon, E. & E. Scharrer (2001).** Amylin potently activates area postrema neurons: possible involvement of cGMP-signaling. *Am J Physiol* 281: R1833-R1843.
- Roden, M., Anderwald, C., Furnsinn, C., Waldhausl, W. & A. Lohninger (2000).** Effects of short-term leptin exposure on triglyceride deposition in rat liver. *Hepatology* 32: 1045-1049.

- Roland, B.L., Li, K.X. & J.W. Funder (1995).** Hybridization histochemical localization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat brain. *Endocrinology* 136: 4697-4700.
- Roselli-Reh fuss, L., Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Low, M.J., Tatro, J.B., Entwistle, M.L., Simerly, R.B. & R.D. Cone (1993).** Identification of a receptor for melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8856-8860.
- Rosenbaum, M., Nicolson, M., Hirsch, J., Heymsfield, S.B., Gallagher, D., Chu, F. & R.L. Leibel (1996).** Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3424-3427.
- Rothwell, N.J. & M.J. Stock (1983).** Diet-induced thermogenesis. In: *Mammalian Thermogenesis*. Girardier, L. & M.J. Stock (eds.). Chapman and Hall Ltd., London, New York. Kapitel 7.
- Rousseau, V., Becker, D.J., Ongemba, L.N., Rahier, J., Henquin, J.C. & S.M. Brichard (1997).** Developmental and nutritional changes of ob and PPAR gamma 2 gene expression in rat white adipose tissue. *Biochem J* 321: 451-456.
- Rowland, N.E., Crews, E.C. & R.M. Gentry (1997).** Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. *Regul Pept* 71: 171-174.
- Rowland, N.E. & R.M. Richmond (1999).** Area postrema and the anorectic actions of dexfenfluramine and amylin. *Brain Res* 820: 86-91.
- Rupprecht, R., Arriza, J.L., Sprengler, D., Reul, J.M.H.M., Evans, R.M., Holsboer, F. & K. Damm (1993).** Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 7: 597-603.
- Rushing, P.A., Hagan, M.M., Seeley, R.J., Lutz, T.A. & S.C. Woods (2000a).** Amylin. A novel action in the brain to reduce body weight. *Endocrinology* 141: 850-852.
- Rushing, P.A., Lutz, T.A., Seeley, R.J. & S.C. Woods (2000b).** Amylin and insulin interact to reduce food intake in rats. *Horm Metab Res* 32: 62-65.
- Sachs, L. (1997).** *Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung*, 8. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Saito, M. & G.A. Bray (1984).** Adrenalectomy and food restriction in the genetically obese (*ob/ob*) mouse. *Am J Physiol* 246: R20-R25.
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B. & J. Auwerx (1995).** Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529.
- Sanacora, G., Kershaw, M., Finkelstein, J.A. & J.D. White (1990).** Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127: 730-737.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Numata, Y., Masuzaki, H., Yoshimasa, Y. & K. Nakao (1998).** Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neurosci Lett* 249: 107-110.
- Schioth, H.B., Muceniece, R. & J.E. Wikberg (1997).** Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides* 31: 565-571.

