# Entwicklung der Adipositas und Neuropeptidexpression bei Melanokortin-4-Rezeptor-defizienten Mäusen unter besonderer Berücksichtigung der Haltungsbedingungen

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Karin Weide**

aus Frankfurt/Main

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 22.02.2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. I. Schmidt

Zweitgutachter: HD Dr. M. Klingenspor

Tag der mündlichen Prüfung am 28.02.2006

**Groß sind die Werke des Herrn;**

**wer sie erforscht, der hat Freude daran.**

**Psalm 111, 2**

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS……I

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE……VI

**1 EINLEITUNG……1**

**1.1 Adipositas……1**

**1.2 Untersuchung der Adipositas mit Hilfe von Tiermodellen……4**

**1.3 Hormone, Peptide und Neuropeptide, die an der Regulation des Körpergewichts beteiligt sind……5**

1.3.1 LEPTIN……5

1.3.1.1 Entdeckung des Leptins……5

1.3.1.2 Struktur und Funktion des Leptins……6

1.3.1.3 Leptinrezeptor……8

1.3.2 WEITERE HORMONE UND PEPTIDE, DIE IN DER PERIPHERIE GEBILDET WERDEN……9

1.3.2.1 Insulin……9

1.3.2.2 Weitere intestinale Peptidhormone……10

1.3.3 NEUROPEPTIDE……11

1.3.3.1 NPY (Neuropeptid Y)……11

1.3.3.2 AGRP (Agouti-related protein)……12

1.3.3.3 POMC (Pro-Opiomelanokortin)……14

1.3.3.4 CART (Cocaine- and Amphetamine-regulated transcript)……15

1.3.3.5 MCH (Melanin-concentrating hormone)……16

1.3.3.6 Orexin A und B (Hypocretin 1 und 2)……17

1.3.4 DAS MELANOKORTINSYSTEM……17

1.3.5 ZUSAMMENFASSUNG……22

**1.4 Der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung und Entwicklung der Adipositas……22**

1.4.1 THERMONEUTRALITÄT……22

1.4.2 DIÄTINDUZIERTE ADIPOSITAS……23

1.4.3 FRÜHPOSTNATALE EINFLÜSSE AUF DIE ENTSTEHUNG DER ADIPOSITAS……24

**1.5 Ziele der Arbeit……25**

**2 MATERIAL UND METHODEN……27**

**2.1 Versuchstiere……27**

**2.2 Versuchsreihen……27**

**2.3 Untersuchungen vor und während des Versuchs……29**

2.3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE GENOTYPBESTIMMUNG ..... 29
2.3.1.1 Gewinnung und Aufarbeitung der DNA ..... 29
2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion ..... 29
2.3.1.3 Elektrophorese ..... 30
2.3.2 BESTIMMUNG VON FUTTERAUFNAHME UND KÖRPERMASSE ..... 30
2.3.3 BESTIMMUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS ..... 31
2.3.3.1 Versuchsaufbau ..... 31
2.3.3.2 Bestimmung der Stoffwechselrate ..... 33
**2.4 Untersuchungen nach Ablauf des Versuchs ..... 34**
2.4.1 TÖTUNG DER VERSUCHSTIERE UND PLASMAGEWINNUNG ..... 34
2.4.2 PRÄPARATION DER GEHIRNE ..... 34
2.4.3 BESTIMMUNG DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG ..... 34
2.4.4 BESTIMMUNG DER HORMONKONZENTRATIONEN IM PLASMA ..... 35
2.4.5 IN SITU HYBRIDISIERUNG ..... 36
2.4.5.1 Schneiden der Gehirne ..... 36
2.4.5.2 Durchführung der radioaktiven in situ Hybridisierung ..... 37
*2.4.5.2.1 Herstellung der Sonde (in vitro Transkription) ..... 37*
*2.4.5.2.2 Herstellung des Hybridisierungspuffers ..... 38*
*2.4.5.2.3 Herstellung der Hybridisierungslösung ..... 38*
*2.4.5.2.4 Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte ..... 38*
*2.4.5.2.5 Posthybridisierung ..... 38*
*2.4.5.2.6 Autoradiographie ..... 39*
*2.4.5.2.7 Auswertung der Röntgenfilme ..... 39*
**2.5 Statistische Datenauswertung ..... 40**
2.5.1 REGRESSIONSANALYSEN ..... 40
2.5.2 VARIANZANALYSEN ..... 40
**3 ERGEBNISSE ..... 42**
**3.1 Untersuchungen an 10, 21, 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen bei Standardernährung und 22°C Umgebungstemperatur ..... 42**
3.1.1 AUSWIRKUNGEN VON GESCHLECHT UND GENOTYP AUF DIE KÖRPERZUSAMMENSETZUNG ..... 42
3.1.1.1 Feuchtmasse und fettfreie Trockenmasse ..... 42
3.1.1.2 Feuchtmasse und Körperfett ..... 43
3.1.1.3 Körperzusammensetzung bei 56 Tage alten Tieren ..... 45
3.1.1.4 Zusammenfassende statistische Auswertung der Körperzusammensetzung unter zusätzlicher Einbeziehung des Wurffaktors ..... 47

3.1.2 PLASMALEPTINGEHALT DER VERSCHIEDENEN ALTERSSTUFEN ..... 51
3.1.3 SAUERSTOFF UND FUTTERMESSUNG VON TAG 21-35 BEI MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN BEI STANDARDERNÄHRUNG UND 22°C ..... 53
**3.2 Untersuchungen an 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen bei hochkalorischer Zusatzfütterung und 34°C Umgebungstemperatur ..... 56**
3.2.1 TIERE IM ALTER VON 35 TAGEN UND DIE AUSWIRKUNGEN VON GESCHLECHT UND GENOTYP AUF DAS KÖRPERGEWICHT UND DIE KÖRPERZUSAMMENSETZUNG ..... 56
3.2.1.1 Körpergewicht und Körperzusammensetzung ..... 56
3.2.1.2 Statistische Auswertung unter zusätzlicher Berücksichtigung des Wurffaktors ..... 58
3.2.2 PLASMALEPTINGEHALT DER 35 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 60
3.2.3 FUTTERAUFNAHME DER 35 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 61
3.2.4 VERGLEICH DES KÖRPERGEWICHTS UND DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG VON 35 TAGE ALTEN TIEREN MIT STANDARDFUTTER BEI 22°C UND TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 64
3.2.5 KÖRPERGEWICHTSVERLÄUFE VON 56 TAGE ALTEN TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 66
3.2.6 TIERE IM ALTER VON 56 TAGEN UND DIE AUSWIRKUNGEN VON GESCHLECHT UND GENOTYP AUF DAS KÖRPERGEWICHT UND DIE KÖRPERZUSAMMENSETZUNG ..... 67
3.2.6.1 Köpergewicht und Körperzusammensetzung ..... 67
3.2.6.2 Statistische Auswertung unter zusätzlicher Berücksichtigung des Wurffaktors ..... 70
3.2.7 PLASMALEPTINGEHALT DER 56 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 72
3.2.8 FUTTERAUFNAHME DER 56 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 73
3.2.9 VERGLEICH DES KÖRPERGEWICHTS UND DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG VON 56 TAGE ALTEN TIEREN MIT STANDARDFUTTER BEI 22°C UND TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C ..... 76

**3.3 In situ Hybridisierung ..... 77**
3.3.1 NEUROPEPTID Y (NPY) ..... 78
3.3.2 PRO-OPIOMELANOKORTIN (POMC) ..... 80
3.3.3 AGOUTI-RELATED PROTEIN (AGRP) ..... 81
3.3.4 COCAINE-AND AMPHETAMINE-REGULATED TRANSCRIPT (CART) ..... 81
3.3.5 KOEXPRESSION DER NEUROPEPTIDE ..... 83
3.3.6 STATISTISCHE UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION ..... 83

**4 DISKUSSION ..... 86**

**4.1 Kritische Entwicklungsphasen ..... 86**
**4.2 Einfluss der Haltungstemperatur ..... 88**
**4.3 Hochkalorische Ernährung ..... 89**
**4.4 Körpergewicht ..... 91**
**4.5 Körperzusammensetzung ..... 91**
**4.6 Leptin ..... 93**
**4.7 Futteraufnahme ..... 96**
**4.8 Sauerstoffmessung ..... 97**
**4.9 Neuropeptidexpression bei Nagetieren ..... 98**
4.9.1 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEIM FASTEN ..... 98
4.9.2 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEI STANDARD DIÄT ..... 100
4.9.3 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEI HOCHKALORISCHER ERNÄHRUNG ..... 101
4.9.4 EINFLUSS DER PHYSISCHEN AKTIVITÄT AUF DIE ADIPOSITAS UND AUF DIE NEUROPEPTIDEXPRESSION ..... 103
**4.10 Einordnung der eigenen Befunde ..... 105**
**4.11 Steuerung orexigener und anorexigener Signale ..... 106**

**5 ZUSAMMENFASSUNG ..... 110**

**6 ANHANG – VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN ..... 113**

**6.1 Beschichten der Objektträger ..... 113**
**6.2 Herstellung der radioaktiv markierten RNA-Sonde ..... 113**
**6.3 Herstellung des Hybridisierungspuffers ..... 114**
**6.4 Herstellung der Hybridisierungslösung ..... 115**
**6.5 Hybridisierung ..... 115**
**6.6 Posthybridisierung ..... 116**
**6.7 Filmentwicklung ..... 116**

**7 LITERATURVERZEICHNIS ..... 117**

**DANKSAGUNG**

**ERKLÄRUNG**

**LEBENSLAUF**

# ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE

| | |
|---|---|
| +/+ | homozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens |
| +/- | heterozygoter Träger des Wildtyp-Allels eines Gens |
| -/- | homozygoter Träger eines defekten Allels eines Gens |
| $^{14}C$ | radioaktives Kohlenstoff-Isotop |
| $^{125}I$ | radioaktives Iod-Isotop |
| $^{35}S$ | radioaktives Schwefel-Isotop |
| ad libitum | zu freier Verfügung |
| ACTH | adrenocorticotropes Hormon |
| AGRP | „Agouti-related protein“ |
| AKR/J | Name eines Inzucht-Mäusestammes |
| α–MSH | „alpha-melanocyte-stimulating hormone“, α–Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| AM | Amygdala |
| anorexigen | appetithemmend |
| *Aqua dest.* | „aqua destillata“, destilliertes Wasser |
| ARC | Nucleus arcuatus des Hypothalamus |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β-MSH | β-Melanozyten stimulierendes Hormon |
| $B_0$ | Leerprobe im Radioimmunoassay |
| 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 |
| C57BL/6J | Name eines Inzucht-Mäusestammes |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CART | „Cocaine-and Amphetamine-regulated transcript“ |
| CC | Corpus callosum |

| | |
|---|---|
| CCX | cerebraler Cortex |
| cDNA | geklonte stabile mRNA-Kopie |
| $CO_2$ | Kohlendioxid |
| cpm | „counts per million“, Maßeinheit für radioaktiven Zerfall |
| $CrK(SO_4)_2*12H_2O$ | Chromkaliumsulfat-12-Hydrat |
| CTP | Cytosintriphosphat |
| db/db-Maus | homozygoter Träger des ausgeschalteten Leptinrezeptor-Gens, der keinen funktionellen Leptinrezeptor exprimieren kann |
| DEPC | Diethyl-Pyrocarbonat |
| DMN | Nucleus dorsomedialis des Hypothalamus |
| DNA/DNS | deoxyribonucleic acid/Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonucleosid Triphosphat |
| DPX | p-Xylen-bis (N-pyridin-bromid) |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | „ethylenediaminetetraacetic acid“, Ethylen-diamin-tetra-Essigsäure |
| *et al.* | „*et alii*“, lat.: und andere |
| EtOH | Ethanol |
| fa/fa-Ratte | homozygoter Träger des defekten Leptinrezeptor-Gens, der keinen funktionellen Leptinrezeptor exprimieren kann |
| FFDM | „fat-free dry-mass“, fettfreie Trockenmasse |
| FX | Fornix |
| γ-MSH | gamma-Melanozyten stimulierendes Hormon |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| $H_2O$ | Wasser |
| HI | Hippocampus |
| Hybridisierung | Verbindung zweier komplementärer Nukleinsäure-Einzelstränge zu einem Doppelstrang |
| icv | „intracerebroventrikulär“, in den Gehirnventrikel |
| IgG | γ–Immunglobuline |

| | |
|---|---|
| in situ | „am natürlichen Ort“, hier: an anatomisch und morphologisch unversehrten Gehirnschnitten von Mäusen |
| IOD | integrierte optische Dichte |
| ip | intraperitoneal |
| I.U. | „international unit“, internationale Einheit |
| JAK | „janus-kinase“, Thyrosinkinase der Janus-Familie |
| kb | kilo Basenpaare |
| kDa | kilo-Dalton, atomare Maßeinheit |
| LepR | Leptinrezeptor (wird in der neueren Literatur und in der vorliegenden Arbeit statt Ob-R verwendet), verschiedene Subtypen (LepRa, LepRb, LepRe) |
| LHA | „lateral hypothalamic area“, lateraler Hypothalamus |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| log | Logarithmus, logarithmisch |
| M | Einheit des Molekulargewichtes 1 Mol |
| MC3R | Melanokortin-3-Rezeptor |
| MC4R | Melanokortin-4-Rezeptor |
| MC4r | Gen, das den MC4R codiert |
| MC4r-KO Maus | Melanokortin-4-Rezeptor-Knockout Maus, homozygoter Träger des defekten *MC4r* |
| MCH | „Melanin concentrating hormone“ |
| ME | Eminentia mediana |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| $MgCl_2*6H_2O$ | Magnesiumchlorid-Hexahydrat |
| mRNA | „messenger ribolnucleic acid“, Boten-Ribonucleinsäure |
| MSH | Melanozyten stimulierendes Hormon (mehrere Typen: $\alpha$; $\beta$; $\gamma$) |
| N | Anzahl der untersuchten Tiere |
| NaCl | Natriumchlorid, Kochsalz |
| $NaH_2PO_4*2H_2O$ | Natrium-di-Hydrogenphosphat-Dihydrat |

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | di-Natrium-Hydrogenphosphat-Anhydrat |
| NPY | Neuropeptid Y |
| NSB | „non specific binding“, unspezifische Bindung des „Tracers“ im Radioimmunoassay |
| NTS | Nucleus tractus solitarii |
| ob | steht für ein defektes Leptin-codierendes Gen (Obesity) |
| ob/ob Maus | homozygoter Träger des ausgeschalteten ob-Gens, der kein funktionelles Leptin synthetisieren kann |
| ob-R | veraltete Bezeichnung für den Leptinrezeptor, heute LepR |
| OC | Chiasma opticum |
| orexigen | appetitsteigernd |
| P | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PA | „prä-optical area“ prä-optische Region |
| PBS | „phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung |
| PC1, PC2 | Pro-Hormon Convertasen |
| PCR | „polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFH | perifornikale Region des Hypothalamus |
| pGK | Phosphoglycerinkinase |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3 Kinase |
| POMC | „pro-opiomelanocortin“, Pro-Opiomelanokortin, |
| PP | pancreatic polypeptide |
| PVN | Nucleus paraventricularis des Hypothalamus |
| PYY | Polypeptid YY |
| RIA | Radioimmunoassay |
| rNTP | Ribonukleosid Triphosphat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAse | Ribonukleinsäure-spaltendes Enzym |

| | |
|---|---|
| RNA-Sonde | einzelsträngige markierte Basensequenz, die dem spezifischen Nachweis von komplementärer RNA im Gewebe dienen |
| RQ | respiratorischer Quotient |
| SCN | Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus |
| SE | Septum |
| SEM | „standard-error“, Standardfehler des Mittelwertes |
| SNP | „single nucleotide polymorphism“ |
| SOCS | „suppressor of cytokine signaling“ |
| SSC | Natriumchlorid / Natriumcitrat-Puffer |
| STAT | „signal transducers and activators of transcription“ |
| STPD | „standard temperature pressure dry“ Standardbedingungen: 273 K, 760 mm Hg und 60% $P_{H2O}$=0 mm Hg (Trockenheit) |
| TBE-Puffer | Tris-Borsäure-EDTA-Puffer |
| template | linearisiertes cDNA-Fragment, das als Transkriptionsvorlage der RNA-Sonde im Rahmen einer in situ-Hybridisierung dient |
| TH | Thalamus |
| $T_0$ | Totalaktivität im Radioimmunoassay |
| Tracer | radioaktiv markiertes Antigen bekannter Konzentration im Radioimmunoassay |
| tRNA | „transfer ribonucleic acid“, Transfer-Ribonucleinsäure |
| TULP | „tubby-like proteins“ |
| 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 |
| UCP | „uncoupling protein“ |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UTP | Uridintriphosphat |
| Vektor | „Träger“, Transportsystem (z.B. Plasmid) |
| VMN | Nucleus ventromedialis des Hypothalamus |
| Y1-5 | NPY-Rezeptor Subtypen |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Adipositas

Adipositas ist eine komplexe systemische Stoffwechselstörung, die durch eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts gekennzeichnet ist. Energetisch resultiert sie aus einer über einen längeren Zeitraum bestehenden positiven Energiebilanz, d.h. es wird mehr Energie aufgenommen als der Organismus verbraucht, und diese überschüssige Energie wird dann in Form von Fett im Körper gespeichert. Als Berechnungsgrundlage für die Gewichtsklassifikation wird meistens der Körpermassenindex (Body Mass Index – BMI) verwendet. Der BMI ist der Quotient aus dem Gewicht und der Körpergröße zum Quadrat. Übergewicht ist definiert als BMI > 25 kg/m², von Adipositas spricht man bei einem BMI > 30 kg/m² (WHO 1997).

In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl der übergewichtigen und adipösen Menschen in der Bevölkerung der westlichen Industrieländer stetig zugenommen, und diese Entwicklung hält auch weiterhin an. Vor allem in Regionen, in denen sich der Lebensstil der entwickelten Länder etabliert hat, ist eine Zunahme der Adipositas vor allem auch bei Kindern und Jugendlichen zu beobachten. In Deutschland sind ca. zwei Drittel der männlichen und ca. die Hälfte der weiblichen Bevölkerung übergewichtig oder adipös. Je nach Definition sind ca. 10-20% der Schulkinder und Jugendlichen als übergewichtig oder adipös zu bezeichnen. Der Anteil adipöser Kinder und Jugendlicher mit einem BMI über der 97. Perzentile liegt bei ca. sieben Prozent (Robert-Koch-Institut 2003).

Nicht nur der BMI, sondern auch das Fettverteilungsmuster kann als Parameter für den Grad der Adipositas in Betracht gezogen werden (Kopelman 2000). Eine einfache Methode zur Beurteilung der Fettverteilung ist die Schätzung der intraabdominalen/viszeralen Fettmasse durch Messung des Taillenumfangs (Lean *et al.* 1995). Bei einem Taillenumfang > 88 cm bei Frauen beziehungsweise > 102 cm bei Männern liegt eine abdominale Adipositas vor.

Das Vorliegen einer Adipositas begünstigt zahlreiche Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Chan *et al.* 1994; Colditz *et al.* 1995), Dyslipidämie, arterielle Hypertonie, kardiovaskuläre Erkrankungen, manche Karzinome (Everett *et al.* 2003; Stephenson *et al.* 2003; WHO 2003; Mao *et al.* 2003), pulmonale Komplikationen, gastrointestinale Erkrankungen und degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates.

Die Mehrzahl der Menschen ist auch bei größeren Schwankungen in der Nahrungsaufnahme in der Lage, ihr Körpergewicht auf einem konstanten Niveau zu halten. Die Fähigkeit, überschüssige Energie bei gutem Nahrungsangebot in einem Fettspeicher anzulegen, um für

Hungerperioden Energiereserven zu haben, ist für viele Tierarten, speziell für Winterschläfer, eine unverzichtbare Überlebensstrategie. Dies galt bis in die jüngere Vergangenheit auch für den Menschen, da auch damals eher Nahrungsmangel vorherrschte, und gilt jetzt immer noch für unter extremen Bedingungen lebende Naturvölker. In den westlichen Industrieländern haben wir heute jedoch keine Nahrungsknappheit mehr, sondern im Gegenteil ein Überangebot an Nahrung. Außerdem hat sich die Lebensweise dahingehend geändert, dass man sich vorwiegend in geheizten oder klimatisierten Räumen aufhält und häufig wenig Bewegung hat. Diese Lebensbedingungen, unter denen der Energieverbrauch minimiert ist, begünstigen die Entwicklung der Adipositas. Die Adipositasprävention ist eine wichtige Aufgabe, weil es mit zunehmender Dauer und Ausprägung der Adipositas immer schwieriger wird, sie dauerhaft rückgängig zu machen, und es dazu komplexer Behandlungsprogramme bedarf. Auch sind selbst bei dauerhafter Normalisierung des Körpergewichts die gesundheitlichen Folgeerscheinungen einer lange bestehenden Adipositas nicht immer reversibel (Weintraub 1992). Um der Entwicklung einer Adipositas vorzubeugen, wird ein gesunder Lebensstil mit regelmäßiger körperlicher Bewegung empfohlen (Jakicic *et al.* 2005). Bei der Ernährung sollte man die Regeln der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE 2004) berücksichtigen, die eine fettmoderate, stärkebetonte und ballaststoffreiche Ernährung empfiehlt.

Die Ursachen für die Entwicklung der Adipositas sind vielfältig. Die familiäre genetische Disposition spielt eine wichtige Rolle, wobei die Adipositas beim Menschen in der Regel polygenetisch bedingt ist. Nur sehr selten findet man monogenetische Formen der Adipositas. Die Entwicklung einer Adipositas wird durch den modernen Lebensstil (die ständige Verfügbarkeit von hochkalorischer Nahrung, eine angenehme Umgebungstemperatur und Bewegungsmangel) gefördert, und auch psychische Faktoren spielen eine Rolle. Essstörungen, endokrine Erkrankungen und einige Medikamente (z.B. manche Anti-depressiva, Neuroleptika) können eine Adipositas verursachen.

Wie man aus Tierversuchen weiß, kann die Entstehung und Entwicklung der Adipositas durch Störungen auf den verschiedenen Ebenen der Körpergewichtsregulation hervorgerufen werden. Die unterste Ebene, auf der eine Störung auftreten kann, ist die zelluläre Ebene (Rezeptorsynthese, Rezeptorbindung, Aktivierung von Signalkaskaden und Änderungen der Genexpression). Die nächste Ebene ist dann die nervös-humorale Ebene (sympathisches und parasympathisches Nervensystem, Neuropeptide), die auch das Zusammenwirken verschiedener Hormonsysteme umfasst und der schließlich die Ebene der Energiebalance (Gleichgewicht zwischen Futteraufnahme und Energieabgabe) übergeordnet ist. Auf jeder

Ebene spielen außerdem Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle und beeinflussen die Entstehung und Entwicklung der Adipositas (Schmidt 2002).

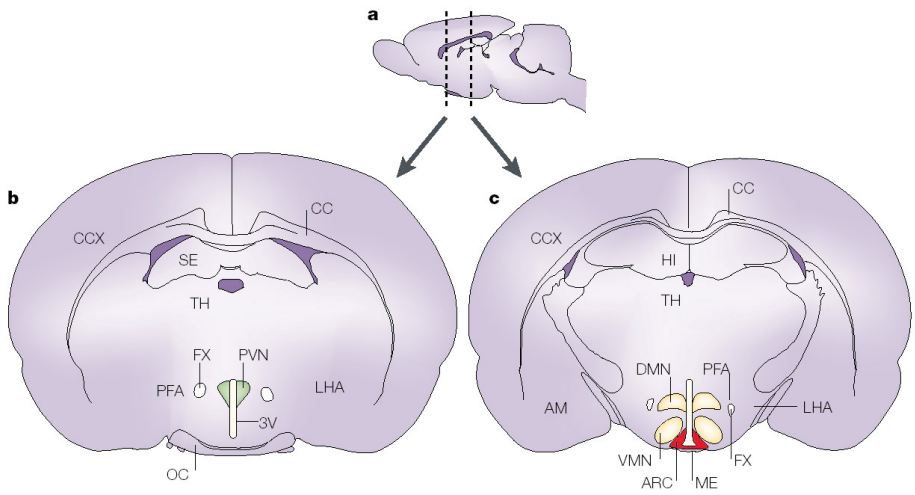



***Abb. 1:*** *Kerngebiete des Hypothalamus eines Rattengehirns, die an der Regulation des Körpergewichts beteiligt sind. a: Längsschnitt durch ein Rattengehirn, links das vordere Ende mit dem Bulbus olfactorius, rechts das caudale Rautenhirn. b, c: Querschnitte durch ein Rattengehirn an den in a markierten Stellen. Neurone 1. Ordnung, die auf humorale Signale reagieren, liegen im Nucleus arcuatus (c; ARC rot) und haben Projektionen zum paraventriculären Nucleus (b; PVN grün) und zur perifornikalen Region, die benachbart zur Fornix (b; FX weiß) liegt, und zum lateralen Hypothalamus (LHA). Andere Regionen, die an der Körpergewichtsregulation beteiligt sind, sind der ventromediale Nucleus (VMN gelb) und der dorsomediale Nucleus (DMN gelb).*

*Weitere Abkürzungen: AM Amygdala, CC Corpus callosum, CCX cerebraler Cortex, HI Hippocampus, ME Eminentia mediana, OC Chiasma opticum, SE Septum, TH Thalamus, 3V 3. Ventrikel (nach Barsh et al. 2002).*

Der Hypothalamus ist die Gehirnregion, der die entscheidende Rolle bei der Regulation des Körpergewichts zukommt. Im Jahr 1940 wurden Versuche an Ratten durchgeführt, die zur Aufstellung der Hypothese führten, dass im Gehirn zwei Areale, der laterale Hypothalamus und der ventromediale Hypothalamus, für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich sind. Läsionen im lateralen Hypothalamus führen zur Anorexie bis hin zum Verhungern und Läsionen im ventromedialen Hypothalamus führen zu übermäßiger Nahrungsaufnahme und zur Entwicklung einer Adipositas (Anand *et al.* 1951). Nach dem heutigen Wissensstand stehen diese Areale in Verbindung mit zahlreichen hypothalamischen Kerngebieten (PVN, DMN, ARC, suprachiasmatischer Nucleus) als Komponenten eines Netzwerks, das entscheidend für die Körpergewichtsregulation verantwortlich ist (siehe Abbildung 1). Außerdem werden im Hypothalamus metabolische und kognitive Informationen verarbeitet, die vom Rautenhirn und vom limbischen System kommen. Metabolische Informationen erhält der Hypothalamus außerdem vor allem durch die

Hormone Leptin und Insulin (Beck 2001). Wichtig für das Verständnis der Funktion dieses Netzwerkes ist die Kenntnis der an der Signalbildung und Fortleitung beteiligten Überträgersubstanzen, wobei es sich vornehmlich um Neuropeptide handelt. Auch die Erfassung von Störungen in der Synthese der Neuropeptide oder ihrer Rezeptoren kann Aufschluss über die komplexen neuronalen Steuerungsprozesse geben.

## 1.2 Untersuchung der Adipositas mit Hilfe von Tiermodellen

Zur Untersuchung der Mechanismen der Körpergewichtsregulation und ihrer mit der Entstehung und Entwicklung der Adipositas verbundenen Störungen stehen unterschiedliche diagnostische und experimentelle Methoden zur Verfügung. Histochemische Methoden ermöglichen es, die zentralen Neuropeptide selbst oder deren mRNA-Expression unter definierten Bedingungen der Nahrungsaufnahme oder des Körperfettgehalts quantitativ zu bestimmen. Die lokale experimentelle Beeinflussung des Regulationssystems erfolgt durch Injektion von Peptiden in die Nähe der hypothalamischen Kerngebiete. Durch entsprechende systemische Applikation lassen sich die Wirkungen derjenigen Botenstoffe manipulieren, die dem Gehirn den metabolischen Status des Organismus signalisieren. Vor allem war aber die Entdeckung von Mutationen bei Mäusen und Ratten, die für erbliche monogenetische Formen der Adipositas verantwortlich sind, eine entscheidende Hilfe, um die Ursachen der Adipositas zu erforschen. Diese Tiere ermöglichen eine Untersuchung der Adipositas am Tiermodell. Häufig werden Mausmodelle untersucht, weil das Mausgenom gut erforscht ist und eine große Homologie mit dem menschlichen Genom besitzt (Waterston *et al.* 2002).

Besonders bekannt sind die monogenetischen Mutationen agouti, tubby, obese, fat und diabetes. Von den agouti Mutationen wurden zuerst die spontan aufgetretenen Mutationen lethal yellow und yellow agouti untersucht. Inzwischen kennt man sechs verschiedene autosomal dominant vererbte agouti Mutationen. Das agouti Gen gab Aufschluss, dass das Produkt des agouti Gens Adipositas verursacht, indem es als Antagonist des Melanokortin-4-Rezeptors (MC4R) wirkt. Die Mutation tubby ist eine Spontanmutation, die 1997 im Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) auftrat und autosomal rezessiv vererbt wird. Die Funktion der tubby-like proteins (TULPs) ist noch nicht vollständig aufgeklärt, sie spielen aber wahrscheinlich eine Rolle beim Transport von Vesikeln, vermitteln beim Insulinsignalweg und sind an der Transkription von Genen beteiligt (Ikeda *et al.* 2002). Ebenso gibt es die autosomal rezessiv vererbte Mutation obese, von der bereits im Jahr 1950 berichtet wurde (Ingalls *et al.* 1950). Das obese Gen wurde dann 1994 identifiziert und führte zur Entdeckung des Leptins, eines Schüsselhormons, das dem Gehirn Informationen über die

Größe der Fettspeicher im Körper gibt. Homozygote Träger des ob Gendefekts sind nicht in der Lage, funktionelles Leptin zu bilden (Zhang *et al.* 1994). Die Untersuchung des autosomal rezessiv vererbten db (diabetes) Gens bei Mäusen und des fa (fatty) Gens bei einem adipösen Rattenstamm führte zur Identifikation des Leptinrezeptors. Sowohl db/db Mäusen als auch fa/fa Ratten fehlt ein funktionsfähiger LepRb Rezeptor (Chua *et al.* 1996). Durch die inzwischen etablierte Technik, transgene und Knockout Tiere zu erzeugen, bei denen spezifisch Gene, die bei der Körpergewichtsregulation eine Rolle spielen, eingebracht oder ausgeschaltet werden können, erschließt sich eine weitere gute Möglichkeit, die Adipositas am Tiermodell zu untersuchen. Bis heute sind viele transgene und Knockout Modelle erzeugt worden, die dazu beigetragen haben, dass neue Erkenntnisse über die komplexen Vorgänge bei der Körpergewichtsregulation gewonnen werden konnten. Für die Erforschung der einzigen bisher bekannten relevanten monogenetischen Form der Adipositas beim Menschen, der Mutationen im Melanokortin-4-Rezeptor Gen zu Grunde liegen, war die Entwicklung der MC4r-Knockout Maus von besonderer Bedeutung.

## 1.3 Hormone, Peptide und Neuropeptide, die an der Regulation des Körpergewichts beteiligt sind

### 1.3.1 LEPTIN

#### 1.3.1.1 Entdeckung des Leptins

Die Identifizierung des obese Gens war der letzte Schritt zur Entdeckung des Hormons Leptin (gr. leptos = dünn), das hauptsächlich im weißen Fettgewebe gebildet wird und ein Schlüsselhormon bei der Regulation des Körpergewichts ist. Bereits 1953 vermutete Kennedy (Kennedy 1953), dass es einen im Blut zirkulierenden Faktor gibt, der Information über die Größe der Fettspeicher gibt und über eine Rückkopplung zum Gehirn die Nahrungsaufnahme kontrolliert. Weiteren Aufschluss gaben die von Hervey und Coleman durchgeführten Parabioseversuche (Hervey 1959; Coleman 1973). Hervey führte Parabioseversuche mit Ratten durch, die Läsionen im ventromedialen Hypothalamus hatten. Coleman untersuchte die Auswirkung der Parabiose von ob/ob mit db/db Mäusen. Die ob Partner verloren an Gewicht und verhungerten durchschnittlich 26 Tage nach der Operation. Ähnliches, nämlich das Verhungern der Wildtypen innerhalb von 50 Tagen nach der Operation, hatte Coleman vorher auch bei Parabioseversuchen von Wildtypen mit db/db Mäusen beobachtet (Coleman *et al.* 1969). Er zog daraus den Schluss, dass die ob/ob Mäuse wie die normalen Mäuse ein intaktes Sättigungszentrum haben, das auf den Sättigungsfaktor,

der von den db/db Mäusen im Übermaß produziert wird, reagiert. Die Parabiose von ob/ob Mäusen mit Wildtypen führte zu einer lebensfähigen Kombination, bei der die ob/ob Mäuse langsamer an Gewicht zunahmen als bei Parabiose von ob/ob mit ob/ob Mäusen. Alle diese Versuche führten zu der Annahme, dass die ob/ob Mäuse zwar ein funktionsfähiges Sättigungszentrum besitzen, aber nicht in der Lage sind, den Sättigungsfaktor zu bilden, den sowohl normale als auch db/db Mäuse bilden können. Bei db/db Mäusen vermutete Coleman, dass das Sättigungszentrum defekt ist. Im Jahr 1994 gelang es Zhang (Zhang *et al.* 1994) das obese Gen zu identifizieren, was zur Entdeckung des Hormons Leptin führte. Nur ein Jahr später konnte dann auch die Sequenz des Leptinrezeptors (LepR oder ob-R) aufgeklärt werden (Tartaglia *et al.* 1995), dessen Defekt den Phänotyp der db/db Maus bedingt.

#### 1.3.1.2 Struktur und Funktion des Leptins

Das Maus ob Gen codiert ein 4,5 kb langes mRNA-Transkript. Das ob Gen umfasst 650 kb und besteht aus 3 Exons, die durch 2 Introns getrennt sind. Die codierende Region für das Protein liegt in den Exons 2 und 3. Bei den verschiedenen Spezies wurde eine weitgehende Homologie der Leptinsequenz festgestellt. Menschliches Leptin ist zu 84% mit dem murinen Leptin identisch (Zhang *et al.* 1994). Die Strukturanalyse des Proteins ergab, dass Leptin zu der Familie der Cytokine gehört.

Leptin wird hauptsächlich im weißen Fettgewebe gebildet und ins Blut abgegeben. Versuche sowohl bei Mäusen und Ratten als auch beim Menschen zeigten, dass der Plasmaleptinspiegel mit Größen, die ein Maß für den Grad der Adipositas sind, wie Körperfettmasse, Körperfettgehalt und BMI, korreliert ist. Am besten ist die Korrelation des Leptins mit der Körperfettmasse. Frauen haben bei gleichem Körperfett höhere Leptinwerte als Männer (Maffei *et al.* 1995; Considine *et al.* 1997). Der Geschlechtsunterschied in Bezug auf den Plasmaleptinspiegel beruht beim Menschen und bei Nagetieren darauf, dass Leptin bei Männchen durch Testosteron gehemmt wird und bei Weibchen wahrscheinlich durch Östrogen stimuliert wird, wobei für Weibchen auch berichtet wird, dass Östrogen keinen Einfluss auf den Plasmaleptinspiegel hat (Rosenbaum *et al.* 1996; Roemmich *et al.* 1998; Watanobe *et al.* 1999).

Eine Leptinexpression findet man nicht nur im weißen Fettgewebe, sondern auch im braunen Fettgewebe (Oliver *et al.* 2001). Im Magenepithel (Bado *et al.* 1998; Guilmeau *et al.* 2004), im Skelettmuskel (Wang *et al.* 1999), in der Plazenta (Zhao *et al.* 2003), im Milchdrüsen-

epithel (Casabiell *et al.* 1997) und auch im Gehirn (Popovic *et al.* 2001) wurde ebenfalls die Expression des Hormons nachgewiesen.

Die Leptinsekretion unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Beim Menschen liegt das Minimum der Sekretion zwischen 11 und 20 Uhr und das Maximum nachts zwischen 24 und 4 Uhr. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem der Höhepunkt der Leptinsekretion in der Schlafphase zu beobachten ist, wurde bei nachtaktiven Nagetieren ein entgegengesetztes Sekretionsmuster beobachtet. Hier steigt der Leptinspiegel mit dem Beginn der Dunkelphase an, erreicht seinen Höhepunkt in der Mitte der Dunkelphase und sinkt danach wieder ab (Kalra *et al.* 2003). Die Ausschüttung des Leptins erfolgt sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen pulsatil. Bei männlichen Ratten wurden eine niedrige Amplitude und eine hohe Pulsfrequenz, bei Weibchen eine hohe Amplitude und eine etwas geringere Frequenz festgestellt. Der geschlechtsspezifische Unterschied in der Plasmaleptinkonzentration beruht wahrscheinlich auch auf diesen unterschiedlichen pulsatilen Rhythmen (Coleman *et al.* 1999; Kalra *et al.* 2003).

Einige Stunden nach der Nahrungsaufnahme steigt der Leptinspiegel bei Nagetieren an, beim Menschen ist bei erhöhter Nahrungsaufnahme aber erst nach einigen Tagen ein Anstieg des Leptinwertes zu beobachten. Bei Nagern und Menschen sinkt der Leptinspiegel beim Fasten schon nach Stunden ab. Diese kurzfristige Änderung der Leptinexpression kann nicht im Zusammenhang mit einer Änderung der Fettspeicher stehen. Außerdem wurde beobachtet, dass die Leptinexpression nach Insulinausschüttung ansteigt. Leptin hat eine wichtige Rolle, indem es beim Fasten eine Anpassung des Organismus an die veränderte Ernährungssituation bewirkt. Andererseits ist bei bestehender Übernährung und der dabei auftretenden Leptinresistenz durch das verstärkte Leptinsignal keine angemessene Regulation zu erreichen (Ahima *et al.* 2000).

Das Wirkungsspektrum des Leptins beschränkt sich nicht auf seine Funktion als Signal für die Größe der Fettspeicher. Leptin hat weitere Funktionen beim Fett- und Glukosemetabolismus, der Energieverteilung, Angiogenese (Sierra-Honigmann *et al.* 1998), Adipozytenapoptose (Qian *et al.* 1998), Hämatopoese (Gainsford *et al.* 1996) und der Immunabwehr. Der Leptinspiegel ist bei akuter Infektion und Sepsis erhöht. Leptin hat einen Einfluss auf die CD4+T Lymphocyten-Proliferation, die Makrophagen-Phagozytose und die Sekretion von inflammatorischen Cytokinen, z.B Interleukin-1 und TNF-α (La Cava *et al.* 2004). Außerdem spielt Leptin bei der Wundheilung (Murad *et al.* 2003), der Knochen- und Gehirnentwicklung (Steppan *et al.* 1999; Steppan *et al.* 2000), der sexuellen Reifung und Reproduktion und bei der neuroendokrinen Regulation eine Rolle (Ahima *et al.* 2000). Eine Wechselwirkung des

Leptins mit anderen Hormonsystemen wurde für Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere, Gonaden, Schilddrüse und für die Wachstumsachse nachgewiesen. Insulin stimuliert die Leptinexpression und -sekretion. Leptin hemmt im Gegenzug die Insulinsekretion.

Das sympathische Nervensystem hat eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Leptinproduktion im weißen Fettgewebe und ist außerdem für die Mobilisierung von Fettsäuren aus dem weißen Fettgewebe verantwortlich. Bei einer sympathischen Stimulation des weißen Fettgewebes werden die Leptinexpression im Gewebe und die Leptinproduktion verringert. Auf der anderen Seite führt eine sympathische Blockade oft zu einem Anstieg des Plasmaleptinspiegels und der Leptin-Genexpression (Trayhurn *et al.* 1998; Rayner *et al.* 2001).

Leptin hat eine Molekülgröße von 16 kDa und für seinen Transport ins Gehirn werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Am wahrscheinlichsten sind die Diffusion durch fenestrierte Kapillaren, die auch im Nucleus arcuatus vorkommen, und durch perikapilläre Räume im Bereich der Eminentia mediana, die den Nucleus arcuatus umgibt (Gross 1992).

Ein sättigbarer Transportmechanismus über die Blut-Hirn-Schranke (Banks *et al.* 1996) erscheint auf Grund der Größe des Proteins eher unwahrscheinlich.

Die Ausscheidung von Leptin erfolgt über glomeruläre Filtration in den Nieren und die anschließende Degradation in den renalen Tubuli. Über den Urin werden nur sehr kleine Mengen von aktivem Leptin ausgeschieden (Cumin *et al.* 1997; Meyer *et al.* 1997).

Mutationen des ob Gens kommen beim Menschen sehr selten vor. Sie verursachen Hyperphagie, morbide Adipositas und hypothalamischen Hypogonadismus (Montague *et al.* 1997). Teilweise treten ein vermindertes Längenwachstum und ein verminderter sympathischer Tonus auf.

#### 1.3.1.3 Leptinrezeptor

Die Wirkung von Leptin erfolgt über eine Bindung des Hormons an Leptinrezeptoren. Man unterscheidet sechs verschiedene Spliceformen des Leptinrezeptors, der zur Familie der Cytokin-I-Rezeptoren gehört, bei denen man eine identische extrazelluläre Liganden-bindungsdomäne, aber unterschiedliche intrazelluläre Domänen findet. Die lange Rezeptorform LepRb hat eine intrazelluläre Bindungsstelle für die JAK-STAT Signaltransduktion (JAK – januskinase, STAT – signal transducer and activator of tran-scription). Weitere Rezeptorisoformen sind LepRa, LepRc, LepRd und LepRf, die eine kurze intrazelluläre Domäne haben, und LepRe, der keine transmembranale Domäne besitzt. Der

LepRb-Rezeptor vermittelt hauptsächlich die Leptinwirkung im Gehirn (Ahima *et al.* 2000). Hier findet man den Rezeptor im Hypothalamus in der Region des ARC, im VMN, im DMN und im Hirnstamm, d.h. in Gebieten, die eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme und der Energiebilanz spielen. In wesentlich geringerer Dichte findet man den Rezeptor aber auch in peripheren Geweben. Die kurzen Formen des Leptinrezeptors findet man im Plexus choroideus, im Gefäßendothel und in peripheren Geweben wie Niere, Leber, Lunge und Gonaden, wo die Rezeptoren wahrscheinlich eine Rolle beim Transport oder der clearance spielen (Elmquist *et al.* 1998).

Bindung des Leptins an die lange Form des Leptinrezeptors LepRb führt intrazellulär zur Bindung der Januskinase, die als Tyrosinkinase bei ihrer Aktivierung STAT-Proteine phosphoryliert. Die STAT Proteine wiederum stimulieren im Zellkern die Transkription von Genen, die die Leptinwirkung vermitteln. Unabhängig von den Effekten auf die Transkription kann Leptin die Rate neuronaler Aktionspotentiale beeinflussen, indem ATP-abhängige Kaliumkanäle offengehalten werden und die Auswärtsdiffusion positiv geladener Kaliumionen aus der Zelle das Membranpotential erhöht, was die Aktionspotentialbildung hemmt (Schwartz 2000). Dies geschieht durch die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs, vielleicht mittels der JAK2 Kinase (Niswender *et al.* 2004). Leptin induziert außerdem die Bildung von SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) Protein. SOCS3 wirkt hemmend auf die JAK-STAT Signaltransduktion (Bjorbaek *et al.* 1999; Ahima *et al.* 2004).

Mutationen des Leptinrezeptors kommen auch beim Menschen vor, sind aber sehr selten zu finden. Die ersten Fälle wurden 1998 (Clement *et al.* 1998) beschrieben. Die Patienten zeigen Hyperphagie, früh einsetzende Adipositas und hypothalamischen Hypogonadismus; außerdem ist die Sekretion von Thyrotropin und Wachstumshormon beeinträchtigt.

### 1.3.2 Weitere Hormone und Peptide, die in der Peripherie gebildet werden

#### 1.3.2.1 Insulin

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Regulation des Blutglukosespiegels ist das in den β-Zellen des Pankreas gebildete Hormon Insulin ein afferentes Signal, das dem Gehirn Änderungen der Körperfettspeicher meldet. Für den dazu erforderlichen Transfer von im Blut zirkulierendem Insulin in das Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke wird ein Transportsystem mit Sättigungscharakteristik postuliert (Niswender *et al.* 2004). Die zentrale Wirkung des

Insulins besteht, wie die des Leptins, in einer Hemmung der Nahrungsaufnahme und ist somit indirekt katabol, im Gegensatz zu seiner anabolen peripheren Wirkung (Vergrößerung der Energiespeicher und bei hohen Insulinspiegeln ein Anstieg des Körpergewichts). Nicht nur die Plasmakonzentration von Leptin, sondern auch die des Insulins steigt proportional zum Körperfettgehalt. Man findet Insulinrezeptoren im Gehirn konzentriert in der Region des ARC. Icv (intracerebroventrikuläre) Injektionen mit Insulin bei Nagern und anderen Säugetieren führen zu einer Reduktion der Futteraufnahme und des Körpergewichts. Tiere mit gehirnspezifischen Knockouts des Insulinrezeptors und Tiere, denen das Insulinrezeptorsubstrat 2 fehlt, zeigen Adipositas und eine Beeinträchtigung der Reproduktivität. Sowohl Leptin als auch Insulin wirken sich hemmend auf die NPY/AGRP (NPY – Neuropeptid Y, AGRP – agouti-related protein) Neurone aus. Der Insulinrezeptor besitzt intrazellulär eine heterodimere Rezeptor Tyrosine Kinase, die das Insulin-Rezeptorsubstratprotein phosphoryliert und den zellulären Metabolismus über den PI3K abhängigen Signalweg induziert, der durch die Aktivierung eines ATP abhängigen Kaliumkanals zu einem Anstieg des elektrischen Potentials führt und damit die neuronale Entladungsrate senkt (Hyperpolarisation). Interessanterweise werden im Nucleus arcuatus und im ventromedialen Nucleus dieselben Neurone, die durch Leptin hyperpolarisiert werden, auch durch Insulin hyperpolarisiert. Dieser Effekt betrifft die NPY/AGRP Neurone, deren Signale die Futteraufnahme stimulieren. Man nimmt an, dass auch Leptin in der Lage ist, den PI3K Signalweg zu aktivieren, der eine Schlüsselrolle bei der Insulinresistenz hat. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das häufig beobachtete gemeinsame Auftreten von Typ-2-Diabetes und Adipositas (Bruning *et al.* 2000; Barsh *et al.* 2002; Niswender *et al.* 2004).

#### 1.3.2.2 Weitere intestinale Peptidhormone

Abgesehen von lokalen Funktionen einiger intestinaler Peptidhormone bei der Steuerung der Verdauung und von damit zusammenhängenden endokrinen Aktivitäten werden zunehmend Hinweise auf ihre Beteiligung an der Steuerung der Nahrungsaufnahme gefunden (Dhillo *et al.* 2004; Rushing 2003). Die Signalvermittlung zum Gehirn erfolgt auf unterschiedliche Weise, teilweise über Afferenzen des Nervus vagus, teilweise direkt durch Wirkung auf Strukturen mit fehlender oder durchlässiger Bluthirnschranke wie der ARC und die in der Medulla oblongata lokalisierte Area postrema. Hinweise auf direkte Interaktion mit den Zielstrukturen der Adipositassignale Leptin und Insulin liegen zur Zeit für Ghrelin vor, ein die Nahrungsaufnahme stimulierendes Peptid, und für das Peptid YY (PYY), ein

appetithemmendes Peptid. Ghrelin aktiviert direkt die NPY/AGRP Neurone des Nucleus arcuatus und hemmt indirekt die POMC/CART (POMC – Proopiomelanokortin, CART – cocaine- and amphetamine-regulated transcript) Neurone, während das PYY antagonistisch hemmend wirkt (Riediger *et al.* 2003; Riediger *et al.* 2004). Diese Befunde entsprechen den antagonistischen Effekten der beiden Peptide auf die Nahrungsaufnahme.

### 1.3.3 NEUROPEPTIDE

#### 1.3.3.1 NPY (Neuropeptid Y)

NPY ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid der PP (pancreatic polypeptide) Familie, dessen stimulierende Wirkung auf die Futteraufnahme bereits im Jahr 1984 beschrieben wurde (Clark *et al.* 1984). Es ist eines der am weitesten verbreiteten Neuropeptide mit unterschiedlichen biologischen Funktionen. Es ist an der Regulation von kardiovaskulären Prozessen (Pedrazzini *et al.* 2003) beteiligt und spielt eine Rolle als modulierende Überträgersubstanz des sympathischen Nervensystems (Pablo Huidobro-Toro *et al.* 2004). NPY hemmt die reproduktiven Funktionen bei Nahrungsmangel (Gonzales *et al.* 2004). Außerdem spielt NPY eine Rolle bei Depressionen, Krämpfen und der Merkfähigkeit (Erickson *et al.* 1996b; Sorensen *et al.* 2004; Sajdyk *et al.* 2004). Vor allem aber ist NPY einer der stärksten Stimulatoren für die Nahrungsaufnahme.

NPY-mRNA und das Peptid NPY sind im Gehirn weit verbreitet, aber bei der Kontrolle des Energiehaushalts spielen hauptsächlich die NPY bildenden Neurone im Nucleus arcuatus eine Rolle (Woods *et al.* 2000). Im Hypothalamus wird NPY hauptsächlich im ARC exprimiert, wo es mit dem Neuropeptid AGRP koexprimiert ist. Projektionen führen zum PVN und zum LHA. NPY Injektionen in den PVN führen zu einer erhöhten Futteraufnahme und zu einer erniedrigten metabolischen Rate und außerdem zu einer verminderten Thermogenese im braunen Fettgewebe und einer verstärkten Aktivität der Lipoproteinlipase im weißen Fettgewebe (Billington *et al.* 1994). Der PVN des Hypothalamus und die perifornicale Region sind die Hauptwirkungsgebiete von NPY, um die Futteraufnahme zu stimulieren und autonome und endokrine Prozesse zur Erhaltung der Energiereserven zu regeln. Überraschenderweise zeigen NPY-Knockout Mäuse ein normales Körpergewicht und eine normale Futteraufnahme. Die Tiere sind leptinsensitiv. Sie zeigen eine erhöhte Neigung zu Krämpfen. Da die Tiere normales Fressverhalten und ein normales Körpergewicht aufweisen, könnte man den Schluss ziehen, dass NPY keine Rolle bei der Energiehomöostase spielt (Erickson *et al.* 1996a). Versuche an ob/ob-NPY-/- Knockout Mäusen zeigten aber

(Erickson *et al.* 1996b), dass diese Mäuse im Vergleich zu den ob/ob-Knockout Mäusen eine geringere Adiposität, eine reduzierte Futteraufnahme, einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, eine erhöhte Körpertemperatur und eine erhöhte lokomotorische Aktivität zeigten, und dass auch ihre Fertilität verbessert war. NPY spielt also eine Rolle in der Energiehomöostase, aber weitere Mediatoren, wie zum Beispiel das AGRP, das mit NPY koexprimiert wird, müssen an diesem Vorgang beteiligt sein (Robinson *et al.* 2000). Glukokortikoide erhöhen bei zentraler Gabe die NPY-Spiegel. Bei peripherer Gabe bewirken Glukokortikoide eine geringere Futteraufnahme und eine Abnahme der NPY Spiegel im Hypothalamus (Zakrzewska *et al.* 1999).

