

**Tierexperimentelle Untersuchungen zur
Behandlung einer Adipositas infolge
Melanokortin-4-Rezeptor-Defizienz mit
unterschiedlichen pharmakologischen
Behandlungsstrategien**

MICHAELA A. SOCHER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Diener

Aus dem Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung
(W.G. Kerckhoff-Institut) in Bad Nauheim
Betreuerin: Prof. Dr. I. Schmidt

**Tierexperimentelle Untersuchungen zur
Behandlung einer Adipositas infolge
Melanokortin-4-Rezeptor-Defizienz mit
unterschiedlichen pharmakologischen
Behandlungsstrategien**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

MICHAELA A. SOCHER

Tierärztin aus Offenbach a. Main

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Herr Prof. Dr. M. Diener

Frau Prof. Dr. I. Schmidt

Tag der Disputatiom: 9.12.2005

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Fachausdrücke.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 „HUNGER“ UND „SÄTTIGUNG“ ALS ELEMENTE DER ENERGIEHOMÖOSTASE.....	3
1.2 KOMPLEXE REGULATION DES KÖRPERGEWICHTS.....	4
1.2.1. Humorale Signale aus der Peripherie in das Gehirn.....	4
1.2.2. Zentrale Signalverarbeitung.....	7
1.3 ADIPOSITAS ALS FEHLERHAFT E REGULATION DES KÖRPERFETTGEHALTES.....	10
1.4 DIE ADIPOSITAS BEEINFLUSSENDE UMWELT-PARAMETER.....	11
1.4.1 Parameter: Umgebungstemperatur.....	11
1.4.2 Parameter: Diät.....	12
1.5 ADIPOSITAS UND GENETISCHE PRÄDISPOSITION.....	12
1.6 SEKUNDÄRE STÖRUNGEN BEI VORLIEGEN EINER ADIPOSITAS.....	13
1.7 ANSÄTZE IN DER ADIPOSITASTHERAPIE.....	14
1.8 ADIPOSITAS UND DIE RELEVANZ EINER MUTATION IM MC4R.....	16
1.8.1 Das Melanokortin-System.....	16
1.8.2 Das MC4R-defiziente Mausmodell.....	17
1.8.3 Pharmakologische Manipulationen des Körpergewichts bei MC4R-defizienten Mäusen.....	19
1.9 ZIELE DER ARBEIT.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 VERSUCHSTIERE.....	22
2.2 HALTUNGSBEDINGUNGEN VOR VERSUCHSBEGINN.....	22
2.3 VERSUCHSREIHEN.....	22
2.4 VERSUCHSREIHE I : BEHANDLUNG MIT MSH-DERIVATEN.....	22
2.4.1 Versuchstiere und Haltun gsbedingungen Versuchsreihe I.....	22
2.4.2 Behandlung Versuchsreihe I.....	23
2.4.3 Versuchsprotokoll für Versuchsreihe I.....	24
2.5 VERSUCHSREIHE II : BEHANDLUNGEN MIT LACHS-CALCITONIN (SCT).....	27
2.5.1 Versuchstiere und Haltun gsbedingungen Versuchsreihe II.....	27
2.5.2 Behandlung Versuchsreihe II.....	28
2.5.3 Versuchsprotokolle für Versuchsreihe II.....	29
2.6 VORGEHENSWEISE BEI ALLEN VERSUCHEN.....	30
2.6.1 Herstellung und Zusammensetzung der verabreichten Diäten.....	30
2.6.2 Bestimmung von Futteraufnahme und Körpermasse.....	31
2.6.3 Einteilung der Tiere für die Versuche.....	32
2.6.4 Sonstige Arbeiten während der Versuchsdurchführung.....	32
2.6.5 Auswertung von Energieaufnahme und Körpergewicht.....	32
2.6.5.1 Erfassung der Rohdaten.....	32
2.6.5.2 Weiterführende Berechnungen auf der Grundlage der Rohdaten.....	33

2.6.5.3	<i>Statistische Datenauswertung</i>	34
2.7	GENOTYP-BESTIMMUNG BEI MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN	34
2.7.1	DNS-Gewinnung und Proben-Bearbeitung	34
2.7.2	Polymerase- Kettenreaktion (PCR)	34
2.7.3	Elektrophorese.....	36
2.8	VORGEHEN NACH BEENDIGUNG DER VERSUCHE	36
2.8.1	Tötung der Tiere.....	36
2.8.2	Probengewinnung für weiterführende Untersuchungen	36
2.8.3	Ermittlung der Körperzusammensetzung	37
3	 ERGEBNISSE.....	38
3.1	VERSUCHSREIHE I: BEHANDLUNG MIT MSH-DERIVATEN UND LEPTIN	38
3.1.1	Vergleich von α -MSH- und Leptin-Behandlungen bei adulten C57Bl/6J Tieren auf Standard-Diät	38
3.1.1.1	<i>Wirkungen einer erhöhten α-MSH Dosis und von MSH-Derivaten bei adulten C57Bl/6J Tieren im Vergleich zu Leptin</i>	42
3.1.1.2	<i>Behandlung adulter C57Bl/6J Mäuse mit dem MSH-Derivat MTII</i>	45
3.1.1.3	<i>Behandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse mit dem MSH-Derivat MTII</i>	47
3.2	BEHANDLUNG VON MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN UND C57Bl/6J MÄUSEN MIT LACHS CALCITONIN (sCT).....	48
3.2.1	Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei C57Bl/6J Tieren und MC4R-defizienten Tieren	48
3.2.2	Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei veränderten Umgebungsbedingungen.....	50
3.2.2.1	<i>sCT-Wirkung auf weibliche C57Bl/6J Mäuse bei veränderter Umgebungstemperatur und bei unterschiedlichen Diäten</i>	50
3.2.2.2	<i>sCT-Wirkung auf MC4R-defiziente Mäuse beider Geschlechter unter veränderten Umweltbedingungen</i>	51
3.2.3	sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch	54
3.2.3.1	<i>Langzeitversuch mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen</i>	54
3.2.3.2	<i>Langzeitversuch mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren ..</i>	58
3.2.3.3	<i>Langzeitversuch mit sCT-Pulsbehandlung bei C57Bl/6J Mäusen</i>	60
3.2.3.4	<i>Langzeitversuch mit sCT-Pulsbehandlung bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren</i>	65
3.2.3.5	<i>sCT-Pulsbehandlung bei MC4R-defizienten Absetzern: Vergleich der Behandlung von Lebenstag 21 bis 56 zu Behandlung bis Lebenstag 96</i>	68
4	 DISKUSSION	71
4.1	α -MSH UND SEINE BETEILIGUNG AN DER ENERGIEHOMÖOSTASE	72
4.1.1	α -MSH und die Vermittlung seiner Wirkung.....	72
4.1.1.1	<i>POMC und die Melanokortine</i>	72
4.1.1.2	<i>Melanokortin-Rezeptoren</i>	73
4.1.1.3	<i>Endogene Antagonisten und Hilfsproteine</i>	74

4.1.2	Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit α -MSH hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse	75
4.1.3	Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit MSH-Derivaten hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse	76
4.2	GRÜNDE FÜR DIE UNWIRKSAMKEIT DER ZENTRAL VERABREICHTEN MSH-DERIVATE BEI C57Bl/6J MÄUSEN	78
4.3	LEPTIN UND DIE VERMITTLUNG SEINER WIRKUNG	78
4.3.1	Leptin-Rezeptoren	78
4.3.2	Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit Leptin hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse	79
4.4	REAKTION AUF PERIPHERE LANGZEITBEHANDLUNG MIT MTII HINSICHTLICH ENERGIEAUFNAHME UND KÖRPERMASSE.....	80
4.4.1	Behandlung adulter C57Bl/6J Mäuse	80
4.4.2	Gründe für die Wirksamkeit des peripher verabreichten MSH-Derivats MTII bei C57Bl/6J Mäusen	82
4.4.3	Behandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Tiere mit MTII	82
4.4.4	Gründe für die Unwirksamkeit des MSH-Derivats MTII bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen	83
4.5	BEHANDLUNG MIT LACHS-CALCITONIN (sCT).....	85
4.5.1	sCT als Amylin-Analogon.....	85
4.5.2	Wirkung von sCT vermittelt durch Amylin-Rezeptoren	85
4.5.3	sCT-Wirksamkeit nach eintägigen Injektionen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen bei adulten C57Bl/6J Mäusen und MC4R-defizienten Mäusen	86
4.5.3.1	<i>Änderung der Diät und Umgebungstemperatur bei weiblichen C57Bl/6J Mäusen.....</i>	86
4.5.3.2	<i>Änderung der Diät und Umgebungstemperatur bei MC4R-defizienten Mäusen</i>	87
4.5.4	sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch bei kontinuierlicher Behandlung.....	88
4.5.4.1	<i>sCT-Langzeitbehandlung mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen</i>	88
4.5.4.2	<i>sCT-Langzeitbehandlung mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei juvenilen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen</i>	88
4.5.5	sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch mit intermittierender Behandlung.....	90
4.5.5.1	<i>sCT-Langzeitbehandlung mit pulsativer sCT-Gabe bei adulten C57Bl/6J Mäusen.....</i>	90
4.5.5.2	<i>sCT Langzeitbehandlung mit pulsativer sCT-Gabe bei juvenilen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen.....</i>	92
4.5.5.3	<i>Vergleich der sCT Langzeitbehandlung bei juvenilen MC4R-defizienten Tieren mit pulsativer sCT-Gabe in Abhängigkeit zur Behandlungsdauer</i>	92
4.5.6	Zentrale Veränderungen im Signalsystem der Energie-Balance unter langfristiger sCT-Wirkung.....	93
4.5.6.1	<i>Neuropeptide.....</i>	93
4.5.6.2	<i>Beteiligung des dopaminergen Systems.....</i>	94
4.5.6.3	<i>Beteiligung des histaminergen Systems.....</i>	95
4.5.6.4	<i>Mögliche Beteiligung von Cannabinoid-Rezeptoren.....</i>	95
4.6	AUSBLICK.....	96

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6	SUMMARY.....	101
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
8	DANKSAGUNG	119

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE

+/+	homozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens
+/-	heterozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens
-/-	homozygoter Träger eines defekten Allels eines Gens
<i>ad libitum</i>	zu freier Verfügung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AGRP	„agouti-related protein“
α -MSH	„alpha-melanocyte-stimulating hormone“, α -Melanozyten-stimulierendes Hormon, Melanokortinfamilie
anorexigen	appetithemmend
AP	Area postrema
ARC	Nucleus arcuatus
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	„body mass index“, Quotient aus Körpergewicht [kg] und dem Quadrat der Körpergröße [m]
bp	Basenpaare
Bregma	Schnittpunkt der coronalen und sagittalen Suturen auf dem Schädeldach
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C57Bl/6J	Bezeichnung eines Inzucht-Mäusestamms
ca.	circa
CART	„Cocaine-and-Amphetamine-regulated transcript“
CCK	„Cholecystokinin“
CGRP	„Calcitonin-gene-related Peptide“
CNTF	„Ciliary neurotrophic Factor“
CPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
CRLR	„Calcitonin-related Receptor“
CRF	„Corticotropin releasing Hormon“
CT	„Calcitonin-Rezeptor“
Da	Dalton
d	„day“, Tage

<i>db/db</i> -Maus	homozygoter Träger des defekten Leptin-Rezeptor-Gens, der keinen funktionellen Leptin-Rezeptor exprimieren kann
DIO	„diet-induced obesity“, diätinduzierte Adipositas
DMN	Nucleus dorsomedialis des Hypothalamus
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
„down-regulation“	Herunterregulation der Expression z.B. eines Neuropeptids oder eines Rezeptors
<i>et al.</i>	„ <i>et alii</i> “, lat.: und andere
<i>fa/fa</i> -Ratte	homozygoter Träger des defekten Leptin-Rezeptor-Gens, der keinen funktionellen Leptin-Rezeptor exprimieren kann
FFDM	„fat-free dry-mass“, fettfreie Trockenmasse
γ -MSH	γ -Melanozyten stimulierendes Hormon
h	„hour“, Stunden
H ₂ O	Wasser
hCT	humanes Calcitonin
IAAP	„Islet amyloid Peptid“, Amylin
<i>icv</i>	„intracerebroventriculare“, intrazerebroventrikulär = in den Gehirnventrikel
<i>in vitro</i>	„im (Reagenz-) Glas“, d.h. außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
<i>ip</i>	intraperitoneal
I.U.	„international unit“, internationale Einheit
kDA	kilo Dalton
JAK	„janus-kinase“, Thyrosinkinase der Janus-Familie
kDa	Kilo-Dalton, atomare Maßeinheit
<i>Lep^r</i>	Leptin-Rezeptor-Gen
Lep-R	Leptin-Rezeptor (wird in der neueren Literatur und in der vorliegenden Arbeit statt Ob-R verwendet), verschiedene Subtypen (LepR _{a-e})
LHA	„lateral hypothalamic area“, lateraler Hypothalamus

MC1R	Melanokortin-1-Rezeptor
MC2R	Melanokortin-2-Rezeptor
MC3R	Melanokortin-3-Rezeptor
MC4R	Melanokortin-4-Rezeptor
MC5R	Melanokortin-5-Rezeptor
<i>MC4r</i>	Gen, das den MC4R codiert
<i>MC4r</i> -KO Maus	Melanokortin-4-Rezeptor-Knockout Maus, homozygoter Träger des defekten <i>MC4r</i>
MC4R-defiziente Maus	hetero- und homozygoter Träger des defekten <i>MC4r</i>
MCH	„Melanin concentrating hormone“
MeV	Mega Elektronenvolt, physikalische Einheit für Energie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	„messenger ribonucleic acid“, Boten-Ribonucleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon (mehrere Typen: α ; β ; γ)
MTII	synthetischer α -MSH Agonist
N	Anzahl der untersuchten Tiere
n	Anzahl der Tiere mit positivem Methylenblau- Nachweis
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
Nle	L-2-Aminohexanyl
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
<i>Ob</i>	steht für ein defektes Leptin-codierendes Gen ("Obesity")
<i>ob/ob</i> -Maus	homozygoter Träger des ausgeschalteten <i>ob</i> -Gens, der kein funktionelles Leptin synthetisieren kann
<i>ob</i> -R	veraltete Bezeichnung für den Leptin-Rezeptor, heute Lep-R
orexigen	appetitsteigernd
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase- Kettenreaktion

PFH	perifornikale Region des Hypothalamus
pGK	Phosphoglycerinkinase
pH-Wert	Maß für die Wasserstoffionenkonzentration
POMC	„pro-opiomelanocortin“, Pro-Opiomelanokortin, Ausgangspeptid für mehrere Hormone (ACTH; MSH)
PVN	Nucleus paraventricularis des Hypothalamus
PYY	Polypeptid YY
r	Korrelationskoeffizient
RAMP	„receptor activity modifying proteins“
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subcutan
sCT	„salmon calcitonin“, Lachs-Calcitonin
SEM	„standard error of the mean“, Standardfehler des Mittelwertes
STAT3	„signal transducers and activators of transcription 3“
TN	Umgebungstemperatur knapp unterhalb der Thermo-neutralzone
TNZ	Thermoneutralzone, Umgebungstemperatur mit geringstmöglichem thermoregulatorischen Energieaufwand
U	„Unit“, Einheit für die Aktivität eines Enzyms, 1 Unit ist definiert als die Menge eines Enzyms, die pro min 1 µmol eines Substrates in einer chemischen Reaktion umwandelt
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VMN	Nucleus ventromedialis des Hypothalamus
z.B.	zum Beispiel
zeitsummiert	über einen definierten Zeitraum summierte Energieaufnahme einzelner Diäten und der Gesamtenergie
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Dass Adipositas mit ihren sekundären pathologischen Folgeerscheinungen zu einem gravierenden Gesundheitsproblem in der zivilisierten Welt geworden ist, weist auf die Tatsache hin, dass Umweltbedingungen, vor allem der Überfluss an hochkalorischer Nahrung, entscheidend zu ihrer Entstehung beitragen. Der nahe liegende Behandlungsansatz bei manifester Adipositas, sie durch diätetische Maßnahmen im Sinne einer Reduktion der Energieaufnahme rückgängig zu machen, hat sich allgemein als nicht effektiv erwiesen, weil eine solche Diät nur im Ausnahmefall durchgehalten wird. Offenbar existieren starke Antriebe zur Aufrechterhaltung der exzessiven Fett-Depots. Sie lassen vermuten, dass primäre oder sich im Verlauf der Adipositas-Entstehung entwickelnde Störungen der normalen Balance zwischen Energieaufnahme und -abgabe beim adipösen Individuum existieren, die der Normalisierung des Körpergewichts entgegenwirken. Dies erklärt auch, dass pharmakologische Ansätze zur Behandlung der Adipositas, die in die komplexe Steuerung der Energiebilanz eingreifen, bisher langfristig wenig effektiv waren, abgesehen von ihren oft nachteiligen Nebenwirkungen. Um hier Fortschritte zu machen, ist die genauere Kenntnis der Regulationssysteme notwendig, auf denen die ungestörte Energiebilanz beruht, sowie der Normabweichungen, die primär genetisch bedingt sind oder auf den verschiedenen Ebenen der nervös-hormonal gesteuerten Regelkreise während der Entwicklung einer Adipositas entstehen.

Nahrungsüberfluss an sich führt allerdings nicht zwangsläufig zur Adipositas. Dies zeigt die sehr stark unterschiedliche Entwicklung von Fett-Depots bei verschiedenen Individuen innerhalb einer mit hochkalorischer Nahrung homogen versorgten Bevölkerung. Zusätzlich zu prä- und perinatal gegebenen Störungen der Versorgung, etwa unter Kriegsbedingungen (Ravelli *et al.* 1976), gibt es offensichtlich Menschen, die zur Adipositas „veranlagt“ sind. Dies gilt auch für unterschiedliche Zuchtstämme von Tieren, etwa Ratten und Mäusen, die zur Analyse der Entstehung von Adipositas und den daraus resultierenden Störungen herangezogen werden. Bei Tierstämmen sind einige wenige monogenetische Varianten bekannt, die zur Adipositas prädisponieren, wie die *ob/ob* Maus, die *db/db* Maus und der *fa/fa* Gendefekt bei der so genannten Zucker-Ratte. Bei anderen Stämmen besteht eine bisher genetisch nicht definierte Prädisposition zur Adipositas, deren Entwicklung stärker von den Ernährungs- und Umweltbedingungen abhängig ist, wie etwa Ratten (DIO-Ratte), die eine „diätinduzierte Obesitas“ entwickeln, oder auch der C57Bl/6J Mäusestamm.

Die Entdeckung, dass es eine monogenetisch verursachte Adipositas auch beim Menschen gibt, hat erstmals die Möglichkeit eröffnet, Rückschlüsse von entsprechenden tierexperimentellen Modellen auf die Pathologie dieser speziellen Adipositas zu ziehen und nach der Möglichkeit einer gezielten Behandlung zu suchen. Sieht man von in Einzelfällen nachgewiesenen Defekten ab, gilt dies speziell, untersucht in einem extrem adipösen Patientenkollektiv, für den mit einer Prävalenz von ca. 2-6 % auftretenden Gendefekt am Melanokortin-4-Rezeptor (MC4R) für das „Melanozyten-stimulierende Hormon alpha“ (α -MSH), einen entscheidend wichtigen Botenstoff im Regulationssystem zur Begrenzung der Energieaufnahme und der Fettspeicherung (Vaisse *et al.* 1998; Yeo *et al.* 1998; Hinney *et al.* 1999; Lubrano-Berthelie *et al.* 2003). Der Gendefekt kommt bereits bei einer heterozygoten Ausprägung zur Wirkung, indem er eine juvenil einsetzende Adipositas bedingt. Ein vergleichbares „knockout“ Modell wurde bei der Maus entwickelt (Huszar *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000).

Der vorliegenden Untersuchung lag die Absicht zu Grunde, Überlegungen zu einem Therapieansatz experimentell zu verfolgen, die für Menschen mit heterozygoter Ausprägung des Gendefekts angestellt worden sind. Unter anderem wird dabei die Hypothese diskutiert, ob es möglich ist, die offenbar gestörte Transduktionsfunktion des unzureichend exprimierten MC4-Rezeptors für den natürlichen Agonisten α -MSH durch Anwendung unterschiedlicher Analoga zu verbessern (MacNeil *et al.* 2002; Lubrano-Berthelie *et al.* 2003). Die Tatsache jedoch, dass generell eine befriedigende medikamentöse Therapie der Adipositas bisher nicht existiert, und zwar unabhängig von der Pathogenese, macht es andererseits erforderlich, jeden therapeutischen Ansatz unter diesem allgemeinen Gesichtspunkt zu analysieren, auch wenn die Behandlung eines definierten Gendefekts das eigentliche Ziel ist. Aus diesem Grunde erschien es für die vorliegende Untersuchung notwendig, die Organisation des komplexen Regulationssystems der Energie-Balance insgesamt zu betrachten. Auf dieser Grundlage sollte versucht werden, abgesehen von der speziell interessierenden Möglichkeit, gezielt in die gestörte Signal-Transduktion für das Neuropeptid α -MSH einzugreifen, auch Therapieansätze zu analysieren, die unter Umgehung dieses Systems wirksam sein könnten. Die Versuchsansätze sowohl an der MC4-Rezeptor Knockout-Maus wie an polygenetisch zur diätinduzierten Adipositas prädisponierten C57Bl/6J Mäusen gingen deshalb von der Frage aus, ob es überhaupt möglich ist, unabhängig von der Genese einer Adipositas pharmakologisch einen mehr als kurzfristigen Therapieeffekt zu erzielen. Dies erschien deshalb sinnvoll, weil es auf diese

Weise gelingen könnte, sekundär entwickelten Therapie-Resistenzen, wie etwa eine Leptin- oder α -MSH-Resistenz, so weit abzuschwächen, dass die Wirksamkeit entsprechender Pharmaka wieder gegeben ist.

1.1 „HUNGER“ UND „SÄTTIGUNG“ ALS ELEMENTE DER ENERGIEHOMÖOSTASE

Voraussetzung für die zum Überleben eines tierischen Organismus lebensnotwendigen energieverbrauchenden Stoffwechselfvorgänge ist die Aufnahme von Nahrungsmitteln als Energielieferant. Als Energiehomöostase bezeichnet man in diesem Zusammenhang die Aufrechterhaltung eines energetischen Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und -verbrauch über einen längeren Zeitraum. Mechanismen, die sich bei der Nahrungsaufnahme als Auslöser für die Aufnahme einer Mahlzeit und in der Begrenzung der während einer Mahlzeit aufgenommenen Nahrungsmenge auswirken, stellen eine erste, an die Energieaufnahme gekoppelte Steuerungsebene dar. Diese kurzfristig wirksame Steuerung beruht auf Antrieben und Hemmungen, die beim Menschen als Hunger bzw. als Sättigungsgefühl ins Bewusstsein gelangen. Sie sind der längerfristigen Regulation der Energiebilanz vorgeschaltet. Ihr Beitrag zur Energiehomöostase besteht darin, dass Hunger- und Sättigungsgefühl durch das komplexe System der Steuerung der Energiebilanz längerfristig moduliert werden können. Die kurzfristigen Antriebe zur Aufnahme und Beendigung einer Mahlzeit sind teilweise mit solchen identisch, die sich auch längerfristig in der Energiehomöostase auswirken. Hier sollen nur diejenigen steuernden Einflüsse kurz beschrieben werden, deren Wirkung sich nach bisherigem Wissen auf die kurzfristige Steuerung der Energiebilanz beschränkt.

Abgesehen von hedonistischen und soziokulturellen Anregungen sind verschiedene physiologische Parameter bekannt, die den Antrieb zur Aufnahme von Nahrung (Carlson 2001; Saper *et al.* 2002) und zur Begrenzung einer Mahlzeit liefern. In der glukostatischen Theorie wurde bereits vor über 50 Jahren Glukose als einer dieser physiologischen Parameter identifiziert (Mayer 1953). Zwischenzeitlich ist bekannt, dass auch Fettsäuren und einige aus dem Proteinabbau entstehende Aminosäuren bei Unterschreitung eines Sollwertes zur Nahrungsaufnahme führen (Havel 2001). Der Abfall dieser Nährstoffe wird kurzfristig zum einen innerhalb des Gehirns (Glukose) zum anderen in der Leber (Glukose und Fettsäuren) durch entsprechende Rezeptoren erfasst (Carlson 2001; Havel 2001). Nach Aufnahme und oraler mechanischer Zerkleinerung der Nahrung kommt es im Gastrointestinaltrakt unter anderem durch Magensaft und Enzyme zur hydrolytischen

Aufspaltung der Nahrung in ihre Grundbausteine (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide), die anschließend in den entsprechenden Darmabschnitten resorbiert werden. Das kurzfristige Gefühl der Sättigung wird allerdings teilweise bereits prä-resorptiv durch unterschiedliche Vorgänge ausgelöst. So führen einerseits sensorische Eindrücke über Nase, Mund, Rachenraum und Speiseröhre wie Geruch, Geschmack, Konsistenz und Kaubewegungen, andererseits die über Mechanorezeptoren vermittelte Dehnung des Magens zu der Beendigung einer Mahlzeit (Carlson 2001). Zum anderen kommt es durch das Vorhandensein von Glukose, Fettsäuren und Aminosäuren im Magen-Darm-Trakt zur Reizung von Chemozeptoren, die über vagale Afferenzen Sättigungssignale an das Gehirn vermitteln (Carlson 2001; Havel 2001). Im Duodenum führen Fettsäuren und bestimmte Aminosäuren zur Freisetzung von Cholezystokinin (CCK). Dieses klassische Sättigungssignal führt peripher zu einer Stimulation der Gallenblase und des Pankreas, reduziert die Häufigkeit der Magenentleerung und beeinflusst zudem die Magendehnung (Hillebrand *et al.* 2002; Wilding 2002). Ebenso wie von der Leber kommende Stoffwechselsignale vermittelt CCK über afferente Fasern des Nervus vagus dem Gehirn den Stand der Verdauungsaktivität, und diese Information trägt als Sättigungssignal zur Beendigung der Nahrungsaufnahme bei (Carlson 2001).

1.2 KOMPLEXE REGULATION DES KÖRPERGEWICHTS

Die kurzfristige Steuerung der Menge der während einer Mahlzeit aufgenommenen Nahrung wird durch Einflüsse aus dem eigentlichen System der Energiehomöostase moduliert, das langfristig die Energiebilanz über ein komplexes Zusammenspiel aus peripheren Signalen und zentralen Rückkopplungsmechanismen steuert. Seine überwiegend hormonalen Signale sind zum Teil auch kurzfristig an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt. Im Vordergrund des Interesses steht bei der Aufklärung der Interaktionen zwischen hormonaler und zentralnervöser Kontrolle des Körpergewichts jedoch ihre mögliche Beteiligung an der längerfristigen Aufrechterhaltung der Energiebilanz. Hinzu kommt eine Vielzahl weiterer Signale, die den Energiestoffwechsel, die Energieaufnahme und die Energiedissipation, etwa im Rahmen der Temperaturregulation, beeinflussen.

1.2.1. Humorale Signale aus der Peripherie in das Gehirn

Die langfristige Regulation der Energiebilanz wird durch Informationen bestimmt, die mit dem Füllungszustand der Körperfettspeicher zusammenhängen und die Energieaufnahme langfristig auf den aktuellen und auch auf den zu erwartenden Energiebedarf abstimmen, wie dies z.B. während der Schwangerschaft und bei Tieren mit ausgeprägten saisonalen

Stoffwechselzyklen der Fall ist (Klingenspor *et al.* 2000). Bereits vor fünfzig Jahren vertrat Kennedy (1953) die Meinung, dass ein körpereigener Botenstoff proportional zu der Größe der Körperfettspeicher die Nahrungsaufnahme und somit die Fettreserven regelt. Erst viel später gelang es das *ob*-Gen zu klonieren (Zhang *et al.* 1994) und zu beweisen, dass dessen Produkt Leptin den gesuchten „Sättigungsfaktor“ im Blut darstellt (Halaas *et al.* 1995). Leptin, ein 16 kDa Protein (Ahima & Flier 2000), wird hauptsächlich in Adipozyten produziert (Zhang *et al.* 1994; Ahima & Flier 2000) und entfaltet wesentliche Wirkungen durch die Aktivierung von Rezeptoren im Gehirn. Nach heutigem Forschungsstand geht seine lipostatische Bedeutung weit über die eines Sättigungssignals hinaus.

Der Nucleus arcuatus (ARC), der an der Ventralseite des Hypothalamus bzw. am hinteren Ende des dritten Hirnventrikels bilateral lokalisiert ist und eine langgestreckte Ansammlung von neuronalen Zellkörpern darstellt (Sato *et al.* 1997), ist eine wesentliche Zielstruktur für das im Blut zirkulierende Leptin. Aufgrund von Tracer-Studien kann angenommen werden, dass dieser Bereich von im Blut zirkulierendem Leptin direkt, ohne Zwischenschaltung eines Transport-Systems erreicht wird. Zum einen finden sich im ventralen Bereich des ARC neben den vorherrschenden „dichten“ Kapillaren wie sie für die Blut-Hirn-Schranke (BHS) charakteristisch sind, auch fenstrierte Kapillaren, für die der Durchtritt in das Interstitium des Gehirns innerhalb von Sekunden nach Tracer-Infektion bei der Ratte nachgewiesen werden konnte (Gross 1992). Zum anderen können von der benachbarten Eminentia mediana, die sich durch das Fehlen einer BHS auszeichnet, zirkulierende Botenstoffe über die weiten perikapillären Räume in das Interstitium des ARC gelangen (Gross 1992). Auch Insulin entfaltet eine zentrale Wirksamkeit über im ARC exprimierte Insulin-Rezeptoren. Sowohl Insulin als auch Leptin beeinflussen die im ARC vorhandenen Neuropeptide mit dem Ergebnis einer Reduktion der Energieaufnahme (Porte *et al.* 2002; Niswender & Schwartz 2003).

Insulin weist neben seinen Steuerungsfunktionen im Zellstoffwechsel ebenfalls die Charakteristika eines Adipositas-Signals auf (Schwartz *et al.* 2000; Porte *et al.* 2002). Insulin wird von den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas sezerniert. Die im Vordergrund stehende periphere Wirkung, bei der die Freisetzung von Insulin nicht nur durch den Plasmaspiegel von Glukose und Aminosäuren stimuliert, sondern auch durch Glukagon sowie durch sympathische und parasympathische Innervation und Stress moduliert wird (Havel 2001; Aronoff 2004), ist von der katabolen zentralen Wirkung

abzugrenzen (Woods *et al.* 1985). Die zentrale Insulin-Wirkung wird ebenfalls über Rezeptoren im Gehirn vermittelt, die häufig mit Leptin-Rezeptoren co-exprimiert werden (Schulingkamp *et al.* 2000). In gleicher Weise wie Leptin signalisiert ein erhöhter Plasmainsulinspiegel das Vorkommen einer erhöhten Fettmasse und einer positiven Energiebilanz.

Die wie Leptin von Adipozyten sezernierten und der Familie der Zytokine zuzuordnenden Adipokine, gewinnen zunehmend an Bedeutung hinsichtlich ihrer Funktion innerhalb der Energiehomöostase. Insbesondere die Beteiligung von Adiponektin als endogener Insulinsensitizer wird diskutiert, während die Adipokine Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α und Resistin an einer Abnahme der Insulinempfindlichkeit und dem Entstehen der Insulinresistenz beteiligt sein sollen (Fasshauer *et al.* 2004).

Zu den kurzfristig hemmend auf die Energiehomöostase Einfluss nehmenden Signalen gehört das bereits erwähnte CCK. Im Gegensatz dazu ist Ghrelin, ein in den Funduszellen des Magens gebildetes Peptid, ein Signal, das die Energieaufnahme fördert. Während des Fastens und kurz vor der Nahrungsaufnahme kommt es zu einer Erhöhung des Plasma-ghrelinspiegels, der infolge von Nahrungsaufnahme unmittelbar sinkt. Ghrelin nimmt peripher Einfluss auf die Funktionen der Bauchspeicheldrüse, den Glukoseumsatz, die gastrische Motilität und die Magensäureproduktion. Zentral ist es an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt (Tschop *et al.* 2000). Im Unterschied zu CCK wird die zentrale Wirkung des Ghrelins nicht über nervöse Afferenzen vermittelt, sondern entfaltet seine Wirkung über Neurone des medialen und lateralen ARC des Hypothalamus. Diese Neurone sind gleichzeitig leptin-sensitiv. In diesem Zusammenhang wird Ghrelin, das die Neuronengruppen konträr zur Leptin-Wirkung beeinflusst, als funktioneller Antagonist von Leptin diskutiert (Tschop *et al.* 2000; Shintani *et al.* 2001; Riediger *et al.* 2003).

Von den zirkumventrikulären Organen des Gehirns (Gross 1992), die sich durch das Fehlen der BHS auszeichnen, ist speziell die an der Dorsalseite der Medulla oblongata gelegene Area postrema (AP) an der Energiehomöostase beteiligt. Sie ist als afferente Struktur in unmittelbarer Nähe des Nucleus tractus solitarii (NTS) lokalisiert, der eine erste Schaltstation für zahlreiche an der Energieaufnahme beteiligte Informationen darstellt. In der AP werden vor allem humorale Signale aus der Peripherie aufgenommen, sie zeichnet sich wie der NTS insbesondere durch eine hohe Anzahl von Bindungsstellen für Amylin

aus (Sexton *et al.* 1994; Christopoulos *et al.* 1995; Riediger *et al.* 1999). Amylin, auch Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) genannt, ist ein 37 Aminosäuren umfassendes Peptid, das mit Insulin in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme in den β -Zellen des Pankreas co-sezerniert wird (Westermarck *et al.* 1986; Banks & Kastin 1998). Die Tatsache, dass diese amylin-sensitiven Neurone außerdem durch Glukose aktiviert werden, also glukose-sensitiv sind, zeigt eine Interaktion humoraler und metabolischer Signalverarbeitung an und belegt die Schlüsselfunktion, die der Plasmaglukosespiegel im energiehomöostatischen System übernimmt (Riediger *et al.* 2001). Das dem Amylin strukturell und funktional verwandte Lachs-Calcitonin wirkt ebenfalls über die in der AP exprimierten Amylin-Rezeptoren. Durch seine irreversible Bindung an die Rezeptoren ist seine anorektische Wirkung prolongiert und verstärkt (Lutz *et al.* 2000; Del Prete *et al.* 2002).

Inwieweit Amylin und seine Analoga außer ihres kurzfristigen Einflusses auf die Nahrungsaufnahme auch den Energiehaushalt längerfristig beeinflussen können, ist eine der Fragen, die in der vorliegenden Arbeit behandelt werden. Hauptstimulus für die Freisetzung des anorektisch wirksamen Amylins ist ein postprandialer Anstieg des Plasmaglukosespiegels. Amylin wirkt sowohl über periphere, als auch über zentrale Mechanismen, es verringert die Magensäureproduktion, die Häufigkeit der Magenentleerung und reduziert die Energieaufnahme (Guidobono 1998). Zentralnervös wirkt es im Hypothalamus, in der AP und im NTS (Banks & Kastin 1995; Banks & Kastin 1998). Im Gehirn beeinflusst Amylin die Expression nachgeordneter Neuropeptide (Arnelo *et al.* 2000)

Inwieweit die peripheren kurzfristigen Signale die langfristige Regulation der Energiehomöostase beeinflussen ist zurzeit noch nicht abschließend geklärt. Gesichert ist jedoch, dass eine Vielzahl peripherer, sowohl kurz- als auch langfristiger lipostatischer, orexigener und anorexigener Signale ein Netzwerk an eingehenden Informationen liefern, die schließlich zentral durch ein fein abgestimmtes Rückkopplungs-System beantwortet werden.

1.2.2. Zentrale Signalverarbeitung

Übergeordnetes Zentrum der Energiehomöostase ist das zentrale Nervensystem (ZNS). Für die aus der Peripherie kommenden Signale aus dem Gastrointestinaltrakt, der Leber und dem Pankreas ist der NTS, ein Bereich des Hirnstamms, die erste zentralnervöse Schaltstelle, in der die peripheren nervösen Signale mit den von Neuronen der AP erfassten zirkulierenden Signalen verarbeitet werden. Der NTS steht in reziproker Verbindung zum Hypothalamus und seinen für die Regulation der Energiehomöostase wichtigen Kern-

gebieten. Die durch Läsionsstudien bereits Ende der vierziger Jahre identifizierte zentrale Vernetzungsstelle (Brobeck 1946; Anand & Brobeck 1951) enthält co-existierende Neuronengruppen, die spezifische Neurotransmitter exprimieren. Als bedeutsame rezeptive Struktur mit zugleich integrierender Funktion für stimulierende und inhibitorische Signale der Energiehomöostase erscheint der ARC (Abbildung 1). So ist die Existenz von Leptin-Rezeptoren mit Transducer-Funktion (LepR-R_b) für Nervenzellen im Bereich des ARC nachgewiesen, die funktionell antagonistisch wirkende Neuropeptide exprimieren. Somit stellen die Neurone des ARC eine erste Ebene der Integration afferenter Signale und ihrer Weiterleitung zu höheren Kerngebieten des Hypothalamus dar. Als die daran beteiligten zwei antagonistischen Systeme existieren stärker medial lokalisierte Neurone, in denen die orexigen wirksamen Peptide Agouti-related-Protein (AGRP) und Neuropeptid Y (NPY) (Broberger *et al.* 1998; Hahn *et al.* 1998) co-exprimiert werden, und andererseits stärker lateral lokalisierte Neurone, in denen die anorexigenen Peptide Pro-opiomelanocortin (POMC) (Thornton *et al.* 1997; Hahn *et al.* 1998) und Cocaine-and amphetamine-regulated Transkript (CART) (Thim *et al.* 1998; Elias *et al.* 1999; Vrang *et al.* 1999; Hillebrand *et al.* 2002) co-exprimiert werden. Die Expression orexigener Neuropeptide wird durch Leptin supprimiert, während ihre mRNA in Folge eines niedrigen Leptinspiegels ansteigt. Die anorexigenen Neuropeptide werden hingegen durch Leptin stimuliert und sinken ab, wenn wenig oder kein Leptin vorhanden ist (Ahima *et al.* 2000). Insulin verändert ebenfalls die Synthese und Freisetzung von NPY im ARC. Im Falle einer Hypoinsulinämie, wie während des Fastens oder bei Diabetes mellitus steigt die NPY-Expression an (Niswender & Schwartz 2003).

Neben den interagierenden Einflüssen von Leptin und Insulin auf die ARC Neurone, bestehen zudem Interaktionen zwischen den einzelnen Neuronen-Populationen und reziproke Verbindungen zu weiteren hypothalamischen Kerngebieten, wie dem Nucleus paraventricularis (PVN), Nucleus dorsomedialis (DMN), Nucleus ventromedialis (VMN) und der Area lateralis (LHA) (Williams *et al.* 2001).

Der im anterioren Abschnitt dorsal des dritten Ventrikels befindliche PVN ist ein Integrationszentrum verschiedener neuronaler Signale. Neben Axonen der NPY/AGRP und POMC/CART Neurone enden hier auch Axone des lateralen Hypothalamus. Der PVN selbst ist reich an Neurotransmittern, die die Nahrungsaufnahme modifizieren, wie unter

anderem NPY, α -MSH, Serotonin, Galanin und Noradrenalin (Elmqvist *et al.* 1998; Elmqvist *et al.* 1999).

Der VMN entspricht der ehemals als Sättigungszentrum bezeichneten Region. Obwohl bislang keine Synthese anorexigener oder orexigener Peptide nachgewiesen wurde, belegen selektive Destruktionen von Zellkörpern, die zu Hyperphagie und Gewichtszunahme führen, durchaus die neuronale Beteiligung des VMN an der Appetitregulation (Shimizu *et al.* 1987). In direkter Verbindung steht der VMN mit PVN, DMN und LHA.

Der DMN liegt dorsal des VMN und steht wie dieser direkt in Verbindung mit PVN, LHA und zudem mit dem Hirnstamm. Es wird vermutet, dass DMN und PVN eine Funktionseinheit bilden (Christophe *et al.* 1998). Außerdem weist der DMN eine Vielzahl an Leptin- und Insulin-Rezeptoren auf und erhält über Axone der NPY/AGRP Neurone des ARC Informationen (Kalra *et al.* 2000).

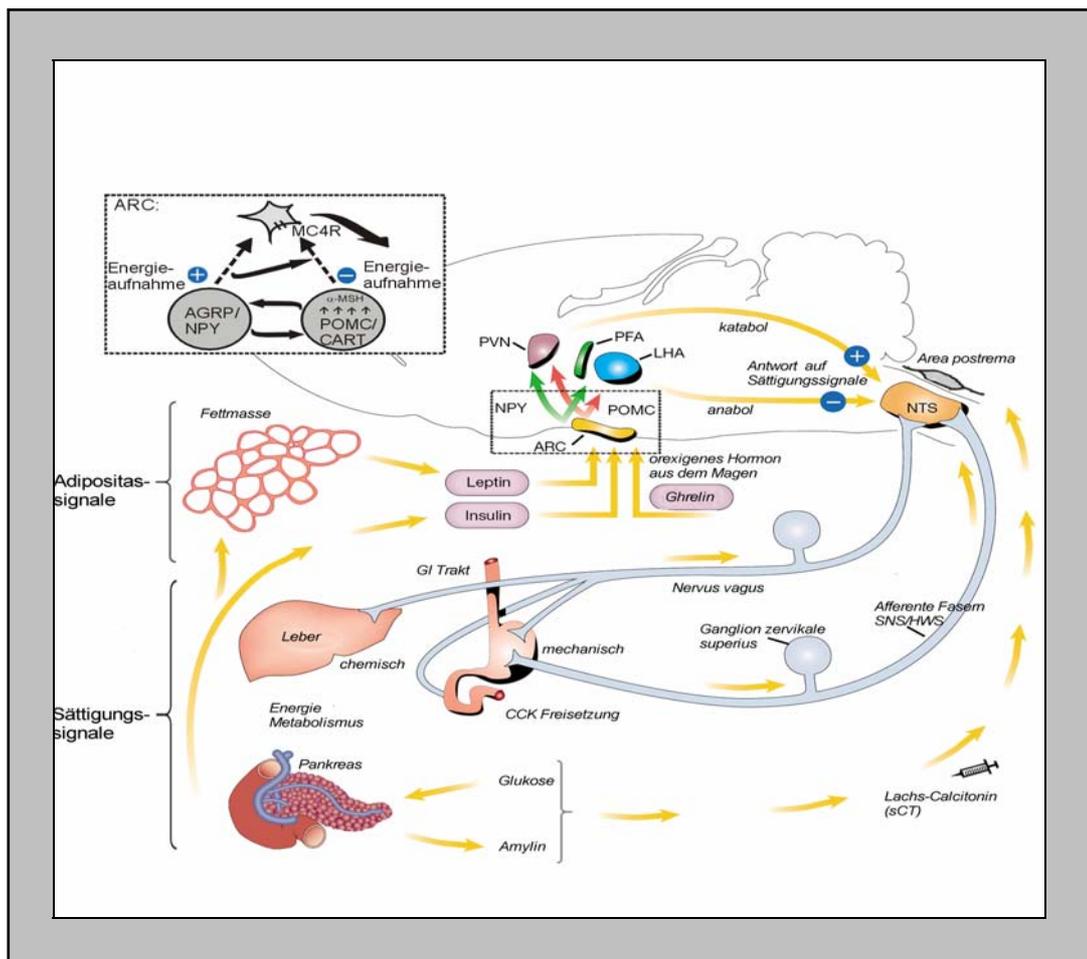


Abbildung 1: Neuroanatomisches Schema, das eine Übersicht über die Regulation von Sättigungs- und Adipositas-Signalen und deren Interaktion mit dem zentralnervösen System gibt. Oben rechts findet sich eine Ausschnittsvergrößerung des Nucleus arcuatus (ARC) und den durch Leptin und Insulin beeinflussten Neuronengruppen. Modifiziert nach Barsh & Schwartz 2002.

Die früher als Hungerzentrum bezeichnete LHA ist eine diffuse Neuronenpopulation, die unter anderem Subpopulationen enthält, die das orexigen wirksame Melanin-concentrating Hormon (MCH) sowie Orexine exprimieren und die in engem Kontakt zu NPY-Endigungen stehen (Broberger *et al.* 1998; Horvath *et al.* 1999). Ähnlich wie Ghrelin sind die Orexine die Energieaufnahme stimulierende Peptide, die einen Gegenpol zu Leptin darstellen und ihrerseits von Leptin beeinflusst wird. Die Aktivität und Genexpression der Orexine enthaltenden Neurone sind dem Energiestatus angepasst (Hillebrand *et al.* 2002; Riediger *et al.* 2003). Orexine verstärken die NPY-Expression und werden selbst durch das anorektische Hormon Amylin supprimiert (Broberger *et al.* 1998; Horvath *et al.* 1999; Riediger *et al.* 2004). Das zudem zahlreiche Auftreten von NPY-Rezeptoren führt zu der Vermutung, dass die LHA an der Vermittlung des orexigenen Effekts des NPY beteiligt ist (Hu *et al.* 1996).

Abschließend zu bemerken ist, dass auch auf dieser übergeordneten Ebene komplexe, interagierende und multifaktorielle Vorgänge ablaufen, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig erforscht sind. Einen Überblick über die Gesamtheit peripherer und zentraler Komponenten des Systems, soll Abbildung 1 liefern.

