

**Zentrale Bedeutung des adrenocorticotropen Hormons
(ACTH) bei der Regulation des Körpergewichtes
- experimentelle Untersuchungen zum Wirkmechanismus -**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr.rer.nat.)

Genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto - von - Guericke - Universität Magdeburg

von **Dipl. Biologin Kerstin Paulus**

geb. am 29.07.1978 in Magdeburg

Gutachter: Prof. H. Lehnert

Prof. W. Raasch

eingereicht am: 24.04.07

verteidigt am: 22.01.08

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Regulation des Energiehaushaltes	3
2.1.1	<i>Bedeutung des Hypothalamus für die Regulation der Energiehomöostase</i>	4
2.1.2	<i>Dem Nucleus arcuatus nachgeschaltete Signalwege</i>	7
2.1.2.1	Der paraventriculäre Nucleus	7
2.1.2.2	Der dorsomediale Nucleus	8
2.1.2.3	Der laterale Nucleus und das perifornikale Gebiet	8
2.1.2.4	Der ventromediale Nucleus	9
2.2	Periphere Mechanismen der Gewichtsregulation	10
2.3	Das melanokortinerge System	12
2.3.1	<i>Die Komponenten des melanokortinergen Systems</i>	12
2.3.2	<i>Expression des Proopiomelanocortin-Gens</i>	13
2.3.3	<i>Biosynthese der POMC-Derivate im Hypothalamus</i>	13
2.3.4	<i>Kontrolle der POMC Expression im Hypothalamus</i>	14
2.3.5	<i>Physiologische Bedeutung endogener Melanokortinagonisten</i>	15
2.3.5.1	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon	15
2.3.5.2	Adrenocorticotropes Hormon	16
2.3.6	<i>Physiologische Bedeutung endogener Melanokortinantagonisten</i>	17
2.3.6.1	Agouti-Protein	17
2.3.6.2	Agouti-related protein	18
2.3.7	<i>Rezeptoren des Melanokortinsystems</i>	18
2.3.7.1	Rezeptortypen für die Vermittlung peripherer Effekte	19
2.3.7.2	Rezeptoren für die Regulation des Körpergewichtes	20
2.4	Bedeutung von Störungen in der zentralen Verarbeitung von Melanokortinsignalen	21
2.4.1	<i>POMC-Knockout-Modelle</i>	21
2.4.2	<i>Mutationen des POMC-Gens beim Menschen</i>	22
2.4.3	<i>MC4-R-Knockout-Modelle</i>	22
2.4.4	<i>Mutationen im MC4-R-Gen beim Menschen</i>	23
2.4.5	<i>MC3-R-Knockout-Modelle</i>	23
2.4.6	<i>Mutationen im MC3-R-Gen beim Menschen</i>	24
2.5	Zielstellung	24
3	Material und Methoden	26
3.1	Allgemeiner Teil	26
3.1.1	<i>Versuchstiere und Tierhaltung</i>	26
3.1.2	<i>Substanzen</i>	26
3.1.3	<i>Herstellung der Mikroinjektionseinheiten</i>	26
3.1.4	<i>Implantation von Mikroinjektionseinheiten</i>	27
3.1.5	<i>Postoperative Behandlung der Tiere</i>	29

3.1.6	<i>Applikation der verschiedenen Substanzen in das Gehirn</i>	29
3.1.7	<i>Tötung der Tiere</i>	29
3.1.8	<i>Immunologische Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Serum</i>	29
3.1.8.1	<i>Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays</i>	29
3.1.8.2	<i>Durchführung der Bestimmung von ACTH im Serum</i>	30
3.1.8.3	<i>Durchführung der Bestimmung von Kortikosteron im Serum</i>	31
3.1.9	<i>in-situ Hybridisierung</i>	31
3.1.9.1	<i>Methode der in-situ Hybridisierung</i>	31
3.1.9.2	<i>Anfertigung von Kryoschnitten</i>	32
3.1.9.3	<i>Fixierung der Gefrierschnitte</i>	33
3.1.9.4	<i>Herstellung der Oligonucleotid-Sonden</i>	33
3.1.9.5	<i>Herstellung ³⁵S-markierter Oligonucleotid-Sonden</i>	34
3.1.9.6	<i>Hybridisierung an Kryoschnitten</i>	35
3.1.9.7	<i>Entfernung nicht hybridisierter Oligonucleotid-Sonden und Exposition</i>	35
3.2	Experiment 1: Einfluss von ACTH bei sham und ADX Tieren	36
3.2.1	<i>Implantation der Mikroinjektionseinheit und Adrenalectomie</i>	36
3.2.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	37
3.3	Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α-MSH	38
3.3.1	<i>Implantation der Mikroinjektionseinheiten</i>	38
3.3.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	38
3.4	Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α-MSH verursacht werden	40
3.4.1	<i>Implantation der Mikroinjektionseinheiten</i>	40
3.4.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	40
3.5	Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK in satten und physiologisch hungrigen Tieren	41
3.5.1	<i>Implantation der Mikroinjektionseinheiten</i>	41
3.5.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	41
3.6	Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression in satten und physiologisch hungrigen Tieren	42
3.6.1	<i>Implantation der Mikroinjektionseinheiten</i>	42
3.6.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	43
3.7	Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-AK bei ad-libitum gefütterten Tieren	44
3.7.1	<i>Narkose und Operation</i>	44
3.7.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	44
3.8	Versuchsauswertung und Statistik	45
3.8.1	<i>Auswertung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie des Körpergewichtes in den Experimenten</i>	45
3.8.2	<i>Auswertung der in-situ Hybridisierung</i>	45

4	Ergebnisse	48
4.1	Experiment 1: Einfluss von ACTH bei sham und ADX Tieren	49
4.1.1	<i>Effekte von ACTH auf die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht bei sham und ADX Tieren</i>	52
4.1.2	<i>Einfluss der ADX und ACTH Applikation auf die Hormonkonzentrationen im Serum</i>	55
4.1.3	<i>Effekte von ACTH auf die hypothalamische mRNA-Expression bei sham und ADX Tieren</i>	57
4.2	Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α-MSH	61
4.2.1	<i>Effekte des ACTH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsveränderung bei Tieren</i>	62
4.2.2	<i>Effekte des α-MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei Tieren</i>	65
4.3	Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α-MSH verursacht werden	69
4.3.1	<i>Einfluss von ACTH und α-MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei Tieren</i>	69
4.4	Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK bei satt und physiologisch hungrigen Tieren	73
4.4.1	<i>Einfluss des ACTH-AK und α-MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei satt und physiologisch hungrigen Tieren</i>	74
4.5	Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression bei satt und physiologisch hungrigen Tieren	81
4.5.1	<i>Einfluss des ACTH-AK und α-MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei satt und physiologisch hungrigen Tieren</i>	81
4.5.2	<i>Einfluss von ACTH-AK und α-MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression bei satt und physiologisch hungrigen Tieren</i>	89
4.6	Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-Antikörpern bei ad-libitum gefütterten Tieren	97
4.6.1	<i>Effekte des ACTH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei ad-libitum gefütterten Tieren</i>	97
5	Diskussion	103
5.1	Experiment 1: Einfluss von ACTH in sham und ADX Tieren	104
5.2	Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α-MSH	110
5.2.1	<i>Wahl des Versuchsdesigns</i>	110
5.2.2	<i>Wahl des Injektionsortes und der Dosis für die Antikörperapplikation</i>	111
5.2.3	<i>Einsparung von Versuchstieren</i>	112
5.2.4	<i>Einfluss von ACTH und die Effektivität des ACTH-AK im in-vivo Experiment</i>	113
5.2.5	<i>Einfluss von α-MSH und die Effektivität des α-MSH-AK im in-vivo Experiment</i>	115

5.3	Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α-MSH verursacht werden	116
5.4	Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK in sattten und physiologisch hungrigen Tieren	117
5.4.1	<i>Abhängigkeit der ACTH- bzw. α-MSH-Wirkung vom Ernährungszustand der Tiere</i>	118
5.5	Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression in sattten und physiologisch hungrigen Tieren	121
5.6	Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-AK bei ad-libitum gefütterten Tieren	122
6	Abkürzungsverzeichnis	124
7	Literaturverzeichnis	127
8	Anhang	144
8.1	Liste der verwendeten Substanzen	144
8.2	Liste der verwendeten Materialien	145
8.3	Liste der verwendeten Geräte	145
8.4	Pufferlösungen für die in-situ Hybridisierung	146
8.4.1	<i>Herstellung von Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS)</i>	146
8.4.2	<i>Herstellung von Natriumcitratpuffer (SSC)</i>	147
8.4.3	<i>Herstellung von Tris-EDTA-Puffer (TE)</i>	147
8.4.4	<i>Herstellung von Hybridisierungspuffer</i>	148
9	Danksagung	149
10	Erklärung	150
11	Lebenslauf	151
12	Publikationen	152

1 Zusammenfassung

Das melanokortinerge System des Hypothalamus ist wesentlich an der Regulation des Körpergewichtes beteiligt. Eine bedeutsame Komponente dieses Systems ist das vom Proopiomelanocortin (POMC) abstammende adrenocorticotrope Hormon (ACTH).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass intracerebroventrikulär (i.c.v.) appliziertes ACTH die Nahrungs- und Wasseraufnahme von männlichen Wistar-Ratten signifikant reduziert. Die Entfernung der Nebennieren bei einem Teil der Tiere, um eine potentielle Stimulation der Glucocorticoid-Freisetzung und damit Erhöhung der Nahrungsaufnahme zu unterbinden, beeinflusste den anorexigen Effekt des ACTH nicht. Die i.c.v. Applikation von ACTH bewirkte eine mittels in-situ Hybridisierung nachgewiesene signifikante Erhöhung der Brain-derived neurotrophic Faktor (BDNF) mRNA-Expression im ventromedialen Hypothalamus (VMN). Die im Gegensatz dazu nachgewiesene Abnahme der Melanokortin-Rezeptor 4 (MC4-R) mRNA lässt eine kompensatorische Herunterregulation der Rezeptor-Expression in Folge der Rezeptorstimulation durch die hohen zentralnervösen ACTH-Spiegel vermuten.

Bisher lagen keine Studien vor, die sich mit der physiologischen Relevanz des endogenen ACTH für die Homöostase des Körpergewichtes beschäftigt haben. Die Untersuchung dieser Fragestellung wird dadurch erschwert, dass mittels enzymatischer Spaltung aus dem ACTH noch ein weiteres potentes anorexigen wirkendes Hormon, das alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), entsteht. Durch den Einsatz von zuvor auf ihre Effektivität getesteten spezifischen Antikörpern (AK) konnte die Beteiligung der beiden Peptide an der Regulation des Körpergewichtes getrennt untersucht werden. Durch ein spezielles Futterregime wurden Tiere generiert, die in den Abendstunden, zum Zeitpunkt der AK-Applikation, gesättigt waren und damit hohe endogene Level der POMC-abstammenden Peptide, wie ACTH und α -MSH, besaßen. Bei diesen Tieren bewirkte die zentrale Applikation der ACTH-AK und α -MSH-AK durch Blockierung der endogenen Peptid-Spiegel eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme und eine Abnahme der BDNF mRNA-Expression im VMN. Experimente mit physiologisch hungrigen Tieren am Abend zeigten, dass bei den dann geringen endogenen ACTH- und α -MSH-Spiegeln die Injektion der AK in den PVN ohne Effekt auf die Nahrungsaufnahme und mRNA-Expression bleibt.

Die zweimal-tägliche Applikation (morgens und abends) der ACTH-AK über eine Woche bestätigte die Erkenntnisse aus den oben genannten Experimenten, da die Injektion nur die Nahrungsaufnahme während des Tages, also während die Tiere gesättigt und die endogenen Level der POMC Spaltprodukte hoch waren, beeinflusste.

Weiterhin zeigten wir, dass die Applikation von α -MSH-AK in den Hypothalamus die Wirkung von i.c.v. applizierten ACTH nicht blockierte. Damit wurde belegt, dass der beobachtete anorexigene Effekt des ACTH durch das Peptid selbst und nicht durch sein Spaltprodukt α -MSH verursacht wird.

Mit Hilfe der hier zusammengefassten Experimente konnte die physiologische Bedeutung von endogenem ACTH in der Regulation des Körpergewichtes erstmals nachgewiesen werden.

The melanocortin system within the hypothalamus is substantially involved in the regulation of body weight. As was shown in this study, the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which is processed by proteolytic cleavage from the proopiomelanocortin (POMC) precursor peptide is an important component of this system.

We caused demonstrate that intracerebroventricular (i.c.v.) administration of ACTH significantly reduced food and water intake in male Wistar rats. Removal of adrenal steroids by adrenalectomy in a subgroup of animals, in order to prevent a potential stimulation of the glucocorticoid release and thus increase of food intake, did not affect the anorexigenic effect of ACTH. The i.c.v. application of ACTH caused a significant increase of brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMN), as detected by in-situ hybridization. In contrast to BDNF mRNA expression, the expression of melanocortin receptor 4 (MC4-R) was decreased, suggesting a compensatory effect to high central nervous ACTH levels.

Thus far no studies on the physiological relevance of the endogenous ACTH for the homeostasis of the body weight have been published. The investigation of this topic is made more difficult by the fact that another potent anorexigenic hormone, the alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), is derived from ACTH by enzymatic processing. By the use of before specific antibodies (Ab), that were before tested on their effectiveness, the involvement of the two peptides, i.e. ACTH and α -MSH, in the regulation of body weight could be examined separately. By a special food regime, animals satiated in the evening hours, at the time of the Ab application, were generated. They thus possessed high endogenous level of the POMC-derived anorexigenic peptides. In these animals the central application of ACTH-Ab and α -MSH-Ab caused an increase of food intake and a decrease of BDNF mRNA expression in the VMN by blocking endogenous peptides. Other animals were fed ad-libitum and thus in the evening, at the time of Ab application, were hungry, since this is the beginning of their feeding period. In contrast to satiated rats, endogenous POMC-derived peptide level were low under this feeding condition. As a consequence, the injection of ACTH-Ab and α -MSH-Ab were not effective on food intake and mRNA expression.

The twice-daily application (morning and evening) of ACTH-Ab over one week confirmed the results from the experiments mentioned above. The injection affected only food intake during the day, when animals were satiated and endogenous levels of POMC-derived peptides were high.

Furthermore we showed that the application of α -MSH-Ab into the hypothalamus did not block the effect ACTH i.c.v., thus proving that the observed anorexigenic effect of the ACTH is caused by the peptide itself and not by α -MSH.

With the help of the experiments summarized here the physiological role of endogenous ACTH in the regulation of body weight was demonstrated for the first time.

2 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat der prozentuale Anteil übergewichtiger und adipöser Menschen in der Bevölkerung der westlichen Industrieländer stetig zugenommen und ein Ende dieser Entwicklung ist nicht abzusehen. In Deutschland waren im Jahr 2005 insgesamt 58 % der erwachsenen Männer und 42 % der erwachsenen Frauen übergewichtig, wie es die Ergebnisse der Mikrozensus-Zusatzbefragung des statistischen Bundesamtes zeigten (www.destatis.de). Besonders erschreckend waren die Zunahme von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen und der Befund, dass aus übergewichtigen Kindern mit großer Wahrscheinlichkeit auch übergewichtige Erwachsene werden (1).

Während jahrzehntelang die öffentliche und wissenschaftliche Meinung „Das Körpergewicht der Menschen spiegelt nur ihr Essverhalten wieder“ war, besteht jetzt der Konsensus der Experten, dass die Adipositas eine multifaktorielle Erkrankung ist, die durch das Zusammenwirken von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen bestimmt wird. Zahlreiche Arbeitsgruppen sind damit beschäftigt, die zur Adipositas führenden Genveränderungen sowie die Regulation der Körpergewichtshomöostase zu entschlüsseln und neue pharmakologische Ansätze zu entwickeln.

2.1 Regulation des Energiehaushaltes

Die Adipositas ist ein Zustand, der durch eine Vermehrung des Körpergewichtes mit übermäßiger Zunahme des Körperfettanteils gekennzeichnet ist. Sie resultiert aus einer über einen langen Zeitraum bestehenden positiven Energiebilanz, die dadurch zustande kommt, dass die aufgenommene Energie größer ist, als die, die der Organismus verbraucht. Diese überschüssige Energie wird in Form von Fett im Körper gespeichert. Die Aufnahme der Energie erfolgt aus der Nahrung und der Verbrauch bzw. die Abgabe in Form von Stoffwechselfvorgängen, Bewegung und Wärme.

Der menschliche Organismus verfügt über verschiedene Regulationssysteme, um das Körpergewicht über die Balance zwischen Energieaufnahme und -verbrauch zu stabilisieren. Es ist bemerkenswert, wie stabil das Körpergewicht eines Erwachsenen reguliert wird. Trotz einer jährlichen Kalorienzufuhr von etwa einer Million Kilokalorien beträgt die durchschnittliche Gewichtszunahme nur 100 bis 400 g pro Jahr (2).

Die Regulation des Energiehaushaltes besteht aus einem komplexen Netz aus neuronalen und humoralen Signalen, die auf unterschiedlichen Ebenen interagieren. Der Hypothalamus hat hierbei eine besonders wichtige Funktion.

2.1.1 Bedeutung des Hypothalamus für die Regulation der Energiehomöostase

Die entscheidende Rolle innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) bei der Regulation des Körpergewichtes kommt dem Hypothalamus zu. Im Jahre 1940 wurde postuliert, dass im Gehirn zwei Areale, der laterale Hypothalamus (LHA) und der ventromediale Hypothalamus (VMN), für diese Regulation verantwortlich sind (3). Diese Hypothese basierte auf der Erkenntnis, dass Läsionen im LHA zur Unterdrückung der Nahrungsaufnahme und Gewichtsreduktion führen. Dies führte zu der klassischen Bezeichnung „Hungerzentrum“ (4). Die Stimulation dieses Kerns verursachte eine verstärkte Nahrungsaufnahme und eine Zunahme des Gewichtes. Schädigungen im VMN hingegen führten zur Entwicklung einer Adipositas, während die Stimulation die Nahrungsaufnahme hemmte. Der VMN wurde historisch als das „Sättigungszentrum“ bezeichnet.