- Schmidt, I. (2001).** The role of juvenile thermoregulatory thermogenesis in the development of normal energy balance or obesity. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain*. Kosaka M, Sugahara, T., Schmidt, K.L. & E. Simon (eds.). Springer-Verlag, Tokyo. 215-225.
- Schmidt, I. (2002).** Metabolic diseases: The environment determines the odds – even for genes. *News Physiol Sci* 17: 115-121.
- Schmidt, I., Döring, H., Stehling, O., Nuesslein-Hildesheim, B., Steinlechner, S. & K. Schwarzer (1997).** Leptin disinhibits rather than stimulates sympathetically mediated energy expenditure. In: *Leptin - The voice of the adipose tissue*. Blum, W.F., Kiess, W. & W. Rascher (eds.), Edition J & J, J.A. Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig. Kapitel V: 133-139.
- Schmidt, I., Schoelch, C., Ziska, T., Schneider, D., Simon, E. & A. Plagemann (2000).** Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiol Genomics* 3: 113-120.
- Schmidt, I., Fritz, A., Schoelch, C., Schneider, D., Simon, E. & A. Plagemann (2001).** The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 1168-1174.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997).** *Animal Physiology. Adaptation and environment*. 5. Auflage. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne. Kapitel 5: 169-214.
- Schölch, C. (2001).** Untersuchungen des Leptin-Systems und des Stoffwechsels juveniler Ratten: Zwei Adipositas-Modelle. Dissertation, Justus Liebig Universität Gießen.
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kujiper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D.Jr., Woods, S.C., Seeley, R.J. & D.S. Weigle (1996a).** Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice. *Diabetes* 45: 531-535.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P. & D.G. Baskin (1996b).** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
- Schwartz, M.W. & J.D. Brunzell (1997).** Regulation of body adiposity and the problem of obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology* 17: 233-238.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P. & D.G. Baskin (1997).** Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-2123.
- Schwarzer, K., Döring, H. & I. Schmidt (1997).** Different physiological traits underlying increased body fat of fatty (*fa/fa*) and heterozygous (*+/fa*) rats. *Am J Physiol* 272: E100-E106.
- Seckl, J.R. (1997).** Glucocorticoids, feto-placental 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids* 62: 89-94.
- Seeley, R.J., van Dijk, G., Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P., Nelligan, J.A., Bell, S.M., Baskin, D.G., Woods, S.C. & M.W. Schwartz (1996).** Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 28: 664-668.
- Seeley, R.J., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P., Thiele, T.E., van Dijk, G., Baskin, D.G. & M.W. Schwartz (1997).** Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 390:349.
- Sellami, S. & R. de Beaupaire (1993).** Medial diencephalic sites involved in calcitonin-induced hyperthermia and analgesia. *Brain Res* 616: 307-310.

- Sexton, P.M., Houssami, S., Hilton, J.M., O'Keeffe, L.M., Center, R.J., Gillespie, M.T., Darcy, P. & D.M. Findlay (1993).** Identification of brain isoforms of the rat calcitonin receptor. *Mol Endocrinol* 7: 815-821.
- Sexton, P.M., Paxinos, G., Kenney, M.A., Wookey, P.J. & K. Beaumont (1994).** In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* 62: 553-567.
- Sexton, P.M., Findlay, D.M. & T.J. Martin (1999).** Calcitonin. *Curr Med Chem* 6: 1067-1093.
- Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M.Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C.B. & R.H. Unger (1997).** Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4637-4641.
- Shor-Posner, G., Ian, C., Brennan, G., Cohn, T., Moy, H., Ning, A. & S.F. Leibowitz (1991).** Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: characterization of three subpopulations. *Physiol Behav* 50: 1187-1195.
- Siegristkaiser, C.A., Pauli, V., Jugeaubry, C.E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W.W., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A.G., Zapf, J. & C.A. Meier (1997).** Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest* 100: 2858-2864.
- Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Carcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. & J.R. Flores-Riveros (1998).** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281: 1683-1686.
- Silbernagl, S. & A. Despopoulos (1991).** Taschenatlas der Physiologie, 4. Auflage. G. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Silvestre, R.A., Rodriguez-Gallardo, J., Gutiérrez, E. & J. Marco (1997).** Influence of glucose concentration on the inhibitory effect of amylin on insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Regul Pept* 68: 31-38.
- Simmons, D.M., Arriza, J.L. & L.W. Swanson (1989).** A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Histotechnol* 12: 169-181.
- Sina, M., Hinney, A., Ziegler, A., Neupert, T., Mayer, H., Siegfried, W., Blum, W.F., Remschmidt H. & J. Hebebrand (1999).** Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet* 65: 1501-1507.
- Sinha, M.K. & J.F. Caro (1998).** Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm* 54: 1-30.
- Sivitz, W.I., Walsh, S., Morgan, D., Donohoue, P., Haynes, W. & R.L. Leibel (1998).** Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 47: 584-591.
- Sliker, L.J., Sloop, K.W., Surface, P.L., Kriauciunas, A., La Quier, F., Manetta, J., Bue-Valleskey, J. & T.W. Stephens (1996).** Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271: 5301-5304.
- Smith, B.K., West, D.S. & D.A. York (1997).** Carbohydrate versus fat intake: differing patterns of macronutrient selection in two inbred mouse strains. *Am J Physiol* 272: R357-R362.
- Smith, B.K., Andrews, P.K. & D.B. West (2000).** Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains. *Am J Physiol* 278: R797-R805.