1.3 ADIPOSITAS ALS FEHLERHAFTES REGULATION DES KÖRPERFETTGEHALTES

Adipositas entwickelt sich durch ein langfristiges Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Zu diesem Ungleichgewicht tragen genetische, umweltbedingte und psychosoziale Gegebenheiten bei. Körpergewicht und körpereigene Fettspeicher unterliegen homöostatischen Regelkreisen, die kurzfristige Störungen wie Gewichtszu- oder abnahme auszugleichen vermögen (Spiegelman & Flier 2001). Eine langfristige Störung dieser Regulation mit einer Verschiebung des Sollwerts nach oben ist dagegen kaum zu korrigieren (Keeseey & Hirvonen 1997; Levin & Keeseey 1998). Die Auswirkungen dieses Sachverhalts zeigen sich in einem weltweiten Anstieg Adipöser in der Gesellschaft. Eine Milliarde Menschen leiden an Übergewicht, 30% der Betroffenen zeigen eine krankhafte Adipositas, die mit schwerwiegenden gesundheitlichen, aber auch sozialen und psychologischen Konsequenzen einhergeht (World Health Organisation [WHO] 2003). Gesundheitliche Folgen der Adipositas sind eine erhöhte Prävalenz einer Diabetes mellitus-Erkrankung, Störungen im Respirationsapparat, chronische Gelenkerkrankungen, Infertilität, sowie eine erhöhte Anfälligkeit für bestimmte Krebsarten (Brust-, Kolon-, Prostata-, Endometrium-, Nieren oder Gallenblasenkrebs) und Gallen-

blasenerkrankungen (Kopelman 2000; Everett et al. 2003). Die dadurch für das Gesundheitswesen entstehenden Kosten betragen zwischen 2-7% der gesamten Kosten (Ravussin & Bouchard 2000; Visscher & Seidell 2001; Labib 2003) und stellen wesentliche Gründe zur intensiven Erforschung und Behandlung dieser Störung dar.

1.4 DIE ADIPOSITAS BEEINFLUSSENDE UMWELT-PARAMETER

Neben der Aufnahme preisgünstiger und energiereicher, häufig jedoch ernährungsphysiologisch betrachtet wenig wertvoller Nahrungsmittel sind vor allem die verminderte physische Aktivität durch technologischen Fortschritt und sitzende Freizeitbeschäftigungen (Fernsehen, Computerspiele, Internet) Grund für die Entwicklung dieser modernen Epidemie (Labib 2003; WHO 2003). Auch bei Haustieren nimmt die Zahl übergewichtiger Tiere stetig zu (Wolf 2005). Neben dem Nahrungsangebot fördert auch der dauerhafte Aufenthalt in einem weitgehend thermoneutralen Bereich die Ausbildung einer Adipositas.

1.4.1 Parameter: Umgebungstemperatur

Gelegentlicher Kältestress ist sowohl für eine normale Entwicklung und die Aufrechterhaltung thermoregulatorischer Funktionen als auch für die Erhaltung ausgeglichener Körperfettspeicher notwendig (Schmidt 2001). Wie in Untersuchungen an Ratten nachgewiesen werden konnte, vermindern bereits pränatale bis in die Säugephase bestehende Einflüsse der Umgebungstemperatur die Reaktionen des sympathischen Nervensystems auf Kältestress und verändern dessen zentrale Organisation. Dies kann zu einer lebenslang andauernden Fehlprogrammierung thermoregulatorischer und energiehomöostatischer Regelkreise führen (Schmidt 2001). Im Tierversuch wurde die Thermoneutralzone (TNZ) erst in jüngster Zeit für C57Bl/6J Mäuse neu bestimmt und die Wechselwirkung von Umgebungstemperatur und Leptinresponsivität untersucht (Steinbrück 2004). Dabei zeigte sich, dass die Vermittlung der Leptinwirkung auf den Körperfettgehalt bei Nagetieren unter thermoneutralen Bedingungen durch die gleichen Effekte wie unter normalen Haltungstemperaturen erfolgen kann. In der TNZ gehaltene Tiere zeigten eine schwächere Leptin-bedingte Reduktion der Körperfettmasse als Tiere bei Kältebelastung. Andererseits wirkte eine Leptin-Behandlung bei limitiertem Futterzugang der bei kleinen Tieren normalerweise auftretenden Absenkung der Stoffwechselrate während der Inaktivitätsphase entgegen. Zudem zeigte sich, dass Körperfettmasse und Körperfettgehalt bis zur thermoregulatorischen kritischen Obergrenze der Umgebungstemperatur exponentiell zunahmen (Steinbrück 2004).

1.4.2 Parameter: Diät

Der Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die Ausprägung einer Adipositas konnte bereits Anfang der 90er Jahre in Untersuchungen am Tiermodell nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass verschiedene Inzucht-Stämme, die unter Standard-Diät kaum Unterschiede im Körpergewicht aufweisen, bei Zugang zu einer fett- und kohlenhydratreichen Diät unterschiedlich reagieren. Nur ein Teil der Stämme bildet eine diätinduzierte Adipositas (DIO) aus (West *et al.* 1992). In Folgestudien zeigte sich für diese Stämme besonders bei fettreichem Nahrungsangebot eine erhöhte Sensitivität, eine DIO zu entwickeln, wobei die Körpermasse proportional mit dem Fettgehalt der Nahrung anstieg (West *et al.* 1995). Dass insbesondere die Präferenz für den Makronährstoff Fett eine DIO begünstigt, konnte sowohl im Tierversuch (Smith *et al.* 2000) als auch beim Menschen (Kopelman 2000) nachgewiesen werden. In einer Untersuchung an Sprague-Dawley-Ratten konnte gezeigt werden, dass neben der genetischen Disposition und der Zusammensetzung der Nahrung auch die Schmackhaftigkeit der Nahrung eine Rolle spielen. Bei entsprechend attraktiver Diät neigen auch Tiere ohne Adipositas-Prädisposition zu einer Zunahme der Körpermasse (Levin & Dunn-Meynell 2002).

Eine neuere umfassende Untersuchung von Ratten mit Zugang zu hochkalorischer und fettreicher Diät zeigte neben einer signifikant stärkeren Gewichtszunahme der Tiere mit Zugang zu hochkalorischer Diät im Vergleich zu den Kontrolltieren, die ausschließlich eine Standard-Diät erhielten, einen signifikant erhöhten Plasmaleptinspiegel. Infolge der Langzeit-Diät kommt es außerdem zu einer vermehrten Expression von Genen des Lipid-metabolismus, bei gleichzeitiger Verminderung von Redox- und Stress-Proteinen (Lopez *et al.* 2003). Der Metabolismus des weißen Fettgewebes ändert sich hierbei in Abhängigkeit von dem in der aufgenommenen Diät dominierenden Makronährstoff und von der Dauer der Aufnahme (Margareto *et al.* 2001). Zudem führt die dauerhafte Aufnahme einer hochkalorischen Diät zu einer Änderung der mRNA-Expression sowohl des Leptin-Rezeptors, als auch von POMC und NPY (Huang *et al.* 2004). Diese Veränderungen können zeitlich unterschiedlichen Phasen zugeordnet werden, die erst mit einer peripheren und schließlich auch einer zentralen Leptin-Resistenz einhergehen (Lin *et al.* 2000).

1.5 ADIPOSITAS UND GENETISCHE PRÄDISPOSITION

Die Meinung, dass Adipositas ausschließlich durch eine ungesunde, übermäßige Ernährung und einen schwachen Willen der Betroffenen begründet ist, gilt längst als überholt. Adipositas ist eine multifaktorielle systemische Störung. Der genetische Einfluss

zeigt sich besonders deutlich an Studien bei eineiigen Zwillingen (Stunkard *et al.* 1990; Maes *et al.* 1996; Pietilainen *et al.* 1999). So entspricht sich z.B. der Grad der als Fett gespeicherten überzähligen Kalorien innerhalb eines Zwillingspaares, während starke Unterschiede zwischen den einzelnen Zwillingspaaren auftreten (Bouchard *et al.* 1990). Auch Studien bei Pima Indianern, die zur Ausbildung einer Adipositas neigen und einen erniedrigten Stoffwechsel haben (Ravussin 1995), unterstreichen die Wichtigkeit genetischer Faktoren, bestätigen jedoch ebenfalls den Einfluss der Umweltbedingungen (Esparza *et al.* 2000). Polygenetisch determinierte Adipositas-Prädispositionen kommen häufig vor, jedoch sind aufgrund der Komplexität der Störung Ursachen und Folgen nur schwer zu klären. Daher eignen sich Tiermodelle mit einer definierten monogenetischen Läsion besonders für die Erforschung der komplexen Interaktion zwischen genetischer Veranlagung und positiv verstärkenden Umwelteinflüssen. Zu den bei Tiermodellen bekannten Spontanmutationen gehören neben den bereits erwähnten *ob/ob* mit nicht-funktionellem Leptin und den *db/db* Mäusen mit defektem Leptin-Rezeptor, die *tub/tub* Maus mit fehlender Insulinsignalübermittlung (Coleman & Eicher 1990; Kleyn *et al.* 1996; Nobentrauth 1996), die Agouti yellow Maus (A^y) (Duhl *et al.* 1994; Yen *et al.* 1994), sowie die erst in jüngster Zeit analysierten Mutationen Mahogany (*mg/mg*) (Miller *et al.* 1997; Gunn *et al.* 1999; Gunn & Barsh 2000) und Mahaganoid (*md/md*). Von besonderem Interesse im Zusammenhang der vorliegenden Untersuchung ist die 1997 generierte MC4R Knockout-Maus (Huszar *et al.* 1997), weil sie eine Entsprechung zu einer beim Menschen identifizierten monogenetisch bedingten Adipositas darstellt (siehe 1.8).

1.6 SEKUNDÄRE STÖRUNGEN BEI VORLIEGEN EINER ADIPOSITAS

Die anfängliche Hoffnung, Leptin als „Wunderdroge“ in der Behandlung der Adipositas einsetzen zu können, hat sich nicht erfüllt. Eine abnehmende Responsivität gegenüber einer Leptin-Behandlung zeigte sich nicht nur im Tierversuch (Van Heek *et al.* 1997; Lin *et al.* 2000) sondern auch in der Adipositas-therapie von adipösen Patientenkollektiven. Nach ersten Untersuchungen erwies sich die Behandlung bisher nur bei den sehr selten auftretenden Fällen der vollständigen Leptin-Defizienz als erfolgreich (Montague *et al.* 1997; Farooqi *et al.* 1999). Im Gegensatz hierzu führten Studien bei Adipositas ohne bekannte genetische Läsion zu keinem Erfolg (Heymsfield *et al.* 1999). Vielmehr verfestigte sich der Verdacht einer im Verlauf der Adipositas-Entwicklung entstehenden Leptin-Resistenz, die sich sowohl bei Ratten mit diätinduzierter Adipositas, als auch bei adipösen Patienten durch einen andauernd hohen Plasmaleptinspiegel ohne entsprechende Antwort bemerkbar macht (Arch *et al.* 1998; Wauters *et al.* 2000). Die Ursachen diese

Leptin-Resistenz werden zurzeit noch diskutiert. Diskutiert werden ein nicht angepasster Transport-Mechanismus über die Blut-Hirn-Schranke, Defekte in der Transduktion des Leptin-Signals oder eine Veränderung der Leptin-sensitiven Neurone im Gehirn (Bjorbaek *et al.* 1999; El-Haschimi *et al.* 2000). Für Insulin sind ähnliche Vorgänge, besonders bei Vorliegen einer Typ II Diabetes mellitus-Erkrankung bekannt. Auch für die Insulin-Resistenz werden ähnliche Gründe wie für die Leptin-Resistenz diskutiert. Neben einer verminderten Rezeptorzahl, einer Verminderung der Aktivität der für die Signalkaskade benötigten Enzyme werden auch eine Störung im Glukose-Transport-Mechanismus und eine verringerte Aktivität intrazellulärer Enzyme in Betracht gezogen (Saltiel & Kahn 2001). Prädisponierende Faktoren, die zu einer Insulin-Resistenz führen können, sind neben einer Typ II Diabetes mellitus-Erkrankung und Adipositas ein erhöhtes Vorkommen von Katecholaminen und Glukokortikoiden (Fasshauer *et al.* 2004). Die bereits erwähnten Adipokine wirken sich ihrerseits unterschiedlich auf die Insulinempfindlichkeit peripherer Organe aus (Fasshauer *et al.* 2004). Aufgrund der ähnlichen Mechanismen der Resistenzentstehung, wie auch der zentralen Rezeptorverteilung wird auf molekularbiologischer Ebene ein Zusammenspiel der Signalkaskaden von Leptin und Insulin vermutet. Nachgewiesen werden konnte bislang, dass Leptin einzelne Faktoren der Signaltransduktion von Insulin beeinflussen kann (Niswender & Schwartz 2003). Das gleichzeitige Vorkommen einer Insulin-Resistenz bei schwerer Leptin-Defizienz oder -Resistenz und die durch exogen zugeführtes Leptin verbesserte Glukose-Toleranz und Insulinempfindlichkeit bei einer Diabetes mellitus-Erkrankung unterstützen diese Vermutung (Niswender & Schwartz 2003) und veranschaulichen eindrücklich die Redundanz einzelner Faktoren in der komplexen Entstehung der Adipositas (Air *et al.* 2002).

1.7 ANSÄTZE IN DER ADIPOSITASTHERAPIE

Reduktions-Diäten sind ein adäquates Mittel eine Gewichtsabnahme zu erreichen. Häufig ist der zuerst erzielte Erfolg jedoch nicht über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten. Durch die Reduktion der Energieaufnahme kommt es zu einer verminderten Stoffwechselrate, da sich der Körper auf die neue Situation eines begrenzten Energieangebots einstellt. Außerdem kommt es bei einer Vielzahl der Diäten durch den Mangel an aufgenommenen Proteinen zu einem Abbau von Muskeleiweiß und so zu einer zusätzlichen Absenkung des Grundumsatzes. Nach Beendigung der Diät und Aufnahme der ursprünglichen Ernährungsgewohnheiten kommt es dann zu einer Gewichtszunahme, die häufig erst über dem Ausgangsgewicht endet, umgangssprachlich auch als JoJo-Effekt bezeichnet.

Die Suche nach einer pharmakologischen Behandlungsmöglichkeit der sich epidemisch ausbreitenden Krankheit Adipositas ist zurzeit nur unbefriedigend gelöst. Ziel aller zur Verfügung stehenden Mittel ist das Resultat einer negativen Energiebilanz. Die Möglichkeit, diese Energie-Reduktion zu erreichen, besteht zum einen darin, die Absorption von Fetten, also von hochkalorischen Nahrungsstoffen, zu vermindern. Mit Orlistat steht hierfür ein Pankreas-Lipase-Hemmer zur Verfügung, der lokal im Intestinaltrakt wirkt und die Aufspaltung der Nahrungsfette und somit ihre Resorption vermindert. Orlistat ist allerdings nur bei gleichzeitiger Reduktions-Diät wirksam und führt zu Veränderungen der Ausscheidungen (Steatorrhoe), Darmkrämpfen und zu einer Reduktion der Aufnahme fettlöslicher Vitamine (Kaplan 2005; Podingbauer & Ekmekcioglu 2005). Eine weitere Möglichkeit die Energiebilanz zu beeinflussen, ist die Erhöhung der Stoffwechselrate. Sibutramin, ein Serotonin/Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor, ursprünglich als Antidepressivum eingesetzt, greift zentral in adrenerge, serotonerge und dopaminerge Signalwege ein. Schwere Nebenwirkungen, wie ein dosisabhängiger Blutdruckanstieg sowie schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankungen machen dieses Mittel jedoch nur bedingt tauglich für die Adipositas-therapie (Kaplan 2005; Podingbauer & Ekmekcioglu 2005). Mit Pramlitidin steht ein Amylin-Analogon zur Verfügung, das bei einer Typ II Diabetes mellitus-Erkrankung zu einer Verbesserung des Stoffwechsels und einer moderaten Gewichtsabnahme führt (Tripp & Ludvik 2004). Ein noch in der klinischen Untersuchung befindliches Pharmakon, ist der Cannabinoid-1-Rezeptor-Agonist Rimonabant, der ebenfalls in einer Gewichtsreduktion und einer Verbesserung des Fettstoffwechsels resultiert (Tripp & Ludvik 2004). Appetitzügler, die durch Volumenersatz (Zellulose, Flüssigkeit) ein Sättigungsgefühl hervorrufen, sind nur bedingt und kurzfristig erfolgreich.

Bei morbidem Adipositas, die mit beträchtlich erhöhtem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einhergeht, stehen zudem noch chirurgische Verfahren zur Verfügung (Hanusch-Enserer *et al.* 2004) Durch das „gastric banding“, das Einsetzen eines Magenballons oder das äußerliche Anbringen eines Magenbandes wird das Volumen des Magens reduziert und bei der Nahrungsaufnahme eine vorzeitige Dehnung und somit ein verfrühtes Sättigungssignal ausgelöst. Bei der Gastroplastik wird mit gleichem Ziel der Magen chirurgisch verkleinert. Bei der Operation des Magenbypass wird ein Vormagen modelliert, der direkt mit dem Dünndarm in Verbindung steht. Neben der Reduktion der Nahrungsaufnahme sollen hierbei die Passage der Nahrungsbestandteile und damit ihre enzymatische Aufschlüsselung verändert werden. Neuerdings eingesetzt werden zudem Magenschrittmacher, die ein

elektrische Signal aussenden und so durch einen noch nicht geklärten Mechanismus ein Sättigungsgefühl hervorrufen. Diese chirurgischen Eingriffe erfordern eine gute Nachbetreuung, um Nebenwirkungen durch den chirurgischen Eingriff und auftretende Mangelerscheinungen möglichst früh zu erkennen (Hanusch-Enserer *et al.* 2004).

1.8 ADIPOSITAS UND DIE RELEVANZ EINER MUTATION IM MC4R

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Studie untersuchten MC4R-defizienten Tiere soll ein Überblick über die Relevanz des Melanokortin-Systems und den derzeitigen Forschungsstand im entsprechenden Mausmodell gegeben werden. Als einzige der bisher beim Menschen monogenetisch vererbten Adipositas-Prädispositionen geht die durch den gestörten MC4R bedingte Abnormität nicht mit einer Beeinträchtigung der sexuellen Reifung und Reproduktionsfähigkeit oder anderen endokrinologischen Dysfunktionen einher (Hebebrand *et al.* 2004). Es zeigt sich beim Menschen eine frühmanifeste Adipositas in Verbindung mit einer Hyperphagie (Vaisse *et al.* 1998; Yeo *et al.* 1998; Gu *et al.* 1999). Eine Hyperinsulinämie und die Neigung, einen Diabetes mellitus Typ II auszubilden, entsprechen dem Vorkommen bei adipösen Patienten ohne genetische Erkrankung (Vaisse *et al.* 1998; Hinney *et al.* 1999). Häufig wird Bluthochdruck beschrieben. Ein schnelleres Längenwachstum und eine größere Statur (Yeo *et al.* 1998; Farooqi *et al.* 2000) konnten nicht in allen Untersuchungen nachgewiesen werden. Außerdem zeigt das Patientenkollektiv eine erhöhte Knochendichte und erhöhte Plasmaleptinwerte (Mergen *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den anderen bislang nur bei einzelnen Menschen nachgewiesenen monogenetischen Formen mit dem Phänotyp Adipositas, weist die Mutation am MC4R mit einem Auftreten von 2-6% in extrem übergewichtigen Patientenkollektiven eine wesentlich höhere Prävalenz auf (Yeo *et al.* 1998; Hinney *et al.* 1999; Lubrano-Berthelier *et al.* 2003; Hebebrand *et al.* 2004; Snyder *et al.* 2004).

1.8.1 Das Melanokortin-System

Zu dem Melanokortin-System werden die aus POMC gebildeten Melanokortin-Peptide (α -, β - und γ -MSH), fünf transmembranale Rezeptoren und die endogenen melanokortinergen Antagonisten Agouti- und Agouti-Related-Protein gezählt. Zudem wird die Aktivität der Melanokortine durch die Proteine Mahagony und Syndecan-3 beeinflusst. Als das für die Energiehomöostase wesentlichste Melanokortin gilt zurzeit das α -MSH. Der Einfluss von ACTH und α -MSH auf die Futteraufnahme bei Ratten wurde Ende der achtziger Jahre erstmalig erwähnt (Poggioli *et al.* 1986). Größere Beachtung fand die Rolle

des Melanokortin-Systems für die Kontrolle der Energiebilanz allerdings erst als die Klonierung der Melanokortin-Rezeptoren, insbesondere des MC4R, gelang.

1.8.2 Das MC4R-defiziente Mausmodell

Huszar *et al.* beschreiben 1997 zum ersten Mal die Entwicklung eines MC4R-defizienten Mausmodells. In embryonalen Stammzellen wurde die Aminosäuresequenz für den MC4R teilweise durch ein Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt und somit die Genfunktion vollständig unterbunden. Die Initialstudie wies bereits im Alter von sieben Wochen nach, dass alle homozygoten Träger des Defekts beiderlei Geschlechts schwerer waren als ihrer Wildtypgeschwister, wobei der Gewichtsunterschied mit ansteigendem Alter größer wurde. Die heterozygoten Mutanten liegen mit ihrer Körpermasse zwischen homozygoten und Wildtypen (Huszar *et al.* 1997). Folgestudien konnten den Heterozygoteneffekt lediglich für männliche Tiere nachweisen, wahrscheinlich bedingt durch leichte Abweichungen im genetischen Hintergrund der embryonalen Stammzellen (Chen *et al.* 2000). Für Tiere mit Gendefekt konnte im Vergleich zu den Wildtypen zudem ein gesteigertes Längenwachstum nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass der MC4R auch an regulatorischen Kreisläufen des Wachstumshormons beteiligt ist (Huszar *et al.* 1997).

Eine am gleichen Mausmodell wie in der Initialuntersuchung durchgeführte Studie zeigt, dass trotz geringer Unterschiede im Lebendgewicht bereits in einem Alter von 35 Tagen der Körperfettgehalt bei homozygoten Mutanten signifikant höher ist als bei heterozygoten Tieren und Wildtypen. Diese Tendenz verstärkt sich bis zum Lebenstag 56, -/- Tiere haben in diesem Alter einen 50% höheren Körperfettgehalt als die Heterozygoten, die einen 20 % größeren Körperfettgehalt als Wildtypen aufweisen (Weide *et al.* 2003). Durch Gabe einer hochkalorischen Zusatz-Diät nach dem Absetzen (Lebenstag 21), kommt es nicht nur zu einem Anstieg des Körperfettgehalts bei allen drei Genotypen, sondern der Heterozygoteneffekt ist bereits ab Lebenstag 35 nachzuweisen (Weide *et al.* 2003). Dies ist im Hinblick auf die beim Menschen bereits juvenil einsetzende Adipositas bei Vorliegen einer funktionellen Mutation im MC4r wichtiger Befund.

Die homozygoten Tiere nehmen nicht nur als Adulte, sondern vor allem während der Entwicklung signifikant größere Futtermengen auf als Wildtypen (Huszar *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000; Ste Marie *et al.* 2000; Weide *et al.* 2003). Neben diesem Effekt wird auch eine Veränderung des Metabolismus der Tiere diskutiert. Untersuchungen der körperlichen Aktivität zeigen eine verminderte lokomotorische Aktivität adulter, bereits adipöser

-/- Tiere gegenüber den Wildtyptieren (Chen et al. 2000). In derselben Studie wird die metabolische Rate der -/- Tiere mit der von Wildtypen und der von C57Bl/6J Mäusen mit DIO verglichen und festgestellt, dass die bestehende Veränderung sekundär auf das erhöhte Körpergewicht der Tiere zurückzuführen ist (Chen *et al.* 2000). In einer anderen Studie wird dagegen festgestellt, dass die massenspezifische metabolische Rate der homozygoten Tiere unter der anderer gleichgewichtiger Mäuse liegt (-20%) und deshalb neben der Hyperphagie als Ursache des erhöhten Körpergewichts diskutiert wird (Ste Marie *et al.* 2000). Eine vom Absetzen an durchgeführte Studie, beginnend vor dem Zeitpunkt zu dem sich die Adipositas manifestierte, lässt sekundär entstehende von auslösenden Effekten trennen (Weide *et al.* 2003). Diese Ergebnisse zeigten keine verminderte Stoffwechselrate der homozygoten Mutanten. Die exzessive Fettdeposition der Tiere wird primär durch eine Hyperphagie angetrieben (Weide *et al.* 2003).

Untersuchungen der Blutparameter Glukose, Insulin und Leptin zeigten bei adulten MC4R-Mutanten beiden Geschlechts eine signifikante Erhöhung (Huszar *et al.* 1997). Hierbei besteht eine positive Korrelation zwischen dem Anstieg des Körperfettgehalts und den Plasmaleptinwerten (Weide *et al.* 2003). Untersuchungen der Neuropeptid-Expression zeigen, dass sie durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Genotyp, Geschlecht, Alter, Fütterung der Tiere und eine sich sekundär ausbildende Leptin-Resistenz (Marsh *et al.* 1999) beeinflusst werden und deshalb die Interpretation einzelner Veränderungen erschwert wird. Während in der Erstuntersuchung keine Änderung der POMC-Expression im ARC, jedoch eine gesteigerte NPY-Expression im DMN nachgewiesen wurde (Huszar *et al.* 1997), zeigen Folgeuntersuchungen ein komplexeres Bild. So bestimmt der Körperfettgehalt über den davon abhängigen Plasmaleptinspiegel die Expression der Neuropeptide im ARC bis in das frühe Erwachsenenalter (56 Lebensstage). Hierbei bedingt ein Anstieg des Körperfettgehalts bzw. der Plasmaleptin-Konzentration eine verminderte Expression von NPY und AGRP, jedoch eine erhöhte POMC und CART Expression (Arens *et al.* 2003). Bei Tieren mittleren Alters (neun Monate) zeigt sich dieser Effekt nicht mehr, allerdings lässt sich bei diesen Tieren eine mit dem Körperfettgehalt und der Plasmaleptin-Konzentration positiv korrelierte NPY-Expression im DMN und VMN nachweisen, die bei -/- Tieren besonders hoch ist. Der bei Jungtieren bestehende suppressive Genotyp-Einfluss auf die AGRP-Expression wird im Alter von neun Monaten umgekehrt, so dass für heterozygote und homozygote Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren eine signifikant erhöhte AGRP-Expression nachgewiesen werden kann. Die veränderte Expression der Neuro-

peptide mit zunehmendem Alter scheint durch eine fortschreitende Änderung zentraler Signalwege im ARC bedingt zu sein. Mit zunehmendem Alter führt dies zum Verlust der Fähigkeit, auf den ansteigenden Körperfettgehalt mit adäquaten gegenregulatorischen Reaktionen zu antworten (Arens *et al.* 2003).

1.8.3 Pharmakologische Manipulationen des Körpergewichts bei MC4R-defizienten Mäusen

Bisher wurde nur eine umfassende Studie über den Einfluss unterschiedlicher Pharmaka auf die Energieaufnahme und die Körpermasse homozygoter MC4R-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtypen in unterschiedlichen Altersstufen publiziert (Marsh *et al.* 1999). Eine zweitägige Leptin-Behandlung (icv.: 5 Injektionen, Dosis: 3,2 µg, 48 h gefastet) der Tiere zeigte, dass ältere adipöse -/- Tiere bereits eine sekundäre Leptin-Resistenz entwickelt haben. Homozygote junge Tiere (5 Wochen) dagegen, deren Körpermasse sich noch nicht signifikant von der der Wildtypen unterscheidet, reagieren, wenn auch etwas schwächer als die Wildtypen, mit einer signifikanten Reduktion der Energieaufnahme (Abnahme 27% bei -/- versus 70% bei +/+). Auch die periphere Leptin-Injektion (3 x tgl. 25 µg/g Körpermasse ip.) bewirkt eine signifikante Verminderung der Energieaufnahme bei homozygoten MC4R-defizienten Mäusen im Alter von fünf Wochen (Abnahme 24% bei -/- versus 32% bei +/+). Im Gegensatz hierzu führen weder zentrale noch peripher verabreichte Leptin-Injektionen bei 13-16 Wochen alten homozygoten Tieren, die 60% mehr als die Wildtyp-Kontrollen wiegen, zu einer Reduktion der Energieaufnahme (Marsh *et al.* 1999). Die in der genannten Studie durchgeführte Behandlung mit dem synthetischen α -MSH Agonisten MTII (icv.: 1 µg) zeigte nach 20-stündigem Fasten keine Reaktion auf die Energieaufnahme bei homozygoten Tieren, während die Wildtypen nach vier Stunden mit einer signifikanten Futterreduktion und nach acht Stunden mit einer signifikanten Verminderung des Körpergewichts reagierten (Marsh *et al.* 1999). Außerdem wurde DH-CNTF als Analogon des Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) (3 x tgl. 125 ng/g Körpermasse ip., Alter der Tiere: 14-16 Wochen) untersucht. CNTF aktiviert ähnlich wie Leptin Faktoren für die STAT Transkription. Hier konnte eine bei den -/- Tieren stärkere Reaktion auf Energieaufnahme und Körpermasse als bei den Wildtypen festgestellt werden (Marsh *et al.* 1999). Die Ergebnisse der Untersuchung des humanen Corticotropin Releasing Factors (CRF) bei 16-18 Wochen alten Tieren in einer Dosierung von 1 µg icv. führten bei -/- Tieren und Wildtypen zu einer signifikanten Reduktion der Futteraufnahme, eine Auswirkung auf die Körpermasse zeigte sich allerdings nur bei den homozygoten MC4R-defizienten Mäusen. Auch die Reaktion auf Urocortin (icv.: 5 µg), einem Mitglied der

gleichen Familie, entspricht der auf CRF (Marsh *et al.* 1999). Neben diesen anorexigen wirksamen Substanzen wurden zudem die orexigen wirksamen Stoffe NPY, PYY₃₋₃₆ und Orexin-A und -B untersucht. Während NPY, PYY₃₋₃₆ zu einer signifikanten Erhöhung der Energieaufnahme sowohl bei -/- Tieren wie Wildtypen führten, konnte bei den Orexinen keine Reaktion nachgewiesen werden.

Eine ebenfalls in ihrer Wirkung auf Energieaufnahme und Körpermasse bei homozygoten MC4R-defizienten Mäusen untersuchte Substanz ist Lachs-Calcitonin (sCT). Homozygote MC4R-defiziente Mäuse zeigen eine signifikante und dosisabhängige Reduktion der Energieaufnahme ab einer sCT-Dosis von $49 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$. Diese Reaktion war jedoch im Vergleich zu der von C57Bl/6J Mäusen deutlich geringer (Eiden *et al.* 2002).

1.9 ZIELE DER ARBEIT

Wie eingangs erwähnt, steht als monogenetische Ursache einer Adipositas beim Menschen gegenwärtig die MC4R-Defizienz im Zentrum des Interesses. Deshalb sollte in der vorliegenden Untersuchung speziell für das analoge Tiermodell, die heterozygote MC4R-defiziente Maus, nach einer Behandlung gesucht werden, die möglichst für längere Zeit das Anwachsen ihres Körperfettgehalts limitiert. Ausgangspunkt war die Anwendung von α -MSH Analoga. Als Vergleichsmöglichkeit zur Überprüfung der Veränderung von Energieaufnahme und Körpermasse infolge von Behandlungen dienten neben Kontrollen der jeweiligen Versuchsgruppe zudem C57Bl/6J Mäuse, die sich durch Neigung zur Ausbildung einer DIO ebenfalls als Untersuchungsmodell für die Adipositas therapie eignen.

Den zunächst angestellten Überlegungen zufolge wurde in der vorliegenden Arbeit der endogene MC4R Agonist α -MSH verabreicht. Der so erzielte Überschuss des Agonisten sollte bei den heterozygoten MC4R-defizienten Tieren die verbliebenen Rezeptoren stimulieren und zu einer verminderten Energieaufnahme und einer Abnahme des Körperfettgehalts führen. Da Literaturergebnisse für die Behandlung mit α -MSH fast ausschließlich für Ratten vorhanden sind (Huang *et al.* 1999; Abbott *et al.* 2000; McMinn *et al.* 2000; Millington *et al.* 2001), wurde, um grundlegende Vergleichsdaten an Mäusen zu erhalten, diese Behandlung zuerst an C57Bl/6J Tieren durchgeführt. Da die Untersuchungsergebnisse bereits bei den C57Bl/6J Mäusen nicht zufrieden stellend waren, wurden bei diesem Stamm zunächst Kontrolluntersuchungen gleicher Länge und Methode mit Leptin durchgeführt, um methodische Fehler als Ursache auszuschließen. Außerdem wurden MSH-Derivate, wie β -MSH und NDP- α -MSH eingesetzt, deren biologische Wirksamkeit

und Stabilität höher ist als die von α -MSH (Sawyer *et al.* 1980; Hadley *et al.* 1981; Brown *et al.* 1998; Abbott *et al.* 2000; Kask *et al.* 2000). Weiterhin wurden C57Bl/6J Mäuse mit dem synthetischen Agonisten MTII behandelt. Die hierfür erstellten Vergleichsdaten stimmten mit Literaturbefunden überein (Pierroz *et al.* 2002). Der sich anschließende eigene Behandlungsversuch an den bisher noch nicht untersuchten heterozygoten MC4R-defizienten Tieren zeigte jedoch so geringe Wirkung, dass die Versuche einer spezifischen Behandlung mit einem exogen zugeführten Agonisten des MC4R eingestellt wurden.

Die im Gegensatz hierzu zumindest kurzfristig vielversprechende Wirkung einer symptomatischen Behandlung mit sCT auf die Energieaufnahme (Eiden *et al.* 2002), war der Ausgangspunkt für die Untersuchung der bisher noch nicht ermittelten Langzeitwirkung einer sCT-Behandlung bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen. Vorbereitend für diese Versuchsserie wurden sowohl bei adulten heterozygoten als auch bei homozygoten MC4R-defizienten Tieren Eintagesbehandlungen unter veränderten Umweltbedingungen durchgeführt. Dazu gehört zum einen der Aufenthalt der Tiere in einer annähernd thermoneutralen Umgebung, zum anderen die Verfügbarkeit einer wohl-schmeckenden, hochkalorischen Zusatz-Diät neben gesunder ausgewogener Kost in unbegrenzter Menge. Da sich der „moderne Mensch“ überwiegend in einer solchen Umgebung aufhält, ist es besonders wichtig, dass pharmakologische Ansätze auch unter diesen Bedingungen ihre Wirkung beibehalten.

Als sich die Grenzen der Behandlung für die Langzeitwirkung bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen trotz einer versuchten Kombinationsbehandlung mit sCT und Leptin zeigten, wurden Tiere direkt nach dem Absetzen (Lebenstag 21) behandelt. Zu diesem Zeitpunkt, ist noch kein signifikanter Unterschied im Körperfettgehalt nachzuweisen und ein frühzeitiges pharmakologisches Eingreifen Erfolg versprechend, da sich noch keine Sekundärstörungen ausgebildet haben. Als auch die kontinuierliche Langzeitbehandlung von Jungtieren keinen signifikanten Einfluss auf den Körperfettgehalt ergab, wurde ein neues Behandlungsschema entwickelt, das die gegenregulatorisch wirksamen Mechanismen berücksichtigt und durch Ruhezeiten zwischen den Behandlungen die Responsivität auf die sCT-Injektionen wiederherstellen sollte. Nach der Erprobung eines pulsatilem Behandlungsmusters für sCT an adulten C57Bl/6J Mäusen wurden entsprechende Behandlungen bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren getestet.

2 Material und Methoden

2.1 VERSUCHSTIERE

Die Versuche wurden an MC4R-defizienten Mäusen beider Geschlechter aus der Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Instituts in Bad Nauheim durchgeführt. Die vier heterozygoten Zuchtpaare, aus denen die Zucht hervorging, waren 1999 freundlicherweise von Dennis Huszar, Millenium Pharmaceuticals, Inc., Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt worden. Zum Vergleich wurden C57Bl/6J Mäuse untersucht, die im Alter von drei Wochen von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen wurden. In späteren Versuchen wurden C57Bl/6J Mäuse aus der Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Instituts verwandt, die ursprünglich auf Zuchtpaare der Firma Harlan Winkelmann zurückzuführen sind. Die Geschlechterverteilung ergab sich aus den zum Versuchszeitpunkt verfügbaren Würfen.

2.2 HALTUNGSBEDINGUNGEN VOR VERSUCHSBEGINN

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere bei $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ in einem Licht/Dunkel-Zyklus von 12:12 h gehalten. Weibliche Tiere waren in Gruppenhaltung, männliche Mäuse in Einzelhaltung in Makrolon-Käfigen (Typ 2, Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel) auf Holzgranulatstreu (Altromin, Lage) untergebracht. Vom Absetzen an (im Alter von 21 Lebenstagen) erhielten die Mäuse pelletierte Standard-Diät (Zuchtfutter, Altromin 1314, Altromin, Lage) aus der Futterraufe. Die weiblichen Tiere wurden eine Woche vor Wiegebeginn in Einzelhaltung gesetzt und alle Tiere in den späteren Versuchsraum verbracht und an die neuen Haltungsbedingungen gewöhnt. Sobald sich die Verläufe von Futteraufnahme und Körpergewicht wieder stabilisiert hatten, wurde mit den Versuchen begonnen.

2.3 VERSUCHSREIHEN

Die Arbeit umfasst zwei Versuchsreihen. In ihnen wurde versucht, mit unterschiedlichen pharmakologischen Substanzen Einfluss auf die Entwicklung der Adipositas von MC4R-defizienten Mäusen und C57Bl/6J Mäusen zu nehmen.

2.4 VERSUCHSREIHE I : BEHANDLUNG MIT MSH-DERIVATEN

2.4.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen Versuchsreihe I

MSH-Behandlungen wurden an adulten C57Bl/6J Mäusen und heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen durchgeführt. Die C57Bl/6J Tiere wurden bei $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$, die adulten MC4R-Gruppen bei $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten. Alle Tiere erhielten ausschließlich Standard-Diät.

2.4.2 Behandlung Versuchsreihe I

Alle verwendeten MSH-Derivate stammen von BACHEM, Weil am Rhein. α -MSH ($M_w = 1664,9$ DA) und NDP-((Nle⁴,D-Phe⁷)- α -MSH, $M_w = 1646,87$ DA), β -MSH ($M_w = 2660,95$ DA) sowie der synthetische MSH-Agonist MTII (Acetyl-(Nle⁴, Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰)-cyclo- α -MSH (4-10)amide acetate salt, $M_w = 1024,2$ DA). NDP-, α -MSH und β -MSH wurden unter Verwendung von subkutan implantierten osmotischen Mini-Pumpen (Micro-Osmotic Pump, Model 1002, alzet®, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) in Verbindung mit intrazerebroventrikulären Kanülen (Brain Infusion Kit II, 3-5 mm, alzet®, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) in den lateralen Ventrikel injiziert. Die Dosierung für α -MSH betrug 0,2/0,4/1/4,2 oder 5,4 $\mu\text{g/h}$. NDP- α -MSH wurde in einer Dosis von 4,2 $\mu\text{g/h}$ verabreicht. Für die Vergleichsstudie wurde ein rekombinantes murines Leptin mit einem Molekulargewicht von 16 kDa verwendet (R&D Systems GmbH, Wiesbaden). Die Dosierung für Leptin betrug 42 ng/h. MTII wurde in einer Dosis von 4,2 $\mu\text{g/h}$ subkutan ausschließlich über osmotische Mini-Pumpen gegeben. Tierzahlen, Art und Dosierung der pharmakologischen Behandlung sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Stamm	N w/m	n (bei icv nur mit positiver Ventrikelfärbung)	Pharmakon	Applika-tion	Dosis/h	Abbildung
C57Bl/6J	18/0	α -MSH Kontrollen n = 6 n = 4	α -MSH	ICV	1 μg	Abb. 4/5 linke Seite
C57Bl/6J	15/0	α -MSH Kontrollen n = 4 n = 4 n = 3	α -MSH	ICV	4,2 μg 5,4 μg	Abb. 6
C57Bl/6J	15/0	NDP- α -MSH Kontrollen n = 4 n = 3	NDP- α -MSH	ICV	4,2 μg	Abb. 6
C57Bl/6J	10/0	Leptin Kontrollen n = 3 n = 5	Leptin	ICV	0,42 ng	Abb. 4/5 rechte Seite
C57Bl/6J	15/0	Leptin Kontrollen n = 3 n = 3	Leptin	ICV	0,42 ng	Abb. 6
C57Bl/6J	10/0	α -MSH Kontrollen n = 3 n = 4	α -MSH	ICV	0,2 μg	ad 3.1.1.1 Ohne Abb.
C57Bl/6J	10/0	α -MSH Kontrollen n = 3 n = 4	α -MSH	ICV	0,4 μg	ad 3.1.1.1 Ohne Abb.
C57Bl/6J	7/0	β -MSH Kontrollen n = 3 n = 4	β -MSH	ICV	0,3 μg	ad 3.1.1.1 Ohne Abb.
C57Bl/6J	16/0	MTII Kontrollen n = 8 n = 7	MTII	MOP	4,2 μg	Abb. 7
MC4R +/-	0/8	MTII Kontrollen n = 4 n = 4	MTII	MOP	4,2 μg	Abb. 8
MC4R +/-	0/4	MTII Kontrollen n = 2 n = 2	MTII	MOP	14,6 μg	Ad 3.1.1.3 Ohne Abb.

Tabelle 1: Übersicht für Untersuchungen, die mit MSH-Derivaten bzw mit Leptin. durchgeführt wurden, N = Anzahl der operierten Tiere, n = Anzahl der ausgewerteten Tiere mit korrektem Kanülensitz, (bei icv+MOP), w = Weibchen, m = Männchen, icv = intrazerebroventrikuläre Kanülierung + subkutane osmotische Mini-Pumpen; MOP = osmotische Mini-Pumpen, subkutan.

2.4.3 Versuchsprotokoll für Versuchsreihe I

In einem Vorversuch erwiesen sich C57Bl/6J Mäuse mit einem Alter von 13 Wochen als zu jung. Die Schädeldecke war noch sehr weich, so dass eine erhöhte Gefahr der Verletzung des gesamten Schädels durch die Druckausübung während der Bohrung bestand. Für die eigentlichen Versuchsreihen wurden deshalb Tiere im Alter zwischen 22-26 Wochen verwendet. Theoretische Grundlagen, Durchführung und Überprüfung der Implantation osmotischer Mini-Pumpen und icv. Kanülierung werden nachfolgend beschrieben:

Aufbau und Funktionsweise der Pumpen: Die Pumpen arbeiten über den Aufbau eines osmotischen Gradienten. In dem Mantel der Pumpe befindet sich eine konzentrierte Salzlösung. Die Außenwand der Pumpe ist semipermeabel und führt so zu einem Einstrom der Umgebungsflüssigkeit entlang des Gradienten. Diese Volumenzunahme erhöht den Innendruck, der dazu führt, dass das impermeable flexible Pumpenreservoir, in dem sich das Pharmakon befindet, zusammengedrückt wird und das Pharmakon über den Metallstift, den sogenannten Flow Moderator, ausströmt. Werden die Pumpen subkutan implantiert, erfolgt ein kontinuierlicher Ausstrom des Pharmakons in das umliegende Gewebe. Werden zusätzlich icv. Kanülen verwendet, wird das Pharmakon über einen mit dem Flow Moderator verbundenen Polyethylen-Schlauch (ID 0,86 mm, OD 1,27 mm) definierter Länge (2 cm) und die Kanüle in den lateralen Ventrikel geleitet (Abbildung 2).

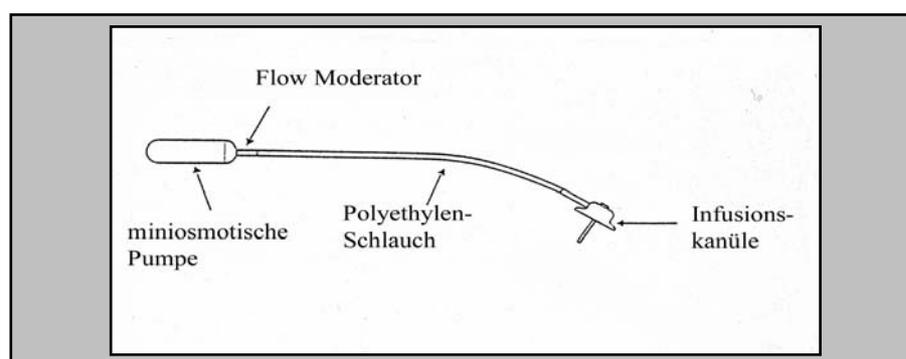


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Alzet® osmotischen Mini-Pumpe in Kombination mit Polyethylen-Schlauch und Kanüle zur intrazerebroventrikulären Verwendung.

Vorbereitung: Die osmotischen Mini-Pumpen wurden 12 Stunden vor Operationsbeginn mit dem Pharmakon befüllt und in steriler 0,9 % Kochsalzlösung (B. Braun, Melsungen) inkubiert. Die 12-stündige Inkubation bei Raumtemperatur wurde durchgeführt, damit die

Pumpen bei der Implantation bereits einen osmotischen Gradienten aufgebaut hatten und das Pharmakon im Tier direkt zu wirken began. Sollten die Pumpen in Kombination mit einer intrazerebroventrikulären Kanülierung eingesetzt werden, so wurde der Polyethylen-Schlauch auf den Flow Moderator der Pumpe und die Kanüle aufgesetzt und diese Kombination inkubiert.