Man kennt inzwischen sechs verschiedene NPY-Rezeptoren, die Rezeptoren Y1-Y6, deren Sequenzen keine große Übereinstimmung zeigen (Blomqvist *et al.* 1997). Außer dem Y3-Rezeptor, der pharmakologisch im Nucleus tractus solitarii (NTS) nachgewiesen wurde, konnten alle Rezeptortypen kloniert werden. Beim Y6-Rezeptor konnte eine Funktion des Rezeptors aber nur bei Mäusen und Kaninchen nachgewiesen werden. Alle NPY-Rezeptortypen sind im Hypothalamus vertreten. Man findet eine weite Verbreitung der Y1- und Y2-Rezeptoren aber niedrige Dichten von Y4- und Y5-Rezeptoren (Fetissov *et al.* 2004).

NPY-Y1, -Y2 und -Y5 Rezeptor-Knockouts bei Mäusen wurden erzeugt und zeigen eine spät einsetzende schwache Form der Adipositas (Pedrazzini 2004; Robinson *et al.* 2000). Man nimmt an, dass ein komplexes Zusammenspiel der NPY-Rezeptoren an der Energiehomöostase beteiligt ist. Es gibt Anzeichen dafür, dass besonders die Y1- und Y5-Rezeptorsubtypen die orexigenen Effekte von NPY vermitteln (Kalra *et al.* 2004).

#### 1.3.3.2 AGRP (Agouti-related protein)

AGRP wird mit NPY in den Neuronen des Nucleus arcuatus koexprimiert. AGRP ist ein Peptid, das in Größe und Struktur annährend mit dem agouti Protein identisch ist (Shutter *et al.* 1997; Ollmann *et al.* 1997). Das humane AGRP besteht aus 132, das von Nagetieren aus 131 Aminosäuren. Das AGRP Gen Transkript im Hypothalamus enthält ein 5' nicht codierendes Exon, das dem in der Peripherie nachgewiesenen Transkript fehlt; dieses findet sich in der Nebenniere und gering exprimiert in den Hoden, den Nieren und den Lungen. Im Hypothalamus wird AGRP vor allem in Neuronen des ARC gebildet (Dinulescu *et al.* 2000; Stütz 2005). AGRP ist der Antagonist des α-MSHs (siehe 1.3.3.3) und greift am MC3-und MC4-Rezeptor (siehe 1.3.4) an. Dort hat es eine die Nahrungsaufnahme stimulierende Wirkung. Es hat eine stärker orexigene Wirkung als das NPY. Eine einzige icv Injektion von

AGRP führt zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von 6 Tagen, eine NPY Injektion beeinflusst die Futteraufnahme für ca. 24 Stunden (Hagan *et al.* 2000; Seeley *et al.* 2004). Zahlreiche hormonelle Signale beinflussen die AGRP-Expression. Dazu gehören die Sättigungssignale Leptin und Insulin, die die AGRP-Expression senken. Das im Magen gebildete Protein Ghrelin aktiviert die NPY/AGRP Neurone. Leptin und Glukokortikoide wirken antagonistisch auf das hypothalamische AGRP. Die Gabe von Glukokortikoiden führt zu einem Anstieg der AGRP-Expression sowie zu einer Erhöhung der Futteraufnahme und des Körpergewichts. Umgekehrt führt Adrenalektomie bei Nagetieren zu einer verminderten Futteraufnahme (Drazen *et al.* 2003). Als metabolische Faktoren haben wahrscheinlich auch Fettsäuren und die Glukosekonzentration einen Einfluss auf die AGRP-Expression.

Die Wirkung des im ARC gebildeten AGRP auf die nachgeschalteten Neurone ist noch nicht genau untersucht. Neurone im PVN und im lateralen Hypothalamus sind wahrscheinlich Mediatoren der AGRP-Wirkung, wobei die AGRP Neurone starke Projektionen zu MC4R exprimierenden Regionen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Hypothalamus aufweisen (Stütz 2005).

Transgene Mäuse, die humanes AGRP überexprimieren, sind hyperphag, adipös, zeigen ein erhöhtes Längenwachstum, Hyperinsulinämie, spät einsetzende Hyperglykämie, Hyperplasie der Inselzellen des Pankreas und erniedrigte Kortikosteronspiegel (Graham *et al.* 1997). AGRP -/- Mäuse zeigen ein normales Fressverhalten und keine Änderung im Körpergewicht. Die Mäuse sind fertil, und sie zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern keine Änderung der gemessenen Plasmawerte für Glukose, Leptin, Triglyceride und freie Fettsäuren. Auch die Expressionswerte für MC3R, MC4R und NPY waren mit den Wildtypen vergleichbar. Allerdings wurde im lateralen Hypothalamus ein starker Anstieg der Expression des orexigenen Neuropeptids Melanin-concentrating hormone (MCH, siehe 1.3.3.5) gefunden. Seine orexigene Wirkung könnte den Verlust des AGRP kompensieren (Qian *et al.* 2002).

Studien an Menschen zeigen eine interessante Assoziation von AGRP SNPs (single nucleotide polymorphisms) mit einer Resistenz gegen Adipositas und vielleicht auch gegen Typ-2-Diabetes bei Schwarzafrikanern (Bai *et al.* 2004).

#### 1.3.3.3 POMC (Pro-Opiomelanokortin)

Das anorexigene Neuropeptid POMC wird im Nucleus arcuatus, im NTS, in der Hypophyse, in der Haut und im Immunsystem exprimiert. Im ARC wird POMC zusammen mit dem ebenfalls anorexigen wirkenden CART exprimiert.

Aus POMC, einem 32 kDa Pro-Peptid, entstehen durch gewebespezifisches posttranslationales Prozessing verschiedene biologisch aktive Peptide. Sein für die Körpergewichtsregulation wichtigstes Spaltprodukt ist der anorexigen wirkende α-Subtyp des Melanozyten stimulierenden Hormons (MSH). Die Prozessierung der Peptide hängt von zahlreichen Enzymen ab, zu denen auch die Enzyme PC1 (Pro-Hormonkonvertase 1) und PC2 (Pro-Hormonkonvertase 2) gehören. In der Hypophyse, wo nur PC1 exprimiert wird, werden ACTH und β-Lipotropin gebildet. Die Expression von PC2 im Hypothalamus führt zur Produktion von α-, β- und γ-MSH (Pritchard *et al.* 2002; Coll *et al.* 2004). Rezeptoren für diese POMC-Produkte sind die fünf verschiedenen Melanocortinrezeptoren (MC1R-MC5R), die eine unterschiedliche Affinität für die einzelnen Peptide besitzen. Für die funktionelle Rolle von POMC bei der Regulation des Körpergewichts, die auf Wechselwirkungen zwischen aus POMC entstandenen Peptiden im Gehirn und neuroendokrinen spezifischen Rezeptoren beruhen, sind die Rezeptoren MC3R und MC4R verantwortlich. Die physiologische Rolle von β- und γ-MSH und β-Lipotropin ist ungeklärt. β-Lipotropin ist ein Vorläufermolekül des β-Endorphins, das an Opioid Rezeptoren bindet (Yeo *et al.* 2000).

POMC Neurone im Nucleus arcuatus haben Projektionen zu spezifischen Gehirnregionen, die an der Körpergewichtsregulation beteiligt sind, wie dem paraventriculären, dorsomedialen und ventromedialen hypothalamischen Nucleus.

POMC-Knockout Mäuse sind adipös, die Nebennierenentwicklung ist gestört und die Mäuse haben eine veränderte Pigmentierung. Intraperitoneale Injektionen mit α-MSH führen zu einem starken Gewichtsverlust der Mäuse (Yaswen *et al.* 1999).

Nach zweitägigem Fasten wurde eine Abnahme von hypothalamischer POMC-mRNA beobachtet. Dabei war eine positive Korrelation mit der Leptin-mRNA Konzentration zu beobachten. Ob/ob und db/db Mäuse haben eine erniedrigte POMC-mRNA-Expression (Mizuno *et al.* 1998). Dass Überfütterung im Gegensatz dazu zu einer Hochregulation der POMC-mRNA-Expression führt, wurde durch Versuche an Ratten nachgewiesen (Hagan *et al.* 1999). Die Tatsache, dass mRNA der langen Form des Leptinrezeptors (LepRb) in den POMC Neuronen exprimiert wird, weist darauf hin, dass die POMC Neurone die Leptinwirkung vermitteln (Cheung *et al.* 1997). Leptininjektionen bewirken einen Anstieg

der POMC-mRNA-Expression bei ob/ob Mäusen, haben aber keinen Effekt auf die POMC-mRNA-Expression bei db/db Mäusen (Schwartz *et al.* 1997). Ebenso führen Insulin und erhöhte Plasmaglukosespiegel zu einem Anstieg der POMC-Expression (Pritchard *et al.* 2002). Glukokortikoide fördern die POMC-Expression, sind aber nicht modulierend an der Kontrolle durch Leptin beteiligt (Vrang *et al.* 2002).

Mutationen im POMC Gen sind beim Menschen extrem selten (Hinney *et al.* 1998). Es wurden 1998 zwei humane POMC Mutationen beschrieben, denen ein Fehlen funktionsfähiger POMC Genprodukte zu Grunde liegt (Krude *et al.* 1998). Die Patienten zeigten eine früh einsetzende Adipositas, Nebenniereninsuffizienz und hatten rote Haare.

#### 1.3.3.4 CART (Cocaine- and Amphetamine-regulated transcript)

Das Neuropeptid CART spielt eine Rolle bei der Futteraufnahme, der Belohnung und Verstärkung, bei sensorischen Prozessen, bei der endokrinen Regulation und bei Stress; außerdem zeigt es eine neurotrophe Wirkung. Es ist ein stark anorektisch wirkendes Neuropeptid. Zahlreiche Studien haben die Prozessierung und die Sequenzen der CART Proteine untersucht. Es gibt ein langes CART Pro-Peptid, das aus 129 Aminosäuren, und ein kurzes, das aus 116 Aminosäuren besteht. Während bei Mäusen und Ratten sowohl die lange als auch die kurze Isoform vorkommt, findet man beim Menschen nur die kurze Form. Aus den Pro-Peptiden entstehen durch Pro-Hormonkonvertasen jeweils zwei biologisch aktive Fragmente, CART 42-89 und 49-89 aus der kurzen Isoform, CART 55-102 und 62-102 aus der langen Isoform. CART-mRNA findet man in Gehirnregionen, die eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielen; so im ventromedialen Nucleus, im dorsomedialen Nucleus, im lateralen Hypothalamus, im Nucleus arcuatus, im periventriculären Nucleus und im Nucleus accumbens. Im ARC findet man CART-Expression im lateralen Bereich. Die CART-Expression wird durch Leptin und Glukokortikoide reguliert. CART ist mit anderen Peptiden und Neurotransmittern, die an der Körpergewichtsregulation beteiligt sind, kolokalisiert. Mit MCH (siehe 1.3.3.5) im DMN und LH, mit CRF (corticotrophin-releasing factor) im PVN und mit POMC im ARC. Da MCH die Nahrungsaufnahme stimuliert und α-MSH im Gegensatz dazu die Nahrungsaufnahme hemmt und CART somit sowohl mit einem orexigenen als auch mit einem anorexigenen Peptid kolokalisiert ist, vermutet man eine modulierende Rolle von CART bei der Futteraufnahme. Bisher wurde kein CART-Rezeptor identifiziert (Kuhar *et al.* 2000; Dey *et al.* 2003; Hunter *et al.* 2004). Neue Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass CART an einem spezifischen G-Protein-gekoppelten

Rezeptor bindet und dass es mehr als einen CART-Rezeptor geben muss (Lakatos *et al.* 2005).

Leptin aktiviert POMC/CART Neurone im ARC (Elias *et al.* 1998). Nach Futterentzug beobachtet man ein Absinken der CART-mRNA im Nucleus arcuatus. Bei ob/ob Mäusen und fa/fa Ratten beobachtet man kaum CART-mRNA-Expression. Intraperitoneale Leptininjektionen führen bei ob/ob Mäusen zu einer verminderten Futteraufnahme, zu einer Wiederherstellung der CART-Expression im Nucleus arcuatus und zu einem Anstieg der CART-mRNA-Expression im lateralen Hypothalamus. Icv Injektionen von CART (55-102) führen zu einer Verminderung der Futteraufnahme. Eine vorherige Injektion von orexigenem NPY wird dosisabhängig durch die Gabe von CART unterdrückt (Kristensen *et al.* 1998).

CART findet man in hoher Konzentration in Geweben, die im Zusammenhang mit der Antwort auf Stress stehen. Adrenalektomie führt zu einer Verminderung der CART-mRNA und des Peptidgehalts im Nucleus arcuatus (Balkan *et al.* 2003).

CART-Knockout Mäuse wurden 2001 beschrieben. Homozygote Tiere beiderlei Geschlechts und heterozygote CART-defiziente weibliche Mäuse zeigten bei der Gabe einer hochkalorischen Diät einen Anstieg der Futteraufnahme, des Körpergewichts und der Fettmasse (Asnicar *et al.* 2001). Eine neuere Untersuchung berichtet, dass CART-Knockout Mäuse auch bei Gabe einer Standarddiät im Alter von 40 Wochen im Vergleich zu Wildtypen ein signifikant höheres Körpergewicht haben, aber keine Unterschiede in der Futteraufnahme auftreten. Außerdem zeigen die CART-Knockout Mäuse bei Stimulation mit Glukose eine gestörte Insulinsekretion (Wierup *et al.* 2005).

Verschiedene Studien haben bei adipösen Menschen einen Polymorphismus im CART Gen nachgewiesen. Zwei Untersuchungen konnten einen Zusammenhang der Mutation mit dem adipösen Phänotyp der untersuchten Personen nachweisen (del Giudice *et al.* 2001; Yamada *et al.* 2002).

#### 1.3.3.5 MCH (Melanin-concentrating hormone)

MCH ist ein zyklisches Peptid, das ursprünglich dadurch bekannt wurde, dass es als Hypophysenhormon für die Regulation der Hautfarbe bei Knochenfischen verantwortlich ist. Es bindet beim Menschen an zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren MCHR1 und MCHR2. MCH wird im lateralen Hypothalamus exprimiert und ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase. MCH stimuliert die Futteraufnahme und führt zu einem Anstieg des

Körpergewichts. Bei Adipositas und bei Futterentzug ist die Expression von MCH und MCHR1 hochreguliert. MCH-Knockout Mäuse sind hypophag und haben eine leicht erhöhte metabolische Rate. MCHR1-Knockout Mäuse sind resistent gegen Adipositas und haben eine höhere Energieabgabe. Sie sind hyperphag und hyperaktiv. Die Effekte von MCH auf die Energiehomöostase stehen unter dem hemmenden Einfluss von Leptin. Bei ob/ob Mäusen findet man eine signifikant erhöhte MCH Expression, wohingegen man bei Leptingabe ein Absinken des MCH beobachtet. Ebenso wurde ein Einfluss des MCH auf die Insulin- und Glukokortikoidspiegel und auf die Thermogenese nachgewiesen (Shi 2004).

#### 1.3.3.6 Orexin A und B (Hypocretin 1 und 2)

Die Peptide Orexin A und B (Hypocretin 1 und 2) kommen im lateralen Hypothalamus vor, wo sie eine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme spielen. Leptinresponsive Zellen im Nucleus arcuatus innervieren die Orexinneurone im LHA und Neurone im ARC werden durch Orexinneurone innerviert (Rauch *et al.* 2000). Die beiden Orexine werden aus dem gleichen Vorläufer im lateralen Hypothalamus gebildet. Orexine steigern die Nahrungsaufnahme. Außerdem spielen sie eine Rolle im Schlaf-Wach-Rhythmus. Die Orexinneurone haben Projektionen zu verschiedenen Gehirnregionen, was auf eine komplexe physiologische Rolle der Orexine hinweist (Sakurai 1999). Im Bereich des ARC besteht ein partieller Antagonismus excitatorischer Orexin- und inhibitorischer Leptineffekte auf die neuronale Aktivität (Rauch *et al.* 2000).

### 1.3.4 DAS MELANOKORTINSYSTEM

Wie bereits hervorgehoben, ist die Störung des hypothalamischen Melanokortin-Rezeptorsystems beim Menschen die häufigste monogenetische Ursache der Adipositas, die mit einer Häufigkeit von 2-6% bei stark übergewichtigen Menschen als epidemiologisch relevant bezeichnet werden kann. Andere ebenfalls erwähnte monogenetische Ursachen treten dagegen nur sehr selten auf. Aus diesem Grund hat in der gegenwärtigen Erforschung genetischer Ursachen der Adipositas das Melanokortinsystem und seine Kontrolle durch die an der Steuerung des Energiehaushalts beteiligten Neuropeptide einen besonderen Stellenwert.

Zur Aufklärung des Melanokortinsystems hat entscheidend eine bereits vor ca. 100 Jahren beschriebene spontan aufgetretene Mutation beigetragen. Auf Grund ihrer besonderen gelben Fellfarbe wurden die Mäuse weitergezüchtet. Diese agouti Mutation (Ay) führt im

homozygoten Zustand zum Tod der Tiere und beruht auf einer Mutation im Promotor des agouti Locus (Miller *et al.* 1993; Michaud *et al.* 1994). Das agouti-Protein ist in erster Linie ein Antagonist des Melanokortin-1-Rezeptors, der zusammen mit dem Agonisten α-MSH für die Regulation der Fellfarbe in den Melanozyten verantwortlich ist. Es wird bei Mäusen in den Zellen der Haarfollikel temporär gebildet. Bei agouti Mutanten wird agouti im ganzen Körper exprimiert. Agouti Mutanten entwickeln mit zunehmendem Alter Adipositas und Insulinresistenz. Nachdem die molekulare Struktur des agouti-Proteins aufgeklärt werden konnte (Bultman *et al.* 1992; Wilson *et al.* 1995), wurde nachgewiesen, dass agouti auch als Antagonist am Melanokortin-4-Rezeptor wirkt. Da agouti normalerweise nicht im Gehirn gebildet wird, dort jedoch als Antagonist an MC3- und MC4-Rezeptoren orexigene Wirkung zeigt, vermutete man, dass ein anderes Protein diese Funktion im Gehirn hat. Bei Mäusen und Menschen wurde diese Vermutung durch den Nachweis des AGRP bestätigt (Wilson *et al.* 1999). Der wichtigste Agonist der Melanokortinrezeptoren ist das α-MSH. Aber auch die anderen POMC Produkte γ-MSH, ACTH, β-MSH binden mit unterschiedlicher Affinität an verschiedenen Rezeptoren. Lediglich der MC2-Rezeptor bindet ausschließlich ACTH.

Man kennt fünf verschiedene Melanokortinrezeptoren, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Den MC1-Rezeptor findet man in den Melanozyten der Haut, den MC2-Rezeptor in der Nebennierenrinde und dem Fettgewebe, den MC3-Rezeptor im Hypothalamus, Thalamus, Epithalamus, Hippocampus, in der Placenta, im Magen, im Zwölffingerdarm und Pankreas, den MC4-Rezeptor im Hypothalamus, Thalamus, Limbischen System, Rautenhirn, Hirnstamm, Cortex, Rückenmark und schließlich den MC5-Rezeptor im Gehirn, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Hoden, Knochenmark, Hypophyse, Lunge, Herz, Nieren, Leber und Fettgewebe (Mountjoy *et al.* 1992; Tatro 1996). Die Melanokortinrezeptoren sind Rezeptoren, die an GTP (Guanosintriphosphat) bindende Proteine gekoppelt sind, man nennt sie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie haben sieben transmembranale Domänen, drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen. Die Rezeptoren stimulieren die Adenylatcyclase, die die second-messenger-Signaltransduktion über cAMP vermittelt. Bei einer Aktivierung der Rezeptoren lässt sich ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel nachweisen (Bockaert 2001; Haskell-Luevano *et al.* 2001).

Bei der Regulation des Körpergewichts spielen das Melanokortinsystem und hierbei besonders der MC4R und in geringerem Maß auch der MC3R eine Rolle. Zur Aufklärung der Funktion des MC4R hat die Untersuchung von MC4r-Knockout Mäusen entscheidende Erkenntnisse vermittelt. Das MC4r Gen liegt bei Mäusen auf dem Chromosom 18, besteht aus einem Exon und hat eine Länge von 999 Basenpaaren. Zuerst wurde die MC4r-Knockout

Maus im Jahr 1997 von Huszar *et al.* beschrieben. Die Tiere waren hyperphag, zeigten Hyperinsulinämie und Hyperglykämie. Sie entwickelten eine spät einsetzende Adipositas. Bis zu einem Alter von 4 Wochen waren keine Unterschiede im Körpergewicht im Vergleich zu Wildtypen zu beobachten. Im Alter von 5 Wochen waren die homozygoten Mutanten schwerer als die Wildtypwurfgeschwister. Sie hatten ein signifikant höheres Längenwachstum als die Wildtypen und erhöhte Plasmaleptinspiegel. Die Kortikoidspiegel waren unverändert. In Bezug auf die Ausprägung der Adipositas war ein Gen-Dosiseffekt bei den Heterozygoten nachweisbar (Huszar *et al.* 1997). Nachfolgende Untersuchungen von MC4r-Knockout Mäusen bestätigten die Ergebnisse von Huszar und lieferten weitere Befunde, die Änderungen der Körperzusammensetzung, die metabolische Rate und die lokomotorische Aktivität betreffen. Die Reaktion bei Kältebelastung und die UCP1- (uncoupling protein 1) mRNA-Expression nach Leptininjektion wurden untersucht (Chen *et al.* 2000a; Ste Marie *et al.* 2000). Körpergewicht und Fettmasse waren bei MC4r-Knockout Mäusen signifikant höher als bei Wildtypen. Die pRMR (pseudo resting metabolic rate) der -/- Mäuse war höher als die der Wildtypen. Bezogen auf g Körpergewicht war die beobachtete metabolische Rate der homozygoten MC4R-defizienten Mäuse signifikant geringer als die der Wildtypen. MC4r-Knockout Mäuse zeigten eine geringere lokomotorische Aktivität als die Wildtypen (Chen *et al.* 2000a), was bei der nachfolgenden Untersuchung (Ste Marie *et al.* 2000) aber nur für die männlichen Tiere nachgewiesen werden konnte. Außerdem wurden „pair-feeding-Versuche“ durchgeführt (homozygote Mutanten erhielten nur die durchschnittliche Futtermenge, die von Wildtypgeschwistern am Vortag gefressen wurde). Paargefütterte -/- Mäuse lagen mit ihrem Körpergewicht über dem der Wildtypen und unter dem Körpergewicht der -/- Tiere, die freien Zugang zum Futter hatten. Pro g Körpergewicht war die metabolische Rate der MC4r-Knockout Mäuse erniedrigt. Außerdem wurde eine normale Reaktion bei Kältebelastung beobachtet. Andererseits konnte bei weiblichen Mäusen keine Expression von UCP1-mRNA nach Leptininjektion gezeigt werden.

Das Melanokortinsystem beeinflusst zahlreiche andere hormonelle Regelsysteme. Die Glukosehomöostase wird wahrscheinlich unabhängig von Änderungen in der Futteraufnahme vom Melanokortinsystem beeinflusst (Fan *et al.* 2000). Obgleich MC4r-Knockout Mäuse keine Beeinträchtigung bei der Reproduktion zeigen, haben Versuche nachgewiesen, dass die MC3- und MC4-Rezeptoren am Zusammenspiel der HPG-Achse (Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden) beteiligt sind (Schioth *et al.* 2002). Der MC4-Rezeptor moduliert die erektile Funktion und das Sexualverhalten bei männlichen Mäusen (Van der Ploeg *et al.* 2002).

α-MSH und ACTH bewirken Erektionen bei männlichen Mäusen, Ratten und Kaninchen. Ebenso gibt es Belege, dass α-MSH an der Produktion von luteinisierendem Hormon und Prolaktin beteiligt ist. Melanokortine beeinflussen auch cardiovasculäre Funktionen. Schließlich wurde nachgewiesen, dass α-MSH einen antiinflammatorischen Effekt hat (Seeley *et al.* 2004) und endogen fiebersenkend wirkt.

MC3R-Knockout Mäuse wurden im Jahr 2000 untersucht (Butler *et al.* 2000; Chen *et al.* 2000b). Die Mäuse haben, obwohl sie nicht übergewichtig sind, eine erhöhte Körperfettmasse, eine höhere Futtereffizienz und eine verminderte lokomotorische Aktivität. Sie zeigen eine Hyperleptinämie und die männlichen Mäuse auch eine schwache Hyperinsulinämie. Knockout Mäuse, denen sowohl der MC3- als auch der MC4-Rezeptor fehlt, sind deutlich schwerer als MC4R-Knockout Mäuse (Chen *et al.* 2000b).

Beim Menschen ist der Melanokortinrezeptor ein aus 332 Aminosäuren bestehendes Protein, das wie bei der Maus von einem einzelnen Exon codiert wird und auf Chromosom 18q22 lokalisiert ist. In den Jahren 1998 und 1999 wurden die ersten der inzwischen über 70 verschiedenen MC4-Rezeptormutationen beim Menschen beschrieben (Yeo *et al.* 1998; Vaisse *et al.* 1998; Hinney *et al.* 1999). Die meisten dieser Mutationen sind heterozygote missense Mutationen, aber auch frameshift, inframe, deletion und nonsense Mutationen wurden gefunden. Man versucht die Mutationen auf Grund ihrer funktionellen Defekte zu klassifizieren. Manche Mutationen führen dazu, dass entweder keine Rezeptorproteine in der Zelle vorhanden sind (Klasse 1) oder der Rezeptor zwar gebildet, aber intrazellulär zurückgehalten wird (Klasse 2). In anderen Fällen wird der Rezeptor an der Zelloberfläche exprimiert, kann aber den Liganden nicht binden (Klasse 3), oder er kann den Liganden zwar binden, aber die durch den Agonisten vermittelte Signaltransduktion ist gestört (Klasse 4). Schließlich findet man auch Rezeptorvarianten mit offensichtlich normaler Funktion (Tao 2005; Govaerts *et al.* 2005). Beim weiblichen Geschlecht wirkt sich die MC4R Mutation stärker als beim männlichen Geschlecht aus. Männliche und weibliche Mutationsträger sind ca. 5-10 kg/m² schwerer als Träger des Wildtypgenotyps. Kinder mit MC4R Mutationen haben ein schnelleres Längenwachstum, wobei die Endlänge aber nicht größer ist, und zeigen Hyperinsulinämie. Personen mit Compound-Heterozygotie oder Homozygotie sind noch adipöser als heterozygote Träger. MC4R Mutationen werden nur sehr selten bei normalgewichtigen Personen gefunden. Es konnte ein Polymorphismus im MC4R nachgewiesen werden, der bei etwa 3-5% der Bevölkerung vorkommt und dessen Träger ein ca. 1,5 kg niedrigeres Körpergewicht als Wildtypträger zeigen (Hebebrand 2004; Geller *et al.* 2004).

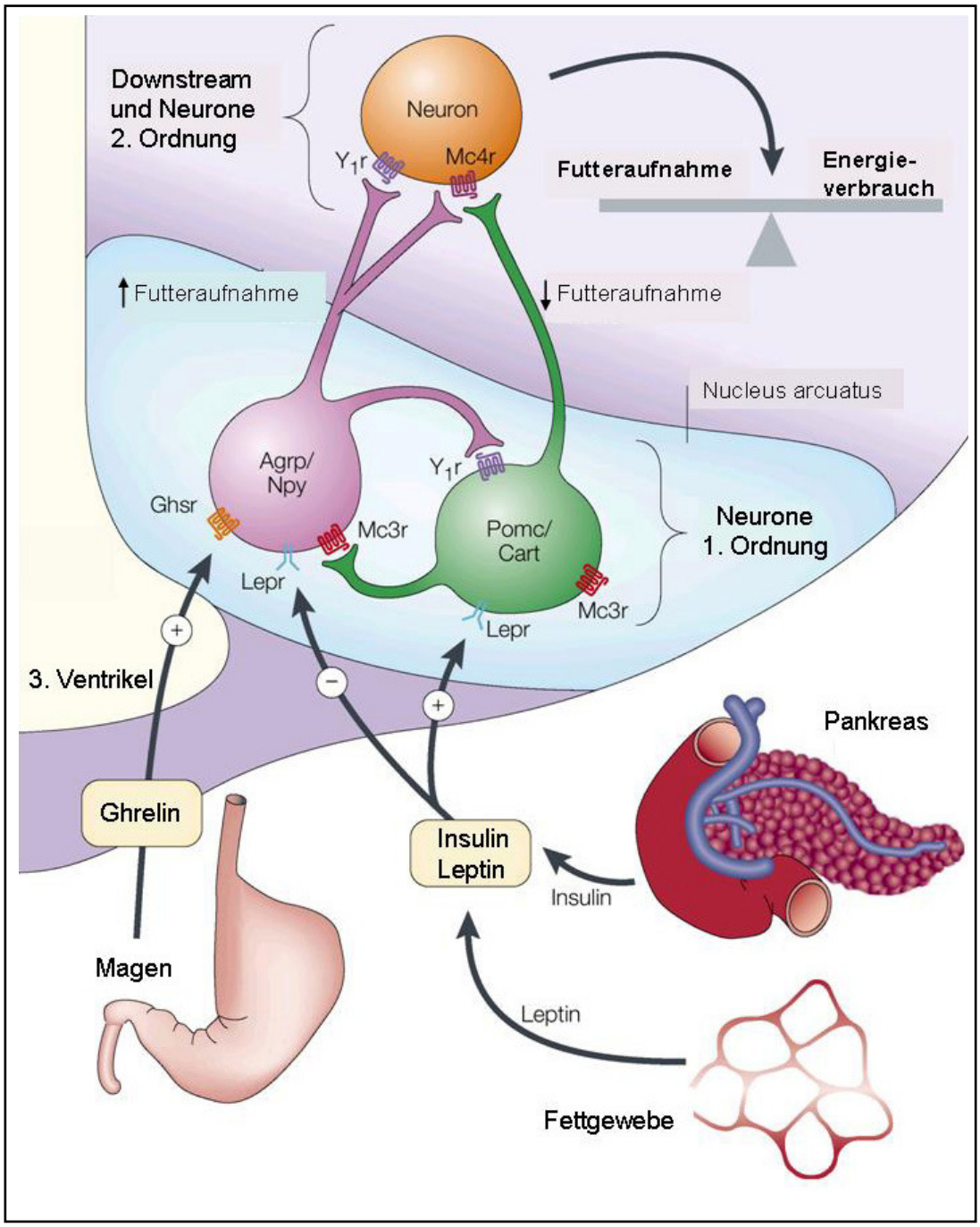



***Abb. 2:*** *Im Nucleus arcuatus findet man zwei verschiedene Neuronenpopulationen – AGRP/NPY und POMC/CART Neurone. AGRP und NPY sind Neuropeptide, die die Futteraufnahme stimulieren, wohingegen α-MSH (entsteht durch posttranslationale Prozessierung aus POMC) und CART die Nahrungsaufnahme hemmen. Die Hormone Insulin und Leptin hemmen die AGRP/NPY Neurone und aktivieren die POMC/CART Neurone. Sinkende Insulin- und Leptinspiegel aktivieren die AGRP/NPY Neurone und hemmen die POMC/CART Neurone. Ghrelin stimuliert die Nahrungsaufnahme und aktiviert die AGRP/NPY Neurone (nach Barsh et al. 2002).*

Die Untersuchung der MC4R-defizienten Mäuse ist – auch wenn dieses Modell natürlich nicht direkt auf den Menschen übertragen werden kann – ein interessanter Ansatz, um weitere Aufschlüsse über die Rolle des Melanokortinsystems bei der Körpergewichtsregulation zu erlangen, weil sie für das Verständnis der Entstehung und Ausprägung dieser monogenetischen Form der Adipositas beim Menschen relevant sein können.

### 1.3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die lange Form des Leptinrezeptors (LepRb) ist mit NPY, AGRP, POMC und CART koexprimiert. NPY und AGRP werden in Neuronen im medialen Nucleus arcuatus, POMC und CART werden im lateralen Nucleus arcuatus koexprimiert. Leptin hemmt die NPY/AGRP Neurone und stimuliert die POMC/CART Neurone. Das durch Prozessierung aus POMC entstehende α-MSH ist für die Aufklärung der genetischen Ursachen der Adipositas von besonderem Interesse, da es als Agonist an den MC4-Rezeptor bindet. Mutationen im MC4-Rezeptor sind bisher die einzige monogenetische Form der Adipositas beim Menschen, die auf Grund ihrer Häufigkeit als relevant angesehen werden können.

Die schematische Abbildung 2 versucht das Zusammenspiel der wesentlichen Faktoren bei der Regulation des Körpergewichts darzustellen, soweit sie im Zusammenhang mit der Steuerung durch anorexigene und orexigene Signale stehen.

## 1.4 Der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entstehung und Entwicklung der Adipositas

### 1.4.1 THERMONEUTRALITÄT

Homoiotherme endotherme Tiere (die meisten Säugetiere und Vögel) besitzen die Fähigkeit, ihre Körperkerntemperatur durch Mechanismen der Thermoregulation auch bei einer Änderung der Umgebungstemperatur konstant zu erhalten. Bei steigenden Umgebungstemperaturen erfolgt dies durch eine Steigerung der Wärmeabgabe durch gesteigerte Hautdurchblutung und durch Wasserverdunstung, bei sinkenden Temperaturen durch Steigerung der Wärmeproduktion mittels Kältezittern und durch zitterfreie Thermogenese. Im Bereich der Thermoneutralzone erfolgt die thermische Anpassung nur mittels vasomotorischen und pilomotorischen Änderungen. Die Thermoneutralzone liegt zwischen der unteren kritischen Temperatur und der oberen kritischen Temperatur. Die untere kritische Temperatur ist die Temperatur, bei der ein endothermes Lebewesen seine

Körpertemperatur nur noch durch eine Erhöhung der metabolischen Wärmeproduktion aufrechterhalten kann. Unterhalb dieser Temperatur steigt die metabolische Rate linear zur sinkenden Umgebungstemperatur an. Bei Temperaturen, die die obere kritische Temperatur übersteigen, erfolgt eine zusätzliche Wärmeabgabe durch Schwitzen, Hecheln oder Befeuchten des Haarkleides mit Speichel. Beim Überschreiten der oberen kritischen Temperatur steigt die metabolische Rate ebenfalls an (Eckert 1993). Eine gängige Methode zur Festlegung der Thermoneutralzone ist es, die Temperatur zu bestimmen, bei der die metabolische Rate am niedrigsten ist. In der Literatur werden unterschiedliche Bereiche für die Thermoneutralzone bei Mäusen angegeben. Die Bereiche liegen bei 26-30°C und 31-34°C (Romanovsky *et al.* 2002), in einer anderen Untersuchung werden 35°C als thermoneutrale Temperatur angegeben (Melnyk *et al.* 1997). Die Thermoneutralzone von C57BL/6J Mäusen wurde im Rahmen einer Doktorarbeit (Steinbrück 2004) bestimmt. Bei dieser Untersuchung wurden zusätzlich zur metabolischen Rate die Futteraufnahme und das Körpergewicht gemessen, da Hitzestress eine reduzierte Futteraufnahme bewirkt und dadurch zu einer Abnahme des Körpergewichts führt (Mitchell *et al.* 1992). Auf Grund der dort ermittelten Ergebnisse wurden 34°C bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit als thermoneutrale Umgebungstemperatur festgelegt.

### 1.4.2 DIÄTINDUZIERTE ADIPOSITAS

Der Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die Entstehung und Ausprägung der Adipositas wurde durch zahlreiche Tierversuche nachgewiesen. Es wurden eine Vielzahl von Diäten mit unterschiedlicher Zusammensetzung und teilweise auch unterschiedlicher Konsistenz über verschiedene Zeiträume bei Nagetieren eingesetzt, was eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse häufig nicht zulässt.

Untersuchungen, die vorwiegend an Ratten, aber auch an Mäusen durchgeführt wurden, zeigten, dass Diäten mit einem hohen Fettgehalt zu einem signifikanten Anstieg des Körperfettgehaltes führen. Diese Entwicklung ist abhängig von dem Fettgehalt der Diät und der Dauer der Fütterung. Wahrscheinlich wird durch die fettreiche Diät Hyperphagie ausgelöst. Bei Ratten wurde beobachtet, dass die Fütterung einer fettreichen Nahrung auch ohne Hyperphagie zur Adipositas führen kann. Außerdem spielen Geschmackskomponenten bei der Futteraufnahme eine Rolle. Süß schmeckende Diäten fördern Hyperphagie und Adipositas. Bei Ratten wurde nachgewiesen, dass der Anstieg des Körperfetts davon abhängig ist, wann mit der Fütterung der Adipositas auslösenden Diät begonnen wird und wie lange die Fütterung anhält (West *et al.* 1998; Oscai *et al.* 1987; Sclafani 1987; Ramirez

1987). Eine Untersuchung an 3 Wochen alten C57BL/6J Mäusen, die zur Entwicklung einer diätinduzierten Adipositas neigen, hat ergeben, dass diese Entwicklung in 3 Phasen eingeteilt werden kann. In der frühen Phase (in den ersten 3 Wochen) zeigt sich im Vergleich zu Mäusen, die keine fettreiche Diät erhielten, kein Unterschied in der Futteraufnahme und die Tiere sind leptinsensitiv. In den folgenden 5 Wochen sinkt die Futteraufnahme im Vergleich zu den Kontrollen, aber nach 15 Wochen haben die fettreich ernährten Tiere wieder eine höhere Futteraufnahme als die Kontrolltiere. Im mittleren Stadium zeigen die Mäuse noch eine zentrale Leptinresponsivität, die dann im Verlauf des Versuches zurückgeht (Lin *et al.* 2000a). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die diätinduzierte Adipositas mit der Entwicklung einer Leptinresistenz einhergeht.

Es gibt eine unterschiedliche Prävalenz für den Einfluss einer fettreichen Diät auf die Entwicklung und Ausprägung einer Adipositas bei verschiedenen Mäuse- und Rattenstämmen (Levin *et al.* 1987; West *et al.* 1992; West *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999). Einige Stämme haben eine besondere Prädisposition für eine diätinduzierte Adiopositas, wie zum Beispiel Osborne-Mendel und Wistar-Lewis Ratten, AKR/J und C57BL/6J Mäuse.

Es muss also genetische Faktoren geben, die bei der Verfügbarkeit von fettreicher Nahrung für eine verschieden starke Reaktion auf diese Nahrung verantwortlich sind. Man bemüht sich um die Erforschung dieser polygenetischen Formen der Adipositas. Wenn es gelingt, die beteiligten Gene zu identifizieren, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit auch Rückschlüsse auf polygenetische Formen der Adipositas beim Menschen ziehen.

### 1.4.3 FRÜHPOSTNATALE EINFLÜSSE AUF DIE ENTSTEHUNG DER ADIPOSITAS

Die Bedeutung, die eine von der Norm abweichende Energieversorgung für die Entwicklung einer Adipositas hat, hängt wesentlich auch davon ab, in welchen Phasen der körperlichen Entwicklung sie auftritt. Dies betrifft auch die intrauterine und frühe postnatale Phase der Entwicklung. Die daraus resultierenden langfristig wirkenden Prädispositionen können unterschiedlich sein. So ist beim Menschen nachgewiesen, dass Mangelernährung der Mutter in der Frühschwangerschaft zur Adipositas prädisponiert (Ravelli *et al.* 1976). Das gleiche gilt, wenn bei der Mutter eine diabetische Störung vorliegt (Plagemann *et al.* 1997). Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass frühpostnatale Unterschiede in der Energieversorgung einen signifikanten Einfluss auf den Körperfettgehalt haben (Schmidt *et al.* 2000). Aus diesem Grunde sind bei der Analyse der Entstehung einer genetisch bedingten Adipositas definierte Bedingungen bei der Aufzucht der Tiermodelle von Bedeutung.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von physiologischen Parametern an Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen, die unter Standardbedingungen gehalten werden. Es werden Tiere verschiedener Alterstufen untersucht, wobei die gewählten Zeitpunkte bestimmten Entwicklungsstufen der Mäuse entsprechen. Am Tag 10 untersuchte Mäuse werden ausschließlich von der Mutter gesäugt, am Tag 21 untersuchte Mäuse sind abgesetzt und erhalten jetzt als Nahrung pelletiertes Futter. Am Tag 35 befinden sich die Tiere in der Umbruchphase vom Jugendalter zum Erwachsenenalter. Am Tag 56 sind die Mäuse dann geschlechtsreif. Es sollen Parameter wie die Futteraufnahme, das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und der Plasmaleptinspiegel bestimmt werden. Bei einigen Tieren soll von Tag 21-35 die Messung der metabolischen Rate mittels indirekter Kalorimetrie erfolgen. Eine Betrachtung der Energiebilanz (Summe der Energie des Futters, des Sauerstoffverbrauchs und der eingelagerten Energie in Form von fettfreier Trockenmasse und Fett) kann Aufschluss über die Ursachen der bei MC4R-defizienten Mäusen beobachteten Adipositas geben.

Die Untersuchung des Einflusses von genetischen, aber auch von umweltbedingten Faktoren auf die Entstehung und Entwicklung der Adipositas bei 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen ist das zweite Ziel der Arbeit. Um Lebensbedingungen von Menschen in entwickelten Ländern zu simulieren, die sich durch ein Überangebot an Nahrung, angenehme Umgebungstemperaturen und wenig Bewegung auszeichnen, erhalten die Mäuse ein hochkalorisches Zusatzfutter (weiße Schokolade) und werden unter thermoneutralen Bedingungen (34°C) gehalten. Futteraufnahme, Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Plasmaleptinwerte sollen ermittelt und mit den bei den Tieren unter Standardbedingungen erhaltenen Daten verglichen werden.

Schließlich soll die Expression der Neuropeptide NPY, AGRP, POMC und CART im Nucleus arcuatus bei 35 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen in Abhängigkeit vom Genotyp und den Haltungsbedingungen untersucht werden. Bei den untersuchten Mäusen sollen die Geschlechter und Genotypen gleichmäßig verteilt sein und es sollen Tiere mit jeweils hohem, mittlerem und niedrigem Fettgehalt in der untersuchten Stichprobe enthalten sein. Die mRNA-Expression der untersuchten Neuropeptide wird quantitativ mit Hilfe von in situ Hybridisierung und durch eine anschließende Auswertung mit einem imaging-Programm, das die Fläche und Dichte des Hybridisierungssignals misst, bestimmt. Hierbei sollen sowohl Einflüsse des Genotyps als auch Einflüsse der Haltungsbedingungen auf die Neuropeptidexpression analysiert werden. Ein besonderer

Schwerpunkt soll auf der Untersuchung des Einflusses der Haltungsbedingungen (Umweltbedingungen) liegen, da die Genotypabhängigkeit und Altersabhängigkeit der Neuropeptidexpression im Nucleus arcuatus bereits nachgewiesen wurde (Arens *et al.* 2003; Arens 2005).

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen (Heterozygote und Homozygote) aus der eigenen Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Instituts in Bad Nauheim durchgeführt. Diese Zucht wurde im Frühjahr 1999 durch Paarung von jeweils 4 heterozygoten Männchen und Weibchen aufgebaut. Die Tiere wurden uns freundlicherweise von Dennis Huszar, Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt. C57BL/6J Mäuse waren der Ausgangsstamm bei der Generierung der MC4R-defizienten Mäuse.

Die Mäuse wurden bei 22°C und einer relativen Luftfeuchte von 45% gehalten. Der Licht/Dunkel-Zyklus betrug 12:12 Stunden. Nicht verpaarte weibliche Zuchtmäuse saßen zu zweit, männliche einzeln in Makrolon-Käfigen (Typ 2, Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel, BRD) auf Holzgranulatstreu (Altromin, Lage, BRD). Zur Paarung wurden ein Männchen und ein Weibchen für 14 Tage zusammengesetzt. Dann wurden die tragenden Weibchen isoliert und ab dem frühest möglichen Geburtstermin wurde täglich kontrolliert, ob die Tiere geworfen hatten. Die Welpen blieben insgesamt 21 Tage beim Muttertier und wurden am 4. Lebenstag individuell tätowiert. Nach dem Absetzen wurden 2-4 Welpen in Gruppen gleichen Geschlechts gehalten. Bis zu einem Alter von etwa 14 Tagen ernährten sich die Welpen ausschließlich von Muttermilch. Ab der 3. Lebenswoche erhielten sie zusätzlich pelletiertes Zuchtfutter (Zuchtfutter für Ratten und Mäuse, Altromin 1314, Lage, BRD), das für die Welpen auf den Boden des Käfigs gelegt wurde. Nach dem Absetzen erhielt ein Teil der Mäuse pelletiertes Standardfutter (Standardfutter für Ratten und Mäuse, Altromin 1324, Lage, BRD) und Wasser ad libitum. Eine andere Gruppe erhielt zusätzlich zu den Pellets weiße Schokolade (van Netten GmbH, Dortmund, BRD) als hochkalorisches Zusatzfutter und wurde bei 34°C unter thermoneutralen Bedingungen gehalten.

## 2.2 Versuchsreihen

Insgesamt wurden drei Versuchsreihen mit Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen durchgeführt (siehe Tabelle 1). Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden am Tag 10, Tag 21, Tag 35 und Tag 56 die Körperzusammensetzung (Feuchtmasse, Körperfettgehalt, Wassergehalt und die fettfreie Trockenmasse) unter Standardbedingungen (pelletiertes Standardfutter, 22°C) untersucht und teilweise auch die Plasmaleptinwerte bestimmt. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden bei Mäusen unter Standardbedingungen von Tag 21 bis 35

außerdem die tägliche Futteraufnahme und der Sauerstoffverbrauch mittels indirekter Kalorimetrie gemessen.

| I Standardernährung 22°C | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | d10 | | d21 | | d35 | | d56 | |
| Genotyp | m | w | m | w | m | w | m | w |
| +/+ | 10 | 14 | 14 | 10 | 11 | 16 | 11 | 10 |
| +/- (1) | 12 | 8 | 20 | 8 | 14 | 22 | 16 | 15 |
| +/- (2) | 9 | 8 | 20 | 12 | 8 | 21 | 10 | 10 |
| -/- | 8 | 6 | 10 | 14 | 12 | 7 | 5 | 8 |
| **gesamt** | **35** | **33** | **47** | **38** | **41** | **51** | **40** | **42** |

| II Standardernährung 22°C Sauerstoffmessung | | |
|---|---|---|
| d21-35 | | |
| Genotyp | m | w |
| +/+ | 6 | 4 |
| +/- | 6 | 4 |
| -/- | 3 | 3 |
| **gesamt** | **15** | **11** |

| III hochkalorisches Zusatzfutter TN | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | d21- 35 | | d21- 56 | |
| Genotyp | m | w | m | w |
| +/+ | 14 | 8 | 9 | 9 |
| +/- (1) | 13 | 9 | 20 | 9 |
| +/- (2) | 12 | 10 | 17 | 10 |
| -/- | 11 | 13 | 12 | 11 |
| **gesamt** | **43** | **37** | **45** | **33** |

| In situ Hybridisierung | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | d35 Standardernährung 22°C | | | | d35 hochkalorisches Zusatzfutter TN | | | |
| Sex/Genotyp | NPY | POMC | AGRP | CART | NPY | POMC | AGRP | CART |
| Männchen +/+ | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| +/- | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| -/- | 4 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Weibchen +/+ | 4 | 4 | 4 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| +/- | 4 | 4 | 3 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| -/- | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| **gesamt** | **23** | **23** | **22** | **22** | **31** | **32** | **31** | **32** |

***Tabelle 1:*** *Anzahl (N) der Versuchstiere in den 3 Versuchsreihen (I-III) sowie bei der in situ Hybridisierung Männchen: m, Weibchen: w, Wildtypen: +/+, Heterozygote: +/-, +/- Geschwister der +/+ Tiere: +/- (1), +/- Geschwister der -/- Tiere: +/- (2), Homozygote: -/-*

Die Tiere der dritten Versuchsreihe erhielten nach dem Absetzen am Tag 21 zusätzlich zum pelletierten Standardfutter weiße Schokolade als hochkalorisches Zusatzfutter und wurden unter thermoneutralen Bedingungen bei 34°C gehalten. Eine Gruppe der Mäuse wurde von Tag 21 bis 35, eine weitere von Tag 21 bis 56 unter diesen Bedingungen gehalten, wobei die Aufnahme beider Diäten sowie die Körpermasse täglich bestimmt wurden. Nach dem Töten dieser Tiere wurden wiederum die Körperzusammensetzung und die Plasmaleptinwerte bestimmt. Mit den Gehirnen von 35 Tage alten Tieren aus Versuchsreihe 1 (d21-35

Standardernährung 22°C) und Versuchsreihe 3 (d21-35 Schokoladenzusatzernährung 34°C) wurde außerdem eine radioaktive in situ Hybridisierung zur Bestimmung der Expression der Neuropeptide NPY, POMC, AGRP und CART durchgeführt. Bei der Auswahl der Tiere wurde auf ein ausgewogenes Verhältnis der Geschlechter und Genotypen und auf eine gute Verteilung des prozentualen Fettgehaltes geachtet.

## 2.3 Untersuchungen vor und während des Versuchs

### 2.3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE GENOTYPBESTIMMUNG

#### 2.3.1.1 Gewinnung und Aufarbeitung der DNA

Am 4. Lebenstag wurde von jedem Versuchstier eine Gewebeprobe (ca. 0,5 cm der Schwanzspitze) entnommen. Zur DNA Gewinnung und Reinigung wurde der QIAamp DNA Mini Kit 250 (Qiagen GmbH, Hilden, BRD) verwendet. Die Gewebeprobe wurde mit Proteinase K und Puffer versetzt und dann über Nacht im Schüttler bei 55°C verdaut. Am nächsten Tag wurde die DNA laut Anleitung des Kits mit Ethanol abs. (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD) ausgefällt, gereinigt und schließlich in einer Pufferlösung aufgefangen. In dieser Form konnte sie später in die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt werden.

#### 2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die gewonnene DNA (3µl der DNA-Lösung) wurde am nächsten Tag in einen Master-Mix folgender Zusammensetzung (Angabe pro Tier) gegeben:

| | |
|---|---|
| 13,75 µl | $H_2O$ (Millipore, steril) |
| 2,50 µl | PCR-Puffer 10x |
| 2,00 µl | $MgCl_2$ (2mM) |
| 0,50 µl | dNTP-Mix (200µM pro dNTP) |
| 1,00 µl | MC4 F3 Primer (4µM) |
| 1,00 µl | MC4 R1 Primer (4µM) |
| 1,00 µl | pGK R3 Primer (4µM) |
| 0,25 µl | Taq-Polymerase (=1,25 u) |

Das Endvolumen betrug 25 µl.