- Smith, C.K. & D.R. Romsos (1985).** Effects of adrenalectomy on energy balance of obese mice are diet dependent. *Am J Physiol* 249: R13-R22.
- Smith, D.M. & S.R. Bloom (1995).** Paracrine/autocrine control of the islet and the amylin family. *Biochem Soc Trans* 23: 336-340.
- Solano, J.M. & L. Jacobson (1999).** Glucocorticoids reverse leptin effects on food intake and body fat in mice without increasing NPY mRNA. *Am J Physiol* 277: E708-E716.
- Spangler, E. & D.E. Johnson (1981).** Influence of feeding pattern on energy balance and activity in rats. *J Nutrition* 111: 1297-1304.
- Stanley, B.G. & S.F. Leibowitz (1985).** Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3940-3943.
- Stanley, B.G., Daniel, D.R., Chin, A.S. & S.F. Leibowitz (1985).** Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 6: 1205-1211.
- Stanley, B.G., Anderson, K.C., Grayson, M.H. & S.F. Leibowitz (1989).** Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol Behav* 46: 173-177.
- Stehling, O., Döring, H., Ertl, J., Preibisch, G. & I. Schmidt (1996).** Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *Am J Physiol* 271: R1770-R1774.
- Stehling, O., Döring, H., Nuesslein-Hildesheim, B., Olbort, M. & I. Schmidt (1997).** Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Eur J Physiol* 434: 694-697.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Buevalleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A., MacKellar, W., Rosteck, P.R., Schonder, B., Smith, D., Tinsley, F.C., Zhang, X.Y. & M. Heiman (1995).** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-532.
- Steppan, C.M. & A.G. Swick (1999).** A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 600-602.
- Stern, J.S. & P.R. Johnson (1977).** Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (*fafa*). *Metabolism* 26: 371-80.
- Strack, A.M., Sebastian, R.J., Schwartz, M.W. & M.F. Dallman (1995).** Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268: R142-R149.
- Stricker-Krongrad, A., Cumin, F., Burlet, C. & B. Beck (1998).** Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat. *Neurosci Lett* 254: 157-160.
- Stridsberg, M., Sandler, S. & E. Wilander (1993).** Cosecretion of islet amyloid polypeptide (IAPP) and insulin from isolated rat pancreatic islets following stimulation or inhibition of  $\beta$ -cell function. *Regul Pept* 45: 363-370.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. & A.D. Strosberg (1998).** A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18: 213-215.
- Stroop, S.D. & E.E. Moore (1994).** Calcitonin persistently activates a receptor-operated calcium channel. *J Bone Miner Res* 9 (Suppl 1): S283.

- Surwit, R.S., Petro, A.E., Parekh, P. & S. Collins (1997).** Low plasma leptin in response to dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice. *Diabetes* 46: 1516-1520.
- Surwit, R.S., Edwards, C.L., Murthy, S. & A.E. Petro (2000).** Transient effects of long-term leptin supplementation in the prevention of diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 49: 1203-1208.
- Takahashi, Y., Okimura, Y., Mizunol, I., Takahashi, T., Kaji, H., Uchiyama, T., Abe, H. & K. Chihara (1996).** Leptin induces tyrosine phosphorylation of cellular proteins including STAT-1 in human renal adenocarcinoma cells, ACHN. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 859-864.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Wenig, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A. & R.I. Tepper (1995).** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
- Tataranni, P.A., Larson, D.E., Snitker, S., Young, J.B., Flatt, J.P. & E. Ravussin (1996).** Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am J Physiol* 271: E317-E325.
- Tempel, D.L. & S.F. Leibowitz (1990).** Diurnal variations in the feeding responses to norepinephrine, neuropeptide Y and galanin in the PVN. *Brain Res Bull* 25: 821-825.
- Tempel, D.L. & S.F. Leibowitz (1994).** Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 6: 479-501.
- Thiele, T., van Dijk, G., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Schwartz, M., Burn, P. & R.J. Seeley (1998).** Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion. *Am J Physiol* 274: R248-R254.
- Thornton, J.E., Cheung, C.C., Clifton, D.K. & R.A. Steiner (1997).** Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinology* 138: 5063-5066.
- Tobe, K., Ogura, T., Tsukamoto, C., Imai, A., Matsuura, K., Iwasaki, Y., Shimomura, H., Higashi, T. & T. Tsuji (1999).** Relationship between serum leptin and fatty liver in Japanese male adolescent university students. *Am J Gastroenterol* 94: 3328-3335.
- Tokuyama, K. & J. Himms-Hagen (1986).** Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate- treated mice. *Am J Physiol* 251: E407-E415.
- Tokuyama, K. & J. Himms-Hagen (1989).** Enhanced acute response to corticosterone in genetically obese (*ob/ob*) mice. *Am J Physiol* 257: E133-E138.
- Tokuyama, Y., Kanatsuka, A., Ohsawa, H., Yamaguchi, T., Makino, H., Yoshida, S., Nagase, H. & S. Inoue (1991).** Hypersecretion of islet amyloid polypeptide from pancreatic islets of ventromedial hypothalamic-lesioned rats and obese Zucker rats. *Endocrinology* 128: 2739-2744.
- Tokuyama, Y., Kanatsuka, A., Yamaguchi, T., Ohsawa, H., Makino, H., Nishimura, M. & S. Yoshida (1993).** Islet amyloid polypeptide/amylin contents in pancreata increase in genetically obese and diabetic mice. *Horm Metab Res* 25: 289-291.
- Tomlinson, A.E. & D.R. Poyner (1996).** Multiple receptors for calcitonin gene-related peptide and amylin on guinea-pig ileum and vas deferens. *Br J Pharmacol* 117: 1362-1368.