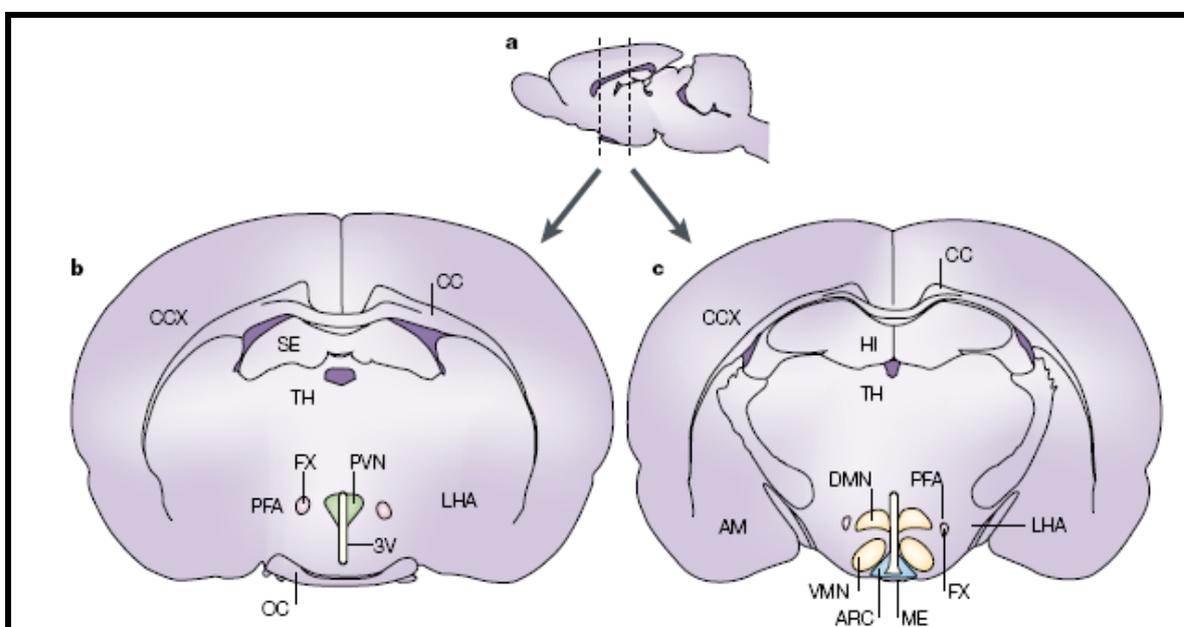


Abb. 1: Kerngebiete des Hypothalamus eines Rattengehirnes, die an der Regulation des Körpergewichtes beteiligt sind. a: Sagittalschnitt durch ein Rattengehirn. b, c: Frontalschnitte in den in a markierten Ebenen. Neurone erster Ordnung, die auf humorale Signale reagieren, liegen im Nucleus arcuatus (ARC) (c, blau) und besitzen Projektionen zum paraventriculären Nucleus (PVN) (b, grün) und zur perifornikalen Region (PFA), die benachbart zur Fornix (b; FX weiß) liegt und zum LHA. Andere Regionen, die an der Körpergewichtsregulation beteiligt sind, sind der VMN (gelb) und der dorsomediale Nucleus (DMN) (gelb). Weitere Abkürzungen: Amygdala (AM), Corpus callosum (CC), cerebraler Kortex (CCX), Hippocampus (HI), Eminentia mediana (ME), Chiasma opticum (OC), Septum (SE), Thalamus (TH), 3.Ventrikel (3V) (aus (5))

Nach heutigem Wissensstand ist die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase und die Regulation der Nahrungsaufnahme ein komplexer Vorgang, an dem nicht nur der LHA und

VMN, sondern noch weitere hypothalamische Kerngebiete sowie medulläre Strukturen beteiligt sind (Abb. 1, (6)). Die elektrische Läsion des paraventriculären Nucleus (PVN) bzw. des Nucleus arcuatus (ARC) verursachte Hyperphagie und Adipositas (7), wie es auch beim VMN beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu führte die Zerstörung des dorsomedialen Nucleus (DMN) zu einer Unterbrechung der Nahrungsaufnahme, jedoch in einem geringeren Ausmaß als Läsionen im VMN (8).

Eine Reihe von anorexigenen und orexigenen Peptiden, die den Hauptteil des neuronalen Netzwerkes bilden, werden primär in den Neuronen dieser hypothalamischen Gebiete produziert (Tab1).

Anorexigene Substanzen	Orexigene Substanzen
Leptin	NPY
Insulin	AgRP
α-MSH	MCH
Cholecystokinin	Orexin A
Neurotensin	Noradrenalin
Serotonin	Galanin
CART	Ghrelin
CRH	GHRH
Urocortin	GABA
TRH	Opioide
BDNF	Syndecan 3
Oxytocin	Glucocorticoide
Glucagon-like peptide 1	

Tab. 1: Hormone, Neurotransmitter bzw. -peptide, die die Nahrungsaufnahme stimulieren (Orexigene Substanzen) bzw. inhibieren (Anorexigene Substanzen) (Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erklärt)

Eine bedeutsame Struktur mit zugleich integrierender Funktion für stimulierende und inhibitorische Signale ist der ARC, eine Hirnregion mit einer hohen Dichte an Leptinrezeptoren (Ob-R) (9) und Insulinrezeptoren (IR) (10). Innerhalb des ARC wurden zwei unterschiedliche Neuronenpopulationen (Neuropeptid Y/Agouti-related protein- Neuronen (NPY/AgRP), Proopiomelanocortin/Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript-Neuronen (POMC/CART)) nachgewiesen, die einen gegensätzlichen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme besitzen (11).

Die Expression der beiden im ARC koexprimierten orexigen wirkenden Neuropeptide NPY und AgRP wird u.a. durch die Leptin- und Insulinspiegel beeinflusst. Durch niedrige Leptin- bzw. Insulinspiegel im ARC werden NPY und AgPR vermehrt exprimiert, die über efferente Fasern zum PVN gelangen (12) und dadurch die Nahrungsaufnahme steigern (13).

Gleichzeitig wird durch GABAerge (Gammaaminobuttersäure) Synapsen der NPY-Neurone eine Hemmung der POMC/CART-Neuronen im ARC bewirkt (Abb. 2). Bei vermehrter Leptinbindung im ARC kommt es dagegen zu einer Hemmung der NPY-Neurone. Der Verlust des inhibitorischen Inputs der Kollateralen der NPY/AgR-Neurone auf die POMC/CART-Neurone bewirkt eine Aktivierung der melanokortikotropen Neurone (14). Die Expression von POMC wird heraufreguliert, woraufhin vermehrt alpha-Melanozytenstimulierendes Hormon (α -MSH) über efferente Fasern in den PVN freigesetzt wird. Dort vermittelt es durch Bindung an den Melanokortin-4-Rezeptor (MC4-R) einen appetitmindernden Effekt.

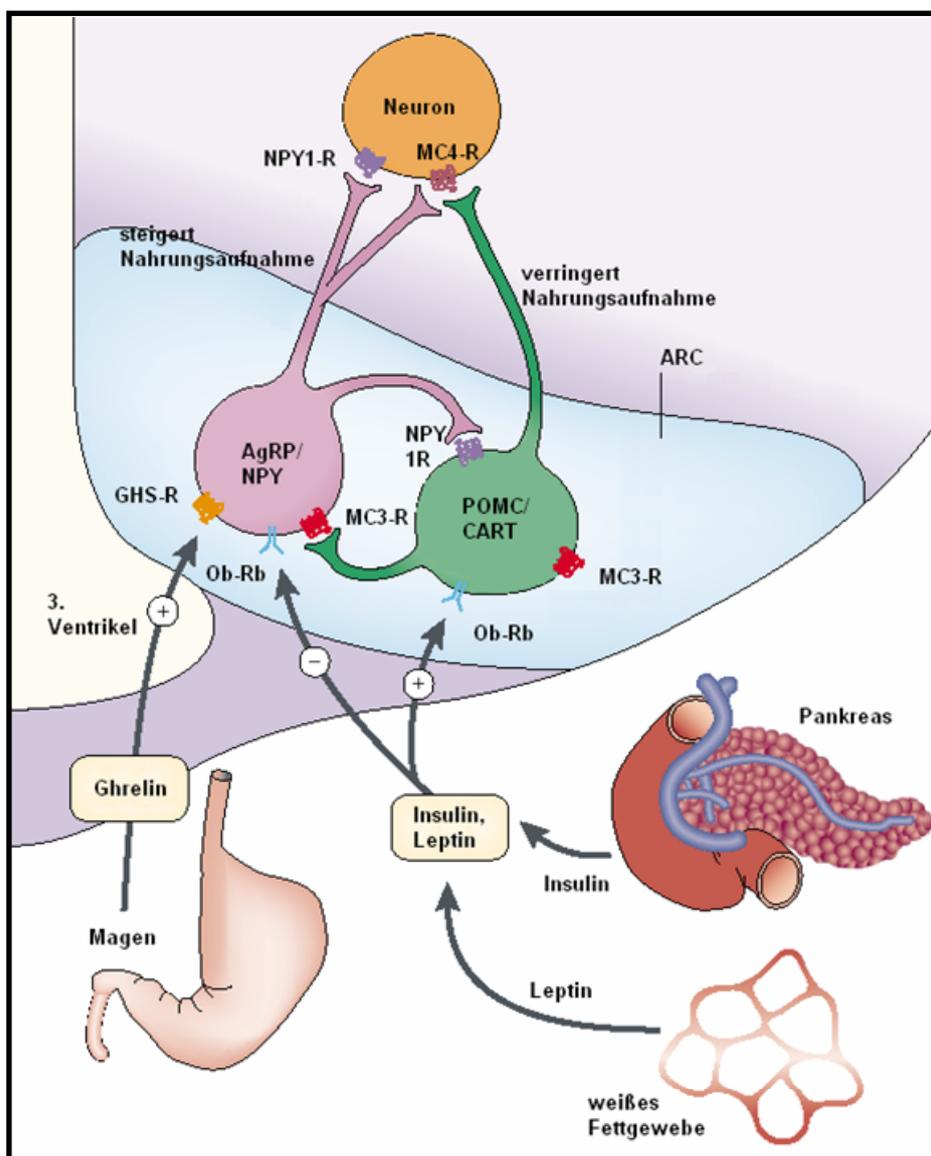


Abb. 2: Wirkung von Leptin und Insulin auf ARC Neurone. Die Expression von orexigen wirkenden Peptiden NPY/AgRP wird rezeptor-vermittelt gehemmt, wohingegen die Expression der Anorexigene POMC/CART heraufreguliert wird. Modifiziert nach (5).

Neben Leptin und Insulin können auch andere Peptide, die in der Peripherie gebildet werden, die zentralen Signalwege beeinflussen und damit die Energiebalance regulieren (siehe Abschnitt 2.2).

2.1.2 Dem Nucleus arcuatus nachgeschaltete Signalwege

Die peptidergen Neurone innerhalb des ARC projizieren in die hypothalamischen Kerngebiete, wie PVN, DMN, LHA und perifornikale Region (PFA) (15). Diese Gebiete enthalten Neuronen zweiter Ordnung, die Informationen bezüglich der Energiehomöostase verarbeiten (siehe Abb. 3).

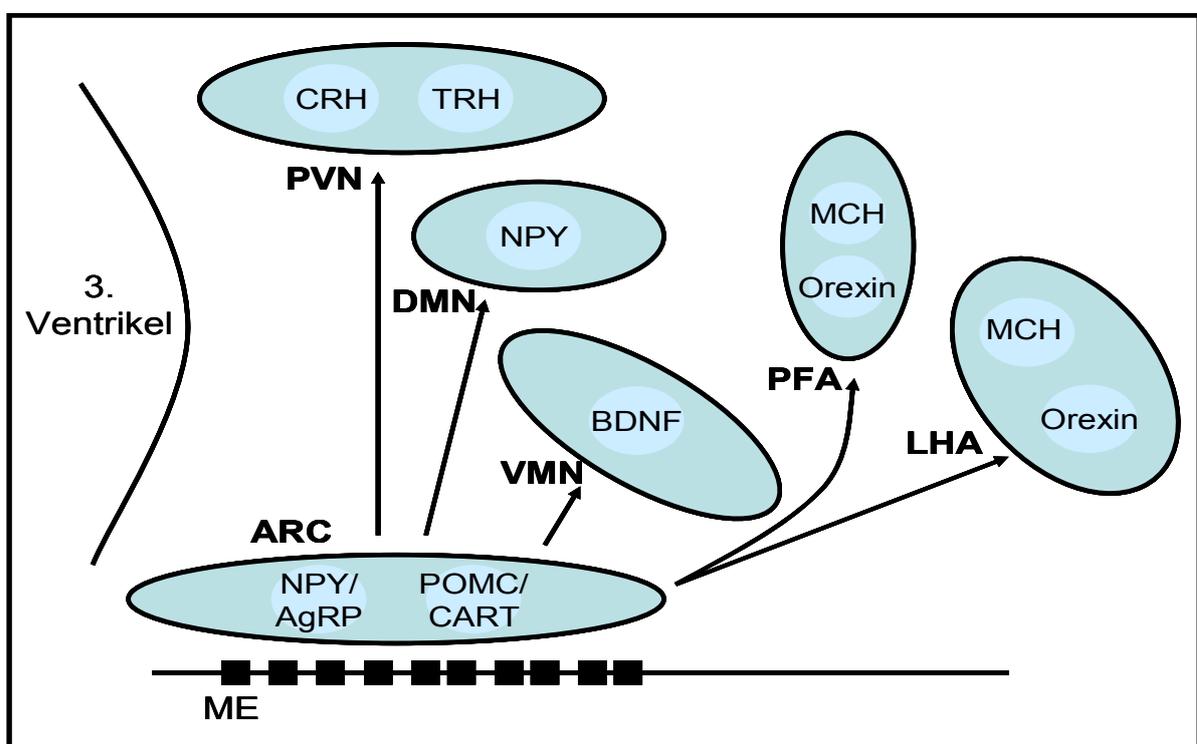


Abb. 3: Schematische Darstellung der an der Appetitregulation beteiligten hypothalamischen Kerne. Corticotropin-Releasing Faktor (CRH), Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH), Brain-derived neurotrophic Faktor (BDNF), Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH) (aus (16))

2.1.2.1 Der paraventriculäre Nucleus

Der PVN, der beiderseits des dritten Ventrikels liegt, integriert die Signale, die er aus dem ARC und Nucleus tractus solitarii (NTS) erhält. Verschiedene Zellpopulationen des PVN synthetisieren einerseits anorexigene Peptide, wie z.B. Corticotropin-Releasing Faktor (CRH), Thyrotropin-Releasing Hormon (TRH), Oxytocin und CART und andererseits orexigen wirkende Substanzen, wie NPY und Orexin, wodurch die Energiehomöostase beeinflusst wird.

CRH ist ein potentes anorektisch wirkendes Peptid, das vor allem in den parvocellulären Neuronen des PVN synthetisiert wird. Diese Neurone exprimieren sowohl NPY5-Rezeptoren (NPY-R) als auch MC4-R, was auf eine Interaktion zwischen dem CRH- und NPY-System sowie dem MC-System im ARC schließen lässt (17;18). Einen weiteren Hinweis für eine Interaktion zwischen diesen Systemen erbrachte eine Studie, in der CRH-(9-41), ein CRH Antagonist, in den PVN appliziert wurde. Die durch die Injektion von NPY in denselben Lokus hervorgerufene Steigerung der Nahrungsaufnahme wurde durch die gleichzeitige Gabe des CRH Antagonisten (CRH-(9-41)) weiter potenziert (19;20). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von Melanotan-II (MT-II), einem synthetischen Melanokortinagonisten, eine schnelle CRH Gentranskription im PVN induziert (18). Die subcutane (s.c.) Applikation von Leptin mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe über einen Zeitraum von sieben Tagen in ob/ob (obese)-Mäusen nach 24 Stunden Fasten führte zu einer gesteigerten CRH messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Synthese im PVN und erhöhte die Aktivität der CRF Neurone in dieser Gehirnregion (21).

Ein weiteres anorexigen wirkendes und innerhalb des PVN synthetisiertes Neuropeptid ist das TRH. Die Synthese des TRH wird durch die beiden Neuronenpopulationen im ARC (NPY/AgRP, POMC/CART) reguliert (22). Die i.c.v. Applikation von α -MSH in Tieren nach 24 Stunden Fasten übte einen potenten stimulierenden Effekt auf die Transkription des TRH-Gens in den hypophysiotropen Neuronen des PVN aus (23).

2.1.2.2 Der dorsomediale Nucleus

Die Erkenntnisse über eine Beteiligung des DMN bei der Kontrolle der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und der Körpergewichtsregulation basieren auf Läsionsexperimenten (24;25). Zahlreiche Studien zeigten, dass dieses Kerngebiet von Fasern mit einem anorexigen wirkenden Hormon (α -MSH) und zahlreichen orexigen wirkenden Neuropeptiden (Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH), Orexin, AgRP) innerviert wird (26-28). Die direkte Infusion eines α -MSH Agonisten wie MT-II in den DMN von Ratten nach 24 Stunden Fasten unterdrückte die Nahrungsaufnahme bei gleichzeitiger Reduktion der NPY mRNA-Expression (29). Im Gegensatz dazu führte die Applikation von 0,1 nmol AgRP-(83-132) in ad-libitum gefütterten Ratten zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme über 24 Stunden (30).

2.1.2.3 Der laterale Nucleus und das perifornikale Gebiet

Der Nachweis von Orexin A und B (31) sowie MCH (32) in den Neuronen des LHA bzw. PFA und die physiologischen Untersuchungen über die Bedeutung dieser Neuropeptide legten nahe, dass beide Strukturen eine Rolle bei der Stimulierung der Nahrungsaufnahme spielen.

Die zentrale Injektion von Orexin A in den lateralen Ventrikel in ad-libitum gefütterten und gefasteten Ratten drei bzw. sechs Stunden vor Beginn der Lichtphase führte zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme, wohingegen die Applikation von Orexin B keinen Einfluss auf die Tiere hatte (33). Wenn die Injektion jedoch zu Beginn der Dunkelphase durchgeführt wurde, konnte auch bei Gabe von Orexin A keine Veränderung der Nahrungsaufnahme festgestellt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die chronische Applikation von Orexin A über einen Zeitraum von acht Tagen an den Versuchstagen zwei und acht die Nahrungsaufnahme tagsüber erhöht, jedoch die nächtliche reduziert hat, so dass bei Betrachtung der Nahrungsaufnahme über 24 Stunden keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden wurden. Diese Daten zeigen, dass der Einfluss von Orexin A auf die Nahrungsaufnahme einer zirkadianen Rhythmik unterliegt.

MCH ist ein zyklisches 19 Aminosäure (AS) großes Peptid, das in Neuronen innerhalb des LHA und PFA exprimiert wird. Sowohl die Behandlung mit Inhibitoren der Fettsäureoxidation als auch Fasten führte bei normalen und ob/ob-Mäusen zu einer Erhöhung der MCH mRNA. Eine wiederholte i.c.v. Applikation steigerte bei Ratten die Nahrungsaufnahme (34), was zur Ausbildung einer milden Fettsucht führte. MCH-Knockout-Mäuse (MCH^{-/-}) sind hypophag, mager und haben einen erhöhten Energieumsatz, trotz verringerter POMC-Level im ARC und reduzierter Leptinspiegel (35).