Um die verschiedenen Genotypen zu unterscheiden, wurden Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

MC4 F3 Primer (5'-GGA AGA TGA ACT CCA CCC ACC-3')
MC4 R1 Primer (5'-GAC GAT GGT TTC CGA CCC ATT-3')
pGK R3 Primer (5'-TTC CCA GCC TCT GAG CCC AGA-3')

MC4 F3 und MC4 R1 Primer bilden den Start und Endpunkt der Wildtyp MC4r Sequenz. MC4 F3 und pGK R3 Primer markieren das Gen für Neomycin-Resistenz, das unter der Kontrolle des Phosphoglycerinkinase1 Promotors steht und in der Knockout Maus den Großteil der codierenden Region des MC4r Gens ersetzt. Die Primer wurden im Überschuss zugesetzt, damit bevorzugt eine Hybridisierung des Primers an der Zielsequenz und nicht eine Rehybridisierung der getrennten Einzelstränge stattfinden konnte.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt, BRD) durchgeführt. Drei Schritte wurden jeweils für 45 Sekunden durchgeführt und 40 Mal hintereinander durchlaufen. Im ersten Schritt wurde die DNA bei 94°C denaturiert und in Einzelstränge aufgetrennt (melting), im zweiten Schritt fand die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge bei einer Temperatur von 64°C statt (annealing) und im dritten Schritt erfolgte schließlich bei 72°C die Replikation (synthesis).

#### 2.3.1.3 Elektrophorese

Nach Abschluss der PCR wurden die Amplifikate auf ein 1,5%iges Agarose Gel (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) aufgetragen. Anschließend lief die Elektrophorese bei 150 Volt ca. 30 Minuten. Das Gel wurde anschließend in einem Ethidiumbromidbad (Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) ca. 10 Minuten lang gefärbt. Das fertige Gel wurde schließlich auf einen UV-Tisch gelegt und mit einer Polaroidkamera fotografiert.

Für Wildtyp-Tiere wird auf dem Gel eine Bande von 313 bp, für heterozygote Tiere eine Bande von 313 bp und eine Bande von 405 bp und für homozygote Tiere eine Bande von 405 bp sichtbar.

### 2.3.2 BESTIMMUNG VON FUTTERAUFNAHME UND KÖRPERMASSE

Während der Versuche mit Messung des Sauerstoffverbrauchs bzw. Fütterung von hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen wurden die Tiere täglich ca. 1 Stunde vor Beginn der Dunkelphase (Aktivitätsphase) versorgt. Dabei wurde die Körpermasse bestimmt und die tägliche Futteraufnahme anhand der Differenz zwischen dem Futterrest und dem am Tag zuvor eingewogenen Futter errechnet. Wenn zwei Futtersorten zur Verfügung standen, wurde die Futteraufnahme von Pellets und weißer Schokolade

getrennt bestimmt. Um den Verlust von Krümeln zu minimieren, wurden spezielle Futterhalter für beide Futtersorten in der Werkstatt des W.G. Kerckhoff-Instituts angefertigt. Für die Berechnung der Gesamtenergieaufnahme wurde die umsetzbare Energie für die jeweilige Futtersorte zugrunde gelegt. Im Rahmen von anderen Examensarbeiten an unserem Institut wurden dazu bombenkalorimetrische Bestimmungen (Zusammenarbeit mit Prof. Weigand, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen) der Futtersorten und des Kot-Energiegehaltes durchgeführt (Tabelle 2). In einer Studie (Rafael *et al.* 2000) wurden übereinstimmende Werte für die metabolisierbare Energie der hier verwendeten Standarddiät gefunden.

| Futtersorte | Zusammensetzung [Gewichts-%] | | Brutto-energie [kJ/g] | umsetzbare Energie [kJ/g] |
|---|---|---|---|---|
| pelletiertes Standardfutter (Altromin 1324) | Protein:<br>N-freie Extraktstoffe:<br>Fett:<br>Rohfaser:<br>Asche:<br>Wasser: | 20<br>53<br>4<br>6<br>7<br>10 | 16,2 | 13,5 |
| pelletiertes Zuchtfutter (Altromin 1314) | Protein:<br>N-freie Extraktstoffe:<br>Fett:<br>Rohfaser:<br>Asche:<br>Wasser: | 23<br>50<br>5<br>5<br>7<br>10 | 16,6 | 13,7 |
| weiße Schokolade | Protein:<br>Kohlenhydrate:<br>Fett:<br>Wasser: | 5<br>58<br>34<br>3 | 23,7 | 23,5 |

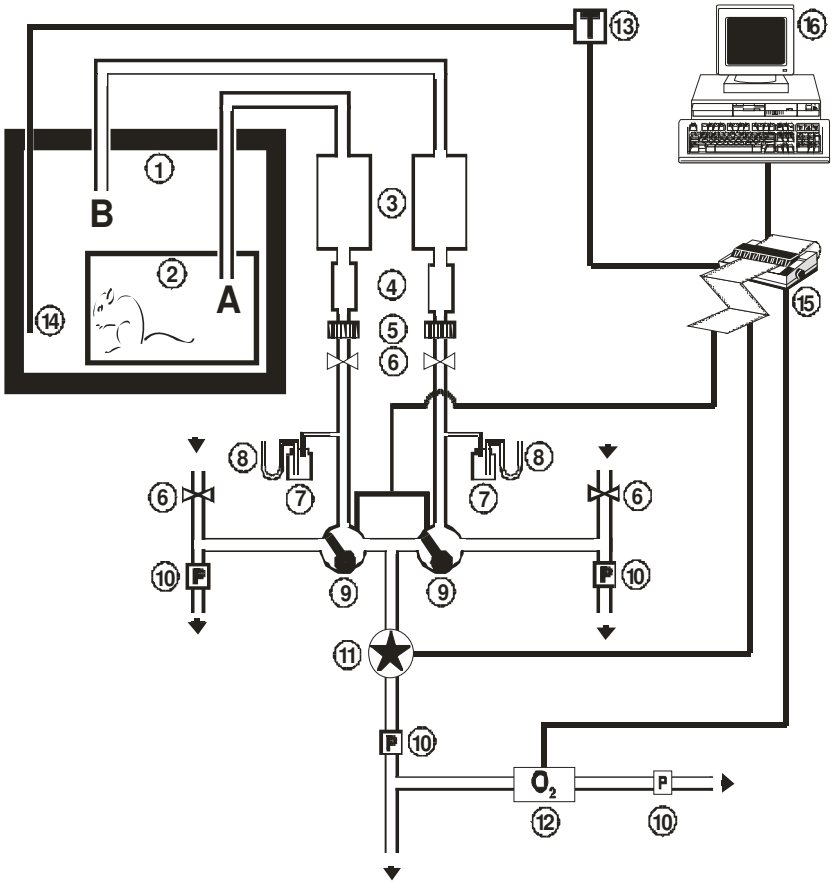
***Tabelle 2:*** *Zusammensetzung, Bruttoenergie und umsetzbare Energie der in dieser Arbeit verwendeten Futtersorten.*

### 2.3.3 BESTIMMUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS

#### 2.3.3.1 Versuchsaufbau

Die Tiere befanden sich einzeln in Boxen, die in einer Klimakammer (Typ 500SB, Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen, BRD) untergebracht waren. Aus den Tierboxen wurde durch Membranpumpen kontinuierlich Luft abgesaugt, deren Sauerstoffgehalt reihum abwechselnd für jeweils 5 Minuten gemessen wurde. Die abgesaugte Luft wurde durch mit Calziumsulfat gefüllte Trockenröhren und durch eine leere 500 ml Flasche geleitet. Die unmittelbar am Absaugrohr auftretenden starken Schwankungen des Sauerstoffgehaltes sollten durch die zwischengeschaltete Sammlung der Luft in einer Flasche ausgeglichen werden. Außerdem wurden Aktivkohlefilter zur Absorption organischer Moleküle und Membranfilter zum

Auffangen von Staubpartikeln eingebaut. Durch Magnetventile, die mit einem Zeitgeber verbunden waren, wurde die angesaugte Luft zu einem Massenflussmesser (FM 360, Tylan General, Eching, BRD) und von dort zum Sauerstoffanalysator oder durch Bypasspumpen in den Raum geleitet. Um eine konstante Flussrate auch in der Zeit, in der ein Tier nicht gemessen wurde, zu gewährleisten, waren zwischen den beiden Ventilen Wassermanometer zur optischen Druckdifferenz-Kontrolle eingebaut.




1 Klimakammer
2 Tierbox
3 Trockenröhren
4 Aktiv-Kohle-Filter
5 Staubfilter
6 Nadelventil
7 Überlaufbehälter
8 Wassermanometer
9 Magnetventile
10 Luftflusspumpe
11 Massenflussmesser
12 Sauerstoff-Analysator
13 Temperatur-Verstärker
14 Thermoelement
15 Matrix-Drucker mit A/D-Wandler
16 Computer

***Abb. 3:*** *Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Sauerstoffmessung mittels indirekter Kalorimetrie. Am Beispiel eines Tieres ist die Messung des Sauerstoffgehaltes der Tier-Atemluft in Messposition gezeigt (A). Der zweite dargestellte Kanal zeigt die Referenzmessung der Umgebungsluft, die sich gerade - wie die anderen nicht gemessenen Tierkanäle - in Bypass-Position befindet (B). Der ständig mit Umgebungsluft gespeiste Analysatorkanal ist nicht dargestellt (nach Döring 2000).*

Die Flussrate, mit der die Luft abgesaugt wurde, hing vom Alter der Tiere und der Umgebungstemperatur ab. Sie lag zwischen 140 und 200 ml/min und wurde so gewählt, dass die Sauerstoffextraktion innerhalb der Tierbox ca. 0,5% betrug. Zur Kalibrierung des Massenflussmessers wurde nach Einstellung eines konstanten Luftflusses die Zeit gestoppt, die eine Seifenblase benötigte, um in einem Plexiglasrohr eine definierte Strecke zurückzulegen.

Die Umgebungstemperatur, die Luftfeuchte und der Luftdruck wurden dabei berücksichtigt, um das Luftvolumen auf Standardbedingungen (STPD=273 K, 760 mm Hg, 0% relative Luftfeuchte) zurückzurechnen. Der errechnete Luftfluss wurde gegen die am Massenflussmesser eingestellte Spannung aufgetragen und so eine Geradengleichung ermittelt, die eine Grundlage für die PC gestützte Auswertung der Daten war. Die Luft aus den Tierboxen und die aus der Umgebung abgesaugte Luft wurde schließlich zu einem Zwei-Kanal-Sauerstoff-Analysator geleitet (S-3A111, Ametek, Pittsburgh, USA) und im offenen Flusssystem gemessen. Einer der zwei Kanäle bestimmte den Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft und der andere Kanal in 5-minütigem Wechsel den Sauerstoffgehalt in den Tierboxen und eines weiteren Kontrollkanals, der auch Umgebungsluft aus der Kammer ansaugte. Die Differenz zwischen Tier- und Raumluft, eine Kennung zur Identifizierung des gerade gemessenen Kanals sowie der Luftfluss durch diesen Kanal und die Temperatur wurden simultan durch einen Mehrkanalpunktdrucker und einen Computer aufgezeichnet.

#### 2.3.3.2 Bestimmung der Stoffwechselrate

Die Daten wurden in Intervallen von 12 s mit Hilfe von speziell entwickelten Programmen aufgezeichnet und gespeichert. Es wurden immer nur die letzten 2,5 Minuten einer Messperiode ausgewertet und gemittelt, um Fehlmessungen von Restluft des zuvor gewählten Kanals zu vermeiden. Der Unterschied im prozentualen Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft und Tierluft sowie der Luftfluss bildeten die Grundlage für die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs pro Minute, die nach der Gleichung für das offene System von Withers (Withers 1977) erfolgte. Die Ermittlung der Stoffwechselrate basierte auf den Einzelmesswerten pro Tier und Tag. Es wurde – parallel zur Futtermessung – ein Mittelwert über 24 Stunden gebildet.

Da eine Messung des Sauerstoffverbrauchs nur bei Standarddiät-Fütterung durchgeführt wurde, konnte auf Grund der Zusammensetzung der pelletierten Standardnahrung ein respiratorischer Quotient (RQ) von 0,85 angenommen werden.

## 2.4 Untersuchungen nach Ablauf des Versuchs

### 2.4.1 TÖTUNG DER VERSUCHSTIERE UND PLASMAGEWINNUNG

Die Tiere wurden 3 Stunden vor Beginn ihrer Dunkelphase getötet. Zunächst wurden sie mit $CO_2$ narkotisiert und anschließend dekapitiert. Das aus dem Torso austretende Blut wurde in einem Eppendorfcup mit Heparinvorlage (Liquemin N 5000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) aufgefangen und auf Eis gekühlt. Die Heparinmenge richtete sich nach der zu erwartenden Blutmenge und betrug ca. 10% des Endvolumens. Die Blutproben wurden dann bei 5000 U/min bei einer Temperatur von 4°C ca. 15 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abpipettiert, aliquotiert und bis zur Bestimmung der Plasmaleptinspiegel bei -80°C gelagert. Durch Wiegung der festen und flüssigen Blutbestandteile wurde das Plasma-Heparinverhältnis bestimmt. Der resultierende Verdünnungsfaktor wurde bei der Auswertung der Plasmaleptinwerte berücksichtigt.

### 2.4.2 PRÄPARATION DER GEHIRNE

Nach der Dekapitierung der Tiere wurde sofort mit der Gehirnentnahme begonnen. Die Kopfhaut wurde bis zwischen die Augen aufgeschnitten und so weit wie möglich zur Seite geklappt. Danach wurde die Schädeldecke mit einer spitzen Schere vom Foramen magnum ausgehend entlang der Schädelnähte rechts und links eingeschnitten und dann durch einen Querschnitt entlang des Bregmas geöffnet. Die Schädeldecke wurde mit einem Spatel vorsichtig von der Schädelkapsel gelöst, die Nervi optici und trigemini und der Hirnstamm durchtrennt und das Gehirn anschließend mit dem Cortex nach unten auf einen mit Alufolie umwickelten Objektträger gelegt. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Gehirn symmetrisch ausgerichtet und der Objektträger danach auf Trockeneis gelegt. Wenn das Gehirn vollkommen gefroren war, wurde es zum Schutz gegen Austrocknung zuerst mit Parafilm und dann mit Alufolie umhüllt. Die Gehirne wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 2.4.3 BESTIMMUNG DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG

Nach der Tötung wurde den Tieren der Magen-Darm-Trakt entfernt und die Blase eröffnet, um eine Vergleichbarkeit der Gewichte unabhängig vom Füllungszustand des Magen-Darm-Traktes zu erhalten. Die Tiere wurden gewogen und die Feuchtmasse bestimmt, wobei das zuvor entnommene Blut berücksichtigt wurde. Die Feuchtmasse ist eine genaue Bezugsgröße für die Berechnung der prozentualen Körperzusammensetzung. Die Bestimmung der Körperzusammensetzung erfolgte nach einem mehrfach beschriebenen Verfahren

(Markewicz *et al.* 1993; Olbort 1998). Die Tierkörper wurden zunächst in einem Trockenschrank bei 75°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. So konnte das Trockengewicht bestimmt und der Wassergehalt errechnet werden. Anschließend wurden die Tierkörper in einer Soxhlet-Apparatur (VWR International, Darmstadt, BRD) einer ungefähr 24-stündigen Chloroformextraktion unterzogen. Nach Abschluss der Extraktion wurden die Körper erneut im Trockenschrank getrocknet. Das erhaltene Endgewicht ist die FFDM (fat-free dry-mass, fettfreie Trockenmasse). Zusätzlich wurden nun die prozentualen Anteile der Körperfettmasse, des Körperwassers und der FFDM an der Feuchtmasse errechnet.

### 2.4.4 BESTIMMUNG DER HORMONKONZENTRATIONEN IM PLASMA

Radioimmunoassays (RIA) ermöglichen die quantitative Bestimmung von Substanzen in biologischen Flüssigkeiten wie z.B. dem Blutplasma. Grundlage der von Yalow (Yalow 1980) entwickelten Methode ist die Antigen-Antikörper-Reaktion: die spezifische Bindung eines zu bestimmenden Moleküls (=Antigen) an einen Antikörper (γ-Immunglobulin, IgG). Die gleichzeitige oder zeitversetzte Zugabe einer bekannten Menge an radioaktiv markiertem Hormon (Tracer) führt zu einer kompetitiven Austauschreaktion, bei der das unmarkierte und das radioaktiv markierte Hormon um die Bindungsstellen an den Antikörpermolekülen konkurrieren. Nach Abschluss der Reaktion werden die freien Antikörpermoleküle separiert und die Radioaktivität des Antigen-Antikörper-Komplexes in einem γ-Counter gemessen. Je höher die Konzentration des zu bestimmenden unmarkierten Antigens im Testansatz ist, umso geringer ist die gemessene Radioaktivität des Bindungskomplexes.

Die Plasmaleptinkonzentration wurde mit Hilfe eines Kits (Maus-Leptin RIA-Kit, Linco Research Inc., St. Charles, USA) bestimmt. Zur radioaktiven Markierung wurde [$^{125}$I] Maus-Leptin verwendet. Für jeden Assay wurde eine Eichkurve errechnet, der eine Doppelmessung 7 verschiedener Leptinstandards (0,5 bis 20 ng/ml) zu Grunde liegt. Außerdem wurden 3 Kontrollansätze gemessen: Der erste, $T_{0,}$ enthielt nur das markierte Antigen, also 100% der eingesetzten Radioaktivität. Der zweite Ansatz, Non-Specific-Binding (NSB), enthielt zusätzlich Puffer, um festzustellen, wie viel der Radioaktivität durch unspezifische Bindungen an Puffermoleküle und Gefäßwände verloren geht. Der NSB/$T_0$-Wert lag bei allen RIAs unter 5%. Der dritte Ansatz, die Leerprobe ($B_0$), enthielt zusätzlich den spezifischen radioaktiv markierten Antikörper, aber kein unmarkiertes Antigen. Diese Probe zeigt die maximale Bindung des Tracers an das Antigen, die in der Regel zwischen 40 und 45% lag. Da die Eichkurve einen sigmoidenVerlauf zeigt, wurde versucht, die Menge des eingesetzten Plasmas so zu wählen, dass die Messwerte im linearen Bereich der Kurve liegen. Das

fehlende Volumen wurde jeweils mit Puffer aufgefüllt. Um die Variabilität innerhalb eines RIAs zu bestimmen, wurde in jedem Assay außerdem eine Dreifachbestimmung des Leptingehaltes eines Plasmapools durchgeführt.

Die mit Hilfe der Eichkurve errechneten Rohwerte wurden durch zwei Korrekturfaktoren berichtigt: den Verdünnungsfaktor, der die Zugabe von Heparin beim Auffangen des Blutes berücksichtigt und den Verdünnungsfaktor, der durch die Zugabe von Puffer (um ein Probenvolumen von 100 µl zu erhalten, wenn weniger als 100 µl des Plasmas in den RIA eingesetzt werden) zustande kommt.

Die Dreifachmessung des Plasmapools wurde dazu verwendet, die Interassay-Variabilität zu bestimmen. Auf Basis dieser Messwerte wurde für jeden RIA ein Korrekturfaktor berechnet, mit dem die Messwerte korrigiert wurden, um so Messwerte aus verschiedenen RIAs miteinander vergleichen zu können.

### 2.4.5 IN SITU HYBRIDISIERUNG

Die radioaktive in situ Hybridisierung ist eine etablierte Methode zur Lokalisation und Semi-Quantifizierung von DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben und Zellen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine RNA-RNA in situ Hybridisierung durchgeführt und so die relativen NPY-mRNA-, POMC-mRNA-, AGRP-mRNA- und CART-mRNA-Konzentrationen im ARC im Hypothalamus der Mäuse bestimmt. Es wurde eine radioaktiv markierte $^{35}$S-Sonde verwendet. Der radioaktiv markierte Einzelstrang (Sonde) bindet an den komplementären Einzelstrang der mRNA-Zielsequenz. Es entsteht ein stabiles Doppelstrang-Hybrid-Molekül, das durch die radioaktive Markierung auf einem Film sichtbar gemacht werden kann. Das hier durchgeführte Verfahren wurde von Simmons (Simmons 1989) beschrieben und von der Arbeitsgruppe von Dr. J.G. Mercer am Rowett Research Institute (Aberdeen, Schottland, UK) modifiziert (Mercer *et al.* 1995). Die verwendeten cDNA-Plasmide wurden ebenfalls von Dr. J.G. Mercer am Rowett Research Institute (Aberdeen, UK) zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.5.1 Schneiden der Gehirne

Von den Gehirnen wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (HM 500 O, Microm GmbH, Walldorf, BRD) 20 µm dicke Frontalschnitte von rostral nach caudal angefertigt und mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen. Es wurden Serien auf 8 Objektträgern von der Region des Nucleus arcuatus angefertigt. Im Vorfeld wurden Kleinhirn

und Hirnstamm mit einem Skalpell abgetrennt und das Gehirn danach auf dieser Schnittfläche aufgeblockt (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL). Mit dem Auftreten des ARC (Bregma -1,22 mm) wurde mit der Aufnahme der Schnitte begonnen (Fig. 41 Franklin & Paxinos, 1997) und beim ventralen Ende des 3. Ventrikels bei Bregma -2,54 mm beendet (Fig. 52 Franklin & Paxinos, 1997). Die fertigen Schnitte wurden bei -80°C gelagert.

#### 2.4.5.2 Durchführung der radioaktiven in situ Hybridisierung

Alle Mengenangaben beziehen sich auf eine in situ Hybridisierung für 30 Objektträger und wurden je nach Anzahl der untersuchten Objektträger/Gehirne modifiziert. Die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

##### *2.4.5.2.1 Herstellung der Sonde (in vitro Transkription)*

Die $^{35}$S-markierten Sonden (NPY, POMC, AGRP, CART) wurden unter Verwendung der entsprechenden DNA-Templates folgendermaßen hergestellt:

| | |
|---|---|
| 7,5 µl | DEPC-Wasser |
| 5,0 µl | 5x Transkriptionspuffer |
| 2,5 µl | DNA-Template (0,5-1 µg) |
| 3,0 µl | rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP) |
| 1,0 µl | 0,75M DTT |
| 1,0 µl | 1U RNase Block |
| 4,0 µl | $^{35}$S-UTP (=50 µCi) |
| 1,0 µl | RNA-Polymerase |

Für die NPY-antisense-Sonde (AS) wurde die T3-Polymerase, für die POMC-AS-Sonde SP6-Polymerase, für die AGRP-AS-Sonde und für die CART-AS-Sonde die T7-Polymerase verwendet. Der jeweilige Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden 2 µl DNase zugegeben, um nicht transkribierte DNA-Doppelstränge zu zerstören und anschließend für eine weitere halbe Stunde inkubiert. Danach wurde die Sonde mit Hilfe einer RNA bindenden Säule isoliert und die Radioaktivität nach Verdünnung im Szintillationszähler gemessen. Die unverdünnte Probe sollte 1,5-2 Mio. cpm/µl haben.

*2.4.5.2.2 Herstellung des Hybridisierungspuffers*

| | |
|---|---|
| 2500 µl | Formamid |
| 300 µl | 5M NaCl |
| 100 µl | 50x Denhardts-Lösung |
| 50 µl | 1M Tris (pH8) |
| 40 µl | DEPC Wasser |
| 1000 µl | 50% Dextransulfat |

*2.4.5.2.3 Herstellung der Hybridisierungslösung*

| | |
|---|---|
| 256 µl | tRNA (3,9 mg/ml) |
| 20 µl | 1M DTT |
| 74 µl | DEPC Wasser |
| 50 µl | $^{35}$S-markierte Sonde |
| 1600 µl | Hybridisierungspuffer |

Um die erforderliche Radioaktivität von 10.000 cpm/µl zu erhalten, wurde die Sonde entsprechend verdünnt. Wenn die Sonde nicht am Tag der Hybridisierung hergestellt wurde, wurde sie, um eventuell gebildete Doppelstränge zu spalten, 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Eine erneut durchgeführte Kontrollmessung der Radioaktivität sollte ca. 10.000 cpm/µl ergeben, was auch bei allen verwendeten Lösungen erreicht wurde.

*2.4.5.2.4 Fixierung und Hybridisierung der Gehirnschnitte*

Die Gehirnschnitte wurden aufgetaut, getrocknet und 20 Minuten in 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Dann wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (50%-100%) entwässert und anschließend vakuumgetrocknet. Auf jeden Objektträger wurden 70 µl Hybridisierungslösung aufgetragen, ein Deckgläschen aufgelegt und dieses mit DPX abgedichtet. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei 58°C hybridisiert.

*2.4.5.2.5 Posthybridisierung*

Nach Entfernen des DPX wurden die Objektträger für 30 Minuten in Coplin Jars in 4x SSC gestellt und nach dem Ablösen der Deckgläschen wurden sie 4x je 5 Minuten mit 4x SSC gewaschen und danach einer 30-minütigen RNase Behandlung unterzogen.

Lösung für RNase Behandlung:

| | | |
|---|---|---|
| 222 | ml | Wasser |
| 25 | ml | 5M NaCl |
| 2,5 | ml | 1M Tris (pH8) |
| 0,5 | ml | 0,5M EDTA |
| 0,5 | ml | RNase (0,1mg/ml) |

Im Anschluss wurde mehrfach mit abnehmender SSC Konzentration (2-0,1x SSC) gespült und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

#### *2.4.5.2.6 Autoradiographie*

Die Objektträger wurden getrennt nach der verwendeten Sonde zusammen mit einem $^{14}$C-Standard auf einen Röntgenfilm in eine Expositionskassette gelegt und die Filme anschließend 6 Tage (NPY und CART) bzw. 5 Tage (POMC und AGRP) exponiert. Der Film wurde dann anschließend 2 Minuten entwickelt, fixiert, gespült und schließlich getrocknet.

#### *2.4.5.2.7 Auswertung der Röntgenfilme*

Die Röntgenfilme wurden dann mit einem Durchlichtscanner (PowerLookIII, Umax Systems GmbH Willich, BRD) mit Hilfe der Software (MagicScan, Umax Systems GmbH Willich, BRD) eingescannt. Die quantitative Auswertung der in situ Hybridisierung erfolgte mit dem Programm Image-ProPlus (Media Cybernetics, Inc., Silverspring, MD, USA). Helligkeit und Kontrast wurden dabei so eingestellt, dass mindestens 6 der 8 Felder des $^{14}$C -Standards einen unterscheidbaren Schwärzungsgrad aufwiesen. Bei jedem auswertbaren Schnitt wurden die Fläche und die optische Dichte des Hybridisierungssignals in der Region des ARC gemessen. Durch einen Vergleich der schwächsten und stärksten Signale auf einem Film wurde ein für beide geeigneter Range eingestellt. Mit Hilfe der anhand der $^{14}$C-Skala erstellten Eichkurve errechnete das Programm für jeden Schnitt einen Wert für die „integrierte optische Dichte“ (IOD), wobei Fläche, Schwärzungsgrad und Hintergrundfärbung berücksichtigt wurden. Indem die IOD-Werte aller auswertbaren Schnitte eines Gehirns gemittelt wurden, ergab sich für jedes Tier die relative mRNA-Konzentration im ARC für das jeweils untersuchte Neuropeptid.

## 2.5 Statistische Datenauswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene statistische Verfahren zur Auswertung der Daten verwendet, die im folgendem beschrieben werden sollen.

Bei den angewendeten statistischen Verfahren wurde ein Mindestsignifikanzniveau von $P<0,05$ angenommen. Wenn ein statistisch signifikanter Unterschied auftrat, wurde er mit * $P<0,05$, ** $P<0,01$ und *** $P<0,001$ gekennzeichnet. Eine Tendenz zur Signifikanz ($P<0,1$) wurde mit + gekennzeichnet.

Da in manchen Würfen je nach Paarungsansatz nicht alle 3 möglichen Genotypen vertreten waren, wurde in einigen Fällen bei der Statistik eine getrennte Auswertung, sowohl aller +/+ Tiere und ihrer +/- Geschwister, als auch aller -/- Tiere und ihrer +/- Geschwister durchgeführt, um den Wurfeinfluss optimal analysieren zu können.

### 2.5.1 REGRESSIONSANALYSEN

Für die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten wurden gängige Standardverfahren zur Bestimmung der Regressionsgeraden mit der Methode der kleinsten Quadrate angewendet und deren Signifikanz gegen Null bestimmt (Sachs 1997).

Für den Vergleich zweier Regressionsgeraden wurde ein hauseigenes Statistikprogramm benutzt, mit dem die zu vergleichenden Geraden zunächst auf Parallelität und dann, im Falle vorliegender Parallelität, auf Unterschiede im y-Achsenabschnitt untersucht wurden (Brownlee 1965).

Außerdem wurde der Regressionsgeradenvergleich in Form der multiplen linearen Regressionsanalyse (SigmaStat, SPSS Corporation, Chicago, USA) angewandt. Dabei wurden die Einflüsse mehrerer Faktoren auf eine zu untersuchende Größe bestimmt.

### 2.5.2 VARIANZANALYSEN

Zweifache Varianzanalysen wurden mit dem Programm SigmaStat (SPSS Corporation, Chicago, USA) gerechnet. Die Daten wurden auf Normalverteilung (nach Kolmogorov-Smirnov) und gleiche Varianz (Levene-Median-Test) getestet. Als Mittelwerte wurden die kleinsten Quadrate (KQ) Mittelwerte mit Standardfehler (±SEM) angegeben. Als post hoc-Test wurden Bonferroni t-Tests angewendet.

Dreifaktorielle Varianzanalysen wurden mit dem Statistikprogramm (Statistica, StatSoft, Tulsa, OK 74104, USA) durchgeführt. Als Mittelwerte wurden die kleinsten Quadrate (KQ) Mittelwerte mit Standardfehler (±SEM) verwendet. Die statistischen Prognosen wurden

durch geplante Vergleiche der KQ Mittelwerte geprüft, die auch als Kontrastanalyse bezeichnet werden. Es wurde eine multifaktorielle ANOVA gerechnet, wobei das allgemeine lineare Modell zu Grunde gelegt wurde, und außerdem die Parametrisierung „keine Konstante“ und die Quadratsummen „Typ III orthogonal“ gewählt wurden.

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Untersuchungen an 10, 21, 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen bei Standardernährung und 22°C Umgebungstemperatur

### 3.1.1 AUSWIRKUNGEN VON GESCHLECHT UND GENOTYP AUF DIE KÖRPER-ZUSAMMENSETZUNG

#### 3.1.1.1 Feuchtmasse und fettfreie Trockenmasse

Die lineare Beziehung zwischen der Feuchtmasse und der fettfreien Trockenmasse (FFDM) ist bei 10, 21 und 35 Tage alten Tieren deutlich zu erkennen (Abb. 4), wobei ein Geschlechtsunterschied bei den jüngeren Tieren (10 und 21 Tage alt) nicht nachweisbar ist. Am Tag 35 zeigt sich ein kleiner, jedoch nicht signifikanter Unterschied zwischen Männchen

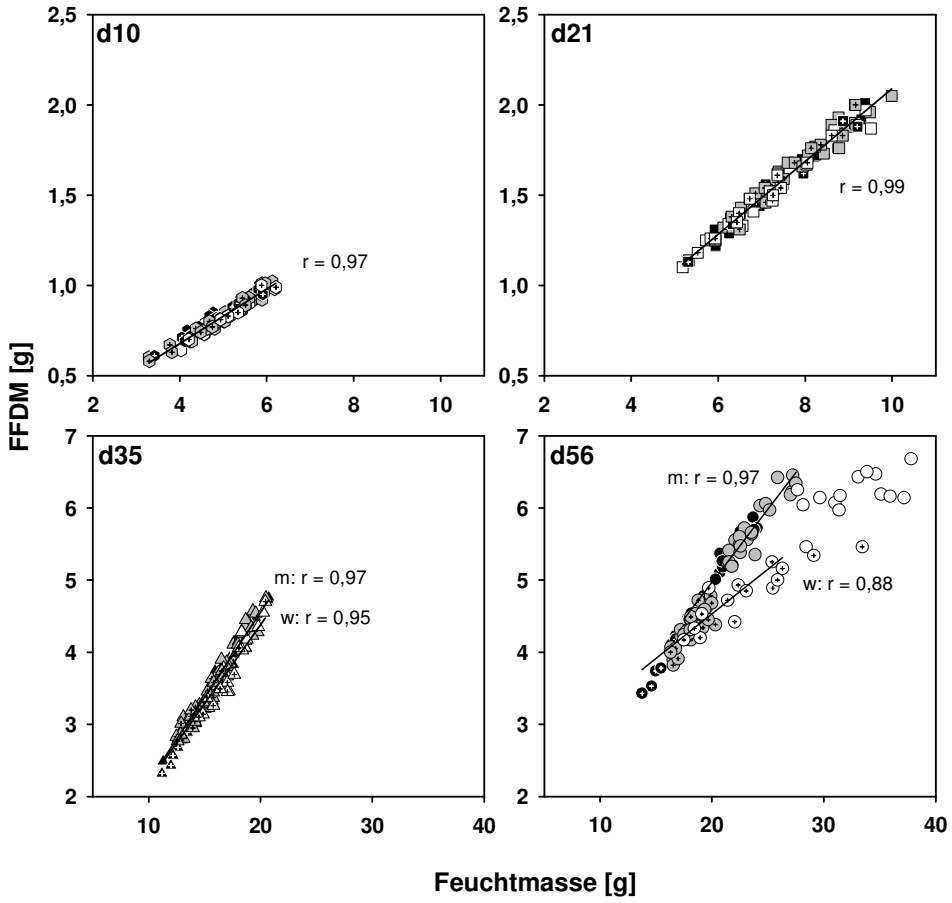



***Abb. 4:*** *Korrelation zwischen der fettfreien Trockenmasse (FFDM) und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Weibchen sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. 10 Tage alte Tiere (Sechseck), 21 Tage alte Tiere (Quadrat), 35 Tage alte Tiere (Dreieck) und 56 Tage alte Tiere (Kreis). Bei 10 und 21 Tage alten Tieren wurde die Regression für Weibchen und Männchen zusammen, bei 35 und 56 Tage alten Tieren für Männchen und Weibchen getrennt berechnet.*

und Weibchen. Die Regression der männlichen Tiere verläuft etwas steiler. Der Anstieg der FFDM mit zunehmender Feuchtmasse bleibt in diesem Alter ebenso wie bei den jüngeren Tieren vom Genotyp unabhängig. Am Tag 56 wird der Unterschied in der Steilheit zugunsten der männlichen Tiere sehr deutlich. Jedoch besteht nur unterhalb eines geschlechts-abhängigen Grenzwertes der Feuchtmasse weiterhin Linearität zur FFDM, und in diesem Bereich existiert auch kein Genotypunterschied. Mit weiter steigender Feuchtmasse kommt es zu einer geringeren Zunahme der FFDM bei beiden Geschlechtern. Bei den Männchen wie bei den Weibchen betrifft das ausschließlich homozygote MC4R-defiziente Tiere.

### 3.1.1.2 Feuchtmasse und Körperfett

Die Beziehung zwischen der Feuchtmasse und der Körperfettmasse zeigt für 10-35 Tage alte Tiere eine lineare Abhängigkeit der beiden Größen (Abb. 5). Bei 10 und 21 Tage alten Tieren

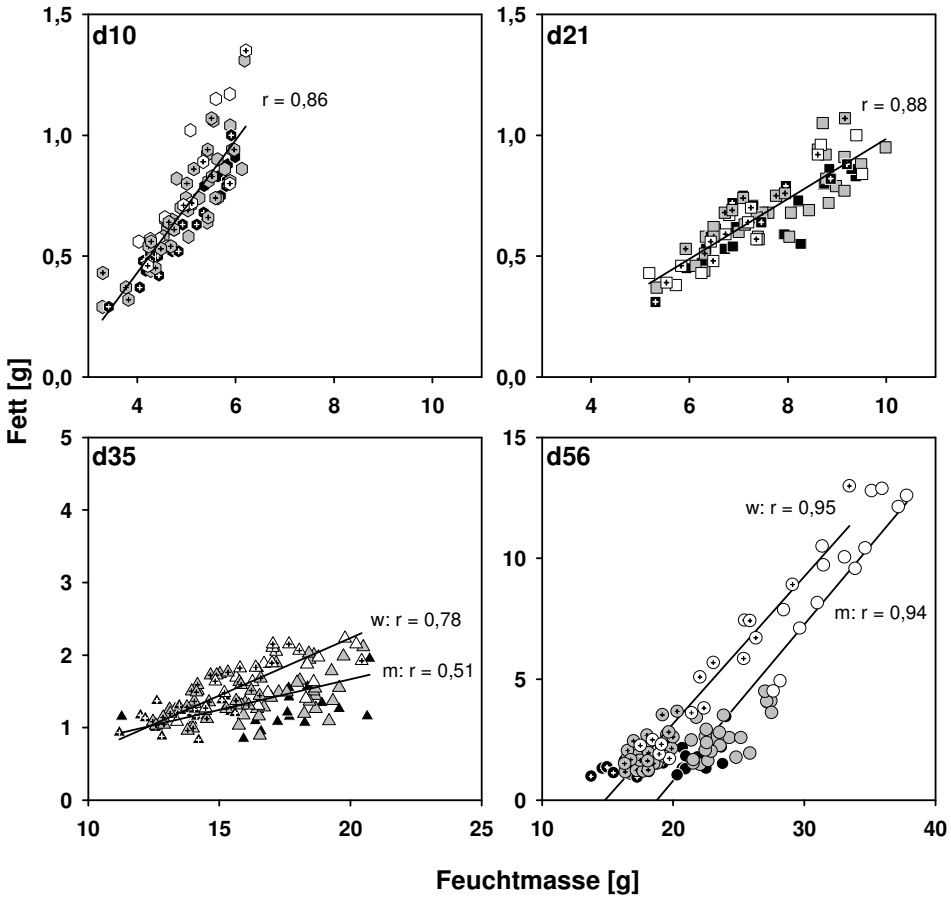



***Abb. 5:*** *Korrelation zwischen dem Körperfett in g und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Weibchen sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. 10 Tage alte Tiere (Sechseck), 21 Tage alte Tiere (Quadrat), 35 Tage alte Tiere (Dreieck) und 56 Tage alte Tiere (Kreis). Bei 10 und 21 Tage alten Tieren wurde die Regression für Weibchen und Männchen zusammen; bei 35 und 56 Tage alten Tieren für Männchen und Weibchen getrennt berechnet.*

steigt die Körperfettmasse mit steigender Feuchtmasse unabhängig von Geschlecht und Genotyp der Tiere an. An Tag 35 verläuft die Korrelation für die Weibchen steiler als für die Männchen. Die Weibchen zeigen also bei gleicher Feuchtmasse eine höhere Körperfettmasse als die Männchen. Die Regressionsgeraden für Männchen und Weibchen sind signifikant voneinander verschieden (P<0,01). Ein Genotypunterschied ist nicht zu erkennen. Am Tag 56 finden sich nur lockere lineare Regressionen für die beiden Geschlechter, wobei die Werte für die weiblichen Tiere über denen der männlichen Tiere liegen. Wildtypen liegen im unteren Bereich der Geraden, heterozygote im mittleren Bereich und homozygote Tiere im oberen Bereich der Geraden.

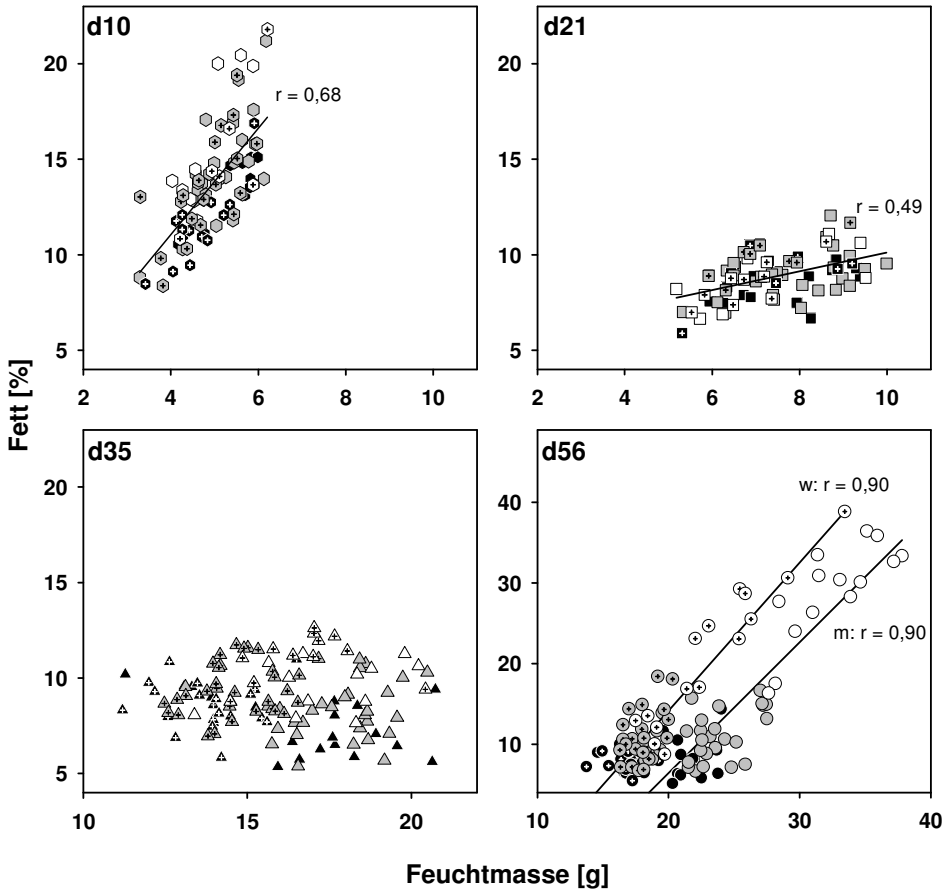



***Abb. 6:*** *Korrelation zwischen dem Körperfettgehalt in % und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Weibchen sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. 10 Tage alte Tiere (Sechseck), 21 Tage alte Tiere (Quadrat), 35 Tage alte Tiere (Dreieck) und 56 Tage alte Tiere (Kreis). Bei 10 und 21 Tage alten Tieren wurde die Regression für Weibchen und Männchen zusammen errechnet, bei 35 Tage alten Tieren liegt keine lineare Beziehung vor. Bei 56 Tage alten Tieren wurden die Regressionen für Männchen und Weibchen getrennt berechnet.*

Die Beziehung zwischen Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt zeigt ähnliche weniger enge altersabhängige Verteilungen (Abb. 6). Hier sind Regressionsgeraden für beide Geschlechter gemeinsam dargestellt, soweit getrennte Regressionen keinen signifikanten Geschlechts-

unterschied ergeben. Bei 10 und 21 Tage alten Tieren ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt nachweisbar. 10 Tage alte Tiere zeigen eine relativ enge Korrelation. Am Tag 21 ist sie schwächer, aber noch signifikant und am Tag 35 nicht mehr zu erkennen. Bis Tag 21 sind visuell keine Geschlechts- und Genotypunterschiede zu erkennen. Am Tag 56 haben Weibchen einen höheren Körperfettgehalt als Männchen gleicher Feuchtmasse. Die verschiedenen Genotypen liegen entsprechend ihrem Körperfettgehalt auf der Geraden verteilt, Wildtypen im unteren, Heterozygote im mittleren und Homozygote im oberen Bereich. Betrachtet man für die verschiedenen Altersstufen nach Geschlecht und Genotyp getrennt die jeweils minimalen und maximalen Werte des Körperfettgehalts, erkennt man, dass die Minimalwerte zwischen 5 und 15 % Fett liegen und nahezu unverändert bleiben. Die Maximalwerte nehmen vom Tag 10 - 21 ab, bleiben dann bis zum Tag 35 konstant und steigen vom Tag 35 bis 56 bei den homozygoten Tieren steil, bei heterozygoten Tieren schwach an und bleiben bei den Wildtypen unverändert. Die Maximalwerte nehmen einen breiten Bereich zwischen 5 und 39 % Fett ein. Im Zeitraum zwischen Tag 21 und 35 lagern die Tiere zwar zunehmend Fett ein, aber sie wachsen in dieser Zeit auch noch so stark, dass die Anstiege in der FFDM und in der Körperfettmasse in gleichem Maß erfolgen, so dass der Körperfettgehalt stabil bleibt.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass die Beziehung zwischen Feuchtmasse und FFDM mit zunehmendem Alter lockerer wird. Geschlechtsunterschiede werden ab Tag 35 erkennbar. Im Bezug auf die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt nimmt die Enge der Korrelation ebenfalls mit dem Alter ab, wobei die Geschlechtsunterschiede erwartungsgemäß denen im Bezug auf die FFDM entgegengesetzt sind. Genotypunterschiede werden besonders am Tag 56 deutlich. Sie werden für diese Altersgruppe nachfolgend genauer analysiert.

#### 3.1.1.3 Körperzusammensetzung bei 56 Tage alten Tieren

Bei 56 Tage alten Tieren wurden Genotypunterschiede getrennt nach dem Geschlecht analysiert (Abb. 7). Die Beziehung zwischen Feuchtmasse und FFDM, Fettmasse bzw. Körperfettgehalt ist für die Männchen links und für die Weibchen rechts dargestellt. Weibchen besitzen allgemein eine niedrigere Feuchtmasse als Männchen. Für die verschiedenen Genotypen wurden getrennte Regressionen berechnet. Zuerst soll die FFDM betrachtet werden. Bei Männchen und Weibchen weisen die Regressionen für +/+ und +/- Tiere gleiche Steilheit auf, sind nicht signifikant parallel gegeneinander verschoben, während die Steigung der Regressionsgeraden bei -/- Tieren flacher verläuft und sich signifikant von den Regressionen der +/+ und +/- Tiere unterscheidet.

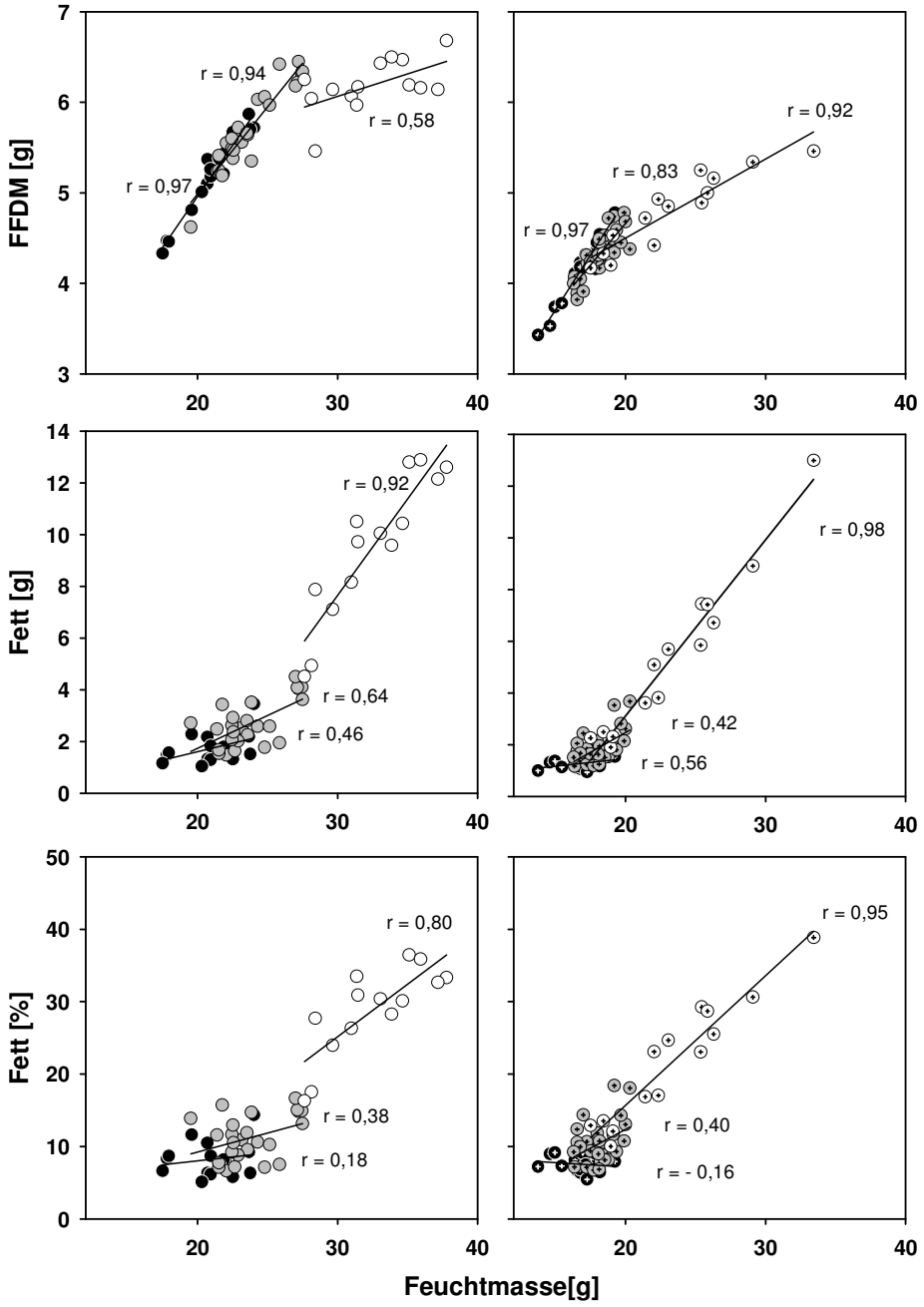



***Abb. 7:*** *Korrelation zwischen der FFDM, dem Körperfett in g, dem Körperfettgehalt in % und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) 56 Tage alten MC4R-defizienten Mäusen. Die Beziehungen sind für Männchen und Weibchen getrennt dargestellt. Weibchen (rechte Seite) sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Die Regressionen für die verschiedenen Genotypen sind getrennt berechnet.*

Bei der Körperfettmasse ist bei +/+ Tieren die Steigung der Regressionsgeraden niedriger als bei +/- Tieren, bei +/- Tieren niedriger als bei -/- Tieren. Für alle Regressionen außer zwischen +/+ Männchen und +/- Männchen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Für den Körperfettgehalt ist die Steigung der Regressionsgeraden in gleicher Weise vom Genotyp abhängig (+/+ < +/- < -/-). Die Regressionsgeraden der +/+ und +/- Männchen und der +/- und -/- Weibchen verlaufen parallel zueinander. Am Tag 56 sind für alle drei untersuchten Parameter fast durchgängig signifikante Genotypeinflüsse

nachweisbar. Die Regressionsgeraden weisen für Fett g bei den +/+ Männchen und für Fett % bei den +/+ und +/- Männchen sowie den +/+ Weibchen keine signifikante Korrelation auf.

#### 3.1.1.4 Zusammenfassende statistische Auswertung der Körperzusammensetzung unter zusätzlicher Einbeziehung des Wurffaktors

Es ist vielfach belegt, dass die Wurfzugehörigkeit das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung während der postnatalen Entwicklung beeinflusst und deshalb bei der statistischen Analyse berücksichtigt werden sollte.