- Toshimori, H., Narita, R., Nakazato, M., Asai, J., Mitsukawa, T., Kangawa, K., Matsuo, H. & S. Matsukura (1990).** Islet amyloid polypeptide (IAPP) in the gastrointestinal tract and pancreas of man and rat. *Cell Tissue Res* 262: 401-406.
- Trayhurn, P., Thomas, M.E., Duncan, J.S. & D.V. Rayner (1995).** Effects of fasting and refeeding on *ob* gene expression in white adipose tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. *FEBS Lett* 368: 488-490.
- Trayhurn, P., Duncan, J.S., Hoggard, N. & D.V. Rayner (1998).** Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc* 57: 413-419.
- Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J.G. & D.V. Rayner (1999).** Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord (Suppl 1)*: 22-28.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M. & G. Schütz (1998).** Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr Opin Genet Dev* 8: 532-538.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R. & G. Schütz (1999).** Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23: 99-103.
- Twery, M.J., Obie, J.F. & C.W. Cooper (1982).** Ability of calcitonins to alter food and water consumption in the rat. *Peptides* 3: 749-755.
- Ueno, T., Sugawara, H., Sujaku, K., Hashimoto, O., Tsuji, R., Tamaki, S., Torimura, T., Inuzuka, S., Sata, M. & K. Tanikawa (1997).** Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol* 27: 103-107.
- Uotani, S., Bjørnbæk, C., Tornøe, J. & J.S. Flier (1999).** Functional properties of leptin receptor isoforms. Internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* 48: 279-286.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E. Jr., Stoffel, M. & J.M. Friedman (1996).** Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wildtype and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nat Gen* 14: 95-97.
- Vaisse, C., Clément, K., Guy-Grand, B. & P. Froguel (1998).** A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-114
- Vaisse, C., K. Clément, E. Durand, S. Hereber, B. Guy-Grand & P. Froguel (2000).** Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *Journal of Clinical Investigation* 106: 253-262.
- Van Heek, M., Compton, D.S., France, C.F., Tedesco, R.P., Fawzi, A.B., Sybertz, E.J., Strader, C.D. & H.R.Jr. David (1997).** Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99: 385-390.
- Wabitsch, M., Jensen, P.B., Blum, W.F., Christoffersen, C.T., Englaro, P., Heinze, E., Rascher, W., Teller, W., Tornqvist, H. & H. Hauner (1996).** Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45: 1435-1438.
- Wagner, R., Oberste-Berghaus, C., Herpertz, S., Blum, W.F., Pelz, B., Hebebrand, J., Senf, W., Mann, K. & N. Albers (2000).** Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 54: 174-180.
- Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N. & L. Rossetti (1998a).** A nutrient-sensing pathway regulates leptin expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688.