Die NPY-, AgRP- und α -MSH-Fasern aus dem ARC projizieren in den LHA und stehen dort in engem Kontakt zu MCH- und Orexin-exprimierenden Zellen (26;36). Durch die Expression von NPY4-R (37) und Ob-R (38) sind die zentralen Orexin-Neurone in der Lage, Sättigungssignale zu integrieren. Weiterhin wird durch die große Zahl von Glucose-sensitiven-Neuronen im LHA der Blutzucker erfasst. Einige Studien haben gezeigt, dass Hypoglykämie die c-Fos Expression in Orexin-Neuronen induziert (39) und die Orexin mRNA-Level erhöht (40).

2.1.2.4 Der ventromediale Nucleus

Durch bilaterale Läsionsuntersuchungen im VMN im Jahre 1940, in denen Hyperphagie und Fettsucht erzeugt wurde, ist die Rolle dieses hypothalamischen Kernes in der Energiehomöostase schon lange bekannt. Der VMN erhält Projektionen von NPY-, AgRP- und POMC-immunreaktiven-Neuronen aus dem ARC, wobei er selbst zu anderen hypothalamischen Kernen (z.B. DMN) und Hirnstammregionen, wie dem NTS projiziert.

Bis heute gibt es nur wenige Hinweise auf die Expression von orexigen und/oder anorexigen wirkenden Neuropeptiden innerhalb des VMN. Im Gegensatz dazu gibt es zahlreiche

Studien, die die Existenz von verschiedenen Rezeptortypen, wie MC3-R, MC4-R (41-43), NPY-R (44) und Galanin-2-Rezeptor (45) nachgewiesen haben. Jedoch führten Mikroinjektionen von NPY (46), Galanin (47) und GABA (48) in den VMN zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme, während die Applikationen von Leptin bzw. Urocortin diese hemmten (49;50).

Neuere Studien haben innerhalb des VMN hohe Konzentrationen des Brain-derived neurotrophic Faktors (BDNF) und des „Tropomyosin-Rezeptor-Kinase-B“ Rezeptors (Trk-B) nachgewiesen, der nach Freisetzung in diesem Gebiet zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (51;52). Knock-out-Mäuse, bei denen die Expression von BDNF im Gehirn ausgeschaltet wurde, zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) eine signifikant erhöhte Nahrungsaufnahme und hatten ein höheres Körpergewicht (53).

BDNF gehört wie fünf weitere Peptide zur Familie der Neurotrophine. Die biologische Aktivität dieses Faktors und anderer Neurotrophine erfolgt durch Bindung an den Trk-B, der zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört (54). Dieser Rezeptortyp konnte ebenfalls in zentralen Strukturen, wie Hypothalamus und Amygdala nachgewiesen werden, die an der Appetitregulation beteiligt sind (55). Dass der Trk-B außerdem eine kritische Rolle im menschlichen Nervensystem spielt, zeigte eine Studie aus dem Jahre 2004, die bei einem achtjährigen Jungen eine Missense-Mutation nachgewiesen hat (56). Dieser Junge zeigte eine umfassende Entwicklungsverzögerung. Er hatte eine Beeinträchtigung der Sprech- und Sprachentwicklung, die sich darin äußerte, dass das Kind bis zum fünften Lebensjahr nicht zu sprechen begann. Neben der Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses und einer gestörten Schmerzempfindung konnten auch Anzeichen einer schweren Fettsucht nachgewiesen werden. BDNF als Ligand des Trk-B ist ebenfalls in die neuronale Entwicklung und synaptische Plastizität involviert (57).

2.2 Periphere Mechanismen der Gewichtsregulation

In das hypothalamische Netzwerk, das die Nahrungsaufnahme reguliert, werden auch Informationen aus der Peripherie integriert. Hier sind insbesondere Leptin, Insulin (siehe Abschnitt 2.1.1) und weitere Hormone des Gastrointestinaltraktes zu nennen.

Ein gut charakterisiertes peripheres metabolisches Signal ist das Leptin. Ein Hormon, das primär in den weißen Adipozyten, aber in geringem Ausmaß auch in weiteren peripheren Geweben, wie Skelettmuskelfasern (58), Plazenta, Uterus (59) und Milchdrüsenepithel (60), produziert wird. Die Produktion von Leptin ist positiv korreliert mit der Fettmasse (61). Die einmalige Gabe von Leptin senkt die fasten-induzierte Hyperphagie (62), und die chronische periphere Verabreichung von Leptin in WT-Mäusen führt zur Verringerung der Nahrungsaufnahme, einem Verlust des Körpergewichtes von 12 % und einer Reduktion der Körperfettmasse von 12,2 % auf 0,7 % (63).

Ein weiteres Sättigungssignal ist Insulin, das von den B-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas sezerniert wird und die Glukosehomöostase reguliert (64). Die Frage nach der zentralnervösen Synthese des Insulins wird bis heute sehr kontrovers diskutiert (65;66). Die Insulinspiegel im Plasma sind wie die Leptinlevel mit der Fettmasse positiv korreliert (67). Insulin überwindet die Blut-Hirn-Schranke durch einen sättigbaren, rezeptor-vermittelten Transport (68) und wirkt im ZNS als ein anorexigenes Signal, das die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht reduziert. Die Insulininfusion in den lateralen Ventrikel von adipösen Zuckerratten (69) oder die direkte Applikation in den PVN von Wistar-Ratten (70) verursacht eine dosisabhängige Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes. Der Mechanismus, über den Insulin seine zentralnervöse Wirkung ausübt, scheint aufgeklärt zu sein. Studien deuteten darauf hin, dass das NPY im Hypothalamus der potenzielle Vermittler des regulatorischen Effektes von Insulin ist. Einerseits verhindert die i.c.v. Insulinapplikation die fasten-induzierte Zunahme der hypothalamischen NPY-Level im PVN und ARC während des Nahrungsentzuges bei Ratten (71) und andererseits ist die NPY mRNA-Expression in insulindefizienten, Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten erhöht, wobei dieser Effekt unter Insulintherapie aufgehoben wird (72;73).

Ein weiteres, die Nahrungsaufnahme regulierendes Hormon ist das orexigen wirkende Ghrelin, das primär im Magen, aber auch im Zwölffingerdarm, Darm, Blinddarm und im Gehirn synthetisiert wird (74;75). Der Ghrelinspiegel im Blut steigt während einer Hungerperiode an und fällt nach einer Mahlzeit wieder ab (76). Die Injektion von Ghrelin sowohl zentral als auch peripher führt zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes bei Ratten (77). Die periphere Applikation von Ghrelin führt zu einer Zunahme der c-Fos mRNA-Expression, eines Markers für neuronale Aktivität, innerhalb der NPY-synthetisierenden-Neuronen des ARC, was auf eine Beteiligung dieser hypothalamischen Region hinweist (78). Außerdem scheint es eine Verbindung zwischen Ghrelin und Orexin in der Regulation der Nahrungsaufnahme zu geben, denn zum einen gibt es direkte synaptische Kontakte zwischen den Ghrelin-immunreaktiven-Fasern und den Orexin-produzierenden-Neuronen, zum anderen induziert die i.c.v. Injektion von Ghrelin die Expression von c-Fos in diesen Neuronen (79).

Cholecystokinin (CCK) ist ein kurzfristig wirkender Sättigungsfaktor, der innerhalb des Magen-Darm-Traktes weit verbreitet ist, wobei die höchsten Konzentrationen im Duodenum und Jejunum zu finden sind (80). CCK wird von den endokrinen Zellen des Duodenums gebildet und postprandial freigesetzt (81). Beim Menschen steigen die Plasmakonzentrationen nach dem Essen bis zu einem Maximum an, das nach 30 bis 60 Minuten erreicht ist, und fallen anschließend wieder ab (82). CCK hat eine Vielzahl von

Funktionen im Gastrointestinaltrakt, z.B. die Stimulation der Ausschüttung von Enzymen aus dem Pankreas und der Gallenblase, die die Magenkontraktion stimuliert und die Magenentleerung hemmt (83;84).

Das zirkulierende CCK reduziert die Nahrungsaufnahme durch Bindung an die CCK_A-Rezeptoren der afferenten Fasern des Nervus vagus (85). Der Nervus vagus vermittelt Informationen zum Hirnstamm, einschließlich dem NTS, dessen Fasern zum lateralen parabrachialen Nucleus des Hirnstammes und PVN projizieren (86). Bei Maus und Ratte werden die anorexigenen und körperrgewichtsreduzierenden Effekte von CCK (i.p.) durch gleichzeitige Applikation von Leptin (i.c.v. oder i.p.) verstärkt. Dieser synergistische Effekt scheint über die CCK_A-Rezeptoren und Capsaicin sensitive Afferenzen vermittelt zu werden (87).

2.3 Das melanokortinerge System

Die Entdeckung des gewichtsregulierenden Peptids Leptin im Jahre 1994 schürte die Hoffnung, ein potentes Medikament zur Behandlung von schwerem Übergewicht gefunden zu haben. Die zahlreichen Publikationen, die bis heute zum Leptin erschienen sind, konnten leider die geweckten Hoffnungen in eine therapeutische Anwendbarkeit dieses Hormons nicht bestätigen. Aufgrund dieser Tatsache konzentrieren sich in jüngster Zeit zahlreiche Arbeitsgruppen auf nachgeschaltete Regelkreise. Zu diesen gehört auch das melanokortinerge System, welches als neurohumorales Netzwerk des Energiehaushaltes in das Interesse der Forschung gerückt ist.

2.3.1 Die Komponenten des melanokortinergen Systems

Die für die Gewichtsregulation bedeutsamen Komponenten des melanokortinergen Systems umfassen im Wesentlichen die transmembranalen MC3-R und MC4-R sowie die antagonistischen und agonistischen Liganden (88). Zu den Liganden zählen die Melanokortine, eine Gruppe von Hormonen bzw. Neuropeptiden, die aufgrund ihrer gemeinsamen Herkunft als sequenzielle Spaltprodukte von POMC die übereinstimmende Kernsequenz Histidin - Phenylalanin - Arginin - Tryptophan besitzen (89). In Abhängigkeit von der Enzymausstattung entstehen in den jeweiligen Geweben aus dem Prohormon POMC die verschiedenen Melanokortine: adrenocorticotropes Hormon (ACTH), α -MSH, beta-Melanozyten-stimulierendes Hormon (β -MSH) und gamma-Melanozyten-stimulierendes Hormon (γ -MSH). Diese Hormone werden als „Melanokortine“ bezeichnet, da sie sowohl die Pigmentierung als auch die Steroidbiosynthese in der Zona glomerulosa und fasciculata der Nebennierenrinde (NNR) stimulieren.

2.3.2 Expression des Proopiomelanocortin-Gens

Der hauptsächliche Expressionsort von POMC ist die Hypophyse. Zahlreiche Studien konnten POMC auch im Gehirn in den hypothalamischen Kerngebieten wie z.B. im ventrolateralen Teil des ARC und im NTS, sowie in endokrinen Geweben, wie dem Hoden, dem Ovar, der Plazenta, dem Nebennierenmark und dem Pankreas nachweisen (90-92).

Neben den für Entgiftung und Homöostase wichtigen Organen, Leber und Nieren, wird POMC auch in Zellen der Immunabwehr wie den Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten gebildet (93). Auch in den inneren Körperbegrenzungen wie in der Wand des Magen-Darm-Trakts, und der äußeren Körperbegrenzung, der Haut, konnte POMC nachgewiesen werden. In den Hautzellen sind es Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, die POMC synthetisieren (94-97).

Das 32 Kilodalton (kDa) große menschliche POMC-Gen umfasst 7665 Basenpaare, ist auf Chromosom 2 (p23) lokalisiert und besteht aus drei Exons, die durch zwei Introns getrennt werden (98;99). Das Exon 1 umfasst ca. 87 Basenpaare und enthält den 5'-untranslatierten Abschnitt der mRNA. Das Exon 2 umfasst 152 Basenpaare, es enthält ebenfalls einen Teil des 5'-untranslatierten Abschnitts, kodiert das Signalpeptid, das für die Proteinsynthese und Sekretion Bedeutung hat und die ersten 18 AS des N-terminalen von POMC (100). Das 663 Basenpaare umfassende Exon 3 kodiert für den restlichen Teil des POMC, aus dem die verschiedenen bioaktiven Peptide durch enzymatische Spaltung entstehen (Abschnitt 2.3.3).

2.3.3 Biosynthese der POMC-Derivate im Hypothalamus

Die Schritte der POMC-Prozessierung im zentralen Nervensystem (ZNS) wurden durch die Arbeitsgruppe von Liotta im Jahre 1980 aufgeklärt (101): Durch Puls-Chase Labeling von POMC-Produkten in kultivierten hypothalamischen Rattenneuronen mit nachfolgender Immunpräzipitation und Gelfiltration wurde die POMC-Prozessierung innerhalb des Hypothalamus analysiert.

Das Prohormon wird nach dem Transport durch den Golgi-Apparat, vermittelt über ein spezifisches Signalpeptid, zielgerichtet in die sekretorischen Granula transportiert (102). Innerhalb dieser Granula wird POMC posttranslational durch eine Familie von Serinproteasen, die Prohormonkonvertasen (PC), proteolytisch geschnitten (Abb. 4). Diese Enzyme gehören zur großen Gruppe der Endopeptidasen und schneiden die Prohormone an Paaren von dibasischen Aminosäureresten (häufig Lysin (K) und Arginin (R)) (103). Während PC1 bevorzugt hinter dem Motiv KR spaltet, erkennt PC2 alle vier Kombinationsmöglichkeiten (KK, KR, RK, RR). Zunächst werden mit Hilfe der PC1 aus dem POMC das 22 kDa proACTH und das beta-Lipotropin (β -LPH) geschnitten (Abb. 4). Danach werden aus

dem proACTH durch PC1 das 4,5 kDa große ACTH (= ACTH-(1-39)), N-POC und joining peptide (JP) gebildet. N-POC wird weiter zu γ -MSH prozessiert. Aus dem ACTH-(1-39) wird mit Hilfe von PC2 ACTH-(1-17) und das Corticotrophin-like intermediate lobe peptide (CLIP) erzeugt. Die Bildung des reifen α -MSH aus dem ACTH-(1-17) wird über desacetyl- α -MSH (DA- α -MSH) durch Carboxypeptidase E (CPE), Peptidylglycyl- α -amidierende-Monooxygenase (PAM) und N-Acetyltransferase (N-AT) katalysiert. Aus β -LPH erzeugt PC2 auch gamma-Lipototropin (γ -LPH) und beta-Endorphin (β -END).

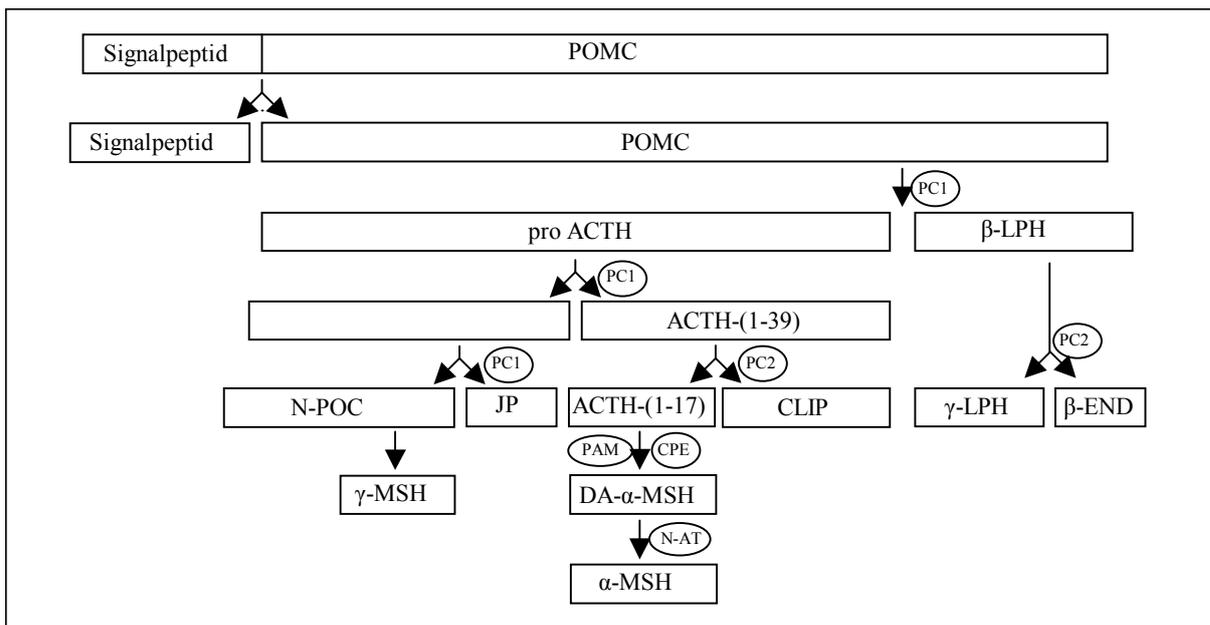


Abb. 4: Schematische Darstellung der POMC-Peptidsynthese im Hypothalamus (verändert nach (104))

In einer Studie von Pritchard et al. im Jahre 2003 wurden der relative Gehalt von POMC, ACTH und α -MSH in der cerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) und in hypothalamischen Extrakten untersucht (104). Es konnte gezeigt werden, dass die Vorläuferpeptide des α -MSH in der CSF von Ratten nachweisbar sind, wie es auch im Menschen der Fall war (105). Im Gegensatz dazu konnte α -MSH nicht detektiert werden. In den hypothalamischen Extrakten wurden α -MSH und in geringerer Konzentration POMC und ACTH nachgewiesen.

2.3.4 Kontrolle der POMC Expression im Hypothalamus

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass sich die POMC Expression im Hypothalamus in Abhängigkeit zum Energiebedarf im Körper verändert. Ein Nahrungsentzug führt bei Ratten zu einer Verringerung der POMC mRNA-Expression (106-108). Im Gegensatz dazu findet eine Heraufregulation bei Ratten statt, die durch die zusätzliche Zufuhr von gesüßter Kondensmilch zum Zeitpunkt des Experimentes ein 5 % erhöhtes Körpergewicht im

Vergleich zu den Kontrolltieren hatten (109). Die Vermittlung der transkriptionalen Kontrolle erfolgt wenigstens teilweise durch Leptin. Die POMC mRNA-Spiegel von Leptin-defizienten Nagern (ob/ob-Mäuse) bzw. Tieren mit einem Defekt in der Signaltransduktion des Leptinrezeptors (db/db (diabetes)-Mäuse) sind signifikant niedriger als die der entsprechenden WT-Tiere. Leptinbehandlung führte bei den Leptin-defizienten ob/ob-Mäusen zu einem Anstieg der POMC mRNA-Expression im Hypothalamus, wohingegen kein Effekt bei den db/db-Tieren mit Defekt in der Leptinrezeptor Signaltransduktion zu beobachten war (110). Über welchen Mechanismus Leptin die POMC Expression aktiviert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird eine direkte Modulation durch STAT (Signaltransduktoren und –aktivatoren der Transkription) Proteine, die bei Aktivierung des Janus-Kinase (JAK)/STAT Signalwegs durch die lange Form des Leptinrezeptors (OB-Rb) phosphoryliert werden, angenommen. So gibt es Untersuchungen, die gezeigt haben, dass STAT3 in POMC-Neuronen exprimiert wird (111) und in vitro die POMC mRNA-Expression reguliert (112).