Um den Wurf-, Geschlechts- und Genotypeinfluss nachzuweisen, wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp durchgeführt. (Ergebnisse Tabelle 3). Nahezu durchgängig ist für alle untersuchten Parameter ein Wurfeinfluss festzu-

| **Körpergewicht [g]** | **d10** | | **d21** | | **d35** | | **d56** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
| Wurf | *** | *** | *** | *** | ns | ** | *** | * |
| Geschlecht | ns | ns | ns | ns | *** | *** | *** | *** |
| Genotyp | ns | ns | ns | ns | ns | ** | ** | *** |
| Geschlecht x Gen. | ns | * | ns | ns | ns | ns | ns | + |

| **FFDM [g]** | **d10** | | **d21** | | **d35** | | **d56** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
| Wurf | *** | *** | *** | *** | * | ** | * | ns |
| Geschlecht | ns | ns | ns | ns | *** | *** | *** | *** |
| Genotyp | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ** |
| Geschlecht x Gen. | ns | ** | ns | ns | ns | ns | ns | * |

| **Fettmasse [g]** | **d10** | | **d21** | | **d35** | | **d56** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
| Wurf | *** | *** | *** | *** | * | ** | *** | ** |
| Geschlecht | ns | ns | ns | ns | ns | ns | *** | ns |
| Genotyp | ns | ns | ns | ns | ns | *** | *** | *** |
| Geschlecht x Gen. | + | ** | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

| **Fettgehalt [%]** | **d10** | | **d21** | | **d35** | | **d56** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
| Wurf | *** | *** | *** | *** | * | ns | *** | ** |
| Geschlecht | ns | ns | ** | + | * | * | *** | ns |
| Genotyp | + | ns | ns | ns | ns | ** | *** | *** |
| Geschlecht x Gen. | + | + | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

***Tabelle 3:*** *Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp. +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennt betrachtet. . +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

stellen. Bis zum Tag 21 ist nur ein Geschlechtseinfluss auf den Körperfettgehalt am Tag 21, ansonsten kein Einfluss des Geschlechts und Genotyps auf die Körperzusammensetzung festzustellen. Ab Tag 35 wird beim Körpergewicht und Fettgehalt zusätzlich der Genotypeinfluss deutlich.

Die Balkendiagramme (Abb. 8–11) zeigen die kleinsten Quadratemittelwerte und Signifikanzen für die Unterschiede des Körpergewichts, der FFDM, der Köperfettmasse und des Körperfettgehalts aller Tiere links, für Männchen und Weibchen getrennt rechts dargestellt. Da keine Geschlecht/Genotypinteraktion vorliegt, lassen sich aus der Varianzanalyse nicht direkt Signifikanzen für Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen ermitteln. Unterwirft man die bei der Varianzanalyse errechneten kleinsten Quadratemittelwerte einem

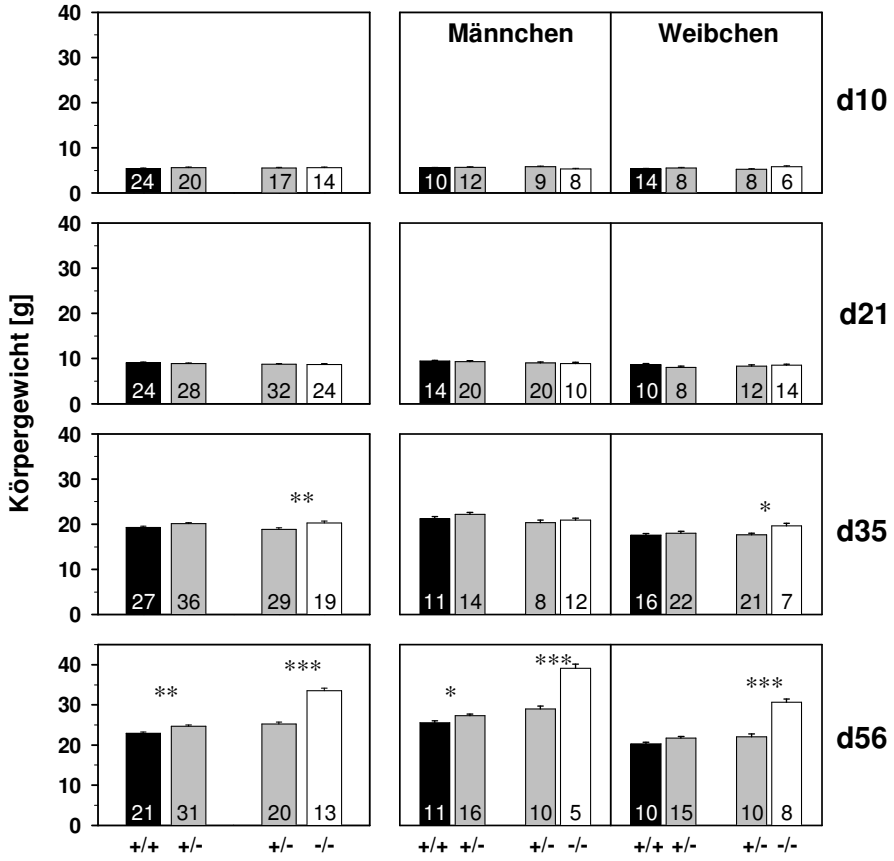



***Abb. 8:*** *Kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) des Körpergewichts in g von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Die +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und die -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennt statistisch mittels einer 3-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp ausgewertet. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen die Mittelwerte für 10, 21, 35 und 56 Tage alte Tiere ohne Berücksichtigung des Geschlechts. Die Sterne geben die Signifikanz an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001. Auf der rechten Seite sind die Mittelwerte für Männchen und Weibchen abgebildet. Die hier angegebenen Signifikanzen wurden durch einen t-Test Vergleich der Mittelwerte errechnet, wobei außerdem die Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche berücksichtigt wurde.*

t-Test-Vergleich, kann man unter Berücksichtigung der Stichprobengröße und des Standardfehlers eine Aussage über den Unterschied der Mittelwerte machen.

Für die Gesamtheit der Tiere links ist beim Körpergewicht (Abb. 8) ein signifikanter Genotypunterschied zwischen +/- und -/- Tieren an d35 festzustellen. -/- Tiere haben ein höheres Körpergewicht als +/- Tiere. Am Tag 56 tritt ein signifikanter Unterschied zwischen +/+ und +/- und ein hochsignifikanter Unterschied zwischen +/- und -/- Tieren auf. Der Mittelwert des Körpergewichts ist für +/- Tiere höher als für +/+ Tiere und für -/- Tiere höher als für +/- Tiere. Beim Vergleich der mittleren und rechten Diagramme zeigt sich, dass Männchen an Tag 35 und Tag 56 ein höheres Körpergewicht als Weibchen haben. Am Tag 35 unterscheidet sich das Körpergewicht der +/- Weibchen signifikant von dem der -/- Weibchen. Am Tag 56 ist sowohl für Männchen als auch für Weibchen ein Unterschied zwischen +/+ und +/- und zwischen +/- und -/- Tieren festzustellen.

Die Betrachtung der fettfreien Trockenmasse (FFDM) (Abb. 9) zeigt nur am Tag 56 einen signifikanten Genotypunterschied zwischen +/- und -/- Tieren. Am Tag 35 und 56 haben

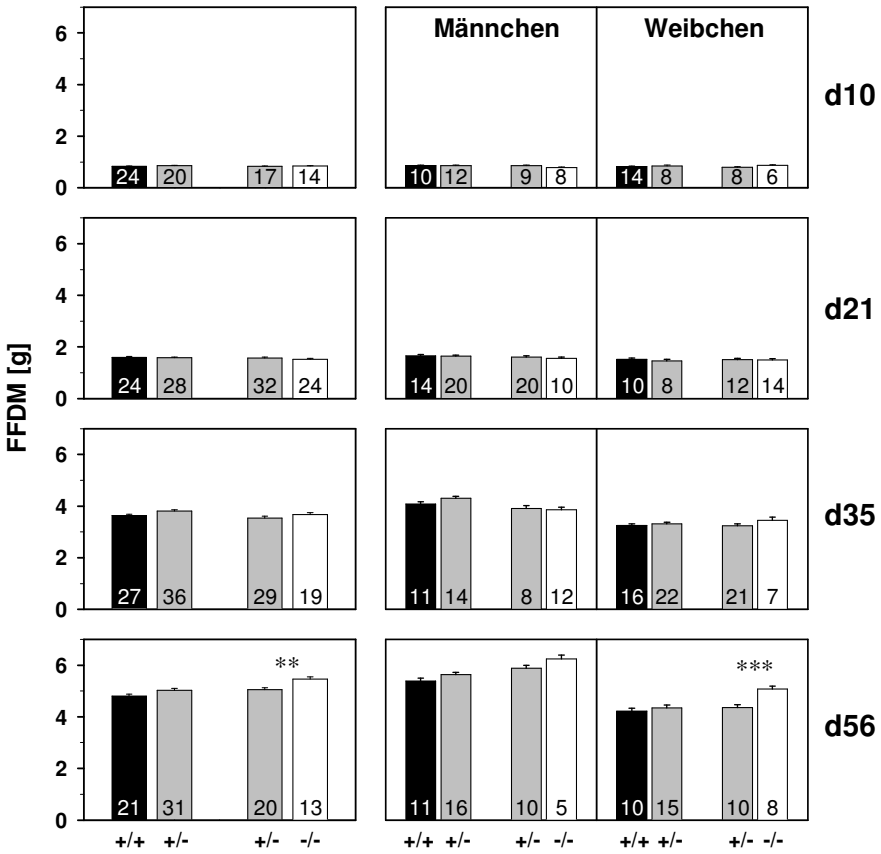



***Abb. 9:*** *Kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) der fettfreien Trockenmasse (FFDM) in g von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 8.*

männliche Tiere eine höhere FFDM als weibliche Tiere. Der Genotypunterschied beschränkt sich bei den 56 Tage alten Tieren nur auf +/- und -/- Weibchen.

Der Mittelwert der Körperfettmasse bei der Betrachtung aller Tiere (Abb. 10) zeigt am Tag 35 einen signifikanten Unterschied zwischen +/- und -/- Tieren. Bei der getrennten Darstellung von Männchen und Weibchen ist nur ein signifikanter Unterschied zwischen +/- und -/- Weibchen nachzuweisen. Am Tag 56 sind die Unterschiede in der Körperfettmasse bei Männchen und Weibchen bei gemeinsamer und getrennter Betrachtung für die Genotypunterschiede +/+ und +/- wie auch +/- und -/- hochsignifikant, wobei Männchen eine höhere Körperfettmasse als Weibchen haben. -/- Tiere haben eine deutlich höhere Körperfettmasse als Tiere anderen Genotyps.

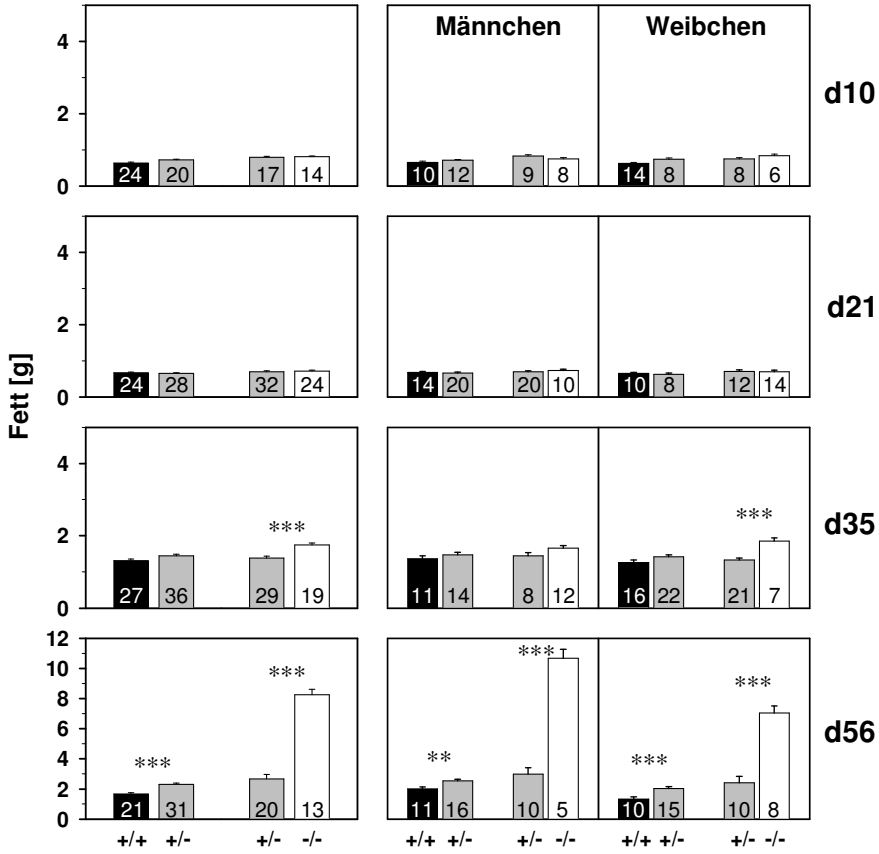



***Abb. 10:*** *Kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) des Körperfettes in g von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 8.*

Beim Körperfettgehalt (Abb. 11) ergibt sich am Tag 35 ein signifikanter Unterschied zwischen +/- und -/- Tieren. Bei der getrennten Betrachtung von Männchen und Weibchen zeigt sich dieser Unterschied nur für +/- und -/- Weibchen. Am Tag 56 ist ein Heterozygotenunterschied und ein hochsignifikanter Unterschied zwischen +/- und -/- Tieren festzustellen. Bei getrennter Analyse der Geschlechter lässt sich der Genotypunterschied am

Tag 56 für Männchen nur zwischen Hetero- und Homozygoten, bei Weibchen für beide Genotypunterschiede nachweisen.

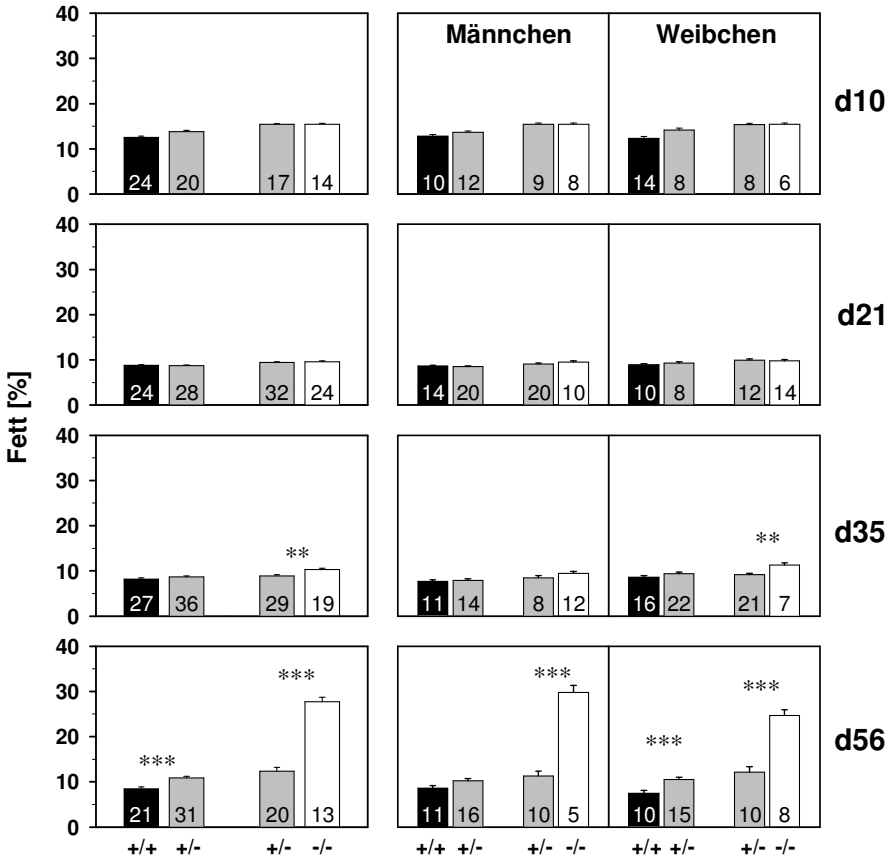



***Abb. 11:*** *Kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) des Körperfettgehaltes in % von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Nähere Erläuterungen siehe Abbildung 8.*

### 3.1.2 PLASMALEPTINGEHALT DER VERSCHIEDENEN ALTERSSTUFEN

Die Beziehung zwischen Plasmaleptin und sowohl der Körperfettmasse als auch dem Körperfettgehalt wurde für 10, 21, 35 und 56 Tage alte Tiere untersucht (Abb. 12). Innerhalb einer Altersgruppe ist für alle Genotypen der Plasmaleptinspiegel linear mit der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt korreliert. Der Korrelationskoeffizient ist 0,6-0,8 für die 10-35 Tage alten Tiere und 0,9 für die 56 Tage alten Tiere, deren Körperfettmasse und Körperfettgehalt einen breiteren Bereich einnehmen. Die Steigung der Regressionsgeraden ist bei 10 Tage alten Tieren am steilsten. 10 Tage alte Tiere haben insgesamt einen höheren Plasmaleptinspiegel als 21 Tage alte Tiere gleicher Körperfettmasse. Die Steigungen der Regressionsgeraden nehmen bis zum Tag 35 mit steigendem Alter der Tiere ab. Am Tag 56 ist die Steigung jedoch wieder steiler. (Tag 10 > Tag 56 > Tag 21 > Tag 35). Visuell ist keine Genotypabhängigkeit zu entdecken. Wenn -/- Tiere einen höheren Plasmaleptinspiegel als +/-

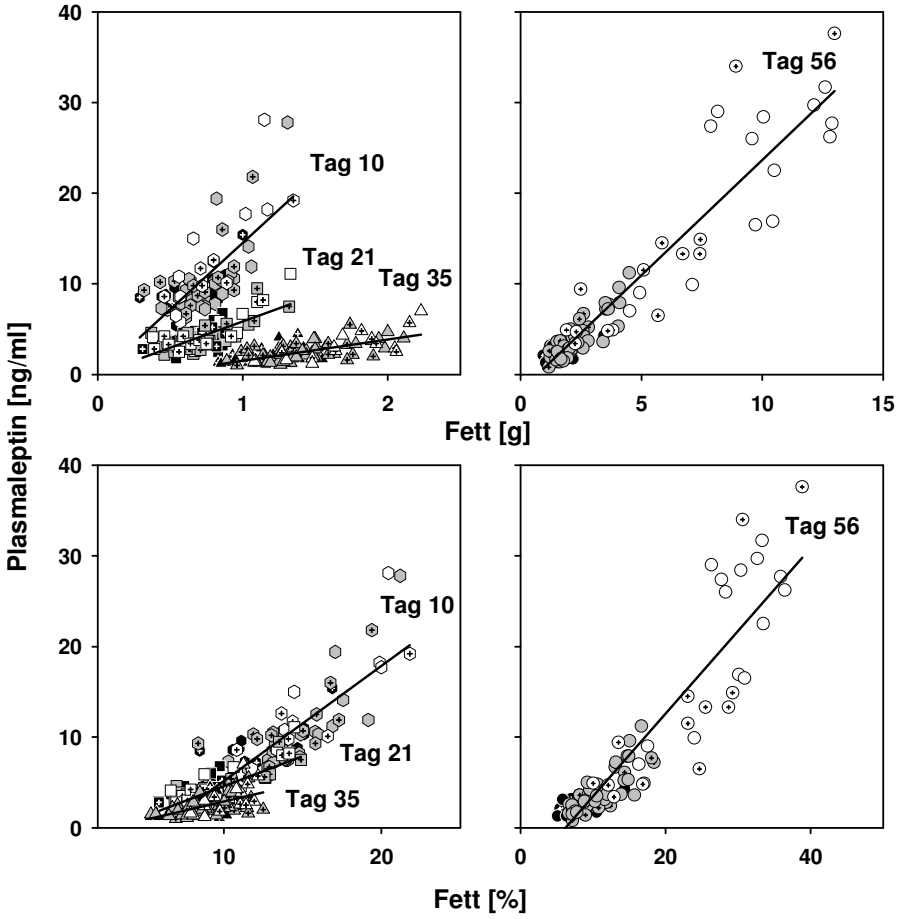



***Abb. 12:*** *Plasmaleptinkonzentration [ng/ml] verschiedener Altersstufen in Abhängigkeit von der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt. 10 Tage alte Tiere (Sechseck), 21 Tage alte Tiere (Quadrat), 35 Tage alte Tiere (Dreieck) und 56 Tage alte Tiere (Kreis). Genotypen der MC4R-defizienten Mäuse sind folgendermaßen unterschieden: Wildtypen (schwarz), heterozygote (grau) und homozygote (weiß) MC4R-defiziente Mäuse. Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet.*

und +/+ Tiere haben, so entspricht dies ihrem höheren Körperfettanteil. Eine Untersuchung berichtet, dass bei Wildtypmäusen die Steilheit der Korrelation des Plasmaleptins mit der Körperfettmasse von Tag 10 bis zum Tag 56 stetig abnimmt (Kellendonk *et al.* 2002). Dass in der vorliegenden Untersuchung die Korrelation der 56 Tage alten Tiere steiler als die der 21 und 35 Tage alten Tiere ist, ist auf die vermehrte Fetteinlagerung der Mäuse auf Grund der MC4R-Defizienz zurückzuführen. Multiple Regressionsanalyse zeigte bei 56 Tage alten Tieren, $R^2 = 0{,}86$, dass 85 % der Variabilität der logarithmierten Plasmaleptinwerte auf den Einfluss des Körperfettgehaltes ($P<0{,}001$) und nur 1% ($P<0{,}01$) auf vom Körperfettgehalt unabhängige Genotypeinflüsse zurückzuführen sind. Bei jüngeren Tieren ist der Körperfettgehalt die einzige Größe, die den Plasmaleptinspiegel signifikant beeinflusst.

### 3.1.3 SAUERSTOFF UND FUTTERMESSUNG VON TAG 21-35 BEI MC4R-DEFIZIENTEN MÄUSEN BEI STANDARDERNÄHRUNG UND 22°C

Der Sauerstoffverbrauch und die Futteraufnahme wurde bei 4 Würfen (N=26) vom Tag 21-35 gemessen. Ab dem 21. Lebenstag wurden die Tiere einzeln bei 22°C gehalten und erhielten pelletiertes Standardfutter. Exemplarisch sind die Futteraufnahme und die metabolische Rate eines Wurfes dargestellt (Abb. 13). Man sieht, dass die Futteraufnahme individuell variiert. Dabei liegt die der -/- Tiere im oberen Bereich, die der +/- Tiere im mittleren und die der +/+ Tiere im unteren Bereich. Die gleichen Verhältnisse zeigen sich für die metabolische Rate: auch hier liegen die -/- Tiere über den +/- und +/+ Tieren. Die -/- Tiere verbrauchen mehr Sauerstoff als die Heterozygoten und Wildtypen, sie haben also keinen reduzierten Stoffwechsel.

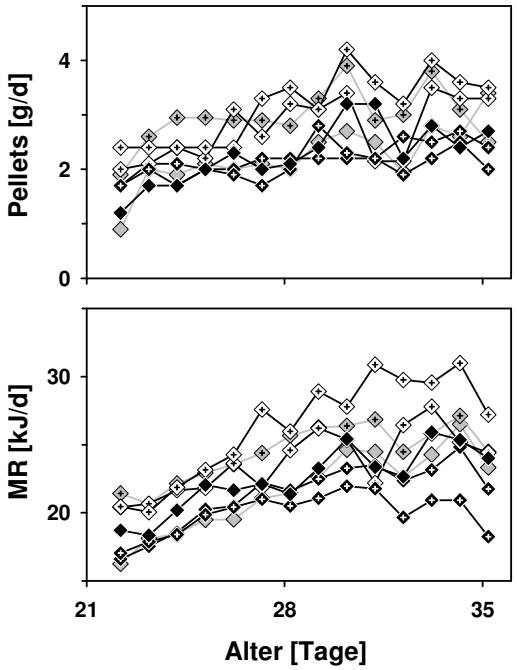



***Abb. 13:*** *Tägliche Futteraufnahme und kontinuierlich gemessene metabolische Rate von Tag 21-35. Gezeigt sind 7 Wurfgeschwister, Wildtypen (schwarz), heterozygote (grau) und homozygote (weiß) MC4R-defiziente Mäuse. Weibchen sind mit einem Kreuz im Symbol markiert.*

Um eine Energiebilanz erstellen zu können, wurde mit Hilfe der in 3.1.1. ausgewerteten Daten der 21 Tage alten Tiere die Feuchtmasse der untersuchten Mäuse bestimmt, indem die Korrelation (Geradengleichung) zwischen Körpergewicht und Feuchtmasse zu Grunde gelegt wurde (Abb. 14). Da auch die FFDM und die Körperfettmasse am Tag 21 eng mit der Feuchtmasse korreliert sind, konnten so die FFDM und die Körperfettmasse der Absetzlinge mit Hilfe der Korrelationen (Geradengleichungen) bei den lebenden Tieren mit guter Genauigkeit geschätzt werden. Die Körperzusammensetzung am Tag 35 wurde nach dem

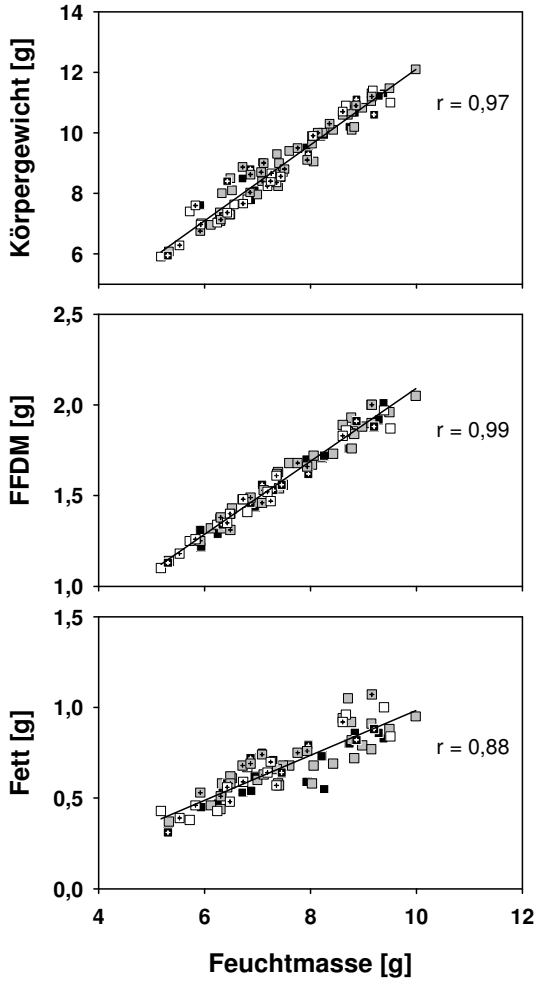



***Abb. 14:*** *Korrelation zwischen dem Körpergewicht, der FFDM, der Körperfettmasse und der Feuchtmasse von 21 Tage alten Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz im Symbol markiert. Die Regression wurde für Männchen und Weibchen gemeinsam berechnet.*

Töten der Tiere direkt bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf/Geschlecht und Genotyp. Abhängige Variablen waren die Differenzen zwischen Tag 21 und 35 von Körpergewicht, FFDM und Körperfettmasse, außerdem die kumulative Futteraufnahme, der kumulative Sauerstoffverbrauch und der Energiezuwachs (Einlagerung von Fett und fettfreier Trockenmasse) (Abb. 15). Die statistische Auswertung der Differenz des Körpergewichts zeigt einen signifikanten Unterschied ($P < 0,05$) zwischen +/+ und -/- Tieren. Bei der Differenz der FFDM sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden, die Betrachtung der Differenz der Körperfettmasse ergibt einen signifikanten Unterschied zwischen +/+ und +/- Tieren ($P < 0,05$), ebenso zwischen +/- und -/- Tieren ($P < 0,001$) und zwischen +/+ und -/- Tieren ($P < 0,001$). Bei der kumulativen Futteraufnahme unterscheiden sich +/+ und -/- Tiere ($P < 0,01$). Auch der kumulative Sauerstoffverbrauch zeigt diesen Unterschied, aber auf einem niedrigeren

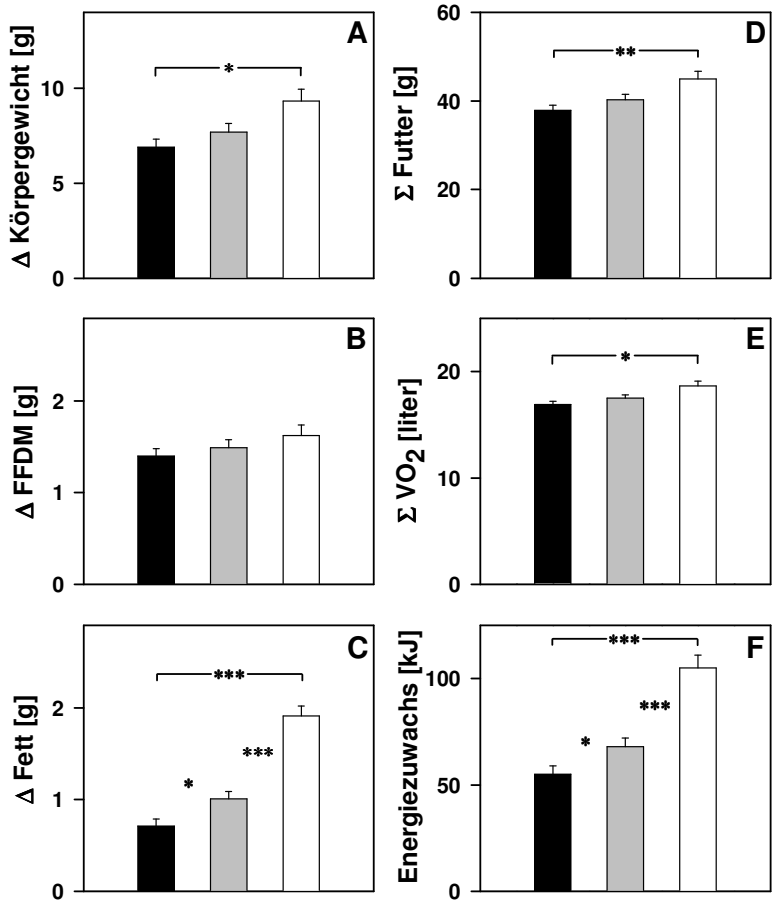



***Abb. 15:*** *Durch eine 2 faktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf/Geschlecht und Genotyp ermittelte kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Dargestellt ist die Differenz des Körpergewichts (A), der FFDM (B) und der Körperfettmasse (C) in g zwischen Tag 21 und 35; außerdem die kumulative Futteraufnahme (D), der kumulative Sauerstoffverbrauch (E) und der Energiezuwachs, d.h. der Anstieg der im Körper gespeicherten Energie durch die in der Zeit zwischen Tag 21 und 35 eingelagerte FFDM und das eingelagerte Fett (F).*

Signifikanzniveau. Obwohl weder signifikante Unterschiede in der Futteraufnahme noch im Sauerstoffverbrauch zwischen +/+ und +/- Tieren zu beobachten sind, sind schließlich beim Energiezuwachs zwischen allen Genotypen signifikante Unterschiede zu beobachten. Zwischen Wildtypen und Heterozygoten ($P < 0,05$), zwischen Heterozygoten und Homozygoten ($P < 0,001$) und zwischen Wildtypen und Homozygoten ($P < 0,001$). Die kalkulierte Nettoenergieaufnahme ist in Tabelle 4 dargestellt. -/- Tiere haben gegenüber den +/+ Tieren eine um 86 kJ (22%) höhere Energieaufnahme, aber eine nur um 36 kJ (10,5 %) höhere metabolische Rate. +/- Tiere haben im Unterschied zu den Wildtypen eine um 25 kJ (6,3 %) höhere Energieaufnahme und eine nur um 12 kJ (3,5 %) gesteigerte metabolische Rate. Obwohl der Unterschied in der Futteraufnahme und der metabolischen Rate für +/+ und +/- Tiere keine Signifikanz ergibt, kann diese Kalkulation der Differenz in der

Nettoenergieaufnahme den signifikanten Unterschied im Energiezuwachs erklären. Die Genotypabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs entspricht in ihrer Tendenz der Genotypabhängigkeit der FFDM. In gleichem Maß wie die FFDM der Tiere – also der Anteil der Körperzusammensetzung, der hauptsächlich für die Stoffwechselaktivität verantwortlich ist – ansteigt, steigt auch der Sauerstoffverbrauch der Tiere an. Die Ratio Sauerstoffverbrauch [Liter]/ΔFFDM [g] bleibt bei den drei Genotypen annähernd gleich. Für die +/+ Tiere beträgt sie 13,1 ± 1,2, für die +/- Tiere 11,9 ± 0,7 und für die -/- Tiere 11,7 ± 0,9. Der t-Test Vergleich der Ratios ergibt keinen signifikanten Unterschied für die drei Genotypen. Die Tiere steigern zwar nicht in gleichem Maß die metabolische Rate, wie sie die Futteraufnahme steigern, jedoch gibt es auch keinen Hinweis auf eine durch den Gendefekt bewirkte Senkung der metabolischen Rate. Deshalb ist die sich entwickelnde Adipositas auf Hyperphagie und nicht auf einen Hypometabolismus zurückzuführen.

| | Σ d21-35 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ΣFutter [kJ] | | ΣMR [kJ] | | Energie-zuwachs [kJ] | | Σ Netto Energie-aufnahme [kJ] |
| | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM | |
| | ** | | * | | *** | | |
| **+/+** | 492[a] | 15 | 344[a] | 6 | 55[a] | 4 | 399 |
| **+/-** | 523[a/b] | 16 | 356[a] | 6 | 68[b] | 4 | 424 |
| **-/-** | 585[b] | 22 | 380[b] | 9 | 105[c] | 6 | 485 |

***Tabelle 4:*** *Kumulative Futteraufnahme, metabolische Rate, Energiezuwachs und Nettoenergieaufnahme von Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen mit Standardfutter bei 22°C über den Versuchszeitraum von Tag 21-35. Werte mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich mit einer Signifikanz von P<0,05 voneinander (Post-hoc Test).*

## 3.2 Untersuchungen an 35 und 56 Tage alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen bei hochkalorischer Zusatzfütterung und 34°C Umgebungstemperatur

### 3.2.1 Tiere im Alter von 35 Tagen und die Auswirkungen von Geschlecht und Genotyp auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung

#### 3.2.1.1 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Für die Beziehung zwischen der Feuchtmasse und dem Körpergewicht 35 Tage alter Wildtypen und MC4R-defizienter Mäuse, die hochkalorische Zusatznahrung erhielten und bei 34 °C gehalten wurden, liegt eine enge lineare Korrelation vor (Abb. 16). Männchen und

Weibchen liegen auf einer gemeinsamen Regressionsgeraden. Bei der Beziehung zwischen der Feuchtmasse und der FFDM ist eine Geschlechtsabhängigkeit zu erkennen: männliche Tiere haben bei gleicher Feuchtmasse eine höhere FFDM als weibliche. Sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen ist die Korrelation signifikant (P<0,001). Die Regressionsgeraden der Männchen und Weibchen sind signifikant voneinander verschieden (P<0,001). Die Korrelation zwischen der Feuchtmasse und der Körperfettmasse ist lockerer. Auch hier ist eine Abhängigkeit vom Geschlecht der Tiere ersichtlich. Weibchen haben eine höhere Fettmasse als Männchen; bei den Männchen ist die Korrelation enger. Beide Korrelationen sind signifikant (Männchen P=0,008, Weibchen P<0,001). Wiederum sind die Regressionsgeraden der beiden Geschlechter signifikant voneinander verschieden (P<0,001). Bei der Darstellung der Beziehung zwischen der Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt tritt eine sehr große Streuung der Werte auf. Hier liegt keine lineare Korrelation vor.

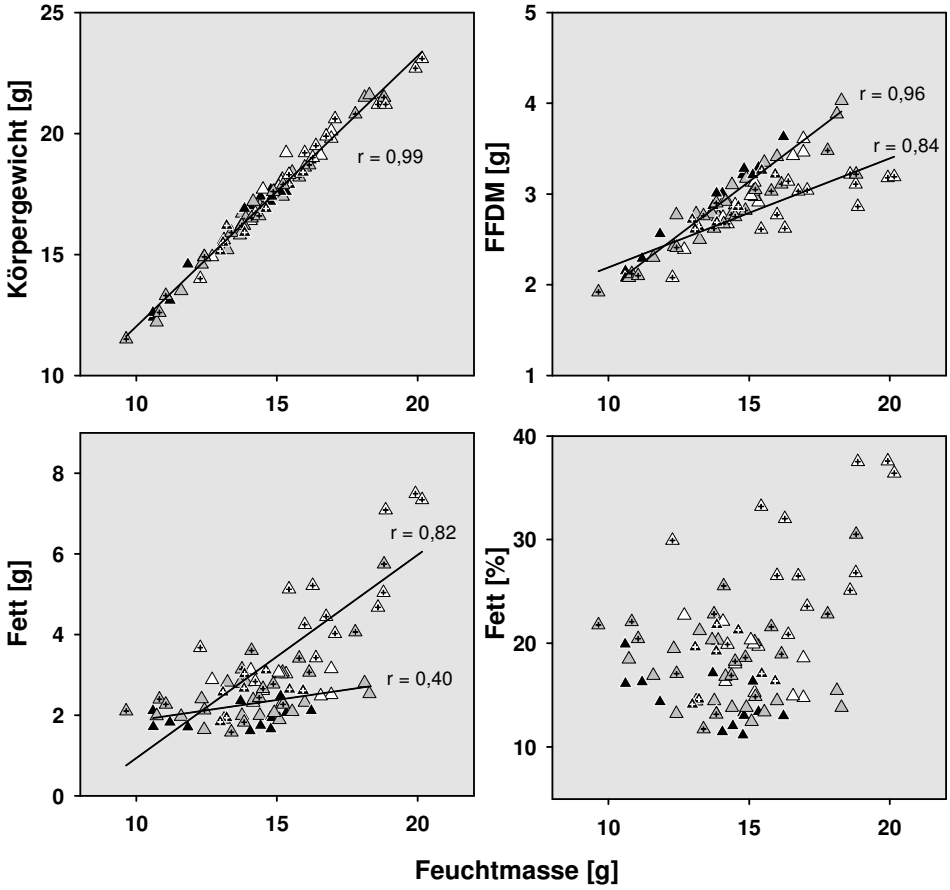



***Abb. 16:*** *Korrelationen des Körpergewichts, der FFDM, der Fettmasse und des Körperfettgehalts mit der Feuchtmasse von Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen. Die Tiere waren 35 Tage alt (Dreieck), erhielten hochkalorisches Zusatzfutter und wurden unter thermoneutralen Bedingungen (grauer Hintergrund) gehalten. Die Genotypen sind folgendermaßen unterschieden: Wildtypen (schwarz), Heterozygote (grau) und Homozygote (weiß). Weibchen sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Bei der Beziehung zwischen dem Körperfettgehalt und der Feuchtmasse liegt keine lineare Abhängigkeit vor.*

### 3.2.1.2 Statistische Auswertung unter zusätzlicher Berücksichtigung des Wurffaktors

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Einflussgrößen Wurf, Geschlecht und Genotyp für die 35 Tage alten Mäuse mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen dargestellt. Für alle Parameter ist ein Einfluss des Wurffaktors festzustellen. Außer beim Körpergewicht und bei dem Vergleich der Körperfettmasse der +/+ Tiere und ihrer +/- Geschwister ist sonst durchgängig ein Einfluss des Geschlechts vorhanden. Auch ein Genotypeinfluss ist bei fast allen untersuchten Größen nachweisbar. Lediglich bei der Analyse der FFDM ist für die +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister kein Genotypeinfluss festzustellen. Geschlecht/Genotypinteraktionen treten bei der Untersuchung der Köperfettmasse und des Körperfettgehalts der -/- Tiere und ihrer +/- Geschwister auf.

| **Körpergewicht [g]** | **+/+ vs +/-** | **+/- vs -/-** |
|---|---|---|
| Wurf | *** | *** |
| Geschlecht | ns | ns |
| Gen | ** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | + |

| **FFDM [g]** | **+/+ vs +/-** | **+/- vs -/-** |
|---|---|---|
| Wurf | *** | *** |
| Geschlecht | * | *** |
| Gen | ns | * |
| Geschlecht x Gen | ns | ns |

| **Fettmasse [g]** | **+/+ vs +/-** | **+/- vs -/-** |
|---|---|---|
| Wurf | ** | *** |
| Geschlecht | ns | *** |
| Gen | *** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | *** |

| **Fettgehalt [%]** | **+/+ vs +/-** | **+/- vs -/-** |
|---|---|---|
| Wurf | * | *** |
| Geschlecht | * | *** |
| Gen | ** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | ** |

***Tabelle 5:*** *Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp der 35 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. Für +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennte Statistiken gerechnet. +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Abbildung 17 zeigt die errechneten Mittelwerte (±SEM) für die verschiedenen Genotypen (linke Seite). Die Werte aller untersuchten Größen steigen von +/+ über +/- bis hin zu den -/- Tieren an. Der Unterschied zwischen den -/- Tieren und ihren +/- Geschwistern ist besonders deutlich.

Betrachtet man nun die Mittelwerte für Männchen und Weibchen getrennt (rechte Seite), ist zu erkennen, dass der geschlechtsabhängige Unterschied in der FFDM kaum erkennbar ist. Die geschlechtsbedingten Unterschiede in der Körperfettmasse und dem Köperfettgehalt treten bei den Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter aber ganz deutlich zu Tage. Weibchen haben eine weit höhere Fettmasse und einen entsprechend höheren Körperfettgehalt als Männchen. Die auf der rechten Seite angegebenen Signifikanzen wurden durch t-Test Vergleiche unter Berücksichtigung der Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche ermittelt.

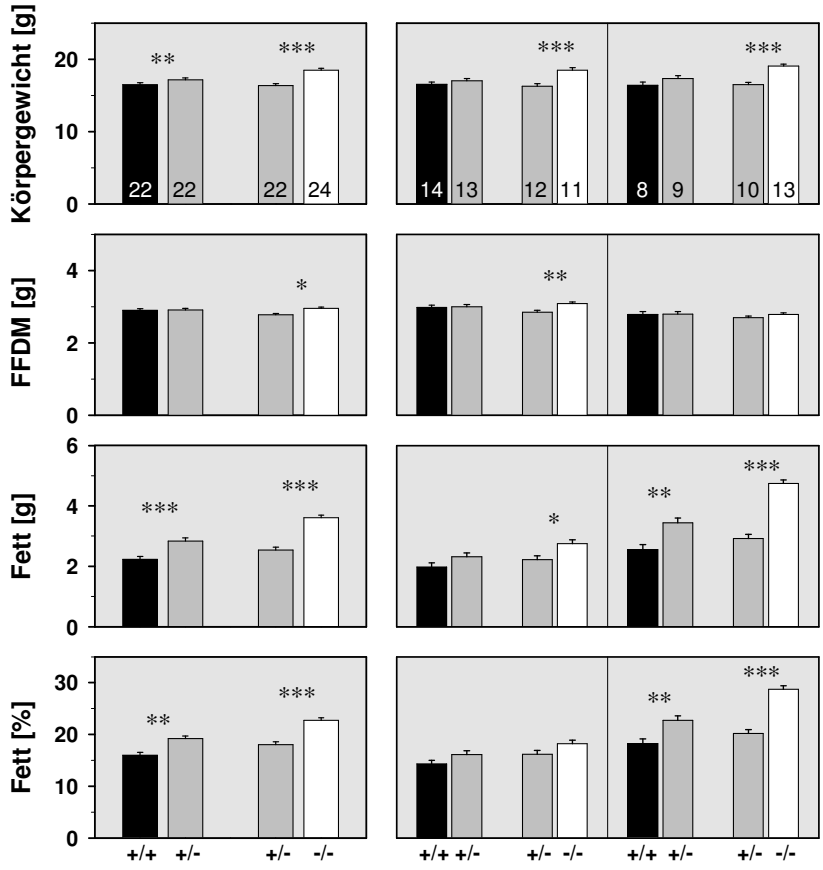



***Abb. 17:*** *Kleinste Quadratemittelwerte (±SEM) des Körpergewichts, der FFDM, der Körperfettmasse und des Körperfettgehalts von 35 Tage alten Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Die +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und die -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennt statistisch mittels einer 3-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp ausgewertet. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen die Mittelwerte für die verschiedenen Genotypen. Auf der rechten Seite sind die Mittelwerte zuerst für Männchen und daneben für Weibchen gesondert dargestellt Die angegebenen Signifikanzen wurden hier durch einen t-Test Vergleich der Mittelwerte errechnet, wobei außerdem die Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche berücksichtigt wurde. Die Sterne geben das Signifikanzniveau an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

### 3.2.2 PLASMALEPTINGEHALT DER 35 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

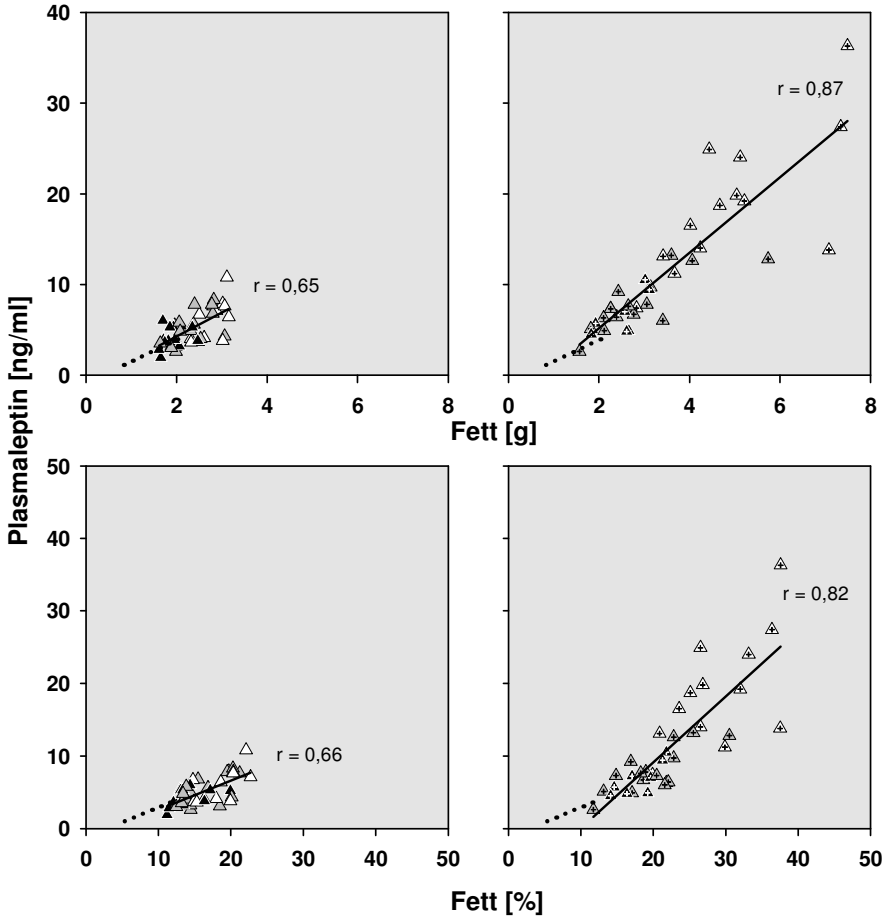



***Abb. 18:*** *Plasmaleptinkonzentration [ng/ml] von 35 Tage alten männlichen (links) und weiblichen (rechts) Mäusen in Abhängigkeit von der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt. Genotypen sind folgendermaßen unterschieden: Wildtypen (schwarz), Heterozygote (grau) und Homozygote (weiß). Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Die Tiere erhielten hochkalorisches Zusatzfutter und wurden bei 34°C gehalten. Zusätzlich ist die Regression der 35 Tage alten Tiere mit Standardfutter bei 22°C (gepunktet) in die Abbildung aufgenommen.*

Bei Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen ist, bedingt durch den unterschiedlichen Fettgehalt der Männchen und Weibchen, ein deutlicher Unterschied zwischen den Plasmaleptinwerten von Männchen und Weibchen festzustellen. Daher sind in Abb. 18 getrennt die Männchen links und die Weibchen rechts dargestellt. Zum Vergleich ist zusätzlich die Regression der 35 Tage alten normal ernährten Tiere bei 22°C angegeben, bei der keine Geschlechtsabhängigkeit des Plasmaleptingehalts festgestellt werden konnte. Die männlichen Tiere liegen auf der Verlängerung der Regression der normal ernährten Tiere. Eine Genotypabhängigkeit des Plasmaleptins ist bei den Männchen nicht ersichtlich. Die Regressionsgerade der weiblichen Tiere verläuft steiler und die Werte haben,

je höher die Körperfettmasse bzw. der Körperfettgehalt ist, eine desto größere Streuung, wobei die +/+ und +/- Tiere im unteren Bereich und die -/- Tiere im oberen Bereich der Geraden liegen. Für die Beziehung zwischen Fettmasse und Plasmaleptingehalt unterscheiden sich die Regressionsgeraden der weiblichen und männlichen Tiere nicht signifikant voneinander. Jedoch sind die Regressionsgeraden der Männchen und Weibchen für Fettgehalt und Plasmaleptin signifikant verschieden (P<0,01). Die multiple Regressionsanalyse der Beziehung zwischen Fettmasse und Plasmaleptin ergab, dass die Plasmaleptinwerte in Abhängigkeit von der Fettmasse zu 78 % durch das Fett, zu nur einem Prozent durch das Geschlecht, jedoch nicht durch den Genotyp beeinflusst sind. Auch wenn man eine multiple Regressionsanalyse getrennt für Männchen und Weibchen durchführt, ergibt sich, dass nur ein signifikanter Einfluss des Fettes und kein Genotypeinfluss auf die Plasmaleptinwerte vorliegt. Bei den Weibchen, nicht jedoch bei den Männchen, wird für den Einfluss des Genotyps auf den Plasmaleptingehalt fast das Signifikanzniveau erreicht (P=0,07).