- Wang, J., Akabayashi, A., Dourmashkin, J., Yu, H.J., Alexander, J.T., Chae, H.J. & S.F. Leibowitz (1998b).** Neuropeptide Y in relation to carbohydrate intake, corticosterone and dietary obesity. *Brain Res* 802: 75-88.
- Wang, J., Dourmashkin, J.T., Yun, R. & S.F. Leibowitz (1999a).** Rapid changes in hypothalamic neuropeptide Y produced by carbohydrate-rich meals that enhance corticosterone and glucose levels. *Brain Res* 848: 124-136.
- Wang, J., Liu, R., Liu, L., Chowdhury, R., Barzilai, N., Tan, J. & L. Rossetti (1999b).** The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nat Med* 5: 895-899.
- Wang, M.Y., Zhou, Y.T., Newgard, C.B. & R.H. Unger (1998).** A novel leptin receptor isoform in the rat. *FEBS Lett* 392: 87-90.
- Wang, T., Hartzell, D.L., Flatt, W.P., Martin, R.J. & C.A. Baile (1998).** Responses of lean and obese Zucker rats to centrally administered leptin. *Physiol Behav* 65: 333-341.
- Wang, T., Hartzell, D.L., Rose, B.S., Flatt, W.P., Hulsey, M.G., Menon, N.K., Makula, R.A. & C.A. Baile (1999).** Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding. *Physiol Behav* 65 (4/5): 839-848.
- Watson, P.M., Commins, S.P., Beiler, R.J., Hatcher, H.C. & T.W. Gettys (2000).** Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57Bl/6J mice during diet-induced obesity. *Am J Physiol* 279: E356-E365.
- Wauters, M., Considine, R.V. & L.F. van Gaal (2000).** Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 143: 293-311.
- Webb, G.P., Jagot, S.A. & M.E. Jakobson (1982).** Fasting-induced torpor in *mus musculus* and its implications in the use of murine models for human obesity studies. *Comp Biochem Physiol* 72: 211-219.
- Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holdermann, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C. & J.L. Kuijper (1995).** Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest* 96: 2065-2070.
- Welch, C.C., Grace, M.K., Billington, C.J. & A.S. Levine (1993).** NPY induces fat selection in fat-preferring rats (Abstract). *FASEB J* 7: A88.
- Welch, C.C., Grace, M.K., Billington, C.J. & A.S. Levine (1994).** Preference and diet type affect macronutrient selection after morphine, NPY, norepinephrine, and deprivation. *Am J Physiol* 266: R426-R433.
- West, D.B., Boozer, C.N., Moody, D.L. & R.L. Atkinson (1992).** Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 262: R1025-R1032.
- Westermarck, P., Wernstedt, C., Wilander, E. & K. Sletten (1986).** A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 140: 827-831.
- White, B.D., He, B., Dean, R.G. & R.J. Martin (1994).** Low protein diets increase neuropeptide Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J Nutr* 124: 1152-1160.
- White, D.W., Wang, D.W., Chua, S.C. Jr., Morgenstern, J.P., Leibel, R.L., Baumann, H. & L.A. Tartaglia (1997).** Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln→Pro extracellular domain fatty mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10657-10662.