Neben den Effekten von Leptin gibt es Hinweise auf einen direkten stimulierenden Einfluss von Plasmainsulin, Blutglukose und Glukokortikoiden (GC) auf die POMC Expression (113-115). In-vitro konnten weitere Faktoren identifiziert werden, die die POMC Expression beeinflussen, so z.B. CRH und Leukämie inhibierender Faktor (LIF) in AtT-20 Zellen (116).

Die Regulation der post-translationalen Modifikation von POMC innerhalb des Hypothalamus ist sehr komplex und wird durch second messenger Systeme kontrolliert, die in den POMC-Neuronen als Antwort auf Schwankungen im Energiehaushalt aktiviert werden (104).

2.3.5 Physiologische Bedeutung endogener Melanokortinagonisten

2.3.5.1 α -Melanozyten-stimulierendes Hormon

α -MSH ist biochemisch ein Tridekapeptid, das strukturell in der Aminosäuresequenz von ACTH enthalten ist, da es durch proteolytische Spaltung aus diesem Peptid entsteht. In diesem Prozessierungsprozess findet eine C-terminale Amidierung statt, so dass aus ACTH zunächst DA- α -MSH entsteht. Für die Bildung von α -MSH wird anschließend das N-terminale Ende acetyliert. Die Hauptfraktion in der Hypophyse ist das α -MSH, während im Gehirn das DA- α -MSH vorherrscht (117). Dies stimmt mit dem Befund überein, dass in hypothalamischen Extrakten nur geringe Level der N-AT, des Enzyms, das für die Spaltung von DA- α -MSH zu α -MSH verantwortlich ist, nachgewiesen werden konnten.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die i.c.v. Injektion von DA- α -MSH in Ratten nach 24 Stunden Nahrungsentzug zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme führt, jedoch war zum Erzielen der gleichen Effekte eine 25fach höhere Dosis erforderlich als für α -MSH (118),

obwohl ähnliche Affinitäten für den MC3-R und MC4-R vorliegen. Diese unterschiedlichen Effekte nach i.c.v. Applikation der Peptide könnten auf Unterschiede in der Stabilität der Moleküle zurückzuführen sein. Das Entfernen der N-acetylierten Gruppe zur Bildung des DA- α -MSH macht das Peptid gegenüber Peptidasen empfindlicher, wodurch der Abbau beschleunigt werden kann. Studien haben gezeigt, dass DA- α -MSH fünf- bis zehnmal schneller in Homogenaten von Rattengehirnen abgebaut wird als α -MSH (119).

Übereinstimmend mit der POMC Verteilung konnte α -MSH in Arealen des ZNS wie Hypothalamus und NTS, aber auch in peripheren Gebieten, wie Haut, Pankreas, Hoden, Ovarien, Plazenta, Nebennierenmark und Neuronen des Darms nachgewiesen werden (120). Zu den wichtigsten Funktionen des α -MSH in der Peripherie zählt der Einfluss auf die Regulation der Hautpigmentierung. So führt UV-Bestrahlung der Haut über eine UV-induzierte Stimulation des MC1-R durch α -MSH zu einer Erhöhung der Melanozytenzahl und Melaninproduktion, wodurch die Haut vor strahlungsbedingter Schädigung geschützt wird (121;122).

Zudem werden α -MSH eine Reihe von Immunfunktionen zugesprochen, wie z.B. Unterdrückung der Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)-Synthese, Suppression der Expression von kostimulierenden Molekülen (CD86, CD40, intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)) auf antigenpräsentierten dendritischen Zellen, Hemmung der Fieberreaktion und Minderung der Entzündungsreaktion, die durch Chemikalien oder UV-Bestrahlung verursacht wird (123;124).

Wie schon im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, beeinflusst α -MSH die Energiehomöostase. Studien haben gezeigt, dass eine i.c.v. Applikation von α -MSH bei ad-libitum gefütterten Ratten (125), als auch bei hungrigen Tieren zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führte (126). Außerdem wurde in adipösen, POMC-defizienten-Mäusen (127) nach einer zweiwöchigen i.p. Behandlung mit einem α -MSH-Analogon (α -MSH-(4-13)) eine Abnahme des Körpergewichtes beobachtet.

2.3.5.2 Adrenocorticotropes Hormon

ACTH ist ein aus 39 AS bestehendes Polypeptid mit einem Molekulargewicht (MM) von 4540 Da. Die ersten 24 AS sind für alle Spezies identisch. Die ersten 18 AS stellen den Träger der vollen biologischen Aktivität dar (128;129).

Neben der Synthese des ACTH im ZNS und der Hypophyse, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben wurde, wird dieses Peptid auch in der Nebenniere und der Haut gebildet (130). Mit der Entdeckung, dass die Injektion von ACTH oder α -MSH in die CSF bzw. in verschiedene Gehirnregionen bei Säugetieren (Affen, Hunden, Ratten, Kaninchen, Katzen)

zu einer komplexen Verhaltensveränderung führt, wurde schon Mitte der 60er Jahre über eine physiologische Rolle dieser beiden Peptide im ZNS spekuliert (131;132). Diese Beobachtungen waren vor dem Nachweis, dass ACTH und α -MSH nicht nur in endokrinen Zellen der Hypophyse, sondern auch in unterschiedlichen neuronalen Strukturen des Gehirnes synthetisiert werden (133). Erst Ende der neunziger Jahre erfolgte die Entdeckung der MC-R und der Nachweis deren Expression in verschiedenen Regionen des ZNS (134). Neben den durch die zentral applizierten Melanokortine induzierten Verhaltensveränderungen, wie Strecken, Gähnen und exzessives Putzen („stretching-yawning syndrome“) (131), konnten später mit dem Schütteln des ganzen Körpers, wiederholtes Auftreten von Erektionen und Hyperalgesie, noch weitere Veränderungen beobachtet werden (135;136).

Mitte der achtziger Jahre wurde zum ersten Mal die Rolle der Melanokortine in der zentralnervösen Kontrolle des Appetits beschrieben. Die Injektion von ACTH-(1-24) in den lateralen Ventrikel nach einer 24-stündigen Hungerperiode oder in den VMN während der nächtlichen Phase der Futteraufnahme hemmte die Nahrungsaufnahme der Ratten (137). Dieser inhibitorische Effekt des ACTH-(1-24) auf die Nahrungsaufnahme bestätigte sich ebenfalls in Mäusen und Kaninchen (136).

2.3.6 Physiologische Bedeutung endogener Melanokortinantagonisten

2.3.6.1 Agouti-Protein

Das Agouti-Protein ist ein natürlich vorkommender Antagonist der MC-R, das aus 131 AS besteht und normalerweise in der Haut exprimiert wird, wodurch es die Pigmentation durch Antagonisieren des MC1-R beeinflusst (138). Durch Bindung an den MC1-R kommt es zu einer Verminderung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels in den Melanozyten und damit zu einer Umschaltung der Synthese von Eumelanin (schwarzes Pigment) auf Phaeomelanin (gelbes Pigment). Eine ektopische Expression des Agouti-Proteins führt zu Veränderungen des Phänotyps, einschließlich erhöhter Nahrungsaufnahme, Körpergewichtszunahme und Anstieg des Längenwachstums, wie es eindrucksvoll in den lethal yellow Agouti (A^Y) Mäusen gezeigt werden konnte (139). Die bei den A^Y Mäusen beobachtete Fettsucht beruht auf der Expression des Agouti-Proteins in Kernen des Hypothalamus, wie PVN, DMN und VMN und damit der Antagonisierung des MC4-R im ZNS, wodurch die Wirkung des endogenen Agonisten α -MSH unterdrückt wird (140).

2.3.6.2 Agouti-related protein

AgRP ist ein Appetit stimulierendes Neuropeptid, das in Struktur und Größe nahezu identisch ist mit dem Agouti-Protein. Das humane AgRP ist auf Chromosom 16 lokalisiert und besteht aus 132 AS, das von Nagetieren wie Maus und Ratte nur aus 131 AS (141;142). Es zeigte sich in zahlreichen Studien, dass das AgRP ein potenter Antagonist des MC3-R und MC4-R ist (143) und in hypothalamischen Kernen wie ARC und PVN exprimiert wird (144), jedoch auch in geringer Menge in Nebenniere, Hoden und Lunge vorkommt (142). Innerhalb des ARC wird in über 98 % der NPY-exprimierenden-Neuronen das AgRP synthetisiert (27). Eine Überexpression von humanen AgRP in transgenen Mäusen führt ab einem Alter von vier Wochen zu einer deutlichen Körpergewichtszunahme bis hin zur Fettsucht, erhöhtem Längenwachstum, Hyperinsulinämie, spät einsetzender Hyperglykämie, Hyperplasie der Inselzellen des Pankreas und erniedrigten Kortikosteronspiegeln (145). Diese phänotypischen Merkmale sind vergleichbar mit denen der A^Y -Mäuse und den MC4-R-Knockout-Mäusen (MC4-R^{-/-}). Im Gegensatz dazu zeigen AgRP-Knockout-Mäuse (AgRP^{-/-}) ein normales Fressverhalten, ohne Änderung des Körpergewichtes und der kumulativen Nahrungsaufnahme im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern. AgRP^{-/-}-Mäuse sind fertil, weisen keine schweren histologischen und pathologischen Abnormalitäten auf und haben mit den WT-Mäusen vergleichbare Serumspiegel für Glukose, Leptin, Triglyceride und freie Fettsäuren. Zudem sind die Expressionslevel für MC3-R, MC4-R und NPY im Vergleich zu den WT-Mäusen unverändert. Als Kompensationsmechanismus für den Verlust von AgRP wird die beobachtete Zunahme der Expression des orexigenen MCH im LHA der AgRP^{-/-}-Mäuse diskutiert (146).

Die lang anhaltenden Effekte auf die Nahrungsaufnahme nach zentraler Injektion des AgRP zeigen, dass es sich um ein sehr potentes orexigenes Peptid handelt. Die i.c.v. Applikation von C-terminalen Fragmenten des AgRP, wie AgRP-(83-132) bzw. AgRP-(86-132), führte jeweils zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme, die über einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen anhielt (147;148). Die unterliegenden Mechanismen dieses lang anhaltenden Effektes sind bisher noch ungeklärt, doch scheint er unabhängig von einer andauernden Blockierung der MC-R zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Injektionen in den PVN, den medialen präoptischen Kern (MPO) und den DMN erzielt. Im Gegensatz dazu wurden keine Veränderungen in der Nahrungsaufnahme bei Applikationen in den ARC, LHA oder VMN festgestellt (30). Dieses zeigt damit deutlich, dass der PVN, MPO und DMN die Hauptkerne des melanokortinergen Systems sind, die die orexigene Wirkung des AgRP vermitteln.

2.3.7 Rezeptoren des Melanokortinsystems

Fünf verschiedene MC-R, die neben ihrer gewebsspezifischen Expression auch unterschiedliche Affinitäten zu den Liganden aufweisen, wurden bisher identifiziert (Tab. 2).

Die MC-R gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. Sie bestehen aus sieben Transmembrandomänen sowie drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen. Die Wirkung der Rezeptoren wird über die Aktivierung der Adenylatzyklase, die die second-messenger Signalkaskade über cAMP vermittelt, ausgelöst. Bei der Aktivierung der Rezeptoren lässt sich ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel nachweisen (149). Ein weiterer, jedoch bisher kaum untersuchter Signaltransduktionsmechanismus für den MC3-R und MC5-R ist der Phosphoinositol-Weg, bei dem es durch Bindung von Liganden an den Rezeptor zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumausschüttung kommt (150).

Die fünf verschiedenen MC-R weisen auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 40 – 60 % auf. So lässt sich zwischen dem MC3-R und dem MC4-R eine 58%-ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz feststellen (41).

Melanokortin-Rezeptor	Lokalisation	physiologische Funktion	Agonisten	Antagonisten
MC1-R	Melanozyten, Zellen des Immunsystems	Haut- und Haarpigmentierung, Immunmodulation	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	Agouti
MC2-R	Nebennierenrinde, Adipozyten	Glukokortikoid- und Mineralokortikoidproduktion	ACTH	
MC3-R	ZNS, Dünndarm, Magen, Pankreas, Plazenta	Energiehomöostase, Einfluss auf Fettverteilung, Blutdruck und Herzfrequenz	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	AgRP
MC4-R	ZNS	Energiehomöostase, Modulation des Sexualverhaltens	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	AgRP, Agouti
MC5-R	exokrine Drüsen, Talgdrüsen	Drüsenfunktion, Thermoregulation	α -MSH > β -MSH = ACTH > γ -MSH	

Tab. 2: Lokalisation, physiologische Funktion und Bindungsaffinität der endogenen Liganden der Melanokortin-Rezeptoren. (verändert nach (88))

2.3.7.1 Rezeptortypen für die Vermittlung peripherer Effekte

Der MC1-R findet sich in der Hypophyse, den Hoden, den Ovarien und der Plazenta. Außerdem wird der Rezeptor an Oberflächen unterschiedlicher Blutzellen (Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten) sowie Endothelzellen, Fibroblasten und Keratozyten exprimiert. Das Expressionsmuster legt die Vermutung nahe, dass dieser Rezeptortyp einerseits an der Pigmentbildung in der Haut und andererseits an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt ist (151;152).

Der MC2-R konnte in der Haut, im Kortex der NNR und im Fettgewebe der Maus, jedoch nicht in menschlichen Fettzellen nachgewiesen werden. Dieser Rezeptortyp, früher auch als

ACTH-Rezeptor bezeichnet, ist an der Vermittlung der Effekte von ACTH auf die Steroidsynthese beteiligt (153).

Der MC5-R wird in einer Vielzahl von peripheren Geweben wie Skelettmuskel, Milz, Thymus, Hoden, Knochenmark, Hypophyse, Lunge, Herz, Niere, Leber und Fettgewebe exprimiert (154-156). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptortyp ebenfalls im ZNS exprimiert wird (156). Seine Funktion ist bis heute ungeklärt, die Beteiligung an der Thermoregulation (157), Immunmodulation (158) und dem Sexualverhalten (159;160) wird diskutiert.

2.3.7.2 Rezeptoren für die Regulation des Körpergewichtes

In diesem Abschnitt werden die beiden Rezeptortypen (MC3-R und MC4-R), die, wie es in 2.3.1 beschrieben wurde, bei der Regulation des Körpergewichtes eine wichtige Rolle spielen, näher charakterisiert.

Die genomische Lokalisation des menschlichen MC3-R-Gens wurde auf Chromosom 20 durch Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (ISH) nachgewiesen (161). Das menschliche MC3-R-Gen verschlüsselt ein Protein von 360 AS (162). Im Gegensatz dazu umfasst das Protein bei Ratten und Mäusen nur 323 AS (163;164). Die Bedeutung der 37 zusätzlichen AS des menschlichen MC3-R ist bisher unklar, jedoch scheinen sie die MC3-R Aktivität nicht zu beeinflussen. Die Analyse der MC3-R mRNA mittels ISH zeigte die Expression in Strukturen des ZNS, wie Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus und Kortex (162). Eine relativ hohe Dichte an mRNA wurde in Arealen des Gehirnes gefunden, die von POMC immunreaktiven Neuronen innerviert werden, wie dem ARC. Außer dem ARC wird der MC3-R auch im VMN, MPO und LHA des Hypothalamus exprimiert. Die Expression im anteroventralen periventriculären Nucleus und dem posterioren hypothalamischen Gebiet weist auf eine Funktion des Rezeptors in der kardiovaskulären und thermoregulatorischen Kontrolle hin. Neben der Expression im ZNS wurde dieser Rezeptortyp auch in peripheren Geweben, wie Leber, Lunge, Herz, Hoden, Schilddrüse und beim Menschen zusätzlich noch in Darm, Plazenta, Magen und Duodenum nachgewiesen (162;163).

Der MC4-R besteht aus 332 AS und das entsprechende Gen ist auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 18 lokalisiert. Die Aminosäuresequenz des Rezeptors ist hoch konserviert und besitzt eine Übereinstimmung von 88 % zwischen Ratte und Mensch und 87 % zwischen Huhn und Mensch auf mRNA-Ebene (165). Bisher wurde der MC4-R ausschließlich im ZNS nachgewiesen. ISH-Studien zeigten innerhalb des Rattengehirnes ein relativ breites Expressionsmuster der MC4-R mRNA mit einer relativ hohen Dichte im Hypothalamus, Thalamus, Kortex, limbischen System und Hirnstamm (166). Dieses breite

Verteilungsmuster impliziert die komplexe Rolle des Rezeptors in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Die höchste Dichte an MC4-R mRNA findet sich in Regionen des Hypothalamus, die für die Kontrolle der Nahrungsaufnahme mitverantwortlich sind, wie PVN, DMN und LHA (166).

2.4 Bedeutung von Störungen in der zentralen Verarbeitung von Melanokortinsignalen

Mit der Entdeckung des Agouti-Gens und der Analyse der A^Y-Mäuse während der 90iger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde das Interesse an der potenziellen Rolle des melanokortinergen Systems in der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Adipositas eingeleitet. In der letzten Zeit sind zahlreiche Studien erschienen, die sich mit den Mutationen von Genen des melanokortinergen Systems beschäftigen. So sind z.B. die Deletion der zentralen MC-R, wie MC3-R und MC4-R, und des POMC mit der Ausbildung von Fettsucht assoziiert. In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Mutationen, sowohl in den Knockout-Tieren als auch beim Menschen, und die sich daraus ergebenden phänotypischen Veränderungen dargestellt.

2.4.1 POMC-Knockout-Modelle

Yaswen und seine Arbeitsgruppe generierten 1999 eine POMC-Knockout-Maus (POMC^{-/-}), die entsprechend nicht in der Lage war ACTH, γ -LPH, α -MSH, β -MSH und β -END zu synthetisieren (127). Diese Mäuse zeigten ab dem zweiten Lebensmonat ein erhöhtes Körpergewicht in Folge gesteigerter Nahrungsaufnahme, die im Verlauf ihres Lebens zu einer Adipositas führte. Ein anderer phänotypischer Unterschied zwischen den Mutanten und den WT-Mäusen war die gelbliche Hautfarbe der Mausmutanten. Die gestörte Entwicklung der Nebennieren in den POMC^{-/-}-Mäusen zeigte deutlich, dass die vom POMC-abstammenden Peptide für die Nebennierenentwicklung essentiell sind. Die Kortikosteron- und Aldosteronspiegel im Serum lagen unter der Nachweisgrenze. Der Phänotyp dieser Mutanten ist dem der bereits zuvor identifizierten POMC-defizienten-Menschen sehr ähnlich (siehe Abschnitt 2.4.2). Die tägliche Behandlung der POMC^{-/-}-Mäuse mit einem stabilen α -MSH Agonisten führte innerhalb von zwei Wochen zu einem Gewichtsverlust von 46 % des Ausgangsgewichtes. Nach Beendigung der Injektionen von POMC nahmen die Tiere an Gewicht zu und erreichten nach 14 Tagen wieder das Ausgangsgewicht, das sie vor der Behandlung aufwiesen (127).