### 3.2.3 FUTTERAUFNAHME DER 35 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

Die statistische Betrachtung der kumulativen Futteraufnahme über den Versuchszeitraum von 2 Wochen mittels einer 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp ergab die in Tabelle 6 zusammengestellten Ergebnisse. Nur bei der Schokoladenaufnahme ist kein signifikanter Wurfeinfluss zu beobachten. Das Geschlecht wirkt sich signifikant sowohl auf die Pelletaufnahme als auch auf die Schokoladenaufnahme aus. Für alle untersuchten Größen ist durchgängig ein Genotypeinfluss zu beobachten. Bei der Gesamtfutteraufnahme und bei der Schokoladenaufnahme ist eine signifikante Geschlecht/Genotyp-Interaktion zu beobachten. Auch bei der Pelletaufnahme ist eine beinahe signifikante (P=0,052) Geschlecht/Genotyp-Interaktion feststellbar.

| | Futter ges [kJ] | Pellets [kJ] | Schokolade [kJ] |
|---|---|---|---|
| Wurf | ** | * | + |
| Geschlecht | ns | ** | * |
| Gen | ** | * | * |
| Geschlecht x Gen | * | + | ** |

***Tabelle 6:*** *Kumulative Futteraufnahme: Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp der 35 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen. +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

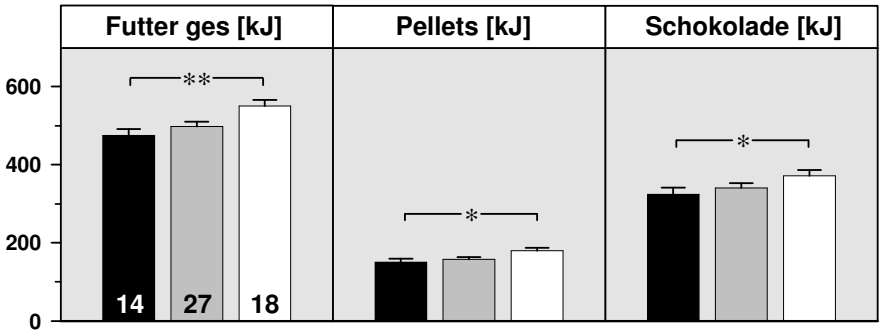



***Abb. 19:*** *Durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnete Futtermittelwerte (±SEM) von 35 Tage alten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme über den Versuchszeitraum (Tag 21-35) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Die Sterne geben die Signifikanz an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

In Abbildung 19 sind die Mittelwerte (±SEM) für die kumulative Gesamtfutteraufnahme, die kumulative Pelletaufnahme und die kumulative Schokoladenaufnahme in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt. Hier ist eine Zunahme der Futteraufnahme in Abhängigkeit vom Genotyp zu beobachten. +/+ Tiere nehmen weniger Energie als +/- Tiere und +/- Tiere weniger Energie als -/- Tiere auf, was auf die Gesamtfutteraufnahme, die Pelletaufnahme und die Schokoladenaufnahme zutrifft. Die Darstellung der errechneten Mittelwerte (±SEM) für Männchen und Weibchen (Abb. 20) zeigt, dass bei der Gesamtfutteraufnahme kein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen besteht. Jedoch ist bei der Pellet- und Schokoladenaufnahme ein Geschlechtsunterschied zu beobachten. Männliche Tiere nehmen mehr Pellets als weibliche Tiere auf, und bei der Schokoladenaufnahme finden

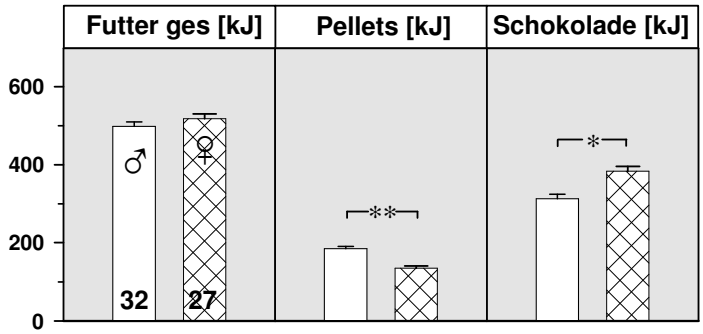



***Abb. 20:****. Durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnete Futtermittelwerte (±SEM) von 35 Tage alten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme über den Versuchszeitraum (Tag 21-35) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade von Männchen (weiß) und Weibchen (kariert). Die Sterne geben die Signifikanz an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

wir umgekehrte Verhältnisse. Weibchen fressen mehr Schokolade als Männchen. Der Anteil der Nahrung, den die Männchen in Form von Pellets zu sich nehmen, beträgt 37,2%, der Schokoladenanteil 62,8%. Bei den Weibchen sind 26% der aufgenommenen Nahrung Pellets und 74% Schokolade.

Betrachtet man die Mittelwerte für die Geschlecht/Genotyp-Interaktion (Abb. 21) dann ist zu erkennen, wie sich sowohl der Einfluss des Genotyps als auch der Einfluss des Geschlechts auf die Futteraufnahme auswirken. Beim t-Test Vergleich der Mittelwerte mit anschließender Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche erhält man signifikante Unterschiede zwischen +/- und -/- Weibchen für die Gesamtfutteraufnahme und die Schokoladenaufnahme. Zwischen +/+ und +/- Weibchen ist kein Unterschied feststellbar. Bei den kumulativen Futtermittelwerten der Männchen sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

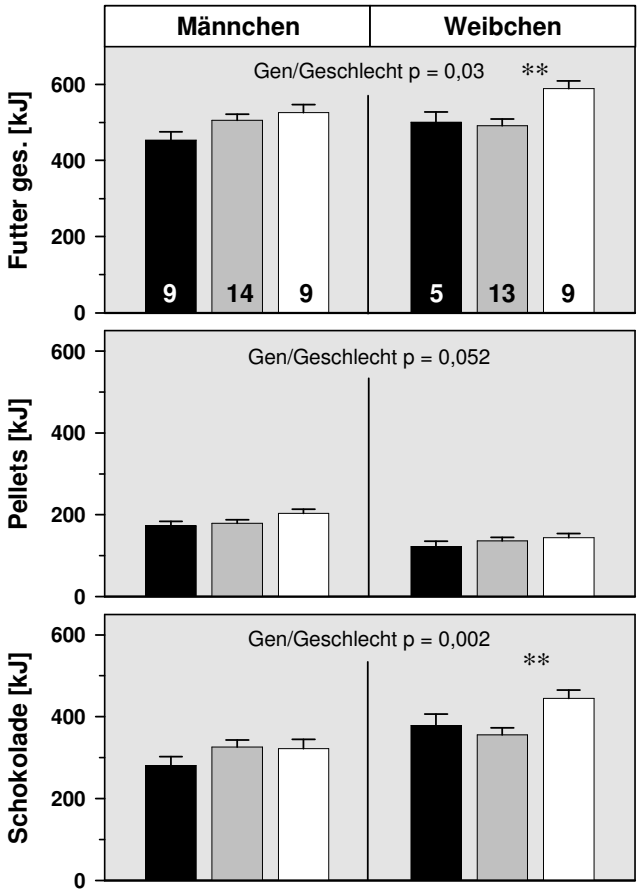



***Abb. 21:*** *Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen über den Versuchszeitraum (Tag 21-35) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade. Die Mittelwerte (±SEM) wurden durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnet. Die P-Werte der Gen/Geschlecht Interaktionen sind vermerkt. Die angegebenen Signifikanzen wurden durch einen t-Test Vergleich der Mittelwerte errechnet, wobei außerdem die Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche berücksichtigt wurde.*

Interessant ist auch ein Vergleich der Gesamtfutteraufnahme von Tieren unter Standardbedingungen mit den Tieren, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und thermoneutral gehalten wurden (Abb. 22). Die Standardtiere haben eine etwas höhere Gesamtfutteraufnahme als die Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter. Hier spielt sicherlich eine Rolle, dass die eine Versuchsgruppe nicht nur hochkalorisches Zusatzfutter erhielt, sondern zusätzlich noch unter thermoneutralen Bedingungen gehalten wurde. Bei thermoneutraler Haltung wird keine Energie zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur benötigt, und außerdem sind die Tiere auf Grund der hohen Umgebungstemperatur auch träger und bewegen sich weniger.

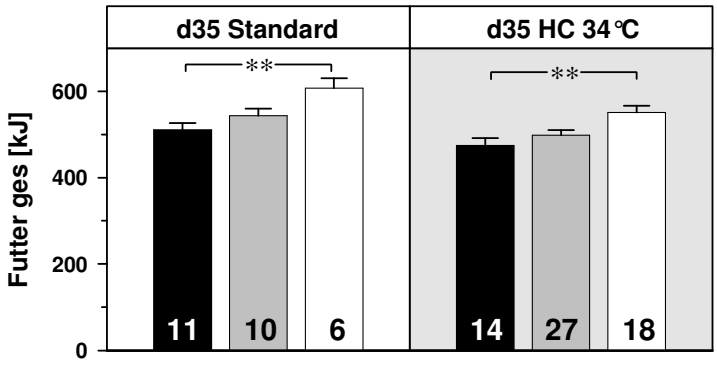



***Abb. 22:*** *Kumulative Gesamtfutteraufnahme in kJ über den Versuchszeitraum (Tag 21-25) von Mäusen mit Standardfutter bei 22°C (links) und von Mäusen mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (rechts). Dargestellt sind durch eine 3-faktorielle ANOVA errechnete Mittelwerte (±SEM) von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Die Sterne geben die Signifikanz an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

### 3.2.4 VERGLEICH DES KÖRPERGEWICHTS UND DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG VON 35 TAGE ALTEN TIEREN MIT STANDARDFUTTER BEI 22°C UND TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

Um die Tiere unter Standardbedingungen bei 22°C und die Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C miteinander zu vergleichen, wurde eine 3-faktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Haltungsbedingungen (Futter, Haltungstemperatur), Geschlecht und Genotyp durchgeführt. Außerdem wurden die drei verschiedenen Genotypen zusammen betrachtet. Der Wurfeinfluss wurde hierbei nicht berücksichtigt, weil die Anzahl der Würfe relativ groß war. Die erhaltenen Mittelwerte unterscheiden sich nur geringfügig von den Mittelwerten, die mittels 3-faktorieller Varianzanalyse unter Berücksichtigung des Wurffaktors errechnet wurden (siehe Kapitel 3.1.1.4 und 3.2.1.2). Tabelle 7 zeigt die

Ergebnisse der Varianzanalyse und in Abbildung 23 sind die errechneten Mittelwerte (±SEM) dargestellt. Bei allen untersuchten Größen ist ein Einfluss der Haltungsbedingungen feststellbar. Tiere mit hochkalorischer Zusatznahrung bei 34°C weisen ein niedrigeres Körpergewicht und eine um ca. 20% niedrigere FFDM als Tiere unter Standardbedingungen

| | Körperge-wicht [g] | FFDM [g] | Fett [g] | Fett [%] |
|---|---|---|---|---|
| Haltungsbedingungen | *** | *** | *** | *** |
| Geschlecht | *** | *** | *** | *** |
| Gen | *** | ns | *** | *** |
| Haltung x Geschlecht | *** | *** | *** | *** |
| Haltung x Gen | + | ns | *** | *** |
| Geschlecht x Gen | ** | ns | *** | ** |
| Haltung x Geschlecht x Gen | ns | ns | ** | * |

***Tabelle 7:*** *Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse der 35 Tage alten Tiere unter Standardbedingungen und der 35 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. Einfluss der Faktoren Haltung, Geschlecht und Genotyp auf das Körpergewicht, die FFDM, die Fettmasse und den Körperfettgehalt. +: P < 0,1; *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

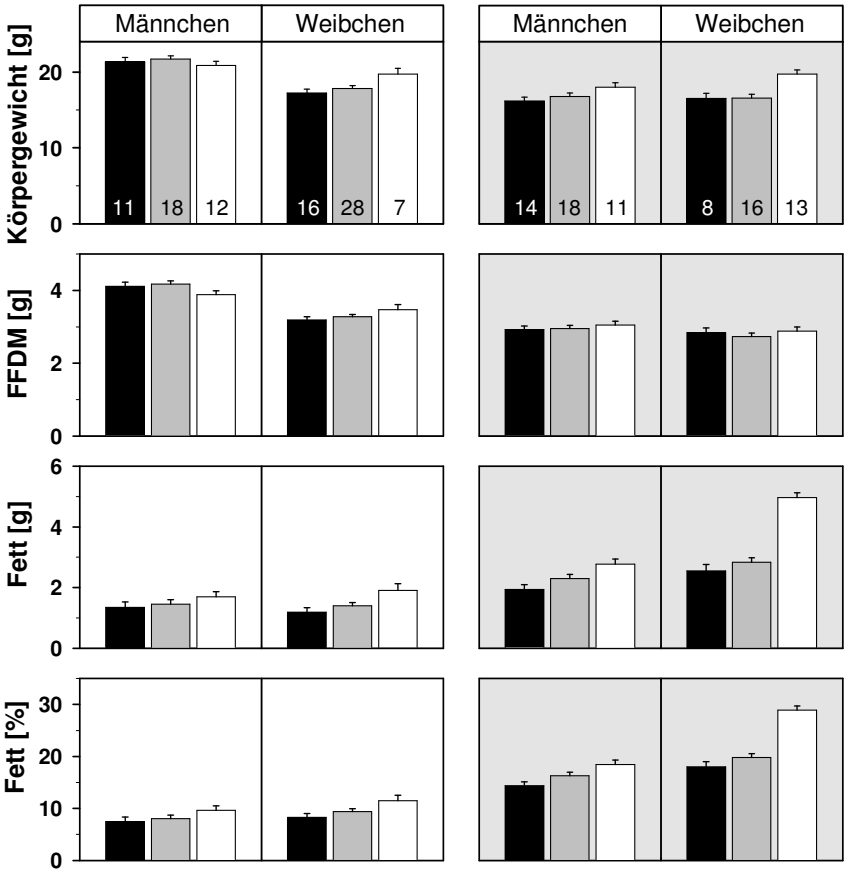



***Abb. 23:*** *Dargestellt sind die durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Haltung, Geschlecht und Genotyp errechneten Mittelwerte (±SEM) für Körpergewicht, FFDM, Fettmasse und Körperfettgehalt für Männchen und Weibchen. Wildtypen (schwarz), heterozygote (grau) und homozygote (weiß) MC4R-defiziente Mäuse. Die linke Seite zeigt 35 Tage alte Tiere mit Standardfutter bei 22°C und die rechte Seite 35 Tage alte Tiere, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden.*

auf. Ihre Körperfettmasse ist aber stark erhöht und ihr Körperfettgehalt ist außer bei den -/- Weibchen doppelt so hoch wie der der Standardtiere. Der Körperfettgehalt der -/- Weibchen ist um sogar 150% erhöht. Weiterhin ist auch der Einfluss des Geschlechts durchgängig feststellbar. Außer bei der Körperfettmasse ist bei den Standardtieren ein Geschlechtseinfluss vorhanden (siehe Tabelle 3). Bei den Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C ist nur beim Körpergewicht kein Geschlechtseinfluss nachweisbar (siehe Tabelle 5). Schießlich ist bei der gemeinsamen Betrachtung der beiden Gruppen bei allen untersuchten Größen außer bei der FFDM ein Genotypeinfluss nachweisbar. Bei den hochkalorisch ernährten 35 Tage alten Tieren sind für das Körpergewicht, die Fettmasse und den Körperfettgehalt signifikante Genotypunterschiede sowohl zwischen +/+ und +/- als auch zwischen +/- und -/- Tieren nachweisbar (siehe Tabelle 5). Bei den Tieren unter Standardbedingungen tritt in diesem Alter lediglich ein signifikanter Genotypunterschied zwischen +/- und -/- Tieren auf (siehe Tabelle 3). Die Fettmasse und der Fettgehalt steigen bei beiden Gruppen von +/+ über +/- bis hin zu den -/- Tieren an, wobei die Weibchen höhere Werte als die Männchen erreichen und die hohen Fettwerte der homozygoten MC4R-defizienten Weibchen besonders herausragen.

### 3.2.5 KÖRPERGEWICHTSVERLÄUFE VON 56 TAGE ALTEN TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

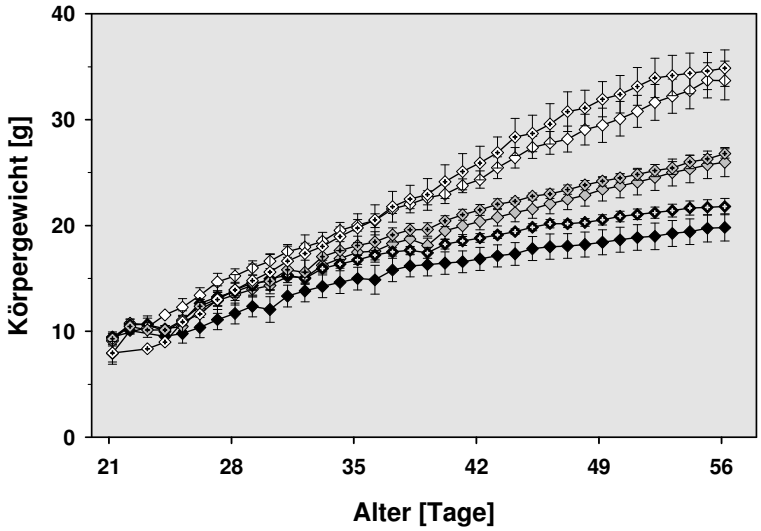



***Abb. 24:*** *Körpergewichtsverlauf von Tag 21- 56. Dargestellt sind Mittelwerte (±SEM) von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet.*

Die Körpergewichtsverläufe von Männchen und Weibchen, sowohl von Wildtypen als auch von MC4R-defizienten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C

gehalten wurden, sind in Abbildung 24 dargestellt. Für alle drei Genotypen steigt das Körpergewicht beginnend am Tag 21 (Absetztag) bis zum Tag 56 stetig an. Der Abstand zwischen den Genotypen vergrößert sich, wobei der Abstand zwischen +/+ und +/- Tieren kleiner als der Abstand zwischen +/- und -/- Tieren ist. Bei allen drei Genotypen liegt das Körpergewicht der Weibchen leicht über dem der Männchen.

### 3.2.6 TIERE IM ALTER VON 56 TAGEN UND DIE AUSWIRKUNGEN VON GESCHLECHT UND GENOTYP AUF DAS KÖRPERGEWICHT UND DIE KÖRPERZUSAMMENSETZUNG

#### 3.2.6.1 Köpergewicht und Körperzusammensetzung

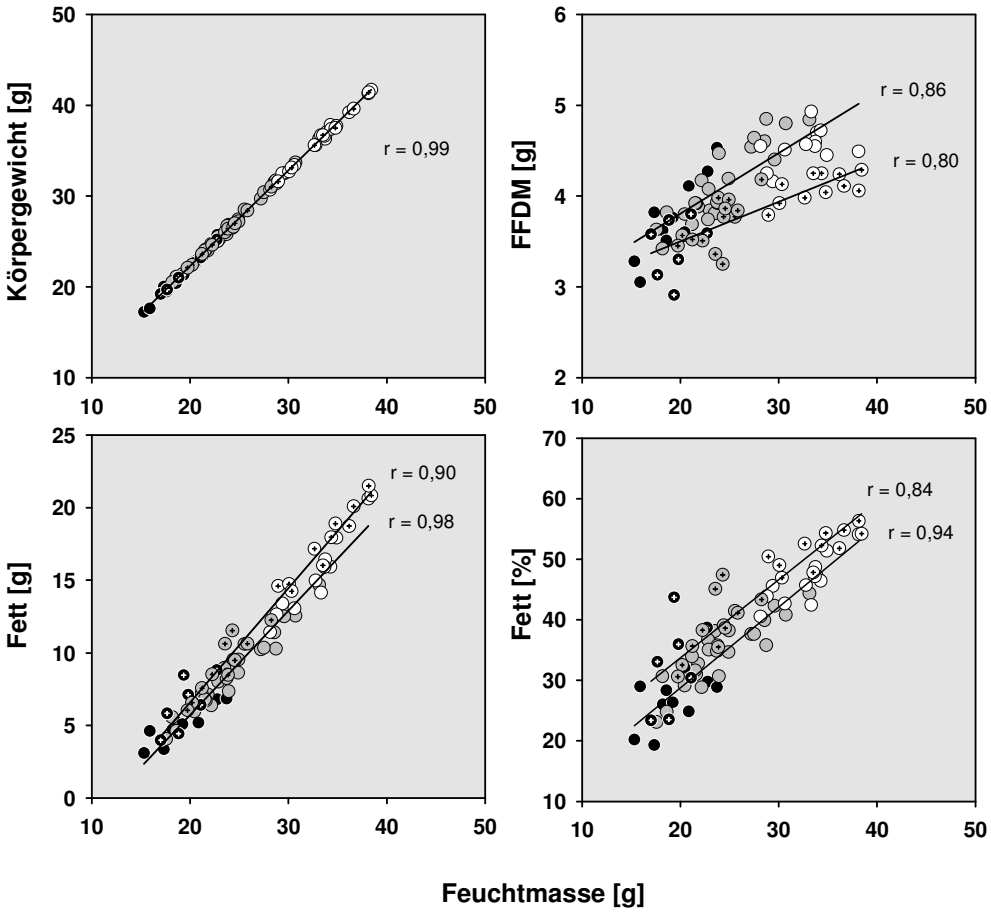



***Abb. 25:*** *Korrelationen des Körpergewichts, der FFDM, der Fettmasse und des Körperfettgehalts mit der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Die Tiere waren 56 Tage alt (Kreis), erhielten hochkalorisches Zusatzfutter und wurden unter thermoneutralen Bedingungen gehalten. Weibchen sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Beim Körpergewicht liegen Männchen und Weibchen auf einer Regressionsgeraden. Für die FFDM, die Fettmasse und den Körperfettgehalt wurden getrennte Regressionen für Männchen und Weibchen ermittelt.*

Bei den 56 Tage alten Tieren, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und unter thermoneutralen Bedingungen gehalten wurden (Abb. 25), findet man eine sehr enge lineare Korrelation zwischen der Feuchtmasse und dem Körpergewicht, wobei die Wildtypen den unteren Bereich und die Homozygoten den oberen Bereich einnehmen und Geschlechtsunterschiede nicht erkennbar sind. Männchen und Weibchen liegen auf einer Regressionsgeraden. Die FFDM ist gut mit der Feuchtmasse korreliert, aber hier zeigt sich zusätzlich zur genotypabhängigen Verteilung ein deutlicher Geschlechtsunterschied. Die männlichen Tiere haben eine höhere FFDM als die weiblichen Tiere und liegen auf einer Regressionsgeraden, die sich hochsignifikant von der der Weibchen unterscheidet. Zwischen der Feuchtmasse und der Fettmasse ist die Korrelation wieder sehr eng, doch weisen die Weibchen eine etwas höhere Fettmasse auf als die Männchen, und bei getrennter Regression ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Weibchen und Männchen. Ähnliche Verhältnisse findet man für die Beziehung zwischen der Feuchtmasse und dem Körperfettgehalt. Hier ist die Streuung der Werte aber etwas größer und die Regressionsgerade der Weibchen ist parallel zu der der Männchen nach oben verschoben.

Bei den drei untersuchten Größen liegen immer die +/+ Tiere im unteren, die +/- Tiere im mittleren und die -/- Tiere im oberen Bereich der Regressionsgeraden. Alle gezeigten Regressionen sind hochsignifikant ($P<0,001$).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei der FFDM, der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt eine Abhängigkeit der Werte vom Geschlecht der Tiere festzustellen ist, die den Genotypeffekt überlagert.

Wenn man versucht, unabhängig vom Einfluss des Geschlechts den Genotypeinfluss darzustellen, indem man getrennte Regressionen sowohl für Männchen und Weibchen als auch für die unterschiedlichen Genotypen erstellt, erhält man Abbildung 26. Hier zeigt sich bei der FFDM zusätzlich zum Geschlechtseinfluss auch der Genotypeinfluss. Aber nur bei den Männchen unterscheiden sich die Steigungen der Regressionsgeraden der verschiedenen Genotypen signifikant voneinander. Dagegen sind bei Männchen und Weibchen die y-Mittelwerte zwischen den Genotypen – außer für den Vergleich der Regressionsgeraden der +/+ mit den +/- Weibchen – hochsignifikant verschieden. Bei der Korrelation der Feuchtmasse mit der Fettmasse sind wiederum die Steigungen der Regressionsgeraden nur bei den Männchen signifikant voneinander verschieden, nicht jedoch bei den Weibchen. Andererseits ergibt sich für die y-Mittelwerte sowohl der Weibchen als auch der Männchen ein hochsignifikanter Unterschied. Betrachtet man schließlich die Beziehung der Feuchtmasse zum Körperfettgehalt, so ist hier kein signifikanter Steigungsunterschied der

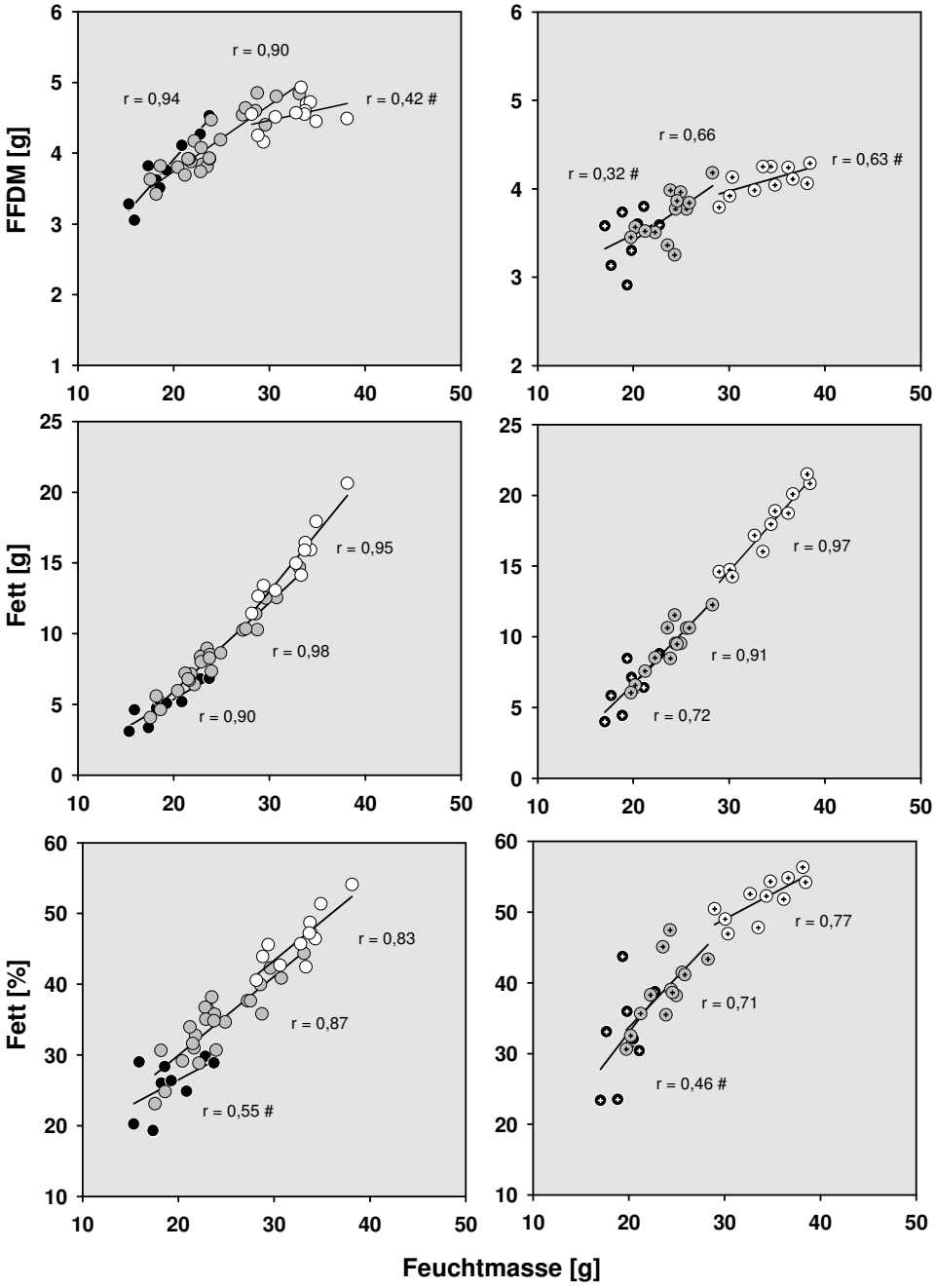



***Abb. 26:*** *Korrelation zwischen der FFDM, dem Körperfett in g, dem Körperfettgehalt in % und der Feuchtmasse von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) 56 Tage alten MC4R-defizienten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Die Beziehungen sind für Männchen und Weibchen getrennt dargestellt. Weibchen (rechte Seite) sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Die Regressionen für die verschiedenen Genotypen sind getrennt berechnet. Nicht signifikant sind die mit # markierten Regressionen.*

Regressionsgeraden der drei Genotypen innerhalb eines Geschlechts feststellbar. Jedoch sind weiterhin die y-Mittelwerte der einzelnen Genotypen hochsignifikant verschieden. Bis auf einige Ausnahmen sind alle Korrelationen zwischen der Feuchtmasse und den verschiedenen Parametern signifikant. Beim Köperfettgehalt erkennt man eine Abflachung der Regression

bei den -/- Weibchen. Die 56 Tage alten -/- Weibchen haben einen Körperfettgehalt von ca. 55%. Die Untersuchung von 9 Monate alten homozygoten MC4R-defizienten Mäusen, die mit Standardfutter bei 22°C gehalten wurden, hat gezeigt, dass die -/- Weibchen mit ca. 60% den höchsten Körperfettgehalt erreichen. (Arens 2005). Auch bei homozygoten MC4R-defizienten Tieren, die älter als 56 Tage waren, hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und unter thermoneutralen Bedingungen gehalten wurden, wurde ein maximaler Körperfettgehalt von ca. 60% beobachtet. Bei diesem Wert scheint die physiologische Höchstgrenze für den Körperfettgehalt erreicht zu sein.

#### 3.2.6.2 Statistische Auswertung unter zusätzlicher Berücksichtigung des Wurffaktors

| Körpergewicht [g] | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
|---|---|---|
| Wurf | + | ns |
| Geschlecht | ns | ns |
| Gen | ** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | ns |

| FFDM [g] | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
|---|---|---|
| Wurf | *** | ** |
| Geschlecht | *** | *** |
| Gen | ns | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | ns |

| Fettmasse [g] | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
|---|---|---|
| Wurf | ns | ns |
| Geschlecht | ns | * |
| Gen | ** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | ns |

| Fettgehalt [%] | +/+ vs +/- | +/- vs -/- |
|---|---|---|
| Wurf | ns | ns |
| Geschlecht | * | ** |
| Gen | ** | *** |
| Geschlecht x Gen | ns | ns |

***Tabelle 8:*** *Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp für das Körpergewicht, die FFDM, die Fettmasse und den Körperfettgehalt der 56 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennt betrachtet. +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Die Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Einflussgrößen Wurf, Geschlecht und Genotyp für 56 Tage alte Wildtypen und MC4R-defiziente Mäuse mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen sind in Tabelle 8 dargestellt. Lediglich für die FFDM ist ein Wurfeinfluss zu beobachten. Der Einfluss des Geschlechts ist beim Körpergewicht nicht signifikant. Bei den übrigen Parametern besteht – abgesehen vom

Vergleich der Fettmasse der +/+ Tiere mit ihren +/- Geschwistern – ebenfalls ein signifikanter Geschlechtseinfluss. Ein signifkanter Genotypeinfluss ist bei allen untersuchten Größen außer bei der FFDM für den Vergleich der +/+ Tiere mit ihren +/- Geschwistern festzustellen. Geschlecht/Genotypinteraktionen treten nicht auf.

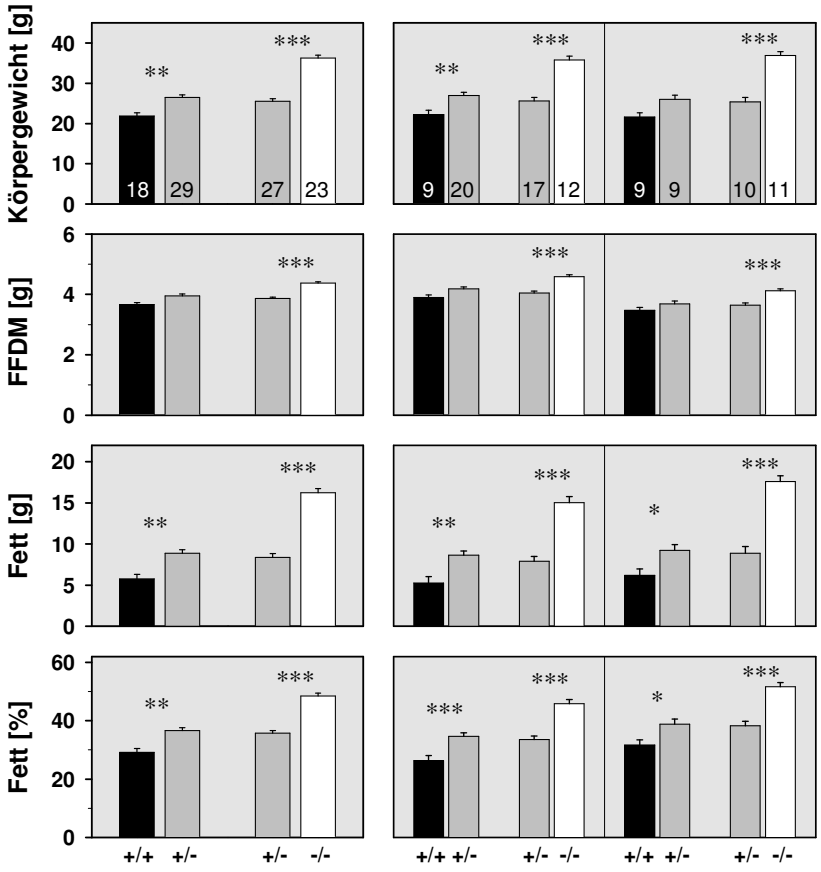



***Abb. 27:*** *Mittelwerte (±SEM) des Körpergewichts, der FFDM, der Körperfettmasse und des Körperfettgehalts von 56 Tage alten Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Die +/+ Tiere und ihre +/- Geschwister und die -/- Tiere und ihre +/- Geschwister wurden getrennt statistisch mittels einer 3-faktoriellen ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp ausgewertet. Die Abbildungen auf der linken Seite zeigen die Mittelwerte für die verschiedenen Genotypen. Auf der rechten Seite sind die Mittelwerte zuerst für Männchen und daneben für Weibchen gesondert dargestellt Die angegebenen Signifikanzen wurden hier durch einen t-Test Vergleich der Mittelwerte errechnet, wobei außerdem die Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche berücksichtigt wurde. Die Sterne geben das Signifikanzniveau an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Abb. 27 zeigt die mittels der 3 faktoriellen Varianzanalyse berechneten Mittelwerte (±SEM) der 56 Tage alten Mäuse mit hochkalorischem Zuatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen. Die Ergebnisse des statistischen Vergleichs sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Außer bei der FFDM zeigt sich sowohl für den Vergleich der +/+ Tiere mit ihren +/- Geschwistern als auch für den Vergleich der -/- Tiere mit ihren +/-

Geschwistern ein signifikanter Genotypeinfluss (linke Seite der Abbildung). Bei der getrennten Betrachtung der Männchen und Weibchen sind ebenfalls fast durchgängig signifikante Genotypunterschiede zu beobachten. Keine Signifikanz tritt beim Körpergewicht für den Vergleich der +/+ Weibchen und ihrer +/- Geschwister und bei der FFDM sowohl beim Vergleich der +/+ Weibchen als auch der +/+ Männchen mit ihren jeweiligen +/- Geschwistern auf. Beim Köpergewicht ist kein Unterschied zwischen Weibchen und Männchen feststellbar. Die FFDM der Weibchen ist niedriger als die der Männchen. Bei der Fettmasse und dem Körperfettgehalt zeigen die Weibchen höhere Werte als die Männchen, wobei besonders die -/- Weibchen durch ihre hohen Fettwerte auffallen.

### 3.2.7 PLASMALEPTINGEHALT DER 56 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

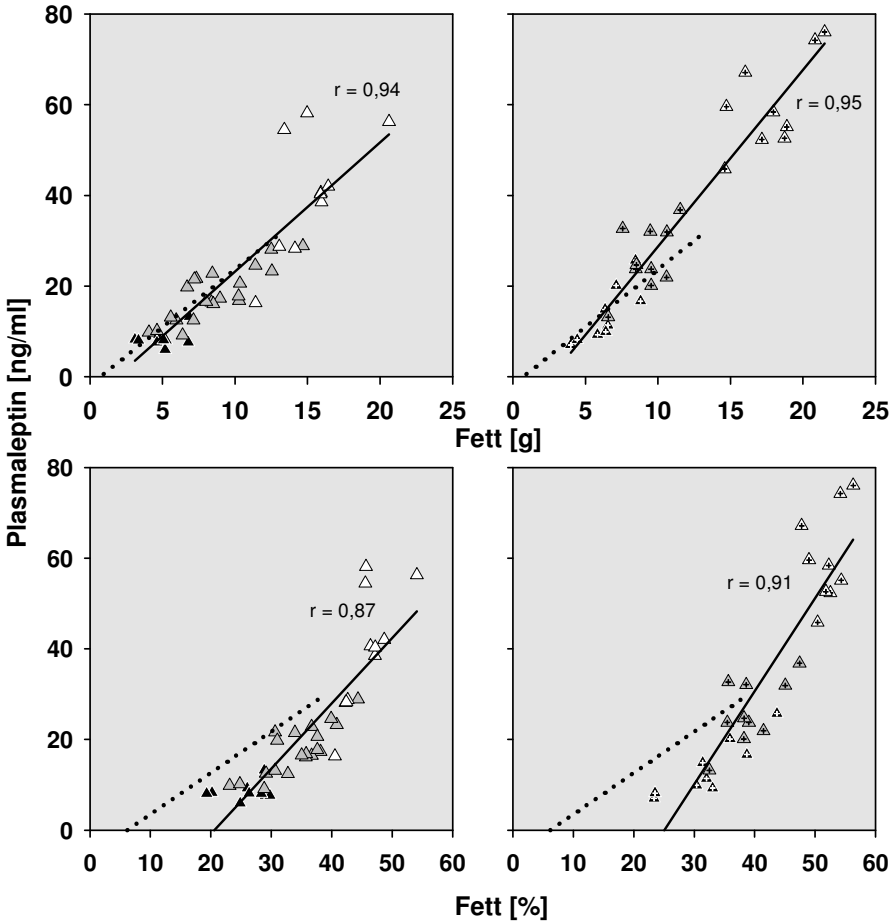



***Abb. 28:*** *Plasmaleptinkonzentration [ng/ml] von 56 Tage alten männlichen (links) und weiblichen (rechts) Mäusen in Abhängigkeit von der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt. Genotypen sind folgendermaßen unterschieden: Wildtypen (schwarz), Heterozygote (grau) und Homozygote (weiß). Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz im Symbol gekennzeichnet. Die Tiere erhielten hochkalorisches Zusatzfutter und wurden bei 34°C gehalten. Zusätzlich ist die Regression der 56 Tage alten Tiere mit Standardfutter bei 22°C (gepunktet) in die Abbildung aufgenommen.*

Wie schon bei den 35 Tage alten Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter und thermoneutraler Haltung gezeigt, ergibt sich auch bei den 56 Tage alten Tieren ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Plasmaleptingehalt (Abb. 28). Die männlichen Tiere sind auf der linken, die weiblichen auf der rechten Seite dargestellt. Zusätzlich ist die Regression der 56 Tage alten Tiere mit Standardfutter bei 22°C angegeben, bei denen kein Geschlechtsunterschied festgestellt wurde (Abb. 10). Alle vier gezeigten Regressionen sind steiler als die der 56 Tage alten Tiere unter Standardbedingungen. Die Regressionsgeraden der Weibchen verlaufen jeweils signifikant steiler als die der Männchen. Die Körperfettmasse und der Körperfettgehalt der Männchen und Weibchen am Tag 56 liegen in einem annähernd gleichen Bereich, während bei den 35 Tage alten hochkalorisch ernährten Tieren die Weibchen eine ungefähr doppelt so hohe Fettmasse und einen doppelt so hohen Körperfettgehalt wie die Männchen haben (Abb. 16). Es besteht für die Beziehung zwischen dem Plasmaleptingehalt und sowohl der Körperfettmasse als auch dem Körperfettgehalt ein signifikanter Unterschied zwischen den Regressionsgeraden der Männchen und Weibchen ($P<0,01$). Die multiple Regressionsanalyse ergab bei der gemeinsamen und der getrennten Betrachtung der Männchen und Weibchen eine hohe Signifikanz für die Abhängigkeit des Plasmaleptins von der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt ($P<0,001$). Untersucht man den Einfluss des Körperfettgehaltes und des Genotyps auf den Plasmaleptinspiegel bei beiden Geschlechtern zusammen oder nur bei den Weibchen, findet man eine zusätzliche signifikante Abhängigkeit vom Genotyp, was auf die Höhe der Plasmaleptinwerte jedoch nur einen geringen Einfluss hat. Bei den Weibchen wird der Leptinwert zu 83% durch den Körperfettgehalt und nur zu 5% durch den Genotyp bestimmt.

### 3.2.8 FUTTERAUFNAHME DER 56 TAGE ALTEN TIERE MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

| | Futter ges [kJ] | Pellets [kJ] | Schokolade [kJ] |
|---|---|---|---|
| Wurf | ** | ** | * |
| Geschlecht | + | *** | ** |
| Gen | *** | *** | ** |
| Geschlecht x Gen | n.s. | n.s. | n.s. |

***Tabelle 9:*** *Kumulative Futteraufnahme: Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp der 56 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. +: P < 0,1; *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Tabelle 9 zeigt die statistische Auswertung der kumulativen Gesamtfutter-, Pellet- und Schokoladenaufnahme über den Versuchszeitraum von Tag 21 – 56 mit Hilfe einer 3-

faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp. Für alle drei untersuchten Größen ist ein Wurfeinfluss feststellbar. Ebenso hat das Geschlecht einen Einfluss auf die Futteraufnahme, wobei außer beim Gesamtfutter das Signifikanzniveau erreicht wird. Durchgängig zeigt sich schließlich ein hochsignifikanter Genotypeinfluss.

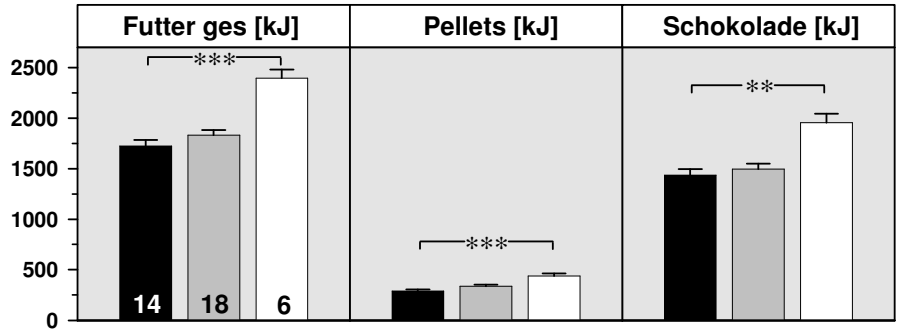



***Abb. 29:*** *Durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnete kumulative Futtermittelwerte (±SEM) von 56 Tage alten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme über den Versuchszeitraum (Tag 21-35) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen. Die Sterne geben die Signifikanz an *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

In Abbildung 29 sind die Mittelwerte für die kumulative Gesamtfutter, Pellet- und Schokoladenaufnahme in Abhängigkeit vom Genotyp der Tiere dargestellt. Es zeigt sich ein hochsignifikanter Einfluss des Genotyps; hier fallen besonders die -/- Tiere durch eine stark erhöhte Gesamtfutter- und Schokoladenaufnahme auf.

Den Geschlechtseinfluss zeigen die Mittelwerte (±SEM) in Abbildung 30. Die Unterschiede in der Gesamtfutteraufnahme bei Männchen und Weibchen verfehlen das Signifikanzniveau mit P=0,08 nur knapp.

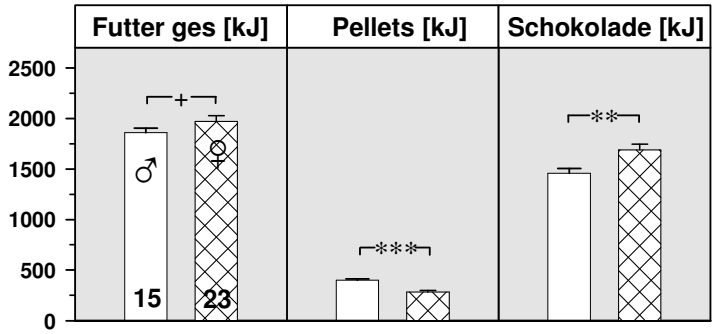



***Abb. 30:*** *Durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnete kumulative Futtermittelwerte (±SEM) von 56 Tage alten Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme über den Versuchszeitraum (Tag 21-35) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade von Männchen (weiß) und Weibchen (kariert). Die Signifikanz ist folgendermaßen angegeben: +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Bei der Pellet- und Schokoladenaufnahme ist dann eindeutig ein Geschlechtseinfluss festzustellen. Wie bei den 35 Tage alten Tieren, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden, zeigt sich auch hier, dass Männchen mehr Pellets und Weibchen mehr Schokolade aufnehmen. Der Anteil der Pellets an der Nahrung der Männchen beträgt 21,6%, der Schokoladenanteil 78,4%. Weibchen fressen nur 14,3% in Form von Pellets, aber 85,7% in Form von Schokolade. Die Darstellung der Mittelwerte in Abhängigkeit von Genotyp und Geschlecht (Abb. 31), wobei die angegebenen Signifikanzen durch t-Test Vergleiche der Mittelwerte mit zusätzlicher Bonferronikorrektur für die Anzahl der Vergleiche errechnet wurden, verdeutlicht, dass bei den Männchen ein eher stetiger Genotypeinfluss auf die Gesamtfutter-, die Pellet- und die Schokoladenaufnahme vorliegt, d.h. +/- Tiere fressen mehr als +/+ Tiere, -/- Tiere mehr als +/- Tiere. Bei den Weibchen ist kein Unterschied in der Futteraufnahme zwischen +/+ und +/- Tieren, sondern nur zwischen +/- und -/- Tieren feststellbar.

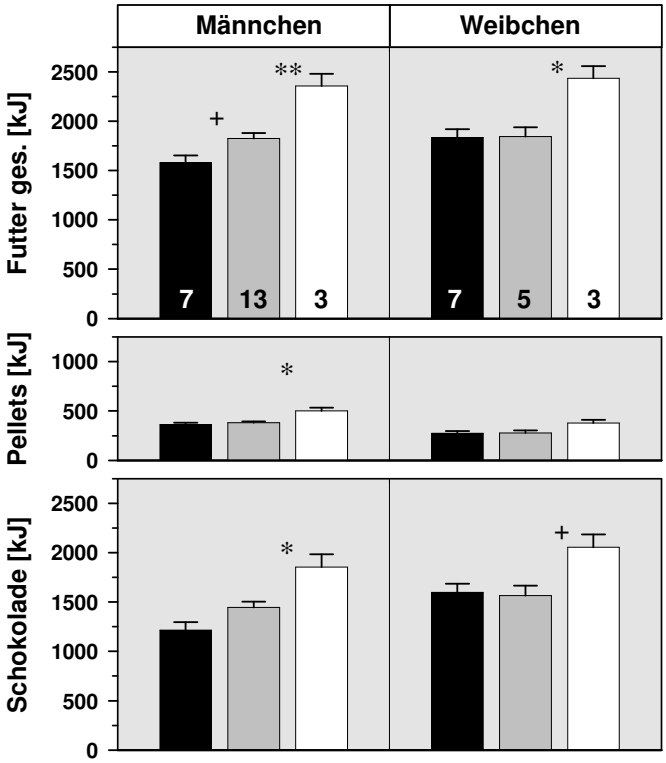



***Abb. 31:*** *Dargestellt ist jeweils die kumulative Futteraufnahme von Wildtypen (schwarz), heterozygoten (grau) und homozygoten (weiß) MC4R-defizienten Mäusen über den Versuchszeitraum (Tag 21-56) in kJ für Gesamtfutter, Pellets und weiße Schokolade. Die Mittelwerte (±SEM) wurden durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Wurf, Geschlecht und Genotyp errechnet. Die angegebenen Signifikanzen wurden hier durch einen t-Test Vergleich der Mittelwerte errechnet, wobei außerdem die Bonferronikorrektur für die Anzahl der durchgeführten Vergleiche berücksichtigt wurde. Die Signifikanzen sind folgendermaßen angegeben: +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

### 3.2.9 VERGLEICH DES KÖRPERGEWICHTS UND DER KÖRPERZUSAMMENSETZUNG VON 56 TAGE ALTEN TIEREN MIT STANDARDFUTTER BEI 22°C UND TIEREN MIT HOCHKALORISCHEM ZUSATZFUTTER BEI 34°C

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Haltungsbedingungen (Futter, Haltungstemperatur), Geschlecht und Genotyp, bei der die 56 Tage alten Tiere mit Standardfutter bei 22°C und die 56 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34 °C gemeinsam berechnet wurden. Außer beim Körpergewicht ist ein hochsignifikanter Einfluss der Haltungsbedingungen feststellbar. Das Geschlecht beeinflusst alle untersuchten Größen mit Ausnahme der Fettmasse. Durchgängig ist ein hochsignifikanter Genotypeinfluss zu beobachten.

| | Körperge-wicht [g] | FFDM [g] | Fett [g] | Fett [%] |
|---|---|---|---|---|
| Haltungsbedingungen | ns | *** | *** | *** |
| Geschlecht | *** | *** | ns | * |
| Gen | *** | *** | *** | *** |
| Haltung x Geschlecht | *** | *** | *** | *** |
| Haltung x Gen | * | ns | *** | ** |
| Geschlecht x Gen | ns | ns | ns | ns |
| Haltung x Geschlecht x Gen | ns | ns | * | ns |

***Tabelle 10:*** *Ergebnisse der 3-faktoriellen Varianzanalyse der 56 Tage alten Tiere unter Standardbedingungen und der 56 Tage alten Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. Einfluss der Faktoren Haltung, Geschlecht und Genotyp auf das Körpergewicht, die FFDM, die Fettmasse und den Körperfettgehalt. +: P < 0,1, *: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001.*

Die mit Hilfe der 3-faktoriellen Varianzanalyse errechneten Mittelwerte (±SEM) sind in Abbildung 32 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Körpergewichte der beiden Haltungsgruppen kaum unterscheiden, jedoch ist der Heterozygotenunterschied bei den Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C verstärkt. Bei der Betrachtung der FFDM ist deutlich zu sehen, dass alle Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C eine um etwa 20% niedrigere FFDM aufweisen. Im Gegensatz dazu ist die Körperfettmasse bei den Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter erhöht. Bei den +/+ und +/- Männchen steigt die Körperfettmasse ungefähr auf den dreifachen Wert an, bei den -/- Männchen ist sie um 50% erhöht. Bei den +/+ und +/- Weibchen ist die Körperfettmasse im Vergleich zu den Tieren unter Standardbedingungen sogar vervierfacht, bei den -/- Weibchen mehr als verdoppelt. Beim Körperfettgehalt findet man der Körperfettmasse entsprechende erhöhte Werte. Die -/- Tiere haben unter Standardbedingungen bereits einen so hohen Fettgehalt, dass die geänderten Haltungsbedingungen bei den -/- Tieren anscheinend nicht zu einer im gleichen Maß gesteigerten Fetteinlagerung wie bei den +/+ und +/- Tieren führen können.