- Widdowson, P.S., Upton, R., Buckingham, R., Arch, J. & G. Williams (1997).** Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity. *Diabetes* 46: 1782-1785.
- Widjaja, A., Schurmeyer, T.H., Von zur Muehlen, A. & G. Brabant (1998).** Determinants of serum leptin levels in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 600-603.
- Wieser, W. (1984).** A distinction must be made between the ontogeny and the phylogeny of metabolism in order to understand the mass exponent of energy metabolism. *Respir Physiol* 55: 1-9.
- Wiesner, G., Vaz, M., Collier, G., Seals, D., Kaye, D., Jennings, G., Lambert, G., Wilkinson, D. & M. Esler (1999).** Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2270-2274.
- Wilding, J.P., Gilbey, S.G., Mannan, M., Aslam, N., Ghatei, M.A. & S.R. Bloom (1992).** Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats. *J Endocrinol* 132: 299-304.
- Wilding, J.P., Gilbey, S.G., Bailey, C.J., Batt, R.A., Williams, G., Ghatei, M.A. & S.R. Bloom (1993).** Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (*ob/ob*) mouse. *Endocrinology* 132: 1939-1944.
- Williams, G., Harrold, J.A. & D.J. Cutler (2000).** The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc* 59: 385-396.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J. & X. H. Liu (2001).** The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74: 683-701.
- Williams, L.M., Adam, C.L., Mercer, J.G., Moar, K.M., Slater, D., Hunter, L., Findlay, P.A. & N. Hoggard (1999).** Leptin receptor and neuropeptide Y gene expression in the sheep brain. *J Neuroendocrinol* 11: 165-169.
- Wimalawansa, S.J. (1997).** Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* 11: 167-239.
- Withers, P.C. (1977).** Measurement of  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , and evaporative water loss with a flow-through mask. *J Appl Physiol* 42: 120-123.
- Withers, P.C. (1992).** *Comparative Animal Physiology*. Saunders HJB, Florida.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, J.D. & M.W. Schwartz (1998).** Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-1383.
- Woods, S.C. & R.J. Seeley (2000).** Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16: 894-902.
- Wookey, P.J., Cao, Z., Vangeenen, R.C.I., Voskuil, M., Darby, I.A., Komers, R. & M.E. Cooper (1997).** Increased density of renal amylin binding sites in experimental hypertension. *Hypertension* 30: 455-460.
- Yamamoto, Y., Nakamuta, H., Koida, M., Seyler, J.K. & R.C. Orlowski (1982).** Calcitonin-induced anorexia in rats: a structure-activity study by intraventricular injections. *Jpn J Pharmacol* 32: 1013-1017.
- York, D.A. (1996).** Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25: 781-800.

- Young, A.A., Mott, D.M., Stone, K. & G.J. Cooper (1991).** Amylin activates glycogen phosphorylase in the isolated soleus muscle of the rat. *FEBS Lett* 281: 149-151.
- Young, A.A. (1994).** Amylin regulation of fuel metabolism. *J Cell Biochem* 55 (Suppl): 12-18.
- Young, A.A., Gedulin, B., Vine, W., Percy, A. & T.J. Rink (1995a).** Gastric emptying is accelerated in diabetic BB rats and is slowed by subcutaneous injections of amylin. *Diabetologia* 38: 642-648.
- Young, A.A., Wang, M.W., Gedulin, B., Rink, T.J., Pittner, R. & K. Beaumont (1995b).** Diabetogenic effects of salmon calcitonin are attributable to amylin-like activity. *Metabolism* 44: 1581-1589.
- Young, A. (1997).** Role of amylin in nutrient intake - animal studies. *Diabet Med* 14 (Suppl 2): S14-S18.
- Zaidi, M., Datta, H.K., Bevis, P.J.R., Wimalawansa, S.J. & I. MacIntyre (1990).** Amylinamide: a new bone-conserving peptide from the pancreas. *Exp Physiol* 75: 529-536.
- Zakrzewska, K.E., Cusin, I., Stricker-Krongrad, A., Boss, O., Ricquier, D., Jeanrenaud, B. & F. Rohner-Jeanrenaud (1999).** Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48: 365-370.
- Zamorano, P.L., Mahesh, V.B., DeSevilla, L.M., Chorich, L.P., Bhat, G.K. & D.W. Brann (1997).** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65: 223-228.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & J.M. Friedman (1994).** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zhang, Y., Olbort, M., Schwarzer, K., Nusslein-Hildesheim, B., Nicolson, M., Murphy, E., Kowalski, T.J., Schmidt, I. & R.L. Leibel (1997).** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 492-495.
- Zhang, Y., Hufnagel, C., Eiden, S., Guo, K.Y., Diaz, P.A., Leibel, R. & I. Schmidt (2001).** Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics* 4: 189-199.
- Zimmermann, U., Fluehmann, B., Born, W., Fischer, J.A. & R. Muff (1997).** Coexistence of novel amylin-binding sites with calcitonin receptors in human breast carcinoma MCF-7-cells. *J Endocrinol* 155: 423-431.
- Ziotopoulou, M., Mantzoros, C.S., Hileman, S.M. & J.S. Flier (2000).** Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol* 279: E838-E845.
- Zucker, L.M. & T.F. Zucker (1961).** Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered* 52: 275-278.

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich mit Rat und Tat, Geduld und Zuversicht unterstützt haben.