2.4.2 Mutationen des POMC-Gens beim Menschen

Mutationen im POMC-Gen sind beim Menschen relativ selten (167). Im Jahre 1998 wurden ein Junge und ein Mädchen beschrieben, die im Säuglingsalter mit Hypoglykämie und Hyponatriämie aufgefallen waren, was sich später auf einen ACTH-Mangel zurückführen ließ (168). Im Alter von wenigen Monaten waren beide Kinder bereits extrem adipös. Außerdem hatten die Kinder rote Haare und helle Haut. Durch Genanalyse konnte bei dem Mädchen eine Compound-Heterozygotie im Exon 3 des POMC-Gens und dem Jungen eine homozygote Mutation im Exon 2 des POMC-Gens festgestellt werden. Im Jahre 2000 wurden noch drei weitere Patienten beschrieben, die eine Mutation im POMC-Gen besaßen (169). Alle Patienten waren adipös und zeigten eine Hyperphagie.

Bei den von Krude et al. (168) beschriebenen Mutationen im POMC-Gen wurde ein rezessiver Erbgang nachgewiesen; in einem anderen Fall konnte kürzlich eine Mutation im POMC-Gen mit dominant negativem Effekt diagnostiziert werden (170). Durch einen Aminosäureaustausch in Position 236 wird die dibasische Schnittstelle zwischen β -MSH und β -END zerstört, so dass ein β -MSH/ β -END-Fusionsprotein entsteht. Dieses Fusionsprotein bindet mit einer ähnlichen Affinität wie die natürlichen Liganden an den MC4-R, jedoch ist die Fähigkeit, den Rezeptor nach der Bindung zu aktivieren, reduziert. Die Patienten zeigten eine frühmanifeste Adipositas ohne weitere phänotypische Auffälligkeiten.

2.4.3 MC4-R-Knockout-Modelle

Der MC4-R zeigt innerhalb des Gehirns ein relativ breites Expressionsmuster mit besonders hoher Dichte in Regionen des Hypothalamus, die für die Kontrolle des Appetits mitverantwortlich sind, wie PVN, DMN und LHA (43).

Im Jahre 1997 wurde die MC4-R^{-/-}-Maus von Huszar et al. beschrieben, die neben einem adipösen Phänotyp auch Hyperinsulinämie und Hyperglykämie aufwies. Innerhalb der ersten vier Lebenswochen traten keine Unterschiede im Körpergewicht zu Tage. Erst ab einem Alter von fünf Wochen waren alle homozygoten Träger des Defektes beiderlei Geschlechtes schwerer als ihre gleichaltrigen Wurfgeschwister (171). Außerdem zeigten die Tiere ein signifikant höheres Längenwachstum im Vergleich zu den WT-Mäusen sowie erhöhte Plasmaleptinspiegel. Die heterozygoten Mutanten wiesen ein Körpergewicht auf, das zwischen den homozygoten Tieren und den WT-Tieren lag (171). Dieser Heterozygoteneffekt wurde in Folgestudien lediglich für männliche Tiere bestätigt, die Weibchen unterschieden sich nicht von den WT-Mäusen. Ein möglicher Grund könnte die leichte Variation des genetischen Hintergrundes der embryonalen Stammzellen sein (172).

2.4.4 Mutationen im MC4-R-Gen beim Menschen

Nachdem für die MC4-R^{-/-}-Maus die Bedeutung des MC4-R hinsichtlich des Phänotyps der extremen Adipositas belegt worden war, begann die Suche nach Mutationen im menschlichen MC4-R. Die Mutationssuche bei extrem adipösen Menschen erbrachte bisher 38 unterschiedliche Mutationen im translatierten Bereich des MC4-R-Gens. Zahlreiche internationale Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Mutationen im menschlichen MC4-R-Gen und der Adipositas mit einer Prävalenz von 0,5 – 5,8 % aufzeigen (173), wobei die große Spanne der Prävalenzen in den verschiedenen untersuchten ethnischen Gruppen begründet sein kann. In einer kürzlich erschienenen Studie aus Dänemark wurden bei 1 – 2,5 % aller schwer übergewichtigen Kinder, Jugendlichen und Erwachsenen Mutationen im MC4-R-Gen gefunden; sie sind ursächlich an der Entstehung der Adipositas beteiligt (174).

Ende 1998 beschrieben Yeo et al. und Vaisse et al. unabhängig voneinander zwei Mutationen im MC4-R, die funktionell zu einer Haploinsuffizienz führen (175;176). Yeo et al. identifizierte eine heterozygote Frameshift Mutation im Codon 211 des MC4-R bei einem extrem adipösen Kind, dessen Vater einen body mass index (BMI) von 41 kg/m² aufwies (175). Eine Nonsensmutation an Position 35 des MC4-R wurde bei zwei nicht verwandten adipösen Kindern nachgewiesen (BMI 31 kg/m² und 46 kg/m²). Diese Mutation führt zu einem trunkierten Protein, das ausschließlich die N-terminale extrazelluläre Domäne umfasst (177).

Die Daten aus den Untersuchungen an Patienten mit Mutationen im MC4-R-Gen belegten zusammen mit den aus der Generierung der MC4-R^{-/-}-Mäuse gewonnenen Ergebnissen die entscheidende Rolle des MC4-R in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme.

2.4.5 MC3-R-Knockout-Modelle

Genetische (171) und pharmakologische (178) Studien haben die Rolle des MC4-R in der Regulation der Energiehomöostase aufgezeigt. Durch Erzeugung von MC3-R^{-/-}-Mäusen und der anschließenden Charakterisierung der phänotypischen Auffälligkeiten der Tiere sollte die physiologische Relevanz des Rezeptors näher untersucht werden (179). Diese Tiere zeigten kein signifikantes Übergewicht, jedoch eine 50 – 60 %-ige Zunahme des Körperfettanteils, bei reduzierter Magermasse und einer gesteigerten Effizienz der Futtermittelverwertung (Ratio von Gewichtszunahme zu Nahrungsaufnahme) im Vergleich zu den WT-Wurfgeschwistern, trotz Hypophagie und normaler metabolischer Rate. Übereinstimmend mit der erhöhten Fettmasse sind diese Tiere hyperleptinämisch, und zudem entwickeln männliche Mäuse eine milde Hyperinsulinämie. Ein reduzierter Stoffwechsel als Erklärung für die Gewichtszunahme trotz Hypophagie findet sich bei MC3-R^{-/-}-Mäusen nicht. Lediglich eine gering verminderte

körperliche Aktivität der Tiere könnte für die Gewichtszunahme verantwortlich sein. Außerdem wurde bei den MC3-R^{-/-}-Tieren eine ungewöhnliche Zunahme des respiratorischen Quotienten nachgewiesen, wenn die Ratten ein Futter mit hohem Fettanteil erhielten, was auf eine Reduzierung des Verhältnisses zwischen Fettoxidation und Kohlenhydratoxidation hinweist (180). Offenbar hat der MC3-R nur einen moderaten Effekt auf das Körpergewicht, wohl aber einen deutlichen Einfluss auf den Körperfettanteil. Doppelknockout-Mäuse für MC3-R und MC4-R sind schwerer als Knockouts für jedes der beiden einzelnen Gene (179).

2.4.6 Mutationen im MC3-R-Gen beim Menschen

Die erste Beschreibung einer Mutation im menschlichen MC3-R erfolgte im Jahre 2002 durch Lee et al. (181). In einer Familie aus Singapur wurde bei der 13-jährigen Tochter und ihrem Vater ein Basenaustausch in Position 548 (T548A) festgestellt. Das Mädchen zeigte neben ihrer extremen Fettsucht auch unregelmäßige Menstruationszyklen. Im Vergleich zu 40 anderen adipösen Probanden ohne MC3-R Mutation wurde eine erhöhte Insulinsensitivität festgestellt. Der relativ hohe Körperfettanteil von 30 % und 49 % bei Vater und Tochter ist ähnlich wie bei anderen adipösen Patienten. Die Unterschiede im Phänotyp zwischen Vater und Tochter und die Beobachtung, dass die Familienmitglieder ohne Mutation ebenfalls adipös sind, unterstützt die Annahme, dass die Fettsucht nicht nur aus oben genannter Mutation resultiert, sondern aus einer Kombination von Umwelt-, Verhaltens- und multiplen genetischen Faktoren.

2.5 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die potentielle Bedeutung des ACTH in der Regulation des Körpergewichtes in experimentellen Untersuchungen an Wistar-Ratten erforscht werden.

Zunächst wird untersucht, welche Auswirkungen die einmalige zentralnervöse Applikation von ACTH auf die Nahrungsaufnahme besitzt. Da ACTH die Ausschüttung von GC aus der NNR stimuliert, die wiederum die Nahrungsaufnahme anregen können, sind Experimente sowohl an adrenaletomierten (ADX) als auch an scheinoperierten Tieren geplant. Weiterhin werden die Expression des MC4-R und die eines nachgeordneten Neuropeptides der Appetitregulation (BDNF) im Hypothalamus untersucht.

Außerdem wird in der hier vorliegenden Arbeit die physiologische Relevanz des endogenen ACTH für die Homöostase des Körpergewichtes untersucht. ACTH und sein Spaltprodukt α -MSH wirken nach heutigem Kenntnisstand an den gleichen MC-R, so dass für die Beantwortung dieser Fragestellung keine Rezeptorantagonisten verwandt werden können. Alternativ wird ein Ansatz gewählt, bei dem spezifische Antikörper (AK), die entweder gegen

ACTH oder α -MSH gerichtet sind, gegeben werden. Dieses ist ein bisher weder für α -MSH noch ACTH etabliertes experimentelles Verfahren, so dass zunächst die Testung der Wirksamkeit spezifischer Antikörper durchgeführt werden muss. Geeignete AK werden dann in einem Experiment eingesetzt, in dem die Tiere zwei unterschiedlichen Fütterungsregimes unterzogen werden, so dass die Ratten zu Beginn des Experimentes entweder satt oder physiologisch hungrig (jedoch nicht nahrungsdepriviert) sind. Die Hypothese ist, dass bei hungrigen Tieren die zentralnervösen Spiegel der anorexigenen Peptide α -MSH und ACTH niedrig, bei satten Tieren jedoch hoch sind. In Experimenten, in denen jeweils eine einmalige Applikation von gegen α -MSH oder ACTH gerichteten Antikörpern oder die kombinierte Applikation von beiden durchgeführt wird, soll dieses überprüft, sowie die physiologische Bedeutung von endogenem α -MSH und ACTH untersucht werden. Auch im Rahmen dieser Fragestellung wird an den Gehirnen der Versuchstiere die Expression von MC4-R und BDNF untersucht.

Abschließend wird in einem subchronischen Applikationsschema über sieben Tage an ad libitum gefütterten Ratten untersucht, ob die Gabe von ACTH-AK (zweimal täglich) einen Einfluss auf Nahrungs- und Wasseraufnahme der Tiere sowie die Entwicklung des Körpergewichtes besitzt. Die getrennte Betrachtung der Nahrungsaufnahme während des Tages (= satte Tiere) bzw. während der Nacht (= hungrige Tiere) ermöglicht es hier, den Einfluss der AK in Abhängigkeit vom Ernährungszustand im Detail zu betrachten.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeiner Teil

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche Albinoratten vom Stamm Wistar (*Rattus norvegicus*) verwendet, die von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen wurden. Die Ratten wurden mit einem Gewicht von 225 – 250 g übernommen. Den Tieren wurde vor Versuchsdurchführung eine mindestens einwöchige Gewöhnungsfrist an den Tierstall des ZENIT (Zentrum für Neurowissenschaftliche Innovation und Technologie) in Magdeburg ermöglicht. Der Haltungsraum war fensterlos und hatte eine konstante Temperatur von + 23 °C. Die Regulierung der Beleuchtung wurde durch eine Zeitschaltung mit einer 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Verteilung gewährleistet (Licht an: 6.00 Uhr). Die Haltung der Tiere erfolgte einzeln in PVC-Käfigen (Makrolon Typ III) mit Drahtaufsatz in den Abmessungen 38 cm x 22 cm x 24 cm. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Wasser und, wenn nicht anders erwähnt, zu Futter. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden sie mit Standardnagetierfutter (Typ 2018) der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gefüttert.

Für die Haltung der Tiere und die Versuchsdurchführungen lagen die erforderlichen behördlichen Genehmigungen vor.

3.1.2 Substanzen

Die verwendeten Chemikalien, Antikörper und Substanzen für die ISH sowie ihre Bezugsquellen und die Zusammensetzung der Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

Bei der Herstellung der Lösungen wurde stets entionisiertes Wasser verwendet, das mit Hilfe des „Milli-Q-Water-Purification-Systems“ der Firma Millipore (Milford, England) aufbereitet wurde. Der Begriff „Aqua destillata“ (Aqua dest.) steht in den Arbeitsvorschriften für derart gewonnenes Wasser, wenn es nicht anders vermerkt ist.

3.1.3 Herstellung der Mikroinjektionseinheiten

Zur Applikation der Substanzen in das Gehirn (lateraler Ventrikel und / oder PVN) wurde eine chronische Implantation von Mikroinjektionseinheiten durchgeführt. Diese Mikroinjektionseinheiten wurden selbst hergestellt.

Über eine Edelstahlkapillare (25 Gauge, Firma Braun, Melsungen, Deutschland) mit einer Länge von 15 mm wurde ein 10 mm langer Polyethylenschlauch (PE, 0,38 mm

Innendurchmesser (ID), 1,09 mm Außendurchmesser (AD), Portex, Kent, England) geschoben. Eine 18,5 mm lange fused silica Kapillare mit 150 µm Außendurchmesser (Firma Laser 2000, Weßling, Deutschland) wurde konzentrisch in die Edelstahlkapillare mit Sekundenkleber so eingeklebt, dass ca. 3,5 mm fused silica Kapillare an einem Ende frei lagen. Die Stahlkapillare diente als Ansatz für einen dünnen PE-schlauch (0,28 mm ID, 0,61 mm AD), über den die zu applizierende Substanz mittels einer 5 µl Glasspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) gegeben werden konnte. Eine schematische Darstellung der Mikroinjektionseinheit ist in Abb. 5 gezeigt.

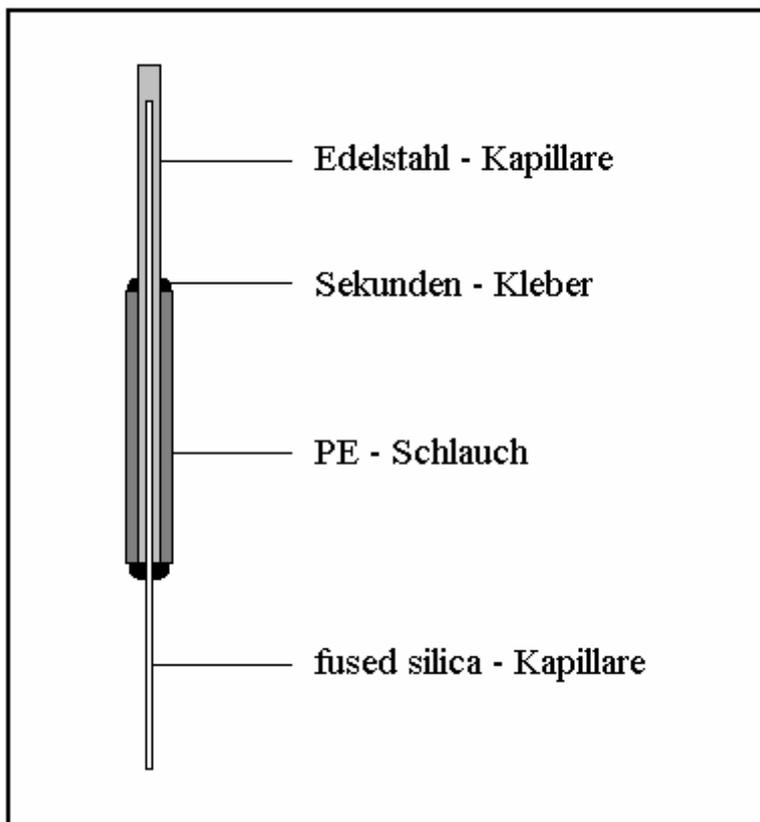


Abb. 5: Schematische Darstellung der verwendeten Mikroinjektionseinheiten

Vor der Implantation wurde die Mikroinjektionseinheit mit physiologischer Kochsalzlösung (phys. Kochsalzlg.) gefüllt und mit einem PE-schlauch verschlossen, um ein Austrocknen des Gehirns und ein Verunreinigen der Mikroinjektionseinheit zu verhindern.

3.1.4 Implantation von Mikroinjektionseinheiten

Zur Einleitung der Narkose wurden 100 mg/kg Körpergewicht Ketanest[®] (50 mg/ml Ketaminhydrochlorid, Parke – Davis GmbH Berlin, Freiburg, Deutschland) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach etwa zehn Minuten Wartezeit folgte bei ausreichender Sedierung die intramuskuläre (i.m.) Injektion von 14 mg/kg Körpergewicht Rompun[®] (2 % Xylazin, Bayer

Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einen Muskel der Hinterbeine (Musculus membranous). Durch mechanische Reizung der Hinterpfote, des Lides, Ohres und Schwanzes wurde die Narkosetiefe überprüft. Nach Erreichen der operativen Narkosetiefe wurde mit der Operation begonnen. Während der gesamten Operation wurde die Narkosetiefe immer wieder überprüft und bei Bedarf wurde Ketanest® in Dosen von 20 – 40 mg/kg Körpergewicht i.p. nachgegeben.

Um einen sauberen Zugang zur Schädelkalotte zu ermöglichen, wurden die Kopfhare des Tieres mit Hilfe eines Trockenrasierers entfernt. Der Kopf des Tieres wurde mittels Ohrstiften und Schneidezahnhalterung in einer stereotaktischen Apparatur (Föhr Medical Instruments, Pohlheim, Deutschland) so fixiert, dass die Schädeldecke horizontal ausgerichtet war. Diese Apparatur diente der präzisen Implantation der Mikroinjektionseinheiten nach dreidimensionalen Raumkoordinaten (rostral – caudal (RC), dorsal – ventral (DV), lateral (L), Koordinaten sind auf Bregma bezogen). Um die Körpertemperatur konstant auf ca. 37,5 °C zu halten, wurden die Tiere auf eine regulierte Heizmatte (Temperatur Controller CMA 150, Carnegie Medicin, Stockholm, Schweden) gelegt.

Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut in rostrocaudaler Richtung über eine Länge von 2 cm durchtrennt und mit Klemmen auseinander gezogen. Anschließend wurde die Kopfhaut von der Schädelkalotte gelöst, so dass der Referenzpunkt Bregma gut erkennbar war.

Abhängig vom Experiment wurden entweder eine (siehe Abschnitt 3.2 und 3.6) oder zwei (siehe Abschnitt 3.3, 3.4 und 3.5) Mikroinjektionseinheiten implantiert. Dafür wurde jeweils eine Öffnung (0,5 mm Durchmesser) mit einem Dentalbohrer (Reco-Dental, Wiesbaden, Deutschland) in den Schädel trepaniert, ohne die Dura mater zu verletzen. Die erforderlichen Koordinaten wurden dem stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (182) entnommen.

Die Dura mater wurde an der Implantationsstelle mittels einer Injektionskanüle eröffnet und die Mikroinjektionseinheit mit Hilfe von Mikromanipulatoren implantiert. Außerdem erfolgte eine weitere Bohrung etwa in 5 mm Entfernung zur Implantationsstelle. In diese Bohrung wurde eine Edelstahlschraube (1,0 x 4 mm, Messinger Schrauben GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) eingebracht, die zur späteren Verankerung diente. Die Fixierung dieser Instrumentierung auf der Schädelkalotte erfolgte mit Dental-Zement (DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland), der die Mikroinjektionseinheit und die Schraube umschloss. Der Dental-Zement wurde vorsichtig und in kleinen Portionen aufgetragen, um eine durch die Aushärtung bedingte Wärmeentwicklung zu mindern und die Bildung von Spannungen im Material zu verhindern. Nach dem Aushärten des Dental-Zementes (ca. zehn Minuten) wurden die Mikromanipulatoren entfernt und die Klemmen von der Kopfhaut gelöst.

3.1.5 Postoperative Behandlung der Tiere

Nach der Operation wurden die Tiere in ihren Einzelkäfig zurückgesetzt und bis zum Zeitpunkt des Erwachens mit einer Wärmelampe bestrahlt. Danach wurden die Tiere in den Tierstall gebracht und die Rekonvaleszenz eine Woche lang durch tägliche Gewichtskontrollen überprüft.

3.1.6 Applikation der verschiedenen Substanzen in das Gehirn

Mit Hilfe einer 5 µl Hamilton-Spritze und eines PE-schlauches (0,28 mm ID, 0,61 mm AD) wurden die Substanzen in das Gehirn appliziert. Das Applikationsvolumen für den lateralen Ventrikel betrug im ersten Experiment 5 µl und in den anderen 2,5 µl. Die Substanzen wurden über einen Zeitraum von zwei Minuten appliziert. Bei Injektionen in den PVN wurde über einen Zeitraum von einer Minute nur 1 µl appliziert. In den Experimenten zwei bis fünf wurden jedem Tier zwei Substanzen appliziert, die eine i.c.v. und die andere in den PVN. Nach Applikation der Substanz in den lateralen Ventrikel wurde nach einer Wartezeit von fünf Minuten die andere Substanz in den PVN injiziert.

Bei jedem Experiment erfolgte die Auswahl der Hemisphären für die Implantation der Mikroinjektionseinheiten randomisiert.

3.1.7 Tötung der Tiere

Am Ende jedes Experimentes, außer Experiment sechs (siehe Abschnitt 3.6), wurden die Tiere durch Nackenschlag und Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde zügig aus dem Schädel befreit. Ein Teil des Kleinhirnes wurde so abgeschnitten, dass eine glatte Auflagefläche entstand. Mit dieser Auflagefläche wurden die Gehirne auf Trockeneis gestellt, tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Das nach der Dekapitation aus dem Torso austretende Blut wurde aufgefangen und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Blut bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, um das Blutserum von den korpuskulären Blutbestandteilen zu trennen. Danach wurde das Serum aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.1.8 Immunologische Bestimmung der Hormonkonzentrationen im Serum

3.1.8.1 Allgemeines zur Durchführung eines Radioimmunoassays

Radioimmunoassays (RIA) ermöglichen die quantitative Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten, wie etwa dem Blutplasma oder Serum. Das Hormon aus einer Serumprobe, welches das zu bestimmende Antigen bei dieser immunologischen Reaktion darstellt, tritt dabei in eine komplexe Wechselwirkung mit gegen das Antigen gerichteten, spezifischen Antikörpermolekülen (Immunglobulin G (IgG)). Durch die gleichzeitige Zugabe

einer bekannten Konzentration von radioaktiv markiertem Hormon („Tracer“) kommt es zu einer kompetitiven Austauschreaktion, wobei radioaktiv markiertes und unmarkiertes Hormon (aus der Serumprobe) um die Bindungsstellen an den Antikörpermolekülen konkurrieren. Hohe Mengen von unmarkiertem Antigen in der Probe führen so zu einer verminderten Radioligandenbindung. Die Erstellung einer Standardkurve ist die Voraussetzung zur Quantifizierung der jeweiligen Hormonkonzentrationen in den zu untersuchenden Serumproben. Dabei wird eine definierte Menge an Antikörpermolekülen mit einer definierten Menge an „Tracer“ zusammengebracht. Beide sind so gewählt, dass etwa 50 % der radioaktiven Hormonmoleküle an die Antikörper gebunden werden, wenn kein unmarkiertes Hormon zugegeben wird (B_0 -Wert). Steigende Konzentrationen von unmarkiertem Hormon unter identischen Inkubationsbedingungen führen zu einer dosisabhängigen Abnahme des Radioliganden an den spezifischen Antikörperbindungsstellen. Anhand der Kalibrierkurve kann dann die unbekannte Hormonkonzentration in einer Serumprobe bestimmt werden.

3.1.8.2 Durchführung der Bestimmung von ACTH im Serum

Zur quantitativen Ermittlung des ACTH-Gehaltes in den zu untersuchenden Serumproben wurde ein kommerzieller humaner Kit (MP Biomedicals Inc., Heidelberg, Deutschland) verwendet. Durch eine Arbeit aus dem Jahre 1998 konnte gezeigt werden, dass der Kit auch für die Bestimmung von Ratten ACTH eingesetzt werden kann (183).

Für den Assay wurde eine Kalibrierkurve errechnet, die auf Doppelbestimmungen sieben verschiedener ACTH-Standards im Bereich von 10 bis 1000 pg/ml basierte. Zur Bewertung der gemessenen Radioaktivität waren außerdem drei Kontrollansätze notwendig: Der erste (TO) enthielt nur das radioaktiv markierte Antigen, folglich wurde die eingesetzte Radioaktivität maximal gebunden. Der zweite Kontrollansatz (NSB) enthielt neben dem Tracer auch noch Puffer. Dieser Ansatz zeigte an, wie viel Prozent der eingesetzten Radioaktivität durch unspezifische Bindungen an den Puffer und an die Gefäßwand gebunden wird. Der NSB/TO-Wert lag unter den geforderten 5 %. Der dritte Ansatz (B_0) enthielt den spezifischen Antikörper, aber kein unmarkiertes Antigen.

Die Serumproben sowie die Bestandteile des RIA-Kits wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Die polyklonale Antikörper-Lösung (50 μ l) wurde zu allen Proben (50 μ l), außer TO und NSB, zugegeben. Nach Zugabe von 50 μ l Tracer (125 I hACTH) zu allen Proben wurden diese gründlich gemischt und über Nacht (16 Stunden) bei 4 °C inkubiert. Der Antigen-Antikörper Komplex wurde anschließend durch Zugabe von 250 μ l Polyethylenglykol (Precipitating Reagent) im Röhrchen (außer TO) gefällt. Nach gründlicher Durchmischung, 15-minütiger Inkubation bei 4 °C und Zentrifugation für 15 Minuten bei 1000 x g (außer TO)

wurde der Überstand unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (außer TO) und die gebundene Radioaktivität im präzipitierten Protein-Sediment, welches die gefällten IgG-Moleküle enthielt, im Gammazähler (EG & G Bertold, Bad Wildbad, Deutschland) erfasst.

Die sieben verschiedenen ACTH-Standards für die Erstellung der Eichkurve wurden auf die gleiche Weise behandelt wie die zu untersuchenden Proben.

Die Inter- und Intra-Assay-Koeffizienten betragen 10,7 % beziehungsweise 6,0 %. Das Detektionslimit lag bei 5,7 pg/ml. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und aus den Messwerten die Mittelwerte gebildet.

3.1.8.3 Durchführung der Bestimmung von Kortikosteron im Serum

Für die Bestimmung der Kortikosteronkonzentration im Serum der Versuchstiere wurde ein kommerzieller Kit (Ratten-Kortikosteron RIA-Kit, MP Biomedicals Inc., Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für den Assay wurde ebenfalls eine Eichkurve errechnet, die auf Doppelbestimmungen sechs verschiedener Kortikosteron-Standards im Bereich von 25 bis 1000 ng/ml basierte. Die Proben wurden zunächst mit dem mitgelieferten Puffer 1:200 verdünnt. Anschließend wurden 100 µl verdünnte Probe mit Antikörper (200 µl) und Tracer (200 µl) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das gebundene Antigen wurde anschließend unter der Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) als Antikörper-Antigen-PEG-Komplex ausgefällt.

Die Inter- und Intra-Assay-Koeffizienten betragen 6,5 % beziehungsweise 4,4 %. Das Detektionslimit lag bei 7,7 ng/ml. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Aus den beiden Messwerten wurden die Mittelwerte gebildet.

3.1.9 in-situ Hybridisierung

3.1.9.1 Methode der in-situ Hybridisierung

Die Technik der ISH wurde etwa zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen entwickelt (184;185). Mit Hilfe dieser Methode wird die Lokalisierung von DNA- und RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen ermöglicht. Das Ziel besteht darin, die mRNA eines bestimmten Gens sichtbar zu machen, um auf diese Weise die gewebsspezifische Expression eines Proteins zu verfolgen.

Für die ISH wird ein mit der Ziel-mRNA komplementärer Nukleinsäurestrang (Sonde) markiert und mit der im Gewebeschnitt vorliegenden Ziel-mRNA hybridisiert. Dabei lagern sich die beiden komplementären Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen und bilden ein stabiles Hybrid.

Nach dem Auswaschen nichtgebundener Sonde wird das Hybridisierungssignal über die Markierung sichtbar gemacht. Markiert wurden die Nukleinsäuren in der hier vorliegenden Arbeit durch radioaktives ^{35}S , das den Nachweis über Autoradiografie auf Röntgenfilm erlaubt. Eine schematische Darstellung über den Ablauf der ISH ist in Abb. 6 abgebildet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ISH mit Hilfe von Oligonucleotid-Sonden durchgeführt und nach einer Methode von Erdtmann-Vourliotis et al. (186) verfahren.

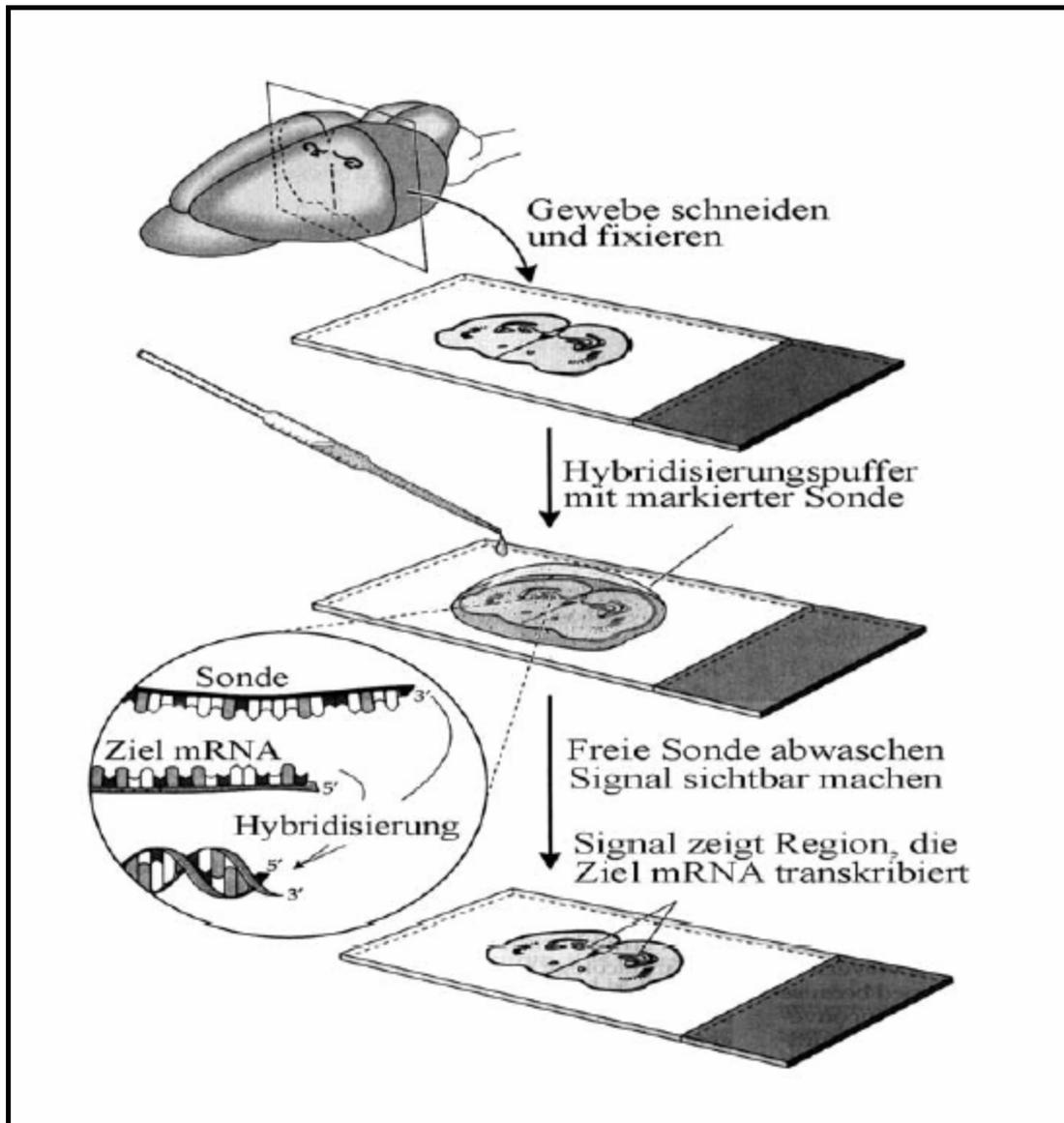


Abb. 6: Schematischer Ablauf einer in-situ Hybridisierung (aus (187))

3.1.9.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Von den bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Gehirnen wurden mit Hilfe eines Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim, Deutschland) Gefrierschnitte angefertigt. Die Arbeitstemperatur

des Kryostaten und die Objekthaltertemperatur wurden auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt. Das tiefgefrorene Gehirn wurde vor dem Schneiden für 30 min im Kryostat auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ equilibriert. Das Gehirn wurde mit der Anschnittfläche des Kleinhirnes auf den Objekthalter gestellt und mit Hilfe von Einbettmedium (Jung, Leica, Nussloch, Deutschland) auf diesem befestigt. Nach Aushärten des Einbettmediums wurde der Objekthalter im Kryostat eingespannt. Die Schnittdicke betrug $14\text{ }\mu\text{m}$. Mit Hilfe des Kryostaten wurden jeweils drei Schnitte hintereinander ausgeführt, mit einem Pinsel voneinander getrennt und auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen. Es wurden 150 Schnitte im Bereich des Hypothalamus von jedem Gehirn aufgenommen, in einen Präparatekasten in Folie luftdicht eingeschweißt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Fixierung gelagert.

3.1.9.3 Fixierung der Gefrierschnitte

Um Kondensation auf den Schnitten zu vermeiden, wurden die eingeschweißten Präparatekästen mehrere Stunden bei Raumtemperatur equilibriert. In frisch angesetzter eisgekühlter Paraformaldehydlösung (4 %, in Phosphat-gepufferte Kochsalzlg. (PBS) gelöst) wurden drei Gefrierschnitte jedes Tieres für 30 Minuten fixiert. Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur einmal in 3 x PBS und zweimal in 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie über eine Alkoholreihe (70 %, 90 %, absolutes Ethanol) entwässert und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.1.9.4 Herstellung der Oligonucleotid-Sonden

Als Sonden für die ISH werden einzelsträngige, zur gesuchten mRNA komplementäre Oligonucleotide verwendet. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Oligonucleotide eine Länge von ca. 50 Basen, einen Guanin/Cytosin-Gehalt (GC-G) von ca. 55 % und eine Schmelztemperatur von ca. $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ haben. Mehr als fünf identische Basen in Folge sowie hairpins mit einer freien Energie von weniger als $-4,7\text{ kcal}$ sollten vermieden werden.

Die Oligonucleotid-Proben wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Primer designer version 2.0, Scientific and Educational Software) entworfen und von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert.

Hinter der Bezeichnung der Oligonucleotide sind die *accession-numbers* (aus NCBI Datenbank) der mRNA-Sequenz und der Sequenzbereich angegeben, zu der sie komplementär sind.

BDNF, M61175, 694 – 650

5' - AGTTCCAGTGCCTTTTGTCTATGCCCCTGCAGCCTTCCTTCGTGT - 3'

MC4-R, U67863, 688 - 644

5' - CCGATACTGTGCAAGCTGCCAGATACAACCTGATGATGATCCCGA - 3'

In Tab. 3 sind die Eigenschaften der einzelnen Oligonucleotid-Proben aufgelistet.

Oligonucleotide	% GC	Tm (°C)	Hairpins	Runs	Länge
BDNF	57	102	keine	4	45
MC4-R	60	103	keine	3	45

Tab. 3: Eigenschaften der benutzen Oligonucleotid-Proben

3.1.9.5 Herstellung ³⁵S-markierter Oligonucleotid-Sonden

Das 3'-Ende der Oligonucleotide wurde durch das Matrizen-unabhängige Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit einem Poly (³⁵S-dA)- Ende versehen: 18,8 µl DEPC-H₂O, 7,2 µl Oligonucleotid, 8 µl 5 x TdT-Reaktionspuffer, 4 µl ³⁵S-ATP (Deoxyadenosin 5' [alpha-³⁵S]thio] triphosphate, 12,5 mCi/ml) und 2 µl TdT wurden 60 Minuten bei 37 °C inkubiert (Thermomixer compact, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Das Oligonucleotid wurde anschließend mit 400 µl TE-Puffer und 1 µl Hefe-tRNA versetzt und mit Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zu dieser Lösung wurden 225 µl Phenol-Lösung und die gleiche Menge Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gegeben. Dieses Gemisch wurde, nachdem es für eine Minute auf einem Rüttler (Reax top, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland) geschüttelt worden war, fünf Minuten bei 16.000 g und 4 °C (Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Nach Überführung der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurden zum Waschen 450 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben, wieder für eine Minuten auf einem Rüttler geschüttelt und anschließend für fünf Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 20 µl 5M NaCl-Lösung und 1300 µl absoluten Ethanol versehen und so bei -70 °C über drei Stunden gefällt.