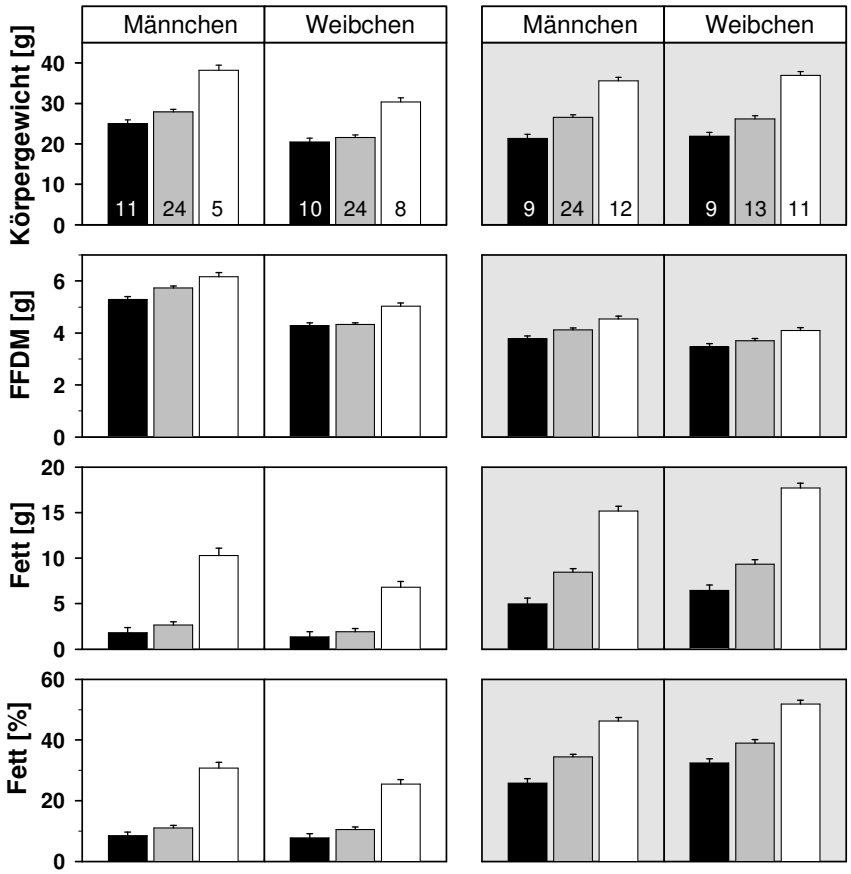



***Abb. 32:*** *Dargestellt sind die durch eine 3-faktorielle ANOVA mit den Faktoren Haltung, Geschlecht und Genotyp errechneten Mittelwerte (±SEM) für Körpergewicht, FFDM, Fettmasse und Körperfettgehalt für Männchen und Weibchen. Wildtypen (schwarz), heterozygote (grau) und homozygote (weiß) MC4R-defiziente Mäuse. Die linke Seite zeigt 56 Tage alte Tiere mit Standardfutter bei 22°C und die rechte Seite 56 Tage alte Tiere, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden.*

## 3.3 In situ Hybridisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde an parallelen Gehirnschnitten die Expression von Neuropeptid Y (NPY), Pro-Opiomelanokortin (POMC), Agouti-related protein (AGRP) und Cocaine-and-Amphetamine-regulated transcript (CART) im Nucleus arcuatus gemessen. Ausgewählt wurden Gehirne von 35 Tage alten Tieren mit Standardernährung bei 22°C und von 35 Tage alten Tieren, die hochkalorisches Zusatzfutter erhalten hatten und bei 34 °C gehalten worden waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils Tiere mit niedrigem, mittlerem und hohem Fettgehalt ausgewählt wurden und dass eine gleichmäßige Verteilung der Geschlechter und der verschiedenen Genotypen – Wildtyp (+/+), heterozygot (+/-), homozygot (-/-) – der MC4R-defizienten Mäuse vorlag. Ausgewertet wurden Schnitte von 3-4 Tieren mit Standardernährung bei 22°C und Schnitte von 4-6 Tieren mit hochkalorischem

Zusatzfutter bei 34°C. Für die quantitative Auswertung wurde die integrierte optische Dichte des spezifischen Hybridisierungssignals im ARC gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden dann mit dem Körperfettgehalt und dem Plasmaleptingehalt der Tiere korreliert. Abb. 33 zeigt exemplarisch Einzelschnitte mit den typischen Expressionsmustern der untersuchten Neuropeptide im Nucleus arcuatus.

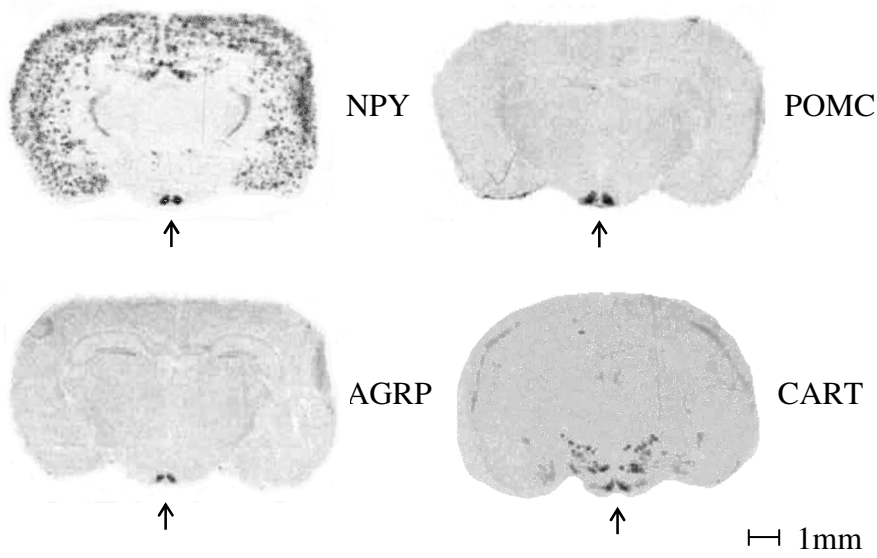



***Abb. 33:*** *NPY-, POMC-, AGRP- und CART-Expression in 20 µm Gehirnschnitten von MC4R-defizienten Mäusen. Exemplarisch sind vier Gehirnschnitte mit den nach der Durchführung einer radioaktiven in situ Hybridisierung erkennbaren Hybridisierungsmustern gezeigt. Der Pfeil zeigt auf die Region des ARC; außerdem ist ein Größenmaßstab angegeben.*

### 3.3.1 NEUROPEPTID Y (NPY)

In Abbildung 34 sind links Schnitte von Tieren unter Standardbedingungen und rechts Schnitte von Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen dargestellt. Gezeigt sind vertikal angeordnet jeweils Schnitte von Weibchen der drei verschiedenen Genotypen. Auf den Bildern ist bei den +/+ und +/- Weibchen zu erkennen, dass die Stärke des Hybridisierungssignals von oben nach unten und von links nach rechts schwächer wird. Bei den -/- Weibchen vermittelt der optische Eindruck keinen eindeutigen Unterschied im Hybridisierungsmuster.

Die quantitative Auswertung auf der Grundlage der optischen Dichtemessung erfolgte durch lineare Regression des Neuropeptid Y Signals mit dem Körperfettgehalt (links) und dem Plasmaleptingehalt (rechts). Aufgrund der Verteilung der Einzelwerte wurde die in Abbildung 35 gezeigte doppelt-logarithmische Darstellung gewählt. Die Steigung der Regression der Tiere mit Standardfutter bei 22°C unterscheidet sich nicht signifikant von der

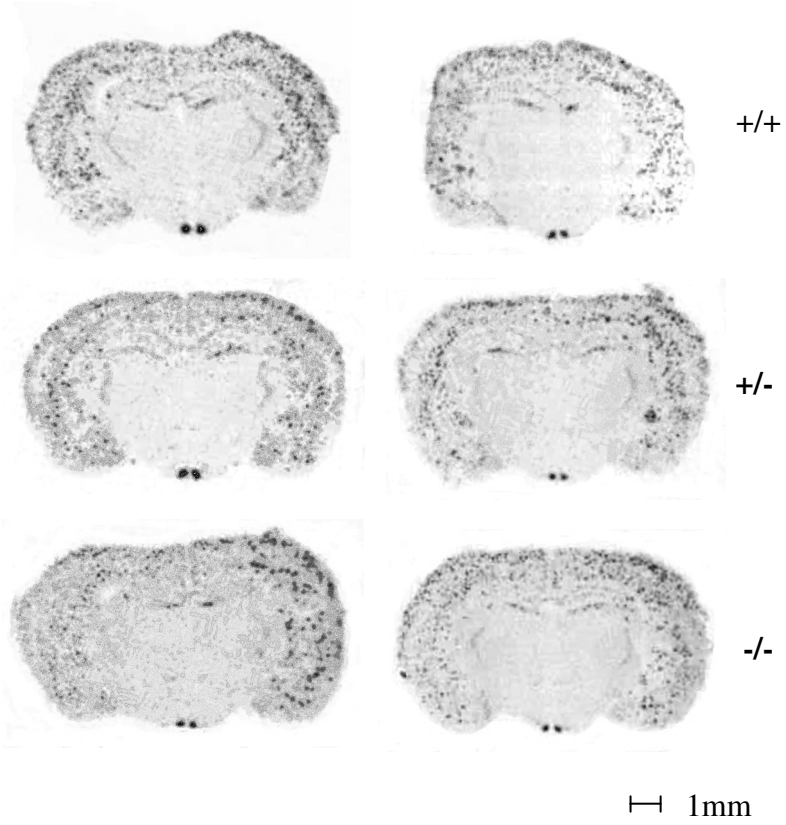



***Abb. 34:*** *Gehirnschnitte mit unterschiedlich starken Expressionsmustern von Neuropeptid Y (NPY) in der Region des Nucleus arcuatus von Weibchen verschiedener Genotypen, die Standardfutter erhielten und bei 22°C gehalten wurden (linke Seite) und von Weibchen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden (rechte Seite).*

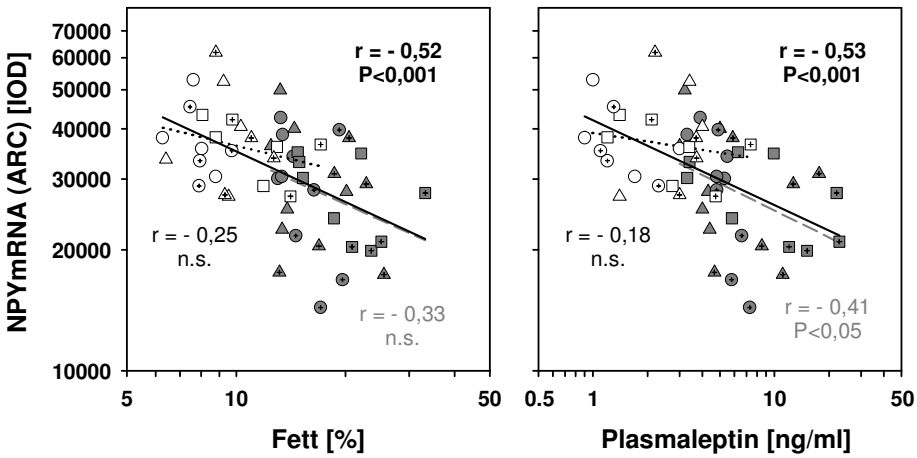



***Abb. 35:*** *NPY-Expression im ARC von Wildtypen (+/+, Kreis) und heterozygoten (+/-, Dreieck) bzw. homozygoten (-/-, Quadrat). Mäusen mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). Abgebildet sind die Ergebnisse der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD), die mit dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel korreliert wurden. Die gemeinsame Korrelation beider Gruppen ist fett, die der Tiere mit Standardfutter bei 22°C gepunktet und die der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C dunkelgrau mit unterbrochener Linie dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind in der Abbildung angegeben.*

der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C. Deswegen wurde eine gemeinsame Regression für beide Gruppen berechnet, die sowohl für die Korrelation mit dem Körperfettgehalt als auch mit Plasmaleptin hochsignifikant ist (P<0,001). Man erkennt deutlich, dass die Tiere mit Standardfutter bei 22°C im linken (oberen) Teil und die mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C im rechten (unteren) Teil der Geraden liegen, wobei sich beide Gruppen etwas überlappen. Die y-Mittelwerte der beiden Haltungsgruppen sind signifikant verschieden (P<0,001), somit ist die NPY-Expression im Nucleus arcuatus bei Tieren mit Standardfutter bei 22°C höher als bei Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C.

### 3.3.2 PRO-OPIOMELANOKORTIN (POMC)

Die doppeltlogarithmische Korrelation der POMC-Expression im Nucleus arcuatus mit dem Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration ergibt wiederum keinen signifikanten Unterschied in der Steigung der Geraden, wenn man die beiden Haltungsgruppen getrennt betrachtet (Abb. 36). Die gemeinsame Regression liefert in Bezug auf die Steigung kein signifikantes Ergebnis. Die Werte der Tiere mit Standardfutter bei 22°C liegen auf Grund ihres Fettgehaltes im linken, die mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C im rechten Teil der Abbildung, und die Werte überlappen nur in einem kleinen Bereich.

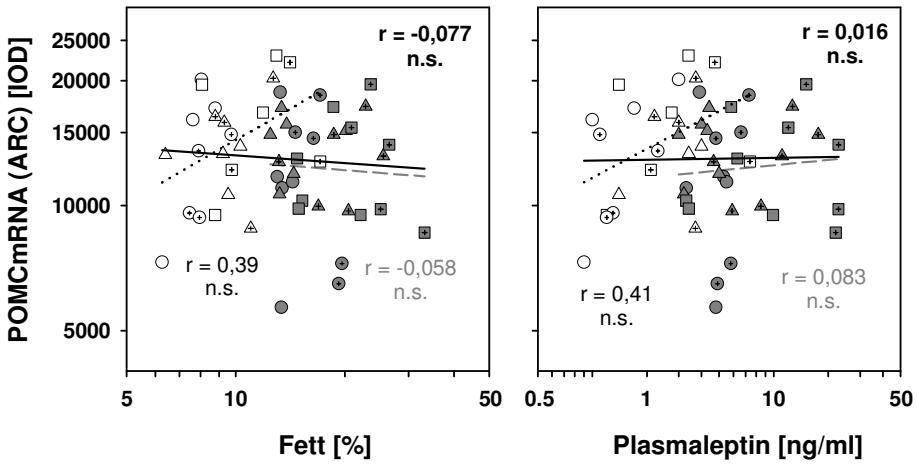



***Abb. 36:*** *POMC-Expression im ARC von Wildtypen (+/+, Kreis) und heterozygoten (+/-, Dreieck) bzw. homozygoten (-/-, Quadrat). Mäuse mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). Abgebildet sind die Ergebnisse der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD), die mit dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel korreliert wurden. Die gemeinsame Korrelation beider Gruppen ist fett, die der Tiere mit Standardfutter bei 22°C gepunktet und die der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C dunkelgrau mit unterbrochener Linie dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind in der Abbildung angegeben.*

### 3.3.3 AGOUTI-RELATED PROTEIN (AGRP)

Die Korrelation des orexigenen Peptids AGRP mit dem Körperfettgehalt und dem Plasmaleptin zeigt ähnliche Verhältnisse, wie sie oben für das Neuropeptid Y beschrieben wurden (Abb. 37). Die getrennte Regression der beiden Ernährungsgruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Steigung der beiden Geraden. Die Steigung der gemeinsamen Regression für beide Haltungsgruppen ist signifikant (P<0,001). Die Tiere unter Standardbedingungen liegen im linken (oberen) Bereich und die Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen im rechten (unteren) Bereich der Geraden. Die y-Mittelwerte der beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,01)

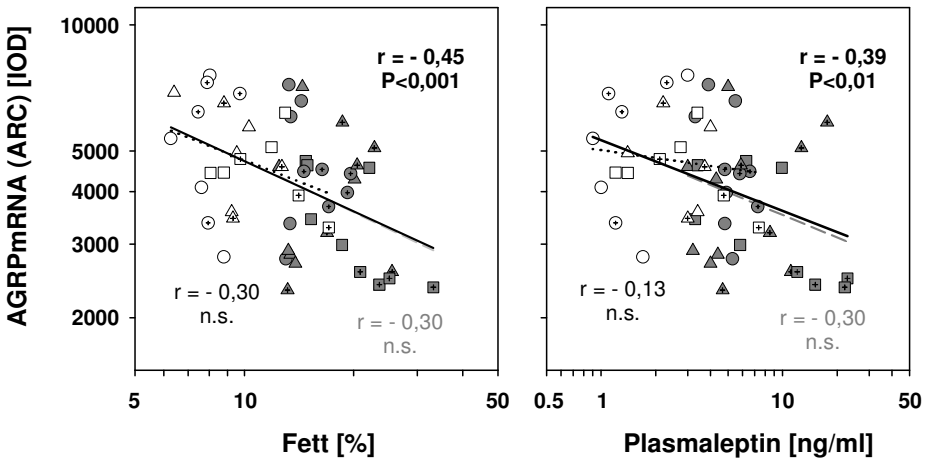



***Abb. 37:*** *AGRP-Expression im ARC von Wildtypen (+/+, Kreis) und heterozygoten (+/-, Dreieck) bzw. homozygoten (-/-, Quadrat). Mäuse mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). Abgebildet sind die Ergebnisse der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD), die mit dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel korreliert wurden. Die gemeinsame Korrelation beider Gruppen ist fett, die der Tiere mit Standardfutter bei 22°C gepunktet und die der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C dunkelgrau mit unterbrochener Linie dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind in der Abbildung angegeben.*

### 3.3.4 COCAINE-AND AMPHETAMINE-REGULATED TRANSCRIPT (CART)

Schließlich wurde die Expression von CART in der Region des Nucleus arcuatus gemessen (Abb. 38). Die Steigungen der Regressionsgeraden der beiden Haltungsgruppen sind wie bei den anderen untersuchten Neuropeptiden nicht signifikant voneinander verschieden. Wenn man die CART-Expression beider Gruppen gemeinsam mit dem Körperfettgehalt und der Plasmaleptinkonzentration korreliert, liegen wie bei POMC die Tiere unter Standardbedingungen im linken Bereich der Geraden, die Tiere mit hochkalorischem

Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen im rechten Bereich. Die Steigung der gemeinsamen linearen Regression der Daten lässt sich statistisch nicht sichern. Die y-Mittelwerte der beiden Gruppen sind aber hochsignifikant voneinander verschieden (P<0,001), was bei der POMC-Expression nicht der Fall ist. Interessant ist auch, dass bei den Tieren mit Standardfutter bei 22°C bei einer Korrelation der CART-mRNA-Expression mit dem Körperfettgehalt fast das Signifikanzniveau erreicht wird, und dass bei der Korrelation der CART-Expression mit dem Plasmaleptingehalt eine Signifikanz P<0,01 vorliegt.

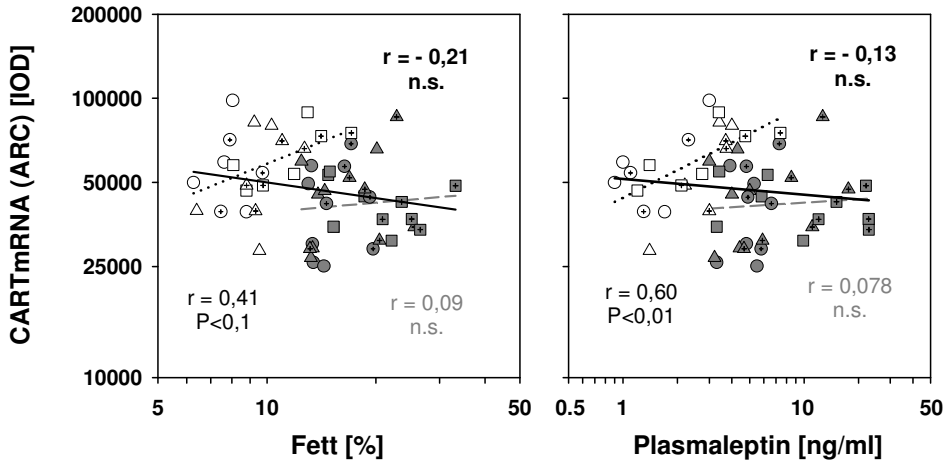



***Abb. 38:*** *CART-Expression im ARC von Wildtypen (+/+, Kreis) und heterozygoten (+/-, Dreieck) bzw. homozygoten (-/-, Quadrat). Mäuse mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). Abgebildet sind die Ergebnisse der Messung der integrierten optischen Dichte (IOD), die mit dem Körperfettgehalt bzw. dem Plasmaleptinspiegel korreliert wurden. Die gemeinsame Korrelation beider Gruppen ist fett, die der Tiere mit Standardfutter bei 22°C gepunktet und die der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C dunkelgrau mit unterbrochener Linie dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzen sind in der Abbildung angegeben.*

Zusammenfassung: Die Korrelation der Neuropeptide NPY, POMC, AGRP und CART mit dem Körperfettgehalt bzw. der Plasmaleptinkonzentration ergibt, wenn man beide Haltungsgruppen getrennt korreliert, dass die Steigungen der Regressionsgeraden nicht signifikant voneinander verschieden sind. Deshalb wurden stets gemeinsame Regressionen der beiden Gruppen bestimmt. Bei der Betrachtung der Regressionsgeraden ergibt sich, dass die orexigenen Neuropeptide NPY und AGRP eine signifikante Korrelation zeigen, wohingegen bei den anorexigenen Neuropeptiden POMC und CART keine signifikante Korrelation mit Körperfett bzw. Plasmaleptin festzustellen ist. Außer bei der POMC-Expression unterscheiden sich jedoch die y-Mittelwerte der beiden Haltungsgruppen, also die mittleren gemessenen optischen Dichten der Expressionssignale, mit einer Signifikanz von mindestens P<0,01 voneinander.

### 3.3.5 KOEXPRESSION DER NEUROPEPTIDE

Abbildung 39 zeigt die Koexpression der orexigenen Neuropeptide NPY und AGRP und die Koexpression der anorexigenen Neuropeptide POMC und CART im Nucleus arcuatus. Beide Korrelationen sind hochsignifikant (P<0,001). Es zeigt sich, dass bei den orexigenen Neuropeptiden die Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter verstärkt im unteren Bereich der Regressionsgeraden liegen, während bei den anorexigenen Neuropeptiden die Expressionswerte beider Gruppen fast vollständig überlappen.

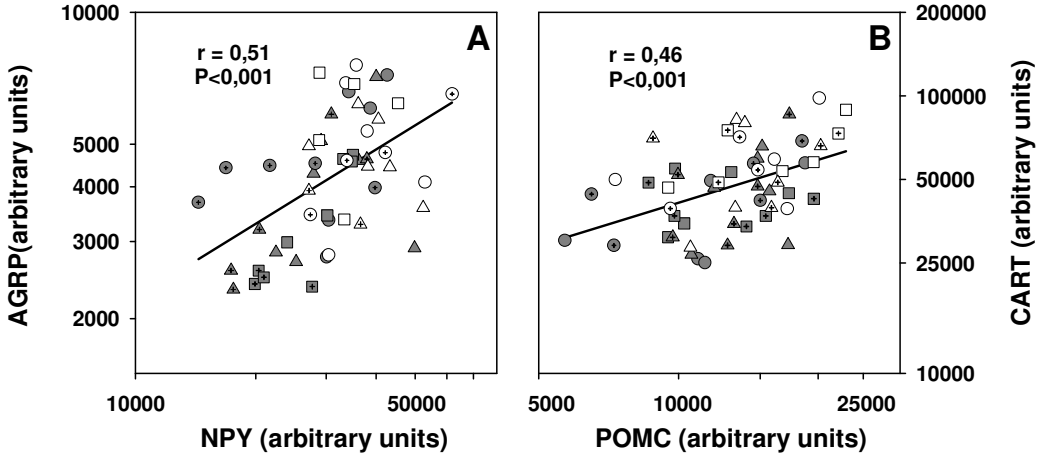



***Abb. 39:*** *Korrelation zwischen der NPY- und AGRP-Expression bzw. POMC- und CART-Expression im ARC. Wildtypen (+/+, Kreis), heterozygote (+/-, Dreieck), homozygote (-/-, Quadrat). Mäuse mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). Dargestellt sind die Ergebnisse der integrierten optischen Dichte (IOD)-Messung.*

### 3.3.6 STATISTISCHE UNTERSUCHUNG DER NEUROPEPTIDEXPRESSION

Die ermittelten Expressionsdaten wurden hinsichtlich des Einflusses der Haltungsbedingungen mit dem Programm für den Mann-Whitney Rank Sum Test verglichen, das bei fehlender Abweichung von der Normalverteilung und bei Abwesenheit von Varianzinhomogenität auf die Auswertung mittels t-Test umschaltet. Dies traf für jedes der untersuchten Neuropeptide zu. Bei der Untersuchung der beiden Haltungsgruppen (unterschiedliche Ernährung und Umgebungstemperatur) ergibt sich für log NPY eine Signifikanz von P<0,001, keine Signifikanz für log POMC, für log AGRP P=0,009 und für log CART P<0,001 (Abb. 40). Bei der Analyse des Geschlechtsunterschieds erhält man nur für log NPY einen signifikanten Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. Männchen zeigen eine höhere NPY-Expression als Weibchen. Bei der Anwendung des Tests für den

Genotyp ist lediglich für log AGRP ein signifikanter Mittelwertunterschied beim Vergleich zwischen +/+ und -/- Tieren festzustellen.

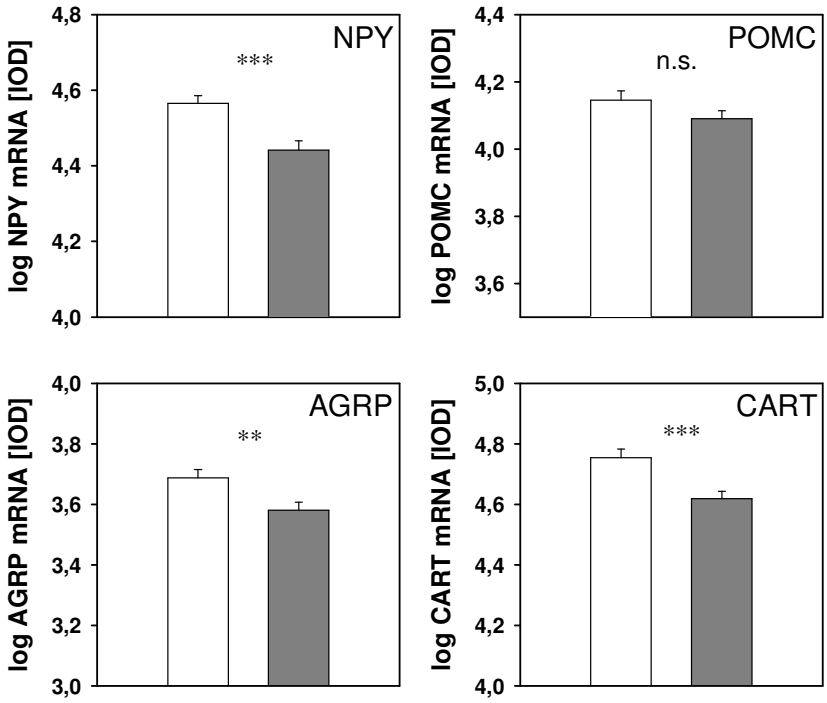



***Abb. 40:*** *Mittels Mann-Whitney Rank Sum Test errechnete Mittelwerte (±SEM) für die logarithmierten Ergebnisse der IOD Messung der Neuropeptide NPY, AGRP, POMC und CART. Mäuse mit Standardfutter bei 22°C (weiß) und mit hochkalorischem Zusatzfutter bei 34°C (dunkelgrau). ∗: P < 0,05; ∗∗: P < 0,01; ∗∗∗: P < 0,001.*

| logarithmierte Werte | NPY | POMC | AGRP | CART |
|---|---|---|---|---|
| Haltung | *** | *** | *** | *** |
| Kovariable log Fett | * | ns | * | ns |
| Geschlecht | *** | *** | *** | *** |
| Kovariable log Fett | *** | ns | ** | + |
| Genotyp | *** | *** | *** | *** |
| Kovariable log Fett | *** | ns | ** | + |

***Tabelle 11:*** *Ergebnisse der Kovarianzanalysen (Kovariable log Fett) mit den Faktoren Haltung, Geschlecht oder Genotyp. +: P < 0,1, ∗: P < 0,05; ∗∗: P < 0,01; ∗∗∗: P < 0,001.*

Zusätzlich dazu wurde zur Berücksichtigung der Abhängigkeit des Körperfettgehalts eine einfaktorielle Kovarianzanalyse getrennt für die Faktoren Haltung, Geschlecht oder Genotyp durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Bei NPY und AGRP zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Kovariablen log Körperfettgehalt, bei POMC und CART ist kein signifikanter Einfluss der Kovariablen feststellbar. Bei allen untersuchten Neuropeptiden sind bei der Analyse jeweils einer Einflussgröße hochsignifikante Unterschiede zwischen den Haltungsgruppen, Geschlechtern und Genotypen nachweisbar. Die Expression sowohl der

orexigenen Neuropeptide als auch der anorexigenen Neuropeptide ist im Mittelwert höher bei den Mäusen, die mit Standardfutter bei 22°C gehalten wurden, als bei den Mäusen, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und bei 34°C gehalten wurden. Wenn man eine 2-faktorielle Kovarianzanalyse (Ernährung/Geschlecht, Ernährung/Genotyp) durchführt, tritt aber nur noch vereinzelt bei NPY und CART bei den Einflussgrößen Ernährung und Geschlecht eine Signifikanz auf. Die Trennschärfe wird mit der Zahl der berücksichtigten Faktoren geringer, was theoretisch durch eine Vergrößerung der Stichprobe ausgeglichen werden kann. Dem sind andererseits dadurch Grenzen gesetzt, dass der Vergleich der gemessenen Expressionswerte nur dann optimal ist, wenn diese im gleichen Hybridisierungsgang gewonnen werden.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 Kritische Entwicklungsphasen

Die vorliegende Untersuchung konzentriert sich auf den Einfluss des Melanokortin-4-Rezeptor-Defektes bei der Maus, von dem bekannt ist, dass er zur Entstehung und Entwicklung einer Adipositas führt. Da Mutationen im Melanokortin-4-Rezeptor die häufigste monogenetische Form der Adipositas beim Menschen sind, wurden bei der vorliegenden Untersuchung am Tiermodell die Haltungsbedingungen so gestaltet, dass neben dem Einfluss des Genotyps auch die für den Menschen in der heutigen Zivilisation gegebenen Umweltbedingungen – thermoneutrale Umgebung und ständige Verfügbarkeit hochkalorischer Nahrung – vergleichend in die vorliegende Untersuchung einbezogen werden konnten.

Hormone und Neurotransmitter sind im prä- und frühpostnatalen Leben umweltabhängige Einflussgrößen des neuroendokrinen Systems, die fundamentale Lebensprozesse einschließlich des Metabolismus und der Informationsverarbeitung regeln. Nicht physiologische Konzentrationen eines Hormons in diesen Entwicklungsphasen können zu einer Fehlprogrammierung des eigenen neuroendokrinen Regelsystems führen, die lebenslange Fehlentwicklungen und Krankheiten zur Folge haben kann (Dörner 1976). Es gibt an Menschen und Nagetieren zahlreiche Untersuchungen über den Einfluss der Ernährung in kritischen Entwicklungsphasen. Prä-, peri- und frühpostnatal können beim Menschen die Ernährungssituation oder auch eine Diabeteserkrankung der Mutter zu einer Prädisposition für Adipositas führen. Frühfetale Unterernährung prädisponiert für Adipositas, eine spätfetale und frühpostnatale Unterernährung hat einen protektiven Einfluss auf das Adipositasrisiko (Ravelli *et al.* 1976). Eine Untersuchung an Ratten ergab, dass frühpostnatale Überfütterung, die durch die Reduzierung der Wurfgröße auf nur 4 Welpen erreicht wurde, zu einer Erhöhung der FFDM und der Körperfettmasse führt (Schmidt *et al.* 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden daher überwiegend Mäuse aus Würfen mit 7-10 Welpen untersucht, um dafür Sorge zu tragen, dass die Tiere einer möglichst gleichartigen Ernährungssituation während der Säugephase ausgesetzt waren.

Es ist nachgewiesen, dass Kinder von Müttern, die in der Schwangerschaft Diabetes hatten, dafür prädisponiert sind, in der Kindheit Adipositas zu entwickeln (Plagemann *et al.* 1997). Ein unbehandelter Diabetes bei schwangeren Ratten führt bei 21 Tage alten Rattenwelpen zu einer Fehlprogrammierung der Neuropeptid exprimierenden Neurone (NPY, AGRP, α-MSH) im ARC, die für die spätere Entwicklung der Adipositas verantwortlich sein kann (Franke *et al.* 2005). Bei den MC4R-defizienten Mäusen, die auch einen Diabetes entwickeln können,

wäre daher ein Einfluss von diabetischen Müttern auf die Entstehung der Adipositas bei den Nachkommen zu erwarten. Aus diesem Grund wurden bei der vorliegenden Untersuchung keine Nachkommen von Müttern mit -/- Genotyp, bei denen die Adipositas am stärksten ausgeprägt ist, sondern nur Nachkommen von +/+ und +/- Müttern für den Versuch verwendet.

Die Entwicklung des hypothalamischen Körpergewichtregulationssystems erfolgt bei Nagetieren vorwiegend nach der Geburt. Zum Beispiel sind NPY/AGRP Projektionen zwischen ARC und DMN erst 10-11 Tage nach der Geburt voll ausgebildet (McMillen *et al.* 2005).

Die Barker-Hypothese besagt, dass die Prävalenz, Adipositas zu entwickeln, an Typ-2-Diabetes oder Bluthochdruck zu erkranken, für Kinder mit niedrigem Geburtsgewicht erhöht ist (Law *et al.* 1992; Barker *et al.* 1993).

Eine Weiterentwicklung der Barker Hypothese ist die „thrifty phenotype"-Hypothese, die von Hales und Barker aufgestellt wurde (Hales *et al.* 2001). Diese Hypothese führt den beobachteten Zusammenhang zwischen schwachem fetalem und frühkindlichem Wachstum einerseits und der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes und des metabolischen Syndroms andererseits auf eine unzureichende Ernährung in frühen Lebensphasen zurück, die zu einer permanenten Veränderung im Glukose-Insulin-Metabolismus führt.

Häufig werden Tiere, die eine Adipositas ausprägen, erst im Erwachsenenalter untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist es jedoch schwierig, primäre genetisch bedingte Einflüsse von sekundären Einflüssen, die durch eine schon vorhandene Adipositas entstehen, zu trennen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auch 10 und 21 Tage alte Tiere (während der Säugephase) untersucht. Im Alter von 21 Tagen werden die Welpen abgesetzt. Ab diesem Tag werden die Tiere nicht mehr gesäugt und fressen nun ausschließlich pelletiertes Futter oder erhalten schon ab diesem Zeitpunkt ein hochkalorisches Zusatzfutter. Am Tag 35 sind die Mäuse dann im Umbruch zum Erwachsenenalter, was sich bei der Analyse der Körperzusammensetzung auch daran zeigt, dass der Körperfettgehalt im Gegensatz zu den anderen Alterstufen nicht mit der Feuchtmasse korreliert ist (siehe Abb. 6 und Abb. 16). Der letzte Untersuchungszeitpunkt ist der Tag 56, an dem die Tiere schließlich geschlechtsreif sind. Nach dem Tag 56 nimmt das Körpergewicht der MC4R-defizienten Mäuse weiterhin zu und die Tiere lagern noch mehr Fett ein. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass bei einem Körperfettgehalt von 60% die physiologische Obergrenze der Fetteinlagerung erreicht wird (Arens 2005).

Bei der Untersuchung der MC4R-defizienten Mäuse wurde versucht, Bedingungen zu schaffen, bei denen die Tiere möglichst gleichartigen prä-, peri- und frühpostnatalen Einflüssen ausgesetzt sind, die sich zusätzlich zu dem durch den Knockout verursachten Rezeptordefekt auf die Ausprägung der Adipositas auswirken können.

## 4.2 Einfluss der Haltungstemperatur

Auf die Ausprägung der Adipositas hat auch die Haltungstemperatur der Tiere einen Einfluss. Die Standardlabortemperatur von ca. 23°C, eine für den Menschen angenehme Umgebungstemperatur, bedeutet für Ratten und Mäuse eine Kältebelastung (Williams *et al.* 2003). Eine gelegentliche Kältebelastung ist in frühen Entwicklungsphasen wahrscheinlich nicht nur für die normale Entwicklung und die Erhaltung der thermoregulatorischen Funktionen notwendig, sondern auch, um die Energiespeicher des Körpers auf einem optimalen Wert zu erhalten (Doi *et al.* 1979).

Bei Rattenwelpen, die von Tag 4-16 unter thermoneutralen Bedingungen gehalten wurden, steigen die fettfreie Masse und Fettmasse nicht proportional an. Energie, die nicht zur Thermoregulation gebraucht wird, scheint in erster Linie für die Fettspeicherung genutzt zu werden. Den Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Körperfettgehalt eines Tieres kann man wie folgt beschreiben: der Anteil des Körperfettes steigt zuerst an, wenn die Temperatur wenig unter Raumtemperatur absinkt bzw. über Raumtemperatur ansteigt und sinkt, wenn die Abweichung von der Raumtemperatur extrem wird. Es gibt eine Interaktion zwischen der frühen thermischen Umgebung und der Kontrolle der Energiespeicher, aber es ist bisher ungeklärt, inwieweit sich diese Umweltbedingungen langfristig beim erwachsenen Tier auswirken (Schmidt 2001). Dagegen wurden Ratten vom 1. bis 60. Lebenstag bei 18°C oder bei 30°C und ab dem 60. Lebenstag bis zum 120. Lebenstag bei normaler Labortemperatur (21°C) gehalten. Die Tiere, die in der kalten Umgebung aufwuchsen, nahmen mehr an Gewicht zu und lagerten mehr Fett ein als die Tiere, die bei 30°C gehalten worden waren. Sie zeigten außerdem eine höhere Prädisposition für diätinduzierte Adipositas (Young *et al.* 1998). Eine Untersuchung an 28 Tage alten Mäusen aus dem Jahr 1977 zeigt klar, dass das Körperfett auch nach dem Absetzen durch eine Änderung der Umgebungstemperatur beeinflusst wird. Die Gruppe von Mäusen, die bei 22°C gehalten wurden, erreichte im Alter von 55 Tagen das gleiche Endgewicht wie die Gruppe, die bei 33°C (thermoneutral), gehalten wurde. Bei gleichem Körpergewicht hatte die Gruppe, die in der warmen Umgebung aufwuchs, eine ungefähr um die Hälfte reduzierte Futteraufnahme, aber am Ende trotzdem einen um ca. 50% erhöhten Fettgehalt gegenüber den Tieren in der kalten Umgebung, was

zeigt, dass die Futtereffizienz bei den Tieren mit 33°C Umgebungstemperatur größer war. Die tägliche Zunahme an Fett war ca. ein Viertel der täglichen Gewichtszunahme bei Mäusen in der warmen Umgebung, bei den anderen Mäusen nur ca. ein Zehntel der täglichen Gewichtszunahme (Stanier 1977). Daher ist für die vorliegende Arbeit anzunehmen, dass eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf thermoneutrale 34°C bei den MC4R-defizienten Mäusen eher zu einer verringerten Futteraufnahme, zu einem deutlichen Anstieg des Körperfettes und zu keiner Veränderung in der FFDM führen müsste.

## 4.3 Hochkalorische Ernährung

Sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren ist zu beobachten, dass ein Teil einer Population für die Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas prädisponiert ist, während andere Individuen unter den selben Ernährungsbedingungen ein normales Körpergewicht aufrechterhalten können (Schrauwen *et al.* 2000). Bei einer frühpostnatalen Überernährung nehmen die fettfreie Körpermasse und der Körperfettgehalt in der Regel parallel zu. Die Aufzucht im kleinen Nest von Tag 3-21, was mit einer Überernährung der Welpen gleichzusetzen ist, führt bei Wildtypen und heterozygoten +/fa Ratten sowohl zu einer Erhöhung der Fettmasse als auch zu einer Erhöhung der FFDM (Schmidt *et al.* 2000).

Der Einfluss einer hochkalorischen Ernährung bei Labortemperatur wurde auch schon an MC4R-defizienten Mäusen untersucht (Butler *et al.* 2001). Diese Untersuchung beschäftigte sich mit dem Einfluss einer moderat fettreichen Diät und ergab, dass männliche und weibliche homozygote MC4R-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypen und männlichen ob/ob Mäusen auf eine Nahrung mit erhöhtem Fettgehalt (25,1 Energie % Fett) mit anhaltender Hyperphagie und einem Anstieg des Körpergewichts reagieren. Es wurden männliche Mäuse im Alter von 40-45 Tagen und weibliche Mäuse im Alter von 10 Wochen untersucht, weil die jüngeren Weibchen keine Reaktion auf die fettreiche Diät zeigten. Auf zwei 7 Tage umfassende Phasen der fettreichen Diät folgten jeweils 7 Tage auf Standarddiät. Beim Wechsel von der fettarmen zur fettreichen Diät zeigten die Wildtypen und die -/- Mäuse in den ersten 24 Stunden einen Anstieg in der Futteraufnahme, der nur bei den -/- Mäusen auch darüber hinaus anhielt. Der Autor vermutet einen leptinunabhängigen Effekt des MC4-Rezeptors auf die Futteraufnahme, weil männliche ob/ob Mäuse keinen starken Gewichtsanstieg und keine anhaltende Hyperphagie zeigten. Ebenso war eine erhöhte Futtereffizienz (Gewichtszunahme pro kcal des aufgenommenen Futters) beim Wechsel zur fettreichen Diät bei -/- Mäusen zu beobachten. Die ob/ob Mäuse zeigten bei fettarmer Diät eine höhere Futtereffizienz als -/- Tiere. Die Gabe einer fettreichen Diät hatte hingegen bei

Wildtypen und ob/ob Mäusen keinen Einfluss auf die Futtereffizienz. Daraus könnte man auf eine wichtige spezifische Interaktion zwischen dem MC4-Rezeptor und dem Fettgehalt der Diät schließen. Die moderat fettreiche Diät bewirkt bei Wildtypen und ob/ob Mäusen, nicht aber bei homozygoten MC4R-defizienten Mäusen einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Der MC4-Rezeptor scheint somit bei der diätinduzierten Thermogenese eine Rolle zu spielen. Der respiratorische Quotient ist bei homozygoten MC4R-defizienten Mäusen dauerhaft erhöht, was auf eine verringerte Nutzung von Fettsäuren im Vergleich zu Kohlehydraten hinweist. Schließlich wurde bei Wildtypen, die eine fettmoderate Diät erhielten, aber nicht bei -/- Mäusen, eine vermehrte Laufradaktivität beobachtet. Adipositas bei MC4R-defizienten Mäusen resultiert somit aus einer schlechten Koordination der Nahrungsaufnahme mit dem Energieverbrauch.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde der kombinierte Einfluss der zwei für die Adipositasentwicklung beim Menschen wesentlichen Umweltparameter – Thermoneutralität und unbegrenzter Zugang zu hochkalorischer Nahrung – auf das Körpergewicht, die Körperzusammensetzung und die Plasmakonzentration des Leptins als das wesentliche, vom Fettgewebe ausgehende und auf zentralnervöse Zielstrukturen wirkende adipostatische Signal untersucht. Außerdem wurde die Futteraufnahme bei Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen und bei einigen Tieren auch die Stoffwechselaktivität gemessen. Besonders berücksichtigt wurde dabei die Entwicklung der für dieses Tiermodell typischen Adipositas durch Analysen in verschiedenen Entwicklungsstadien von der Säugephase bis zur Geschlechtsreife. Zusätzlich wurde durch die Untersuchung der mRNA-Expression im ARC von vier an der Körpergewichtsregulation im Hypothalamus wesentlich beteiligten Neuropeptiden versucht, die Ursachen für die bei der Adipositas auftretenden Störungen in der Regulation der Energiebilanz aufzuklären.

Sowohl das hochkalorische Zusatzfutter als auch die Unterdrückung der metabolischen Kälteabwehr durch thermoneutrale Umgebungstemperatur begünstigen die Entwicklung einer Adipositas. Wie bereits dargelegt, entsprach die gemeinsame Analyse dieser beiden Einflussgrößen dem Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit. Nachfolgend werden die am Tiermodell ermittelten Ergebnisse diskutiert, wobei – im Blick auf die Relevanz des MC4-Rezeptordefektes beim Menschen – besonders die Tiere unter Standardbedingungen und Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter und thermoneutraler Haltung vergleichend betrachtet werden sollen.

## 4.4 Körpergewicht

Bei der vorliegenden Arbeit konnte am Tag 21 und 35 lediglich ein signifikanter Wurfeinfluss auf das Körpergewicht der MC4R-defizienten Mäuse und Wildtypen gezeigt werden. Ab Tag 35 wurde für den Vergleich der +/- mit den -/- Tieren ein Einfluss des Genotyps auf das Körpergewicht nachgewiesen. Ab Tag 56 war auch beim Vergleich der +/+ mit den +/- Tieren ein Einfluss des Genotyps nachweisbar Außerdem wurde ab Tag 35 ein hochsignifikanter Einfluss des Geschlechts auf das Körpergewicht nachgewiesen. Huszar (Huszar *et al.* 1997) berichtet übereinstimmend, dass im Alter von 5 Wochen ein Unterschied im Körpergewicht zwischen den +/+ und -/- Mäusen auftritt, im Alter von 7 Wochen waren dann auch die heterozygoten MC4R-defizienten Mutanten schwerer als die Wildtypen. Ein weiterer Autor (Chen *et al.* 2000a) berichtet bei männlichen Tieren von einem Unterschied zwischen +/+ und -/- Mäusen im Alter von 6 Wochen und von einem Heterozygotenunterschied im Alter von 8 Wochen. Der bei Huszar und in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Gen-Dosis-Effekt des MC4r Gens auf das Körpergewicht ist in der Untersuchung von Chen bei den Weibchen nicht beobachtet worden. Das Körpergewicht von +/+ und +/- Weibchen ist dort im Alter von 8 Wochen nicht signifikant verschieden.

Bei hochkalorischer Zusatzfütterung und thermoneutraler Haltung ist im Alter von 35 Tagen im Vergleich zu den Tieren unter Standardbedingungen ein signifikanter Einfluss der Haltungsbedingungen, des Geschlechts und des Genotyps auf das Körpergewicht feststellbar. Das Körpergewicht der Standardtiere liegt über dem der Tiere mit hochkalorischem Zusatzfutter und thermoneutraler Haltung, was vielleicht auf unterschiedliche Wurfeinflüsse zurückgeführt werden kann. Bei 56 Tage alten Mäusen ist kein Einfluss der Haltungsbedingungen, wohl aber ein Einfluss des Geschlechts und Genotyps auf das Körpergewicht nachweisbar. Man sollte erwarten, dass eine hochkalorische Zusatzdiät und eine energiesparende thermoneutrale Haltung auch zu einer Zunahme des Körpergewichts führen. Die Zunahme der Adiposität ist bei den untersuchten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen nicht an einem erhöhten Körpergewicht, sondern an der veränderten Körperzusammensetzung der Tiere zu erkennen.

## 4.5 Körperzusammensetzung

Die Feuchtmasse der Wildtypen und MC4R-defizienten Mäuse ist bis zum Tag 21 unabhängig vom Geschlecht linear mit der FFDM korreliert. Ab Tag 35 zeigt sich dann ein Einfluss des Geschlechts auf die FFDM. Am Tag 56 steigt bei den homozygoten MC4R-

defizienten Mäuse die FFDM nicht in gleichem Maß wie die Feuchtmasse. Männliche Mäuse haben eine höhere FFDM als weibliche Mäuse.

Die Körperfettmasse und der Körperfettgehalt sind am Tag 10 und am Tag 21 unabhängig vom Geschlecht mit der Feuchtmasse korreliert. Ab Tag 35 ist ein Geschlechtseinfluss feststellbar. Lediglich am Tag 35 konnte keine Korrelation des Körperfettgehaltes mit der Feuchtmasse gefunden werden. Ab Tag 35 haben Weibchen bei gleicher Feuchtmasse eine höhere Körperfettmasse und einen höheren Körperfettgehalt als Männchen. Die statistische Auswertung mittels einer dreifaktoriellen ANOVA ergibt, dass für die Fettmasse und den Körperfettgehalt am Tag 35 ein signifikanter Unterschied zwischen +/- und -/- Mäusen und am Tag 56 auch zwischen +/+ und +/- Mäusen festgestellt werden kann. Die weiblichen Mäuse weisen für die Fettmasse und den Körperfettgehalt niedrigere Mittelwerte als die Männchen auf, haben aber bei gleicher Feuchtmasse höhere Fettwerte als die Männchen. Auch Chen untersuchte die Körperzusammensetzung bei männlichen MC4R-defizienten Mäusen. MC4R-defiziente Mäuse zeigen dort bezogen auf das Körpergewicht einen signifikant höheren Körperfettgehalt als Wildtyp-Wurfgeschwister, allerdings wurden nur jeweils 3 Tiere untersucht und außerdem war die untersuchte Gruppe altersgemischt (Chen *et al.* 2000a).

Die zusätzliche Fütterung einer hochkalorischen Nahrung und die Haltung unter thermoneutralen Bedingungen wirken sich in erheblichem Maß auf die Körperzusammensetzung der Mäuse aus. Außer einem Einfluss des Genotyps auf die FFDM ist im Alter von 35 Tagen durchgängig ein hochsignifikanter Einfluss der Haltungsbedingungen, des Geschlechts und Genotyps auf die FFDM, die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt zu beobachten. Für das Körpergewicht, die Fettmasse und den Körperfettgehalt sind signifikante Genotypunterschiede sowohl zwischen +/+ und +/- als auch zwischen +/- und -/- Tieren feststellbar. Bei Tieren unter Standardbedingungen ist in diesem Alter kein Unterschied zwischen +/+ und +/- Tieren zu beobachten. Die FFDM der Tiere ist um ca. 20% niedriger als die der Tiere unter Standardbedingungen. Der Körperfettgehalt ist etwa verdoppelt und bei -/- Weibchen sogar um 150% gegenüber den -/- Weibchen unter Standardbedingungen erhöht. Im Alter von 56 Tagen zeigt sich ein Genotypeinfluss auf die FFDM, aber kein Einfluss des Geschlechts auf die Körperfettmasse, ansonsten stimmen die Ergebnisse mit denen der 35 Tage alten Mäuse überein. Männliche Wildtypen und heterozygote MC4R-defiziente Mäuse haben einen um 200% höheren Körperfettgehalt und bei weiblichen Tieren ist der Körperfettgehalt sogar um 300% höher.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein erheblicher Einfluss der Umweltbedingungen (hochkalorische Zusatznahrung, thermoneutrale Haltung) auf den Körperfettgehalt festzustellen ist. Selbst Wildtypen haben bei diesen Umweltbedingungen einen stark erhöhten Körperfettgehalt. Bei MC4R-defizienten Mäusen ist festzustellen, dass die primär durch den MC4-Rezeptor-Defekt verursachte Adipositas durch Umwelteinflüsse entscheidend beeinflusst wird. Durch die hochkalorische Zusatzfütterung und die thermoneutrale Haltung wird selbst bei Wildtypen die Entwicklung einer Adipositas ausgelöst. In einer Untersuchung wird berichtet – dass basierend auf den Erkenntnissen von Zwillingsstudien bei Menschen – der BMI zu 10-40% von Umwelteinflüssen bestimmt ist. 50-80% der Varianz des BMI lassen sich dagegen durch genetische Faktoren erklären (Hebebrand 2004).