Narkose: Für die Operation der intrazerebroventrikulären Kanülierung wurden die Tiere mit AVERTIN® narkotisiert. Zur Herstellung des Injektionsnarkotikum wurden 50 ml Aqua ad injectabilia (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) im Wasserbad auf 50°C erwärmt. 1g Tri-Bromoethanol (Sigma) wurde in 1 ml Tertamyl-Ethanol (Merck, Darmstadt) gelöst und zu den 50 ml Aqua ad injectabilia gegeben. Die Lösung wurde sofort aliquotiert (500 µl Aliquots) und tiefgekühlt (-20°C). Bei Bedarf wurde das Narkotikum direkt vor der Verwendung aufgetaut und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Die Injektion wurde intraperitoneal in den linken unteren Bauch-Quadranten der Tiere in einer Dosierung von 10-12 ml/kg Körpergewicht verabreicht. Wurden osmotisch wirksame Mini-Pumpen nur subkutan implantiert, erhielten die Tiere eine Inhalationsnarkose mit Halothan (Fluothane®, Zeneca GmbH, Planckstadt) und einem Sauerstoff-Lachgasgemisch im Verhältnis 3:7. Einleitend wurde das Gemisch in einer 2,8%-igen Konzentration zugeführt, zur Erhaltung wurde die Konzentration auf 0,8-1% gesenkt.

Die Narkosetiefe wurde jeweils anhand des Hinterbein-Rückzugreflexes überprüft. Der Ausfall des Reflexes zeigt eine ausreichende chirurgische Narkosetiefe an (Whelan & Flecknell 1992; Clowry & Flecknell 2000).

Zusätzlich zu der Allgemeinnarkose erfolgte eine Lokalanästhesie im Operationsbereich mit 1%-igem Xylocain (Astra Chemicals GmbH, Wedel). Um die Austrocknung der während der Narkose geöffneten Augen zu verhindern, wurde jedem Tier Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Hoffmann- La Roche AG, Grenzach Wyhlen) gegeben.

Operation: Zur Implantation der intrazerebroventrikulären Kanülierung wurden die Tiere nach Erreichen der Narkosetiefe im Kopf- und Rückenbereich geschoren und das Operationsfeld gereinigt und desinfiziert. Die Tiere wurden nach einer Methode von Hoorneman (1985) in einen Gipsabdruck verbracht und mit Leukoplast fixiert. Die Inzision erfolgte auf Höhe des Ohransatzes und verlief in der Medianen 1,5 cm nach kaudal. Ausgehend von dem Schnitt wurde mit Hilfe einer Metzenbaum-Schere durch Lösung des

Unterhautfettgewebes eine Wundhöhle im hinteren Nackenbereich geschaffen. Das Operationsfeld wurde nach kranial verlagert, so dass die Schädeldecke sichtbar wurde. Das Periost des Schädels wurde entfernt und die Schädeldecke zur besseren Haftung des Gewebeklebers mit Ethanol 70 % entfettet. Als Orientierungshilfen dienten Lambda und Bregma, die knöchernen Strukturen des Schädels.

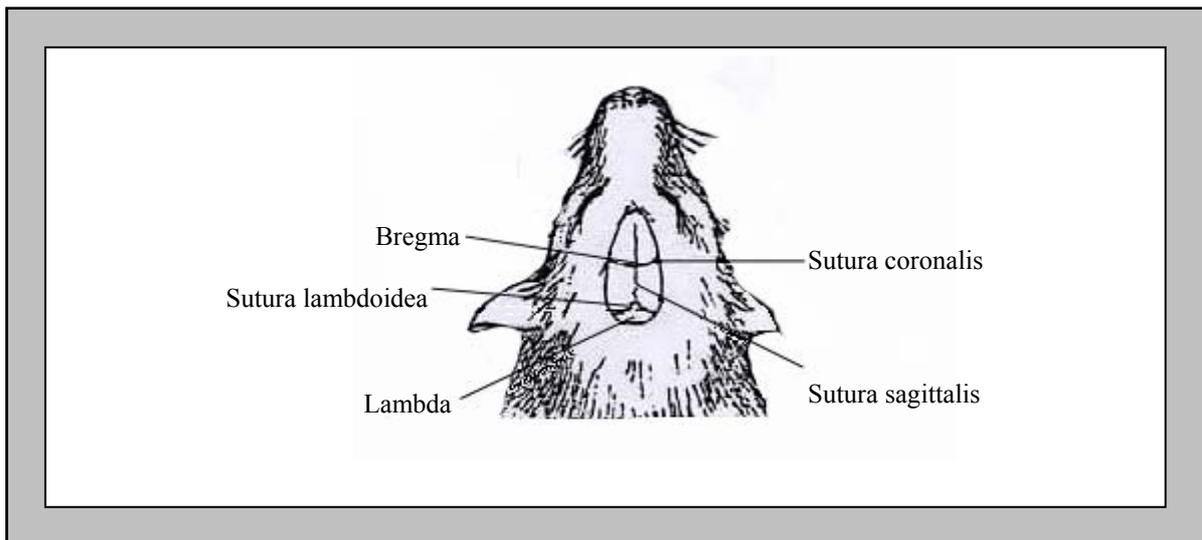


Abbildung 3: Darstellung der wichtigsten Knochenpunkte, die zur Orientierungshilfe bei icv-Operationen dienen.

Lambda ist die Schnittstelle der Sutura lambdoidea und der Sutura sagittalis. Bregma ist der Punkt an dem sich Sutura coronalis und Sutura sagittalis treffen. Das Bregma wird deutlicher, wenn man leichten Druck auf die Schädeldecke ausübt; es erscheint dann als weißlicher Fleck an der Schnittstelle der Knochennähte. Die Koordinaten für den Zugangspunkt zum lateralen Ventrikel sind, ausgehend vom Bregma als Nullpunkt, -1,2 mm lateral und 0,4 mm posterior (Franklin & Paxinos 1997). Hier erfolgte die Bohrung mit einem Handbohrer (Durchmesser 0,41 mm). Die Pumpe wurde in die bereits hergestellte Wundhöhle am Rücken eingeführt und in das vorgefertigte Loch die Kanüle mit einer Länge von 3 mm eingebracht und mit Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun AG und Co KG, Tuttlingen) fixiert. Die Wunde wurde mit U-Nähten mittels NC-Silk- Faden (Seda Trenzoda, schwarz, B. Braun Melsungen AG) verschlossen und die Wunde mit Tyrosur® (Engelhard Arzneimittel Ag und Co GK) antibiotisch versorgt. Eine postoperative Schmerztherapie erschien aufgrund des unauffälligen postoperativen Verhaltens der Tiere nicht notwendig.

Kontrolle: Sitz und Durchlässigkeit der Kanülen, sowie der Füllungszustand der Pumpen wurden am Versuchsende kontrolliert. Dies erfolgte unter den Bedingungen der terminalen CO₂-Narkose. Zuerst wurde überprüft, ob der Kanülenkopf sich gelockert hatte, war dies nicht der Fall wurde die Operations-Naht eröffnet, die osmotischen Mini-Pumpen entnommen und über die verbliebene Schlauch-Kanülen-Verbindung mittels einer Insulinspritze (Omnican®, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen) 20 µl Methylenblau-Lösung nach Löffler (E. Merck, Darmstadt) unter leichten Druck injiziert und die Tiere dekapitiert. Anschließend wurden die Gehirne mit einem Skalpell in feine Scheiben geschnitten. Tiere, die keinen korrekten Kanülensitz (keine bläuliche Verfärbung des lateralen Ventrikels) zeigten wurden in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt (N-Zahlen siehe Tabelle 1).

Um den Füllungszustand der Pumpen zu überprüfen wurde das Volumen der verbliebenen Flüssigkeit bestimmt und vom Ausgangsvolumen subtrahiert. Das Ergebnis im Verhältnis zu der Zeit, in der die Pumpe gelaufen ist, dient der Kontrolle der Pumprate. Kam es zu Abweichung in der Pumprate, wurden die entsprechenden Tiere nicht in die Auswertung miteinbezogen (N=2).

2.5 VERSUCHSREIHE II : BEHANDLUNGEN MIT LACHS-CALCITONIN (sCT)

2.5.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen Versuchreihe II

Versuchsreihe II wurde an adulten C57Bl/6J Mäusen und hetero- und homozygoten MC4R-defizienten adulten Tieren durchgeführt (Tabelle 2).

Stamm	Genotyp	N w/m	Alter d. Tiere bei		Haltungsbedingungen		
			Beginn/ Wochen	Ende/ Wochen	Diät	Temperatur	Dauer Behandlung
C57Bl/6J	Wildtyp	32/0	21	26	SD	kalt	Eintägig
C57Bl/6J	Wildtyp	8/0	18	23	SD	TN	Eintägig
C57Bl/6J	Wildtyp	8/0	29	23	SD+ZD	kalt	Eintägig
C57Bl/6J	Wildtyp	4/0	26,5	36,5	SD+ZD	TN	Mehrtägig/Puls
MC4R	+/-	0/4	35	40	SD	kalt	Eintägig
MC4R	+/-	2/6	14	22	SD	TN	Eintägig
MC4R	+/-	12/10	19	30,5	SD+ZD	TN	Eintägig
MC4R	-/-	4/6	19,5	27	SD+ZD	TN	Eintägig
MC4R	+/-	5/0	33	39	SD+ZD	TN	Mehrtägig

Tabelle 2: Übersicht für sCT Behandlungen adulter Tiere. N = Anzahl der mit sCT behandelten Tiere, w = Weibchen, m = Männchen, SD = Standard-Diät (Altromin 1320, Altromin, Lage), ZD = Zusatz-Diät, kalt: 22 ± 0,5°C, TN = Umgebungstemperatur knapp unter thermoneutralen Bereich, 30 ± 0,5°C.

Außerdem wurde bei heterozygoten, MC4R-defizienten Tieren mit Versuchen unmittelbar nach dem Absetzen begonnen. Die Tiere sind in Tabelle 3 dargestellt.

Stamm	Genotyp	N w/m	Alter d. Tiere bei		Haltungsbedingungen		
			Beginn/ Tagen	Ende/ Tagen	Diät	Temperatur	Dauer Behandlung
MC-4R	+/-	5/5	21	35	SD+ZD	TN	Mehrtägig
MC-4R	+/-	10/9	21	56	SD+ZD	TN	Mehrtägig/Puls
MC-4R	+/-	10/9	21	96	SD+ZD	TN	Mehrtägig/Puls

Tabelle 3: Übersicht für mehrtägige sCT-Behandlungen juveniler Tiere. N= Anzahl der mit sCT behandelten Tiere und Kontrollen, w = Weibchen, m = Männchen, SD = Standard-Diät (Altromin 1320, Altromin, Lage), ZD = Zusatz-Diät, TN= Umgebungstemperatur knapp unter dem thermoneutralen Bereich, $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Bei den Versuchen mit adulten Tieren wurde eine heterozygote Gruppe bei 22°C untersucht, alle weiteren Gruppen unterschiedlicher Genotypen wurden bei Temperaturen am unteren Ende der Thermoneutralzone gehalten. Für die erste hetero- und homozygote MC4R Gruppe wurde eine Temperatur von $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gewählt. Da die Tiere bereits ausgewachsen waren, als sie dieser Temperatur ausgesetzt wurden, gab es Adaptionsprobleme, so dass in weiteren Versuchen, bei denen adulte Tiere verwendet wurden, eine Temperatur von $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ vorgezogen wurde. Die Absetzer wurden bei einer Temperatur von $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten. Vorversuche mit einer Absetzer-Gruppe, die zwei unterschiedliche Zusatz-Diäten erhielt, ergaben methodische Probleme bei der Auswertung der einzelnen Diäten. Alle weiteren Absetzer-Gruppen erhielten deshalb nur Zugang zu einer Zusatz-Diät (selbst hergestellte weiße Schokolade, s. 2.6.1).

2.5.2 Behandlung Versuchsreihe II

Zunächst wurde sCT ($M_w = 3432 \text{ Da}$, $1 \text{ I.U.} = 0,167 \mu\text{g}$) von ratiopharm (Calcitonin-ratiopharm®50, pH-Wert = 4) verwendet. Wegen bei MC4R-defizienten Tieren auftretenden Hautirritationen wurde in späteren Versuchen sCT der Firma BACHEM (Calcitonin (salmon I), BACHEM, Weil am Rhein, pH-Wert = 7) eingesetzt. Die Stammlösung für das als Pulver gelieferte sCT wurde mit Aqua dest. angesetzt, die Verdünnung der zu verwendenden Dosis erfolgte mit 0,9 % Kochsalzlösung ungefähr eine Stunde vor Verabreichen der Injektion. Bis zur Verwendung wurde die Injektionslösung auf Eis gekühlt. Das sCT wurde in Dosen von 50, 250 und $500 \text{ pmol}\cdot\text{d}^{-1}$ verabreicht, die Kontrollen erhielten das gleiche Volumen an PBS bei Verwendung von sCT der Firma ratiopharm, bzw. isotonische Kochsalzlösung bei Verwendung von sCT der Firma BACHEM. Die

Injektionen wurden einmal täglich nach Aufnahme der Messwerte (Futteraufnahme und Körpermasse) kurz vor Beendigung der Lichtphase subkutan appliziert.

Im Falle einer Kombinationsbehandlung mit sCT und Leptin, wurde Leptin ($M_w = 16$ kDa) der Firma R&D Systems GmbH, Wiesbaden eingesetzt. Die Leptin-Dosis lag bei $100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ und wurde auf zwei Dosen verteilt verabreicht. Die erste subkutane Injektion erhielten die Tiere zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase, die zweite Injektion kurz vor deren Ende zeitlich gemeinsam mit dem sCT.

2.5.3 Versuchsprotokolle für Versuchsreihe II

Eintagesbehandlungen an adulten Tieren: Eintagesbehandlungen wurden innerhalb einer Versuchsgruppe mehrfach durchgeführt. Der Zeitraum zwischen den Injektionen wurde so gewählt, dass die Energieaufnahme der Tiere unbeeinflusst von der vorangegangenen Injektion war, und betrug mindestens drei Tage. Tierzahlen, Geschlecht, Alter der Tiere und Umgebungsbedingungen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Zehntagesbehandlungen an adulten Tieren: Zehntagesbehandlungen wurden in der Regel nur einmal durchgeführt, um im Anschluss die Körperzusammensetzung bestimmen zu können. Folgt zwei Zehntagesbehandlungen aufeinander lagen zwischen Ende der letzten und Beginn der neuen Behandlung mindestens zehn Tage.

Dauerbehandlung an heterozygoten MC4R-Absetzern: Eine Dauerbehandlung wurde von Lebenstag 21 bis Lebenstag 35 (sCT $N=5$, ko $N=5$) durchgeführt. Es wurde eine sCT-Dosis von $50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ eingesetzt.

Pulsbehandlung an adulten Tieren und heterozygoten MC4R-Absetzern: Abschließend wurde ein neues Behandlungsschema entwickelt; Ziel war es, durch eine Pulsbehandlung im Sinne einer Stoßtherapie mit sCT eine über einen längeren Zeitraum fortbestehende Wirkung zu erzielen. Untersucht wurden zunächst unterschiedliche Pulsmuster, in denen sich Tage mit Behandlung und behandlungsfreie Tage in unterschiedlichen Intervallen abwechselten. Die überwiegend eingesetzte sCT-Dosis betrug $50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$, bei den adulten C57Bl/6J Tieren wurde die Dosis vorübergehend auf $500 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$, bei einer der bis Tag 96 behandelten Stichproben vorübergehend auf $250 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ erhöht. Tierzahlen, Geschlecht, Alter der Tiere und Umgebungsbedingungen für die mit sCT behandelten

C57Bl/6J Tiere sind Tabelle 2, für die ab Lebenstag 21 mit sCT behandelten MC4R-defizienten Mäuse einschließlich der Behandlungsdauer sind Tabelle 3 zu entnehmen.

2.6 VORGEHENSWEISE BEI ALLEN VERSUCHEN

2.6.1 Herstellung und Zusammensetzung der verabreichten Diäten

Die Zusammensetzung der selbst hergestellten Schokoladenmasse leitete sich von der ebenfalls in einigen Versuchen eingesetzten handelsüblichen Kuvertüre ab. Bei der selbst gemachten weißen Schokolade wurde statt der Kakaobutter in der weißen Kuvertüre Kokosfett verwendet. In Anlehnung an die Zusammensetzung der Standard-Diät wurde im Lauf der Versuche der Proteinanteil auf 20% erhöht. Die Konsistenz der selbst hergestellten Schokolade war weicher als die der gekauften Kuvertüre. Um eine bessere Bindung der Bestandteile zu erreichen und diese auch bei höheren Temperaturen aufrecht zu erhalten, wurde als Emulgator Lecithin zugesetzt. Außerdem konnten die selbst hergestellten Diäten angefärbt werden, so dass Krümel in der Einstreu leichter zu erkennen waren. Die Zusammensetzung der einzelnen Futterkomponenten ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Diät	Zusammensetzung (Gewichts%)		Metabolisierbare Energie kJ/g
Altromin Haltungsfutter 1324	Protein	20	13,5
	N-freie Extraktstoffe	53	
	Fett	4	
	Rohfaser	6	
	Asche	7	
	Wasser	10	
Weiße Kuvertüre	Protein	5	23,5
	Kohlenhydrate	58	
	Fett	35	
	Wasser	2	
Weiße selbst hergestellte Schokolade I	Protein	9	23,2
	Kohlenhydrate	50	
	Fett	36	
	Wasser	5	
Weiße selbst hergestellte Schokolade II	Protein	20	23,2
	Kohlenhydrate	37	
	Fett	35,5	
	Wasser	5	
	Lecithin	2,5	

Tabelle 4: Zusammensetzung der Standard-Diät Altromin 1324 und der Zusatz-Diät laut Herstellerangaben bzw. eigener Rezeptur. Dargestellt ist der errechnete Näherungswert für die Gehalte an umsetzbarer Energie in kJ/g.

Für die Herstellung der Schokolade wurde erhitztes Palmin® (Union Deutsche Lebensmittelwerke, Hamburg) mit in Wasser gelösten Soja Lecithin Granulat (bioviel GmbH-Diät und Pharmaprodukte, Bad Pyrmont) und konzentriertem Proteinpulver (Novartis Nutrition GmbH, München) vermischt, die rote Lebensmittelfarbe (Cochenillerot E124, Wusitta, Erich Wutzig, Sitzendorf) zugefügt und diese Masse mit gesiebt Puderzucker (Südzucker AG, Mannheim/Ochsenfurt) vermengt.

Die Aufbewahrung der schokoladenähnlichen Masse erfolgte im Kühlschrank. Sie wurde maximal zehn Tage zur Verfütterung verwendet.

2.6.2 Bestimmung von Futteraufnahme und Körpermasse

Die Tiere wurden täglich, je nach Größe der Gruppe 1-1,5 h vor Beendigung der Lichtphase versorgt. Im Rahmen dieser Versorgung wurden Körpermasse und die tägliche Futteraufnahme bestimmt. Der zu bestimmende Futterwert errechnet sich aus der Differenz zwischen aktuell gewogenem Futterrest und eingewogenem Futter des Vortages. Nach der Bestimmung des Futterwerts wurde neues Futter eingewogen, wobei den Tieren immer so viel zu Verfügung gestellt wurde, dass sie ad libitum von der Diät aufnehmen konnten.

Die pelletierte Standard-Diät (Altromin 1320, Altromin, Lage) wurde in Futterhaltern angeboten, die in der Werkstatt des W.G. Kerckhoff-Instituts hergestellt wurden. Die Futterhalter sind so konstruiert, dass Verfälschungen des tatsächlichen Futterwerts durch Verluste des Futters vermindert werden. Mit Klemmen werden die Pellets auf einem Gitter befestigt, darunter befindet sich ein Gefäß, in dem die Krümel aufgefangen werden, so dass diese am folgenden Tag mitgewogen werden können. Erhielten die Tiere eine Zusatz-Diät in Form von Schokolade, wurde diese anfangs in mit doppelseitigem Klettband (tesa®, Beiersdorf) auf dem Käfigboden fixierten Aluminiumschalen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) im Käfig befestigt. In späteren Versuche befand sich auch die Zusatz-Diät in dafür von der Werkstatt des W.G. Kerckhoff-Instituts hergestellten Futterbehältern. Die Futterbehälter bestanden aus einem runden Kupferboden mit einem Durchmesser von zwei Zentimetern; um den Boden und senkrecht nach oben wurde ein offenes Kunststoffrohr mit ca. 2,5 cm Höhe angebracht. Eine seitliche halbovale Einbuchtung erlaubte den Tieren einfachen Zugang zu der Diät. So sollten Verluste durch Krümeln der Tiere auf ein Minimum beschränkt und bei Bedarf das Weichwerden der Schokolade über ein unter Metallplatten liegendes Kühlsystem verhindert werden. Die Futterwerte für die gleichzeitig verabreichten Diäten wurden einzeln bestimmt.

Unterschiede in der Aufnahme der Schokolade vor und nach Erhöhung des Proteinanteils wurden über separate vergleichende Fütterungsversuche ausgeschlossen (N=8, nicht dargestellt). Ebenso ergaben in getrennten Testgruppen durchgeführte Fütterungsversuche (nicht dargestellt) keine statistisch signifikanten Unterschiede der quantitativen Aufnahme der unterschiedlichen Schokoladensorten, so dass im nachfolgenden die Diäten nicht gesondert bezeichnet werden.

2.6.3 Einteilung der Tiere für die Versuche

Für die Gruppeneinteilung in mit einem Pharmakon behandelte Tiere und Kontrolltiere (im Weiteren als Kontrollen bezeichnet) wurde für jedes Tier der Mittelwert der Futteraufnahme und des Körpergewichts über maximal zehn Tage gebildet. Die Gruppen wurden so eingeteilt, dass sich der Mittelwert beider Gruppen für die Futteraufnahme und für das Körpergewicht annähernd entsprach. Bei Absetzern erfolgte die Gruppeneinteilung anhand der gemittelten Körpergewichtswerte, die fünf Tage vor Versuchsbeginn, während die Tiere noch bei der Mutter waren, gemessen wurden. Setzte die Behandlung der Jungtiere erst einige Tage nach dem Absetzen ein, so wurden zur Gruppeneinteilung auch die Mittelwerte der Futteraufnahme herangezogen. Bei wiederholten Behandlungen innerhalb einer Versuchsgruppe wurde versucht, die Tiere so einzuteilen, dass sie abwechselnd zur Behandlung mit dem Pharmakon und als Kontrolltiere verwendet wurden.

2.6.4 Sonstige Arbeiten während der Versuchsdurchführung

Neben der täglichen Erfassung der Werte wurden die Tiere außerdem auf ihren Gesundheitszustand hin überprüft, die Wasserflaschen gewechselt und die Käfige regelmäßig gereinigt. Gleichzeitig wurden Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit kontrolliert.

2.6.5 Auswertung von Energieaufnahme und Körpergewicht

2.6.5.1 Erfassung der Rohdaten

Rohdaten wurden bei Eintagesbehandlungen über einen Zeitraum von vier Tagen ausgewertet. Dieser Zeitraum umfasst zwei Vorlauftage, den Injektionstag und den Effekttag. Der Effekttag ist der Tag, der dem Injektionstag folgt und an dem die Reaktion der Tiere auf die pharmakologische Behandlung des Vortags zu erwarten ist. Um eine Vergleichbarkeit auch zwischen pharmakologisch unterschiedlichen Behandlungen zu ermöglichen wurde der Injektionstag in Anlehnung an vorhergehende Versuche (Versuche mit Leptin-Injektionen) nicht berücksichtigt, da die Leptin-Injektion am Morgen die

Energieaufnahme bei Erhebung der Messwerte schon beeinflusst haben könnte (Döring 2000; Eiden 2002). Die Rohdaten der Zehntagesbehandlungen wurden über fünf Vorlauftage und den Behandlungszeitraum erfasst. Für die mehrwöchige Pulsbehandlung der C57Bl/6J Tiere wurde ein Vorlauf von zehn Tagen berücksichtigt.

2.6.5.2 Weiterführende Berechnungen auf der Grundlage der Rohdaten

Aus den gemessenen Futterwerten (Standard- und Zusatz-Diät in g) wurde, bei Zugang zu Standard- und Zusatz-Diät, die Gesamtenergieaufnahme pro Tag und die über die Zeit summierte Energieaufnahme der einzelnen Diäten und der Gesamtenergie – nachfolgend als zeitsummierte Energieaufnahme bezeichnet – der Tiere errechnet. Die Berechnung erfolgte über den Vorlauf und den gesamten Behandlungszeitraum.

In der Regel wurde zur graphischen Darstellung des Behandlungseffekts die Abweichung der Werte jedes einzelnen behandelten Tieres zum Mittelwert der Kontrollen ermittelt (Versuchsreihe I 4, 6-8, Versuchsreihe II Abb. 9-17). Bei Zugang zu verschiedenen Diäten wurden die Werte in der umgerechneten Messgröße kJ wie in Abbildung 10-16 verwendet und dienten ansonsten als Grundlage für weitere Berechnungen. Der Mittelwert der Kontrollen entspricht in den Abbildungen der Null-Linie. Speziell für Abbildung 13 und 15 wurden die Differenzen zwischen den individuellen, im Zeitgang sich summierenden Energieaufnahmen und den entsprechenden mittleren Energieaufnahmen der Kontrolltiere bestimmt. Daraus wurde die zeitsummierte Abweichung der Energieaufnahme von den Kontrollen abgeleitet.

Für sCT-Eintagesbehandlungen wurde der Behandlungseffekt außerdem als Differenz der Energieaufnahme am Effekttag zu dem Mittel der Energieaufnahme der Vorlauftage bestimmt. Hierzu wurde zunächst für die vier Tage des Auswertungszeitraums die Abweichung der sCT behandelten Tiere vom Kontrollmittel berechnet. Die für die zwei Kontrolltage (Vorlauf) 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 Energieaufnahme infolge der Behandlung. Diese Auswertung liefert die Daten für die Abbildungen 9-11.

2.6.5.3 Statistische Datenauswertung

Statistische Vergleiche wurden, wenn möglich mit den Verfahren der Varianzanalyse durchgeführt oder die Daten wurden mittels t-Tests verglichen. Hierzu wurde das Programm Sigmastat (SPSS Corporation, USA) eingesetzt. Diese Verfahren waren jedoch nicht in jedem Fall verwendbar. Dies galt vor allem dann, wenn im Verlauf der Behandlung Phasen unterschiedlicher Responsivität auf das Pharmakon auftraten. Da hier auch meist die Voraussetzungen gleicher Varianz bzw. Normalverteilung nicht erfüllt waren, wurden zur statistischen Prüfung Rangtests (Sigmastat) verwendet. Außerdem wurde das Programm STATISTIKA (StatSoft, USA) für die Durchführung von Vorzeichentests herangezogen. Der jeweils angewendete Test ist in der Ergebnisdarstellung angegeben.

2.7 GENOTYP-BESTIMMUNG BEI MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Vor Versuchsbeginn musste in der Regel der Genotyp der MC4R-defizienten Mäuse mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)¹ bestimmt werden.

2.7.1 DNS-Gewinnung und Proben-Bearbeitung

Um den Genotyp der MC4R-defizienten Mäuse zu ermitteln, wurde den Nachkommen der Genträger bei der allgemeinen Kennzeichnung und Gesundheitskontrolle zwischen dem 4. und 5. Lebenstag ein ca. 0,5 cm langes Gewebestück der Schwanzspitze entnommen. Aus der gewonnenen Probe konnte die für die PCR benötigte Desoxyribonukleinsäure (DNS) extrahiert werden. Die Probe wurde über Nacht auf einem Schüttler bei 55°C unter Zugabe von Proteinase K und Puffer (Qiagen GmbH, Hilden) verdaut. Am nächsten Tag erfolgt die Aufarbeitung mit einem QIAmp DNS Mini Kit 250 (Qiagen GmbH, Hilden), der zur Isolierung und Reinigung der DNS eingesetzt wurde. Die DNS wurde mittels Ethanol absolut (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München) ausgefällt, mehreren Reinigungsschritten unterzogen und schließlich in einer Pufferlösung aufgefangen und in dieser Form in der PCR verwandt.

2.7.2 Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR ist es möglich Abschnitte der DNS zu vervielfältigen, vorausgesetzt dass zwei bekannte DNS Sequenzen sie begrenzen. Für die Amplifizierung muss die doppelsträngige DNS denaturiert werden und als Einzelstrang vorliegen (melting). An diesen Einzelstrang

¹Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von den Kolleginnen K. Weide und D. Fuchs übernommen

binden Primer, das sind Oligonukleotide, die sich als kurze einsträngige DNS-Moleküle komplementär an die definierte Stelle der DNS-Matrize heften und diese als Start- und Endpunkt begrenzen (annealing). Ausgehend von dem Primer verlängert eine DNS-Polymerase mit Hilfe von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) den entstehenden DNS-Strang (synthesis). Am Ende des Vorgangs liegt wieder eine doppelsträngige DNS vor. Denaturierung und Anlagerung erfolgen mehrfach zyklisch bei spezifischen Temperaturen in einem Thermocycler (PerkinElmer Biosystems, Weiterstadt, BRD). Die Denaturierung und Trennung der DNS in Einzelstränge erfolgte bei 94°C, die Hybridisierung der Primer-Oligonucleotide bei 64°C, während die Replikation bei 72°C durchgeführt wurde, jeder dieser Vorgänge dauerte 45 Sekunden. Der gesamte Zyklus wurde 40mal wiederholt. Der Reaktion wurden Puffer zur Stabilisierung des pH-Werts und MgCl₂ zugesetzt. MgCl₂ stimuliert die Aktivität der DNS-Polymerase und führt zu einer stärkeren Bindung zwischen Primer und Matrize. Die Mg²⁺-Ionen und dNTPs bilden eine lösliche Verbindung, was Voraussetzung für den Einbau der dNTPs in den neuen DNS-Strang ist.

Für die Genotypisierung der MC4R-defizienten-Tiere wurden 3 µl der gewonnenen DNS zu einem Master-Mix von 22 µl gegeben. Der Master-Mix setzt sich zusammen aus:

13,75	µl	H ₂ O (Millipore, steril)
2,5	µl	PCR-Puffer 10x
2	µl	MgCl ₂ (2 mM)
0,5	µl	dNTP-Mix (200µM/dNTP)
1	µl	MC4 F3 Primer (4 µM)
1	µl	MC4 R1 Primer (4 µM)
1	µl	pGK R3 Primer (4 µM)
0,25	µl	Taq-Polymerase

Die Primer wurden in großer Menge zugesetzt, so dass eine Hybridisierung der Primer an den DNS-Strang gegenüber der Rehybridisierung der aufgespaltenen Einzelstränge unterstützt wird. Die Primer MC4F3 und MC4R1 bilden Start- und Endpunkt der zu codierenden Sequenz des MC4R-defizienten Wildtyps. Die Primer MC4F3 und pGKR3 sind spezifisch für das Neo-Gen. Das Neo-Gen steht unter Kontrolle des Phosphoglycerinkinase1 (pGK1)-Promotors und ist bei Knockout-Mäusen gegen die zerstörte MC4R Sequenz ausgetauscht. Die Sequenzen der Primer lauten wie folgt:

MC4 F3 (forward) Primer: 5'-GGA AGA TGA ACT CCA CCC ACC- 3'

MC4 R1 (reverse) Primer: 5'-GAC GAT GGT TTC CGA CCC ATT- 3'

PGK R3 Primer: 5'-TTC CCA GCC TCT GAG CCC AGA- 3'

2.7.3 Elektrophorese

Die amplifizierte DNS wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen. Diese Methode trennt die Nukleinsäuren mittels ihrer unterschiedlichen Mobilität in einem elektrischen Feld anhand ihrer Länge auf. Die Amplifikate wurden mit 1,2 µl Farbpuffer versetzt. Je 10 µl einer Probe und 1,5 µl Marker (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot), der mit 10 µl TBE 0,5x Puffer und dem Farbstoff gemischt wurde, sind auf ein 1,5%iges Agarose-Gel (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen worden. Zur Trennung der Amplifikate wurde eine Spannung 150 V angelegt. Eine 15-minütige Färbung des Gels in fluoreszierendem Ethidiumbromid (5 µl Ethidiumbromid 10% (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in 120 ml TBE 0,5x Puffer) macht die Amplifikate unter 366 nm UV-Licht auf dem Transilluminator sichtbar. Zur Identifizierung der einzelnen Genotypen vergleicht man die Länge der unterschiedlichen DNS-Fragmente. +/+ Mäusen zeigen eine Bande mit 313 bp, -/- Tiere eine 405 bp-Bande und heterozygote MC4R-defiziente Mäuse weisen beide DNS-Banden auf.

2.8 VORGEHEN NACH BEENDIGUNG DER VERSUCHE

Im Anschluss an Behandlungen, die vermuten ließen, dass ein Einfluss auf die Körperzusammensetzung der Tiere erzielt worden war, wurde diese ermittelt.

2.8.1 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte drei Stunden vor Ende der Lichtphase, eine weitere Stunde vorher wurde den Tieren, möglichst ohne diese zu stören, das Futter entzogen. Ziel war es die Tiere nüchtern und innerhalb ihrer Ruhephase zu töten, um möglichst unverfälschte Werte für die weiterführenden Untersuchungen zu erhalten. Die Tiere wurden vor der Dekapitierung ungefähr 30 Sekunden mit CO₂ betäubt. Blut und Gehirne, wurden, soweit die Gehirne nicht für die Anfärbung mit der Methylenblau-Lösung nach Löffler (E. Merck, Darmstadt) in Versuchsreihe I benötigt wurden, für Untersuchungen im Rahmen anderer Arbeiten entnommen.

2.8.2 Probengewinnung für weiterführende Untersuchungen

Die Präparation der Gehirne erfolgte mit einer spitzen kleinen Schere ausgehend vom Foramen magnum. Die Schädeldecke wurde beidseitig nach rostral eröffnet, Quetschungen und Einschnitte der Gehirne sollten durch vorsichtiges Arbeiten vermieden werden. Die Schädeldecke wurde abgehoben und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels vorsichtig, ohne es zu verletzen, aus dem Schädel gelöst. Nach möglichst rostraler Durchtrennung der Nervi

optici (rostral des Chiasma opticum) und der Loslösung der Nervi trigemini, sowie des Hirnstamms konnte das Gehirn mit dem Kortex nach unten auf einem Objektträger gelegt werden. Um die Orientierung für spätere Untersuchungen zu erleichtern, wurden die Gehirne symmetrisch und anatomisch korrekt ausgerichtet und für 10 Minuten auf Trockeneis durchgefroren und dann mit einem Skalpell in dünne Scheiben geschnitten. Wurden die Gehirne nicht für den Nachweis mit Methylenblau verwendet, wurden sie nach Durchfrieren in Parafilm und Alufolie eingewickelt, und so gegen Austrocknung geschützt bei - 80°C bis auf weiteres gelagert.

2.8.3 Ermittlung der Körperzusammensetzung

Die verbleibenden Tierkörper wurden ausgehend vom After kranial bis zum Hals eröffnet. Zwei Entlastungsschnitte entlang der Rippenbögen ermöglichen eine weite Öffnung des Tierkörpers, um besonders bei stark adipösen Tieren eine gute Trocknung zu gewährleisten. Der Magen-Darm-Trakt wurde zur Vermeidung von Verfälschung der Ergebnisse durch Kot- und Futterrest entfernt. Die Präparation erfolgte stumpf ausgehend vom Mastdarm entlang des Darms über die große Krümmung des Magens unter Loslösung der Milz bis zum Ösophagus nach kranial. Die genannten Anteile, das Ligamentum hepatogastricum und das Gekröse wurden durchtrennt und der Magen-Darm-Trakt verworfen. Bei stark adipösen Tieren wurden die Fettanteile des inguinalen Fetts, Nierenfetts und Unterhautdepots an den Beinen und im Schulterbereich in eine gesonderte Aluschale gelegt, da die Trocknung der Tiere sich sonst verlangsamt und unvollständig eintritt. Die Bestimmung der Feuchtmasse, unter Berücksichtigung der gewonnenen Blutmenge, erfolgte durch Wiegen des Restkörpers. Für das weitere standardisierte Verfahren (Markewicz *et al.* 1993; Olbort 1998) werden die Tiere in einem Trockenschrank (Memmert, Schwalbach) bei 75°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dem Körperwasser entspricht die Differenz zwischen Feucht- und Trockenmasse. Die getrockneten Überreste werden in ein fettfreies Filterpapier gewickelt und zerkleinert. Im Soxhlet-Apparat (VWR International GmbH, Darmstadt) erfolgt eine 24-stündige Fettextraktion mittels Chloroform (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München). Das fettfreie Filterpapier wird nach der vollständigen Entfettung entfernt und die Überreste nochmals getrocknet. Der stabile gewogene Endwert stellt die fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat free dry mass) dar. Der Differenz zwischen FFDM und Trockenmasse entspricht die Körperfettmasse und, bezogen auf die Feuchtmasse, der prozentuale Fettgehalt.

3 Ergebnisse

3.1 VERSUCHSREIHE I: BEHANDLUNG MIT MSH-DERIVATEN UND LEPTIN

3.1.1 Vergleich von α -MSH- und Leptin-Behandlungen bei adulten C57Bl/6J Tieren auf Standard-Diät

Die Differenzen in der täglichen Aufnahme der Standard-Diät und in der Entwicklung der Körpermasse zwischen mit α -MSH bzw. mit Leptin behandelten C57Bl/6J Mäusen und ihren jeweiligen Kontrollen werden in Abbildung 4 gezeigt.

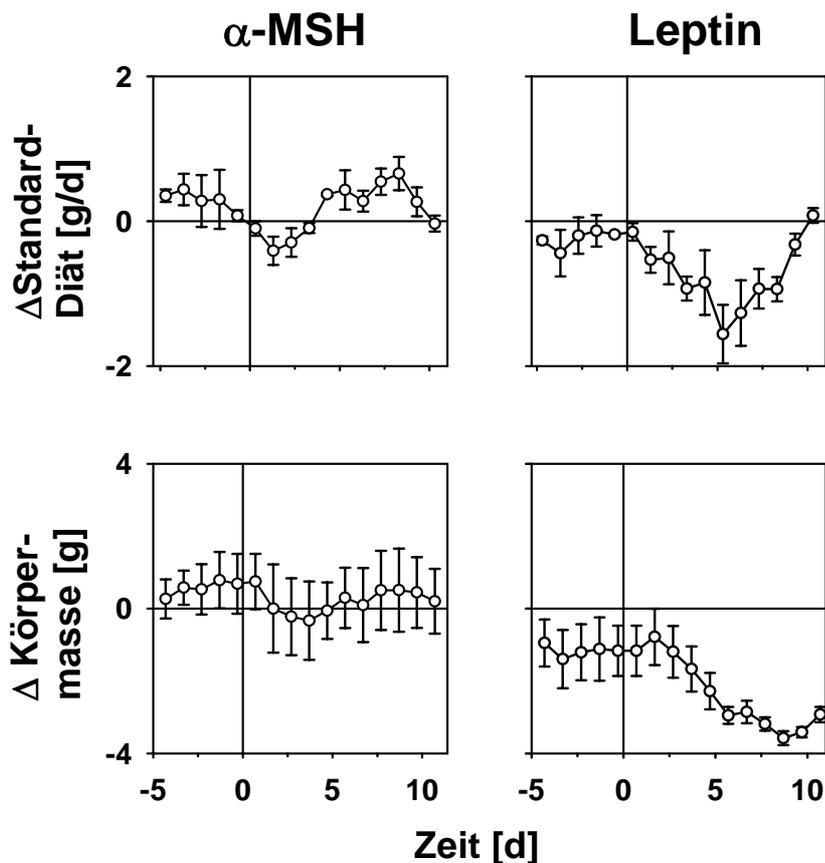


Abbildung 4: Abweichung der Futteraufnahme und Körpermasse von mit α -MSH (linke Seite) und mit Leptin (rechte Seite) behandelten C57Bl/6J Mäusen vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie) während des fünftägigen Vorlaufs und der zehntägigen Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) von mit α -MSH behandelten Tieren ($N=6$; Kontrollen: $N=4$) bzw. mit Leptin behandelten Tieren ($N=3$; Kontrollen: $N=5$). Am Tag 0 wurden die ICV-Kanülen und osmotischen Mini-Pumpen implantiert. α -MSH-Dosis: $1 \mu\text{g/h}$, Leptin-Dosis: 42 ng/h . Standard-Diät, Umgebungstemperatur $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Die Tiere erhielten über eine icv. Kanüle in Verbindung mit einer osmotischen Mini-Pumpe kontinuierlich α -MSH ($1 \mu\text{g/h}$) bzw. Leptin (42 ng/h). Da aber nur Tiere mit positiver Methylenblaufärbung des Ventrikels in die Auswertung einfließen, ließen sich bereits im Vorlauf und infolgedessen auch während der Behandlungsperiode Differenzen zwischen den Gruppen behandelter und Kontrolltiere nicht vermeiden, trotz ausgeglichener Einteilung der Gruppen vor Versuchsbeginn. Bei den mit α -MSH behandelten Tieren

kommt es im Vergleich zu den Kontrollen zu einer kurzfristigen Verminderung der Energieaufnahme in den ersten drei Tagen nach Behandlungsbeginn, die sich in einer temporären leichten Abnahme der Körpermasse bei großer Streuung widerspiegelt. Energieaufnahme und Körpermasse steigen ab dem vierten Tag nach Behandlungsbeginn wieder auf den Ausgangswert. Die mit Leptin behandelten Tiere zeigen dagegen im Vergleich zu den Kontrollen ein mehrtägiges Absinken der Energieaufnahme und einen deutlich ausgeprägten Abfall der Körpermasse mit Stabilisierung auf einem niedrigeren Niveau.

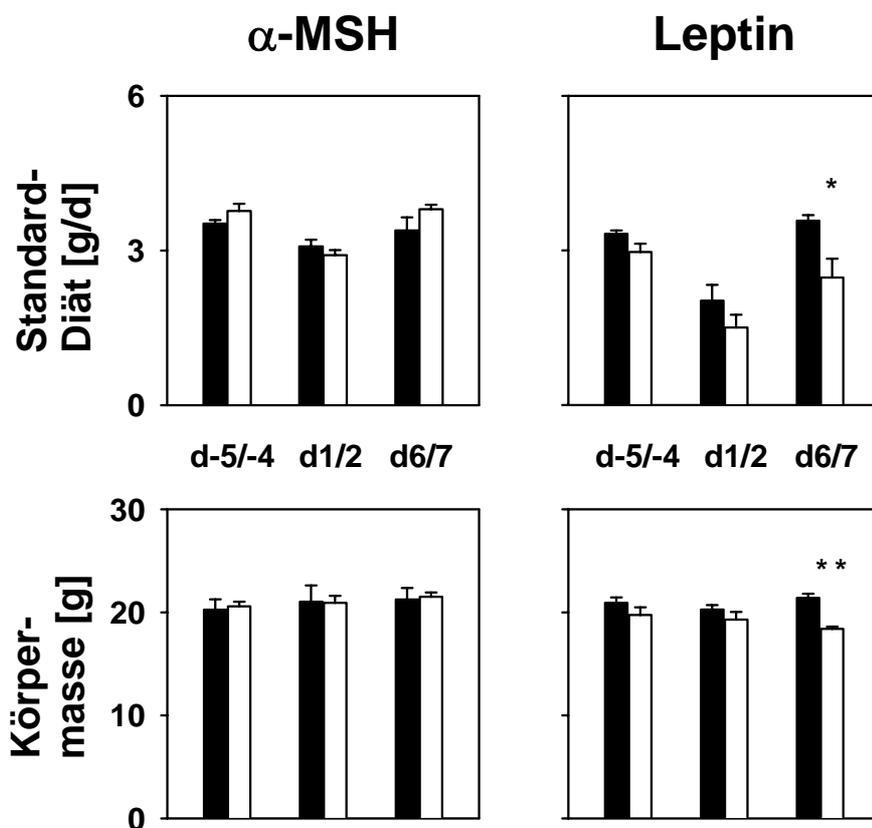


Abbildung 5: Absolutwerte der Futteraufnahme und Körpermasse der Versuchsgruppen aus Abbildung 4. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) von mit α -MSH (links) und mit Leptin (rechts) behandelten Tieren (weiss) und Kontrollen (schwarz). Angegeben sind die Mittelwerte von d-5/-4 des Vorlaufs, d1/2 und d6/7 der Behandlung. ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$.

Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Energieaufnahme und Körpermasse über die ersten beiden Vorlaufstage (d-5/-4), Tag 1-2 der Behandlung (d1/2) und Tag 6-7 (d6/7) der Behandlung herangezogen (Abbildung 5). Dabei ergab ein t-Test für unverbundene Stichproben für die mit Leptin behandelten Tiere, nicht aber für die mit α -MSH behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen einen statistisch signifikanten Behandlungseffekt (rechte bzw. linke Seite Abbildung 5).

Ein t-Test für paarweise Vergleiche über die Absolutwerte für Energieaufnahme und Körpermasse ergibt sowohl bei den mit Leptin als auch bei den mit α -MSH behandelten Tieren wie bei den Kontrollen ein signifikantes ($P \leq 0,001$) Absinken der Futteraufnahme im Vergleich zu den ersten beiden Vorlauftagen. Da der gleiche Effekt auch bei den Kontrolltieren auftritt, ist diese Reaktion auf einen unspezifischen Operationseffekt im Zusammenhang mit der Pumpen- und der Kanülenimplantation zurückzuführen.