Gedankt sei zunächst meinen Eltern, die die Fertigstellung dieser Arbeit wohl genauso sehr herbeigesehnt haben wie ich selbst. Meine Heimatbesuche gaben mir immer die nötige Motivation weiterzumachen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner "Doktormutter" Frau Professor Dr. Ingrid Schmidt bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und die mich bei deren Fertigstellung durch ihr stetiges Engagement tatkräftig unterstützt hat. In den insgesamt 5 Jahren unserer Zusammenarbeit habe ich die Arbeitsbedingungen in Bad Nauheim und die kollegiale Atmosphäre zu schätzen gelernt und werde mit einem weinenden Auge an diese Lehrjahre zurückdenken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Eckhart Simon, der trotz seiner Emeritierung jederzeit ein offenes Ohr für alle Arten von Fragestellungen hatte und der mit seinem großen Wissensschatz und einer ebenso großen Einsatzbereitschaft entscheidend zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Nicht zuletzt gab er den Anstoß für die Lachs-Calcitonin-Versuche. Ich wusste den Japaner in ihm sehr zu schätzen und werde ihn als Vorbild auf wissenschaftlicher und menschlicher Ebene in Erinnerung behalten.

Ich danke Herrn Professor Dr. Gerhard Heldmaier an der Philipps-Universität Marburg, der sich freundlicherweise als Zweitgutachter für die Beurteilung der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Aventis Pharma, Frankfurt a.M., danke ich für die freundliche Bereitstellung des rekombinanten His<sub>6</sub>-tagged-Leptins. In diesem Zusammenhang soll speziell Herr Dr. Gerald Preibisch erwähnt werden, mit dem es mir eine Freude war, im Rahmen eines gemeinsamen Projektes zusammenzuarbeiten.

Im Rahmen der Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg und der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Günther Schütz möchte ich François Tronche und Christoph Kellendonk hervorheben und ihnen für die Bereitstellung der Mäuse, die gute Zusammenarbeit und ihren Einsatz beim 'Paper-Schreiben' danken.

Im Zusammenhang mit der *in situ*-Hybridisierung möchte ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe von Dr. Julian Mercer am Rowett Research Institute in Aberdeen, Schottland, im Speziellen bei Kim Moar, für ihre freundliche, geduldige und äußerst kompetente Einarbeitung in diese Methodik und die persönliche Betreuung während meiner beiden Aufenthalte dort bedanken.

Herrn Professor Dr. Edgar Weigand und seinen Mitarbeitern gilt mein Dank für die kompetente Durchführung der bombenkalorimetrischen Messungen, auf die ich für die Angabe der metabolisierbaren Energie der verwendeten Diäten zurückgreifen konnte.

Bei Roswitha Bender und Diana Fuchs möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Blutentnahme und bei der Durchführung der RIAs bedanken.

Frank Voss und Helmut Busch aus der Computerabteilung danke ich für die Hilfe bei der Beseitigung von Computer-Problemen aller Art. Obwohl ich die Technik oft verflucht habe, konnten größere Katastrophen immer verhindert werden.

Auch den Mitarbeitern der hauseigenen Werkstatt, im Speziellen Klaus Burk und Wolfgang Schubert, sei gedankt für die prompte und gekonnte Ausführung aller anfallenden Arbeiten und vor allem für ihre Kooperationsbereitschaft und Geduld, wenn etwas mal wieder ganz schnell gehen musste.

Zuletzt möchte ich schließlich der gesamten Arbeitsgruppe sowie allen Aushilfen und Praktikanten für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen und Fragen danken. Für "besondere Verdienste" außerhalb der Arbeitszeiten sind dabei vor allem Alex, Caro, Darius, Nicole, Carmen und Heiko hervorzuheben. Trotz allem hatten wir doch eine schöne Zeit.



## ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

**"Pharmakologische und genetische Eingriffe in das Leptinsystem und in andere an der Regulation des Energiehaushalts beteiligte Hormonsysteme bei Mäusen"**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Bad Nauheim, Juni 2002

Sandra Eiden

---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name: Eiden  
Vorname: Sandra  
Geboren am: 15.10.1973  
Geboren in: Trier  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Kurstr. 28  
61231 Bad Nauheim

### Schulbildung

1980-1984 Grundschule Waldrach  
1984-1993 Hindenburg-Gymnasium Trier  
16.06.1993 Abitur