Nach dieser Zeit wurde das Gemisch für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 30 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Sediment für 30 Minuten bei 37 °C getrocknet. Dieses Sediment wurde in 100 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 1 µl Dithiothreitol versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um den Erfolg der radioaktiven Markierung zu messen, wurden 1 ml Szintillatorflüssigkeit (Rotiszint® eco plus, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 1 µl Sonde in einen Wallac Counter (1450 MicroBeta, Trilux, Freiburg, Deutschland) gegeben. Dabei sollte eine Aktivität von etwa 1×10^6 cpm/µl Sondensuspension erzielt werden.

3.1.9.6 Hybridisierung an Kryoschnitten

Die mit ^{35}S markierten Sonden wurden zur Hybridisierung in einem 50 % formamidhaltigen Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die Menge der markierten Oligonucleotid-Sonden muss dabei im Überschuss (im Verhältnis zur mRNA im Präparat) vorliegen. Nach den Erfahrungen der Arbeitsgruppe ist hierzu eine Aktivität von $1,5 \times 10^6$ cpm markierter Sonde pro 50 µl Puffer geeignet. Dieses Volumen ist für eine Präparatfläche von etwa 1 cm^2 ausreichend.

Zur Hybridisierung wurden 150 µl Oligonucleotid-Pufferlösung auf den Objektträger aufgetragen, mit Parafilm (American National Can TM, Greenwich, USA) abgedeckt und für 12 - 18 Stunden in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) bei 42 °C inkubiert.

3.1.9.7 Entfernung nicht hybridisierter Oligonucleotid-Sonden und Exposition

Nach der Inkubation wurden die Objektträger in mehreren Schritten für jeweils 15 Minuten bei 55 °C in SSC gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen (1 mal 2 x SSC, 4 mal 1 x SSC). Wichtig ist dabei, dass beim ersten Waschschrift der Parafilm von den Objektträgern entfernt wird, da dadurch die Hintergrundstrahlung durch unspezifisch gebundene Sonde minimiert werden kann. Anschließend wurden die Schnitte noch einmal für eine Stunde in 1 x SSC bei Raumtemperatur gewaschen und über eine Alkoholreihe entwässert (70 %, 90 %, absolutes Ethanol – jeweils fünf Minuten).

Nach dem Trocknen der Schnitte bei Raumtemperatur wurde ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR Film, Stuttgart, Deutschland) aufgelegt und für mehrere Wochen bei – 80 °C in einer Filmkassette exponiert. Um sicher zu gehen, sich noch im Kontrastumfang des Filmes zu befinden und eine Überschwärzung dieses auszuschließen, wurden bei allen hybridisierten Gehirnschnitten nacheinander zwei Expositionen unterschiedlicher Dauer durchgeführt und eine davon ausgewertet.

3.2 Experiment 1: Einfluss von ACTH bei sham und ADX Tieren

3.2.1 Implantation der Mikroinjektionseinheit und Adrenaektomie

Zur Einleitung der Narkose wurde den Tieren, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, i.p. Ketanest® (100 mg/kg Körpergewicht) und nach einer Wartezeit von etwa zehn Minuten in ausreichender Sedierung i.m. Rompun® (14 mg/kg Körpergewicht) in einen Muskel der Hinterbeine (Musculus membranous) injiziert. Um eine bessere Analgesie für die Eröffnung des Peritoneums zu erreichen, erfolgte nach weiteren fünf Minuten die i.m. Injektion von 1 mg/kg Körpergewicht Vetranquil® 1 % (CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in einen Muskel des anderen Hinterbeines (Musculus membranous). Nach Erreichen der operativen Narkosetiefe wurde mit der Operation begonnen.

Den Versuchstieren (mittleres Operationsgewicht: $271,4 \pm 5,8$ g, Spanne: 261,4 - 289,0 g) wurde, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, eine Mikroinjektionseinheit in den lateralen Ventrikel implantiert, über die verschiedene Substanzen appliziert werden konnten. Die verwendeten Koordinaten für die Implantation waren RC -0,08 mm, DV -0,36 mm, L $\pm 0,14$ mm von Bregma.

Nach der Implantation der Mikroinjektionseinheit wurde das Tier aus dem stereotaktischen Instrument entfernt und auf der geregelten Heizmatte in Bauchlage fixiert. Das Fell wurde auf dem Rücken im Lendenbereich geschoren. Nach einem kleinen Hautschnitt in der Mittellinie wurde von dieser Stelle aus mit stumpfer Schere die seitliche Begrenzung der Rückenmuskulatur erreicht. Anschließend wurde das Peritoneum eröffnet und dort die retroperitoneal gelagerte Nebenniere aufgesucht, mobilisiert und nach kurzem Abklemmen und Ligieren der Gefäße abgesetzt. Danach wurde gleichermaßen die Nebenniere der anderen Seite entfernt. Das Peritoneum sowie die Muskeln wurden durch Einzelknopfnähte (Vicryl 4-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen und die Hautwunde (Wundklammern N. Michel 7,5 x 1,75 mm, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) geklammert.

Bei der sham-Operation wurde, wie bei der Adrenaektomie beschrieben, vorgegangen, jedoch wurden die Nebennieren nur mit einer Pinzette erfasst, aber nicht entfernt. Anschließend wurde die Wunde, wie oben beschrieben, verschlossen. Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa zwei Stunden.

Um die durch das Fehlen der Nebennierenhormone (besonders des Aldosteron) verursachte Störung des Mineralhaushaltes auszugleichen, wurde bei den adrenaektomierten Tieren das Trinkwasser durch phys. Kochsalzlsg. (0,9 %) ersetzt.

3.2.2 Versuchsdurchführung

Nach einer Erholungsphase von mindestens acht Tagen wurde mit dem Experiment begonnen, das mittlere Körpergewicht betrug zu diesem Zeitpunkt bei den Tieren $274,7 \pm 12,6$ g. Das Körpergewicht zu Beginn des Versuches war beim Vergleich über alle Gruppen betrachtet voneinander signifikant verschieden ($F_{3,19}=9,907$, $p<0,001$, Details siehe 4.1).

Den Tieren wurde zunächst ab ca. 9 Uhr für 24 Stunden die Nahrung entzogen; sie behielten aber freien Zugang zu Wasser. Am folgenden Tag zwischen 9 und 10 Uhr wurde den Tieren ACTH oder phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel über einen Zeitraum von zwei Minuten appliziert, wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben. Die sich ergebenden Versuchsgruppen und die Anzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere sind in Tab. 4 dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Applikation	Adrenalektomie	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./sham	phys. Kochsalzlg. (5 μ l)	—	6
ACTH/sham	ACTH (2nmol in 5 μ l phys. Kochsalzlg.)	—	6
phys. Kochsalzlg./ADX	phys. Kochsalzlg. (5 μ l)	ADX	5
ACTH/ADX	ACTH (2nmol in 5 μ l phys. Kochsalzlg.)	ADX	6

Tab. 4: Darstellung der Versuchsgruppen

Nach Applikation der Substanz wurden die Tiere gewogen und zurück in den Käfig gesetzt, und es wurde vorgewogenes Futter und Wasser gegeben. Für sechs Stunden wurde stündlich die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme kontrolliert. Nach der sechsten Beobachtungsstunde wurden die Tiere gewogen und, wie unter Abschnitt 3.1.7 beschrieben, getötet.

Die Konzentrationen von ACTH und Kortikosteron im Serum aller Versuchstiere wurde mit Hilfe eines RIA, wie in Abschnitt 3.1.8 beschrieben, bestimmt.

Die entnommenen Gehirne wurden genutzt, um mittels ISH die Expression von BDNF mRNA und MC4-R mRNA innerhalb des Hypothalamus, und hier speziell des VMN, zu untersuchen (Abschnitt 3.1.9). Die Dauer der Röntgenfilmexpositionen sind Tab. 5 zu entnehmen.

	Expositionszeit in Tagen 1. Auflage	Expositionszeit in Tagen 2. Auflage
BDNF	21	35
MC4-R	23	35

Tab. 5: Expositionszeiten der verschiedenen Auflagen

3.3 Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α -MSH

3.3.1 Implantation der Mikroinjektionseinheiten

Den Versuchstieren wurde, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, eine Mikroinjektionseinheit in den lateralen Ventrikel und eine weitere in den PVN implantiert, über die verschiedene Substanzen appliziert werden konnten. Die gewählten Koordinaten waren für die Implantation in den lateralen Ventrikel RC -0,08 mm, DV -0,36 mm, L \pm 0,14 mm und für den PVN RC -0,18 mm, DV -0,77 mm, L \pm 0,04 mm von Bregma. Das mittlere Operationsgewicht der Versuchstiere für die Untersuchung der Effektivität des ACTH-AK betrug $281,3 \pm 5,6$ g (Spanne: 271,4 - 289,0 g) und bei den Versuchstieren zur Testung des α -MSH-AK $282,7 \pm 4,3$ g (Spanne: 278,1 - 291,2 g). Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa 90 Minuten.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Nach einer einwöchigen Erholungsphase wurde den Tieren, deren mittleres Körpergewicht für die Testung des ACTH-AK $297,8 \pm 7,9$ g und für α -MSH-AK $297,6 \pm 7,9$ g betrug ab ca. 9 Uhr für 24 Stunden die Nahrung entzogen; sie behielten aber freien Zugang zu Wasser. Den Tieren wurde am folgenden Tag zwischen 9 und 10 Uhr i.c.v. ACTH, α -MSH oder phys. Kochsalzlg. appliziert. In einem Abstand von fünf Minuten zur i.c.v. Applikation erfolgte die Gabe von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG in den PVN.

Die sich ergebenden Versuchsgruppen und die Anzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere sind in Tab. 6 und Tab. 7 dargestellt.

Nach Applikation der Substanzen wurden die Tiere gewogen und zurück in den Käfig gesetzt, und es wurde vorgewogenes Futter und Wasser gegeben. In den nächsten sechs Stunden wurde stündlich, dann nach acht, zehn und 24 Stunden die Nahrungs- und Wasseraufnahme protokolliert. Das Gewicht der Tiere wurde nach sechs und 24 Stunden kontrolliert.

Im Anschluss an das beschriebene Vorgehen wurde den Tieren eine fünftägige Erholungszeit gewährt, die als Ausschwemmungsphase für die applizierten Substanzen diente. An den Tagen zwischen den Wirkstoff/Kontrollapplikationen erhielten die Tiere einmal täglich phys. Kochsalzlg. in die Mikroinjektionseinheiten appliziert, um diese durchgängig zu halten. Nach der fünftägigen Erholungszeit wurde den Tieren erneut nach dem obigen Schema Nahrung entzogen, 24 Stunden später wurden die Substanzen appliziert und wie oben beschrieben die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht dokumentiert. Anschließend erfolgte eine weitere fünftägige Ausschwemmungsphase und schließlich ein drittes Mal Nahrungsentzug, Applikationen und Messungen wie beschrieben. 24 Stunden nach der dritten Applikation wurden die Tiere gewogen und, wie unter Abschnitt 3.1.7 beschrieben, getötet. Die Reihenfolge der Applikationen erfolgte randomisiert; jedes Tier erhielt drei verschiedene Substanzen.

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./IgG	phys. Kochsalzlg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	6
ACTH/IgG	ACTH (1nmol in 2,5µl phys. Kochsalzlg.)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	4
phys. Kochsalzlg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5µl)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	5
ACTH/ACTH-AK	ACTH (1nmol in 2,5µl phys. Kochsalzlg.)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	5

Tab. 6: Darstellung der Versuchsgruppen für die Untersuchung der Effektivität des ACTH-AK

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./IgG	phys. Kochsalzlg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	6
α-MSH/IgG	α-MSH (1nmol in 2,5µl phys. Kochsalzlg.)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	6
phys. Kochsalzlg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5µl)	α-MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	6
α-MSH/α-MSH-AK	α-MSH (1nmol in 2,5µl phys. Kochsalzlg.)	α-MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	6

Tab. 7: Darstellung der Versuchsgruppen für die Untersuchung der Effektivität des α-MSH-AK

3.4 Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α -MSH verursacht werden

3.4.1 Implantation der Mikroinjektionseinheiten

Den Versuchstieren wurde, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, eine Mikroinjektionseinheit in den lateralen Ventrikel und eine weitere in den PVN implantiert, über die verschiedene Substanzen appliziert werden konnten. Das mittlere Operationsgewicht der Versuchstiere betrug $278,7 \pm 4,6$ g (Spanne: 270,4 - 286,9 g). Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa 90 Minuten.

3.4.2 Versuchsdurchführung

Nach einer einwöchigen Erholungsphase wurde den Tieren ab ca. 9 Uhr für 24 Stunden die Nahrung entzogen; freier Zugang zu Wasser blieb gewährleistet. Das mittlere Körpergewicht zu Versuchsbeginn war bei den Tieren $294,8 \pm 9,9$ g. Den Tieren wurde am folgenden Tag zwischen 9 Uhr und 10 Uhr i.c.v. ACTH oder phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel appliziert. In einem Abstand von fünf Minuten zur i.c.v. Applikation erfolgte die Gabe von α -MSH-AK bzw. IgG in den PVN.

Die sich ergebenden Versuchsgruppen und die Anzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere sind in Tab. 8 dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./IgG	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	IgG (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	6
ACTH/IgG	ACTH (1nmol in 2,5 μ l phys. Kochsalzlg.)	IgG (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	6
phys. Kochsalzlg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	α -MSH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	6
ACTH/α-MSH-AK	ACTH (1nmol in 2,5 μ l phys. Kochsalzlg.)	α -MSH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	6

Tab. 8: Darstellung der Versuchsgruppen

Nach Applikation der Substanzen wurden die Tiere gewogen, zurück in den Käfig gesetzt und vorgewogenes Futter und Wasser wurde zugeführt. In den nächsten sechs Stunden wurde stündlich, dann nach acht, zehn und 24 Stunden die Nahrungs- und Wasseraufnahme protokolliert. Das Gewicht der Tiere wurde nach sechs und 24 Stunden kontrolliert.

Wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wurden an jedem Tier drei verschiedene Behandlungsvarianten getestet.

24 Stunden nach der dritten Applikation wurden die Tiere gewogen und, wie unter Abschnitt 3.1.7 beschrieben, getötet.

3.5 Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK in satten und physiologisch hungrigen Tieren

3.5.1 Implantation der Mikroinjektionseinheiten

Den Versuchstieren wurden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, die Mikroinjektionseinheiten in den lateralen Ventrikel und den PVN implantiert. Das mittlere Operationsgewicht der Ratten betrug $275,7 \pm 5,7$ g (Spanne: 270,4 - 281,3 g). Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa 90 Minuten.

3.5.2 Versuchsdurchführung

Die physiologische Relevanz der endogenen Peptide ACTH und α -MSH wurde in dieser Studie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern in satten und physiologisch hungrigen Tieren untersucht.

Um Experimente an zu Versuchsbeginn satten Tieren durchführen zu können, wurde Ratten, mit einem mittleren Körpergewicht von $298,1 \pm 9,9$ g, nach einer einwöchigen Erholungsphase zunächst ab ca. 9 Uhr für 24 Stunden die Nahrung entzogen; freier Zugang zu Wasser wurde gewährt. Am folgenden Tag um 9 Uhr wurde den Tieren Nahrung ad libitum angeboten; der Zugang zu Wasser blieb erhalten. Am selben Tag, zu Beginn der Dunkelphase (zwischen 19 und 20 Uhr), wurde dann zunächst phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel appliziert. In einem Abstand von fünf Minuten zur i.c.v. Applikation erfolgte die Gabe von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG in den PVN.

Um für die hier dargestellten Versuche physiologisch hungrige Tiere (Körpergewicht zu Versuchsbeginn: $296,7 \pm 6,1$ g), jedoch nicht nahrungsdeprivierte, zur Verfügung zu haben, wurden diese Ratten während des gesamten Experimentes ad-libitum gefüttert. Da die Tiere fast ausschließlich während ihrer Aktivitätsphase der Nacht Nahrung aufnehmen, waren sie zum Zeitpunkt der Applikation der Substanzen, die zu Beginn der Dunkelphase injiziert wurden, hungrig. Wie bei den satten Tieren wurde den physiologisch hungrigen Ratten zu Beginn der Dunkelphase i.c.v. phys. Kochsalzlsg. und in den PVN ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG appliziert.

Sowohl an den satten (Tab. 9) als auch den physiologisch hungrigen Tieren (Tab. 10) wurden die gleichen Behandlungen durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere ist in den jeweiligen Tabellen dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlsg./IgG	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9
phys. Kochsalzlsg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	α-MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK+α-MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK + α-MSH-AK (2µg + 2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9

Tab. 9: Darstellung der Versuchsgruppen für die satten Tiere

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlsg./IgG	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	10
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9
phys. Kochsalzlsg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	α-MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK+α-MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK + α-MSH-AK (2µg + 2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	9

Tab. 10: Darstellung der Versuchsgruppen für die physiologisch hungrigen Tiere

Nach Applikation der Substanzen und Zurücksetzen der Tiere in ihren Käfig wurde die Messung der Nahrungsaufnahme, Wasseraufnahme und des Körpergewichts, wie es in Abschnitt 3.3.2 beschrieben wurde, durchgeführt. Zur Einsparung von Versuchstieren wurde wie im Experiment 2 (siehe Abschnitt 3.3) das Prinzip der dreimaligen Substanzapplikation mit einer fünftägigen Ausschwemmungsphase genutzt.

3.6 Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α-MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression in satten und physiologisch hungrigen Tieren

3.6.1 Implantation der Mikroinjektionseinheiten

Den Versuchstieren wurden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, die Mikroinjektionseinheiten in den lateralen Ventrikel und den PVN implantiert. Das mittlere Operationsgewicht der

Ratten betrug $277,9 \pm 6,0$ g (Spanne: 274,1 - 285,0 g). Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa 90 Minuten.

3.6.2 Versuchsdurchführung

Es wurden wie im Experiment 4 (siehe Abschnitt 3.5) satte und physiologisch hungrige Tiere erzeugt, denen phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel und ACTH-AK, α -MSH-AK oder IgG in den PVN appliziert wurde. Das mittlere Körpergewicht zu Versuchsbeginn betrug bei den satten Tieren $299,1 \pm 8,5$ g und bei den physiologisch hungrigen Ratten $296,0 \pm 7,6$ g.