Die Datenanalyse der mit α -MSH behandelten Tiere ergibt im Vergleich zu den Kontrollen folgende Befunde. Die Energieaufnahme in der Mitte der Behandlung (Mittelwert Tag 6/7) und im Vorlauf (Mittelwert Tag -5/-4 des Vorlaufs), unterscheiden sich nicht, zwar liegt die Energieaufnahme der mit α -MSH behandelten Tiere vor Behandlungsbeginn leicht über der Energieaufnahme der Kontrollen und sinkt an den ersten beiden Behandlungstagen etwas unter den Wert der Kontrollen, statistisch ist dieser Unterschied jedoch weder im t-Test für unverbundene Stichproben noch bei Varianzanalyse mit Messwiederholung signifikant. Die Auswertung der zeitsummierten Energieaufnahme mittels t-Tests für unverbundene Stichproben zeigt sowohl im fünftägigen Vorlauf wie auch während der zehntägigen Behandlung keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und mit α -MSH behandelten Tieren (Tabelle 5). Auch die ermittelten Werte für die Abweichung der zeitsummierten Energieaufnahme, die für jedes Tier zum eigenen Vorlauf korrigiert und in Beziehung zum Mittelwert der Kontrollen gesetzt wurden, zeigten kein signifikantes Ergebnis (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Behandlung, Versuchsgruppe).

				Zeitsummierte Energieaufnahme kJ MW \pm SEM			
Pharmakon	Dosis/h	Zeitraum	Pharmakon behandelt	Kontrollen	P	Abbildung	
α -MSH	1 μ g	Vorlauf	160 \pm 7,6	146 \pm 5,1	n.s.	Abb. 4	
		Behandlung	261 \pm 4,3	261 \pm 4,3	n.s.	Links	
Leptin	0,42 ng	Vorlauf	124 \pm 5,6	135 \pm 3,1	n.s.	Abb. 4	
		Behandlung	165 \pm 6,0	221 \pm 9,9	**	Rechts	
α -MSH	4,2 μ g	Vorlauf	146 \pm 2,1	142 \pm 5,3	n.s.	Abb. 6	
	5,4 μ g	Behandlung	219 \pm 6,9	206 \pm 4,1	n.s.		
NDP- α -MSH	4,2 μ g	Vorlauf	/	/	/	Abb. 6	
		Behandlung	261 \pm 9,2	242 \pm 4,5	n.s.		
Leptin	0,42 ng	Vorlauf	161 \pm 15,4	149 \pm 7,9	n.s.	Abb. 6	
		Behandlung	212 \pm 17,0	252 \pm 4,4	+		

Tabelle 5: Zeitsummierte Energieaufnahme bei mit α -MSH (4,2 bis 5,4 μ g/h N=4) bzw. NDP- α -MSH (4,2 μ g/h, N=4) und Leptin (42 ng/h, N=3) behandelten C57Bl/6J Mäusen und den Kontrollen (N=3). P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorische Varianzanalyse, + $P \leq 0,1$, ** $P \leq 0,01$, n.s.= nicht signifikant.

Die Ermittlung der Körperzusammensetzung bestätigt, dass die Behandlung keinen Einfluss auf den Körperfettgehalt hat (einfaktorielle Varianzanalyse, Tabelle 6).

Parameter der Körperzusammensetzung	α -MSH	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	18,0	0,3	18,0	1,0	n.s.
Fett [g]	1,7	0,2	1,6	0,1	n.s.
Fett %	9,7	0,9	8,9	0,4	n.s.
FFDM [g]	4,3	0,03	4,3	0,2	n.s.

Tabelle 6: Finale Körperzusammensetzung von mit α -MSH (1 μ g/h, N=6) behandelten C57Bl/6J Mäusen und Kontrollen (N=4). P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorielle Varianzanalyse n.s. = nicht signifikant.

Die Datenanalyse der mit Leptin behandelten Tiere ergibt im Vergleich zu den Kontrollen die folgenden Befunde. Mit einem t-Test für unverbundene Stichproben lassen sich hier signifikante Unterschiede am Tag 6-7 der Behandlung im Vergleich zu den ersten beiden Vorlauftagen in der Energieaufnahme und deutlich stärker bei der Körpermasse zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrollen nachweisen. Die mit Leptin behandelten Tiere nehmen zu diesem Zeitpunkt der Behandlung signifikant weniger (-1 g, $P \leq 0,05$) Energie auf und wiegen im Mittel signifikant weniger (-3 g, $P \leq 0,01$) als die Kontrollen. Die zeitsummierte Energieaufnahme, mit einem t-Test für unverbundene Stichproben ausgewertet, ergibt im fünftägigen Vorlauf keinen Unterschied für mit Leptin behandelte Tiere und Kontrollen. Während der zehntägigen Behandlung nehmen die mit Leptin behandelten Tieren knapp 60 kJ signifikant weniger ($P \leq 0,01$) zu sich als die Kontrollen (Tabelle 5). Eine einfaktorielle Varianzanalyse über die korrigierten Werte (für Vorlauf und als Differenz zum Mittelwert der Kontrollen) ergibt keine signifikant niedrigere Energieaufnahme. Untersucht man jedoch die für den Vorlauf korrigierten Differenzen der zeitsummierten Energieaufnahme für alle mit Leptin behandelten Tiere (s. 3.1.2) und deren jeweiligen Kontrollen (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktor: Behandlung und Versuchsgruppe) so ist die zeitsummierte Energieaufnahme der mit Leptin behandelten Tiere signifikant niedriger (-43 kJ, $P \leq 0,01$). Die mit Leptin behandelten Tiere der ersten Leptinserie haben am Versuchsende nicht nur eine signifikant geringere Feuchtmasse, auch Fettmasse und -gehalt sind nur nahezu halb so groß wie bei den Kontrollen. Die Trockenmasse der mit Leptin behandelten Tiere ist dagegen weniger als 10 % niedriger als die der Kontrollen. (Tabelle 7). Die Effektivität der Applikation von Leptin mit der auch für α -MSH angewendeten Methode belegt, dass die fehlende Wirksamkeit von α -MSH nicht auf Fehler in der icv-Applikation zurückzuführen ist.

Parameter der Körperzusammensetzung	Leptin	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	16,3	0,4	18,0	0,4	*
Fett [g]	0,9	0,1	1,8	0,1	***
Fett %	5,4	0,5	9,9	0,7	***
FFDM [g]	4,0	0,1	4,3	0,1	+

Tabelle 7: Finale Körperzusammensetzung von mit Leptin (42 ng/h, N=3) behandelten C57Bl/6J Mäusen und ihren Kontrollen (N=5). P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorische Varianzanalyse, +P≤0,1, *P≤0,05, ***P≤0,001.

3.1.1.1 Wirkungen einer erhöhten α -MSH Dosis und von MSH-Derivaten bei adulten C57Bl/6J Tieren im Vergleich zu Leptin.

Aufgrund der nicht nachweisbaren Wirksamkeit von α -MSH in der vorangehend dargestellten Untersuchungsreihe wurde versucht, ob durch eine Erhöhung der α -MSH Dosis bzw. durch die Verwendung von NDP- α -MSH (2. Pumpenbefüllung) ein Effekt erzielt werden kann. Wieder diente eine Leptin-Behandlung zum Vergleich. Das α -MSH Analogon wurde 12 Tage nach Beginn einer α -MSH-Behandlung mittels einer zweiten Pumpenfüllung appliziert, wie in Abbildung 6 gezeigt. Von den zehn auswertbaren Tieren dieser Gruppe waren je drei Tiere Kontrollen bzw. mit Leptin behandelt (42 ng/h). Von den restlichen vier Tieren wurden zu Beginn der Behandlung zwei Tiere mit einer α -MSH Dosierung von 4,2 μ g/h und zwei Tiere mit einer α -MSH Dosierung von 5,4 μ g/h behandelt. Um die Übersichtlichkeit der Abbildung zu erhalten, wurden beispielhaft für die α -MSH-Behandlung vor dem Pumpenwechsel nur die Differenzen für die Tiere mit der höheren Dosierung (5,4 μ g/h) dargestellt. Da sich, abgesehen von dem unspezifischen Operationseffekt (getestet mit t-Test für paarweise Vergleich) wiederum kein Einfluss auf die Differenzen (getestet mit t-Test für unverbundene Stichproben) der Energieaufnahme und der Körpermasse der mit α -MSH behandelten Tiere bei beiden Dosierungen und Kontrollen zeigte, wurden bei allen mit α -MSH behandelten Tieren (N=4) die Pumpen ausgetauscht. Zur besseren Vergleichbarkeit, finden sich die Differenzen des entsprechenden Vorlaufs für die später mit NDP- α -MSH behandelten Tiere (N=4) ebenfalls in der Abbildung. NDP- α -MSH ist ein synthetisch hergestelltes MSH-Derivat. Auch für dieses Analogon, das aufgrund von *in vivo* Untersuchungen über die Pigmentierung der Froschhaut und *in vitro* Untersuchungen anhand von Melanozyten über die enzymatische Stabilität und Aktivität als 26fach stärker wirksam klassifiziert wurde (Sawyer *et al.* 1980; Hadley *et al.* 1981), war mit dem t-Test für unverbundene Stichproben kein Einfluss auf die Körpermasse nachweisbar. Die vorübergehende Abnahme während der NDP- α -MSH-

Behandlung ist deutlich geringer als bei der Leptin-Behandlung, und die Differenzen zu den Kontrollen unterscheiden sich nach drei Tagen bereits nicht mehr von den Anfangsdifferenzen. Der Mittelwert der Energieaufnahme von Tag 6-7 liegt bei den mit NDP- α -MSH behandelten Tiere zwar signifikant höher als bei den Kontrollen (+0,6 g, $P \leq 0,05$). Der Vergleich mit der Energieaufnahme der mit NDP- α -MSH behandelten Tiere im Vorlauf (erste zwei Tage) zeigt jedoch, dass sich die Energieaufnahme nicht verändert hat. Die Auswertung (t-Test für unverbundene Stichproben) für die zeitsummierte Energieaufnahme unter den unterschiedlichen Behandlungen ist in Tabelle 5 gezeigt. Weder im fünf-tägigen Vorlauf noch in der zehntägigen Behandlung ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Tieren, die mit MSH-Derivaten behandelt wurden, und den Kontrollen. Auch nach Korrektur der Werte zum Vorlauf des jeweiligen Einzeltiers und Bildung der Differenz zum Mittelwert der Kontrollen ergeben sich keine signifikanten Ergebnisse.

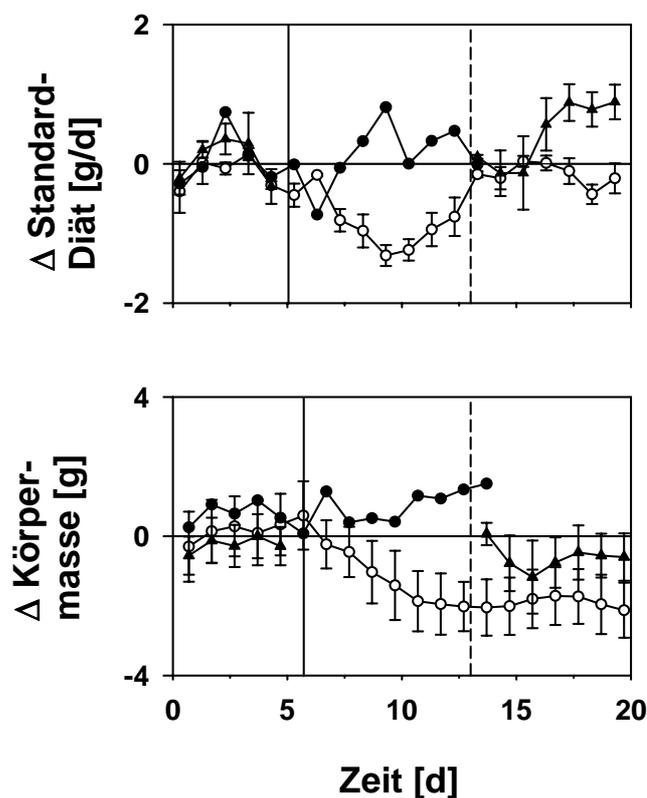


Abbildung 6: Abweichung der Futteraufnahme und Körpermasse von mit Leptin, α -MSH bzw. NDP- α -MSH behandelten C57Bl/6J Mäusen vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, $N=3$). Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) der beiden mit der höheren α -MSH-Dosis (5,4 $\mu\text{g/h}$) behandelten Tiere (-●-) und aller nach Pumpenwechsel mit NDP- α -MSH (4,2 $\mu\text{g/h}$) behandelten Tiere (-▲-, $N=4$). Um die Übersichtlichkeit zu erhalten ist der Mittelwert der beiden Tiere, die mit einer niedrigeren α -MSH-Dosis (4,2 $\mu\text{g/h}$) behandelt wurden, nicht abgebildet. Zum Vergleich wurden Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum mit Leptin (42 ng/h) behandelt (-□-, $N=3$). Am Tag 0 wurden die icv-Kanülen und osmotischen Mini-Pumpen implantiert, Tag 13 markiert den Pumpenwechsel bei Tieren, die nach der α -MSH Behandlung NDP- α -MSH erhielten. Umgebungstemperatur $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$, Standard-Diät.

Die in der gleichen Versuchsgruppe mit Leptin behandelten Tiere nehmen signifikant weniger Nahrung (- 0,9 g, $P \leq 0,05$) zu sich als die Kontrollen. Der Unterschied der zeitsummierten Futteraufnahme, die sich im fünftägigen Vorlauf bei mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrollen nicht unterscheidet, verfehlt während der Behandlung bei den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrollen das Signifikanzniveau nur knapp (Ergebnisse t-Test für unverbundene Stichproben in Tabelle 5). Korrigiert man die Werte für jedes Tier zum eigenen Vorlauf und setzt es in Beziehung zum Mittelwert der Kontrollen, zeigt sich, dass der Unterschied zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrollen am Ende der Behandlung signifikant ist (einfaktorielle Varianzanalyse, -41 kJ, $P \leq 0,01$). Für die Änderung der Körpermasse unter der Behandlung im Vergleich zur Vorperiode, ergibt sich für die mit Leptin behandelten Tiere im Mittel eine Abnahme von 0,8 g, während die Kontrollen um 2 g zunehmen. Die Differenz erreicht jedoch aufgrund der geringen Größe dieser Versuchsgruppe und der hohen Streuung nicht das Signifikanzniveau.

Eine für die Körperzusammensetzung durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse belegt, dass zwischen Kontrollen und den mit α -MSH/NDP- α -MSH behandelten Tiere kein Unterschied festzustellen ist, während die mit Leptin behandelten Tiere entsprechend der ersten mit Leptin behandelten Versuchsgruppe signifikant weniger Fettmasse und -gehalt aufweisen (Tabelle 8).

Parameter der Körperzusammensetzung	NDP- α -MSH	SEM	Kontrollen	SEM	P	Leptin	SEM	P
Feuchtmasse [g]	18,3	0,6	18,8	0,4	n.s.	15,3	0,7	**
Fett [g]	2,3	0,3	2,3	0,3	n.s.	0,5	0,2	**
Fett %	12,3	1,6	12,2	1,4	n.s.	3,0	0,9	**
FFDM [g]	4,4	0,1	4,4	0,1	n.s.	4,0	0,2	n.s.

*Tabelle 8: Finale Körperzusammensetzung gemeinsam untersuchter C57Bl/6J Mäuse nach vorhergehende α -MSH Behandlung und anschließender NDP- α -MSH Behandlung und zum Vergleich mit Leptin behandelte C57Bl/6J Mäuse und die Kontrollen aus Abbildung 6. P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorielle Varianzanalyse ** $P \leq 0,01$, n.s.= nicht signifikant .*

Zuvor durchgeführte zehntägige ICV Behandlungen an C57Bl/6J Mäusen unter Standardbedingungen mit α -MSH (Dosierungen: 0,2 $\mu\text{g/h}$ N=3, 0,4 $\mu\text{g/h}$ N=3; Kontrollen N=4) waren genauso ergebnislos, wie Versuche, die mit β -MSH (Dosierung: 0,3 $\mu\text{g/h}$ N=3; Kontrollen N=4) durchgeführt wurden (ohne Abbildungen). Es konnte in keinem der Versuche ein signifikanter Unterschied der Energieaufnahme oder Körpermasse zwischen mit MSH behandelten Tieren und Kontrollen nachgewiesen werden.

3.1.1.2 Behandlung adulter C57Bl/6J Mäuse mit dem MSH-Derivat MTII

Da im Gegensatz zu α -MSH für das synthetische MSH-Derivat MTII sowohl bei zentraler wie bei peripherer Kurz- wie Langzeitbehandlung eine Reduktion der Energieaufnahme und der Körpermasse nicht nur bei Ratten sondern auch bei Mäusen beschrieben ist (Pierroz *et al.* 2002), wurde versucht, diese Befunde bei C57Bl/6J Tieren mit systemischer Applikation des Analogons zu reproduzieren. In Abbildung 7 sind die Differenzen der Energieaufnahme und der Körpermasse der mit MTII behandelten Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen gezeigt. Nach der Operation ist ein markanter Einbruch in der Energie und der Körpermasse der mit MTII behandelten Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen zu sehen. Der Einfluss eines unspezifischen Operationseffekts ist hier deutlich geringer einzustufen als bei den icv behandelten Tiere, da es sich hier um eine einfache Operationsmethode handelt, bei der unter Inhalationsnarkose innerhalb weniger Minuten eine osmotisch wirksame Mini-Pumpe subkutan implantiert wurde, während bei icv-OPs eine Injektionsnarkose mit deutlich längerer Aufwach- und Erholungsphase verwendet wurde.

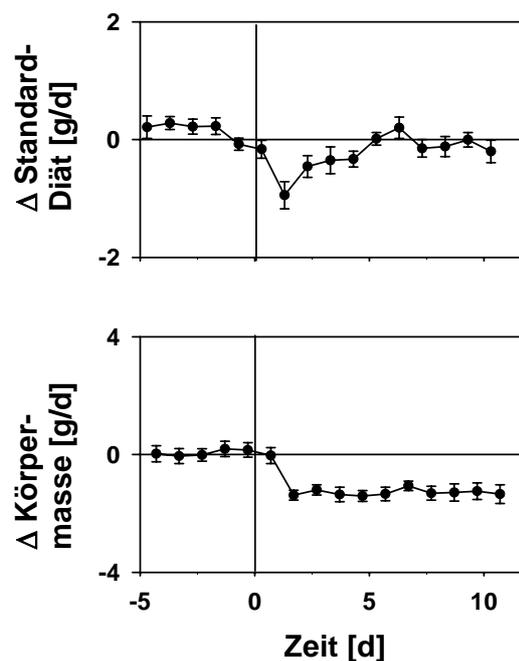


Abbildung 7: Abweichung der Futteraufnahme und Körpermasse von mit MTII behandelten C57Bl/6J Mäusen vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, N=7). Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM, N=8). Am Tag 0 wurden die osmotischen Mini-Pumpen subkutan implantiert. MTII-Dosis: 4,2 μ g/h, Standard-Diät, Umgebungstemperatur $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Eine für die mit MTII behandelten Tiere für Vorlauf (Tag -5 bis -1), Anfangsphase (Tag 1 bis 5) und Endphase (Tag 6 bis 10) der Behandlung durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse ergibt eine signifikant geringere Futteraufnahme während der

Anfangsphase im Vergleich zum Vorlauf (- 0,6 g, $P \leq 0,01$). In der Endphase der Behandlung nehmen die mit MTII behandelten Tiere wieder signifikant mehr Futter auf, als zu Beginn der Behandlung (+ 0,4 g, $P \leq 0,01$), so dass sich diese Futtermenge nicht mehr signifikant von der im Vorlauf unterscheidet. Die Körpermasse der mit MTII behandelten Tiere verringert sich im Vergleich zum Vorlauf bereits in der Anfangsphase der Behandlung signifikant (-1,4 g, $P \leq 0,001$), trotz der wieder ansteigenden Futtermenge der Tiere kann diese Abnahme bis zum Ende der Behandlung aufrechterhalten werden.

Die für die Summe der Energieaufnahme ausgeführte zweifaktorielle Varianzanalyse (Faktoren: Behandlung, Versuchsgruppe), zeigt im fünftägigen Vorlauf keinen Unterschied zwischen mit MTII behandelten Tieren und Kontrollen. Während der zehntägigen Behandlung nehmen die mit MTII behandelten Tiere jedoch signifikant weniger Energie auf als die Kontrollen (-25 kJ, $P \leq 0,05$, Tabelle 9).

Pharmakon	Dosis $\mu\text{g/h}$	Zeitraum	Zeitsummierte Energieaufnahme [kJ] MW \pm SEM		P	Abbildung
			Pharmakon behandelt	Kontrollen		
MTII C57Bl/6J Mäuse gesamt	4,2	Vorlauf	158 \pm 3,3	149 \pm 3,5	n.s.	zu Abb. 7
		Behandlung	267 \pm 7,4	293 \pm 8,0	*	
MTII MC4R- defiziente Mäuse +/-	4,2	Vorlauf	157 \pm 4,8	150 \pm 7,1	n.s.	zu Abb. 8
		Behandlung	236 \pm 5,6	240 \pm 6,0	n.s.	

Tabelle 9: Summe der Energieaufnahme bei mit MTII behandelten C57Bl/6J Mäusen ($N=8$) bzw. heterozygoten MC4R-defizienten Tieren ($N=6$), während des fünftägigen Vorlaufs und der zehntägigen Behandlung, und ihren jeweiligen Kontrollen ($N=7$ bzw. 4). P = Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, $*P \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Bei einer der mit MTII behandelten Versuchsgruppen wurde eine Untersuchung der Körperzusammensetzung durchgeführt, neben der Feuchtmasse unterschied sich bei den mit MTII behandelten Tieren nur der Wassergehalt (g) signifikant von den Kontrollen (einfaktorielle Varianzanalyse, siehe Tabelle 10).

Parameter der Körperzusammensetzung	MTII	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	13,9	0,2	15,8	0,7	*
Fett [g]	2,7	0,1	3,1	0,8	n.s.
Fett %	19,2	1,0	19,0	4,3	n.s.
FFDM [g]	3,9	0,1	4,2	0,1	n.s.

Tabelle 10: Finale Körperzusammensetzung einer der mit MTII behandelten Versuchsgruppen aus Abbildung 7. P = Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere ($N=4$) zu den Kontrollen ($N=3$), einfaktorielle Varianzanalyse $*P \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Aus diesem Grund und da eine zwischenzeitlich durchgeführte Untersuchung bei MC4R-defizienten Mäusen kein viel versprechendes Ergebnis zeigte (siehe unten), wurde die Anzahl der untersuchten Tiere nicht erhöht.

3.1.1.3 Behandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse mit dem MSH-Derivat MTII

Analog zu Abbildung 7 zeigt Abbildung 8 exemplarisch für eine Versuchsgruppe heterozygoter MC4R-defizienter Tiere die Differenzen in der Reaktion von mit MTII systemisch behandelten Mäusen und Kontrollen. Auch in dieser Tiergruppe kommt es zunächst zu einem leichten Abfall der Futtermittelaufnahme und der Körpermasse. Eine durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse über die Mittelwerte der mit MTII behandelten Tiere für Vorlauf (Tag -5 bis -1), Anfangsphase (Tag 1 bis 5) und Endphase (Tag 6 bis 10) der Behandlung ergeben jedoch weder für die Energieaufnahme noch für die Entwicklung der Körpermasse während der einzelnen Phasen statistisch signifikante Veränderungen. Auch für die Energieaufnahme – wiederum als zeitsummiert dargestellt – zeigen sich weder im Vorlauf noch in der folgenden Behandlung signifikante Unterschiede zwischen mit MTII behandelten Tieren und Kontrollen. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung finden sich in Tabelle 9 (einfaktorielle Varianzanalyse).

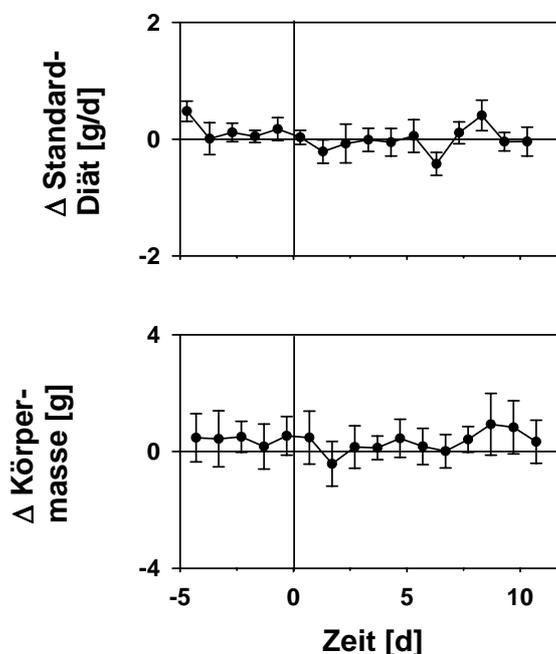


Abbildung 8: Abweichung der Futtermittelaufnahme und Körpermasse von mit MTII behandelten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, N=4). Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM, N=4). Am Tag 0 wurden die osmotischen Mini-Pumpen implantiert. MTII-Dosis: 4,2 μ g/h, Standard-Diät, Umgebungstemperatur $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Bei einer weiteren Gruppe heterozygoter MC4R-defizienter Tiere wurde eine zehntägige MTII Behandlung mit einer 3,5fach erhöhten MTII Dosis durchgeführt (ohne Abbildung), die Dosis wurde durch das Volumen der Pumpe begrenzt. Die mit MTII behandelten Tiere zeigen im Vergleich zu den Kontrollen einen leichten Abfall der Energieaufnahme über drei Tage und eine geringe Reduktion der Körpermasse, wegen der geringen Anzahl der Tiere (MTII N=2, Kontrollen N=2) ist keine statistische Auswertung vorgenommen worden. Die auch bei dieser Dosis allenfalls nur schwache Reaktion legt nahe, dass selbst die Behandlung mit dem im Vergleich zu α -MSH mehrfach potenteren Analogon MTII bei bestehender MC4R-Defizienz mit extremer Adipositas nicht erkennbar in die Körpergewichtsregulation eingreifen kann. Deshalb wurde die ursprünglich konzipierte Behandlungsstrategie nicht weiter verfolgt.

3.2 BEHANDLUNG VON MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN UND C57Bl/6J MÄUSEN MIT LACHS-CALCITONIN (sCT)

Behandlungsstrategien, wie die zunächst verfolgte, die am α -MSH/MC4R-System angreifen, sei es am intakten oder an dem hier untersuchten heterozygot defizienten System, gingen von der Vorstellung aus, dass potentere Agonisten insbesondere ein Rezeptordefizit ausgleichen könnten. Weil dies in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht den erwünschten Erfolg zeigte, sollte ein Pharmakon getestet werden, das nicht an dem defekten System angreift. Da Voruntersuchungen eine anorektische Wirkung von sCT unter anderem bereits bei C57Bl/6J Mäusen und homozygoten MC4R-defizienten Mäusen in Kurzzeitversuchen nachgewiesen hatten (Eiden *et al.* 2002), wurde dieses am Amylin/Calcitonin-System angreifende Analog systematisch untersucht.

3.2.1 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei C57Bl/6J Tieren und MC4R-defizienten Tieren

Die aus Eiden *et al.* (2002) übernommene leicht modifizierte Abbildung 9 zeigt die dosisabhängige sCT-Reaktion der Energieaufnahme bei ausschließlichem Zugang zu Standard-Diät bei C57Bl/6J Mäusen und homozygoten MC4R-defizienten Mäusen. Ergänzend wurden die Befunde aus eigenen Vorversuchen zum Einfluss einer mittleren sCT-Dosis auf die Energieaufnahme bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen eingefügt. Um einen Vergleich auf der Basis der Futteraufnahme trotz der Unterschiede in der Ausgangsenergieaufnahme, zu ermöglichen, wurde die Pelletaufnahme unter dem Einfluss einer subkutanen sCT-Injektion in Prozent zur Energieaufnahme im Vorlauf dargestellt. Die sCT-Dosis wurde im oberen Teil der Abbildung als Absolutwert und im

unteren Teil der Abbildung aufgrund der variierenden Körpermasse auch massenspezifisch angegeben.

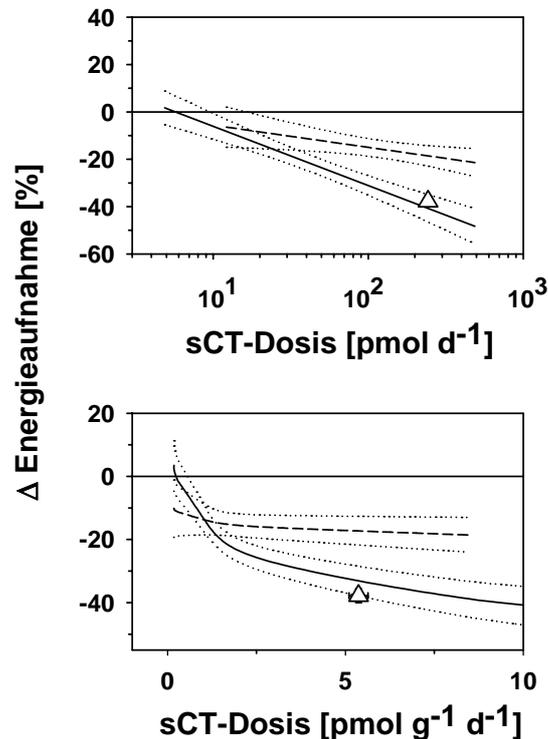


Abbildung 9: Vergleich der Wirkung eintägiger sCT-Behandlung bei C57Bl/6J Mäusen, +/- MC4R-defizienten Mäusen auf Standard-Diät. Gezeigt ist die Differenz in der Energieaufnahme am Effekttag zwischen mit sCT behandelten Tieren und dem Mittelwert der Kontrollen (=Null-Linie). Aufgrund unterschiedlicher Ausgangswerte ist die Differenz in Prozent der Energieaufnahme im Vorlauf angegeben. Gezeigt sind jeweils 95%-Konfidenzintervalle über die Einzelwerte bei logarithmischer Auftragung der sCT-Dosis pro Tier (oberer Teil der Abbildung) bzw. bei linearisierter Auftragung der massenspezifischen sCT-Dosis (unterer Teil der Abb.). C57Bl/6J-Mäuse: ———, $N=61$, $r=-0,72$, $P<0,001$. +/- MC4R-defiziente Mäuse: - - - - -, $N = 33$, $r = -0,40$, $P<0,05$

Eigene Vorversuche: +/- MC4R-defiziente Mäuse: $N = 4$. N-Zahlen geben die Anzahl der individuellen sCT-Behandlungen an. Korrelationskoeffizienten beziehen sich auf oberen Teil der Abbildung, Standard-Diät Umgebungstemperatur $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Abbildung, modifiziert, übernommen aus Eiden *et al.*, 2002.

Im Vergleich zu C57Bl/6J Mäusen ist die Reaktion der homozygoten MC4R-defizienten Mäuse mit maximal 16% deutlich vermindert (Eiden *et al.* 2002). Wie die eingefügten eigenen Messungen zeigen, liegen die heterozygoten MC4R-defizienten Mäuse bei einer mittleren Dosis von $250 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ bzw. $5,4 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ mit einer Verminderung der Energieaufnahme um fast 40% im 95% Konfidenzintervall der Dosis-Wirkungsbeziehung der C57Bl/6J Mäuse, die bei entsprechender Dosis im Mittel 35 % weniger Energie zu sich nehmen.

3.2.2 Vergleich der Wirkungsstärke von Lachs-Calcitonin bei veränderten Umgebungsbedingungen

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, in welcher Weise der pharmakologische Behandlungseffekt durch Umweltparameter modifiziert wird, die den bei Menschen relevanten Bedingungen entsprechen. Dazu gehören eine annähernd thermoneutrale Umgebungstemperatur und die unbegrenzte Verfügbarkeit einer hochkalorischen Nahrung. Für diese Bedingungen sind die Absolutwerte für die Energieaufnahme in Form der beiden Diäten sowie die Gesamtenergieaufnahme pro Tag, gemittelt über den zehntägigen Vorlauf, in Abbildung 10 für C57Bl/6J Mäuse und in Tabelle 11 für MC4R-defiziente Tiere aufgeführt. Sie dienen als Anhalt für das Ausmaß der Änderungen in der Energieaufnahme in den folgenden Versuchen und zugleich für differentielle anorektische Effekte hinsichtlich der beiden Diäten.

Stamm	Geschlecht	Gesamtenergie kJ/d	Anteil Standard-Diät kJ/d	Anteil Zusatz-Diät kJ/d	Anteil Zusatz-Diät %
MC4R +/-	w	64	8	56	87
MC4R +/-	m	75	18	57	76
MC4R -/-	w	87	12	75	86
MC4R -/-	m	76	24	52	68

Tabelle 11: Absolutwerte der Energieaufnahme und prozentuale Anteile der Aufnahme von Standard-Diät und Zusatz-Diät und Thermoneutralität an der Gesamtenergie bei heterozygoten und homozygoten MC4R-defizienten Mäusen. Mittelwerte des zehntägigen Vorlaufs, N siehe Abbildung 9.

3.2.2.1 sCT-Wirkung auf weibliche C57Bl/6J Mäuse bei veränderter Umgebungstemperatur und bei unterschiedlichen Diäten

In Abbildung 10 wird die Wirkung eintägiger sCT-Behandlungen bei weiblichen C57Bl/6J Mäusen mit einer Dosis von 50 bzw. 500 pmol*d⁻¹ gezeigt. Um Unterschiede in der täglichen Energieaufnahme auszugleichen, ist die Abnahme der Energieaufnahme der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen in Prozent dargestellt (Eiden *et al.* 2002). Unter Standardbedingungen, also bei einer Umgebungstemperatur von 22 ± 0,5°C und ausschließlichem Zugang zu Standard-Diät, beträgt die Verringerung der aufgenommenen Energie im Vergleich zu den Kontrollen 20% bei der niedrigen und 40% bei der hohen sCT Dosierung. Sowohl die Erhöhung der sCT-Dosis als auch die Veränderung der Versuchsbedingungen nehmen auf die Verminderung der Energieaufnahme einen signifikanten Einfluss (P≤0,001, zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Dosis, Versuchsbedingungen). Der für paarweise Vergleiche durchgeführte post hoc Test (Bonferroni), zeigt, dass eine zehnfache Erhöhung der sCT-Dosis sowohl bei einer

Umgebungstemperatur von $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$ als auch bei einer Umgebungstemperatur von $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ zu einer signifikant stärkeren Reaktion führt. Die Reduktion der Energieaufnahme verstärkt sich – nicht signifikant unterschiedlich – um 21% ($P \leq 0,05$) bei der niedrigeren und um 17% ($P \leq 0,01$) bei der höheren Umgebungstemperatur.

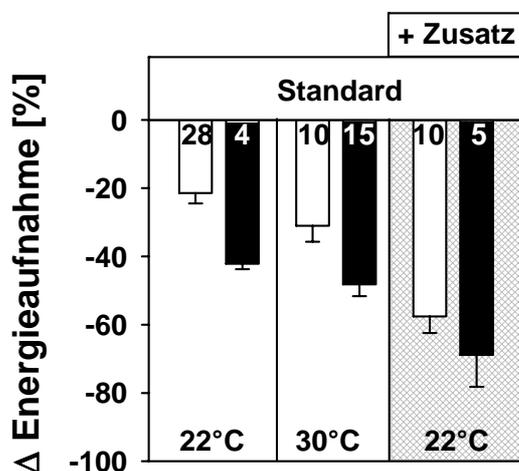


Abbildung 10: Prozentuale Abweichung der Energieaufnahme weiblicher C57Bl/6J Mäuse vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie) nach einer eintägigen sCT-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) bei Zugang zu verschiedenen Diäten und bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. Zusatz = Zugang zu einer Zusatz-Diät (hier: weiße Kuvertüre), neben der immer verfügbaren Standard-Diät (= Standard). Aufnahme während des Vorlaufs Gesamt: 54kJ/d, Standard: 2kJ/d, Zusatz-Diät: 52 kJ/d. sCT-Dosis: 50 pmol/d (weiße Balken) bzw. 500 pmol/d (schwarze Balken,) subkutan appliziert. Zahlen in den Balken entsprechen der Anzahl der mit sCT behandelten Tiere.

Der Einfluss der Versuchsbedingungen ist besonders deutlich bei Zugang zu einer Zusatz-Diät (bei einer Umgebungstemperatur von $22 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Es kommt für die niedrige Dosierung zu einer um fast 40% ($P \leq 0,001$), für die hohe Dosierung zu einer um knapp 30% ($P \leq 0,05$) stärkeren Verminderung der Energieaufnahme, als bei ausschließlichem Zugang zu Standard-Diät. Auf der Grundlage von Untersuchungen an verschiedenen Stichproben (N = Anzahl der Tiere) lässt sich die Dosisabhängigkeit der sCT Wirkung auf die Energieaufnahme unter den Bedingungen der Standard-Diät/22°C ($P \leq 0,05$, $N = 32$) und der Standard-Diät/TN ($P \leq 0,01$, $N = 25$) statistisch sichern, nicht jedoch unter der Bedingung Zusatz-Diät/22°C ($P > 0,05$, $N = 15$). Für die Interpretation des Ergebnisses der zweifaktoriellen Varianzanalyse bedeutet dieser Befund zunächst, dass der Einfluss der Qualität der Nahrung im Vordergrund steht.

3.2.2.2 sCT-Wirkung auf MC4R-defiziente Mäuse beider Geschlechter unter veränderten Umweltbedingungen

Abbildung 11 zeigt die Veränderung der Energieaufnahme im Vergleich zu den Kontrollen nach eintägiger sCT-Behandlung mit niedriger ($50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$), mittlerer ($250 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$) und

hoher ($500 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$) Dosierung. Im oberen Teil sind die Ergebnisse von heterozygoten, im unteren Teil der Abbildung die von homozygoten MC4R-defizienten Tieren gezeigt. Um die Energieaufnahme unabhängig von Unterschieden in der ohne Behandlung aufgenommenen Gesamtenergie vergleichen zu können, werden wiederum die prozentualen Werte mit ein- oder zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet. Als Referenz bei normalen Laborbedingungen (22°C) ist der bei heterozygoten MC4R-defizienten männlichen Mäusen unter Standard-Diät beobachtete Effekt bei mittlerer Dosis dargestellt. Der Vergleich erfolgte nach einer Erhöhung der Umgebungstemperatur auf einen Wert knapp unter dem thermoneutralen Bereich und bei unterschiedlichem Nahrungsangebot. Hierbei wurden die Abhängigkeit der Reaktionsstärke von einer Erhöhung der sCT-Dosis und ein möglicher Einfluss des Geschlechts auf die sCT-Wirkung untersucht.

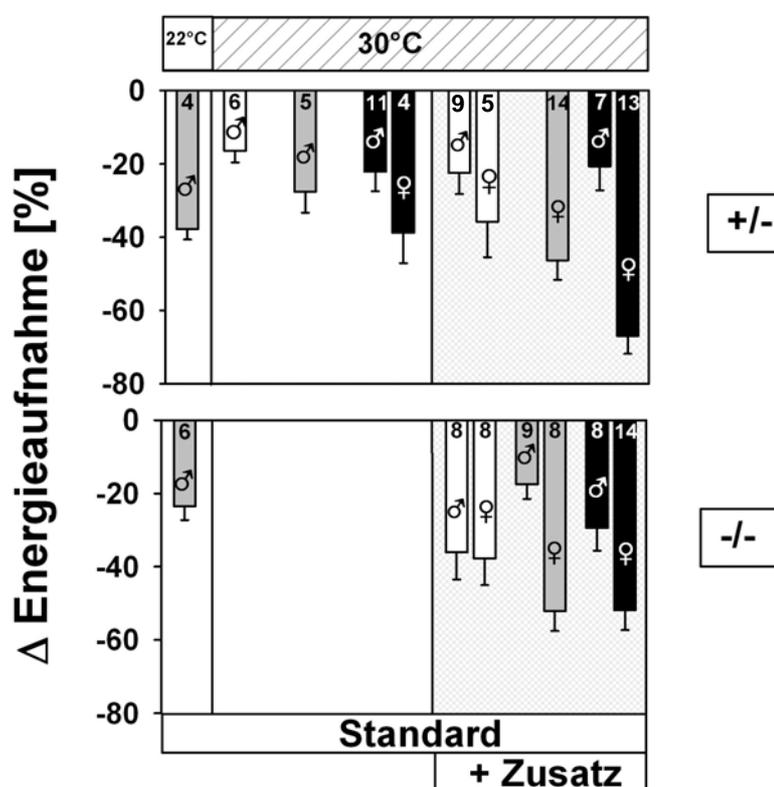


Abbildung 11: Prozentuale Abweichung der Energieaufnahme heterozygoter (oben) und homozygoter (unten) MC4R-defizienter Mäuse vom Mittelwert ihrer Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) nach einer eintägigen sCT-Behandlung bei Zugang zu verschiedenen Diäten und bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. Dosis: 50 pmol/d (weiße Balken), 250 pmol/d (hellgraue Balken), 500 pmol/d (schwarze Balken) subkutan appliziert. Zahlen in den Balken entsprechen der Anzahl der mit sCT behandelten Tiere.

Bei den homozygoten MC4R-defizienten Tieren wurden die Dosisabhängigkeit und der Geschlechtsunterschied unter TN ausschließlich bei Zugang zu Zusatz-Diät untersucht. Wiederum ergab sich im Vergleich zur Kontroll-Behandlung mit mittlerer Dosis bei den männlichen Tieren kein Einfluss der Umgebungstemperatur. Abschließend wurde der Geschlechtsunterschied in der Reaktion auf sCT-Behandlungen ermittelt.

Heterozygote MC4R-defiziente Mäuse: Die Wirkung einer sCT-Dosis von 250 pmol*d⁻¹ bei männlichen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen auf Standard-Diät unterscheidet sich nicht signifikant zwischen einer Umgebungstemperatur von 22 ± 0,5°C und 30 ± 0,5°C (einfaktorielle Varianzanalyse). Für die Veränderung in der Energieabnahme heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse mit Zugang zu Standard-Diät und unter TN lässt sich eine Dosisabhängigkeit statistisch nicht sichern, ebenso nicht für den Geschlechtsunterschied.

Heterozygote MC4R-defiziente Mäuse mit zusätzlichem Zugang zu einer hochkalorischen Diät und TN, zeigen hingegen eine dosisabhängige Reaktion in der Reduktion der Energieaufnahme (P≤0,01). Außerdem zeigt sich unter diesen Bedingungen eine Geschlechtsabhängigkeit der sCT-Wirkung. Die Reaktion der männlichen Tiere ist signifikant schwächer als die der weiblichen Tiere (P≤0,001) (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Dosis, Geschlecht, getrennt untersucht für die jeweiligen Diäten).

Der Diät-Einfluss wurde wegen des nachgewiesenen Geschlechtseinflusses bei Zugang zu einer Zusatz-Diät in Bezug auf die sCT-Wirkung getrennt für männliche und weibliche Tiere bei Dosierungen von 50 und 500 pmol*d⁻¹ verglichen. Weibliche heterozygote MC4R-defiziente Mäuse zeigen eine dosisabhängige Reaktion (P≤0,05) und eine signifikant verstärkte Reduktion der Gesamtenergie bei zusätzlichem Zugang zu hochkalorischer Zusatz-Diät (P≤0,05). Männliche heterozygote Mutanten zeigen weder bei einer Erhöhung der Dosis, noch bei einer Veränderung der Diät eine signifikant unterschiedliche Reaktion (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Dosis, Diät).

Homozygote MC4R-defiziente Mäuse: Für homozygote MC4R-defiziente Mäuse wurde die Wirkung von sCT nur unter TN und mit zusätzlichem Zugang zu einer hochkalorischen Diät untersucht. Die Reduktion der Energieaufnahme der homozygoten Tiere zeigt keine Dosisabhängigkeit. Die sCT-Wirkung wird aber deutlich durch das Geschlecht der Tiere beeinflusst (P≤0,001, zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Dosis, Geschlecht), wobei die weiblichen Tiere stärker anorektisch reagieren als die männlichen Tiere.

Vergleich der Genotypen: Für den Genotypvergleich wurde die mittlere sCT-Dosierung verwendet. Der Genotypvergleich unter Standardbedingungen zeigt, dass männliche homozygote MC4R-defiziente Mäuse bei einer sCT-Dosierung von 250 pmol*d⁻¹

signifikant schwächer reagieren als heterozygote ($P \leq 0,05$, einfaktorische Varianzanalyse). Bei annähernden TN Bedingungen und Zugang zu Zusatz-Diät reagieren die beiden Genotypen hingegen gleich.