### Hochschulbildung

#### *Diplomstudiengang Biologie*

Okt 1993 – Aug 1995 Grundstudium, Gutenberg-Universität Mainz  
14.08.1995 Diplom-Vorprüfung  
Okt 1995 – Jun 1999 Hauptstudium, Philipps-Universität Marburg  
Hauptfach: Tierphysiologie  
1. Nebenfach: Wissenschaftl. Naturschutz  
2. Nebenfach: Biochemie  
3. Nebenfach: Pharmakologie  
Mai 1998 – Mai 1999 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Schmidt. Thema: Änderungen in der Leptinwirkung im Laufe der postnatalen Entwicklung von Ratten  
29.06.1999 Diplom-Hauptprüfung  
seit Juli 1999 Promotion am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Schmidt

---

**Publikationen während der Tätigkeit am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Bad Nauheim***Originalartikel*

1. Kraeft, S., Schwarzer, K., Eiden, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Preibisch, G. & I. Schmidt (1999). Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (*fa*) in newborn rats. *Am J Physiol* 276: E836-E842.
2. Hufnagel, C., Eiden, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Zhang, Y., Leibel, R. & I. Schmidt (1999). Mutation in the leptin receptor (*Lep<sup>rfa</sup>*) causes fat-storage-independent hyperleptinemia in neonatal rats. *Eur J Physiol* 438: 570-572.
3. Eiden, S., Preibisch, G. & I. Schmidt (2000). Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J Physiol* 530: 131-139.
4. Zhang, Y., Hufnagel, C., Eiden, S., Guo, K., Diaz, P., Leibel, R. & I. Schmidt (2001). Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics* 4: 189 –199.
5. \*Kellendonk, C., Eiden, S., Kretz, O., Schütz, G., Schmidt, I., Tronche, F. & E. Simon (2002). Inactivation of the GR in the nervous system affects energy accumulation. *Endocrinology* 143: 2333-2340.
6. \*Eiden, S., Daniel, C., Steinbrueck, A., Schmidt, I. & E. Simon (2002). Salmon calcitonin – a potent inhibitor of food intake in states of impaired leptin signalling in laboratory rodents. *J Physiol* 531: 1041-1048.

\* Diese Publikationen enthalten Bestandteile der vorliegenden Dissertation

*Zitierfähige Kongressbeiträge*

1. Eiden, S., Olbort, M., Tripp, A., Nuesslein-Hildesheim, B. & I. Schmidt (1998). Developmental changes of the rat's response to recombinant leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22 (Suppl 3): 35.
2. Eiden, S., Olbort, M., Tripp, A., Nuesslein-Hildesheim, B. & I. Schmidt (1998). Änderungen in der Leptinwirkung im Laufe der postnatalen Entwicklung von Ratten. *Akt Ernähr Med* 23: 248.
3. Eiden, S., Hufnagel, C., Jursch, S., Zhang, Y., Leibel, R. & I. Schmidt (1999). Differences in plasma leptin levels precede differences in body fat of *fa/fa* and *+/+* pups. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 (Suppl 5): 36.
4. Hufnagel C., Eiden, S., Zhang, Y., Leibel, R.L. & I. Schmidt (1999). Das sympathische Nervensystem vermittelt eine von der Fettmasse unabhängige Wirkung der Leptinrezeptor-Mutation *Lep<sup>rfa</sup>* auf den Plasmaleptinspiegel. *Akt Ernähr Med* 24: 191.
5. Schmidt I., Döring, H. & S. Eiden (1999). Leptin does not increase but only disinhibit sympathetically mediated energy expenditure. *Obes Res* 7: 118.

6. Eiden S., Tronche, F., Kellendonk, C., Schuetz, G. & I. Schmidt (2000). Changes of adiposity caused by disruption of the central glucocorticoid receptor gene. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 (Suppl 1): 178.
7. Schmidt, I., Zhang, Y., Hufnagel, C., Eiden, S. & R. Leibel (2000). The role of leptin receptor (Lepr) and sympathetic activity in regulating brown and white adipose tissue leptin expression and plasma leptin concentrations. *Obes Res* 8 (Suppl 1): 93.
8. Schmidt, I., Christ, N., Schoelch, C., Fritz, A., Eiden, S. & A. Plagemann (2000). In search of environmental factors determining the phenotype of heterozygotes for partially dominant obesity traits. *Obes Res* 8 (Suppl 1): 93.

Bad Nauheim, Juni 2002