## 4.6 Leptin

Das vorwiegend in den Adipozyten des weißen Fettgewebes gebildete Hormon Leptin zirkuliert im Blut. Der Plasmaleptinspiegel ist von der Größe der Fettspeicher abhängig und ist sehr gut mit der Körperfettmasse korreliert. Leptin bewirkt eine Reihe langfristiger kataboler Prozesse, kann auch kurzfristige Wirkung zeigen. Hunger kann kurzfristig zu einem akuten Abfall und anschließende Fütterung zu einem Anstieg des Leptinspiegels führen, was nicht auf die Veränderung der Fettspeicher zurückgeführt werden kann.

Die Auswertung der vorliegenden Daten des Plasmaleptingehaltes von Tieren verschiedener Altersstufen, die unter Standardbedingungen aufgezogen wurden, ergab, dass innerhalb einer Altersgruppe der Plasmaleptinspiegel unabhängig vom Geschlecht und Genotyp linear mit der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt korreliert ist. 85% der Variabilität der Plasmaleptinwerte sind auf den Einfluss des Körperfettgehaltes und nur 1% auf den Einfluss des Genotyps zurückzuführen. Bei 35 Tage alten Mäusen mit Zugang zu hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen ist, bedingt durch den großen Unterschied im Fettgehalt zwischen Männchen und Weibchen, bei den Plasmaleptinwerten ein eindeutiger Geschlechtsunterschied festzustellen. Weibchen haben deutlich höhere Plasmaleptinwerte als Männchen. Die Steigungen der Regressionsgeraden für die Beziehung zwischen Körperfettgehalt und Plasmaleptingehalt von Männchen und Weibchen sind signifikant verschieden. Bei 56 Tage alten Tieren sind ebenfalls die Plasmaleptinwerte der Weibchen höher, aber die Unterschiede in der Körperfettmasse von Männchen und Weibchen und damit auch der Geschlechtsunterschied sind weniger stark ausgeprägt. Die Höhe der Plasmaleptinspiegel hängt wiederum hauptsächlich (83%) vom Körperfettgehalt der Tiere ab. Eine Untersuchung berichtet, dass bei gleichem Körperfettgehalt Weibchen höhere

Leptinwerte als Männchen haben. Außerdem wird berichtet, dass eine fettreiche Diät zu einem Anstieg der Plasmaleptinspiegel führt, was auf die Erhöhung des Körperfetts zurückzugeführt wird (Frederich *et al.* 1995). Bei schlanken Mäusen wurde nachgewiesen, dass Glukose und Insulin zu einer Erhöhung der Leptin-mRNA-Expression führen, wohingegen sowohl Mäuse mit diätinduzierter Adipositas als auch yellow-agouti Mäuse eine erhöhte Leptin-mRNA-Expression haben und relativ insensitiv gegenüber dem Ernährungsstaus sind, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass sie ständig erhöhten Insulin- und oder Glukosespiegeln ausgesetzt sind (Mizuno *et al.* 1996).

Huszar (Huszar *et al.* 1997) berichtet von erhöhten Leptinwerten bei MC4R-defizienten Mäusen. Bei 4-8 Wochen alten homozygoten Mäusen ist der Leptinspiegel bei Weibchen 4,5-fach und bei Männchen 1,5-fach gegenüber den Wildtypen erhöht. Mit zunehmendem Alter der Tiere steigen die Werte weiter an. Heterozygote Tiere haben einen Plasmaleptinspiegel, der zwischen dem der Wildtypen und Homozygoten liegt. Bei der Studie von Ste Marie (Ste Marie *et al.* 2000) wiesen die homozygoten MC4R-defizienten Mäuse signifikant höhere Leptinwerte als die Wildtypen auf.

Eine Untersuchung an 2-10 Monate alten weiblichen C57BL/6J Mäusen ergab, dass der Plasmaleptinspiegel vom Alter der Tiere, einer hochkalorischen Diät und vom Fasten beeinflusst wird. Der Plasmaleptinspiegel ist mit dem Körperfettgehalt korreliert und steigt mit zunehmendem Alter der Tiere an. Außerdem ergibt sich eine signifikante Korrelation des Plasmaleptins mit Plasmainsulin und Plasmaglukose. Bei der Fütterung einer fettreichen Diät (58 Energie % Fett) sind erhöhte Plasmaleptinspiegel zu beobachten. Nach 48-stündigem Fasten zeigen die Mäuse mit Standarddiät eine stärkere Absenkung der Leptinspiegel als die Mäuse mit der fettreichen Diät, wohingegen die Reduktion des Plasmainsulins gleich ist (Ahren *et al.* 1997). Leider wurden in fast allen Untersuchungen keine Korrelationen des Plasmaleptins mit der Körperfettmasse oder dem Körperfettgehalt der Tiere ermittelt, sondern nur die absoluten Werte dargestellt.

Die Untersuchung von Ahren (Ahren *et al.* 1997) zeigt die Korrelation des Plasmaleptins mit dem Körpergewicht. Hier wurden 1, 2, 6 und 10 Monate alte Tiere unabhängig von der Ernährung (Standarddiät oder fettreiche Diät) gemeinsam korreliert. Man erhält eine hochsignifikante Korrelation, bei der die Tiere mit einer fettreichen Diät die höchsten Werte sowohl für das Plasmaleptin als auch für das Körpergewicht erreichen. Tiere, die jünger als einen Monat waren, wurden nicht untersucht. Außerdem wurde in einer späteren Untersuchung gezeigt, dass die Korrelation des Plasmaleptins mit dem Körpergewicht bei

C57BL/6J Mäusen und NMRI Mäusen jeweils steiler verläuft, wenn die Mäuse mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden (Ahren *et al.* 1998).

Eine Untersuchung berichtet über die unterschiedlichen Plasmaleptinspiegel bei A/J Mäusen, die resistent gegen diätinduzierte Adipositas sind, und bei C57BL/6J Mäusen, die zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas neigen. Während bei Standarddiät die Leptinspiegel der beiden Mäusestämme ähnlich sind, sind nach 4 Wochen Fütterung einer fettreichen Diät die Leptinspiegel der A/J Mäuse um das 10-fache erhöht, und diese Erhöhung bleibt auch über die folgenden 14 Tage erhalten. C57BL/6J Mäuse haben dagegen niedrigere Leptinwerte, die nur allmählich mit steigender Fetteinlagerung steigen und auch eine zunehmende Hyperglykämie und Hyperinsulinämie zur Folge haben (Surwit *et al.* 1997). Auch beim Menschen haben Untersuchungen an Pima-Indianern – einer Population, die eine hohe Prävalenz für eine diätinduzierte Adipositas zeigt – ergeben, dass eine Gewichtszunahme bei den Menschen auftrat, bei denen ursprünglich ein niedriger Leptinspiegel nachgewiesen worden war (Ravussin *et al.* 1997).

Für die Widerstandsfähigkeit gegen eine diätinduzierte Adipositas spielt außerdem die Erhaltung der Leptinresponsivität eine Rolle. Zu Beginn eines Versuches, der ebenfalls mit A/J und C57BL/6J Mäusen durchgeführt wurde, waren keine Unterschiede in der Leptinresponsivität zwischen den beiden Stämmen nachweisbar. Nach 4 und 8 Wochen Fütterung mit einer fettreichen Diät zeigten beide Stämme keine Reaktion auf ip-Injektionen mit Leptin. Zentral injiziertes Leptin bewirkte bei A/J Mäusen eine stärkere Reduktion der Futteraufnahme als bei C57BL/6J Mäusen und eine Reduktion der Fettpolster um 50%. Bei C57BL/6J Mäusen war keine Abnahme der Fettmasse zu beobachten (Prpic *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei den 10 und 21 Tage alten Tieren unter Standardbedingungen auf Grund ihres höheren Körperfettanteils höhere Plasmaleptinwerte als bei 35 Tage alten Tieren beobachtet. Die Regression der 56 Tage alten Tiere verläuft steiler als die der 35 Tage alten Tiere und es werden höhere Werte erreicht. Bei hochkalorischer Zusatzfütterung haben sowohl männliche als auch weibliche Tiere höhere Plasmaleptinwerte als unter Standardbedingungen. Die Werte der weiblichen Tiere sind im Alter von 35 Tagen deutlich höher als die der männlichen Tiere. Da mit steigendem Alter die eingelagerten Fettspeicher größer werden und auch eine hochkalorische Zusatzfütterung und die thermoneutrale Haltung zu einer vermehrten Fettdeposition führen, ist der Anstieg der Leptinspiegel durch den starken Anstieg des Körperfettes erklärbar. Die Leptinbildung scheint bei MC4R-defizienten Mäusen nicht gestört zu sein. Die erhöhten Leptinspiegel sind jedoch nicht in der Lage, einer exzessiven Fettdeposition entgegenzuwirken. Mit großer

Wahrscheinlichkeit spielt dabei die Leptinresistenz der adipösen Mäuse eine Rolle. Bei fettreicher Diät schaffen es die Mäuse trotz erhöhter Leptinspiegel nicht, ihre Futteraufnahme entsprechend zu senken.

## 4.7 Futteraufnahme

Die Erstuntersuchung des MC4r-Knockouts durch Huszar (Huszar *et al.* 1997) ergab bei adulten homozygoten MC4R-defizienten Mäusen, die älter als 15 Wochen waren, einen signifikanten Anstieg (46%) in der Futteraufnahme gegenüber den Wildtypen. In der Untersuchung von Ste Marie konnte bei MC4R-defizienten Mäusen bis zu einem Alter von 12 Wochen keine Hyperphagie beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit, bei der Tiere in der Wachstumsphase vom Tag 21 bis 35 untersucht wurden, zeigte sich unter Standardbedingungen in der kumulativen Futteraufnahme von Tag 21 bis 35 eine signifikant höhere Futteraufnahme der -/- Tiere gegenüber den +/+ Tieren (siehe Abb. 15). Die Untersuchung von Ste Marie (Ste Marie *et al.* 2000) enthält aber auch Ergebnisse eines pair-feeding-Versuchs. Die Futtermenge der homozygoten MC4R-defizienten Mäuse wurde auf die Menge beschränkt, die ihre männlichen und weiblichen Wildtypwurfgeschwister an dem vorhergehenden Tag gefressen hatten. Das Körpergewicht wurde wöchentlich gemessen. Bereits im Alter von 12 Wochen zeigten hier die paargefütterten homozygoten MC4R-defizienten Mäuse ein niedrigeres Körpergewicht als die ad libitum gefütterten -/- Mäuse, erreichten aber nicht das Niveau der Wildtypen. Dieser Befund widerspricht der in der selben Untersuchung getroffenen Feststellung, dass in der Futteraufnahme von Wildtypen und Homozygoten kein Unterschied vorliegt. Wäre die aufgenommene Futtermenge auch bei ad-libitum-Fütterung für Wildtypen und Homozygote gleich, dann dürfte ein solcher Fütterungsversuch keine Unterschiede im Körpergewicht der Mäuse zur Folge haben. Wahrscheinlich liegt ein geringer, wenn auch nicht signifikanter Unterschied vor.

Bei der Fütterung einer zusätzlichen hochkalorischen Diät und thermoneutraler Haltung war in der vorliegenden Arbeit bei der kumulativen Gesamtfutteraufnahme interessanterweise kein Unterschied gegenüber den Tieren unter Standardbedingungen zu beobachten. Dieses Ergebnis legt nahe, dass auch die thermoneutrale Haltung einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung der Adipositas hat.

## 4.8 Sauerstoffmessung

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs bei Mäusen aller drei Genotypen über den Zeitraum von Tag 21 bis Tag 35 ergab, das die +/+ Tier einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch als die +/- Tiere, und die +/- Tiere einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch als die -/- Tiere haben. Die -/- Mäuse zeigen keine erniedrigte metabolische Rate. Interessant ist, dass die Genotypabhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs in ihrer Tendenz der Genotypabhängigkeit der FFDM entspricht. Die Ratio Sauerstoffverbrauch [Liter]/ΔFFDM [g] ist bei den allen Genotypen annähernd gleich.

Es gibt zwei Studien, die sich ebenfalls mit der Messung der metabolischen Rate mittels indirekter Kalorimetrie bei MC4R-defizienten Mäusen beschäftigen. Bei der ersten Studie ist bezogen auf das ganze Tier die pRMR (pseudo resting metabolic rate) bei MC4R-defizienten Mäusen signifikant höher als bei Wildtypen. Die Messung erfolgte während der Lichtphase, in der die Tiere sich in Ruhe befanden und auch keinen Zugang zu Futter hatten. Bezogen auf die fettfreie Körpermasse ist die pRMR bei den MC4R-defizienten Mäusen gleichfalls erhöht, jedoch bezogen auf das Körpergewicht ist sie signifikant niedriger als bei Wildtypen. Es ist anzunehmen, dass die erhöhte pRMR bei MC4R-defizienten Mäusen mit dem höheren Körpergewicht und nicht mit dem MC4R-Defekt in Zusammenhang gebracht werden kann. Zur Kontrolle wurde auch die pRMR bei zur diätinduzierten Adipositas veranlagten C57BL/6J untersucht, weil diese Tiere ebenfalls einen erhöhten Körperfettgehalt und ein höheres Körpergewicht aufweisen. Diese Mäuse mit diätinduzierter Adipositas zeigen wie die MC4R-defizienten Mäuse eine erhöhte pRMR. Auch der respiratorische Quotient war bei MC4R-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtypen erhöht. Das könnte auf einen verminderten Fettmetabolismus hinweisen. Die Untersuchung der lokomotorischen Aktivität zeigte eine kleine Erniedrigung ($p<0,02$) bei den MC4R-defizienten Mäusen. Damit ist ausgeschlossen, dass die erhöhte metabolische Rate der MC4R-defizienten Mäuse mit einer höheren Aktivität erklärt werden kann (Chen *et al.* 2000a). Die zweite Untersuchung (Ste Marie *et al.* 2000) ergab ebenfalls, dass die homozygoten Mutanten bezogen auf das Körpergewicht einen geringeren Sauerstoffverbrauch haben. Die absoluten Werte wurden hier nicht gezeigt. Der Befund, dass die MC4R-defizienten Tiere eine geringere lokomotorische Aktivität zeigen, konnte hier nur für die homozygoten Männchen in der Dunkelphase bestätigt werden.

Es bleibt die interessante Frage, auf welche Größe der Sauerstoffverbrauch eines Tieres am besten bezogen werden sollte. Man sollte davon ausgehen, dass Fettgewebe eine niedrigere metabolische Aktivität als andere Gewebe hat (Himms-Hagen 1997). Entgegen der von

Himms-Hagen geäußerten Ansicht, dass absolute Werte pro Maus pro Stunde zu betrachten seien, sollte berücksichtigt werden, dass adipöse Tiere bei steigendem Körpergewicht nicht nur ihre Fettmasse, sondern auch ihre fettfreie Trockenmasse vergrößern (Ergebnisse Abb. 13). Ein Bezug der metabolischen Rate auf die fettfreie Körpermasse wird von einigen Autoren vorgenommen. Es besteht auch eine lineare Beziehung zwischen dem prozentualen Körperfettgehalt und dem prozentualen Wassergehalt eines Tieres. Mäuse mit einem hohen Fettgehalt weisen einen entsprechend niedrigeren Wassergehalt auf. Der Wassergehalt der fettfreien Körpermasse ist konstant. In der vorliegenden Arbeit wurde die metabolische Rate in Bezug auf die Zunahme der fettfreien Trockenmasse betrachtet, da die fettfreie Trockenmasse eine gute Messgröße für das metabolisch aktive Gewebe eines Tieres ist. Eine Absenkung der metabolischen Rate, die für die Entwicklung der Adipositas verantwortlich sein könnte, konnte bei MC4R-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden. Bei MC4R-defizienten Mäusen zeigen die Hetero- und Homozygoten pro Tier betrachtet einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, der der Zunahme der FFDM im Versuchszeitraum entspricht.

## 4.9 Neuropeptidexpression bei Nagetieren

### 4.9.1 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEIM FASTEN

Zahlreiche Untersuchungen zur zentralnervösen Steuerung des Energiehaushaltes befassen sich mit den auch in der vorliegenden Arbeit analysierten Neuropeptiden, die den peripheren lipostatischen und orexigenen auf die Neurone des Nucleus arcuatus wirkenden Signalen nachgeschaltet sind. Die daran beteiligten Systeme NPY/AGRP und POMC/CART wirken im Prinzip antagonistisch. Ihre Einflüsse bei der Körpergewichtsregulation haben sich als nicht gleichgewichtig herausgestellt (siehe Kapitel 4.11). Außerdem reagieren sie unterschiedlich auf genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und endogene Störungen der zentralen Wirksamkeit von Leptin und Insulin. Dies zeigen die zahlreichen nachfolgend diskutierten Befunde zur Neuropeptidexpression, die mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen und bei verschiedenen Tierarten erhoben wurden. Sie liefern noch kein widerspruchsfreies Konzept der Signaltransduktion durch die genannten Neuropeptide, deren mRNA-Expression bei der Maus in der vorliegenden Arbeit speziell unter dem Gesichtspunkt der besonderen Haltungsbedingungen und dem Vorliegen einer MC4R-Defizienz analysiert wurde.

Da sowohl Fasten als auch Überernährung die Mechanismen der Körpergewichtsregulation aktivieren, ist es interessant, im Zusammenhang mit der Erforschung der Körpergewichtsregulation bei Adipositas auch die Ergebnisse der Neuropeptidexpression

beim Fasten zu berücksichtigen. Zum Einfluss des Fastens auf die Expression der Neuropeptide wurden Untersuchungen an Ratten und Mäusen durchgeführt.

Bei schlanken +/fa Ratten bewirkt Fasten über einen Zeitraum von 72 Stunden eine Erhöhung der NPY- und AGRP-mRNA-Expression und eine Senkung der POMC-mRNA-Expression im medialen basalen Hypothalamus. Übereinstimmende Ergebnisse erhält man nach 48 Stunden Fasten bei Sprague-Dawley Ratten. Bei diesen Tieren bewirkt eine Leptininfusion während des Fastens die fast vollständige Aufhebung dieser Expressionsänderungen. Die NPY-mRNA-Spiegel sind bei adipösen fa/fa Ratten im Vergleich zu schlanken +/fa Ratten erhöht und steigen beim Fasten an. Die AGRP-mRNA Spiegel von +/fa und fa/fa Ratten unterscheiden sich nicht. Fasten bewirkt bei fa/fa Ratten keine signifikante Änderung der AGRP-mRNA-Spiegel. Das Fehlen eines funktionalen Leptinrezeptors führt beim Fasten demnach bei diesen Tieren nur zu einer Hochregulation der NPY- und nicht der AGRP-mRNA-Expression (Korner *et al.* 2001). Die mRNA-Expression von NPY, POMC und CART wurde in einer weiteren Studie an Sprague-Dawley Ratten untersucht. Nachdem die Ratten circa 70 Stunden gefastet hatten, war ein Ansteigen der NPY-mRNA und ein Absinken der POMC und CART-mRNA zu beobachten. Eine Leptininfusion während des Fastens, um den Plasmaleptinspiegel aufrecht zu erhalten, konnte dieser Änderung der Neuropeptidexpression entgegenwirken (Ahima *et al.* 1999).

Bei C57BL/6J Mäusen ist die POMC-mRNA-Expression nach zweitägigem Fasten um 60% erniedrigt und die NPY-mRNA steigt auf den vierfachen Wert an. Bei ob/ob und db/db Mäusen wurde auch eine erniedrigte POMC-mRNA-Expression und eine erhöhte NPY-mRNA-Expression gefunden, die wahrscheinlich auf den genetischen Defekt zurückzuführen sind (Mizuno *et al.* 1998).

Bei einer anderen Studie an C57BL/6J Mäusen führte der Futterentzug über 26 oder 30 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der Neuropeptide NPY und AGRP und zu einem Absinken der POMC-mRNA-Expression im ARC. Nach einem Futterentzug über 30 Stunden und erneuter Fütterung war nach 6 Stunden eine Reduktion der NPY-Expression, eine weiterhin erhöhte AGRP-Expression und eine Wiederherstellung der POMC-Expression zu beobachten. Nach einem weiteren Tag waren die NPY Spiegel gegenüber den ad libitum gefütterten Kontrolltieren noch erhöht, und die AGRP- und POMC-Spiegel waren normalisiert (Swart *et al.* 2002).

Den Einfluss des Fastens auf die Expression der Neuropeptide kann man wie folgt zusammenfassen. Bei den orexigenen Neuropeptiden NPY und AGRP bewirkt das Fasten einen Anstieg der mRNA-Expression (eine Ausnahme sind fa/fa Ratten, bei denen kein

Anstieg der AGRP-mRNA-Expression beobachtet werden konnte). Bei den anorexigenen Neuropeptiden POMC und CART wurde ein Absinken der mRNA-Expression beobachtet. Die Verabreichung einer Leptininfusion während des Fastens wirkt diesen Änderungen der Neuropeptidexpression entgegen.

### 4.9.2 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEI STANDARD DIÄT

Bei Sprague-Dawley Ratten, die mit einer Standarddiät gefüttert wurden, wurde die mRNA-Expression von NPY, POMC und CART untersucht. Wenn die Plasmaleptinkonzentration bei ad libitum gefütterten Tieren durch Leptininfusion erhöht wurde, so führte dies zu einer Verminderung der Futteraufnahme und des Körpergewichts, die NPY-mRNA-Expression im ARC sank, bei den Neuropeptiden α-MSH und CART konnte aber keine Expressionsänderung festgestellt werden (Ahima *et al.* 1999).

Schwartz et al. berichten, dass Leptininjektionen zu einem Anstieg der POMC-mRNA im Nucleus arcuatus führen (Schwartz *et al.* 1997). Kesterson et al. stellen fest, dass die POMC-Expression bei lethal-yellow AY Mäusen, MC4R-defizienten Mäusen und ob/ob Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen unverändert ist (Kesterson *et al.* 1997).

Es liegen auch bereits Ergebnisse zur Neuropeptidexpression bei Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen vor, die unter Standardbedingungen gehalten wurden (Arens *et al.* 2003; Arens 2005). Hier konnte bei 35 und 56 Tage alten Tieren gezeigt werden, dass die mRNA-Expression der orexigenen Neuropeptide NPY und AGRP mit steigendem Körperfettgehalt der Tiere abnimmt. Da die Plasmaleptinwerte der Mäuse positiv mit dem Körperfettgehalt korreliert sind, führt der Anstieg des Leptins zu einer Abnahme der NPY/AGRP-mRNA-Expression im Nucleus arcuatus. Im Gegensatz dazu wurde für das Neuropeptid POMC, das ein Vorläufermolekül des anorexigenen α-MSH ist, und für das ebenfalls anorexigen wirkende CART, eine Zunahme der mRNA-Expression mit steigendem Körperfettgehalt gefunden. Die statistische Analyse mittels ANCOVA (Körperfettgehalt als Kovariate, Genotyp als Faktor) ergab einen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die Expression der Neuropeptide, wobei ein Anstieg der mRNA-Expression von POMC und CART, aber auch von NPY vom Wildtypen über Heterozygote bis hin zu Homozygoten beobachtet wurde. Für das AGRP wurde eine Abnahme der mRNA-Expression gefunden (+/+ > +/- > -/-). Das Ergebnis der statistischen Analyse mittels ANCOVA für das NPY ist überraschend, da die Regressionsanalyse eine abnehmende Expression mit steigendem Körperfettgehalt zeigt. Zusätzlich zu diesem Befund wurde auch eine Altersabhängigkeit der Neuropeptidexpression

nachgewiesen. Bei 9 Monate alten Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen findet man keine signifikante Korrelation der Neuropeptide NPY, POMC, AGRP und CART mit dem Körperfettgehalt der Mäuse. Die statistische Auswertung der Daten mittels ANCOVA (Genotyp als Faktor, Körperfettgehalt als Kovariable) ergab nur für die AGRP-Expression einen signifikanten Einfluss des Genotyps. Bei einer zweifaktoriellen ANCOVA (Körperfettgehalt als Kovariate, Alter und Genotyp als Faktoren) waren ein Genotypeinfluss nur bei der CART-Expression und ein Einfluss des Alters bei der NPY- und POMC-Expression nachweisbar. Ältere homozygote MC4R-defiziente Mäuse zeigten gegenüber jüngeren Homozygoten eine höhere NPY- und AGRP-Expression, eine niedrigere POMC-Expression und eine unveränderte CART-Expression. Für alle Genotypen der 9 Monate alten Tiere wurde eine zusätzliche Expression von NPY-mRNA im DMN und VMN nachgewiesen. Es zeigte sich eine positive Korrelation der Anzahl der NPY exprimierenden Zellen mit dem Körperfettgehalt. Da angenommen werden muss, dass der Plasmaleptinspiegel in nur ganz geringem Maß vom Genotyp beeinflusst wird, bleibt die Frage, wie die Genotypabhängigkeit der Neuropeptidexpression unabhängig vom Plasmaleptin erklärt werden kann (MacIntyre *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass bei jüngeren MC4R-defizienten Mäusen eine erhöhte NPY-Expression die Ursache und nicht die Folge von Hyperphagie und der daraus resultierenden Adipositas sind (Arens 2005).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass MC4R-defiziente Mäuse unter Standardbedingungen versuchen durch eine abnehmende NPY- und AGRP-mRNA-Expression und eine verstärkte POMC- und CART-mRNA-Expression, einer vermehrten Fetteinlagerung entgegenzuwirken.

### 4.9.3 NEUROPEPTIDEXPRESSION BEI HOCHKALORISCHER ERNÄHRUNG

Während man bei Untersuchungen zur Neuropeptidexpression beim Fasten generell übereinstimmende Ergebnisse erhalten hat, die mit der postulierten Steuerungsfunktion der Neuropeptide in Übereinstimmung gebracht werden können, sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Neuropeptidexpression nach Fütterung einer hochkalorischen Diät nicht einheitlich und nur teilweise vergleichbar. Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass Tiere unterschiedlichen Alters aus verschiedenen Mäuse- und Rattenstämmen untersucht wurden. Zusätzlich unterscheiden sich die Untersuchungen in Bezug auf die Fütterungsdauer der fettreichen Diät, und auch die Zusammensetzung und der Fettgehalt der Diäten variierte. Bei manchen Studien wurde die Konzentration der Peptide, bei anderen die mRNA-Expression gemessen.

Eine Untersuchung der Neuropeptidexpression bei männlichen 12-16 Wochen alten C57BL/6 Mäusen, die über 2 Wochen eine fettreiche Diät (43 Energie % Fett) erhielten, im Vergleich zu Mäusen, die mit einer Standarddiät ernährt wurden, findet keinen Unterschied in der Expression der NPY-, POMC- und CART-mRNA im gesamten Hypothalamus (Heijboer *et al.* 2005).

Eine andere Untersuchung an 3 Wochen alten männlichen C57BL/6J Mäusen, die ebenfalls über einen Zeitraum von 2 Wochen eine fettreiche Diät (42,2 Energie % Fett) erhielten, ergab, dass bereits nach 2 Tagen eine erhöhte Futteraufnahme und eine Abnahme der mRNA-Expression von NPY um ca. 30% und von AGRP um ca. 50% im gesamten Hypothalamus zu beobachten war. Nach 1 Woche gingen die Futteraufnahme und die NPY/AGRP-Expression auf die Ausgangswerte zurück. Nach 2 Wochen war die Futteraufnahme bei den Mäusen mit fettreicher Diät wieder höher und die POMC-mRNA-Expression stieg an. Bei der NPY/AGRP-mRNA-Expression war nach 2 Wochen kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellbar (Ziotopoulou *et al.* 2000).

Über einen Zeitraum von 19 Wochen wurden 3 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse mit einer fettreichen Diät (58,7 Energie % Fett) ernährt, eine Kontrollgruppe mit einer fettarmen Diät. Nach einer Woche waren keine Unterschiede in der mRNA-Expression des Leptinrezeptors (LepRb), NPY und POMC feststellbar. Nach 8 Wochen war bei den Mäusen, die eine fettreiche Diät erhalten hatten, ein Anstieg des Plasmaleptins und der Leptinrezeptor-mRNA zu beobachten, die NPY-mRNA war erniedrigt und POMC-mRNA-Expression unverändert. Nach 19 Wochen zeigte sich eine Abnahme der Leptinrezeptor-mRNA, NPY-mRNA war weiterhin erniedrigt und die POMC-mRNA-Expression nahm ebenfalls ab (Lin *et al.* 2000b).

Eine weitere Studie an männlichen 12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen, die über einen Zeitraum von 22 Wochen mit einer fettreichen Diät (40 Energie % Fett) gefüttert wurden, berichtet von einer signifikant niedrigeren AGRP- (-31%) und POMC- (-29%) mRNA-Expression im ARC und von einer erhöhten Expression (+40%) von MC4R-mRNA (Huang *et al.* 2003).

Interessant sind auch die Untersuchungsergebnisse bei A/J Mäusen, die resistent gegen eine diätinduzierte Adipositas sind. Die Futteraufnahme der Mäuse, die eine fettreiche Diät (Gruppe 1: 44,9 Energie % Fett, Gruppe 2: 42,16 Energie % Fett) erhielten, stieg nach 2 Tagen an. Nach einer Woche war bei Mäusen mit fettreicher Diät gegenüber denen mit Standarddiät bei beiden Versuchsgruppen kein Unterschied in der kumulativen Futteraufnahme vorhanden. Auch nach 2, 3 und 4 Wochen war weiterhin kein Unterschied in

der Futteraufnahme und beim Körpergewicht zu beobachten. Nach einer Woche konnte aber ein signifikanter Anstieg der Plasmaleptinspiegel bei den mit einer fettreichen Diät ernährten Mäusen beobachtet werden. Auch nach 2 und 4 Wochen waren die Leptinspiegel weiterhin (wenn auch nicht signifikant) erhöht. Zu allen Zeitpunkten konnten keine Unterschiede in der mRNA-Expression der Neuropeptide NPY, AGRP und POMC zwischen den mit einer fettreichen und fettarmen Diät ernährten Mäusen festgestellt werden (Bullen *et al.* 2004).

Die zwei folgenden Versuche beschreiben den Einfluss einer schmackhaften Diät mit einem nur leicht erhöhten Fettgehalt auf die Neuropeptidexpression. Bei Wistar Ratten, die zur diätinduzierten Adipositas neigen, wurde ein erhöhter NPY Gehalt im Nucleus arcuatus, aber eine unveränderte NPY-mRNA-Expression festgestellt. Der Autor vermutet, dass dieser Anstieg durch eine verminderte NPY-Freisetzung zu erklären ist (Wilding *et al.* 1992). Wistar Ratten zeigen eine selektive Herunterregulation der MC4-Rezeptoren im ARC, DMH und VMH. Futterrestriktion bewirkt im Gegensatz dazu eine Hochregulation der hypothalamischen MC4-Rezeptordichte. Die AGRP-Konzentration ist nach 2 und 8 Wochen erhöht, während die POMC- und α-MSH-Konzentrationen im Hypothalamus dieser Ratten unverändert bleiben (Harrold *et al.* 1999). An 3 Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde nach 14 Wochen Fütterung einer fettreichen Diät (30 Energie % Fett) eine signifikante Abnahme der immunoreaktiven Neurone für die Peptide α-MSH und CART gefunden (Tian *et al.* 2004).

Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen zur Neuropeptidexpression bei hochkalorischer Ernährung kann man folgendermaßen zusammenfassen. Nach Fütterung einer fettreichen Diät ist bei Mäusen eine unveränderte Expression oder eine Abnahme der NPY-mRNA-Expression zu beobachten. Die POMC-mRNA-Expression steigt bei einer Fütterungsdauer von 2 Wochen, sinkt dann aber bei länger anhaltender Fütterung der fettreichen Diät ab, oder sie bleibt bei manchen Untersuchungen unverändert. Von dem Neuropeptid CART wird sowohl von einer unveränderten mRNA-Expression nach 2 Wochen Fütterung als auch von einer signifikanten Abnahme der immunoreaktiven Neurone nach 14 Wochen Fütterung einer fettreichen Diät berichtet.

### 4.9.4 Einfluss der physischen Aktivität auf die Adipositas und auf die Neuropeptidexpression

Von den verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten der Adipositas, zu denen Medikamente, Nahrungsrestriktion und zusätzliche physische Aktivität gehören, soll exemplarisch auf den

Einfluss der Bewegung eingegangen werden. Bei normaler Käfighaltung haben Nagetiere kaum ausreichende Bewegungsmöglichkeiten und in der vorliegenden Arbeit hat die thermoneutrale Haltung bei zwei Versuchsgruppen mit großer Wahrscheinlichkeit noch zu einer weiter abnehmenden Bewegung der Mäuse geführt.

Bei Long Evans Ratten mit diätinduzierter Adipositas, die gesüßte Milch als Zusatzfutter erhielten, wurde ein Einfluss des Geschlechts und der Bewegung auf die Hyperphagie beobachtet. Bei weiblichen Tieren wurde eine stärkere diätinduzierte Hyperphagie als bei männlichen Tieren beobachtet. Der Zugang zu einem Laufrad senkte die Futteraufnahme bei Männchen auf das Niveau der Vergleichsgruppe, die nur pelletiertes Standardfutter erhielt, wohingegen er bei Weibchen wohl zu einer Senkung der Futteraufnahme, nicht aber zu einer Normalisierung führte (Eckel *et al.* 2004). Eine andere Untersuchung beschäftigte sich darüber hinaus mit dem Einfluss der Bewegung auf die Neuropeptidexpression bei Sprague-Dawley Ratten. Die Bewegung im Laufrad führte zu einer Verminderung des Körpergewichts und der Fettmasse. Die POMC-Expression im ARC war um 25% erniedrigt, die NPY- und AGRP-Expression waren unverändert. Bei Ratten mit und ohne Zugang zu einem Laufrad wurde für 4 Wochen das Futter limitiert. Bei erneuter ad-libitum-Fütterung war die Futteraufnahme bei beiden Gruppen gleich, aber die Ratten mit Laufrad nahmen in den folgenden 2 Wochen weniger an Gewicht zu als die Tiere ohne Bewegungsmöglichkeit (Levin *et al.* 2004).

9 Wochen alte homozygote MC4R-defiziente Mäuse, die Zugang zu einem Laufrad im Käfig hatten, zeigten nach 20 Wochen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht und einen Rückgang der reproduktiven Dysfunktion. Die homozygoten MC4R-defizienten Mäuse zeigten gegenüber den Wildtypmäusen Hyperphagie, wenn sie ohne Laufrad gehalten wurden. Wenn homozygote Mäuse mit Laufrad gehalten wurden, war im Vergleich zu den Wildtypen kein Unterschied in der kumulativen Futteraufnahme zu beobachten. Wenn die Mäuse anschließend dann im Alter von 20 Wochen wieder ohne Laufrad gehalten wurden, stieg das Körpergewicht der MC4R-defizienten Mäusen wieder auf das Niveau der Gruppe ohne Laufrad an. Stellte man älteren 47 Wochen alten Mäusen ein Laufrad zur Verfügung, so konnte ein Trend zur Gewichtsabnahme in den ersten 5 Wochen beobachtet werden. Im Alter von 53 Wochen waren bei den homozygoten MC4R-defizienten Mäusen jedoch wieder Hyperphagie und ein Gewichtsanstieg zu beobachten (Irani *et al.* 2005). Der Versuch zeigt, dass körperliche Bewegung bei jungen Tieren der Entwicklung der Adipositas entgegenwirken kann.

In der vorliegenden Studie haben wenig Bewegung, die thermoneutrale Haltung und die hochkalorische Zusatznahrung die Entstehung und Entwicklung der Adipositas bei den untersuchten MC4R-defizienten Mäusen gefördert.

## 4.10 Einordnung der eigenen Befunde

In der vorliegenden Arbeit, in der Wildtypen und Mäuse mit einer MC4R-Defizienz untersucht wurden, zeigt sich bei der Untersuchung der Neuropeptidexpression klar eine schwächere Expression der Neuropeptide NPY, AGRP, POMC und CART bei Tieren, die ein hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und thermoneutral gehalten wurden, gegenüber den Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden. Beim Vergleich der orexigenen Peptide NPY und AGRP entspricht dies der bei Wildtyp und MC4R-defizienten Mäusen unter Standardbedingungen nachgewiesenen und unter Abschnitt 4.9.2 dargestellten Tendenz der Abschwächung der Neuropeptidexpression mit zunehmendem Körperfettgehalt. Bei den anorexigenen Peptiden POMC und CART wird bei hochkalorischer Zusatzfütterung und thermoneutraler Haltung nicht die zu erwartende Steigerung der Expression beobachtet, die (siehe Abb. 36 und Abb. 38) für 35 Tage alte Tiere unter Standardbedingungen auch in der vorliegenden Untersuchung für POMC als Tendenz und für CART als signifikant erkennbar ist. Es ist hingegen eine relative Abschwächung derart vorhanden, dass die Expressionswerte bei den Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter und Thermoneutralität nicht erhöht, sondern allenfalls gleichbleibend sind. Der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erkennbare Geschlechts- und Genotypeinfluss (Tabelle 11) wirkt sich in der der Kombination mit den besonderen Haltungsbedingungen offenbar in der zeitlichen Vorverlegung des Zusammenbruchs endogener gegenregulatorischer Prozesse zur Begrenzung der Fettdeposition aus. Die hier dargestellten Befunde wurden an Tieren im Alter von 35 Tagen erhoben. In Untersuchungen an Mäusen unter Standardbedingungen zeigten Wildtypen und MC4R-defiziente Mäuse im Alter von 56 Tagen noch Anpassungen im Sinne der Gegenregulation zur Begrenzung der Fettdeposition. Erst im Alter von 9 Monaten war diese Gegenregulation erloschen (Arens *et al.* 2003). Wie die vorliegende Untersuchung zeigt, ist bei hochkalorischer Zusatzfütterung und thermoneutraler Haltung das Versagen der Gegenregulation schon im Alter von 35 Tagen feststellbar. Während die Mäuse unter Standardbedingungen bis zu einem Alter von 56 Tagen versuchen, mit der Regulation der Neuropeptide einer weiteren Fettdeposition entgegenzuwirken (Arens 2005), so versagt bei Fütterung eines hochkalorischen Zusatzfutters und thermoneutraler Haltung die Regulation der anorexigenen Neuropeptide.

## 4.11 Steuerung orexigener und anorexigener Signale

Der gegenwärtige Stand der Erforschung der Steuerung orexigener und anorexigener Signale stellt sich wie folgt dar. Die bereits erwähnte Untersuchung (Lin *et al.* 2000b), die an 3 Wochen alten C57BL/6J Mäusen durchgeführt wurde, zeigt, dass in der frühen Phase (nach 1 Woche) der Ernährung mit einer hochkalorischen Diät keine Veränderungen im Plasmaleptinspiegel und der Neuropeptidexpression festzustellen sind. In der mittleren Phase (nach 8 Wochen) wird durch eine vermehrte Expression des Leptinrezeptors versucht, der Adipositas entgegenzuwirken. Schließlich führt nach 19 Wochen die Herunterregulation des POMC-Systems zu einem Zusammenbruch der Energiehomöostase und damit zur Entwicklung einer Adipositas. In der vorliegenden Arbeit lag bei den untersuchten Mäusen eine MC4R-Defizienz vor, zu der zusätzlich die Einflüsse einer hochkalorischen Zusatznahrung und der thermoneutralen Haltung berücksichtigt werden müssen. Bis zum Alter von 56 Tagen wurde in einer vorhergehenden Untersuchung bei MC4R-defizienten Mäusen unter Standardbedingungen bei der Korrelation der Neuropeptidexpression mit dem Körperfettgehalt eine hochsignifikante Abnahme der NPY- und AGRP-mRNA-Expression und ein Anstieg der POMC- und CART-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Körperfettgehalt, aber auch eine erhöhte NPY-mRNA-Expression bei MC4R-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen beobachtet (Arens 2005). Hyperphagie und erhöhte NPY-mRNA-Expression sind wahrscheinlich die Ursache und nicht die Folge für steigende Leptinspiegel und eine zunehmende Fettdeposition. Bei 9 Monate alten MC4R-defizienten Mäusen wurde eine zusätzliche NPY-Expression im VMN und DMN gefunden (Arens *et al.* 2003). Es ist anzunehmen, dass sich die bei älteren MC4R-defizienten Mäusen entwickelnde Leptinresistenz zur NPY-Expression in diesen Kerngebieten beiträgt. Der Vorgang beginnt jedoch schon zu einem Zeitpunkt, zu dem die NPY-Expression mit steigendem Körperfettgehalt bei der Betrachtung der Regression zu sinken scheint. Auch im Hypothalamus von C57BL/6J Mäusen mit diätinduzierter Adipositas hat man eine zusätzliche Expression von NPY im DMN und VMN gefunden. Die NPY-mRNA-Expression im ARC war dort aber um 44% erniedrigt (Guan *et al.* 1998).

In der vorliegenden Arbeit zeigen die 35 Tage alten Mäuse mit hochkalorischem Zusatzfutter eine starke Zunahme des Körperfettgehalts, einen Anstieg des Plasmaleptinspiegels und eine signifikant niedrigere NPY-, AGRP-, POMC- und CART-mRNA-Expression gegenüber den Tieren unter Standardbedingungen, wenn die Daten statistisch mit Hilfe einer ANCOVA ausgewertet wurden. Die Durchführung des Mann-Whitney Tests ergibt für die POMC-mRNA-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Haltungsgruppen.

9 Monate alte homozygote MC4R-defiziente Mäuse zeigen unter Standardbedingungen gegenüber jüngeren Homozygoten eine höhere NPY- und AGRP-Expression, eine niedrigere POMC-Expression und eine unveränderte CART-Expression (Arens *et al.* 2003).

Eine interessante Theorie geht davon aus, dass katabole Regelmechanismen (sie hemmen die Futteraufnahme und erhöhen die metabolische Rate) durch die basalen Leptin- und Insulinwerte aktiviert sind. Anabole Mechanismen (sie stimulieren die Futteraufnahme und senken die metabolische Rate) sind im Gegensatz dazu bei basalen Konzentrationen von Leptin und Insulin weitgehend gehemmt. Die Antwort bei Gewichtsverlust führt zu einer Aktivierung der anabolen und zu einer Hemmung der katabolen Regelkreise. Umgekehrt führt eine Gewichtszunahme zu einer weiteren Aktivierung der katabolen (bereits aktivierten) Regelmechanismen und zu einer Hemmung der anabolen (bereits gehemmten) Regelmechanismen (Schwartz *et al.* 2003). Die Beobachtung, dass die Zerstörung des Nucleus arcuatus zu einer Gewichtszunahme führt (Bergen *et al.* 1998) bestätigt die vermutete stärkere Wirksamkeit von katabolen Regelmechanismen.

Außerdem gibt es Anzeichen, dass anabole Regelmechanismen sensitiver als katabole sind. Vielleicht ist dies damit zu erklären, dass die NPY/AGRP-Neurone im medialen Teil des Nucleus arcuatus liegen, somit dichter als die POMC/CART-Neurone an der Eminentia mediana lokalisiert und wahrscheinlich auch höheren Konzentrationen von Leptin und Insulin ausgesetzt sind (Schwartz *et al.* 2003).

Untersuchungen an Knockout Mäusen legen nahe, dass weder AGRP noch NPY unbedingt notwendige orexigene Faktoren sind. Andere Regelsysteme der Energiehomöostase scheinen die Effekte dieser Neuropeptide zu kompensieren. AGRP -/- Mäuse zeigen keine Änderungen in der Futteraufnahme und der Körperzusammensetzung, außerdem haben sie eine unveränderte POMC und NPY-mRNA-Expression. Auch AGRP -/-; NPY -/- Doppel-Knockout Mäuse zeigen keine Veränderungen in der Futteraufnahme und im Körpergewicht. (Qian *et al.* 2002). Im Gegensatz dazu beobachtet man, dass POMC und MC4R Mutationen und auch CART-Knockout Mäuse Adipositas entwickeln.

Bei fettreicher Diät erfolgt wahrscheinlich eine unzureichende Regulation der katabolen Mechanismen, was sich durch eine geringere mRNA-Expression der Neuropeptide POMC und CART zeigt. Der Grund besteht darin, dass die Tiere unter diesen Fütterungsbedingungen besonders schnell eine Leptinresistenz entwickeln. Unter ähnlichen Ernährungsbedingungen ist bei Osborne-Mendel Ratten nach 5 Tagen (Lin *et al.* 2001) und bei C57BL/6 Mäusen nach 16 Tagen eine Leptinresistenz zu beobachten (Van Heek *et al.* 1997).

Die Gabe einer fettreichen Diät bewirkt einen Anstieg des Plasmaleptinspiegels. Leptin induziert die Expression der SOCS-3-mRNA im Hypothalamus. SOCS-3 hemmt die Leptinsignaltransduktion. SOCS-3-Spiegel sind bereits 2-3 Stunden nach Leptinbehandlung erhöht und bleiben 20 Stunden erhöht. SOCS-3 hemmt die leptininduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von JAK2. Eine erhöhte SOCS-3-Aktivität ist ein potentieller Mechanismus für Leptinresistenz (Bjorbaek *et al.* 1999). Leptinresistenz bei diätinduzierter Adipositas ist sowohl durch erhöhte Plamaleptinspiegel als auch durch eine verminderte Antwort auf die exogene Gabe von Leptin charakterisiert. Durch Leptin aktivierte P-STAT3-Expression war bereits nach 6 Tagen, nach 4 Wochen und nach 16 Wochen der Fütterung einer fettreichen Diät (58 Energie % Fett) im Nucleus arcuatus vermindert. In anderen Regionen des Hypothalamus wurden SOCS-3 und der Leptinrezeptor LepRb untersucht. Zwischen Tieren, die eine fettarme Diät und eine fettreiche Diät erhielten, war kein Unterschied in der Leptinrezeptor-mRNA zu beobachten. Die SOCS-3-mRNA war bei Tieren mit einer fettreichen Diät in der Region des ARC, aber nicht im VMH und DMH signifikant erhöht, was mit dem Befund der selektiv im ARC gefundenen reduzierten STAT3-Phosphorylierung übereinstimmt. Deshalb wird angenommen, dass erhöhte SOCS-3-Spiegel für die gestörte Leptinsignaltransduktion im ARC von Mäusen mit diätinduzierter Adipositas verantwortlich sind (Munzberg *et al.* 2004). Es gibt Hinweise, dass Leptin die POMC-Gentranskription durch die Aktivierung von intrazellulären Signalüberträgern und die Aktivierung von STAT3 bewirkt (Munzberg *et al.* 2003). Damit wäre eine erniedrigte POMC-Expression durch die auftretende Leptinresistenz und die damit verbundenen erhöhten SOCS3-Spiegel und eine reduzierte STAT3-Phosphorylierung zu erklären. Da SOCS-3-defiziente Mäuse während der Embryonalentwicklung sterben, wurde ein konditionaler Knockout, der die neuronalen Zellen betrifft, erzeugt. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte leptininduzierte hypothalamische STAT3-Tyrosin-Phosphorylierung und eine erhöhte POMC-Induktion. Sie waren resistent gegen eine durch eine fettreiche Diät ausgelöste Gewichtszunahme und Hyperleptinämie, ihre Insulinsensitivität blieb erhalten (Mori *et al.* 2004).

Hinzu kommt, dass bei den Melanokortin-4-Rezeptor-defizienten Mäusen der Rezeptor bei heterozygoten Tieren teilweise und bei Homozygoten vollständig gestört ist, was die Wirkung der durch das Leptin induzierten Neuropeptide AGRP und des aus POMC durch Prozessierung entstehenden α-MSH beeinträchtigt.

Eine Untersuchung zeigte, dass exogenes Leptin auch unabhängig vom MC4-Rezeptor die Futteraufnahme senken kann, da schlanke homozygote MC4R-defiziente Mäuse bei Leptingabe mit einer Senkung der Futteraufnahme reagieren (Marsh *et al.* 1999).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei der vorliegenden Untersuchung die orexigenen Neuropeptide NPY und AGRP eine Reaktion auf die erhöhten Plasmaleptinspiegel und die erhöhte Fetteinlagerung zeigen, aber nicht in der Lage sind, der vermehrten Fettdeposition entgegenzuwirken. Die Untersuchung von AGRP -/-; NPY -/- Doppel-Knockout Mäusen hat gezeigt, dass bei diesen Mäusen keine Veränderungen in der Futteraufnahme und im Körpergewicht festzustellen sind, was die Relevanz dieser Neuropeptide in Frage stellt. Normalerweise aktiviert Leptin die Expression der Neuropeptide POMC und CART. Anorexigene Neuropeptide reagieren in der vorliegenden Arbeit nicht in der erwarteten Weise. Die verminderte POMC-Expression ist sehr wahrscheinlich auf eine Leptinresistenz der MC4R-defizienten Mäuse zurückzuführen. Da POMC und CART im ARC koexprimiert sind und durch Leptin induziert werden, ist es möglich, dass die Abnahme der mRNA-Expression des Neuropeptids CART auch durch das Auftreten einer Leptinreistenz verursacht wird. Bisher konnte noch kein CART-Rezeptor nachgewiesen werden. Da das Neuropeptid CART auch mit dem orexigen wirkenden MCH im lateralen Hypothalamus koexprimiert wird, vermutet man auch eine eher modulierende Rolle von CART bei der Körpergewichtsregulation.

Da bei MC4R-defizienten Mäusen der Rezeptor, an dem AGRP und α-MSH angreifen, gestört ist, werden die Mechanismen der Körpergewichtsregulation zusätzlich zu der bei fettreicher Diät auftretenden Leptinresistenz und der damit verbundenen Störung der Leptinsignaltransduktion beeinträchtigt. Die Fütterung eines hochkalorischen Zusatzfutters und die thermoneutrale Haltung führen bei Wildtypen und MC4R-defizienten Mäusen dazu, dass bereits in einem Alter von 35 Tagen die fehlende Gegenregulation der anorexigenen Neuropeptide zu einem Zusammenbruch der Energiehomöostase führt.