3.2.3 sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch

3.2.3.1 Langzeitversuch mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen

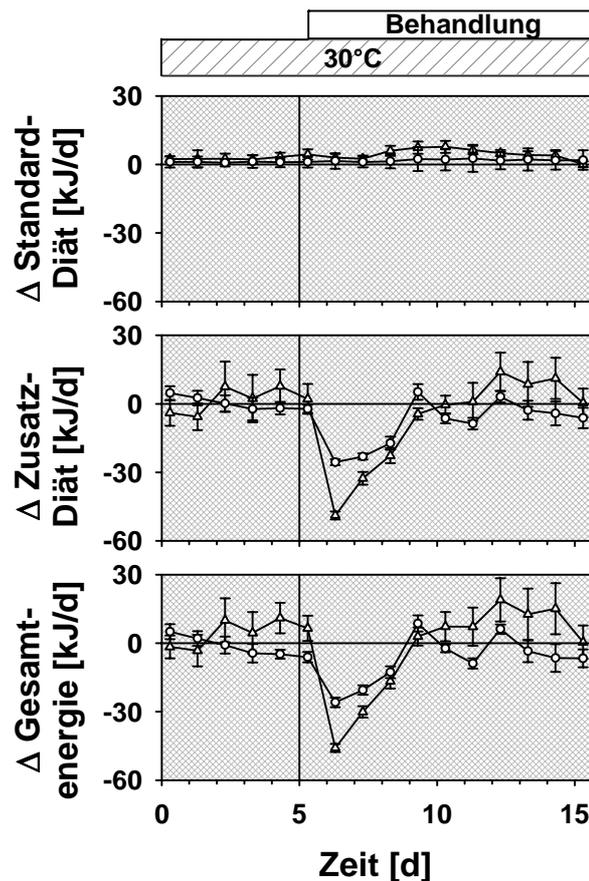


Abbildung 12: Abweichung der Energieaufnahme und Körpermasse von mit sCT behandelten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, $N=4$) während des fünf-tägigen Vorlaufs und der zehntägigen Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM) für zwei Versuchsdurchgänge (1. Durchgang: $-\circ-$, $N=5$; 2. Durchgang: $-\triangle-$, $N=4$), sCT-Dosis: 500 pmol/d , subkutan appliziert. Standard- und Zusatz-Diät, Umgebungstemperatur: $30^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Abbildung 12 zeigt Verlaufskurven von zwei zehntägigen sCT-Behandlungen mit einer Dosis von $500 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen mit Zugang zu Zusatz-Diät und unter TN Bedingungen. Die Behandlungen erfolgten in einem zeitlichen Abstand von vier Wochen, die im ersten Durchgang mit sCT behandelten Tiere wurden bei der folgenden Behandlung zu Kontrollen und die Kontrollen des ersten Versuches zu mit sCT behandelten Tieren. Für die statistische Auswertung wurden Einzelmessungen an den Tieren nach Korrektur zum eigenen Vorlauf und dem Mittel der Kontrollen für Standard-,

Zusatz-Diät und Gesamtenergie analysiert (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Behandlung, Versuchsdurchgang). Zwischen den beiden Durchgängen ist kein statistisch signifikanter Unterschied nachzuweisen. Zusätzlich wurden die Werte der mit sCT behandelten Tiere für die Aufnahme der Zusatz-Diät und die Aufnahme der Gesamtenergie aufgrund des Verlaufs für unterschiedliche Phasen gemeinsam für beide Durchgänge verglichen (einfaktorielle Varianzanalyse). Die Phasen beinhalten die letzten drei Tage des Vorlaufs, die ersten drei Effekttage (=Akutphase) und die letzten drei Tage der Behandlung (Endphase).

Die Aufnahme der Standard-Diät (Abbildung 12 oberer Abschnitt) zeigt zwar noch keinen erkennbaren sCT-Effekt in der Akutphase, liegt danach aber bis zum sechsten Effekttag bei den mit sCT behandelten MC4R-defizienten Mäusen klar, wenn auch energetisch geringfügig über den Kontrollen. Über das Mittel des gesamten Behandlungszeitraums ist die Aufnahme der Standard-Diät bei den mit sCT behandelten Tieren signifikant höher ($+2,5 \pm 0,71$ kJ, $P \leq 0,05$) als bei den Kontrollen. Zum deutlichsten Anstieg kommt es zeitlich nach dem initialen Absinken der Aufnahme von Zusatz-Diät (Abbildung 12 mittlerer Abschnitt).

Die Aufnahme der Zusatz-Diät (Abbildung 12 mittlerer Abschnitt) nimmt am ersten Effekttag des ersten Durchgangs um 26 kJ, beim zweiten Durchgang um 46 kJ ab, in den folgenden zwei Tagen ist die Verringerung der Energieabnahme schwächer und bereits am vierten Effekttag entspricht die Energieaufnahme in beiden Behandlungsdurchgängen dem Kontroll-Niveau. In den folgenden sechs Effekttagen kommt es trotz sCT Injektionen im ersten Behandlungsdurchgang zu einem Angleichen der Energieaufnahme der Zusatz-Diät von mit sCT behandelten Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen. Im zweiten Behandlungsdurchgang kommt es sogar zu einer im Vergleich zu den Kontrollen leicht überschießenden Energieaufnahme der mit sCT behandelten Tiere. Über das Mittel des gesamten Behandlungszeitraums bleibt die Aufnahme der Zusatz-Diät bei den mit sCT behandelten Tieren jedoch signifikant niedriger als bei den Kontrollen ($-10,7$ kJ, $P \leq 0,05$). Die statistische Auswertung der einzelnen Phasen (einfaktorielle Varianzanalyse), ergibt ein deutliches und statistisch signifikantes Absinken der Aufnahme der Zusatz-Diät ($-29,5$ kJ, $P \leq 0,001$) der mit sCT behandelten Tiere in der Akutphase, verglichen mit der Vorlaufphase. In der Endphase der Behandlung ist die Aufnahme der Zusatz-Diät bereits

wieder signifikant angestiegen (+31,8 kJ, $P \leq 0,001$) und unterscheidet sich nicht von der Aufnahme der Zusatz-Diät im Vorlauf.

Der unter sCT-Behandlung beobachtete eindeutige, aber geringe Anstieg der Aufnahme von Standard-Diät, ausgehend von dem bereits beschriebenen niedrigen Anteil (ca. 15 %) an der Gesamtaufnahme, setzt mit Verzögerung ein und vermag deshalb prinzipiell die temporäre Reduktion der Aufnahme der Zusatz-Diät nicht zu kompensieren. Der Verlauf der Gesamtenergieaufnahme (Abbildung 12 unterer Abschnitt) ist deshalb dem der Zusatz-Diät ähnlich und wird lediglich durch den Anstieg der Aufnahme der Standard-Diät im Verlauf der Behandlung geringfügig abgeschwächt. Dies erklärt auch, weshalb es für diesen Diätanteil im Mittel über den Behandlungszeitraum zu keiner signifikanten Änderung bei mit sCT behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen kommt. Die Betrachtung der einzelnen Phasen (einfaktorielle Varianzanalyse) ergibt im Vergleich zum Vorlauf, ähnlich wie für die Aufnahme der Zusatz-Diät, für die mit sCT behandelten Tiere eine signifikante Reduktion der Gesamtenergie (-26,6 kJ, $P \leq 0,001$) in der Akutphase der Behandlung. In der Endphase zeigt sich im Vergleich zur Akutphase ein signifikanter Anstieg der Aufnahme der Gesamtenergie (+30,9 kJ, $P \leq 0,001$), so dass sich auch hier die Aufnahme der Gesamtenergie im Vorlauf und während der Endphase der Behandlung nicht signifikant unterscheiden.

Für die Körpermasse am letzten Effekttag und die Körperzusammensetzung wurden die Absolutwerte ausgewertet (einfaktorielle Varianzanalyse, Tabelle 12).

Parameter der Körperzusammensetzung	sCT	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	43,1	2,6	45,6	1,4	n.s.
Fett [g]	20,9	2,1	23,6	0,6	n.s.
Fett %	48,1	1,9	51,7	0,4	n.s.
FFDM [g]	5,7	0,1	5,8	0,2	n.s.

Tabelle 12: Finale Körperzusammensetzung der über zehn Tage mit Lachs-Calcitonin behandelten adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen (N=4) und ihren Kontrollen (N=4) aus Abbildung 12. P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorielle Varianzanalyse, n.s.= nicht signifikant.

Die Körpermasse zwischen mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen verfehlt das Signifikanzniveau knapp, die Körperzusammensetzung ergab bei den relevanten Parametern Körperfettgehalt, Fettmasse und fettfreier Trockenmasse (FFDM) keine Unterschiede bei mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich für die Dauer der Behandlung mit sCT über 10 Tage feststellen, dass es zu einer vorübergehenden aber deutlichen Verringerung der Aufnahme von Zusatz-Diät kommt, die aber noch im Verlauf der Behandlung wieder verschwindet. Eine mit Verzögerung einsetzende und energetisch schwächere Steigerung der Aufnahme von Standard-Diät vermag den akuten sCT-Effekt auf den Energiehaushalt nicht auszugleichen. Die temporäre Wirksamkeit von sCT spiegelt sich in der Gesamtenergieaufnahme (Abbildung 12 unterer Abschnitt) wider. Entsprechend der insgesamt nur geringfügigen und temporären Änderung der Energieaufnahme ergibt sich kein signifikanter Einfluss auf die finale Körperzusammensetzung.

Der Versuch, die Langzeitwirkung durch eine kombinierte Behandlung mit Leptin aufrecht zu erhalten, wurde an männlichen heterozygoten MC4R-defizienten Tieren unter Standard-Bedingungen durchgeführt (ohne Abbildung). Eine zehntägige Behandlung mit sCT (Dosis: $250 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$, $N=3$) und eine nach dreiwöchiger behandlungsfreier Zeit durchgeführte kombinierte Behandlung mit sCT und Leptin (Dosis_{sCT}: $250 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$, Dosis_{Leptin}: $100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $N=3$) ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlich behandelten Tieren. Die Abnahme der Gesamtenergie der mit sCT oder sCT/Leptin behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen ($N=4$) ist über den Behandlungszeitraum nicht signifikant (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Behandlung, Form der Behandlung). Die Untersuchung der Körpermasse am letzten Behandlungstag und der Körperzusammensetzung (Tabelle 13) ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen mit sCT/Leptin behandelten MC4R-defizienten Mäusen und ihren Kontrollen (einfaktorielle Varianzanalyse).

Parameter der Körperzusammensetzung	sCT	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	36,9	4,4	38,3	3,3	n.s.
Fett [g]	11,1	3,5	12,1	2,3	n.s.
Fett %	28,4	7,0	30,5	4,1	n.s.
FFDM [g]	7,8	0,4	8,0	0,3	n.s.

Tabelle 13: Finale Körperzusammensetzung von über zehn Tage mit Lachs-Calcitonin (sCT) und Leptin behandelten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen (N=3) und ihren Kontrollen (N=4). P = Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorielle Varianzanalyse, n.s.= nicht signifikant.

Im Gesamtergebnis zeigt eine kontinuierliche sCT-Behandlung bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen keine Langzeitwirkung hinsichtlich der Energieaufnahme und Körpermasse. Auch die zusätzliche Behandlung mit Leptin führt nicht zu einer ver-

längerten Wirkung der Behandlung. Die Körperzusammensetzung bleibt von der Behandlung unbeeinflusst.

3.2.3.2 *Langzeitversuch mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren*

Angesichts des negativen Ergebnisses der Langzeitbehandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse wurde untersucht, ob eine entsprechende Behandlung bei gleichen Bedingungen (Zugang zu Zusatz-Diät/TN) bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren, also zu einem Zeitpunkt zu dem sich noch keine Sekundärstörungen ausgebildet haben, eine bessere Wirkung zeigt. In Abbildung 13 sind Verlaufskurven für die Abweichung der Aufnahme von Standard-Diät, Zusatz-Diät und der Körpermasse für diese Jungtiere als Abweichung zu ihren Kontrollen dargestellt. Die Tiere erhielten ab Lebenstag 21 direkt nach dem Absetzen Zugang zu pelletiertem Standardfutter und Zusatz-Diät und wurden über zwei Wochen mit täglichen subkutanen sCT Injektionen (N=5) mit einer Dosierung von $50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ oder in entsprechender Menge NaCl (N=5) behandelt. Der Injektionsbeginn ist mit der senkrechten Linie gekennzeichnet. Da die Tiere bis Lebenstag 21 noch bei der Mutter waren, liegen die Ausgangswerte der Energieaufnahme erst an Lebenstag 22 vor. Mit deutlichen individuellen Schwankungen nehmen die Jungtiere nach dem Absetzen sowohl Standard- als auch Zusatz-Diät auf und zeigen eine kontinuierliche Gewichtszunahme. Da für die Energieaufnahme vor Behandlungsbeginn keine Daten vorlagen, kann ein möglicher Therapie-Effekt nur anhand des Vergleichs von Kontrolltieren und behandelten Tieren nachgewiesen werden.

Dagegen konnten bereits eine Woche vor Versuchsbeginn die Tiere gewogen werden, so dass die Aufzeichnung für den Gewichtsverlauf vor der Behandlung beginnt. Für statistische Vergleiche wurden die Werte der Tiere für Standard-, Zusatz-Diät und Gesamtenergie auf die Mittel der Kontrollen bezogen, für die Körpermasse außerdem auf den Vorlauf, und gemittelt über den Behandlungszeitraum untersucht (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Behandlung, Wurf bzw. Behandlung, Geschlecht). Für die Einflussgrößen Wurf und Geschlecht zeigten sich keine signifikanten Unterschiede und wurden daher nicht weiter berücksichtigt.

Die mit sCT behandelten Jungtiere zeigen gegenüber den Kontrollen im Mittel über den Behandlungszeitraum eine signifikant erhöhte Aufnahme von Standard-Diät (+3,5 kJ, $P \leq 0,05$). Die Aufnahme der Zusatz-Diät ist innerhalb der ersten drei Effekttage leicht

erniedrigt, steigt dann auf das Niveau der Kontrollen und sinkt gegen Behandlungsende wieder ab. Über das Mittel des Behandlungszeitraums unterscheidet sich die Aufnahme der Zusatz-Diät der mit sCT behandelten Tiere nicht signifikant von ihren Kontrollen. Der Verlauf der Körpermasse zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen. Aufgrund des Verlaufs in Abbildung 13 lassen bei den Jungtieren die nicht signifikanten Verlaufsänderungen allenfalls eine Tendenz zu einem mit Verzögerung einsetzenden, schwachen hemmenden sCT-Effekt auf die Aufnahme der Zusatz-Diät vermuten. Er wird aber durch die erhöhte Aufnahme von Standard-Diät vollständig ausgeglichen.

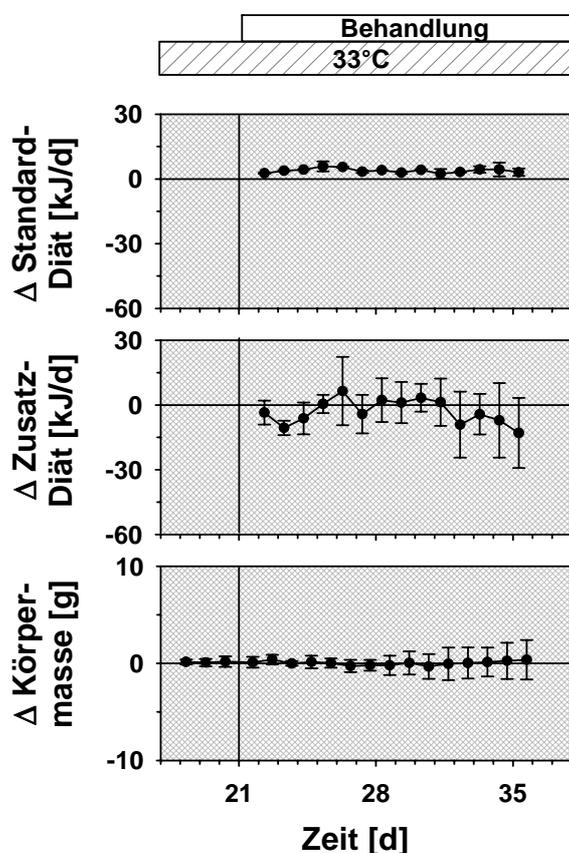


Abbildung 13: Abweichung der Energieaufnahme und Körpermasse heterozygoter MC4R-defizienter Absetzer, die von Lebenstag 21 bis 35 täglich mit sCT behandelt wurden, vom Mittelwert ihrer Kontrollen (Null-Linie, N=5). Gezeigt sind Mittelwerte (\pm SEM, N=5). sCT-Dosis: 500 pmol/d, subkutan appliziert. Umgebungstemperatur $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$, Standard- und Zusatz-Diät.

Die Tiere wurden am Versuchsende auf Veränderung in der Feuchtmasse, Fettmasse und dem Fettgehalt untersucht (einfaktorielle Varianzanalyse). In keinem der Parameter wurde ein signifikanter Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tieren und den Kontrollen festgestellt (Tabelle 13).

Parameter der Körperzusammensetzung	sCT	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	37,0	4,4	38,3	3,3	n.s.
Fett [g]	11,1	3,5	12,1	2,3	n.s.
Fett %	28,4	7,0	30,5	4,1	n.s.
FFDM [g]	5,7	0,11	5,8	0,2	n.s.

Tabelle 13: Finale Körperzusammensetzung der von Lebenstag 21 bis 35 täglich mit Lachs Calcitonin (sCT) behandelten MC4R-defizienten Jungtieren (N=5) und ihren Kontrollen (N=5) aus Abbildung 13. P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorische Varianzanalyse, n.s.= nicht signifikant.

3.2.3.3 Langzeitversuch mit sCT-Pulsbehandlung bei C57Bl/6J Mäusen

Abbildung 14 zeigt Verlaufskurven von C57Bl/6J Mäusen mit Zugang zu Zusatz-Diät unter TN Bedingungen, die über einen Zeitraum von 10 Wochen einer Pulsbehandlung mit sCT unterzogen wurden. Dargestellt sind die Abweichungen zu den Kontrollen (Null-Linie) für die Aufnahme von Standard-Diät (oberer Abschnitt), Zusatz-Diät (mittlerer Abschnitt) und Körpermasse (unterer Abschnitt) für den 10-tägigen behandlungsfreien Vorlauf und für 60 Tage nach Behandlungsbeginn. Die mit sCT behandelten Tiere (N=4) erhielten eine Dosis von 50 (dünne Pfeile) oder 500 pmol*d⁻¹ (dicke Pfeile), die Kontrollen (N=4) bekamen NaCl-Injektionen mit entsprechenden Volumen. Im Behandlungszeitraum wurde das sCT in verschiedenen Pulsmustern verabreicht. Für statistische Vergleiche wurden die Werte der Tiere wieder auf den eigenen Vorlauf und auf das Mittel der Kontrollen bezogen und für Standard-, Zusatz-Diät und Gesamtenergie gemittelt über den Behandlungszeitraum untersucht (einfaktorische Varianzanalyse). Außerdem wurde die Aufnahme der Zusatz-Diät ausgewertet, indem die jeweiligen Minima und Maxima im Behandlungsverlauf (Abbildung 14) mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney verglichen wurden. Dies erfolgte für vier verschiedene Phasen des Vorlaufs bzw. unter der Behandlung.

Der obere Abschnitt der Abbildung zeigt die Aufnahme der Standard-Diät. Infolge der Injektionen kommt es bei den mit sCT behandelten Tieren zu einer sprunghaft ansteigenden Aufnahme der Standard-Diät, die während des gesamten Behandlungszeitraums über die Effekttage (= den Injektionstagen folgende Tage) erhalten bleibt. Dabei unterscheiden sich die durch die sCT-Behandlung erzeugten Schwankungs-Amplituden nur wenig. An den behandlungsfreien Tagen sinkt die Aufnahme der Standard-Diät, bleibt jedoch über dem Kontroll-Niveau. Die Dosissteigerung in der mittleren Behandlungsphase hat keinen ersichtlichen Einfluss auf die Reaktionsstärke. Im Mittel ist über den Behand-

lungszeitraum die Aufnahme der Standard-Diät bei den mit sCT behandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrollen ($P \leq 0,01$). Der Durchschnitt und die Spitzen der Aufnahme der Standard-Diät liegen jedoch wenig über den Kontrollen. Die Spitzenzunahmen bewegen sich zwischen +1 und +5 kJ/Tag und das Mittel liegt bei ca. 2 kJ/Tag.

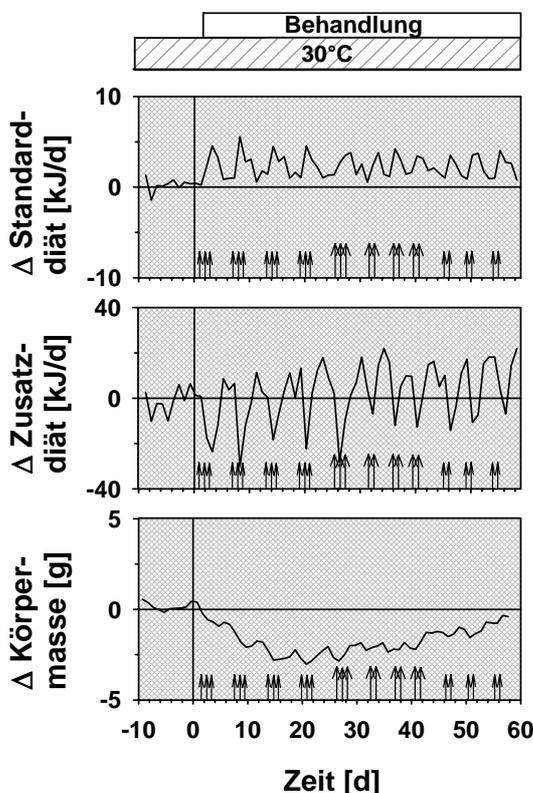


Abbildung 14: Abweichung der Energieaufnahme und Körpermasse von mit sCT behandelten C57Bl/6J Mäusen ($N=4$) vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, $N=4$). Nach zehntägigem Vorlauf erhielten die Tiere während der achtwöchigen Behandlung abwechselnd an 2-3 Tagen sCT, gefolgt von 2-4 behandlungsfreien Tagen (= Pulsbehandlung). Gezeigt sind Mittelwerte für jeden Versuchstag. Die Pfeile markieren die Injektionstage sCT-Dosis: 50 pmol/d (kleiner Pfeil), 500 pmol/d (großer Pfeil), subkutan appliziert. Standard- und Zusatz-Diät. Zu beachten ist, die unterschiedliche Skalierung für Standard- und Zusatz-Diät Umgebungstemperatur $30 \pm 0,5$ °C.

Die Aufnahme der Zusatz-Diät (mittlere Abschnitt der Abbildung) ist bei den mit sCT behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen an den Effekttagen verringert. Dabei ist zu beachten, dass die Minima der Aufnahme von Zusatzfutter deutlich markanter sind als die parallelen Maxima des Standardfutters. Bereits ab der zweiten Behandlung reagieren die mit sCT behandelten Tiere jedoch statt an drei Tagen nur noch an zwei Tagen auf die sCT-Injektion. Am Tag nach der dritten Injektion, liegt die Aufnahme der mit sCT behandelten Tiere über dem Kontroll-Niveau. In der Mitte der Behandlungsperiode kann die sCT-Wirkung trotz dreitägiger Behandlung nur am ersten Effekttag erzielt werden. Eine daraufhin um das zehnfache gesteigerte sCT-Dosis verlängert die Wirkung zwar um einen Tag, führt jedoch nur bei der ersten Anwendung zu einer stärkeren Reaktion. Als

Konsequenz wurden die Injektionsintervalle verkürzt. Insgesamt bleibt die Reaktion auf die sCT-Gabe bei der hohen Dosierung erhalten, wie die etwa gleich bleibende Amplitude zwischen der initialen Hemmung der Aufnahme von Zusatz-Diät und dem anschließenden Anstieg zeigt. Die Differenz zwischen den mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen nimmt jedoch fortlaufend ab. Ein erneuter Übergang auf die niedrige Dosis ab Tag 42 mit einer behandlungsfreien Zeit von vier Tagen und einer zweitägigen Behandlung mit niedriger Dosis änderte nichts an der Amplitude, verschob die Reaktion aber zunehmend in Richtung auf eine verstärkte Aufnahme der Zusatz-Diät.

Die Körpermasse (unterer Abschnitt) nimmt im ersten Drittel der Behandlung bei den mit sCT behandelten Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen ab. In der Mitte der Behandlung bleiben die mit sCT behandelten Tiere auf dem bis dahin erreichten erniedrigten Niveau und nehmen im letzten Drittel stetig zu. Am Ende der Behandlung liegen mit sCT behandelte Tiere und Kontrollen wieder auf einer Höhe.

Unter Einbeziehung dieses Verlaufs werden die folgenden Phasen analysiert: *Phase 0* (= Vorlauf, Tag -10 bis 0): kein Unterschied zwischen den später mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen, *Phase a* (= Tag 0-19): die Entwicklung des Körpergewichts der mit sCT behandelten Tiere weicht von dem der Kontrollen nach unten ab, *Phase b* (= Tag 20 bis 39): die Differenz bleibt auf einem stabilen Niveau. *Phase c* (= Tag 40 bis 59): die Differenz im Verlauf des Körpergewichts vermindert sich trotz sCT-Behandlung.

Anhand des bisherigen Auswertungsschemas, lässt sich über das Mittel der Behandlung kein signifikanter Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen feststellen. Wendet man eine einfaktorische Varianzanalyse ausschließlich auf die mit sCT behandelten Tiere an, lässt sich jedoch eine signifikante Abnahme (-2,5 g, $P \leq 0,05$) von Phase 0 zu Phase a feststellen. Für Phase b und c, in der die Tiere wieder bis auf 1 g an ihr Ausgangsgewicht heranreichen, bleibt dieser Effekt nicht erhalten.

Vergleicht man in Abbildung 14 innerhalb der oben genannten Phasen von je 19 Tagen die Aufnahme der Zusatz-Diät an den Effekttage (= Tage, die auf eine Injektion folgen) mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney, so ergibt sich für Phase a eine signifikant erniedrigte Aufnahme der Zusatz-Diät (im Mittel -8,4 kJ, $P \leq 0,01$), für Phase b ergibt sich an den Effekttagen zwar noch eine erniedrigte Aufnahme der Zusatz-Diät, die jedoch durch

die erhöhte Aufnahme an den behandlungsfreien Tagen bereits zu einem leichten Anstieg der mittleren Aufnahme der Zusatz-Diät in dieser Phase führt (im Mittel + 6 kJ, $P \leq 0,01$). Der Einfluss des gleich bleibenden sCT-Effekts wird durch den Anstieg des Niveaus der mittleren Aufnahme von Zusatz-Diät überkompensiert.

Die statistische Beurteilung des Verlaufs beruht auf den täglichen individuellen Differenzen zwischen mit sCT behandelten Mäusen und den entsprechenden Mittelwerten der Kontrollen, deren mittlere Periodik in Abbildung 14 dargestellt ist. Diese Differenzen werden nach Vorzeichen gruppiert und unter Anwendung des entsprechenden STATISTICA-Programms hinsichtlich der Vorzeichenverteilung geprüft (Vorzeichentest). Die Aufnahme der energetisch weniger relevanten Standard-Diät liegt in der Vorperiode bei den mit sCT behandelten Tieren nur geringfügig unter den späteren Kontrollen. In den Behandlungsphasen a, b und c nehmen die mit sCT behandelten Tiere signifikant mehr Standard-Diät auf als die Kontrollen (Phase a, b, c: $P \leq 0,001$). Auch die Aufnahmen der Zusatz-Diät unterscheiden sich im Vorlauf nicht voneinander. Jedoch ist ihre Aufnahme in den Phasen a und b bei den mit sCT behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den Kontrollen (Phase a, b: $P \leq 0,01$). In Phase c unterscheidet sich die Aufnahme der Zusatz-Diät bei mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen nicht mehr.

Abbildung 15 zeigt die Daten, die Abbildung 14 zu Grunde liegen, für die mit sCT behandelten Tiere über den Behandlungszeitraum als zeitsummierte Aufnahmen von Standard-Diät, Zusatz-Diät und Gesamtenergie (als Summe der beiden Komponenten), und zwar wiederum als Abweichung von der Energieaufnahme der Kontrolltiere. Hierbei ist zu beachten, dass auch die Energieaufnahme der Kontrollen über die Zeit summiert wird. Die statistische Analyse für die Einzel-Diäten wurde auf der Grundlage der Darstellung in Abbildung 14 bereits beschrieben. Die in dieser Abbildung nicht dargestellte Gesamtenergieaufnahme wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben statistisch analysiert. Dabei ergeben sich die folgenden Resultate. Im Vorlauf unterscheidet sich die Aufnahme der Gesamtenergie der eingeteilten Gruppen nicht voneinander. Die Gesamtenergieaufnahme der mit sCT behandelten Tiere ist in Phase a signifikant niedriger ($P \leq 0,001$), durch die stetig steigende Aufnahme der Standard-Diät verringert sich die nun nicht mehr signifikante Differenz in Phase b. In Phase c kommt es bei den mit sCT behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikant überschießenden Gesamtenergieaufnahme ($P \leq 0,001$). Die Darstellung der Gesamtenergieaufnahme erklärt, weshalb die mit

sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen lediglich am Anfang der Behandlung abnehmen und gegen Ende der Behandlung kaum noch ein Unterschied besteht.

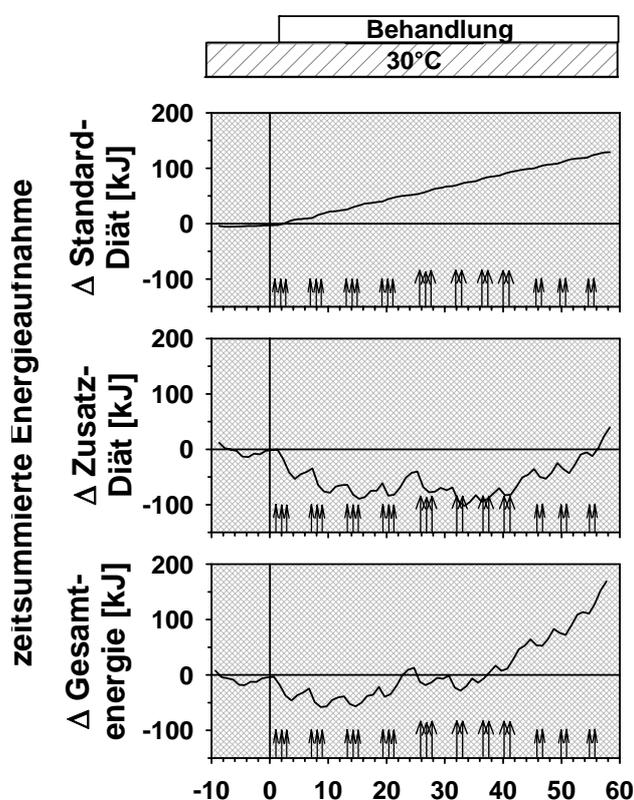


Abbildung 15: Verlauf der zeitsummierten Energieaufnahme von mit sCT behandelten C57Bl/6J Mäusen (N=4) aus Abbildung 14 vom ebenfalls zeitsummierten Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, N=4) während des zehntägigen Vorlaufs und der achtwöchigen Pulsbehandlung. Die Pfeile markieren die Injektionstage sCT-Dosis: 50 pmol/d (kleiner Pfeil), 500 pmol/d (großer Pfeil). Standard- und Zusatz-Diät, Umgebungstemperatur $30 \pm 0,5$ °C.

Die Tiere wurden am Versuchsende auf Veränderung in der Feuchtmasse, Fettmasse und dem Fettgehalt untersucht (einfaktorielle Varianzanalyse). In keinem der Parameter lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tieren und den Kontrollen feststellen (Tabelle 15).

Parameter der Körperzusammensetzung	sCT	SEM	Kontrollen	SEM	P
Feuchtmasse [g]	40,5	3,0	41,1	1,6	n.s.
Fett [g]	20,3	2,6	22,0	1,1	n.s.
Fett %	53,2	0,6	49,5	3,1	n.s.
FFDM [g]	5,4	0,1	5,3	0,1	n.s.

Tabelle 15: Finale Körperzusammensetzung der C57Bl/6J Mäusen (N=4), die eine Pulsbehandlung mit subkutan verabreichtem Lachs-Calcitonin (sCT) erhielten und ihren Kontrollen (N=4) aus Abbildung. 14 und 15. P= Signifikanz des Unterschieds der behandelten Tiere zu den Kontrollen, einfaktorielle Varianzanalyse, n.s.= nicht signifikant.

3.2.3.4 Langzeitversuch mit sCT-Pulsbehandlung bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren

Die in der Anfangsphase Erfolg versprechende sCT-Pulsbehandlung adulter C57Bl/6J Mäuse wurde zeitgleich auch an heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen beginnend mit dem Tag des Absetzens durchgeführt. Auch hier gilt, dass die Jungtiere mit deutlichen individuellen Schwankungen nach dem Absetzen sowohl Standard- als auch Zusatz-Diät aufnehmen, und zwar in einem Verhältnis, das dem bei Adulten beobachteten entspricht, und sie nehmen kontinuierlich an Gewicht zu. Da auch hier Werte der Energieaufnahme erst ab Behandlungsbeginn vorlagen, kann ein möglicher Therapieeffekt nur anhand des Vergleichs von Kontrolltieren und behandelten Tieren nachgewiesen werden.

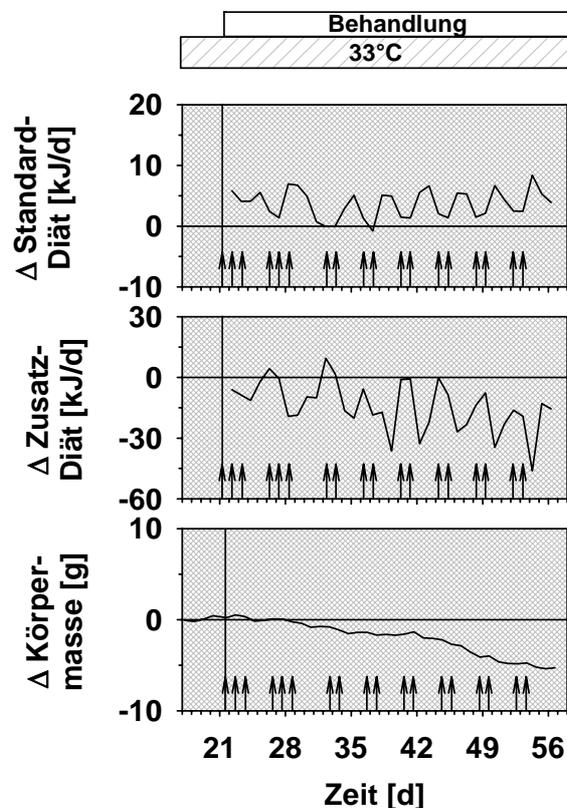


Abbildung 16: Abweichung der Energieaufnahme und Körpermasse heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse ($N=4$), die von Lebenstag 21 bis 56 eine sCT Pulsbehandlung (abwechselnd an 2-3 Tagen sCT, gefolgt von 2-4 behandlungsfreien Tagen) erhielten, vom Mittelwert ihrer Kontrollen (=Null-Linie, $N=3$). sCT-Dosis: 50 pmol/d, subkutan appliziert. Standard- und Zusatz-Diät. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung für Standard- und Zusatz-Diät, Umgebungstemperatur $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Abbildung 16 zeigt beispielhaft für eine von zwei untersuchten Versuchsgruppen die Verlaufskurven für die Aufnahme von Standard- und Zusatz-Diät in kJ/d sowie der Körpermasse in g als Abweichung der mit sCT pulsbehandelten MC4R-defizienten Jungtieren ($N=4$) zu ihren Kontrollen ($N=3$). Die mit sCT behandelten Jungtiere zeigen nach den Injektionen eine erhöhte Aufnahme der Standard-Diät (oberer Abschnitt), dabei

fällt die Aufnahme der Standard-Diät der mit sCT behandelten Tiere anfangs an den unbehandelten Tagen auf das Niveau der Kontrollen zurück, wobei die Amplitude während der ersten Woche ca. 5 kJ umfasst. Ab dem vierten Behandlungspuls bleibt die Aufnahme der Standard-Diät auch in den behandlungsfreien Intervallen erhöht, auf jede sCT-Behandlung folgt ein erneuter sprunghafter Anstieg der Aufnahme der Standard-Diät.

Die dauerhafte Erhöhung der Aufnahme der Standard-Diät entspricht den bereits erhobenen Daten für kontinuierliche Langzeitbehandlungen mit sCT, bei denen die Aufnahme der Standard-Diät während der Behandlung erhöht ist.

Im Vergleich zu den nachfolgend beschriebenen Veränderungen der Zusatz-Diät sind in der Abbildung 16 die unterschiedlichen Skalierungen zu beachten. Die Aufnahme der Zusatz-Diät (mittlerer Abschnitt) der mit sCT behandelten Tiere ist im Vergleich zu ihren Kontrollen nach den Injektionen erniedrigt, gefolgt von einem Wiederanstieg, dessen Amplitude während der ersten Woche ca. 20 kJ umfasst. Sie ist also vier Mal größer als bei der Aufnahme von Standard-Diät. Da die sCT-Wirkung trotz der drei Injektionstage nur über zwei Tage erhalten blieb, wurde die Pulsdauer auf zwei Injektionstage verkürzt. Das daraufhin erprobte Pulsmuster von zwei Injektionstagen, gefolgt von zwei behandlungsfreien Tagen, führte zu einer verminderten Aufnahme der Zusatz-Diät an den Effekttagen der mit sCT behandelten Tier im Vergleich zu den Kontrollen. An den behandlungsfreien Tagen, war die Aufnahme der Zusatz-Diät zwar erhöht, überschritt jedoch nicht das Niveau der Kontrollen und lag gegen Behandlungsende deutlich unter dem Niveau der Kontrollen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den Ergebnissen bisheriger Langzeitbehandlungen mit sCT, bei denen es letztlich zu einer überschießenden Aufnahme der Zusatz-Diät gegen Behandlungsende der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen kommt. Das heißt, dass der Behandlungseffekt während des Beobachtungszeitraums von 24 Tagen monophasisch ist. Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Verläufen der Körpermasse-Entwicklung wider. Bei den Jungtieren zeigt die Körpermasse (Abbildung 16 unterer Abschnitt) am Anfang der Behandlung keinen Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tiere und Kontrollen. Schon ab Lebenstag 28, nach bereits zwei Behandlungspulsen, kommt es zu einer moderat verzögerten Zunahme der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Die Differenz der Körpermasse zwischen mit sCT behandelten Tieren und ihren Kontrollen vergrößert sich kontinuierlich bis zum Ende der Behandlung. Dagegen kommt es bei den erwachsenen Tieren nach 20 Tagen zu einem Stillstand der Massenabnahme (Abbildung 14, unterer Abschnitt).

Abbildung 17 stellt für die Beispielgruppe die zeitsummierte Aufnahme von Standard- und Zusatz-Diät und die Gesamtenergie als Abweichung zu der ebenfalls zeitsummierten Energieaufnahme der Kontrollen in kJ/d dar.

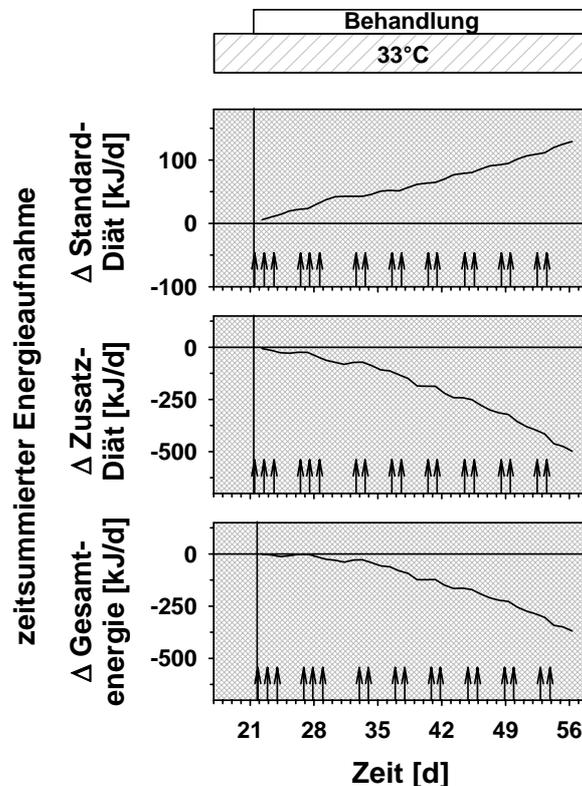


Abbildung 17: Verlauf der zeitsummierten Energieaufnahme der heterozygoten MC4R-defizienten Mäuse ($N=4$) aus Abbildung 16 die eine Pulsbehandlung erhielten, im Vergleich zum jeweiligen Mittelwert der Kontrollen (=Null-Linie, $N=3$). sCT-Dosis: 50 pmol/d, subkutan appliziert. Standard- und Zusatz-Diät. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung für Standard- und Zusatz-Diät bzw. Gesamtenergie Umgebungstemperatur $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Die zeitsummierte Aufnahme der Standard-Diät der mit sCT behandelten Tiere steigt stetig und liegt deutlich über ihren Kontrollen. Die energetisch stärker ins Gewicht fallende zeitsummierte Aufnahme der Zusatz-Diät liegt unter den Kontrollen und sinkt kontinuierlich weiter. Entsprechend stellt sich der Verlauf für die Gesamtenergieaufnahme dar. Die Aufnahme der Gesamtenergie der mit sCT behandelten Tiere liegt ebenfalls niedriger als die Gesamtenergieaufnahme der Kontrollen.

Die in den Abbildungen 16 und 17 beispielhaft beschriebenen Befunde wurden an einer Gruppe erhoben, bei der der sCT-Effekt besonders deutlich war. Um das hier dargestellte Ergebnis zu überprüfen wird nachfolgend das an beiden Gruppen gewonnene Gesamtergebnis für den Zeitraum von Lebenstag 21-56 dargestellt.

3.2.3.5 sCT-Pulsbehandlung bei MC4R-defizienten Absetzern: Vergleich der Behandlung von Lebenstag 21 bis 56 zu Behandlung bis Lebenstag 96

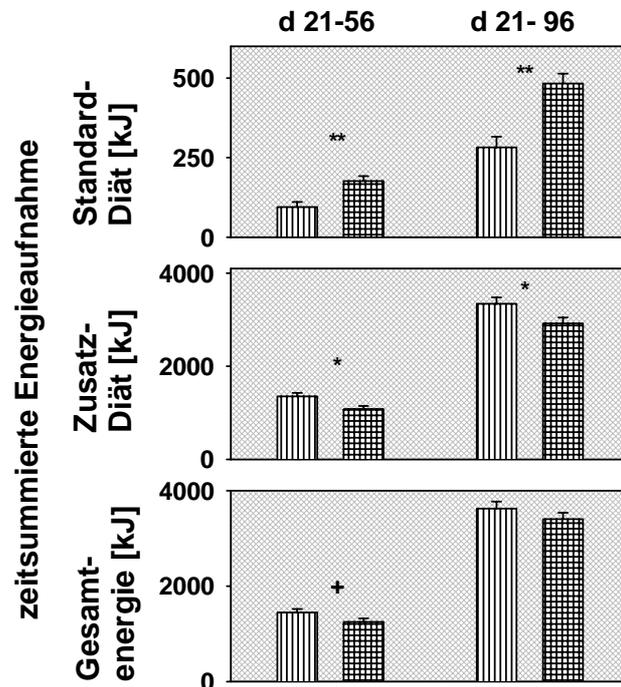


Abbildung 18: Summe (\pm SEM) der Energieaufnahme heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse, unter sCT Pulsbehandlung zwischen Lebenstag 21 und 56 bzw. Lebenstag 21 und 96 im Vergleich zu den Kontrollen. Gezeigt sind die Absolutwerte der mit sCT behandelten Tiere (karierte Balken, N=10) und die ihrer Kontrollen (gestreifte Balken, N=9). Standard- und Zusatz-Diät, Umgebungstemperatur $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$. ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$; + $P \leq 0,1$.

Die Daten für den Zeitraum Lebenstag 21-56 umfassen die oben genannten zwei Versuchsgruppen. In zwei weiteren Versuchsgruppen diente die verlängerte Behandlungsdauer dazu, mögliche persistierende Effekte zu erfassen. Abbildung 16 zeigt die Summe der Energieaufnahme für Standard-, Zusatz-Diät und Gesamtenergie als Mittelwerte über alle Versuchsgruppen mit sCT Pulsbehandlung vom Absetzen bis zum Lebenstag 56 bzw. bis zum Lebenstag 96. Die Untersuchung des Geschlechtseinflusses ergibt, mit Ausnahme der Aufnahme der zeitsummierten Standard-Diät ($P \leq 0,05$), bei einer sCT-Behandlung bis Lebenstag 96, keine Signifikanz (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Reduktion der Energieaufnahme in %, Geschlecht) so dass männliche und weibliche Tiere zusammen ausgewertet werden konnten. Der Wurfeinfluss wird ebenfalls in beiden Gruppen geprüft (zweifaktorielle Varianzanalyse, Faktoren: Reduktion der Energieaufnahme in % und Wurf). Bei der Behandlung von Lebenstag 21-56 ist er signifikant bei der Körpermasse am Tag des Absetzens ($P \leq 0,05$), bei der Energieaufnahme über die Zusatz-Diät und dem entsprechend auch bei der Gesamtenergieaufnahme ($P \leq 0,001$). Unter der Behandlung der Tiere von Lebenstag 21-96 ist der Wurfeinfluss bei allen Parametern mit Ausnahme der

Energieaufnahme durch Standard-Diät signifikant (Körpermasse an Tag 21 $P \leq 0,001$, für alle anderen Parameter $P \leq 0,05$).

In beiden Versuchsgruppen (Abbildung 18) liegt die insgesamt aufgenommene Menge der Standard-Diät der mit sCT behandelten Tiere signifikant über ($P \leq 0,01$) und die zeitsummierte Aufnahme der Zusatz-Diät signifikant unter ($P \leq 0,05$) der der Kontrollen. Die Betrachtung der Gesamtenergie zeigt, dass bei der Behandlung bis Lebenstag 56 der Unterschied in der Gesamtenergieaufnahme das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt und sich bei der Behandlung bis Lebenstag 96 weiter verringert.

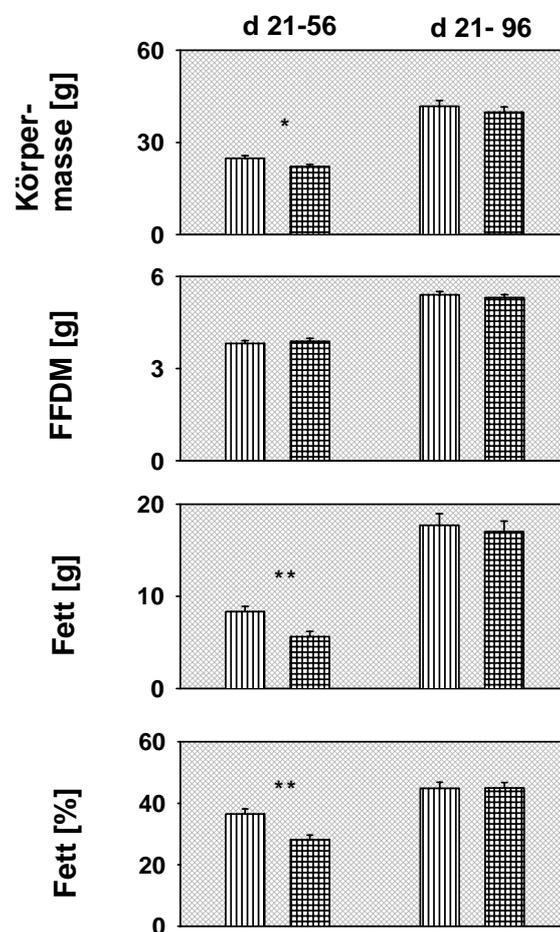


Abbildung 19: Mittelwerte (\pm SEM) der Körperzusammensetzung der heterozygoten MC4R-defizienten Mäuse aus Abbildung 18, die von Lebenstag 21 bis 56 bzw. von Lebenstag 21 bis 96 eine sCT-Pulsbehandlung erhielten (karierte Balken, $N=10$) und ihren Kontrollen (gestreifte Balken, $N=9$). Standard- und Zusatz-Diät Umgebungstemperatur $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$. ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Betrachtung der Körpermasse und Körperzusammensetzung am Ende der Behandlung in Abbildung 19 wider. Die Körpermassen am Lebenstag 56 unterscheiden sich bei mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen

signifikant ($P \leq 0,05$), während bei einer Behandlung bis Lebensstag 96 kein Unterschied zwischen mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen mehr besteht. Die Untersuchung der Körperzusammensetzung zeigt weiterhin, dass für die bis Lebensstag 56 mit sCT behandelten Tiere ein signifikanter Unterschied in Fettgehalt und -masse ($P \leq 0,01$) nachgewiesen werden kann, während bei bis Lebensstag 96 mit sCT behandelten Tieren dieser Unterschied nicht aufrechterhalten bleibt.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass es im Verlauf der Entwicklung zu exzessiver Fettspeicherung zu einer allmählichen Sollwertverschiebung in Richtung auf einen erhöhten Körperfettgehalt kommt, die allen das Körperfett reduzierenden Einflüssen entgegenwirkt. Dabei werden offenbar den Behandlungseffekt kompensierende Faktoren wirksam. Auch die vergleichsweise lang anhaltende Wirkung der Langzeit-Intervall-Behandlung mit sCT kann daher in die gestörte Regulation bei MC4R-Defizienz nicht dauerhaft erfolgreich eingreifen.

4 Diskussion

Anliegen dieser tierexperimentellen Arbeit war es, im Hinblick auf die bisher unbefriedigenden Therapieansätze für Adipositas bei Menschen einen pharmakologischen Ansatzpunkt zu finden, der zu einer langfristig wirksamen Behandlung adipöser MC4R-defizienter Mäuse führt und der in Zukunft speziell bei der entsprechenden, überwiegend als Haploinsuffizienz auftretenden, Mutation beim Menschen angewandt werden könnte. Um die Differenz zwischen den Untersuchungen am Tiermodell und menschlichen Lebensgewohnheiten so weit wie möglich zu verringern, wurden die Tiere in einigen Versuchen veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt. Diese imitieren annähernd zivilisatorische Lebensgewohnheiten, wie den Aufenthalt in weitgehend thermoneutraler Umgebung (TN), sowie Zugang zu einer hochkalorischen, wohlschmeckenden Kost bei gleichzeitigem Angebot einer ausgewogenen Diät, beides in unbegrenzter Menge. Untersucht wurden pharmakologische Stoffe für die bereits Untersuchungsergebnisse in der Literatur vorliegen. Für das kausale Pharmakon α -MSH und dessen ebenfalls zentral zu verabreichende Derivate NDP- α -MSH und β -MSH liegen überwiegend Daten von Untersuchungen an Ratten vor. Diese Datensammlung sollte für Mäuse erweitert werden. Als Grundlage dienten Analysen an C57Bl/6J Mäusen, die zur Ausbildung einer diätinduzierten Adipositas neigen, ohne jedoch eine definierte Mutation in der Körpergewichtsregulation aufzuweisen. Für dieses Tiermodell konnte in der vorliegenden Studie für keine der eingesetzten Substanzen ein längerfristiger relevanter Einfluss auf die Energieaufnahme und die Körpermasse nachgewiesen werden. Um methodische Fehler in der Versuchsreihe auszuschließen, wurden bei den C57Bl/6J Mäusen Vergleichsuntersuchungen mit zentral verabreichten Leptin durchgeführt. Hierbei kam es sowohl zu einer signifikanten Reduktion der Futtermittelaufnahme, als auch zu einer Abnahme der Körpermasse der mit Leptin behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Entsprechende Untersuchungen an MC4R-defizienten Mäusen wurden nicht durchgeführt, da adulte, adipöse, homozygote und heterozygote MC4R-defiziente Mäuse bereits eine sekundäre Leptin-Resistenz entwickelt haben und gegenüber Leptin nicht mehr responsiv sind (Marsh *et al.* 1999).

In Folgeversuchen wurde die Wirkung des auch peripher zu verabreichenden MSH-Derivats MTII (Acetyl-(Nle⁴, Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰)-cyclo- α -MSH (4-10) amide acetate salt) untersucht. In Anlehnung an eine Studie, die an homozygoten MC4R-defizienten Mäusen und Wildtypen durchgeführt wurde (Marsh *et al.* 1999), sind in dieser Versuchs-

reihe, neben den als Vergleich dienenden C57Bl/6J Mäusen, heterozygote MC4R-defiziente Tiere auf Veränderungen in der Energieaufnahme und Körpermasse untersucht worden.

Die Behandlung mit Lachs Calcitonin (sCT) ist die Fortsetzung einer Studie, in der die Wirkung eintägiger sCT Injektionen auf die Energieaufnahme bei C57Bl/6J Mäusen und homozygoten MC4R-defizienten Mäusen untersucht wurde (Eiden *et al.* 2002). Aufbauend auf den Ergebnissen wurden erstmals Untersuchungen an heterozygoten MC4R-defizienten Tieren durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von sCT-Behandlungen unter den oben genannten Umweltbedingungen (Zugang zu einer hochkalorischen Diät/TN) sowohl bei heterozygoten, als auch homozygoten MC4R-defizienten Tieren überprüft. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wurden bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen erstmalig Langzeituntersuchungen mit sCT durchgeführt und über die Bestimmung der Körperzusammensetzung der Langzeiteffekt der Behandlung ermittelt. Außerdem wurden erstmals Langzeitbehandlungen an juvenilen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen, beginnend mit dem Absetzen, vorgenommen.

4.1 α -MSH UND SEINE BETEILIGUNG AN DER ENERGIEHOMÖOSTASE

4.1.1 α -MSH und die Vermittlung seiner Wirkung

4.1.1.1 POMC und die Melanokortine

POMC ist ein zwischen 31-36 kD großes Präprohormon, das überwiegend in der Hypophyse, dem Nucleus arcuatus (ARC) im Hypothalamus und im Nucleus tractus solitarii (NTS) des Hirnstamms exprimiert wird (Wikberg 1999). Aus diesem Hormon entstehen in Abhängigkeit zur Gewebeart durch Abspaltung mit Hilfe unterschiedlicher Prohormon-Konvertasen Peptidhormone (Pritchard *et al.* 2002), unter anderem die in der vorliegenden Arbeit zum Teil zur pharmakologischen Behandlung verwendeten Melanokortine α -, β - und γ -melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH). Bei allen drei Melanokortinen findet sich die bioaktive Aminosäuresequenz (His-Phe-Arg-Trp) (Wikberg 1999). Als das für die Energiehomöostase wesentlichste Melanokortin gilt zur Zeit das α -MSH. Der Einfluss von ACTH und α -MSH auf die Futteraufnahme bei Ratten wurde bereits Ende der achtziger Jahre erwähnt (Poggioli *et al.* 1986). Größere Beachtung fand die Rolle des Melanokortin-Systems für die Kontrolle der Energiebilanz allerdings erst, als die Klonierung der Melanokortin-Rezeptoren, insbesondere die des MC4R gelang.

4.1.1.2 Melanokortin-Rezeptoren

Bei Säugetieren sind bislang fünf verschiedene Melanokortin-Rezeptoren (MC1-5R) bekannt. Sie gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, deren Wirkung über die Stimulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Wikberg 1999; MacNeil *et al.* 2002) ausgelöst wird. Die Entdeckung, Isolierung und Klonierung der einzelnen Rezeptoren erfolgte innerhalb weniger Jahre (Chhajlani *et al.* 1993; Gantz *et al.* 1993; Gantz *et al.* 1993; Slominski *et al.* 1996; Wikberg 1999)(MC1R/MC2R/MC3R und MC4R/MC5R), wobei sich eine Sequenzhomologie der Rezeptoren von 40-60% findet. Die einzelnen Rezeptoren zeigen eine unterschiedliche Affinität zu den Melanokortinen und endogenen Antagonisten. Der MC1R findet sich in der Hypophyse, den Hoden, Ovarien und der Plazenta. Außerdem wird der Rezeptor an Oberflächen unterschiedlicher Blutzellen (Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) sowie Endothelialzellen, Gliomazellen und Astrozyten, Fibroblasten und Keratozyten exprimiert. Das Expressionsmuster dieses Rezeptors legt die Vermutung nahe, dass er an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist (Chhajlani 1996; Luger & Lotti 1998). Der MC2R findet sich in der Haut und im Kortex der Nebenniere. Dieser Rezeptor, früher auch als ACTH-Rezeptor bezeichnet, ist an der Vermittlung der Funktion von ACTH an der Steroidsynthese beteiligt (Tsigos *et al.* 1993; Wikberg 1999). Der MC3-Rezeptor ist peripher in der Plazenta, dem Darm und dem Herzen (Chhajlani 1996) und zentral nachzuweisen. Untersuchungen der MC3R Knockout-Maus, die einen Anstieg der Fettmasse bei reduzierter Körpermasse zeigt, obwohl die Tiere hypophag sind und keine Veränderungen in der Stoffwechselrate aufweisen, lassen darauf schließen, dass dieser Rezeptor an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt ist (Chen *et al.* 2000). Ausschließlich zentral wird der MC4R exprimiert, dieser ist der wichtigste hinsichtlich seiner Beteiligung an der Energiehomöostase, er findet sich im Gehirn (Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Stammhirn) und dem Rückenmark (Mountjoy *et al.* 1994; Kishi *et al.* 2003). Ein Zusammenspiel des MC4R und Leptin wird seit längerem postuliert und wurde durch Untersuchungen unterschiedlicher Antagonisten des Melanokortin-Systems nachgewiesen (Seeley *et al.* 1997; Kask *et al.* 1998; Satoh *et al.* 1998). Neben seiner großen Bedeutung in der Energiehomöostase ist der MC4R außerdem an der Vermittlung des antipyretischen Effekts, ausgelöst durch α -MSH, beteiligt (Sinha *et al.* 2003; Sinha *et al.* 2004). Endogene Melanokortine sind als fiebersenkende Regulatoren bei fiebrigen Erkrankungen bekannt, diese Aufgabe steht eng mit antiinflammatorischen Effekten auf Zytokine in Verbindung (Tatro & Sinha 2003). Der MC5R wird in einer Vielzahl an Geweben exprimiert, darunter

Nebenniere, Fettzellen, Nieren, Leber, Lungen, Lymphknoten, Brustdrüse, Hoden Ovarien und Uterus (Thody *et al.* 1976; Chhajlani *et al.* 1993) und vereinzelt in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen, dem Magen und der Milz (Chhajlani 1996). Seine Funktion ist bislang ungeklärt, die Beteiligung des MC5R an der durch MSH-Peptiden ausgelösten Lipolyse in der Peripherie wird diskutiert (Wikberg 1999).

4.1.1.3 Endogene Antagonisten und Hilfsproteine

Agouti und Agouti-Related-Protein (AGRP) sind die endogenen Antagonisten des Systems mit unterschiedlicher Affinität zu den verschiedenen Rezeptoren (Dinulescu & Cone 2000; Yang *et al.* 2003). *In vitro* verhalten sich beide Peptide wie inverse Agonisten, das bedeutet, dass in Abhängigkeit von ihrer Anwesenheit eine inaktive Konformation des Rezeptors unterstützt wird (Nagle *et al.* 1999; Nijenhuis *et al.* 2001; Yang *et al.* 2003), so dass der endogene Agonist nicht wirksam werden kann. AGRP bindet überwiegend an den MC3R und den MC4R, seine Affinität zu anderen MCR ist gering. Es wird im Hypothalamus, Subthalamus, der Nebennierenrinde, und zum Teil in den Nieren und der Lunge exprimiert (Ollmann *et al.* 1997). Physiologische Funktion des in der Haut exprimierten Proteins Agouti ist die Bestimmung der Fellfarbe in Interaktion mit α -MSH über eine Bindung am MC1-Rezeptor (Duhl *et al.* 1994; Yen *et al.* 1994). Kommt es wie bei der A^Y Maus zu einer übermäßigen ektopischen Expression von Agouti und so zu einer zentralen Wirkung führt dies durch die Konkurrenz zu α -MSH am MC4R zur Adipositas (Carroll *et al.* 2004). Die zentral orexigen wirksamen Stoffe Mahagony und Syndecan-3 interagieren mit Agouti und AGRP. Mahagony, besonders stark vertreten im Gehirn und der Haut, ist an der Fellfärbung beteiligt. Eine Mutation dieses Gens unterdrückt bei gleichzeitig dominantem Defekt im Agouti Protein (A^Y Mutante) die gelbe Fellfarbe und auch die Adipositas vollständig (Gantz & Fong 2003). Zudem scheint Mahagony einen Einfluss auf die metabolische Rate zu haben. Das Zusammenspiel mit dem Melanokortin-System ist noch nicht vollständig geklärt. Syndecan-3 ist ein Proteoglycan, das extrazelluläre Liganden binden kann. Es wird vermutet, dass Syndecan-3 eine Rolle als physiologischer Modulator des Fressverhaltens im Hypothalamus spielt, indem es den Antagonismus von AGRP gegenüber α -MSH am MC4R steigert. Außerdem wirkt es als Co-Rezeptor für AGRP (Gantz & Fong 2003).

4.1.2 Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit α -MSH hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse

Es ist in Untersuchungen an Ratten vielfach belegt, dass bei ungestörter Rezeptorfunktion die durch α -MSH hervorgerufene Wirkung auf die Energieaufnahme überwiegend innerhalb der ersten Stunden nachgewiesen werden konnte (Poggioli *et al.* 1986; Huang *et al.* 1999; Abbott *et al.* 2000; Kask *et al.* 2000; McMinn *et al.* 2000; Millington *et al.* 2001). Ein Effekt über 24 h ist dagegen nicht festzustellen (Abbott *et al.* 2000; McMinn *et al.* 2000; Millington *et al.* 2001; Wirth *et al.* 2001). Lediglich in einer Studie (McMinn *et al.* 2000) kann eine langfristige Wirkung einer Behandlung mit α -MSH gezeigt werden. Neben der signifikant niedrigeren zeitsummierten Energieaufnahme der mit α -MSH behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen ist der Zuwachs an Körpermasse der mit α -MSH behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant geringer. Die mit α -MSH behandelten Ratten zeigen außerdem eine Abnahme der Fettmasse und des Fettgehaltes, sowie der fettfreien Körpermasse, die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreicht. Bei Betrachtung der Verlaufswerte der Energieaufnahme zeigt sich, dass die mit α -MSH behandelten Ratten lediglich am ersten Tag der Behandlung eine signifikant erniedrigte Energieaufnahme aufweisen, die an den folgenden Tagen erniedrigte Futteraufnahme der mit α -MSH behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen erreicht nicht mehr das Signifikanzniveau.

In der vorliegenden Studie an Mäusen zeigte sich kein Einfluss der Behandlung mit α -MSH auf die Energieaufnahme, Körpermasse und Körperzusammensetzung der mit α -MSH behandelten C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Mittelwertvergleiche (Abbildung 5) zeigen sowohl bei den mit α -MSH behandelten C57Bl/6J Mäusen als auch bei den Kontrollen einen signifikanten Abfall der Energieaufnahme an den zwei Tagen nach der Pumpenimplantation und einen Anstieg der Energieaufnahme der mit α -MSH behandelten Tiere und auch der Kontrollen gegen Ende der Behandlung. Die Energieaufnahme der C57Bl/6J Mäuse war trotz unauffälligem Verhalten in den ersten beiden Tagen nach der Operation eingeschränkt.

Bisher wurde im Unterschied zu den eigenen Untersuchungen über Behandlungen im Tierversuch berichtet, in denen nach Setzen der ICV Kanüle mit der Applikation des Pharmakons erst nach einer mehrtägigen Erholungszeit begonnen wurde. Dabei wurde mit

zwei Ausnahmen (McMinn *et al.* 2000; Hill & Dunbar 2002) nicht kontinuierlich infundiert, sondern in Intervallen injiziert. Damit wurde die Überdeckung eines möglichen anfänglichen Behandlungseffekts auf die Energieaufnahme durch Operationseffekte vermieden, die in der vorliegenden Untersuchung in Betracht gezogen werden muss.

Die moderate Abnahme der Körpermasse spiegelt sich in der Studie von McMinn *et al.* (2000) nicht in einer Beeinflussung der Plasmawerte für Leptin und Insulin wider, auch die Expression der für die Energiehomöostase relevanten Neuropeptide wird durch die Langzeitbehandlung mit α -MSH nicht beeinflusst (McMinn *et al.* 2000). Eine Untersuchung der Neuropeptid-Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

RESULTAT: α -MSH eignet sich aufgrund der in der Literatur vorliegenden Befunde und der Ergebnisse der eigenen Studie nicht zur Reduktion des Fettgehalts bei C57Bl/6J Mäusen. Weil auch bei Ratten α -MSH und seine Analoga nur einen kurzfristigen Einfluss auf die Energieaufnahme haben, jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Körperzusammensetzung, ist es insgesamt fraglich, inwieweit dieser Behandlungsansatz generell Erfolg versprechend ist, auch wenn mögliche Speziesunterschiede nicht ausgeschlossen sind. Da ein Therapieeffekt wahrscheinlich über einen Einfluss auf die energiehomöostatisch wichtigen Neuropeptide und Hormone vermittelt wird, sind auch auf dieser Ebene längerfristige Änderungen als Voraussetzung für eine Reduktion der Fettdeposition zu erwarten. Bei Tieren mit genetischem MC4R Defekt bei manifester Adipositas liegen keine Untersuchungen für eine Behandlung mit α -MSH vor. Die Wirkung eines MSH-Analogons bei heterozygoten MC4R-defizienten Tieren wird in Abschnitt 4.4.3 behandelt.

4.1.3 Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit MSH-Derivaten hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse

Auch die Verwendung anderer biologisch aktiverer und stabiler MSH-Derivate blieb ohne Einfluss auf die Energieaufnahme und Körpermasse der mit MSH-Derivaten behandelten C57Bl/6J Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen. NDP- α -MSH ein synthetisches α -MSH Analogon, das biologisch 26 mal aktiver als α -MSH und gegenüber enzymatischem Abbau extrem stabil ist, weist bei Untersuchungen von energetisch nicht relevanten Parametern

eine längere Wirkung auf als α -MSH (Sawyer *et al.* 1980; Hadley *et al.* 1981), doch lässt sich daraus nicht auf eine vergleichbar anhaltende Wirkung auf den Energiehaushalt schließen. Der Grund ist, dass im Energiehaushalt multiple Rückkopplungssysteme wirksam sind (Eiden *et al.* 2005). Zentral verabreicht reduziert es dosisabhängig kurzfristig die Futteraufnahme bei unterschiedlichen Spezies (Brown *et al.* 1998; Koegler *et al.* 2001; Barb *et al.* 2004). Für die Untersuchungen für β -MSH liegen in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse vor. Einerseits wird eine, innerhalb der ersten Stunden nach der Injektion überprüften, dosisabhängige Reduktion der Futteraufnahme beschrieben (Abbott *et al.* 2000; Kask *et al.* 2000), andererseits lässt sich keine Wirkung hinsichtlich der Energieaufnahme, innerhalb eines Zeitraum von 24 h mehrfach gemessen, nachweisen (Millington *et al.* 2001). Langzeituntersuchungen mit Einfluss auf die Energieaufnahme und Körpermasse liegen für NDP- α -MSH, nicht jedoch für β -MSH vor.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie werden adulte C57Bl/6J Mäuse mit unterschiedlichen α -MSH-Derivaten kontinuierlich über sechs Tage, unter anderem auch mit NDP- α -MSH, mit der gleichen Methode, wie in der vorliegenden Arbeit, behandelt (Kim *et al.* 2005). Für zwei MSH-Analoga, zu denen auch NDP- α -MSH gehört, wird eine signifikante Reduktion der Energieaufnahme und der Körpermasse festgestellt. Betrachtet man insbesondere den Verlauf der Körpermasse, beruht die Abnahme vor allem auf einer Reaktion in den ersten Tagen, mit Maxima an Tag zwei und drei. Danach zeigen die Tiere eine kontinuierliche Zunahme, so dass der Verlauf der Behandlung mit den eigenen Befunden für NDP- α -MSH (Abbildung 6) übereinstimmt. Die Auswertung erfolgte bei der Studie von Kim *et al.* (2005) lediglich gegen das Ausgangsgewicht der jeweiligen behandelten Gruppe, im Gegensatz zu der vorliegenden Studie bleiben Verlauf und Abweichung zu den Kontrollen unberücksichtigt. In der vorliegenden Studie kommt es während der zehntägigen Behandlung mit den MSH-Derivaten NDP- α -MSH und β -MSH zu keiner signifikanten Beeinflussung der Energieaufnahme oder Körpermasse. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch nach Ermittlung der Körperzusammensetzung bei den mit NDP- α -MSH behandelten Tieren und Kontrollen, die kein signifikant unterschiedliches Ergebnis für die einzelnen Parameter erbrachte (Tabelle 8).

RESULTAT: Auch von den stabileren MSH-Derivate ist nach den in der Literatur vorliegenden Befunden und aufgrund der eigenen Studie kein längerfristiger Einfluss auf die Energieaufnahme und Körpermasse der mit Derivat behandelten Tiere im Vergleich zu

den Kontrollen zu erwarten. Für MC4R-defiziente Mäuse mit manifester Adipositas ist das gleiche anzunehmen.

4.2 GRÜNDE FÜR DIE UNWIRKSAMKEIT DER ZENTRAL VERABREICHTEN MSH-DERIVATE BEI C57BL/6J MÄUSEN

Für den fehlenden Effekt auf Energieaufnahme und Körpermasse bei zentraler Verabreichung konnten durch die erfolgreichen Kontroll-Untersuchungen mit Leptin methodische Mängel als Ursache ausgeschlossen werden. Als Grund für die Wirkungslosigkeit kann auch der Verschluss der Kanüle im Lauf der Behandlung ausgeschlossen werden, da nur Tiere in die Auswertung einfließen, die nach Behandlungsende eine Anfärbung des Lateralventrikels mit Methylenblau zeigten. Nach Ausschluss methodischer Mängel, scheint die Unwirksamkeit der zentral verabreichten MSH-Derivate in der Regulation des Melanokortin-Systems begründet zu sein. In einer neueren Studie konnte nicht nur gezeigt werden, dass bei Ratten nach Fasten γ_3 -MSH sinkt, sondern auch, dass zwischen dem Absinken des γ_3 -MSH und der AGRP Freisetzung ein nachweisbares Verhältnis besteht (Breen *et al.* 2005). Eine zentrale Verabreichung der MSH-Derivate, könnte eine gegenregulatorische AGRP Freisetzung zur Folge haben. Dies würde auch die nach einigen Tagen beobachtete überschießende Energieaufnahme der mit MSH-Derivaten behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen erklären, die zwar nicht das Signifikanzniveau erreichte, jedoch unabhängig von dem Derivat und der Dosierung zu sehen war. Der kurzfristige in Untersuchungen mit Ratten beobachtete Effekt auf die Energieaufnahme würde demnach in einem Zeitraum nachweisbar sein, bis zu dem keine gegenregulatorische AGRP Freisetzung erfolgt.

4.3 LEPTIN UND DIE VERMITTLUNG SEINER WIRKUNG

4.3.1 Leptin-Rezeptoren

Die Leptin-Wirkung wird über einen Rezeptor der Zytokin-Familie (Tartaglia 1997; Zhang *et al.* 1997) vermittelt. Bislang wurden sechs verschiedene Splice-Varianten des Leptin-Rezeptors (Lep-R entspricht ob-R) entdeckt (Chua *et al.* 1996; Lee *et al.* 1996; Wang *et al.* 1998). Die signaltransduzierende Isoform (Lep-R_b) wird hauptsächlich im Hypothalamus exprimiert (Fei *et al.* 1997; Hill *et al.* 1998), kommt aber auch im Pankreas, Darm, Niere und im Fettgewebe vor (Hoggard *et al.* 1997; Siegrist-Kaiser *et al.* 1997; Hill *et al.* 1998; Morton *et al.* 1998). Sie verfügt als einzige über eine lange zytoplasmatische Domäne mit einer Bindungsstelle für die intrazelluläre Janus-Thyrosin-Kinase (JAK) als Signaltransducer (Trayhurn *et al.* 1999). Infolge der Leptinbindung an diesen Rezeptortyp wird

die JAK phosphoryliert und aktiviert. Die dadurch ebenfalls phosphorylierten Tyrosin-Reste der intrazellulären Rezeptordomäne bilden Bindungsstellen für das Signal-Transkriptions- und Transduktions-Protein (STAT) (Ghilardi *et al.* 1996; Vaisse *et al.* 1996; Bjorbaek *et al.* 1997). Nach dessen Aktivierung und Translokalisierung zum Zellkern erfolgt dort die Expression eines Proteins der Zytokin-Familie (Suppressor of cytokine signaling protein, SOCS), das in einem negativen Rückkopplungsvorgang die Leptin-wirkung inhibiert (Bjorbaek *et al.* 1999; Elias *et al.* 1999; Bjorbaek *et al.* 2000; Krebs & Hilton 2000).

Die kurzen Leptin-Rezeptor Isoformen (Lep-R_{a,c-f}) sind im Hypothalamus, dem Plexus choroideus und zahlreichen peripheren Organen vertreten. Die Funktion der kurzen Isoformen ist nur zum Teil geklärt. Unter anderem wird eine Beteiligung an der Leptin-Clearance in der Niere vermutet (Ahima & Flier 2000). Daneben wird auch eine Speicherung in Geweben wie der Lunge, und dadurch eine Verlängerung der Halbwertszeit durch Bindung an die Rezeptoren (Hill *et al.* 1998) diskutiert. Für Lep-R_a und vor allem für Lep-R_c wird ein Transport von Leptin in und aus der Zerebrospinalflüssigkeit und eine Beteiligung an dem Leptin-Transport über die Blut-Hirn-Schranke angenommen (Bjorbaek *et al.* 1998; Banks 2004). Die Isoform Lep-R_e besitzt als einzige keine intrazelluläre Domäne und dient als lösliches Transportprotein im Blutplasma und ist damit maßgeblich an der Regulation des gebundenen und freien Leptins beteiligt (Lee *et al.* 1996; Uotani *et al.* 1999; Ahima & Flier 2000; Huang *et al.* 2001).

4.3.2 Reaktion von C57Bl/6J Mäusen auf eine zentrale Langzeitbehandlung mit Leptin hinsichtlich Energieaufnahme und Körpermasse

In der vorliegenden Arbeit kommt es im Verlauf der Behandlung von C57Bl/6J Mäusen mit Leptin zu einem temporären Absinken der Futteraufnahme und einem Anstieg der Energieaufnahme auf das Niveau der Kontrollen gegen Behandlungsende. Die Körpermasse nimmt infolge der Leptin-Behandlung ab und verbleibt auf einem abgesenkten Niveau. Dieser Verlauf deckt sich mit Befunden von zentral verabreichtem Leptin in Langzeituntersuchungen bei Ratten (Sahu 2002; Pal & Sahu 2003). Für die Abschwächung der Wirkung auf die Energieaufnahme nach einigen Tagen und die trotz allem auf erniedrigtem Niveau stabilisierte Körpermasse werden ein Anstieg des Energieverbrauchs und eine Erniedrigung des Sollwerts für die Körpermasse diskutiert (Sahu 2002; Pal & Sahu 2003). Wesentlich plausibler ist aber die Beschränkung des Leptin-Effekts durch die Aktivierung entgegenwirkender Rückkopplungssysteme bei abnehmendem Fettgehalt

(Eiden *et al.* 2005) Die Entwicklung der Körpermasse kann jedoch nur bedingt als Spiegel der tatsächlichen Wirkung einer Leptin-Behandlung dienen. Aussagekräftiger ist die Untersuchung der Körperzusammensetzung der Versuchstiere. Die mit Leptin behandelten Tiere (Abbildung 4) haben eine signifikant geringere Feuchtmasse, auch Fettmasse und -gehalt sind nur nahezu halb so groß wie bei den Kontrollen. Die Trockenmasse der mit Leptin behandelten Tiere ist dagegen weniger als 10 % niedriger als die der Kontrollen (Tabelle 7). Die mit Leptin behandelten Tiere aus Abbildung 6 haben ebenfalls eine signifikant geringere Feuchtmasse, Fettmasse und einen geringeren Fettgehalt (Tabelle 8). Auch diese post mortem erhobenen Befunde stimmen mit Literaturbefunden überein. Dass der Einfluss einer Leptin-Behandlung, auf die fettfreie Trockenmasse, wie hier nur begrenzt ist, wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (Halaas *et al.* 1995; Kraeft *et al.* 1999; Chen & Heiman 2000; Döring 2000; Rafael & Herling 2000; Eiden 2002).

RESULTAT: Die hier ermittelten Daten für eine zentrale Behandlung mit Leptin entsprechen den bisherigen Forschungsergebnissen und können daher als Referenzwerte für den erzielten Erfolg einer Behandlung und die korrekte Handhabung der ICV Kanülierung herangezogen werden. Der Befund dient in der vorliegenden Studie in erster Linie als Kontrolle für die Unwirksamkeit der technisch identischen zentralen Behandlung mit MSH-Derivaten bei C57Bl/6J Mäusen hinsichtlich der längerfristigen Reduktion der Energieaufnahme sowie der Körpermasse und -zusammensetzung. Die bei MC4R-defizienten Mäusen durchgeführten Untersuchungen mit Leptin zeigen, dass nur junge homozygote Tiere auf eine Leptin-Behandlung mit einer Reduktion der Nahrungsaufnahme reagieren, ältere Tiere entwickeln, wie auch C57Bl/6J Mäuse auf hochkalorischer Diät, eine Leptin-Resistenz und reagieren nicht auf Leptin-Injektionen (Marsh *et al.* 1999; Eiden *et al.* 2002). So stellt eine Therapie mit Leptin keine adäquate Behandlungsmöglichkeit der Adipositas bei MC4R-defizienten Tieren dar.

4.4 REAKTION AUF PERIPHERE LANGZEITBEHANDLUNG MIT MTII HINSICHTLICH ENERGIEAUFNAHME UND KÖRPERMASSE

4.4.1 Behandlung adulter C57Bl/6J Mäuse

Bei dem MSH-Analogon MTII handelt es sich um ein Peptid mit einer zyklischen Struktur-Komponente. Die zugrunde liegenden Daten der Literatur zeigen bei peripherer Gabe eine über jeweils vier Tage erniedrigte zeitsummierte Energieaufnahme und ein Absinken der Körpermasse. Bei zentraler Gabe ist die Wirkung kürzer (Pierroz *et al.* 2002; Bluher *et al.* 2004). In einer ersten Studie an C57Bl/6J Mäusen mit einer Behandlungs-

dauer bis zu acht Tagen wurde nach dem initialen Abfall ab dem fünften Tag ein Wiederanstieg der Futtermittelaufnahme auf das Niveau der Kontrollen beschrieben, die Körpermasse blieb unverändert erniedrigt. Im Anschluss an die Behandlung kam es zu einer überschießenden Nahrungsaufnahme mit folgender Zunahme der zuvor mit MTII behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen (Pierroz *et al.* 2002). Die nur vier Tage andauernde Wirkung von MTII wird mit einem Gewöhnungseffekt (Tachyphylaxie) begründet, der einerseits durch Desensibilisierung des Rezeptors, andererseits durch eine Überlagerung unterschiedlicher Anpassungsreaktionen auf die Behandlung verursacht sein soll. In der späteren ausführlichen Studie (Blüher *et al.* 2004), werden Mäuse unter verschiedenen Voraussetzungen und unterschiedlichen kurz- und langfristigen Behandlungsansätzen untersucht. Neben normalgewichtigen C57Bl/6J Mäusen werden auch Tiere des gleichen Stamms mit diätinduzierter Adipositas behandelt. Als Kontrollen dienten neben mit Placebo behandelten Tieren in einigen Experimenten zusätzlich paargefütterte Tiere. Bei der Paarfütterung erhält eine Kontrollgruppe bei gleichen Versuchsbedingungen die Menge an Nahrung, die von mit dem Pharmakon behandelten Tieren aufgenommen wird. Auf diese Weise soll getestet werden, ob die Abnahme der Körpermasse nur auf der Reduktion der Energieaufnahme beruht oder das Pharmakon zusätzlich Wirkung auf den Stoffwechsel ausübt. Dieses Verfahren erfasst den Energieumsatz nicht unmittelbar und ist der indirekten Kalorimetrie zur Messung des Energieumsatzes unterlegen. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass Tiere mit DIO stärker auf eine MTII-Behandlung ansprechen. Allgemein stagniert die Abnahme der Körpermasse unter der Behandlung mit dem α -MSH Agonisten nach vier Tagen. Dies kann durch eine Kombinationsbehandlung mit Leptin verhindert werden, so dass eine Beteiligung von Leptin an der Tachyphylaxie auszuschließen ist. Eine überschießende Energieaufnahme nach Abschluss der Behandlung wurde nicht beobachtet (Blüher *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Körperzusammensetzung der Tiere ermittelt, so dass keine Daten für die Energieaufnahme und Körpermasse nach Behandlungsende vorliegen. Bei der Auswertung der Körperzusammensetzung konnte in dieser Arbeit lediglich ein signifikanter Unterschied für die Feuchtmasse, nicht jedoch für weitere Parameter festgestellt werden (Tabelle 10). Im Gegensatz dazu zeigt eine der Studien (Pierroz *et al.* 2002) einen signifikanten Einfluss der MTII Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen auf die fettfreie Körpermasse.

Resultat: Die in der eigenen Studie gefundenen Ergebnisse stimmen während des Versuchsverlaufs mit Literaturberichten überein. Es kommt zu einem vorübergehenden

Absinken der Energieaufnahme, mit einhergehender Abnahme der Körpermasse, die trotz Anstieg der Energieaufnahme auf einem abgesenkten Niveau verbleibt. Eine Abnahme des Körperfettgehalts ließ sich nicht sichern.

4.4.2 Gründe für die Wirksamkeit des peripher verabreichten MSH-Derivats MTII bei C57Bl/6J Mäusen

Im Gegensatz zur zentralen Verabreichung kommt es bei der peripheren Gabe von MTII zu einem langsameren Anstieg des Pharmakons am Wirkungsort und so zu einer verzögerten Gegenregulation über AGRP. Unterstützt wird diese These durch die in der Vergleichsstudie (Blüher *et al.* 2004) durchgeführte Untersuchung der Neuropeptid-Expression. Bei kurzfristigen Behandlungen mit MTII steigt die NPY mRNA und AGRP mRNA im Gegensatz zu den paargefütterten Tieren nicht an, nach langfristiger MTII- Behandlung kommt es sowohl bei den mit MTII behandelten Tieren, als auch bei der paargefütterten Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der NPY mRNA und AGRP mRNA. Gezeigt wurde, dass zumindest der Anstieg der Expression von NPY und AGRP unter MTII Behandlung im Unterschied zu den paargefütterten Tieren nicht innerhalb 24 Stunden auftritt. Andererseits ist bei MTII Behandlung nach acht Tagen ein Anstieg der NPY- und AGRP-Expression nachweisbar, der aber bei Kombination mit Leptin zu diesem Zeitpunkt verhindert wird, verbunden mit einer Abnahme der Körpermasse (Blüher *et al.* 2004). Die Autoren schließen daraus, dass bei Behandlung mit MTII AGRP und NPY an der Vermittlung des Gewöhnungseffekts und an dem nach vier Tagen auftretenden Verschwinden der MTII Wirkung auf die Energieaufnahme und Körpermasse beteiligt sind (Blüher *et al.* 2004). MTII hat auch, wenn zentral verabreicht, eine reduzierende Wirkung auf die Energieaufnahme. Über diesen Weg ist die Abnahme der Körpermasse zwar höher als durch reduzierte Energieaufnahme zu erwarten ist (paargefütterte Kontrollen zeigen im Vergleich eine geringere Abnahme), die Dauer der reduzierten Energieaufnahme ist bei der zentralen Gabe jedoch verkürzt (Pierroz *et al.* 2002). Für die kürzere Wirkungsdauer von MTII bei zentraler Gabe wird keine Erklärung gegeben.

4.4.3 Behandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Tiere mit MTII

In Folgeversuchen wurde untersucht, ob bei heterozygoten MC4R-defizienten Tieren eine Reaktion auf eine MTII-Behandlung erfolgt. Ausgehend von den mit Literaturergebnissen übereinstimmenden Daten für C57Bl/6J Mäuse wurde eine periphere zehntägige MTII-Behandlung mittels osmotisch wirksamer Mini-Pumpen an heterozygoten MC4R-

defizienten Mäusen durchgeführt. Die Dosierung wurde entsprechend der Behandlung der C57Bl/6J Mäuse gewählt. Es zeigte sich im Versuchsverlauf weder eine Reduktion der Energieaufnahme noch ein Einfluss auf die Körpermasse der mit MTII behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Eine Erhöhung der Dosis um das 3,5fache zeigte einen leichten, wegen der geringen Endzahl (MTII N=2, Kontrollen N=2) und großer Streuung statistisch nicht weiter untersuchten Abfall der Energieaufnahme und der Körpermasse, der jedoch so gering erschien, dass auch eine weitere Dosiserhöhung kein zufriedenstellendes Ergebnis erwarten ließ. Der theoretische Ansatz durch ein stärker wirksames Analogon des Agonisten eine relative Rezeptorinsuffizienz auszugleichen, hat sich somit für den MC4R (+/-) Genotyp als nicht realisierbar erwiesen.

Im Vergleich zu einer Studie, in der der Einfluss akuter ICV Injektion von MTII bei homozygoten MC4R-defizienten Tiere im Vergleich zu ebenfalls mit MTII behandelten Wildtypen untersucht wurde (Marsh *et al.* 1999), konnte bei der peripheren Behandlung heterozygoter Tiere kein Effekt nachgewiesen werden. In der Vergleichsstudie zeigten die mit MTII behandelte Wildtypen im Vergleich zu den nicht auf die MTII-Behandlung ansprechenden -/- MC4R-defizienten Tieren nach der Injektion eine signifikante Reduktion der Energieaufnahme über 20 h. Die Körpermasse, verglichen mit der Körpermasse vor der Behandlung, unterscheidet sich bei den Wildtypen nach 8 h ebenfalls signifikant, nicht jedoch bei den -/- Tieren (Marsh *et al.* 1999). Verglichen mit dem eigenen Versuchsansatz handelt es sich hier um Kurzzeitbehandlungen, die keinen Rückschluss auf eine langfristige Beeinflussung der Energiebilanz zulassen.

Resultat: Heterozygote adulte MC4R-defiziente Mäuse reagieren trotz vorhandener MC4R, wie die homozygoten MC4R-defizienten Mäuse, nicht auf eine Behandlung mit MTII, auch die Erhöhung der Dosierung führt zu keinem Ergebnis.

4.4.4 Gründe für die Unwirksamkeit des MSH-Derivats MTII bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen

Die mangelnde Reaktion der MC4R-defizienten Tiere auf die Behandlung mit MTII könnte entweder an einer sehr kurzfristig erfolgenden Gegenregulation zur Sicherung des eingestellten Setpoints für die Körpermasse liegen, an einer Störung der kompletten Regulation der Neuropeptide oder an einer Veränderung der noch verbliebenen Rezeptoren, so dass diese sehr viel schwerer zu aktivieren sind. Bisher ist nur wenig über die Regulation der MC4R Signalwege, die Beendigung des Signals, Desensibilisierung und

Internalisierung der Rezeptoren, bekannt. Sie gehören zu den G-Protein gekoppelten Proteinen und lösen nach Aktivierung die Freisetzung von zyklischen Adenosinmonophosphat aus (cAMP). Nachgewiesen ist, dass diese Rezeptorfamilie sehr schnell auf die Anwesenheit eines Agonisten, kurzfristig mit Desensibilisierung und Internalisierung, langfristig mit Downregulierung und einem Gewöhnungseffekt reagieren kann. Insbesondere α -MSH führt *in vitro* zu einer schnellen Sequestrierung des MC4Rs (Shinyama *et al.* 2003). Somit ist die Aktivierung dieser Rezeptoren mittels Pharmaka insgesamt als problematisch zu betrachten.

FAZIT: Der Einfluss von MSH-Derivaten auf Energieaufnahme und Körpermasse ist begrenzt. Gerade weil das Melanokortin-System eine große Bedeutung in der Energiehomöostase hat, ist es theoretisch gut begründet, mit geeigneten Pharmaka am MSH-Signalweg anzusetzen. Es ist jedoch offenbar nicht möglich, länger als allenfalls kurzfristig mit MSH Agonisten, sozusagen monokausal, in diesen Signalweg einzugreifen. Ihre Applikation hat gegenregulatorische und kompensatorische Signale zur Folge, die eine langfristige Wirkung zunichte machen. Bereits durchgeführte Untersuchungen der Wirkung von MSH-Derivaten (MSH/ACTH₄₋₁₀) auf die Körpermasse bei Menschen zeigten zusammenfassend bei schlanken Menschen im Vergleich zu mit einem Placebo behandelten Menschen eine signifikante Erniedrigung der Parameter Körpermasse, body mass index (BMI), Körperfettgehalt sowie Plasmaleptin und -insulinspiegel, ohne Nebenwirkungen hervorzurufen. Eine gleichartige bei Adipösen durchgeführte Studie findet hingegen keinen signifikanten Einfluss der Behandlung (Hallschmid *et al.* 2004). In einer weiteren an Menschen durchgeführten Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass α -MSH und AGRP in adipösen Patienten erhöht ist und sich im Gegensatz zu Schlanken die Expression von α -MSH und AGRP nicht als Reaktion auf Fasten verändert (Hoggard *et al.* 2004). So sind zusätzlich bei Adipösen physiologische Reaktionen auf äußere Reize nicht auslösbar. Diese Ergebnisse, wie die Tatsache, dass die Behandlung zumindest bei MC4R-defizienten Menschen bereits in der Kindheit begonnen werden muss und die Folgen der Therapie auf die sexuelle Reifung (Wessells *et al.* 2000; MacNeil *et al.* 2002) nicht abzusehen sind, lassen MSH-Derivate zur Zeit nicht als geeignete Pharmaka erscheinen, mit denen eine längerfristige Reduktion von Körperfett erreicht werden kann.

4.5 BEHANDLUNG MIT LACHS-CALCITONIN (sCT)

4.5.1 sCT als Amylin Analogon

Calcitonin ist ein Hormon, das in der Schilddrüse gebildet wird und den Calciumhaushalt, besonders in Phasen mit erhöhten Energieansprüchen wie Wachstum, Schwangerschaft und Laktation, reguliert. Im zentralen Nervensystem beeinflusst Calcitonin das Schmerzempfinden, den Appetit und die Sekretion von Magensäure, die Darmmotilität und die motorische Aktivität (Chait *et al.* 1995). Seine Sequenz ist für viele Tierarten bekannt, übereinstimmend weisen alle eine gleiche Abfolge von 32 Aminosäuren auf. Anhand der unterschiedlichen Restsequenz lassen sich drei Gruppen einteilen: Calcitonin der Paarhufer, der Primaten und Ratten und das der Knochenfische und Vögel. Die Gruppen unterscheiden sich in ihrer biologischen Wirksamkeit und Bindungsfähigkeit, so zeigt Lachs-Calcitonin (sCT) z.B. eine stärkere Interaktion mit dem Calcitonin-Rezeptor des Menschen als menschliches Calcitonin (hCT) (Sexton *et al.* 1999).