# 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Melanokortin-4-Rezeptor-Defekt (mit einer Prävalenz von 2-6% in einem adipösen Patientenkollektiv) ist die bisher am häufigsten nachgewiesene monogenetische Form der Adipositas beim Menschen. Daher ist es auch in Bezug auf die Relevanz beim Menschen interessant, ein Mausmodell mit einem MC4-Rezeptordefekt zu untersuchen. Durch die Untersuchung verschiedener Altersstufen, die entsprechend den Entwicklungsphasen der Mäuse ausgewählt wurden, sollte die Entstehung und Entwicklung der Adipositas bei diesen Mäusen möglichst frühzeitig analysiert werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, welchen Einfluss eine hochkalorische Zusatzdiät und thermoneutrale Haltung, womit die Lebensbedingungen von Menschen in industrialisierten Ländern simuliert werden sollten, auf die Ausprägung der Adipositas ausüben. Schließlich wurde sowohl bei Tieren unter Standardbedingungen als auch bei Tieren mit hochkalorischem Zusatzfutter und thermoneutraler Haltung im Alter von 35 Tagen die mRNA-Expression der Neuropeptide NPY, AGRP, POMC und CART im Nucleus arcuatus gemessen. Die Bestimmung des Körpergewichts, der Körperzusammensetzung, der Plasmaleptinwerte, der Futteraufnahme, des Sauerstoffverbrauchs und der Expression der Neuropeptide und die anschließende statistische Auswertung der Ergebnisse sollten Aufschlüsse über die Ursachen der Adipositas bei MC4R-defizienten Mäusen geben.

Unter Standardbedingungen sind beim Körpergewicht und beim Körperfettgehalt der Wildtypen und MC4R-defizienten Mäuse Geschlechts- und Genotypunterschiede ab Tag 35 zu beobachten. Am Tag 35 sind +/- und -/- Tiere signifikant verschieden, ab Tag 56 tritt auch ein Heterozygoteneffekt auf. Ab Tag 35 haben Männchen eine höhere FFDM als Weibchen.

Der Vergleich der Körperzusammensetzung der 35 Tage alten Mäuse unter Standardbedingungen mit den Tieren, die hochkalorisches Zusatzfutter erhielten und thermoneutral gehalten wurden, zeigt einen signifikanten Einfluss der Haltungsbedingungen, des Geschlechts und des Genotyps auf das Körpergewicht, die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt. Bei 56 Tage alten Tieren erhält man ähnliche Ergebnisse. Hier zeigt sich außerdem ein Genotypeinfluss auf die FFDM, jedoch kein Einfluss der Haltungsbedingungen auf das Körpergewicht und kein Geschlechtseinfluss auf die Körperfettmasse. Mäuse beider Altersgruppen mit hochkalorischem Zusatzfutter unter thermoneutralen Bedingungen zeigen eine Abnahme der FFDM und eine Zunahme des Körperfettgehalts. Alle Genotypen erhöhen

bei hochkalorischer Zusatzfütterung und thermoneutraler Haltung ihren Körperfettgehalt. Bei 35 Tage alten Wildtypen ist der Körperfettgehalt verdoppelt, bei 56 Tage alten +/+ Weibchen ist er sogar beinahe vervierfacht.

Die Plasmaleptinwerte sind unter Standardbedingungen innerhalb einer Altersgruppe unabhängig vom Geschlecht und Genotyp linear mit der Körperfettmasse und dem Körperfettgehalt korreliert. 85% der Variabilität der Plasmaleptinwerte sind auf den Einfluss des Körperfettgehaltes und nur 1% auf den Einfluss des Genotyps zurückzuführen. Bei hochkalorischer Zusatzfütterung unter thermoneutralen Bedingungen haben Weibchen signifikant höhere Plasmaleptinwerte als Männchen. Der Einfluss des Genotyps auf die Leptinwerte ist aber ebenso gering wie bei den Mäusen unter Standardbedingungen.

Die statistische Analyse der kumulativen Futteraufnahme vom Absetzen bis zum Tag 35 oder 56 ergab für die 35 Tage alten Tiere einen signifikanten Einfluss des Wurfes, des Geschlechts und des Genotyps und eine Genotyp/Geschlecht-Interaktion. Die Ergebnisse für die 56 Tage alten Tiere stimmen mit denen der jüngeren Tiere überein, das Signifikanzniveau ist sogar höher, nur die Genotyp/Geschlecht-Interaktion ist nicht nachweisbar. Bei beiden Altersstufen haben weibliche Mäuse eine höhere Präferenz für hochkalorisches Zusatzfutter als männliche Mäuse.

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels indirekter Kalorimetrie ergab, dass -/- Tiere mehr Sauerstoff als Wildtypen und Heterozygote verbrauchen. Die sich entwickelnde Adipositas ist auf Hyperphagie und nicht auf einen Hypometabolismus zurückzuführen. Die Tiere steigern nicht in gleichem Maß die metabolische Rate wie sie die Futteraufnahme steigern. Der höhere Sauerstoffverbrauch der MC4R-defizienten Mäuse entspricht der Zunahme der FFDM der Tiere während des Versuchszeitraums.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden signifikante negative Korrelationen der mRNA-Expression der orexigenen Neuropeptide NPY und AGRP mit dem Körperfettgehalt, aber keine signifikanten Korrelationen der anorexigenen Neuropeptide POMC und CART festgestellt. Die ANCOVA ergab für alle vier untersuchten Neuropeptide eine signifikant niedrigere Expression der Neuropeptide bei den Mäusen mit Zugang zu hochkalorischem Zusatzfutter und thermoneutraler Haltung im Vergleich zu den Mäusen unter

Standardbedingungen. Dieser Zusammenhang steht im Vergleich zu anderen Einflussgrößen wie dem Geschlecht und dem Genotyp im Vordergrund. Die MC4R-Defizienz führt offenbar bei hochkalorischer Zusatznahrung und thermoneutraler Haltung zu einem früheren Erlöschen der Gegenregulation zur Begrenzung der Adipositas, als dies unter Standardbedingungen der Fall ist.

# 6 ANHANG – VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN

## 6.1 Beschichten der Objektträger

- Herstellung von DEPC Wasser:

  dest. Wasser
  0,1% Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) (Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD)

über Nacht auf einem Rührgerät im Abzug stehen lassen, dabei sollen die RNasen inaktiviert werden, anschließendes Autoklavieren spaltet das DEPC Molekül in flüchtiges $CO_2$ und Ethanol

- Ansetzen der 5%igen Gelatine-Lösung:

  1,5 g Gelatine (G-2500, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
  300 ml DEPC-Wasser
  0,15 g $CrK(SO_4)_2$*12 $H_2O$ (VWR International, Poole, UK)

- Ansetzen der Poly-L-Lysin-Lösung:

  25 mg Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)
  300 ml DEPC-Wasser
  3 ml 1M TRIS (pH8) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD)

## 6.2 Herstellung der radioaktiv markierten RNA-Sonde

- Herstellung des 0,75M Dithiothreitol (DTT):

  2,32 g DTT (Promega Ltd., Southampton, UK)
  20 ml 0,01M Sodiumacetat (pH 5,2; mit DEPC-Wasser angesetzt) (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  als Aliquot bei -20°C gelagert

- 5x Transkriptionspuffer, Bestandteil des Promega Transkriptions-Kits (Promega Ltd., Southampton, UK), bei -20°C gelagert
- linearisierte Plasmid-DNA, bei +4°C gelagert
- rNTP-1:1:1 Mix (ATP, GTP, CTP, ursprüngliche Basenkonzentration 10 mM) Bestandteil des Promega Transkriptions-Kits (Promega Ltd., Southampton, UK), bei -20°C gelagert
- RNAse Block I (38,2 U/µl) (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), bei -20°C gelagert
- $^{35}$S-UTP (12,5µCi/µl) (NEN Life Science Products, Zaventem, B), bei +4°C gelagert
- RNA-Polymerase (Promega Ltd., Southampton, UK), bei -20°C gelagert

- DEPC-Wasser
- DNase (1 U/µl), Bestandteil des Promega Transkriptions-Kits (Promega Ltd., Southampton, UK), bei -20°C gelagert
- MicroSpin™ G-50 Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc., New Jersey, USA)
- Szintillationsflüssigkeit (PerkinElmer Inc., Boston, MA, USA)

## 6.3 Herstellung des Hybridisierungspuffers

- Herstellung von Dextransulfat:

  1,5 ml DEPC-Wasser
  1 g Dextransulfat (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)

auf 60°C erwärmen, nach ca. 1 Stunde stark vortexen, dann für eine weitere halbe Stunde erwärmen bis das Dextransulfat vollständig gelöst ist.

- Herstellung von 5M NaCl:

  29,22 g NaCl (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  100 ml dest. Wasser
  1% DEPC

über Nacht stehen lassen, autoklavieren und als Aliquot bei -20°C lagern

- Herstellung des 1M TRIS (pH 8):

  12,11 g TRIS (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  80 ml DEPC-Wasser

das vorkalibrierte pH-Meter wird über Nacht mit DEPC behandelt, den pH-Wert mit HCl einstellen und auf 100 ml mit DEPC-Wasser auffüllen, bei -20°C als Aliquot lagern.

- Herstellung von 0,5M EDTA (pH 8):

  18,61 g EDTA (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  80 ml dest. Wasser.

den pH-Wert mit NaOH eingestellen, Lösung auf 100 ml auffüllen und mit DEPC behandeln, als Aliquot bei -20°C lagern

- Formamid (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK), bei -20°C als Aliquot gelagert
- 50x Denhardts-Lösung (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK), bei -20°C als Aliquot gelagert
- DEPC-Wasser

## 6.4 Herstellung der Hybridisierungslösung

- Herstellung von 1M Dithiothreitol (DTT):

  3,09 g DTT (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  20 ml 0,01M Sodiumacetat (pH 5,2, mit DEPC-Wasser angesetzt), (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK) bei -20°C als Aliquot gelagert

- tRNA (3,9 mg/ml, E.Coli MRE 600) (Boehringer Ingelheim Ltd. Bracknell, UK)
- antisense-Sonde siehe Punkt 6.2
- Hybridisierungspuffer siehe Punkt 6.3
- DEPC-Wasser

## 6.5 Hybridisierung

- Herstellung von 0,2M Phosphatpuffer (PB):

  11,36 g $NaH_2PO_4*2H_2O$ (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  45,44 g $Na_2HPO_4$ (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  2 l dest. Wasser

über Nacht mit DEPC behandeln, bei Raumtemperatur lagern

zur Herstellung von 0,1M PB wird der 0,2M PB 1:1 mit DEPC-Wasser verdünnt.

- Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd:

  24 g Paraformaldehyd (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  300 ml DEPC-Wasser unter Rühren auf 60°C erhitzen, anschließend
  24 Tropfen 10N NaOH (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)

zugeben, bis die Lösung klar wird, nach dem Abkühlen 1:2 mit 0,2M PB verdünnen und auf Eis stellen.

- Herstellung der aufsteigenden Alkoholreihe (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK):

| | | | |
|---|---|---|---|
| 50% EtOH | 250 ml Alkohol abs. | + | 250 ml DEPC-Wasser |
| 70% EtOH | 350 ml | + | 150 ml |
| 95% EtOH | 476 ml | + | 24 ml |
| 100% EtOH | 500 ml | | |

- Hybridisierungslösung, Herstellung siehe Punkt 6.4
- DPX (Agar Scientific Ltd., Stansted, UK)

## 6.6 Posthybridisierung

- Herstellung von 20x SSC (NaCl/Natriumcitrat-Puffer):

  175,3 g NaCl (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  88,2 g Trisodiumcitrat (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)
  1 l dest. Wasser

über Nacht mit DEPC behandeln, bei Raumtemperatur lagern. Zur Herstellung von 4x SSC wird die Lösung 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt.

- Herstellung der SSC-Verdünnungen:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2,0x SSC | 500,0 ml 4x SSC | +500,0 ml dest. Wasser | + 1,0 ml DTT |
| 1,0x SSC | 375,0 ml | +375,0 ml | + 0,5 ml |
| 0,5x SSC | 62,5 ml | +437,5 ml | + 0,5 ml |
| 0,1x SSC | 25,0 ml | +975,0 ml | + 1,0 ml |

- 5M NaCl, Herstellung siehe Punkt 6.3
- 1M Tris (pH 8), Herstellung siehe Punkt 6.3
- 0,5M EDTA, Herstellung siehe Punkt 6.3
- dest. Wasser
- RNase, 10 mg/ml, 1:100 verdünnt (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK), bei -20°C als Aliquot gelagert
- Autoradiographie [$^{14}$C] micro-scales, Code RPA 504 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)
- Kodak Biomax MR Film, (Sigma Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK)

## 6.7 Filmentwicklung

Entwickler (Kodak Limited, Hemel Hempstead, UK)

Fixierer (Kodak Limited, Hemel Hempstead, UK)

# 7 LITERATURVERZEICHNIS


Ahima, R.S. and J.S. Flier (2000). "Leptin." Annu Rev Physiol 62: 413-37.

Ahima, R.S., J. Kelly, J.K. Elmquist and J.S. Flier (1999). "Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia." Endocrinology 140(11): 4923-31.

Ahima, R.S. and S.Y. Osei (2004). "Leptin signaling." Physiol Behav 81(2): 223-41.

Ahren, B., S. Mansson, R.L. Gingerich and P.J. Havel (1997). "Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting." Am J Physiol 273(1 Pt 2): R113-20.

Ahren, B. and A.J. Scheurink (1998). "Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice." Eur J Endocrinol 139(4): 461-7.

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.

Arens, J. (2005). "Alters- und genotypbedingte Änderungen der Neuropeptidexpression im Hypothalamus von Wildtypen und Melanokortin-4 Rezeptor-defizienten Mäusen." Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

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.

Asnicar, M.A., D.P. Smith, D.D. Yang, M.L. Heiman, N. Fox, Y.F. Chen, H.M. Hsiung and A. Koster (2001). "Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet." Endocrinology 142(10): 4394-400.

Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J.P. Laigneau, M.N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel*, et al.* (1998). "The stomach is a source of leptin." Nature 394(6695): 790-3.

Bai, F., T. Rankinen, C. Charbonneau, D.D. Belsham, D.C. Rao, C. Bouchard and G. Argyropoulos (2004). "Functional dimorphism of two hAgRP promoter SNPs in linkage disequilibrium." J Med Genet 41(5): 350-3.

Balkan, B., E. Koylu, S. Pogun and M.J. Kuhar (2003). "Effects of adrenalectomy on CART expression in the rat arcuate nucleus." Synapse 50(1): 14-9.

Banks, W.A., A.J. Kastin, W. Huang, J.B. Jaspan and L.M. Maness (1996). "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin." Peptides 17(2): 305-11.

Barker, D.J., C.N. Hales, C.H. Fall, C. Osmond, K. Phipps and P.M. Clark (1993). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth." Diabetologia 36(1): 62-7.

Barsh, G.S. and M.W. Schwartz (2002). "Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration." Nat Rev Genet 3(8): 589-600.

Beck, B. (2001). "KO's and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms." Neurosci Biobehav Rev 25(2): 143-58.

Bergen, H.T., T.M. Mizuno, J. Taylor and C.V. Mobbs (1998). "Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin." Endocrinology 139(11): 4483-8.

Billington, C.J., J.E. Briggs, S. Harker, M. Grace and A.S. Levine (1994). "Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism." Am J Physiol 266(6 Pt 2): R1765-70.

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.

Blomqvist, A.G. and H. Herzog (1997). "Y-receptor subtypes--how many more?" Trends Neurosci 20(7): 294-8.

Bockaert, J. (2001). "G Protein-coupled Receptors." Encyclopedia of Life Science.

Brownlee, K.A. (1965). "Statistical theory and methodology in science and engineering." J. Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.

Bruning, J.C., D. Gautam, D.J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P.C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland and C.R. Kahn (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." Science 289(5487): 2122-5.

Bullen, J.W., Jr., M. Ziotopoulou, L. Ungsunan, J. Misra, I. Alevizos, E. Kokkotou, E. Maratos-Flier, G. Stephanopoulos and C.S. Mantzoros (2004). "Short-term resistance to diet-induced obesity in A/J mice is not associated with regulation of hypothalamic neuropeptides." Am J Physiol Endocrinol Metab 287(4): E662-70.

Bultman, S.J., E.J. Michaud and R.P. Woychik (1992). "Molecular characterization of the mouse agouti locus." Cell 71(7): 1195-204.

Butler, A.A., R.A. Kesterson, K. Khong, M.J. Cullen, M.A. Pelleymounter, J. Dekoning, M. Baetscher and R.D. Cone (2000). "A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse." Endocrinology 141(9): 3518-21.

Butler, A.A., D.L. Marks, W. Fan, C.M. Kuhn, M. Bartolome and R.D. Cone (2001). "Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat." Nat Neurosci 4(6): 605-11.

Casabiell, X., V. Pineiro, M.A. Tome, R. Peino, C. Dieguez and F.F. Casanueva (1997). "Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake." J Clin Endocrinol Metab 82(12): 4270-3.

Chan, J.M., E.B. Rimm, G.A. Colditz, M.J. Stampfer and W.C. Willett (1994). "Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men." Diabetes Care 17(9): 961-9.

Chen, A.S., D.J. Marsh, M.E. Trumbauer, E.G. Frazier, X.M. Guan, H. Yu, C.I. Rosenblum, A. Vongs, Y. Feng, L. Cao*, et al.* (2000b). "Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass." Nat Genet 26(1): 97-102.

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*, et al.* (2000a). "Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice." Transgenic Res 9(2): 145-54.

Cheung, C.C., D.K. Clifton and R.A. Steiner (1997). "Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus." Endocrinology 138(10): 4489-92.

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.

Clark, J.T., P.S. Kalra, W.R. Crowley and S.P. Kalra (1984). "Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats." Endocrinology 115(1): 427-9.

Clement, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gourmelen, C. Dina, J. Chambaz, J.M. Lacorte*, et al.* (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." Nature 392(6674): 398-401.

Colditz, G.A., W.C. Willett, A. Rotnitzky and J.E. Manson (1995). "Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women." Ann Intern Med 122(7): 481-6.

Coleman, D.L. (1973). "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice." Diabetologia 9(4): 294-8.

Coleman, D.L. and K.P. Hummel (1969). "Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice." Am J Physiol 217(5): 1298-304.

Coleman, R.A. and T.S. Herrmann (1999). "Nutritional regulation of leptin in humans." Diabetologia 42(6): 639-46.

Coll, A.P., I.S. Farooqi, B.G. Challis, G.S. Yeo and S. O'Rahilly (2004). "Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics." J Clin Endocrinol Metab 89(6): 2557-62.

Considine, R.V. and J.F. Caro (1997). "Leptin and the regulation of body weight." Int J Biochem Cell Biol 29(11): 1255-72.

Cumin, F., H.P. Baum and N. Levens (1997). "Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney." J Endocrinol 155(3): 577-85.

del Giudice, E.M., N. Santoro, G. Cirillo, L. D'Urso, R. Di Toro and L. Perrone (2001). "Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family." Diabetes 50(9): 2157-60.

Dey, A., X. Xhu, R. Carroll, C.W. Turck, J. Stein and D.F. Steiner (2003). "Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3." J Biol Chem 278(17): 15007-14.

DGE (2004). "Deutsche Gesellschaft für Ernährung 10 Regeln der DGE."

Dhillo, W.S. and S.R. Bloom (2004). "Gastrointestinal hormones and regulation of food intake." Horm Metab Res 36(11-12): 846-51.

Dinulescu, D.M. and R.D. Cone (2000). "Agouti and agouti-related protein: analogies and contrasts." J Biol Chem 275(10): 6695-8.

Doi, K. and A. Kuroshima (1979). "Lasting effect of infantile cold experience on cold tolerance in adult rats." Jpn J Physiol 29(2): 139-50.

Döring, H. (2000). "Wirkung von rekombinatem Leptin auf den Energiehaushalt von Mäusen in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot." Dissertation, Phillipps-Universität, Marburg.

Dörner, G. (1976). "Hormones and brain differentiation." Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

Drazen, D.L., M.D. Wortman, M.W. Schwartz, D.J. Clegg, G. van Dijk, S.C. Woods and R.J. Seeley (2003). "Adrenalectomy alters the sensitivity of the central nervous system melanocortin system." Diabetes 52(12): 2928-34.

Eckel, L.A. and S.R. Moore (2004). "Diet-induced hyperphagia in the rat is influenced by sex and exercise." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287(5): R1080-5.

Eckert, R. (1993). "Tierphysiologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Elias, C.F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R.S. Ahima, P.R. Couceyro, M.J. Kuhar, C.B. Saper and J.K. Elmquist (1998). "Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord." Neuron 21(6): 1375-85.

Elmquist, J.K., C. Bjorbaek, R.S. Ahima, J.S. Flier and C.B. Saper (1998). "Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain." J Comp Neurol 395(4): 535-47.

Erickson, J.C., K.E. Clegg and R.D. Palmiter (1996b). "Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y." Nature 381(6581): 415-21.

Erickson, J.C., G. Hollopeter and R.D. Palmiter (1996a). "Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y." Science 274(5293): 1704-7.

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**:** 150-7.

Fan, W., D.M. Dinulescu, A.A. Butler, J. Zhou, D.L. Marks and R.D. Cone (2000). "The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels." Endocrinology 141(9): 3072-9.

Fetissov, S.O., J. Kopp and T. Hokfelt (2004). "Distribution of NPY receptors in the hypothalamus." Neuropeptides 38(4): 175-88.

Franke, K., T. Harder, L. Aerts, K. Melchior, S. Fahrenkrog, E. Rodekamp, T. Ziska, F.A. Van Assche, J.W. Dudenhausen and A. Plagemann (2005). "'Programming' of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats." Brain Res 1031(2): 276-83.

Franklin, K.B.J., G. Paxinos (1997). "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

Frederich, R.C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B.B. Lowell and J.S. Flier (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." Nat Med 1(12): 1311-4.

Gainsford, T., T.A. Willson, D. Metcalf, E. Handman, C. McFarlane, A. Ng, N.A. Nicola, W.S. Alexander and D.J. Hilton (1996). "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." Proc Natl Acad Sci U S A 93(25): 14564-8.

Geller, F., K. Reichwald, A. Dempfle, T. Illig, C. Vollmert, S. Herpertz, W. Siffert, M. Platzer, C. Hess, T. Gudermann*, et al.* (2004). "Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity." Am J Hum Genet 74(3): 572-81.

Gonzales, C., M.J. Voirol, M. Giacomini, R.C. Gaillard, T. Pedrazzini and F.P. Pralong (2004). "The neuropeptide Y Y1 receptor mediates NPY-induced inhibition of the gonadotrope axis under poor metabolic conditions." Faseb J 18(1): 137-9.

Govaerts, C., S. Srinivasan, A. Shapiro, S. Zhang, F. Picard, K. Clement, C. Lubrano-Berthelier and C. Vaisse (2005). "Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function." Peptides 26(10): 1909-19.

Graham, M., J.R. Shutter, U. Sarmiento, I. Sarosi and K.L. Stark (1997). "Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice." Nat Genet 17(3): 273-4.

Gross, P.M. (1992). "Circumventricular organ capillaries." Progress in Brain Research 91: 219-233.

Guan, X.M., H. Yu, M. Trumbauer, E. Frazier, L.H. Van der Ploeg and H. Chen (1998). "Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice." Neuroreport 9(15): 3415-9.

Guilmeau, S., M. Buyse and A. Bado (2004). "Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function." Curr Opin Pharmacol 4(6): 561-6.

Hagan, M.M., P.A. Rushing, L.M. Pritchard, M.W. Schwartz, A.M. Strack, L.H. Van Der Ploeg, S.C. Woods and R.J. Seeley (2000). "Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279(1): R47-52.

Hagan, M.M., P.A. Rushing, M.W. Schwartz, K.A. Yagaloff, P. Burn, S.C. Woods and R.J. Seeley (1999). "Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding." J Neurosci 19(6): 2362-7.

Hales, C.N. and D.J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." Br Med Bull 60: 5-20.

Harrold, J.A., G. Williams and P.S. Widdowson (1999). "Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP), but not alpha-MSH or pro-opiomelanocortin concentrations in dietary-obese and food-restricted rats." Biochem Biophys Res Commun 258(3): 574-7.

Haskell-Luevano, C. and E.K. Monck (2001). "Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor." Regul Pept 99(1): 1-7.

Hebebrand, J., Wermter, A.-K., Hinney, A. (2004). "Adipositas." Monatszeitschrift Kinderheilkunde 8: 870-876.

Heijboer, A.C., P.J. Voshol, E. Donga, C.G. van Eden, L.M. Havekes, J.A. Romijn, H. Pijl and E.P. Corssmit (2005). "High fat diet induced hepatic insulin resistance is not related to changes in hypothalamic mRNA expression of NPY, AgRP, POMC and CART in mice." Peptides 26(12): 2554-8.

Hervey, G.R. (1959). "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats." J Physiol 145(2): 336-52.

Himms-Hagen, J. (1997). "On raising energy expenditure in ob/ob mice." Science 276(5315): 1132-3.

Hinney, A., I. Becker, O. Heibult, K. Nottebom, A. Schmidt, A. Ziegler, H. Mayer, W. Siegfried, W.F. Blum, H. Remschmidt*, et al.* (1998). "Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes." J Clin Endocrinol Metab 83(10): 3737-41.

Hinney, A., A. Schmidt, K. Nottebom, O. Heibult, I. Becker, A. Ziegler, G. Gerber, M. Sina, T. Gorg, H. Mayer*, et al.* (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.

Huang, X.F., M. Han, T. South and L. Storlien (2003). "Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity." Brain Res 992(1): 9-19.

Hunter, R.G., K. Philpot, A. Vicentic, G. Dominguez, G.W. Hubert and M.J. Kuhar (2004). "CART in feeding and obesity." Trends Endocrinol Metab 15(9): 454-9.

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*, et al.* (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." Cell 88(1): 131-41.

Ikeda, A., P.M. Nishina and J.K. Naggert (2002). "The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function." J Cell Sci 115(Pt 1): 9-14.

Ingalls, A.M., M.M. Dickie and G.D. Snell (1950). "Obese, a new mutation in the house mouse." J Hered 41(12): 317-8.

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.

Jakicic, J.M. and A.D. Otto (2005). "Physical activity considerations for the treatment and prevention of obesity." Am J Clin Nutr 82(1 Suppl): 226S-229S.

Kalra, S.P., M. Bagnasco, E.E. Otukonyong, M.G. Dube and P.S. Kalra (2003). "Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity." Regul Pept 111(1-3): 1-11.

Kalra, S.P. and P.S. Kalra (2004). "NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy." Neuropeptides 38(4): 201-11.

Kellendonk, C., S. Eiden, O. Kretz, G. Schutz, I. Schmidt, F. Tronche and E. Simon (2002). "Inactivation of the GR in the nervous system affects energy accumulation." Endocrinology 143(6): 2333-40.

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.

Kesterson, R.A., D. Huszar, C.A. Lynch, R.B. Simerly and R.D. Cone (1997). "Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome." Mol Endocrinol 11(5): 630-7.

Kopelman, P.G. (2000). "Obesity as a medical problem." Nature 404(6778): 635-43.

Korner, J., E. Savontaus, S.C. Chua, Jr., R.L. Leibel and S.L. Wardlaw (2001). "Leptin regulation of Agrp and Npy mRNA in the rat hypothalamus." J Neuroendocrinol 13(11): 959-66.

Kristensen, P., M.E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K.N. Christjansen, B.S. Wulff, J.T. Clausen, P.B. Jensen, O.D. Madsen, N. Vrang, *et al.* (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." Nature 393(6680): 72-6.

Krude, H., H. Biebermann, W. Luck, R. Horn, G. Brabant and A. Gruters (1998). "Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans." Nat Genet 19(2): 155-7.

Kuhar, M.J., L.D. Adams, R.G. Hunter, S.D. Vechia and Y. Smith (2000). "CART peptides." Regul Pept 89(1-3): 1-6.

La Cava, A., C. Alviggi and G. Matarese (2004). "Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity." J Mol Med 82(1): 4-11.

Lakatos, A., S. Prinster, A. Vicentic, R.A. Hall and M.J. Kuhar (2005). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors." Neurosci Lett 384(1-2): 198-202.

Law, C.M., D.J. Barker, C. Osmond, C.H. Fall and S.J. Simmonds (1992). "Early growth and abdominal fatness in adult life." J Epidemiol Community Health 46(3): 184-6.

Lean, M.E., T.S. Han and C.E. Morrison (1995). "Waist circumference as a measure for indicating need for weight management." Bmj 311(6998): 158-61.

Levin, B.E. and A.A. Dunn-Meynell (2004). "Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286(4): R771-8.

Levin, B.E. and A.C. Sullivan (1987). "Glucose-induced norepinephrine levels and obesity resistance." Am J Physiol 253(3 Pt 2): R475-81.

Lin, L., R. Martin, A.O. Schaffhauser and D.A. York (2001). "Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 280(2): R504-9.

Lin, S., L.H. Storlien and X.F. Huang (2000b). "Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain." Brain Res 875(1-2): 89-95.

Lin, S., T.C. Thomas, L.H. Storlien and X.F. Huang (2000a). "Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice." Int J Obes Relat Metab Disord 24(5): 639-46.

MacIntyre, D.E. and S.B. Glueck (2003). "The proof of the pudding is in the eating: editorial focus on "Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4-receptor knockout mice"." Physiol Genomics 13(1): 11-4.

Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R.E. Pratley, G.H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan*, et al.* (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med 1(11): 1155-61.

Mao, Y., S. Pan, S.W. Wen and K.C. Johnson (2003). "Physical inactivity, energy intake, obesity and the risk of rectal cancer in Canada." Int J Cancer 105(6): 831-7.

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.

McMillen, I.C., C.L. Adam and B.S. Muhlhausler (2005). "Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system." J Physiol 565(Pt 1): 9-17.

Melnyk, A., M.E. Harper and J. Himms-Hagen (1997). "Raising at thermoneutrality prevents obesity and hyperphagia in BAT-ablated transgenic mice." Am J Physiol 272(4 Pt 2): R1088-93.

Mercer, J.G., C.B. Lawrence, B. Beck, A. Burlet, T. Atkinson and P. Barrett (1995). "Hypothalamic NPY and prepro-NPY mRNA in Djungarian hamsters: effects of food deprivation and photoperiod." Am J Physiol 269(5 Pt 2): R1099-106.

Meyer, C., D. Robson, N. Rackovsky, V. Nadkarni and J. Gerich (1997). "Role of the kidney in human leptin metabolism." Am J Physiol 273(5 Pt 1): E903-7.

Michaud, E.J., S.J. Bultman, M.L. Klebig, M.J. van Vugt, L.J. Stubbs, L.B. Russell and R.P. Woychik (1994). "A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation." Proc Natl Acad Sci U S A 91(7): 2562-6.

Miller, M.W., D.M. Duhl, H. Vrieling, S.P. Cordes, M.M. Ollmann, B.M. Winkes and G.S. Barsh (1993). "Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation." Genes Dev 7(3): 454-67.

Mitchell, M.A. and A.J. Carlisle (1992). "The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (Gallus domesticus)." Comp Biochem Physiol A 101(1): 137-42.

Mizuno, T.M., H. Bergen, T. Funabashi, S.P. Kleopoulos, Y.G. Zhong, W.A. Bauman and C.V. Mobbs (1996). "Obese gene expression: reduction by fasting and stimulation by insulin and glucose in lean mice, and persistent elevation in acquired (diet-induced) and genetic (yellow agouti) obesity." Proc Natl Acad Sci U S A 93(8): 3434-8.

Mizuno, T.M., S.P. Kleopoulos, H.T. Bergen, J.L. Roberts, C.A. Priest and C.V. Mobbs (1998). "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin." Diabetes 47(2): 294-7.

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*, et al.* (1997). "Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans." Nature 387(6636): 903-8.

Mori, H., R. Hanada, T. Hanada, D. Aki, R. Mashima, H. Nishinakamura, T. Torisu, K.R. Chien, H. Yasukawa and A. Yoshimura (2004). "Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity." Nat Med 10(7): 739-43.

Mountjoy, K.G., L.S. Robbins, M.T. Mortrud and R.D. Cone (1992). "The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors." Science 257(5074): 1248-51.

Munzberg, H., J.S. Flier and C. Bjorbaek (2004). "Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice." Endocrinology 145(11): 4880-9.

Munzberg, H., L. Huo, E.A. Nillni, A.N. Hollenberg and C. Bjorbaek (2003). "Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin." Endocrinology 144(5): 2121-31.

Murad, A., A.K. Nath, S.T. Cha, E. Demir, J. Flores-Riveros and M.R. Sierra-Honigmann (2003). "Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing." Faseb J 17(13): 1895-7.

Niswender, K.D., D.G. Baskin and M.W. Schwartz (2004). "Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis." Trends Endocrinol Metab 15(8): 362-9.

Olbort, M. (1998). "Auswirkung von einer und zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes fa (fatty) auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Ratten im Säuglingsalter." Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

Oliver, P., C. Pico and A. Palou (2001). "Ontogenesis of leptin expression in different adipose tissue depots in the rat." Pflugers Arch 442(3): 383-90.

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.

Oscai, L.B., W.C. Miller and D.A. Arnall (1987). "Effects of dietary sugar and of dietary fat on food intake and body fat content in rats." Growth 51(1): 64-73.

Pablo Huidobro-Toro, J. and M. Veronica Donoso (2004). "Sympathetic co-transmission: the coordinated action of ATP and noradrenaline and their modulation by neuropeptide Y in human vascular neuroeffector junctions." Eur J Pharmacol 500(1-3): 27-35.

Pedrazzini, T. (2004). "Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts." Neuropeptides 38(4): 267-75.

Pedrazzini, T., F. Pralong and E. Grouzmann (2003). "Neuropeptide Y: the universal soldier." Cell Mol Life Sci 60(2): 350-77.

Plagemann, A., T. Harder, R. Kohlhoff, W. Rohde and G. Dorner (1997). "Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes." Int J Obes Relat Metab Disord 21(6): 451-6.

Popovic, V., S. Damjanovic, C. Dieguez and F.F. Casanueva (2001). "Leptin and the pituitary." Pituitary 4(1-2): 7-14.

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.

Prpic, V., P.M. Watson, I.C. Frampton, M.A. Sabol, G.E. Jezek and T.W. Gettys (2003). "Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity." Endocrinology 144(4): 1155-63.

Qian, H., M.J. Azain, M.M. Compton, D.L. Hartzell, G.J. Hausman and C.A. Baile (1998). "Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis." Endocrinology 139(2): 791-4.

Qian, S., H. Chen, D. Weingarth, M.E. Trumbauer, D.E. Novi, X. Guan, H. Yu, Z. Shen, Y. Feng, E. Frazier, *et al.* (2002). "Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice." Mol Cell Biol 22(14): 5027-35.

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.

Ramirez, I. (1987). "Feeding a liquid diet increases energy intake, weight gain and body fat in rats." J Nutr 117(12): 2127-34.

Rauch, M., T. Riediger, H.A. Schmid and E. Simon (2000). "Orexin A activates leptin-responsive neurons in the arcuate nucleus." Pflugers Arch 440(5): 699-703.

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., R.E. Pratley, M. Maffei, H. Wang, J.M. Friedman, P.H. Bennett and C. Bogardus (1997). "Relatively low plasma leptin concentrations precede weight gain in Pima Indians." Nat Med 3(2): 238-40.

Rayner, D.V. and P. Trayhurn (2001). "Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions." J Mol Med 79(1): 8-20.

Riediger, T., C. Bothe, C. Becskei and T.A. Lutz (2004). "Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression." Neuroendocrinology 79(6): 317-26.

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.

Robert Koch-Institut Statistisches Bundesamt (2003). Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 16. Übergewicht und Adipositas.

Robinson, S.W., D.M. Dinulescu and R.D. Cone (2000). "Genetic models of obesity and energy balance in the mouse." Annu Rev Genet 34: 687-745.

Roemmich, J.N., P.A. Clark, S.S. Berr, V. Mai, C.S. Mantzoros, J.S. Flier, A. Weltman and A.D. Rogol (1998). "Gender differences in leptin levels during puberty are related to the subcutaneous fat depot and sex steroids." Am J Physiol 275(3 Pt 1): E543-51.

Romanovsky, A.A., A.I. Ivanov and Y.P. Shimansky (2002). "Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality." J Appl Physiol 92(6): 2667-79.

Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S.B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu and R.L. Leibel (1996). "Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin." J Clin Endocrinol Metab 81(9): 3424-7.

Rushing, P.A. (2003). "Central amylin signaling and the regulation of energy homeostasis." Curr Pharm Des 9(10): 819-25.

Sachs, L. (1997). "Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendung. 8. Auflage." Springer Verlag, Berlin.

Sajdyk, T.J., A. Shekhar and D.R. Gehlert (2004). "Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality." Neuropeptides 38(4): 225-34.

Sakurai, T. (1999). "Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior." Regul Pept 85(1): 25-30.

Schioth, H.B. and H. Watanobe (2002). "Melanocortins and reproduction." Brain Res Brain Res Rev 38(3): 340-50.

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., Shmidt,K.L., Simon, E." Springer Verlag Tokio.

Schmidt, I. (2002). "Metabolic diseases: the environment determines the odds, even for genes." News Physiol Sci 17: 115-21.

Schmidt, I., C. Schoelch, T. Ziska, D. Schneider, E. Simon and A. Plagemann (2000). "Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition." Physiol Genomics 3(2): 113-20.

Schrauwen, P. and K.R. Westerterp (2000). "The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight." Br J Nutr 84(4): 417-27.

Schwartz, M.W., R.J. Seeley, S.C. Woods, D.S. Weigle, L.A. Campfield, P. Burn and D.G. Baskin (1997). "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." Diabetes 46(12): 2119-23.

Schwartz, M.W., S.C. Woods, R.J. Seeley, G.S. Barsh, D.G. Baskin and R.L. Leibel (2003). "Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain?" Diabetes 52(2): 232-8.

Sclafani, A. (1987). "Carbohydrate taste, appetite, and obesity: an overview." Neurosci Biobehav Rev 11(2): 131-53.

Seeley, R.J., D.L. Drazen and D.J. Clegg (2004). "The critical role of the melanocortin system in the control of energy balance." Annu Rev Nutr 24: 133-49.

Shi, Y. (2004). "Beyond skin color: emerging roles of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and other physiological functions." Peptides 25(10): 1605-11.

Shutter, J.R., M. Graham, A.C. Kinsey, S. Scully, R. Luthy and K.L. Stark (1997). "Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice." Genes Dev 11(5): 593-602.

Sierra-Honigmann, M.R., A.K. Nath, C. Murakami, G. Garcia-Cardena, A. Papapetropoulos, W.C. Sessa, L.A. Madge, J.S. Schechner, M.B. Schwabb, P.J. Polverini*, et al.* (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." Science 281(5383): 1683-6.

Simmons, D.M., Arriza, J.L., Swanson, L.W. (1989). "A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes." J Histotechnol 12: 169-181.

Smith, B.K., P.K. Andrews, D.A. York and D.B. West (1999). "Divergence in proportional fat intake in AKR/J and SWR/J mice endures across diet paradigms." Am J Physiol 277(3 Pt 2): R776-85.

Sorensen, G., C. Lindberg, G. Wortwein, T.G. Bolwig and D.P. Woldbye (2004). "Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation." J Neurosci Res 77(5): 723-9.

Stanier, M.W. (1977). "Effect of environmental temperature and food intake on the distribution of fat in growing hairless mice." Br J Nutr 37(2): 279-84.

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 Störung im Leptinsystem von C57Bl/6J-Mäusen." Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

Stephenson, G.D. and D.P. Rose (2003). "Breast cancer and obesity: an update." Nutr Cancer 45(1): 1-16.

Steppan, C.M., D.T. Crawford, K.L. Chidsey-Frink, H. Ke and A.G. Swick (2000). "Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice." Regul Pept 92(1-3): 73-8.

Steppan, C.M. and A.G. Swick (1999). "A role for leptin in brain development." Biochem Biophys Res Commun 256(3): 600-2.

Stütz, A.M., Morrison, C.D., Argyropoulos, G (2005). "The Agouti-related protein and its role in energy homeostasis." Peptides.

Surwit, R.S., A.E. Petro, P. Parekh and S. Collins (1997). "Low plasma leptin in response to dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice." Diabetes 46(9): 1516-20.

Swart, I., J.W. Jahng, J.M. Overton and T.A. Houpt (2002). "Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283(5): R1020-6.

Tao, Y.X. (2005). "Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity." Mol Cell Endocrinol 239(1-2): 1-14.

Tartaglia, L.A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G.J. Richards, L.A. Campfield, F.T. Clark, J. Deeds*, et al.* (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell 83(7): 1263-71.

Tatro, J.B. (1996). "Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides." Neuroimmunomodulation 3(5): 259-84.

Tian, D.R., X.D. Li, Y.S. Shi, Y. Wan, X.M. Wang, J.K. Chang, J. Yang and J.S. Han (2004). "Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats." Peptides 25(12): 2147-53.

Trayhurn, P., J.S. Duncan, N. Hoggard and D.V. Rayner (1998). "Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system?" Proc Nutr Soc 57(3): 413-9.

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.

Van der Ploeg, L.H., W.J. Martin, A.D. Howard, R.P. Nargund, C.P. Austin, X. Guan, J. Drisko, D. Cashen, I. Sebhat, A.A. Patchett*, et al.* (2002). "A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function." Proc Natl Acad Sci U S A 99(17): 11381-6.

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.

Vrang, N., P. Kristensen, M. Tang-Christensen and P.J. Larsen (2002). "Effects of leptin on arcuate pro-opiomelanocortin and cocaine-amphetamine-regulated transcript expression are independent of circulating levels of corticosterone." J Neuroendocrinol 14(11): 880-6.

Wang, J., R. Liu, L. Liu, R. Chowdhury, N. Barzilai, J. Tan and L. Rossetti (1999). "The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated." Nat Med 5(8): 895-9.

Watanobe, H. and T. Suda (1999). "A detailed study on the role of sex steroid milieu in determining plasma leptin concentrations in adult male and female rats." Biochem Biophys Res Commun 259(1): 56-9.

Waterston, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An*, et al.* (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature 420(6915): 520-62.

Weintraub, M. (1992). "Long-term weight control study: conclusions." Clin Pharmacol Ther 51(5): 642-6.

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. and B. York (1998). "Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models." Am J Clin Nutr 67(3 Suppl): 505S-512S.

WHO (1997). "Preventing and managing the Global Epidemic - Report of a WHO Consultation on Obesity, 3-5 June 1997, Executive summary."

World Health Organization (2003). WHO Technical Report Series. Diet, nutrition and the prevention of cronic diseases.

Wierup, N., W.G. Richards, A.W. Bannon, M.J. Kuhar, B. Ahren and F. Sundler (2005). "CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight." Regul Pept 129(1-3): 203-11.

Wilding, J.P., S.G. Gilbey, M. Mannan, N. Aslam, M.A. Ghatei and S.R. Bloom (1992). "Increased neuropeptide Y content in individual hypothalamic nuclei, but not neuropeptide Y mRNA, in diet-induced obesity in rats." J Endocrinol 132(2): 299-304.

Williams, T.D., J.B. Chambers, S.P. Gagnon, L.M. Roberts, R.P. Henderson and J.M. Overton (2003). "Cardiovascular and metabolic responses to fasting and thermoneutrality in Ay mice." Physiol Behav 78(4-5): 615-23.

Wilson, B.D., M.M. Ollmann and G.S. Barsh (1999). "The role of agouti-related protein in regulating body weight." Mol Med Today 5(6): 250-6.

Wilson, B.D., M.M. Ollmann, L. Kang, M. Stoffel, G.I. Bell and G.S. Barsh (1995). "Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene." Hum Mol Genet 4(2): 223-30.

Withers, P.C. (1977). "Measurement of VO2, VCO2, and evaporative water loss with a flow-through mask." J Appl Physiol 42(1): 120-3.

Woods, S.C., M.W. Schwartz, D.G. Baskin and R.J. Seeley (2000). "Food intake and the regulation of body weight." Annu Rev Psychol 51: 255-77.

Yalow, R.S. (1980). "Radioimmunoassay." Annu Rev Biophys Bioeng 9: 327-45.

Yamada, K., X. Yuan, S. Otabe, A. Koyanagi, W. Koyama and Z. Makita (2002). "Sequencing of the putative promoter region of the cocaine- and amphetamine-regulated-transcript gene and identification of polymorphic sites associated with obesity." Int J Obes Relat Metab Disord 26(1): 132-6.

Yaswen, L., N. Diehl, M.B. Brennan and U. Hochgeschwender (1999). "Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin." Nat Med 5(9): 1066-70.

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.

Yeo, G.S., I.S. Farooqi, B.G. Challis, R.S. Jackson and S. O'Rahilly (2000). "The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models." Qjm 93(1): 7-14.

Young, J.B. and Y. Shimano (1998). "Effects of rearing temperature on body weight and abdominal fat in male and female rats." Am J Physiol 274(2 Pt 2): R398-405.

Zakrzewska, K.E., I. Cusin, A. Stricker-Krongrad, O. Boss, D. Ricquier, B. Jeanrenaud and F. Rohner-Jeanrenaud (1999). "Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat." Diabetes 48(2): 365-70.

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.

Zhao, J., T.H. Kunz, N. Tumba, L.C. Schulz, C. Li, M. Reeves and E.P. Widmaier (2003). "Comparative analysis of expression and secretion of placental leptin in mammals." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285(2): R438-46.

Ziotopoulou, M., C.S. Mantzoros, S.M. Hileman and J.S. Flier (2000). "Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab 279(4): E838-45.

# DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Sie hat mir, nachdem ich 16 Jahre lang Mutter und Hausfrau war, die Chance gegeben in meinem Beruf als Biologin zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Eckhart Simon danke ich ganz besonders herzlich für die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Er war immer bereit auftretende Fragen zu diskutieren und mit seinem großen und umfassenden Wissen weiterzuhelfen. Ich danke ihm für seine Unterstützung und sein Interesse an meiner Arbeit.

Herzlich danke ich Herrn HD Dr. Martin Klingenspor an der Philipps-Universität Marburg, der sich freundlicherweise als Zweitgutachter für die Beurteilung der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Julian Mercer für die Möglichkeit die in situ Hybridisierung am Rowett Research Institute in Aberdeen, Schottland durchzuführen, besonders Frau Kim Moar für die Hilfe bei der praktischen Durchführung.

Vielen Dank an Herrn Frank Voß, Herrn Helmuth Busch und Herrn Gerhard Staemmler für die Lösung zahlreicher Computer-Probleme.

Ich danke den Mitarbeitern der hauseigenen Werkstatt, besonders Herrn Klaus Burk und Herrn Wolfgang Schubert, für die schnelle und zuverlässige Hilfe bei technischen Problemen aller Art.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmidt am MPI in Bad Nauheim, mit denen ich in den vergangenen 6 Jahren zusammengearbeitet habe, danke ich ganz besonders herzlich für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Besonders danke ich Frau Roswitha Bender und Frau Diana Fuchs für die Durchführung der RIAs und der Genotypisierung und unserer Tierpflegerin Sina Dernedde.

Außerdem möchte ich meine Kolleginnen Dr. Andrea Fritz, Dr. Michaela Socher, Dr. Sandra Eiden, Birgit May und Dr. Janine Arens besonders erwähnen und ihnen für ihre Anregungen und Hilfe herzlich danken.

Herrn Dr. Thomas Rinke danke ich herzlich für das genaue Korrekturlesen meiner Arbeit.

Vor allem aber danke ich meiner Familie: meinem Ehemann Hans, unseren Kindern Christina, Anna Maria, Sabine, Martin und Jonathan, dass sie es mir möglich gemacht haben, diese Dissertation zu erstellen und abzuschließen. Danke für euer Verständnis, eure Unterstützung und eure Geduld. Was wäre ich ohne euch.

# ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Entwicklung der Adipositas und Neuropeptidexpression bei Melanokortin-4-Rezeptor-defizienten Mäusen unter besonderer Berücksichtigung der Haltungsbedingungen**

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, Januar 2006

Karin Weide

# LEBENSLAUF

**Persönliche Daten:**

| | |
|---|---|
| Name: | Karin Weide, geb.: Wissebach |
| Anschrift: | Färbgasse 5<br>35510 Butzbach |
| Telefon: | 06033 - 67640 |
| Geburtsdatum: | 15.09.1957 |
| Geburtsort: | Frankfurt/Main |
| Mutter: | Marianne Wissebach, Übersetzerin |
| Ehemann: | 03.06.1977 Eheschließung mit Johannes Weide, Haupt- und Realschullehrer |
| Kinder: | Christina, geb. 10.06.1982<br>Anna Maria, geb. 15.10.1984<br>Sabine, geb. 14.09.1987<br>Martin, geb. 22.06.1990<br>Jonathan, geb. 10.12.1994 |

**Schulbildung:**

| | |
|---|---|
| Schulbildung: | 1964 - 1967 Schrenzerschule Butzbach (Grundschule)<br>1967 - 1976 Weidigschule Butzbach (Gymnasium) |
| Schulabschluß: | Abitur im Mai 1976 |

**Studium:**

| | |
|---|---|
| Studium: | Sommersemester 1977 - Sommersemester 1983: Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz |
| Vorprüfung: | Diplom-Vorprüfung in Biologie im April 1979 |
| Hauptstudium: | Hauptfach: Genetik<br>1. Nebenfach: Zoologie<br>2. Nebenfach: Mikrobiologie<br>3. Nebenfach: Biochemie |
| Diplomarbeit: | „Produktion von männchengekoppelten Doppeltranslokationen mit hohem Sterilitätsgrad bei der Stechmücke Culex pipiens“ im Institut für Genetik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Laven |
| Abschlussprüfung: | Diplomprüfung in Biologie im Mai 1983 |

**Tätigkeiten nach Abschluss des Studiums:**

Juni 1983 - Oktober 1999 Mutter und Hausfrau

Seit November 1999 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Schmidt

Zulassung zur Promotion an der Philipps Universität in Marburg am 07. Mai 2002

**Publikationen während der Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim**

Originalartikel:

1. *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: 47-56

2. 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 wildtype and melanocortin-4 receptor deficient mice. Physiol Genomics 16: 38-46

* Diese Publikation enthält Bestandteile der vorliegenden Dissertation

Zitierfähige Kongressbeiträge:

1. Weide K., Socher M., May B., Arens J. und I. Schmidt (2002) Entwicklung und pharmakologische Behandlung der Adipositas von Melanocortin-4-Rezeptor-Knockout Mäusen. Akt. Ernähr.-Med. 27: 358

2. Weide, K., B. May, E. Simon und I. Schmidt (2003) Entwicklung der Adipositas bei Melanocortin-4-Rezeptordefizienten Mäusen unter Umweltbedingungen, die für Menschen in entwickelten Ländern typisch sind. Akt. Ernähr.-Med. 28: 342

3. Fritz A., Weide K., Socher M. und I Schmidt (2004) Veränderungen im Körperfettgehalt von Ratten durch Ammen eines anderen Stammes. Akt. Ernähr.-Med 29: 286

4. Schmidt, I., Weide, K., Socher, M., Arens, J., Eiden, S., Moar, K., Mercer, J.G. (2005) Melanocortin-4-Receptor-KO-Mouse: An example of the gap between an identified genetic lesion and therapy. The FASEB Journal, March 7, 2005, Vol. 19, No.5, A1131

Bad Nauheim, Januar 2006