Die anorektische Wirkung von Calcitonin, zentral vermittelt durch Amylin-Rezeptoren, wurde in den 80er Jahren erkannt (Freed *et al.* 1979; Perlow *et al.* 1980; Twery *et al.* 1982; Gaggi *et al.* 1985). Die durch sCT herbeigeführte Anorexie ist wie bei Amylin nicht mit einer Geschmacksaversion verbunden (Chance *et al.* 1992; Lutz *et al.* 2000).

4.5.2 Wirkung von sCT vermittelt durch Amylin-Rezeptoren

Die Signalwege des Amylins, die Rezeptorenstruktur und Interaktion mit anderen Signalen, sind noch nicht abschließend geklärt, besser erforscht hingegen ist die Signalvermittlung der strukturell und funktional verwandten Peptide Adrenomedullin, Calcitonin und Calcitonin-gene-related Peptide (CGRP) (Wimalawansa 1997). Ihnen gemeinsam ist die Senkung des Calcium-Spiegels im Blut, die Reduktion der Glukose-Aufnahme zur Glykogensynthese und die Verminderung der Nahrungsaufnahme, die durch einen Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphats hervorgerufen wird (Vine *et al.* 1996). Die Signalwirkung wird intrazellulär über G-Proteine und den nachfolgenden Anstieg des zyklischen Monophosphat (so genannter second messenger) vermittelt. Bei den vorgeschalteten Rezeptoren existieren aufgrund unterschiedlichen Gen-Splicings zahlreiche Isoformen (Taylor *et al.* 2002). Neuere Studien unterscheiden zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), einen Calcitonin-Rezeptor und einen Calcitonin-Rezeptor-like Rezeptor (CRLR).

Der Amylin-Rezeptor gehört zur Familie der Calcitonin-Rezeptoren. Calcitonin bindet überwiegend an den Calcitonin-Rezeptor, kann aber auch über Rezeptor-activity-modifying-Proteine (RAMP) an die anderen Rezeptoren binden (Roh *et al.* 2004). Bislang wurden RAMP 1-3 identifiziert, deren Aminosäuresequenzen bis zu 50% übereinstimmen und die nach ihrer Bindung die Oberflächenzellstruktur beeinflussen. So führt RAMP 1 gebunden an den CRLR-Rezeptor, zu einer hohen Affinität für das CGRP, während die Bindung von RAMP 2 und 3 an denselben Rezeptor zu einer selektiven Bindung von Adrenomedullin führt (Poyner *et al.* 2002; Udawela *et al.* 2004). Amylin und sCT binden in der AP über den Calcitonin-Rezeptor_(a) (CT_(a)) und RAMP 2/3, in anderen Arealen, wie z.B. dem subfornikalen Organ konnten hingegen für Amylin und sCT der CT_(a) und CT_(b) und nach intraperitonealen Injektion der beiden Substanzen eine Erhöhung der mRNA von RAMP1/2 nachgewiesen werden (Barth *et al.* 2003). Es ist den RAMP Proteinen also möglich, in Abhängigkeit zu ihrer lokalen Expression den Phänotyp der Rezeptoren mitzubestimmen (Christopoulos *et al.* 1999; Christopoulos *et al.* 2003). Die für sCT stärkere Bindung und dadurch verstärkte Wirkung, kann durch eine unspezifischere Bindungsfähigkeit erklärt werden, so gibt es für dieses Pharmakon keinen Unterschied in der Bindungsfähigkeit zwischen dem Calcitonin- oder Amylin-Rezeptor (Hay *et al.* 2005)

4.5.3 sCT-Wirksamkeit nach eintägigen Injektionen bei unterschiedlichen Umweltbedingungen bei adulten C57Bl/6J Mäusen und MC4R-defizienten Mäusen

4.5.3.1 Änderung der Diät und Umgebungstemperatur bei weiblichen C57Bl/6J Mäusen

Zu Umweltbedingungen, die maßgeblich Einfluss auf die Adipositasausprägung nehmen, gehört die angebotene Diät. C57Bl/6J Mäuse, die neben einer Standard-Diät Zugang zu einer wohlschmeckenden, hochkalorischen Zusatz-Diät erhalten, zeigen auf eintägige sCT-Behandlungen eine signifikant stärkere Reduktion der Energieaufnahme als bei ausschließlichem Zugang zu Standard-Diät. Diese verstärkte Reaktion bleibt selbst dann erhalten, wenn Tiere bereits eine diätinduzierte Adipositas (DIO) einhergehend mit einer Leptin-Resistenz ausgebildet haben und nicht mehr auf eine Leptin-Behandlung ansprechen (Eiden *et al.* 2002).

Da bereits Manipulationen in frühen Phasen der Entwicklung zu einer lebenslang andauernden Fehlprogrammierung thermoregulatorischer und energiehomöostatischer Regelkreise führen (Schmidt 2001) und Tiere bei TN eine schwächere leptinbedingte Reduktion der Körperfettmasse zeigen als Tiere bei Kältebelastung, und weil zudem

Körperfettmasse und Körperfettgehalt exponentiell zu einer steigenden Umgebungstemperatur zunehmen (Steinbrück 2004), ist es von besonderem Interesse, die Wirksamkeit der Pharmaka auch unter TN zu untersuchen. Eine Veränderung der Umgebungstemperatur von Standardbedingungen auf eine Temperatur knapp unter den thermoneutralen Bereich, untersucht an C57Bl/6J Mäusen mit ausschließlichem Zugang zu Standard-Diät, führt bei keiner Dosierung zu einer signifikant stärkeren Reaktion auf eine sCT-Injektion (Abbildung 10). Somit ist der Einfluss der Umgebungstemperatur hinsichtlich der untersuchten Behandlungsansätze im Vergleich zum Nahrungsangebot von untergeordneter Bedeutung.

4.5.3.2 *Änderung der Diät und Umgebungstemperatur bei MC4R-defizienten Mäusen*

Wie die C57Bl/6J Mäuse in der Studie von Eiden et al. (2002) zeigen weibliche heterozygote MC4R-defiziente Mäuse bei einer sCT-Dosis von $500 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ eine signifikant stärkere Reaktion, wenn sie neben Standard-Diät Zugang zu einer hochkalorischen Zusatz-Diät erhalten. Für die mittlere Dosis konnte kein Vergleich angestellt werden, da es an Vergleichstieren gleichen Geschlechts mangelte. Für die niedrigste Dosis von $50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ konnte keine signifikante Steigerung in der Reaktionsstärke auf eine sCT-Injektion festgestellt werden, allerdings sind hierbei die geringe Anzahl der Tiere und die hohe Standardabweichung zu beachten.

Genotypeinfluss: In der Vergleichsstudie zeigen auch homozygote MC4R-defiziente Mäuse eine dosisabhängige signifikante Reduktion der Energieaufnahme, die im Vergleich zu den C57Bl/6J Mäusen signifikant schwächer ist (Eiden et al. 2002). Für die bei -/- Tieren abgeschwächte Reaktion, die auch bei weiteren genetisch prädisponierten Mäusen und Ratten auftritt, wird in erster Linie eine mit einer Hyperinsulinämie einhergehende Hyperamylinämie diskutiert (Eiden et al. 2002). Speziell der Zugang zu Zusatz-Diät bedingt einen erhöhten Plasmainsulinspiegel. Andererseits konnte in einer weiteren Studie kein Genotypeinfluss auf die Plasmainsulinkonzentration zwischen homo- und heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen festgestellt werden (Arens 2005). Geht man von einer mit der Plasmainsulinkonzentration einhergehenden Erhöhung der Amylinkonzentration aus, spricht der fehlende Nachweis eines Genotyp-Einflusses auf den Plasmainsulinspiegel nicht für die Erklärung der – im Vergleich zu den heterozygoten Mäusen – schwachen Reaktion der -/- Tiere auf die sCT-Injektionen durch eine Hyperamylinämie.

Für den Einfluss der fehlenden Kältebelastung, exemplarisch untersucht für die mittlere Dosierung, kann bei heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen kein signifikanter Einfluss auf die Reaktionsstärke bei einer sCT-Behandlung nachgewiesen werden. Auch für den homozygoten Genotyp, untersucht für die mittlere Dosis, wurde bei einer Temperaturänderung trotz gleichzeitigem Zugang zu einer Zusatz-Diät kein signifikanter Unterschied der Reaktion auf eine sCT-Injektion festgestellt.

Geschlechtseinfluss: Da für die männlichen +/- Tiere keine signifikante Steigerung der Reaktionsstärke bei zusätzlichem Zugang zu Zusatz-Diät festgestellt wurde und sowohl bei den heterozygoten als auch bei den homozygoten MC4R-defizienten Tieren die Reaktionsstärke niedriger ist als bei den weiblichen Tieren, ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion auf sCT zu vermuten. In einer an adulten MC4R-defizienten Mäusen mit Zugang zu Standard-Diät durchgeführten Studie konnte festgestellt werden, dass der Plasmainsulinspiegel männlicher MC4R-defizienter Tiere, auch unter Berücksichtigung des Körperfettgehaltes, signifikant höher ist, als bei weiblichen MC4R-defizienten Tieren (Arens 2005). Geht man von einer mit der Plasmainsulinkonzentration einhergehenden Erhöhung der Amylinkonzentration aus, könnte diese für die bei männlichen Tieren schwächere Reaktion auf sCT-Injektionen verantwortlich sein.

Resultat: Für heterozygote MC4R-defiziente Tiere kann für den veränderten Parameter der Diät eine erhöhte dosisabhängige Wirkung der sCT-Injektionen festgestellt werden, während der Parameter Umgebungstemperatur keinen Einfluss auf das Behandlungsergebnis nimmt. Bei homozygoten MC4R-defizienten Mäusen mit Zugang zu einer hochkalorischen Zusatz-Diät kann keine dosisabhängige Steigerung der Wirkung hervorgerufen werden. Ein Genotyp-Einfluss auf die sCT-Wirkung lässt sich nicht sichern. Dagegen besteht ein Geschlechtsunterschied dahingehend, dass sCT bei weiblichen Tieren stärker wirksam ist.

4.5.4 sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch bei kontinuierlicher Behandlung

4.5.4.1 sCT-Langzeitbehandlung mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen

Zwei Durchgänge einer zehntägigen sCT-Behandlung an adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen mittels einmal täglicher subkutaner Injektionen zeigen im Gesamtverlauf keinen dauerhaften Einfluss auf die Energieaufnahme der Tiere. Ähnlich wie bei den Eintagesinjektionen kommt es zu Beginn der Behandlung zu einer verminderten

Aufnahme der Zusatz-Diät und einem moderaten, die Reduktion der Zusatz-Diät nicht kompensierenden Anstieg der Aufnahme von Standard-Diät. Die in der Akutphase gute Wirkung von sCT nimmt im Lauf der Behandlung ab. Es kommt zu einer mangelnden Responsivität auf die sCT-Injektionen. Dieses Ergebnis bestätigt sich auch in der durchgeführten Untersuchung der Körperzusammensetzung, bei der sich keiner der untersuchten Parameter bei mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen unterscheidet.

Eine Kombinationsbehandlung mit sCT und Leptin führte weder zu einer stärkeren Reduktion der Energieaufnahme, noch zu einer verlängerten Wirkung der insgesamt zehntägigen Behandlung.

Resultat: sCT-Langzeitbehandlungen mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei adulten MC4R-defizienten Mäusen haben keinen langfristigen Effekt auf die Energieaufnahme und Körpermasse der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die Kombinationsbehandlung mit sCT und Leptin kann die Wirkung weder verstärken noch verlängern und hat auch keinen Einfluss auf die Körperzusammensetzung. Somit kann ausgeschlossen werden, dass ein durch eine veränderte Leptinkonzentration ausgelöstes Gegensignal für die Abnahme der sCT-Wirkung verantwortlich ist.

4.5.4.2 sCT-Langzeitbehandlung mit kontinuierlicher sCT-Gabe bei juvenilen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen

Die im Ansatz erfolgsversprechende Behandlung adipöser Mäuse mit sCT, allerdings mit fehlender langfristiger Wirkung auf den Körperfettgehalt, ließ vermuten, dass ein möglichst frühzeitiges Eingreifen in die Körperfettregulation relevant sein könnte für den erwünschten Effekt: eine längerfristige Reduzierung des Körperfettgehaltes. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden ausschließlich heterozygote MC4R-defiziente Jungtiere untersucht. Ein erstes Versuchsprogramm bestand in täglichen subkutanen sCT-Injektionen von $500 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$, beginnend mit dem Absetzen, und erstreckte sich über zwei Wochen. Die Tiere reagierten mit einer praktisch durchgehenden, energetisch jedoch nur gering ins Gewicht fallenden, erhöhten Aufnahme der Standard-Diät. Die Aufnahme der Zusatz-Diät zeigt unter der sCT-Behandlung initial eine statistisch nicht verifizierbare Tendenz zur Abnahme, und ebenso in den letzten Tagen der Behandlung. Als Ergebnis unterscheidet sich die Entwicklung der Körpermasse nicht von der der Kontrollen.

Resultat: Im Gegensatz zu der Behandlung adulter heterozygoter MC4R-defizienter Tiere wird bei den Jungtieren mit Zugang zur Zusatz-Diät deren Aufnahme während der ersten Tage der Behandlung mit sCT nicht signifikant gehemmt, obwohl die erhöhte Aufnahme der Standard-Diät unter der sCT-Behandlung zeigt, dass juvenile Tiere im Prinzip sCT-responsiv sind.

4.5.5 sCT-Wirksamkeit im Langzeitversuch mit intermittierender Behandlung

4.5.5.1 sCT-Langzeitbehandlung mit pulsatiler sCT-Gabe bei adulten C57Bl/6J Mäusen

Bei den mittels Pulsbehandlung mit sCT behandelten Tieren kommt es zu einem durchgehend signifikanten Anstieg der Aufnahme der Standard-Diät im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Aufnahme der Zusatz-Diät ergibt sich ein phasischer Verlauf, nach dem Vorlauf (Phase 0) sind drei weitere in etwa gleich lange (19 Tage) Phasen zu erkennen, eine Phase in denen das Niveau der Aufnahme des Zusatzfutters im Mittel unter dem der Kontrolltiere liegt (Phase a), eine zweite Phase in der das Niveau der Kontrolltiere gegen Ende der Phase etwa wieder erreicht wird (Phase b) und eine letzte Phase, in der die Aufnahme von Zusatzfutter tendenziell über der der Kontrolltiere liegt (Phase c). Dieser Verlauf wirkt sich auf den Gewichtsverlauf aus, und nur in der ersten Phase kann für die Abnahme der mit sCT behandelten Tiere vergleichend zu den Kontrollen ein signifikanter Behandlungseffekt festgestellt werden. Gegen Ende der Behandlung erreichen die mit sCT behandelten Tiere, nachdem die Körpermasse zunächst auf einem stabilen niedrigeren Niveau verblieb, annähernd die Körpermasse der Kontrollen. Die Betrachtung der zeitsummierten Energieaufnahme für die Standard- und Zusatz-Diät bestätigt die Betrachtungen. In der Gesamtenergieaufnahme, die für die Kontrollen in Phase a: 57 ± 4 kJ/d, in Phase b: 59 ± 6 kJ/d und in Phase c: 51 ± 5 kJ/d absolut beträgt, kommt es bei den mit sCT behandelten Tieren im Vergleich dazu anfänglich zu einer erniedrigten Aufnahme, die im Mittel auch in Phase b erhalten bleibt. In der letzten Phase, kommt es dann aber zu einer signifikant überschießenden Energieaufnahme, obwohl die phasischen sCT-Effekte im Prinzip erhalten bleiben. Dieser Befund spricht für das Wirksamwerden gegenregulatorischer Rückkopplungssysteme, ein Phänomen, das für das komplexe System der Energiebilanz charakteristisch ist (Eiden *et al.* 2005). Dementsprechend zeigte die ermittelte Körperzusammensetzung keinen Unterschied bei mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen.

Zu den Variablen, die dieses neue Behandlungsmuster bestimmen, gehören die Anzahl der Injektionstage und die Dosierung. Inwieweit die Länge der behandlungsfreien Zwischen-

räume Einfluss hat, kann anhand dieser Erstuntersuchung noch nicht bestimmt werden. Während die Aufnahme der Standard-Diät bei dreitägiger Injektionsdauer auch an drei Tagen gesteigert ist, kommt es bereits ab dem zweiten Puls zu einer nur zwei Tage andauernden Reaktion bei der aufgenommenen Zusatz-Diät. Ab dem vierten Puls kann die verminderte Aufnahme der Zusatz-Diät nur über einen Tag erhalten bleiben. Bei der Steigerung der Dosis um das zehnfache kann die Reaktion wieder auf zwei Tage erhöht werden, die Stärke der Reaktion nimmt jedoch nicht zu. Der daraufhin verkürzte Puls (zwei Injektionstage) nach einer verlängerten behandlungsfreien Zeit (drei statt zwei Tage), mit gleichbleibend hoher Dosis, führt zunächst zu einer stärkeren Reaktion, die am zweiten Tag wieder abnimmt. Die Reaktion auf die beiden folgenden Pulse zeigt sich nur nach dem ersten Injektionstag und die überschießende Energieaufnahme an den behandlungsfreien Tagen nimmt zu. Ein verlängerter behandlungsfreier Zeitraum und eine erniedrigte Dosis, führen bei dem ersten Puls zu einer eintägigen Reaktion. Die folgenden Pulse liegen durch die zwischenzeitlich hohe überschießende Reaktion in ihrer Reaktion auf Niveau der Kontrollen.

Im Unterschied zu der kontinuierlichen Behandlung reagieren die mit sCT behandelten Tiere bis Behandlungsende zumindest am ersten Effektag auf die sCT-Injektionen. Allerdings werden bereits ab dem zweiten Puls die vermuteten gegenregulatorischen Einflüsse wirksam, die die Energieaufnahme über die Zusatz-Diät in den behandlungsfreien Intervallen zunehmend ansteigen lässt. Infolge dieser Gegenregulation hat auch die Erhöhung der Dosis, die bei Eintagesinjektionen zu einer stärkeren Reaktion führt, keinen stärkeren Einfluss auf die Reduktion der Energieaufnahme. Trotz der hohen Dosis wird die Wirkung auf die im Mittel aufgenommenen Energie zunehmend schwächer.

Im Gegensatz zu der Dosiserhöhung hat eine Verlängerung der behandlungsfreien Tage einen positiven Einfluss auf die folgende Injektion. In der Summe wird dieser Effekt hinsichtlich der Gesamtenergiebilanz ebenfalls durch die kompensatorische Zunahme der Energieaufnahme zwischen den Effekttagen ausgeglichen. Somit ist auch nach den Ergebnissen dieser Studie nach wie vor die insgesamt erhöhte Aufnahme von Nahrungsennergie das eigentliche Problem. Allerdings konnte mit der Intervall-Behandlung eine anfänglich über 20 Tage andauernde Reduktion der Körpermasse und damit ein länger anhaltender Effekt erzielt werden, als unter kontinuierlicher sCT-Behandlung.

Resultat: Das Konzept der intermittierenden Behandlung erscheint als ein Ansatz, dessen Weiterführung und Modifikation hinsichtlich seiner Intervalle und der angewendeten Dosen aussichtsreich erscheint. Ein derartiges Behandlungsmuster kommt nicht zuletzt Mustern der Hormonausschüttung näher, denn für manche Hormone sind sekretorische Rhythmen physiologisch. Das Aktivwerden gegenregulatorischer Antworten auf die Therapie, die durch zentrale Signale vermittelt wird, konnte in der vorliegenden Untersuchung mehrfach wahrscheinlich gemacht werden. Um diese zu umgehen, muss entweder eine Kombination von Präparaten oder ebenfalls eine zeitlich variierende Behandlung versucht werden.

4.5.5.2 sCT Langzeitbehandlung mit pulsatiler sCT-Gabe bei juvenilen heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen

Die Langzeitbehandlung mit pulsatiler sCT-Gabe wurde unter der Annahme, dass eine hohe Dosis eine stark überschießende Gegenreaktion hervorruft, mit einer niedrigen Dosierung von $50 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$ durchgeführt. Die fast parallel hierzu durchgeführte Pulsbehandlung der adulten C57Bl/6J Mäuse zeigte, dass eine dreitägige Injektionsphase keine über drei Tage andauernde Wirkung hatte, so dass die Injektionstage nach der zweiten durchgeführten Injektion auf zwei verkürzt wurden. Ähnlich wie bei dem Verlauf für die adulten C57Bl/6J Tiere kommt es zu einer Erhöhung der Aufnahme der Standard-Diät infolge der sCT-Injektionen, die gegen Ende der Versuchsdurchführung auf einem erhöhten Niveau verbleibt. Die Aufnahme der Zusatz-Diät sinkt unter dem Einfluss der sCT-Injektionen. Bei Betrachtung des Gewichtsverlaufs zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollen ein allmählicher, geringerer Zuwachs der Körpermasse bei den mit sCT behandelten Mäusen. Dies beruht darauf, dass die Energiebilanz innerhalb der ersten Woche noch ausgeglichen ist. Erst danach wird sie negativ, gefolgt von einer sich vergrößernden Differenz der Körpermasse von mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen.

4.5.5.3 Vergleich der sCT Langzeitbehandlung bei juvenilen MC4R-defizienten Tieren mit pulsatiler sCT-Gabe in Abhängigkeit zur Behandlungsdauer

Langzeitbehandlungen mit sCT beginnend mit dem Absetzen bis zur Tötung an Lebenstag 56 führen zu einem signifikant verzögerten Anstieg von Körpermasse, Fettgehalt und Fettmasse der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Interessant ist dabei der Befund, dass die juvenilen Tiere zwar nicht, wie gezeigt, kurzzeitig mit einer reduzierten Aufnahme der Zusatz-Diät reagieren, sondern mit Verzögerung und zu einem

Zeitpunkt, zu dem es bei adulten Tieren bereits zur Abschwächung des sCT-Effekts kommt. Offenbar ist die Responsivität auf sCT in dieser frühen Phase noch in Entwicklung begriffen.

Wird diese Behandlung weitergeführt bis zum Lebenstag 96 sind keine Unterschiede zwischen mit sCT behandelten Tieren und Kontrollen mehr nachweisbar. Insgesamt scheint sich die Gegenregulation gegenüber dem pharmakologisch erzwungenen Istwert der Körpermasse bzw. des Körperfettgehalts zunehmend zu verstärken. Da alle Tiere eine hochkalorische Zusatz-Diät, beginnend mit dem Absetzen, erhielten, entwickeln die Tiere im Laufe der Behandlung jedoch sehr wahrscheinlich rasch eine Leptin-Resistenz (Sahu 2002; Pal & Sahu 2003). Die Tiere reagieren, wenn auch abgeschwächt, bis zum Ende der Behandlung nach den Injektionen mit einer Absenkung der Energieaufnahme. Das Fehlen einer Gesamtreaktion ist auf eine in behandlungsfreien Zeiträumen überschießende Energieaufnahme, besonders durch Aufnahme der Zusatz-Diät, zurückzuführen. Gerade diese Gegenreaktion ist es auch, die vermuten lässt, das ein stark genetisch beeinflusster erhöhter Istwert für die Körpermasse bzw. den Körperfettgehalt verteidigt wird.

Resultat: sCT-Langzeitbehandlungen mit pulsatischer sCT-Gabe zeigen bei einer Behandlung von Lebenstag 21 bis 56 einen langfristigen Effekt auf die Körperzusammensetzung der mit sCT behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Reduktion des Fettgehalts und der Fettmasse kann jedoch durch die überschießende Energieaufnahme an den behandlungsfreien Tagen bei einer von Lebenstag 21 bis 96 durchgeführten Behandlung nicht aufrechterhalten werden und macht eine zunehmend stärker werdende Gegenreaktion wahrscheinlich.

4.5.6 Zentrale Veränderungen im Signalsystem der Energie-Balance unter langfristiger sCT-Wirkung

4.5.6.1 Neuropeptide

Eine Untersuchung an Ratten, die die Neuropeptid-Expression anhand der vorliegenden mRNA nachweist, ergibt nach 3 h einen Abfall der mRNA von Orexin infolge einer intra-peritonealen Injektion von Amylin und bei sCT zusätzlich von MCH im lateralen Hypothalamus (LHA) (Barth *et al.* 2003). Orexin A und B sind an der Regulierung der Nahrungsaufnahme und der Thermogenese beteiligt, diese Peptide werden Neuronen zugeordnet, die den peptidergen vom ARC ausgehenden Projektionen (POMC, CART bzw. NPY, AGRP = Neuropeptide der „first order Neurone“) nachgeschaltet sind bzw.

diese Projektionen modulieren („second order Neurone“) (Hillebrand *et al.* 2002). Zentral verabreicht wirken die Orexine stimulierend auf die Futteraufnahme. Ihre Wirkung ist jedoch so gering, dass zu vermuten ist, dass ihre Aufgaben vornehmlich im Energiemetabolismus liegen (Inui 2000). MCH spielt eine große Rolle bei der Futteraufnahme, es stimuliert die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch eine erhöhte Ausschüttung von ACTH. Zentrale Verabreichung führt bei Ratten zu Hyperphagie und erniedrigt den Energieverbrauch. MCH greift regulierend in den Leptin und Melanokortin Regelkreislauf ein (Hillebrand *et al.* 2002). Im ARC wird die mRNA Konzentration der Neuropeptide POMC, NPY, CART und AGRP nicht signifikant beeinflusst (Barth *et al.* 2003). Fehlende Nachweise eines Anstiegs anderer Neuropeptide wie NPY schließen nicht in jedem Fall aus, dass Amylin bzw. sCT keine Wirkung auf sie haben, sondern könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese erst langfristig kompensatorisch wirken (Barth *et al.* 2003). Dafür spricht der Nachweis einer Zunahme von NPY im Hypothalamus nach fünftägiger subkutaner Behandlung mit Amylin bei Ratten, der gegenregulatorische Mechanismen vermuten lässt (Arnelo *et al.* 2000). Diese Ergebnisse im Vergleich zu den Verlaufsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit, lassen annehmen, dass sCT nicht auf die Neuropeptide der „first order Neurone“ wirkt, sondern vielmehr auf die Neuropeptide der „second order Neurone“. Für die nach vier Tagen abnehmende Wirkung auf die Energieaufnahme bei kontinuierlicher Langzeitbehandlung ist der NPY Anstieg verantwortlich. Langfristig bedeutet das, dass Mechanismen zum Tragen kommen, die den durch sCT hervorgerufenen Effekt aufheben und den ursprünglichen Zustand wieder herstellen.

4.5.6.2 Beteiligung des dopaminergen Systems

An der Vermittlung des akuten Sättigungseffekts von sCT ist das dopaminerge System beteiligt. Der primär für Amylin postulierte Mechanismus (Lutz *et al.* 2001) ist auch auf sCT übertragbar (Mollet *et al.* 2001). Die Vermittlung erfolgt über D₂-Rezeptoren, die unter anderem zahlreich in der AP und im NTS zu finden sind und führt zu einer verstärkten Freisetzung von Dopamin. Die D₂-Rezeptoren sind auch für die Vermittlung der anorektischen Wirkung von Cholecystokin (CCK) verantwortlich und eine Interaktion von CCK und Dopamin und somit eine Beteiligung von sCT, ist nicht auszuschließen (Lutz *et al.* 2001; Mollet *et al.* 2001).

4.5.6.3 Beteiligung des histaminergen Systems

An der Vermittlung der Amylin-Wirkung wird auch eine Beteiligung des histaminergen Systems diskutiert. Die zentralnervöse Wirkung wird über den Histamin H₁-Rezeptor durch die Unterdrückung endogenen Histamins vermittelt und führt unter anderem durch die Beeinflussung des anorektisch wirksamen Bombesin zu einer Reduktion der Energieaufnahme (Lutz *et al.* 1996). Neuere Studien durchgeführt an H₁Rko Mäusen, denen der H₁-Rezeptor fehlt, konnten diesen Mechanismus auch für peripher verabreichtes sCT nachweisen (Mollet *et al.* 2001). Hierbei wirkt sCT in der Area postrema (AP) und beeinflusst dann direkt oder indirekt die Freisetzung von Histamin im Nucleus ventromedialis (VMN), wo eine Vielzahl an entsprechenden Histamin-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Mollet *et al.* 2001).

4.5.6.4 Mögliche Beteiligung von Cannabinoid-Rezeptoren

Cannabinoide stimulieren sowohl peripher, als auch zentral verabreicht die Nahrungsaufnahme. Die Verteilung des Cannabinoid-Rezeptors₁ (CB₁) in Gehirnregionen, in denen auch die Energieaufnahme gesteuert wird, LHA (MCH, Orexine), ARC (CART) und PVN (CRH), und in geringerer Dichte auch in der AP und dem NTS, lassen eine Rolle des Endocannabinoid-Systems an der Regulierung der Energieaufnahme vermuten (Moldrich & Wenger 2000; Nisoli & Carruba 2004). Im Hypothalamus wird der Endocannabinoidspiegel durch die Gabe von Leptin beeinflusst, außerdem verhindert eine Blockade des CB₁ eine durch Fasten induzierte Hyperphagie (Harrold *et al.* 2002). So ist eine Beteiligung des CB₁-Rezeptors und der Endocannabinoide an der Energiehomöostase anzunehmen. Neben dieser Beteiligung sind extrahypothalamische CB₁-Rezeptoren an hedonistischen Aspekten des Essens und des Belohnungsverhaltens, beteiligt. Eine gesteigerte Aktivität des CB₁ führt zu einer verstärkten Aufnahme wohlschmeckender Nahrung (Harrold *et al.* 2002). Langzeitbehandlungen von Mäusen, z.T. mit DIO und Ratten mit einem CB₁-Rezeptor Antagonisten führen zu einer verminderten Futteraufnahme und zu einer Abnahme der Körpermasse (Colombo *et al.* 1998; Hildebrandt *et al.* 2003). Die Reaktion auf die Behandlung wird ca. ab dem vierten Behandlungstag schwächer. In dem behandlungsfreien Nachlauf kommt es zumindest bei der höheren Dosierung zu einer überschießenden Energieaufnahme mit einem Wiederanstieg der Körpermasse (Colombo *et al.* 1998; Hildebrandt *et al.* 2003). Eine nach zwei behandlungsfreien Wochen wiederholte Behandlung zeigt den gleichen Verlauf. Tiere mit DIO reagieren stärker auf die Behandlung als Tiere die ausschließlich Standard-Diät erhalten (Hildebrandt *et al.* 2003). Die von sCT beeinflussten Gehirnareale (AP, NTS,

LHA) und die Einflüsse auf Neuropeptide (MCH, Orexine), lassen bei ähnlichem Behandlungsverlauf unter Verwendung eines CB₁-Rezeptor Antagonisten und sCT eine Interaktion zwischen sCT und dem Endocannabinoidsystem vermuten.

4.6 AUSBLICK

Insgesamt bestätigen sowohl die erste als auch die zweite Versuchsreihe den verbreiteten Pessimismus, dass ein auf einem einzigen Pharmakon beruhender effektiver Therapie-Effekt beim Problem Adipositas nicht zu erwarten ist. Und dies gilt selbst dann, wenn es sich, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, um eine ganz spezielle Art der genetisch bedingten Adipositas handelt. Somit führt die Kenntnis einzelner Mutationen wie die der MC4R-Defizienz nicht unmittelbar zu einem Therapieansatz. Diskutiert wird aufgrund von Untersuchungen an anderen Tiermodellen, dass gerade Rezeptordefekte bei nur partiell exprimierten Rezeptoren infolge unterschiedlicher Defekte innerhalb des Rezeptors eine im Unterschied zum Rezeptor ohne Mutation veränderte Bindungsfähigkeit aufweisen können (Barb *et al.* 2004), so dass im Überschuss zugesetzte Agonisten unwirksam bleiben können. Für die heterozygote MC4R-defiziente Maus liegen solche Untersuchungen nicht vor. Bei dem Einsatz eines monokausalen Pharmakons muss zudem berücksichtigt werden, dass sich im Behandlungsverlauf kompensatorische und gegenregulatorische Signale ausbilden, die einer Abnahme der Körpermasse entgegenwirken. Deshalb erscheint die Suche nach einer Kombinationsbehandlung als der momentan sinnvollere Weg in der Adipositas-therapie. Zur Kombination bieten sich neben den anorexigenen Agonisten wie Leptin, Antagonisten orexigener Signale z.B. für das NPY oder AGRP an, die kompensatorische und gegenregulatorische Signale unterbinden bzw. ihre Stärke verringern (Blüher *et al.* 2004).

Inwieweit eine intermittierende Behandlung, wie hier erstmals für sCT getestet, die den entsprechenden Systemen Zeit gibt, sich zu erholen und ihre Responsivität wieder zu erlangen, Erfolg hat, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Dass die für adipöse Menschen allgemein gegebene Empfehlung einer ausgewogenen Ernährung bzw. sportlicher Aktivität ein Mittel ist, um die Entwicklung eines übermäßigen Körperfettgehalts einzugrenzen, gilt auch für genetische Formen der Adipositas und wird im Tierexperiment bestätigt durch eine neuere Studie, die an MC4R-defizienten Mäusen durchgeführt wurde (Irani *et al.* 2005). Zum einen verlangsamt stetige Bewegung die Zunahme, zum anderen zeigt sich, dass es besonders wichtig ist, möglichst früh in die Regulation der Entwicklung der Körpermasse und des Körperfettgehalts einzugreifen.

Dieser Befund, ein Eingreifen in die Gewichtsregulation vor dem vollständigen Zusammenbruch der neuropeptidergen Kontrollmechanismen, konnte auch in der vorliegenden Arbeit erhoben werden. So bleibt für die nahe Zukunft, neben den Ratschlägen Bewegung und gesunde Ernährung, die Aufgabe der Gesellschaft, adipöse Menschen weniger auszugrenzen, um nicht zusätzlichen Essstörungen Vorschub zu leisten, und die Einsicht, dass auch ein erhöhtes Gewicht nicht unbedingt Ausdruck eines undisziplinierten Lebensstils ist. Für die ferne Zukunft ist zu hoffen, dass die komplexen Zusammenhänge der Adipositasentstehung detaillierter geklärt werden können und Ansatzpunkte für eine multifaktorielle und in der zeitlichen Sequenz ihrer Anwendung optimierte Therapie der Adipositas liefern werden.

5 Zusammenfassung

Adipositas und ihre sekundären pathologischen Folgen sind ein ernstes Gesundheitsproblem in der zivilisierten Welt geworden. Hierzu tragen Umweltbedingungen, vor allem ein Übermaß hochkalorischer Nahrung, bei. Da eine Reduktions-Diät bei Vorliegen einer Adipositas meist nur kurzfristig durchgeführt wird, sind pharmakologische Ansätze nötig, um in der Adipositastherapie langfristig Fortschritte zu erreichen. Hierzu sind Kenntnisse über die komplexe Regulation der Energiebilanz mit und ohne Normabweichungen nötig. Monogenetisch bedingte Adipositas beim Menschen und Tiermodelle mit entsprechender Mutation stellen hierbei eine große Möglichkeit zur Erforschung der Pathogenese, wie auch der speziellen Therapieansätze dar. Der beim Menschen mit einer Prävalenz von ca. 2-6 % untersucht an extrem übergewichtigen Patientenkollektiven am häufigsten auftretende Gendefekt am MC4-Rezeptor (MC4R) fällt bereits bei heterozygoter Ausprägung durch eine juvenil beginnende Adipositas auf. Ein entsprechendes Tiermodell wurde bei der Maus entwickelt (Huszar *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000) und Behandlungen zur Eingrenzung des übermäßigen Körperfettgehalts in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Da bislang eine medikamentöse Behandlung mit langfristiger Wirkung unabhängig von der Pathogenese nicht existiert, wurde neben Agonisten des MC4R außerdem ein Therapeutikum ohne definierten Ansatzpunkt am genetischen Defekt untersucht. Um die Differenzen zwischen den modernen menschlichen Lebensumständen und der Versuchstierhaltung zu verringern, wurden die Tiere bei einem Großteil der Versuche bei einer Umgebungstemperatur knapp unter dem thermoneutralen Bereich (TN) gehalten. Außerdem hatte ein Teil der Tiere, neben Standard-Diät, Zugang zu einer hochkalorischen Diät. Da sich die Hauptuntersuchung auf die als monogenetische Ursache einer Adipositas beim Menschen identifizierten MC4R-Defizienz konzentrierte, war die Anwendung von α -MSH Analoga ein erster Behandlungsansatz. Wegen fehlender Literaturnachweise für Untersuchungsergebnisse bei Mäusen wurden zunächst C57Bl/6J Mäuse mit α -MSH behandelt. Da das Ergebnis der Behandlung nicht zufrieden stellend war, wurden bei diesem Stamm Kontrolluntersuchungen mit Leptin durchgeführt. Die für eine zentrale Behandlung mit Leptin erhobenen Daten in der vorliegenden Arbeit entsprechen den bisherigen Forschungsergebnissen und werden als Referenzwerte für den erzielten Erfolg einer Behandlung der technisch identischen zentralen Behandlung mit MSH-Derivaten bei C57Bl/6J Mäusen hinsichtlich der Reduktion von Energieaufnahme und Körpermasse und

für die korrekte Handhabung der icv. Kanülierung herangezogen. Zusätzlich kamen MSH-Derivate, wie β -MSH und NDP- α -MSH zum Einsatz, deren biologische Wirksamkeit und Stabilität höher ist als die von α -MSH. Die Ergebnisse der Untersuchungen für α -MSH zeigen, dass dieses Pharmakon bei C57Bl/6J Mäusen nicht zu einer Reduktion der Energieaufnahme führt. Es kommt allenfalls zu einem sehr kurzfristigen Effekt, der sich auch bei Untersuchungen anderer Tiermodelle nicht auf die Neuropeptide oder die Körperzusammensetzung der behandelten Tiere auswirkt. Bei Tieren mit genetischem MC4R Defekt bei manifester Adipositas liegen keine Untersuchungen für eine Behandlung mit α -MSH vor. Auch von den stabileren MSH-Derivaten ist nach den in der Literatur vorliegenden Befunden und aufgrund der eigenen Studie kein längerfristiger Einfluss auf die Energieaufnahme und Körpermasse der mit Derivat behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen zu erwarten. Für die Unwirksamkeit von α -MSH und seinen Analoga, kann eine Gegenregulation von Neuropeptiden, vor allem dem auch kurzfristig reagierenden AGRP als eine der möglichen Ursachen angenommen werden. Auch der synthetische Agonist MTII wurde sowohl bei C57Bl/6J Mäusen als auch bei bisher noch nicht untersuchten heterozygoten MC4R-defizienten Tieren eingesetzt. Für das synthetische MSH-Analogon MTII ergeben die an C57Bl/6J Mäusen durchgeführten Versuche eine Reduktion der Energieaufnahme und der Körpermasse. Jedoch kommt es nach der anfänglich guten Wirkung zu einer Tachyphylaxie und letztendlich zu keinem langfristigen Effekt mit Auswirkung auf die Körperzusammensetzung. Die Behandlung von heterozygoten MC4R-defizienten Tieren zeigt auch nach einer Dosiserhöhung keinen signifikanten Effekt auf die Energieaufnahme und Körpermasse. Dieser Befund lässt vermuten, dass durch den Defekt am MC4R der Rezeptor selbst verändert oder seine Signalwege so gestört werden, dass die Auslösung eines anorexigenen Effekts über dieses System nicht zu erzielen ist bzw. zusätzlich erschwert wird. Aufgrund der geringen Gesamtwirkung wurde die spezifische Behandlung mit einem exogen zugeführten Agonisten des MC4R eingestellt.

Als kurzfristig vielversprechend hatte sich eine Behandlung mit Lachs-Calcitonin (sCT) erwiesen (Eiden *et al.* 2002) und war deshalb Ausgangspunkt für die Untersuchung der bisher noch nicht ermittelten Langzeitwirkung bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen. Vorbereitend wurden sowohl an adulten heterozygoten als auch homozygoten MC4R-defizienten Tieren Eintagesbehandlungen mit unterschiedlichen Dosierungen unter veränderten Umweltbedingungen durchgeführt. Die Behandlung

heterozygoter MC4R-defizienter Mäuse mit sCT ergab eine erhöhte dosisabhängige Wirkung, wenn die Tiere Zugang zu einer hochkalorischen Diät hatten. Die Umgebungstemperatur hatte keinen Einfluss auf die Wirkung der sCT-Injektionen. Homozygote MC4R-defiziente Mäuse mit Zugang zu einer hochkalorischen Zusatz-Diät zeigen keine dosisabhängige Steigerung der Wirkung. Ein Genotyp-Einfluss auf die sCT-Wirkung lässt sich nicht sicher nachweisen, während ein Geschlechtsunterschied mit einer bei weiblichen Tieren stärker Wirksamkeit der sCT-Injektionen belegt werden konnte. Die Langzeitwirkung bei adulten heterozygoten MC4R-defizienten Mäusen trotz einer versuchten Kombinationsbehandlung mit sCT und Leptin war allerdings nur begrenzt. Dies könnte auf dem bereits gestörten System der Regulation der Energiebilanz beruhen, so dass Tiere direkt nach dem Absetzen (Lebenstag 21) behandelt wurden. Auch hatte eine bei Jungtieren nach dem Absetzen begonnene kontinuierliche Langzeitbehandlung keinen signifikanten Einfluss auf den Körperfettgehalt. Deshalb wurde die Wirkung einer intermittierenden sCT-Applikation getestet, wobei das Behandlungsschema gegenregulatorische Mechanismen dadurch berücksichtigt, dass Behandlungs- und Ruhephasen einander ablösen. Nach einem Testdurchlauf des pulsatilem Behandlungsmusters für sCT an adulten C57Bl/6J Mäusen wurden entsprechende Behandlungen bei heterozygoten MC4R-defizienten Jungtieren durchgeführt. Während sich bei einer intermittierenden Behandlung mit sCT von Lebenstag 21 bis 56 ein Einfluss auf die Körperzusammensetzung nachweisen ließ, verschwindet der Effekt bei einer Behandlung der Tiere bis Lebenstag 96. Die intermittierende Behandlung mit sCT scheint im Ansatz richtig. Der Verlauf den die Behandlung nimmt lässt allerdings eine zentral vermittelte Gegenregulation vermuten, die die kurzfristige Wirkung von sCT überlagert. Um diese zu umgehen, muss entweder eine Kombination von Präparaten oder eine zeitlich variierende Behandlung versucht werden. Die Vielzahl der an der Energiehomöostase beteiligten Systeme und die Interaktion der Neuropeptiden untereinander machen es zur Zeit nicht möglich langfristig effektiv in die Energiebilanz einzugreifen.

6 Summary

Obesity and its secondary pathological effects is a serious health problem in civilized countries. Environmental conditions, particularly an excess of palatable high-caloric food accelerate this development. Since reduction-diet as a treatment for obesity is carried out mostly only for a short period of time, pharmacological approaches seem indispensable in order to achieve progress on a long-term basis in the treatment of obesity. For this approach further insight into the regulation of the energy balance with and without norm deviation is required. Monogenetic forms of human obesity and animal models with a corresponding mutation provide promising opportunities for the elucidation of the pathogenesis as well as for the development of specific treatments. In 2-6 % of obese humans we find the most frequent monogenetic defect of haploinsufficiency of the MC4R with early onset obesity. A corresponding animal model was developed with the MC4R-deficient mouse (Huszar et.al. 1997, Chen et al. 2000). In this model specific treatment schedules were examined in this study with the aim to retard the development of excessive body fat content.

For the experimental approach environmental and feeding conditions were established for the mouse model which resembled human living conditions and modern human life style: most of the experiments were carried out in animals living in an ambient temperature just below the thermoneutral zone (TN). In addition, part of the animals had access to a supplementary palatable high-caloric diet in addition to chow.

Since the main attention of this study was directed towards the MC4R-deficiency identified as a monogenetic cause of human adiposity, the application of α -MSH as agonist of the MC4R was a first treatment approach. We first investigated as controls C57Bl/6J mice under intracerebroventricular (icv) treatment with α -MSH, because corresponding observation on mice had not been published so far. This treatment was little effective, but this was not due to technical failure because using leptin as a peptide with established weight reducing action was effective. The results corresponded to previous results and were subsequently taken as reference for icv treatment with other compounds with regard to the reduction of energy consumption, body mass and to the correct handling of the icv cannulation. In addition we used MSH-derivates, as β -MSH and NDP- α -MSH, which are reported to be more stable and effective than α -MSH.

Treatment with α -MSH does not reduce energy consumption of C57Bl/6J mice. It results in a very short anorectic run-off effect and does not measurably alter neuropeptide expression downstream to the leptin signalling system nor does it affect body composition. This applies also to other animal models investigated in this study. The analogs b-MSH, NDP-a-MSH were equally ineffective.

For a systemic treatment the synthetic agonist MTII was used in C57Bl/6J mice as well as in heterozygous MC4R-deficient mice. In C57Bl/6J mice the treatment was only initially effective, due to tachyphylaxia and therefore only a short-time effect on body composition was found. The treatment of the heterozygous animals with MC4R-deficiency did not show a significant effect on energy consumption and body mass, not even after increasing the dose. This lead us to the conclusion that MC4R-deficiency changed the receptor or disturbed its signal pathway to a degree preventing the production of anorexigenic effects even of analogs that have long-term actions in other systems. As an explanation pathologically enhanced counter regulation by neuropeptides, especially the short-term reacting AGRP, is supposed to be the cause for the ineffectiveness of α -MSH and its analogs. For this reason the pharmacological approach using agonists of the MC4R was not further pursued.

As an alternative we tried systemic treatment with salmon-Calcitonin (sCT) which had been shown to exert at least a short-term effect (Eiden et al. 2002). First, different treatment protocols were examined with the aim to obtain more protracted anorectic effects in adult MC4R-deficient mice. As a pilot study we treated homozygous and heterozygous MC4R-deficient mice for one day with different doses and under different environmental conditions. The treatment of heterozygous mice with sCT showed a decrease of energy intake increasing with the dose, when the animals had access to a palatable high-caloric diet. The ambient temperature did not have any influence on the effect of the sCT-treatment. Homozygous MC4R-deficient mice with access to an additional palatable high-caloric diet did not show a dose dependent effect but on the whole the influence of the genotype on the sCT-effect could not be confirmed, while the sex difference was found to be significant with sCT-injections showing a stronger effect on female animals.

In adult heterozygous mice with MC4R-deficiency sCT treatment was effective only over a short period, even when combined with leptin. This suggested for adult animals an

irreversible disturbance of the central peptide system regulating the energy balance. For this reason sCT treatment of the heterozygous mice with MC4R-deficiency was started immediately after weaning (day 21) under the premise that disturbances existing at that time might be still reversible. Because continuous long-term treatment of young animals had no lasting influence on the development of body fat content the effects of intermittent sCT-injection was tested. The rationale of this treatment protocol was that the development of counter regulatory mechanisms could be interrupted by the sequence of treating and resting faces. After a test run of this protocol in adult C57Bl/6J mice, heterozygous young animals with MC4R-deficiency were treated that way. While an influence of the intermittent treatment with sCT on the body composition could be confirmed until the day 56, this effect had disappeared after 96 treatment days. As the result of this study, choosing a particular treatment protocol was shown to prolong the sCT action more than five-fold, although not indefinitely. From this partial success it is concluded that intermittent treatment seems to be the right approach because it takes into account central counter regulation as a process responsible for the short-term decline of continuous sCT treatment effects. Refining the treatment protocol and combining it with additional dietary or pharmacological treatments might be a way to further prolong the retardation of obesity development.

7 Literaturverzeichnis

- Abbott, C. R., M. Rossi, M. Kim, S. H. AlAhmed, G. M. Taylor, M. A. Ghatei, D. M. Smith and S. R. Bloom (2000). "Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor." Brain Res **869**(1-2): 203-10.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Leptin." Annu Rev Physiol **62**: 413-37.
- Air, E. L., S. C. Benoit, D. J. Clegg, R. J. Seeley and S. C. Woods (2002). "Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats." Endocrinology **143**(6): 2449-52.
- Anand, B. K. and J. R. Brobeck (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." Proc Soc Exp Biol Med **77**(2): 323-4.
- Arch, J. R., M. J. Stock and P. Trayhurn (1998). "Leptin resistance in obese humans: does it exist and what does it mean?" Int J Obes Relat Metab Disord **22**(12): 1159-63.
- Arens, J. (2005). Alters- und genotypbedingte Änderungen der Neuropeptidexpression im Hypothalamus von Wildtypen und Melanokortin-4 Rezeptor-defizienten Mäusen. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Arens, J., K. M. Moar, S. Eiden, K. Weide, I. Schmidt, J. G. Mercer, E. Simon and H. W. Korf (2003). "Age-dependent hypothalamic expression of neuropeptides in wild-type and melanocortin-4 receptor-deficient mice." Physiol Genomics **16**(1): 38-46.
- Arnelo, U., M. K. Herrington, E. Theodorsson, T. E. Adrian, R. Reidelberger, J. Larsson, J. Marcusson, L. Strommer, X. Ding and J. Permert (2000). "Effects of long-term infusion of anorexic concentrations of islet amyloid polypeptide on neurotransmitters and neuropeptides in rat brain." Brain Res **887**(2): 391-8.
- Aronoff, S. K. B. B. S. a. L. W. (2004). "Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon." Diabetes Spectrum **17**(3): 183-190.
- Banks, W. A. (2004). "The many lives of leptin." Peptides **25**(3): 331-8.
- Banks, W. A. and A. J. Kastin (1995). "Permeability of the blood-brain barrier to melanocortins." Peptides **16**(6): 1157-61.
- Banks, W. A. and A. J. Kastin (1998). "Differential permeability of the blood-brain barrier to two pancreatic peptides: insulin and amylin." Peptides **19**(5): 883-9.
- Barb, C. R., A. S. Robertson, J. B. Barrett, R. R. Kraeling and K. L. Houseknecht (2004). "The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig." J Endocrinol **181**(1): 39-52.
- Barth, S. W., T. Riediger, T. A. Lutz and G. Rechkemmer (2003). "Differential effects of amylin and salmon calcitonin on neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and the arcuate nucleus of the rat." Neurosci Lett **341**(2): 131-4.
- Bjorbaek, C., K. El-Haschimi, J. D. Frantz and J. S. Flier (1999). "The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance." J Biol Chem **274**(42): 30059-65.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, A. van Bueren, A. L. McCall and J. S. Flier (1998). "Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels." Endocrinology **139**(8): 3485-91.

- Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva and J. S. Flier (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." J Biol Chem **272**(51): 32686-95.
- Bjorbak, C., H. J. Lavery, S. H. Bates, R. K. Olson, S. M. Davis, J. S. Flier and M. G. Myers, Jr. (2000). "SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985." J Biol Chem **275**(51): 40649-57.
- Bluher, S., M. Ziotopoulou, J. W. Bullen, Jr., S. J. Moschos, L. Ungsunan, E. Kokkotou, E. Maratos-Flier and C. S. Mantzoros (2004). "Responsiveness to peripherally administered melanocortins in lean and obese mice." Diabetes **53**(1): 82-90.
- Bouchard, C., A. Tremblay, J. P. Despres, A. Nadeau, P. J. Lupien, G. Theriault, J. Dussault, S. Moorjani, S. Pinault and G. Fournier (1990). "The response to long-term overfeeding in identical twins." N Engl J Med **322**(21): 1477-82.
- Breen, T. L., I. M. Conwell and S. L. Wardlaw (2005). "Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus." Brain Res **1032**(1-2): 141-8.
- Brobeck, J. (1946). "Regulation of Energy Exchange." Annual Reviews: 315-323.
- Broberger, C., L. De Lecea, J. G. Sutcliffe and T. Hokfelt (1998). "Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems." J Comp Neurol **402**(4): 460-74.
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling and T. Hokfelt (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 15043-8.
- Brown, K. S., R. M. Gentry and N. E. Rowland (1998). "Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos." Regul Pept **78**(1-3): 89-94.
- Carlson, N. R. (2001). Ingestive Behavior: Eating. Physiology of Behavior, Howard Hodgkin: 393-405.
- Carroll, L., J. Voisey and A. van Daal (2004). "Mouse models of obesity." Clin Dermatol **22**(4): 345-9.
- Chait, A., C. Suaudeau and R. De Beaurepaire (1995). "Extensive brain mapping of calcitonin-induced anorexia." Brain Res Bull **36**(5): 467-72.
- Chance, W. T., A. Balasubramaniam, X. Chen and J. E. Fischer (1992). "Tests of adipsia and conditioned taste aversion following the intrahypothalamic injection of amylin." Peptides **13**(5): 961-4.
- Chen, A. S., J. M. Metzger, M. E. Trumbauer, X. M. Guan, H. Yu, E. G. Frazier, D. J. Marsh, M. J. Forrest, S. Gopal-Truter, J. Fisher, R. E. Camacho, A. M. Strack, T. N. Mellin, D. E. MacIntyre, H. Y. Chen and L. H. Van der Ploeg (2000). "Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice." Transgenic Res **9**(2): 145-54.
- Chen, Y. and 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**(1-3): 113-9.
- Chhajlani, V. (1996). "Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues." Biochem Mol Biol Int **38**(1): 73-80.

- Chhajlani, V., R. Muceniece and J. E. Wikberg (1993). "Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 866-73.
- Christopoulos, A., G. Christopoulos, M. Morfis, M. Udawela, M. Laburthe, A. Couvineau, K. Kuwasako, N. Tilakaratne and P. M. Sexton (2003). "Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins." J Biol Chem **278**(5): 3293-7.
- Christopoulos, G., G. Paxinos, X. F. Huang, K. Beaumont, A. W. Toga and 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**(7): 1037-41.
- Christopoulos, G., K. J. Perry, M. Morfis, N. Tilakaratne, Y. Gao, N. J. Fraser, M. J. Main, S. M. Foord and P. M. Sexton (1999). "Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product." Mol Pharmacol **56**(1): 235-42.
- Chua, S. C., Jr., W. K. Chung, X. S. Wu-Peng, Y. Zhang, S. M. Liu, L. Tartaglia and R. L. Leibel (1996). "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor." Science **271**(5251): 994-6.
- Clowry, G. J. and P. A. Flecknell (2000). "The successful use of fentanyl/fluanisone ('Hypnorm') as an anaesthetic for intracranial surgery in neonatal rats." Lab Anim **34**(3): 260-4.
- Coleman, D. L. and E. M. Eicher (1990). "Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse." J Hered **81**(6): 424-7.
- Colombo, G., R. Agabio, G. Diaz, C. Lobina, R. Reali and G. L. Gessa (1998). "Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716." Life Sci **63**(8): PL113-7.
- Del Prete, E., B. Schade, T. Riediger, T. A. Lutz and E. Scharrer (2002). "Effects of amylin and salmon calcitonin on feeding and drinking behavior in pygmy goats." Physiol Behav **75**(4): 593-9.
- Dinulescu, D. M. and R. D. Cone (2000). "Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts." J Biol Chem **275**(10): 6695-8.
- Döring, H. (2000). Wirkung von rekombinantem Leptin auf den Energiehaushalt von Mäusen in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot. Marburg, Philipps-Universität.
- Duhl, D. M., H. Vrieling, K. A. Miller, G. L. Wolff and G. S. Barsh (1994). "Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice." Nat Genet **8**(1): 59-65.
- Eiden, S. (2002). Pharmakologische und genetische Eingriffe in das Leptinsystem und in andere an der Regulation des Energiehaushalts beteiligte Hormonsysteme bei Mäusen. Marburg, Philipps-Universität.
- Eiden, S., C. Daniel, A. Steinbrueck, I. Schmidt and E. Simon (2002). "Salmon calcitonin - a potent inhibitor of food intake in states of impaired leptin signalling in laboratory rodents." J Physiol **541**(Pt 3): 1041-8.
- Eiden, S., E. Simon and I. Schmidt (2005). "Dose-related steady states of fat loss in long-term leptin-treated ob/ob mice: Leptin resistance or desensitization versus counterregulatory signaling." J Comp Physiol [B]: 1-11.

- El-Haschimi, K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjorbaek and J. S. Flier (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." J Clin Invest **105**(12): 1827-32.
- Elias, C. F., C. Aschkenasi, C. Lee, J. Kelly, R. S. Ahima, C. Bjorbaek, J. S. Flier, C. B. Saper and J. K. Elmquist (1999). "Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area." Neuron **23**(4): 775-86.
- Elmquist, J. K., C. F. Elias and C. B. Saper (1999). "From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight." Neuron **22**(2): 221-32.
- Elmquist, J. K., E. Maratos-Flier, C. B. Saper and J. S. Flier (1998). "Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin." Nat Neurosci **1**(6): 445-50.
- Esparza, J., C. Fox, I. T. Harper, P. H. Bennett, L. O. Schulz, M. E. Valencia and E. Ravussin (2000). "Daily energy expenditure in Mexican and USA Pima indians: low physical activity as a possible cause of obesity." Int J Obes Relat Metab Disord **24**(1): 55-9.
- Everett, E., H. Tamimi, B. Greer, E. Swisher, P. Paley, L. Mandel and B. Goff (2003). "The effect of body mass index on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer." Gynecol Oncol **90**(1): 150-7.
- Farooqi, I. S., S. A. Jebb, G. Langmack, E. Lawrence, C. H. Cheetham, A. M. Prentice, I. A. Hughes, M. A. McCamish and S. O'Rahilly (1999). "Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency." N Engl J Med **341**(12): 879-84.
- Farooqi, I. S., G. S. Yeo, J. M. Keogh, S. Aminian, S. A. Jebb, G. Butler, T. Cheetham and S. O'Rahilly (2000). "Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency." J Clin Invest **106**(2): 271-9.
- Fasshauer, M., R. Paschke and M. Stumvoll (2004). "Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease." Biochimie **86**(11): 779-84.
- Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell and J. M. Friedman (1997). "Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 7001-5.
- Franklin, K. and G. Paxinos (1997). The Mouse Brain. San Diego, Academic Press.
- Freed, W. J., M. J. Perlow and R. J. Wyatt (1979). "Calcitonin: inhibitory effect on eating in rats." Science **206**(4420): 850-2.
- Gaggi, R., E. Beltrandi, R. Dall'Olio and S. Ferri (1985). "Relationships between hypocalcaemic and anorectic effect of calcitonin in the rat." Pharmacol Res Commun **17**(3): 209-15.
- Gantz, I. and T. M. Fong (2003). "The melanocortin system." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(3): E468-74.
- Gantz, I., Y. Konda, T. Tashiro, Y. Shimoto, H. Miwa, G. Munzert, S. J. Watson, J. DelValle and T. Yamada (1993). "Molecular cloning of a novel melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(11): 8246-50.
- Gantz, I., H. Miwa, Y. Konda, Y. Shimoto, T. Tashiro, S. J. Watson, J. DelValle and T. Yamada (1993). "Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(20): 15174-9.

- Ghilardi, N., S. Ziegler, A. Wiestner, R. Stoffel, M. H. Heim and R. C. Skoda (1996). "Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6231-5.
- Gross, P. M. (1992). "Circumventricular organ capillaries." Prog Brain Res **91**: 219-33.
- Gu, W., Z. Tu, P. W. Kley, A. Kissebah, L. Duprat, J. Lee, W. Chin, S. Maruti, N. Deng, S. L. Fisher, L. S. Franco, P. Burn, K. A. Yagaloff, J. Nathan, S. Heymsfield, J. Albu, F. X. Pi-Sunyer and D. B. Allison (1999). "Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants." Diabetes **48**(3): 635-9.
- Guidobono, F. (1998). "Amylin and gastrointestinal activity." Gen Pharmacol **31**(2): 173-7.
- Gunn, T. M. and G. S. Barsh (2000). "Mahogany/attractin: en route from phenotype to function." Trends Cardiovasc Med **10**(2): 76-81.
- Gunn, T. M., K. A. Miller, L. He, R. W. Hyman, R. W. Davis, A. Azarani, S. F. Schlossman, J. S. Duke-Cohan and G. S. Barsh (1999). "The mouse mahogany locus encodes a transmembrane form of human attractin." Nature **398**(6723): 152-6.
- Hadley, M. E., B. Anderson, C. B. Heward, T. K. Sawyer and V. J. Hruby (1981). "Calcium-dependent prolonged effects on melanophores of [4-norleucine, 7-D-phenylalanine]-alpha-melanotropin." Science **213**(4511): 1025-7.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin and M. W. Schwartz (1998). "Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons." Nat Neurosci **1**(4): 271-2.
- Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley and J. M. Friedman (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." Science **269**(5223): 543-6.
- Hallschmid, M., C. Benedict, J. Born, H. L. Fehm and W. Kern (2004). "Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man." Physiol Behav **83**(1): 55-64.
- Hanusch-Enserer, U., C. Enserer, H. R. Rosen and R. Prager (2004). "Indication for bariatric surgery." Acta Med Austriaca **31**(4): 125-9.
- Harrold, J. A., J. C. Elliott, P. J. King, P. S. Widdowson and G. Williams (2002). "Down-regulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food?" Brain Res **952**(2): 232-8.
- Havel, P. J. (2001). "Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 963-77.
- Hay, D. L., G. Christopoulos, A. Christopoulos, D. R. Poyner and P. M. Sexton (2005). "Pharmacological discrimination of calcitonin receptor: receptor activity-modifying protein complexes." Mol Pharmacol **67**(5): 1655-65.
- Hebebrand, J., A. Wermter and A. Hinney (2004). "Genetic aspects of obesity." Monatsschrift Kinderheilkunde **152**(8): 870-876.

- Heymsfield, S. B., A. S. Greenberg, K. Fujioka, R. M. Dixon, R. Kushner, T. Hunt, J. A. Lubina, J. Patane, B. Self, P. Hunt and M. McCamish (1999). "Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial." Jama **282**(16): 1568-75.
- Hildebrandt, A. L., D. M. Kelly-Sullivan and S. C. Black (2003). "Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 125-32.
- Hill, C. and J. C. Dunbar (2002). "The effects of acute and chronic alpha melanocyte stimulating hormone (alphaMSH) on cardiovascular dynamics in conscious rats." Peptides **23**(9): 1625-30.
- Hill, R. A., S. Margetic, G. G. Pegg and C. Gazzola (1998). "Leptin: its pharmacokinetics and tissue distribution." Int J Obes Relat Metab Disord **22**(8): 765-70.
- Hillebrand, J. J., D. de Wied and R. A. Adan (2002). "Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus." Peptides **23**(12): 2283-306.
- Hinney, A., A. Schmidt, K. Nottebom, O. Heibult, I. Becker, A. Ziegler, G. Gerber, M. Sina, T. Gorg, H. Mayer, W. Siegfried, M. Fichter, H. Remschmidt and 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**(4): 1483-6.
- Hoggard, N., A. M. Johnstone, P. Faber, E. R. Gibney, M. Elia, G. Lobley, V. Rayner, G. Horgan, L. Hunter, S. Bashir and R. J. Stubbs (2004). "Plasma concentrations of alpha-MSH, AgRP and leptin in lean and obese men and their relationship to differing states of energy balance perturbation." Clin Endocrinol (Oxf) **61**(1): 31-9.
- Hoggard, N., J. G. Mercer, D. V. Rayner, K. Moar, P. Trayhurn and 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**(2): 383-7.
- Hoorneman, E. M. (1985). "Stereotaxic operation in the neonatal rat; a novel and simple procedure." J. Neurosci Methods **14**(2): 109-16.
- Horvath, T. L., C. Peyron, S. Diano, A. Ivanov, G. Aston-Jones, T. S. Kilduff and A. N. van Den Pol (1999). "Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system." J Comp Neurol **415**(2): 145-59.
- Hu, Y., B. T. Bloomquist, L. J. Cornfield, L. B. DeCarr, J. R. Flores-Riveros, L. Friedman, P. Jiang, L. Lewis-Higgins, Y. Sadlowski, J. Schaefer, N. Velazquez and M. L. McCaleb (1996). "Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior." J Biol Chem **271**(42): 26315-9.
- Huang, L., Z. Wang and C. Li (2001). "Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor." J Biol Chem **276**(9): 6343-9.
- Huang, Q. H., V. J. Hruby and J. B. Tatro (1999). "Role of central melanocortins in endotoxin-induced anorexia." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): R864-71.
- Huang, X. F., X. Xin, P. McLennan and L. Storlien (2004). "Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression." Diabetes Obes Metab **6**(1): 35-44.

- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, L. R. Berkemeier, W. Gu, R. A. Kesterson, B. A. Boston, R. D. Cone, F. J. Smith, L. A. Campfield, P. Burn and F. Lee (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." *Cell* **88**(1): 131-41.
- Inui, A. (2000). "Transgenic approach to the study of body weight regulation." *Pharmacol Rev* **52**(1): 35-61.
- Irani, B. G., Z. Xiang, M. C. Moore, R. J. Mandel and C. Haskell-Luevano (2005). "Voluntary exercise delays monogenetic obesity and overcomes reproductive dysfunction of the melanocortin-4 receptor knockout mouse." *Biochem Biophys Res Commun* **326**(3): 638-44.
- Kalra, P. S., M. G. Dube and S. P. Kalra (2000). "Effects of centrally administered antisense oligodeoxynucleotides on feeding behavior and hormone secretion." *Methods Enzymol* **314**: 184-200.
- Kaplan, L. M. (2005). "Pharmacological therapies for obesity." *Gastroenterol Clin North Am* **34**(1): 91-104.
- Kask, A., L. Rago, J. E. Wikberg and H. B. Schioth (1998). "Evidence for involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight." *Eur J Pharmacol* **360**(1): 15-9.
- Kask, A., L. Rago, J. E. Wikberg and H. B. Schioth (2000). "Differential effects of melanocortin peptides on ingestive behaviour in rats: evidence against the involvement of MC(3) receptor in the regulation of food intake." *Neurosci Lett* **283**(1): 1-4.
- Keesey, R. E. and M. D. Hirvonen (1997). "Body weight set-points: determination and adjustment." *J Nutr* **127**(9): 1875S-1883S.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**(901): 578-96.
- Kim, R. Y., S. W. Shin, B. J. Kim, W. Lee and J. H. Baik (2005). "Dynamic regulation of hypothalamic neuropeptide gene expression and food intake by melanocortin analogues and reversal with melanocortin-4 receptor antagonist." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(4): 1178-85.
- Kishi, T., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, K. G. Mountjoy, C. B. Saper and J. K. Elmquist (2003). "Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat." *J Comp Neurol* **457**(3): 213-35.
- Kleyn, P. W., W. Fan, S. G. Kovats, J. J. Lee, J. C. Pulido, Y. Wu, L. R. Berkemeier, D. J. Misumi, L. Holmgren, O. Charlat, E. A. Woolf, O. Tayber, T. Brody, P. Shu, F. Hawkins, B. Kennedy, L. Baldini, C. Ebeling, G. D. Alperin, J. Deeds, N. D. Lakey, J. Culpepper, H. Chen, M. A. Glucksmann-Kuis, G. A. Carlson, G. M. Duyk and K. J. Moore (1996). "Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: a member of a novel gene family." *Cell* **85**(2): 281-90.
- Klingenspor, M., H. Niggemann and G. Heldmaier (2000). "Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*." *J Comp Physiol [B]* **170**(1): 37-43.
- Koegler, F. H., K. L. Grove, A. Schiffmacher, M. S. Smith and J. L. Cameron (2001). "Central melanocortin receptors mediate changes in food intake in the rhesus macaque." *Endocrinology* **142**(6): 2586-92.
- Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." *Nature* **404**(6778): 635-43.

- Kraeft, S., K. Schwarzer, S. Eiden, B. Nuesslein-Hildesheim, G. Preibisch and I. Schmidt (1999). "Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (fa) in newborn rats." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): E836-42.
- Krebs, D. L. and D. J. Hilton (2000). "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling." J Cell Sci **113** (Pt 16): 2813-9.
- Labib, M. (2003). "acp Best Practice No 168. The investigation and management of obesity." J Clin Pathol **56**(1): 17-25.
- Lee, G. H., R. Proenca, J. M. Montez, K. M. Carroll, J. G. Darvishzadeh, J. I. Lee and J. M. Friedman (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." Nature **379**(6566): 632-5.
- Levin, B. E. and A. A. Dunn-Meynell (2002). "Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(1): R46-54.
- Levin, B. E. and R. E. Keeseey (1998). "Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats." Am J Physiol **274**(2 Pt 2): R412-9.
- Lin, S., T. C. Thomas, L. H. Storlien and X. F. Huang (2000). "Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice." Int J Obes Relat Metab Disord **24**(5): 639-46.
- Lopez, I. P., A. Marti, F. I. Milagro, L. Zulet Md Mde, M. J. Moreno-Aliaga, J. A. Martinez and C. De Miguel (2003). "DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats." Obes Res **11**(2): 188-94.
- Lubrano-Berthelie, C., E. Durand, B. Dubern, A. Shapiro, P. Dazin, J. Weill, C. Ferron, P. Froguel and C. Vaisse (2003). "Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations." Hum Mol Genet **12**(2): 145-53.
- Luger, T. A. and T. Lotti (1998). "Neuropeptides: role in inflammatory skin diseases." J Eur Acad Dermatol Venereol **10**(3): 207-11.
- Lutz, T. A., E. Del Prete, B. Walzer and E. Scharrer (1996). "The histaminergic, but not the serotonergic, system mediates amylin's anorectic effect." Peptides **17**(8): 1317-22.
- Lutz, T. A., S. Tschudy, A. Mollet, N. Geary and E. Scharrer (2001). "Dopamine D(2) receptors mediate amylin's acute satiety effect." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(6): R1697-703.
- Lutz, T. A., S. Tschudy, P. A. Rushing and E. Scharrer (2000). "Amylin receptors mediate the anorectic action of salmon calcitonin (sCT)." Peptides **21**(2): 233-8.
- MacNeil, D. J., A. D. Howard, X. Guan, T. M. Fong, R. P. Nargund, M. A. Bednarek, M. T. Goulet, D. H. Weinberg, A. M. Strack, D. J. Marsh, H. Y. Chen, C. P. Shen, A. S. Chen, C. I. Rosenblum, T. MacNeil, M. Tota, E. D. MacIntyre and L. H. Van der Ploeg (2002). "The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity." Eur J Pharmacol **450**(1): 93-109.
- Maes, H. H., G. P. Beunen, R. F. Vlietinck, M. C. Neale, M. Thomis, B. Vanden Eynde, R. Lysens, J. Simons, C. Derom and R. Derom (1996). "Inheritance of physical fitness in 10-yr-old twins and their parents." Med Sci Sports Exerc **28**(12): 1479-91.

- Margareto, J., J. Gomez-Ambrosi, A. Marti and J. A. Martinez (2001). "Time-dependent effects of a high-energy-yielding diet on the regulation of specific white adipose tissue genes." Biochem Biophys Res Commun **283**(1): 6-11.
- Markewicz, B., G. Kuhmichel and I. Schmidt (1993). "Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis." Am J Physiol **265**(3 Pt 1): E478-86.
- Marsh, D. J., G. Hollopeter, D. Huszar, R. Laufer, K. A. Yagaloff, S. L. Fisher, P. Burn and R. D. Palmiter (1999). "Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides." Nat Genet **21**(1): 119-22.
- Mayer, J. (1953). "Glucostatic mechanism of regulation of food intake." N Engl J Med **249**(1): 13-6.
- McMinn, J. E., C. W. Wilkinson, P. J. Havel, S. C. Woods and M. W. Schwartz (2000). "Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(2): R695-703.
- Mergen, M., H. Mergen, M. Ozata, R. Oner and C. Oner (2001). "A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity." J Clin Endocrinol Metab **86**(7): 3448.
- Miller, K. A., T. M. Gunn, M. M. Carrasquillo, M. L. Lamoreux, D. B. Galbraith and G. S. Barsh (1997). "Genetic studies of the mouse mutations mahogany and mahoganoid." Genetics **146**(4): 1407-15.
- Millington, G. W., Y. C. Tung, A. K. Hewson, S. O'Rahilly and S. L. Dickson (2001). "Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat." Neuroscience **108**(3): 437-45.
- Moldrich, G. and T. Wenger (2000). "Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study." Peptides **21**(11): 1735-42.
- Mollet, A., T. A. Lutz, S. Meier, T. Riediger, P. A. Rushing and E. Scharrer (2001). "Histamine H1 receptors mediate the anorectic action of the pancreatic hormone amylin." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(5): R1442-8.
- Montague, C. T., I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, J. E. Digby, S. N. Mohammed, J. A. Hurst, C. H. Cheetham, A. R. Earley, A. H. Barnett, J. B. Prins and S. O'Rahilly (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." Nature **387**(6636): 903-8.
- Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu and M. A. Cawthorne (1998). "Leptin action in intestinal cells." J Biol Chem **273**(40): 26194-201.
- Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly and R. D. Cone (1994). "Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain." Mol Endocrinol **8**(10): 1298-308.
- Nagle, D. L., S. H. McGrail, J. Vitale, E. A. Woolf, B. J. Dussault, Jr., L. DiRocco, L. Holmgren, J. Montagno, P. Bork, D. Huszar, V. Fairchild-Huntress, P. Ge, J. Keilty, C. Ebeling, L. Baldini, J. Gilchrist, P. Burn, G. A. Carlson and K. J. Moore (1999). "The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity." Nature **398**(6723): 148-52.
- Nijenhuis, W. A., J. Oosterom and R. A. Adan (2001). "AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor." Mol Endocrinol **15**(1): 164-71.

- Nisoli, E. and M. O. Carruba (2004). "Emerging aspects of pharmacotherapy for obesity and metabolic syndrome." Pharmacol Res **50**(5): 453-69.
- Niswender, K. D. and M. W. Schwartz (2003). "Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities." Front Neuroendocrinol **24**(1): 1-10.
- Nobentrauth, K. N., JK. North, MA. Nishina, PM. (1996). "A Candidate Gene for the mouse mutation Tubby." Nature **380**((6574)): 534-538.
- Olbort, M. (1998). Auswirkung von einer oder zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes fa (fatty) auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Raten im Säuglingsalter. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang, J. A. Kerns, Y. Chen, I. Gantz and G. S. Barsh (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." Science **278**(5335): 135-8.
- Pal, R. and A. Sahu (2003). "Leptin signaling in the hypothalamus during chronic central leptin infusion." Endocrinology **144**(9): 3789-98.
- Perlow, M. J., W. J. Freed, J. S. Carman and R. J. Wyatt (1980). "Calcitonin reduces feeding in man, monkey and rat." Pharmacol Biochem Behav **12**(4): 609-12.
- Pierroz, D. D., M. Ziotopoulou, L. Ungsuan, S. Moschos, J. S. Flier and C. S. Mantzoros (2002). "Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity." Diabetes **51**(5): 1337-45.
- Pietilainen, K. H., J. Kaprio, A. Rissanen, T. Winter, A. Rimpela, R. J. Viken and R. J. Rose (1999). "Distribution and heritability of BMI in Finnish adolescents aged 16y and 17y: a study of 4884 twins and 2509 singletons." Int J Obes Relat Metab Disord **23**(2): 107-15.
- Podingbauer, A. and C. Ekmekcioglu (2005). "Regulation der Nahrungsaufnahme: Physiologische Mechanismen und klinische Relevanz." Journal für Ernährungsmedizin **7**(1): 22-29.
- Poggioli, R., A. V. Vergoni and A. Bertolini (1986). "ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists." Peptides **7**(5): 843-8.
- Porte, D., Jr., D. G. Baskin and M. W. Schwartz (2002). "Leptin and insulin action in the central nervous system." Nutr Rev **60**(10 Pt 2): S20-9; discussion S68-84, 85-7.
- Poyner, D. R., P. M. Sexton, I. Marshall, D. M. Smith, R. Quirion, W. Born, R. Muff, J. A. Fischer and S. M. Foord (2002). "International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 233-46.
- Pritchard, L. E., A. V. Turnbull and A. White (2002). "Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity." J Endocrinol **172**(3): 411-21.
- Rafael, J. and A. W. Herling (2000). "Leptin effect in ob/ob mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(3): R790-5.

- Ravelli, G. P., Z. A. Stein and M. W. Susser (1976). "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy." N Engl J Med **295**(7): 349-53.
- Ravussin, E. (1995). "Metabolic differences and the development of obesity." Metabolism **44**(9 Suppl 3): 12-4.
- Ravussin, E. and C. Bouchard (2000). "Human genomics and obesity: finding appropriate drug targets." Eur J Pharmacol **410**(2-3): 131-145.
- Riediger, T., H. A. Schmid, T. Lutz and E. Simon (2001). "Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(6): R1833-43.
- Riediger, T., H. A. Schmid, A. A. Young and E. Simon (1999). "Pharmacological characterisation of amylin-related peptides activating subfornical organ neurones." Brain Res **837**(1-2): 161-8.
- Riediger, T., M. Traebert, H. A. Schmid, C. Scheel, T. A. Lutz and E. Scharrer (2003). "Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus." Neurosci Lett **341**(2): 151-5.
- Riediger, T., D. Zuend, C. Becskei and T. A. Lutz (2004). "The anorectic hormone amylin contributes to feeding-related changes of neuronal activity in key structures of the gut-brain axis." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(1): R114-22.
- Roh, J., C. L. Chang, A. Bhalla, C. Klein and S. Y. Hsu (2004). "Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes." J Biol Chem **279**(8): 7264-74.
- Sahu, A. (2002). "Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin resistance in neuropeptide Y neurones." J Neuroendocrinol **14**(10): 796-804.
- Saltiel, A. and C. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Saper, C. B., T. C. Chou and J. K. Elmquist (2002). "The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating." Neuron **36**(2): 199-211.
- Satoh, N., Y. Ogawa, G. Katsuura, M. Hayase, T. Tsuji, K. Imagawa, Y. Yoshimasa, S. Nishi, K. Hosoda and K. Nakao (1997). "The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats." Neurosci Lett **224**(3): 149-52.
- Satoh, N., Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, H. Masuzaki, Y. Yoshimasa and K. Nakao (1998). "Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system." Neurosci Lett **249**(2-3): 107-10.
- Sawyer, T. K., P. J. Sanfilippo, V. J. Hruby, M. H. Engel, C. B. Heward, J. B. Burnett and M. E. Hadley (1980). "4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(10): 5754-8.
- Schmidt, I. (2001). The Role of Juvenile Thermoregulatory Thermogenesis in the Development of Normal Energy Balance or Obesity. Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain. Kosaka, M. S., T; Schmidt, KI; Simon, E. Tokyo: 215-225.

- Schulinkamp, R. J., T. C. Pagano, D. Hung and R. B. Raffa (2000). "Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications." Neurosci Biobehav Rev **24**(8): 855-72.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-71.
- Seeley, R. J., K. A. Yagaloff, S. L. Fisher, P. Burn, T. E. Thiele, G. van Dijk, D. G. Baskin and M. W. Schwartz (1997). "Melanocortin receptors in leptin effects." Nature **390**(6658): 349.
- Sexton, P. M., D. M. Findlay and T. J. Martin (1999). "Calcitonin." Curr Med Chem **6**(11): 1067-93.
- Sexton, P. M., G. Paxinos, M. A. Kenney, P. J. Wookey and K. Beaumont (1994). "In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain." Neuroscience **62**(2): 553-67.
- Shimizu, N., Y. Oomura, C. R. Plata-Salaman and M. Morimoto (1987). "Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus." Brain Res **416**(1): 153-6.
- Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." Diabetes **50**(2): 227-32.
- Shinyama, H., H. Masuzaki, H. Fang and J. S. Flier (2003). "Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization." Endocrinology **144**(4): 1301-14.
- Siegrist-Kaiser, C. A., V. Pauli, C. E. Juge-Aubry, O. Boss, A. Pernin, W. W. Chin, I. Cusin, F. Rohner-Jeanraud, A. G. Burger, J. Zapf and C. A. Meier (1997). "Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue." J Clin Invest **100**(11): 2858-64.
- Sinha, P. S., H. B. Schioth and J. B. Tatro (2003). "Activation of central melanocortin-4 receptor suppresses lipopolysaccharide-induced fever in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(6): R1595-603.
- Sinha, P. S., H. B. Schioth and J. B. Tatro (2004). "Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH." Brain Res **1001**(1-2): 150-8.
- Slominski, A., G. Ermak and M. Mihm (1996). "ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin." J Clin Endocrinol Metab **81**(7): 2746-9.
- Smith, B. K., P. K. Andrews and D. B. West (2000). "Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **278**(4): R797-805.
- Snyder, E. E., B. Walts, L. Perusse, Y. C. Chagnon, S. J. Weisnagel, T. Rankinen and C. Bouchard (2004). "The human obesity gene map: the 2003 update." Obes Res **12**(3): 369-439.
- Spiegelman, B. M. and J. S. Flier (2001). "Obesity and the regulation of energy balance." Cell **104**(4): 531-43.
- Ste Marie, L., G. I. Miura, D. J. Marsh, K. Yagaloff and R. D. Palmiter (2000). "A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12339-44.

- Steinbrück, A. (2004). Diätinduzierte und temperaturabhängige Störungen im Leptinsystem von C57Bl/6J-Mäusen. Giessen, Justus-Liebig-Universität.
- Stunkard, A. J., J. R. Harris, N. L. Pedersen and G. E. McClearn (1990). "The body-mass index of twins who have been reared apart." N Engl J Med **322**(21): 1483-7.
- Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." J Biol Chem **272**(10): 6093-6.
- Tatro, J. B. and P. S. Sinha (2003). "The central melanocortin system and fever." Ann N Y Acad Sci **994**: 246-57.
- Taylor, J. W., Q. K. Jin, M. Sbacchi, L. Wang, P. Belfiore, M. Garnier, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, P. F. Zaratini and M. A. Scheideler (2002). "Side-chain lactam-bridge conformational constraints differentiate the activities of salmon and human calcitonins and reveal a new design concept for potent calcitonin analogues." J Med Chem **45**(5): 1108-21.
- Thim, L., P. Kristensen, P. J. Larsen and B. S. Wulff (1998). "CART, a new anorectic peptide." Int J Biochem Cell Biol **30**(12): 1281-4.
- Thody, A. J., M. F. Cooper, P. E. Bowden, D. Meddis and S. Shuster (1976). "Effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone and testosterone on cutaneous and modified sebaceous glands in the rat." J Endocrinol **71**(3): 279-88.
- Thornton, J. E., C. C. Cheung, D. K. Clifton and R. A. Steiner (1997). "Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice." Endocrinology **138**(11): 5063-6.
- Trayhurn, P., N. Hoggard, J. G. Mercer and D. V. Rayner (1999). "Leptin: fundamental aspects." Int J Obes Relat Metab Disord **23 Suppl 1**: 22-8.
- Tripp, B. and B. Ludvik (2004). "Novel anti-obesity drugs." Acta Med Austriaca **31**(4): 133-138.
- Tschöp, M., D. L. Smiley and M. L. Heiman (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." Nature **407**(6806): 908-13.
- Tsigos, C., K. Arai, W. Hung and G. P. Chrousos (1993). "Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropic receptor gene." J Clin Invest **92**(5): 2458-61.
- Twery, M. J., J. F. Obie and C. W. Cooper (1982). "Ability of calcitonins to alter food and water consumption in the rat." Peptides **3**(5): 749-55.
- Udawela, M., D. L. Hay and P. M. Sexton (2004). "The receptor activity modifying protein family of G protein coupled receptor accessory proteins." Semin Cell Dev Biol **15**(3): 299-308.
- Uotani, S., C. Bjorbaek, J. Tornøe and J. S. Flier (1999). "Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation." Diabetes **48**(2): 279-86.
- Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand and P. Froguel (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." Nat Genet **20**(2): 113-4.

- Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, Jr., M. Stoffel and J. M. Friedman (1996). "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice." Nat Genet **14**(1): 95-7.
- Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader and H. R. Davis, Jr. (1997). "Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin." J Clin Invest **99**(3): 385-90.
- Vine, W., K. Beaumont, B. Gedulin, R. Pittner, C. X. Moore, T. J. Rink and A. A. Young (1996). "Comparison of the in vitro and in vivo pharmacology of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide and amylin in rats." Eur J Pharmacol **314**(1-2): 115-21.
- Visscher, T. L. and J. C. Seidell (2001). "The public health impact of obesity." Annu Rev Public Health **22**: 355-75.
- Vrang, N., P. J. Larsen, J. T. Clausen and P. Kristensen (1999). "Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons." J Neurosci **19**(10): RC5.
- Wang, J., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai and L. Rossetti (1998). "A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat." Nature **393**(6686): 684-8.
- Wauters, M., R. V. Considine and L. F. Van Gaal (2000). "Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator." Eur J Endocrinol **143**(3): 293-311.
- Weide, K., N. Christ, K. M. Moar, J. Arens, A. Hinney, J. G. Mercer, S. Eiden and I. Schmidt (2003). "Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice." Physiol Genomics **13**(1): 47-56.
- Wessells, H., D. Gralnek, R. Dorr, V. J. Hruby, M. E. Hadley and N. Levine (2000). "Effect of an alpha-melanocyte stimulating hormone analog on penile erection and sexual desire in men with organic erectile dysfunction." Urology **56**(4): 641-6.
- West, D. B., C. N. Boozer, D. L. Moody and R. L. Atkinson (1992). "Dietary obesity in nine inbred mouse strains." Am J Physiol **262**(6 Pt 2): R1025-32.
- West, D. B., J. Waguespack and S. McCollister (1995). "Dietary obesity in the mouse: interaction of strain with diet composition." Am J Physiol **268**(3 Pt 2): R658-65.
- Westermarck, P., C. Wernstedt, E. Wilander and 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**(3): 827-31.
- Whelan, G. and P. A. Flecknell (1992). "The assessment of depth of anaesthesia in animals and man." Lab Anim **26**(3): 153-62.
- WHO (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916: 54-71.
- Wikberg, J. E. (1999). "Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 295-310.
- Wilding, J. P. (2002). "Neuropeptides and appetite control." Diabet Med **19**(8): 619-27.

- Williams, G., C. Bing, X. J. Cai, J. A. Harrold, P. J. King and X. H. Liu (2001). "The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes." Physiol Behav **74**(4-5): 683-701.
- Wimalawansa, S. J. (1997). "Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily." Crit Rev Neurobiol **11**(2-3): 167-239.
- Wirth, M. M., P. K. Olszewski, C. Yu, A. S. Levine and S. Q. Giraud (2001). "Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTH reduce feeding without causing aversive effects." Peptides **22**(1): 129-34.
- Wolf, P. (2005). "Adipositas." Kleintier Konkret **1**: 19-22.
- Woods, S. C., D. Porte, Jr., E. Bobbioni, E. Ionescu, J. F. Sauter, F. Rohner-Jeanrenaud and B. Jeanrenaud (1985). "Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight." Am J Clin Nutr **42**(5 Suppl): 1063-71.
- Yang, Y., M. Chen, Y. Lai, I. Gantz, A. Yagmurlu, K. E. Georgeson and C. M. Harmon (2003). "Molecular determination of agouti-related protein binding to human melanocortin-4 receptor." Mol Pharmacol **64**(1): 94-103.
- Yen, T. T., A. M. Gill, L. G. Frigeri, G. S. Barsh and G. L. Wolff (1994). "Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow A(vy)/- mice: ectopic expression of the agouti gene." Faseb J **8**(8): 479-88.
- Yeo, G. S., I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. G. Stanhope and S. O'Rahilly (1998). "A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity." Nat Genet **20**(2): 111-2.
- Zhang, Y., M. Olbort, K. Schwarzer, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Nicolson, E. Murphy, T. J. Kowalski, I. Schmidt and R. L. Leibel (1997). "The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 492-5.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.

8 Danksagung

Diese Seite soll all jenen Dank sagen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich mit Rat und Tat, Geduld und Zuversicht unterstützt haben.

An Frau Prof. Dr. Schmidt ergeht ein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit - in unvergessener Erinnerung. Prof. Dr. Simon ganz herzlichen Dank, für das Licht, dass er in das statistische Dickicht brachte und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für die auftretenden Probleme hatte und immer Ideen für ihre Lösung. Prof. Dr. Diener danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit an der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Nicht zu vergessen die große, schnell und oft auch einfallsreich Hilfe die mir aus der Werkstatt durch Klaus Burk und Wolfgang Schubert, aus der Verwaltung durch Ingrid Radermacher und ganz besonders aus der Computerabteilung durch Helmut Busch und Frank Voss entgegengebracht wurde.

Keinesfalls unerwähnt bleiben soll die Arbeitsgruppe Schmidt. Birgit Mey ein großes Dankeschön für die Einarbeitung in die praktische Arbeit und die Auswertungsprogramme, die immerwährende Hilfsbereitschaft und besonders für die vielen unterstützenden Gespräche. Sandra Eiden danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken, das unentwegte kritische Hinterfragen der Daten, die „Endabnahme“ und den Zeitaufwand der damit verbunden war - es waren lehrreiche und lustige Stunden. Alexandra Steinbrück-Poulet, Andrea Fritz, Karin Weide und Mauricio Berriel-Diaz, wir alle haben irgendwann ein Büro miteinander geteilt. Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre! Es gab immer Raum für wissenschaftliche Diskussionen, Hilfe bei kleinen und großen wissenschaftlichen Problemen, aber auch viel Spaß und Freude und Platz für Sorgen und Nöte, die das Leben so mit sich bringt. Bei Roswitha Bender und Diana Fuchs möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Durchführung der PCRs, vielen weiteren Labor-Tätigkeiten und zeitaufwändigen Arbeiten bedanken. Sina Scholz, der besten aller Tierpflegerinnen, sei gedankt für die gekonnte und überaus gewissenhafte Ausführung aller anfallenden Arbeiten bei der Versuchsdurchführung und für die häufige Übernahme der Wochenend-Dienste. Auch zahlreichen Diplomanten, Praktikanten und HiWis sei gedankt, unter ihnen besonders Thomas Maier und Sebastian Buchholz, die mich bei praktischen Arbeiten entlastet haben.

Ein Wort des Dankes ist zuwenig für die Menschen, die mich auf meinem Lebensweg begleiten, dazu gehören:

Meine Eltern Reinhard und Christine Socher

Mein Mann Ralf und unser Sohn Lazare

Katrin Mey

Familie Dr. Posselt

– Die, die nicht mehr sind, bleiben unvergessen –

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

**„ Tierexperimentelle Untersuchungen zur Behandlung einer Adipositas infolge
Melanokortin-4-Rezeptor-Defizienz mit unterschiedlichen pharmakologischen
Behandlungsstrategien“**

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, September 2005



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5013-4



9 783835 950139