In den Tab. 11 und Tab. 12 sind die Versuchsgruppen und die Anzahl der eingesetzten Versuchstiere dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./IgG	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	IgG (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5
phys. Kochsalzlg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	ACTH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5
phys. Kochsalzlg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	α -MSH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5
phys. Kochsalzlg./ACTH-AK+α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	ACTH-AK + α -MSH-AK (2 μ g + 2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5

Tab. 11: Darstellung der Versuchsgruppen der satten Tiere

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
phys. Kochsalzlg./IgG	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	IgG (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	4
phys. Kochsalzlg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	ACTH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5
phys. Kochsalzlg./α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	α -MSH-AK (2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5
phys. Kochsalzlg./ACTH-AK+α-MSH-AK	phys. Kochsalzlg. (2,5 μ l)	ACTH-AK + α -MSH-AK (2 μ g + 2 μ g in 1 μ l phys. Kochsalzlg.)	5

Tab. 12: Darstellung der Versuchsgruppen der physiologisch hungrigen Tiere

Nach Applikation der Substanzen wurden die Tiere gewogen und zurück in den Käfig gesetzt, und es wurde vorgewogenes Futter und Wasser gegeben. In den nächsten sechs Stunden wurde stündlich, dann nach acht und zehn Stunden die Nahrungs- und Wasseraufnahme protokolliert. Das Gewicht der Tiere wurde nach sechs und zehn Stunden kontrolliert.

Die entnommenen Gehirne wurden genutzt, um mittels ISH die Expression von BDNF und MC4-R mRNA innerhalb des Hypothalamus, und hier speziell des VMN, zu untersuchen (Abschnitt 3.1.9). Die Dauer der Röntgenfilmexpositionen ist Tab. 13 zu entnehmen.

	Expositionszeit in Tagen 1. Auflage	Expositionszeit in Tagen 2. Auflage
BDNF	21	35
MC4-R	23	35

Tab. 13: Expositionszeiten der verschiedenen Auflagen

3.7 Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-AK bei ad-libitum gefütterten Tieren

3.7.1 Narkose und Operation

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, wurde den Tieren (mittleres Operationsgewicht: $272,7 \pm 1,7$ g, Spanne: 270,3 - 276,4 g) eine Mikroinjektionseinheit in den PVN implantiert, wobei die Auswahl der Hemisphäre randomisiert erfolgte. Das mittlere Operationsgewicht der Ratten betrug $274,3 \pm 4,9$ g (Spanne: 270,1 - 279,0 g). Die Gesamtdauer des operativen Eingriffes betrug etwa 60 Minuten.

3.7.2 Versuchsdurchführung

Nach etwa einwöchiger Erholungsphase wurde mit dem Versuch begonnen, das mittlere Körpergewicht der Tiere betrug zu Versuchsbeginn $274,7 \pm 12,6$ g. Die statistische Analyse Das Körpergewicht zu Beginn des Versuches war beim Vergleich über alle Gruppen betrachtet voneinander signifikant verschieden ($F_{1,11}=0,206$, $p=0,004$).

Die Applikation der Substanzen in den PVN erfolgte wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben. Die sich ergebenden Versuchsgruppen und die Anzahl der jeweils verwendeten Versuchstiere sind in Tab. 14 dargestellt.

An sieben aufeinander folgenden Tagen wurde den Tieren zweimal täglich (8 Uhr und 18 Uhr) die ACTH-AK bzw. IgG, wie unter Abschnitt 3.1.6 beschrieben, appliziert. Vor der morgendlichen und abendlichen Applikation wurden die Tiere, das Futter und das Wasser gewogen.

Gruppen	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere
IgG	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	7
ACTH-AK	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlg.)	7

Tab. 14: Darstellung der Versuchsgruppen

3.8 Versuchsauswertung und Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Statistiksoftware SPSS (Statistical Package for Social Sciences) für Windows, Version 11.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. In allen Abbildungen sind für den dargestellten Parameter die Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben, wobei Unterschiede ab $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.8.1 Auswertung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie des Körpergewichtes in den Experimenten

Die berechneten Mittelwerte der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie des Körpergewichtes wurden einer multivariaten Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA) und dem Zwischensubjektfaktor Substanzapplikation über den gesamten Beobachtungszeitraum unterzogen. Als Innersubjektfaktoren wurden die verschiedenen Messzeitpunkte gewählt. Sofern der Test der Zwischensubjekteffekte einen Unterschied zwischen den Gruppen mit $p < 0,05$ anzeigte, wurde Post-Hoc ein Bonferroni-Test durchgeführt, der Gruppenunterschiede zu jedem Beobachtungszeitpunkt aufzeigte. Bei Vergleichen zwischen nur zwei Gruppen wurde der Student's t-Test verwendet.

3.8.2 Auswertung der in-situ Hybridisierung

Nach der Entwicklung der Röntgenfilme wurden diese mit Hilfe einer Digitalkamera (Auflösung: 3 Megapixel, Nikon Coolpix 8400, Düsseldorf, Deutschland) und eines Mikroskops (Olympus SZX9[®], Hamburg, Deutschland) aufgenommen. Die weitere Auswertung der Hirnschnitte erfolgte mit dem Programm ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Pro Tier wurde ein Röntgenfilmbild eines Gehirnschnittes analysiert; alle Röntgenfilmbilder eines Experimentes stammten dabei aus einer sogenannten Auflage, d.h. einer bestimmten Exposition (siehe Abschnitt 3.2.2). Die genaue Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Versuchsgruppe und aufgetragener Sonde ist für das erste Experiment, in dem der Einfluss von ACTH in sham und ADX Tieren untersucht wurde, in Tab. 15 dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Applikation	Adrenalektomie	Anzahl der Versuchstiere	
			BDNF	MC4-R
phys. Kochsalzlsg./sham	phys. Kochsalzlsg. (5µl)	—	6	6
ACTH/sham	ACTH (2nmol in 5µl phys. Kochsalzlsg.)	—	6	6
phys. Kochsalzlsg./ADX	phys. Kochsalzlsg. (5µl)	ADX	5	5
ACTH/ADX	ACTH (2nmol in 5µl phys. Kochsalzlsg.)	ADX	6	6

Tab. 15: Anzahl ausgewerteter Tiere pro Versuchsgruppe und Sonde des Experimentes 1

Für das Experiment 5, in dem satte und hungrige Tiere mit ACTH-AK bzw. α -MSH-AK behandelt wurden, ist die Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Versuchsgruppe und aufgetragener Sonde in Tab. 16 und Tab. 17 dargestellt.

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere	
			BDNF	MC4-R
phys. Kochsalzlsg./IgG	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	4	4
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	5	5
phys. Kochsalzlsg./ α -MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	α -MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	5	5
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK+ α -MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK + α -MSH-AK (2µg + 2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	4	5

Tab. 16: Anzahl ausgewerteter Tiere pro Versuchsgruppe und Sonde des Experimentes 5 - satte Tiere

Gruppen	i.c.v. Injektion	PVN Injektion	Anzahl der Versuchstiere	
			BDNF	MC4-R
phys. Kochsalzlsg./IgG	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	IgG (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	4	4
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	5	5
phys. Kochsalzlsg./ α -MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	α -MSH-AK (2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	5	5
phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK+ α -MSH-AK	phys. Kochsalzlsg. (2,5µl)	ACTH-AK + α -MSH-AK (2µg + 2µg in 1µl phys. Kochsalzlsg.)	5	5

Tab. 17: Anzahl ausgewerteter Tiere pro Versuchsgruppe und Sonde des Experimentes 5 - physiologisch hungrige Tiere

Die mRNA-Expression des BDNF und MC4-R wurde im VMN des Hypothalamus mit Hilfe des Programms ImageJ, das die Grauwerte (256, 0 = schwarz, 256 = weiß) ermittelte, bestimmt.

Um den relativen Gehalt an MC4-R mRNA bzw. BDNF mRNA zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurde zunächst der Hintergrundwert jedes Bildes bestimmt. Dazu wurde ein Rechteck mit einer ungefähren Größe von 50.000 – 65.000 Pixel oberhalb des PVN gelegt und der Grauwert gemessen. Dieser Messvorgang wurde im gleichen Bereich, jedoch mit jeweils neu festgelegten Rechtecken, fünfmal wiederholt und ein Mittelwert (von 160 -190) daraus gebildet, der von 256 subtrahiert wurde (neue Mittelwerte von 66 - 96). Von diesem Mittelwert wurde jeweils ein konstanter Betrag von 50 subtrahiert. Das Ergebnis dieser Subtraktion (16 – 36) wurde sodann durch die Software (ImageJ) von den Grauwerten der Pixel des gesamten Bildes abgezogen. Die so im Hinblick auf unterschiedliche unspezifische Hybridisierung (und damit Schwärzung) korrigierten Bilder wurden ausgewertet. Die Subtraktion des oben genannten willkürlich gewählten Wertes von 50 diente dazu, kleinere Grauwerte als den Referenzwert nicht fälschlich aus der Bewertung auszuschließen.

Nach der Subtraktion des Referenzwertes vom Gesamtsignal wurde jeweils der rechte und linke VMN umfahren und der mittlere Grauwert bestimmt. Dieser Auswahl- und Messvorgang wurde fünfmal wiederholt und ein Mittelwert für die rechte bzw. linke Seite des VMN daraus gebildet. Anschließend wurde ein Mittelwert aus beiden Werten gebildet. Der Grauwert steht für den relativen Gehalt an mRNA; je größer dieser Wert ist, desto mehr mRNA ist in dieser Region vorhanden.

Um zu überprüfen, ob im Vergleich aller Versuchsgruppen in der mRNA-Expression des MC4-R und des BDNF signifikante Unterschiede auftraten, wurden die berechneten Mittelwerte einer einfaktoriellen ANOVA unterzogen. Sofern der Test eine Signifikanz mit $p < 0,05$ anzeigte, wurde Post-Hoc ein Bonferroni-Test durchgeführt, um individuelle Gruppenunterschiede zu identifizieren.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die zentrale Bedeutung des ACTH in der Regulation des Körpergewichtes untersucht. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sowohl die zentrale Applikation von ACTH, als auch seiner N-terminalen Fragmente (ACTH-(1-24), ACTH-(1-10) und α -MSH), zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (30;137;188). ACTH wird nicht nur in Funktion als Neuropeptid innerhalb des ZNS, sondern auch als Hormon in der Hypophyse synthetisiert; letzteres stimuliert die Ausschüttung von Nebennierensteroiden, wie Kortikosteron. Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass die vermehrte Freisetzung von Kortikosteron die Nahrungsaufnahme steigert und es damit zu einer Erhöhung des Körpergewichtes kommt. Da bei einer zentralnervösen Applikation von ACTH das Peptid über die Bluthirnschranke in die Peripherie gelangt, können die Nebennieren stimuliert und so durch eine periphere Freisetzung von Kortikosteron die zentralnervösen anorexigenen Effekte von ACTH konterkariert werden. Um den Einfluss der peripheren GC auf die Nahrungsaufnahme zu unterbinden, wurden Versuchstiere entweder adrenaletomiert (ADX) oder als Kontrolle scheinoperiert (sham). Nach i.c.v. Applikation von ACTH wurden die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie das Körpergewicht über einen Zeitraum von sechs Stunden dokumentiert.

Bisher lagen keine Studien vor, die sich mit der physiologischen Relevanz des endogenen ACTH für die Homöostase des Körpergewichtes beschäftigt haben. Um die Wirkung des endogenen Peptides zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit spezifische Antikörper eingesetzt. Da α -MSH wie unter Punkt 2.3.3 der Einleitung dargestellt durch proteolytische Spaltung aus ACTH entsteht, war es notwendig, dieses Neuropeptid mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Männlichen Wistar-Ratten wurden Antikörper, die entweder gegen ACTH oder α -MSH gerichtet waren, in den PVN appliziert, um die Effekte des endogenen ACTH bzw. α -MSH zu blockieren. Die Aufnahme von Nahrung und Wasser und die Veränderung des Körpergewichtes wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert.

Um die physiologische Bedeutung des ACTH weiter zu charakterisieren, wurde ein subchronisches Applikationsschema benutzt, bei dem die Tiere zweimal täglich (8 Uhr und 18 Uhr) den ACTH-AK in den PVN appliziert bekamen. Durch Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme zu allen Applikationszeitpunkten war es mit dieser Studie möglich, Aussagen über den unterschiedlichen Einfluss des ACTH-AK in Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Versuchstiere (satte Tiere versus physiologisch hungrige Tiere) zu machen.

Der anorexigene Effekt der von POMC abstammenden Peptide, wie ACTH und α -MSH, wird durch die Bindung an die MC-R, besonders an den MC4-R, vermittelt. Im Jahre 2003 konnte gezeigt werden, dass es eine Verbindung zwischen dem MC4-R und dem Trk-B Signalweg in der Regulation der Nahrungsaufnahme gibt (51). Ein wichtiger Ligand des Trk-B ist BDNF. Der MC4-R reguliert die BDNF mRNA-Expression innerhalb des VMN, einem Kerngebiet des Hypothalamus, dessen Läsion zu Übergewicht und Fettsucht führt. Daher wurde in dieser Arbeit mittels in-situ Hybridisierung (ISH) die Expression des BDNF und MC4-R nach Blockade der Wirkung von endogenem ACTH und α -MSH mit Hilfe von Antikörpern untersucht. Weiterhin war die Untersuchung des Einflusses einer ADX auf die Expression von BDNF und MC4-R Gegenstand dieser Arbeit.

4.1 Experiment 1: Einfluss von ACTH bei sham und ADX Tieren

Wie bereits geschildert kann das hypophysär freigesetzte ACTH durch Stimulierung der peripheren Kortikosteroonausschüttung den zentralnervösen anorexigenen ACTH Effekten entgegenwirken. Um die peripheren Wirkungen von ACTH zu blockieren wurde in dem hier beschriebenen experimentellen Design bei der Hälfte der Ratten eine bilaterale ADX durchgeführt; die verbleibenden Tiere erhielten eine sham Operation. Bei allen wurden nach Applikation von ACTH verschiedene Parameter, wie Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht über einen Zeitraum von sechs Stunden untersucht.

Entwicklung des Körpergewichtes postoperativ

Zunächst wurde die Entwicklung des Körpergewichtes der sham (n=12) und ADX (n=11) Tiere während der postoperativen Phase untersucht.

Die Abb. 7 zeigt die relativen Veränderungen des Körpergewichtes der Tiere während der acht Tage nach der ADX bzw. sham Operation bezogen auf das postoperative Ausgangsgewicht.

Die statistische Analyse ergab, dass sich die Veränderungen des Körpergewichtes zwischen den sham und ADX Tieren über die acht Tage signifikant unterschieden ($F_{1,21}=15,718$, $p=0,001$). Die ADX Ratten haben täglich, und über den gesamten Zeitraum betrachtet, weniger Gewicht zugenommen als die sham Tiere. An den Tagen drei bis acht war die Zunahme des Körpergewichtes der ADX Tiere im Vergleich zu den sham Tieren signifikant niedriger. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginnes betrug das mittlere Gewicht der ADX Tiere $274,2 \pm 5,6$ g und der sham Tiere $284,0 \pm 9,7$ g. Die absoluten und relativen Veränderungen des Gewichtes während der 24-stündigen Hungerperiode vor dem Experiment waren zwischen den ADX Tieren ($23,9 \pm 7,7$ g, $8,7 \pm 2,7$ %) und den sham Tieren ($24,3 \pm 3,2$ g, $8,5 \pm 1,0$ %) nicht unterschiedlich.

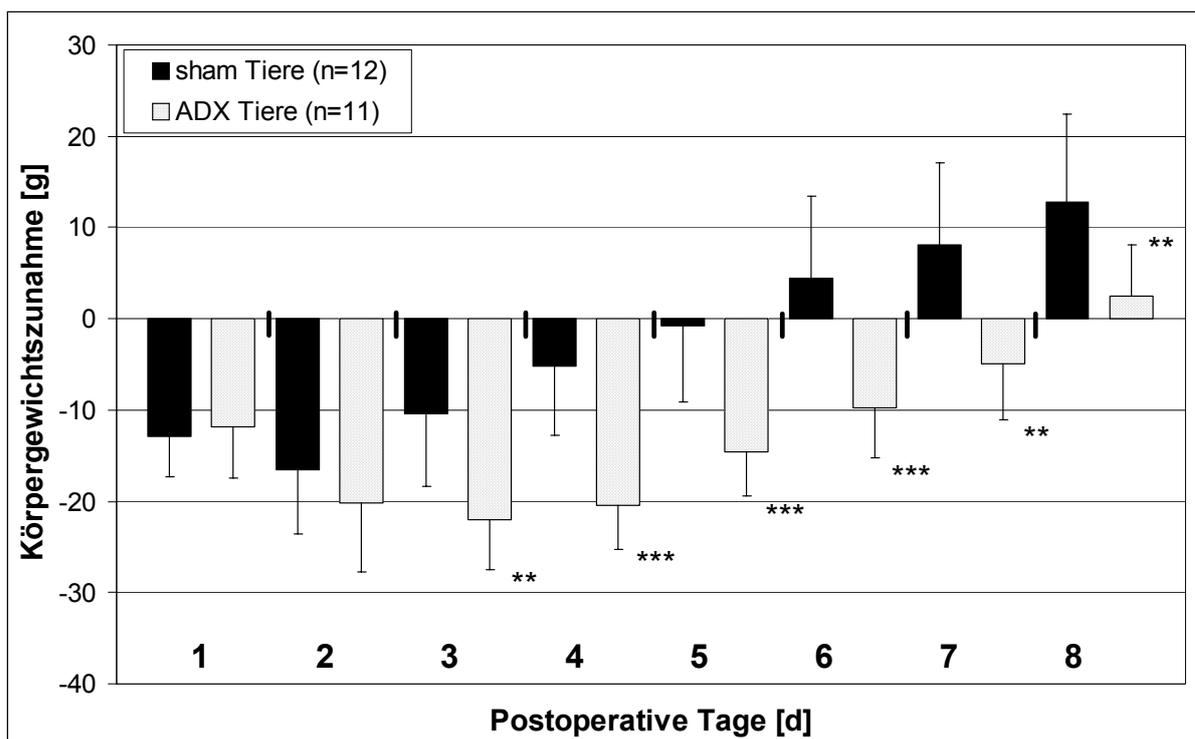


Abb. 7: Veränderung des Körpergewichtes relativ zum postoperativen Ausgangsgewicht bei sham und ADX Tieren über einen Zeitraum von acht Tagen. Mittelwerte \pm SD. ** $p<0,01$, * $p<0,001$ im Vergleich zu sham Tieren**

Entwicklung der Nahrungsaufnahme postoperativ

Die Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme (Abb. 8) während der acht Tage nach der Operation zeigte, dass die ADX Tiere (n=11) weniger Nahrung aufgenommen haben als die sham Tiere (n=12).

Die statistische Analyse ergab, dass sich die kumulative Nahrungsaufnahme ($F_{1,21}=37,770$, $p<0,001$) zwischen den beiden Gruppen über die acht Tage signifikant unterschied. An den Versuchstagen zwei bis acht wurde im t-Test eine signifikante Reduzierung der kumulativen Nahrungsaufnahme der ADX Tiere im Vergleich zu den sham Tieren festgestellt.

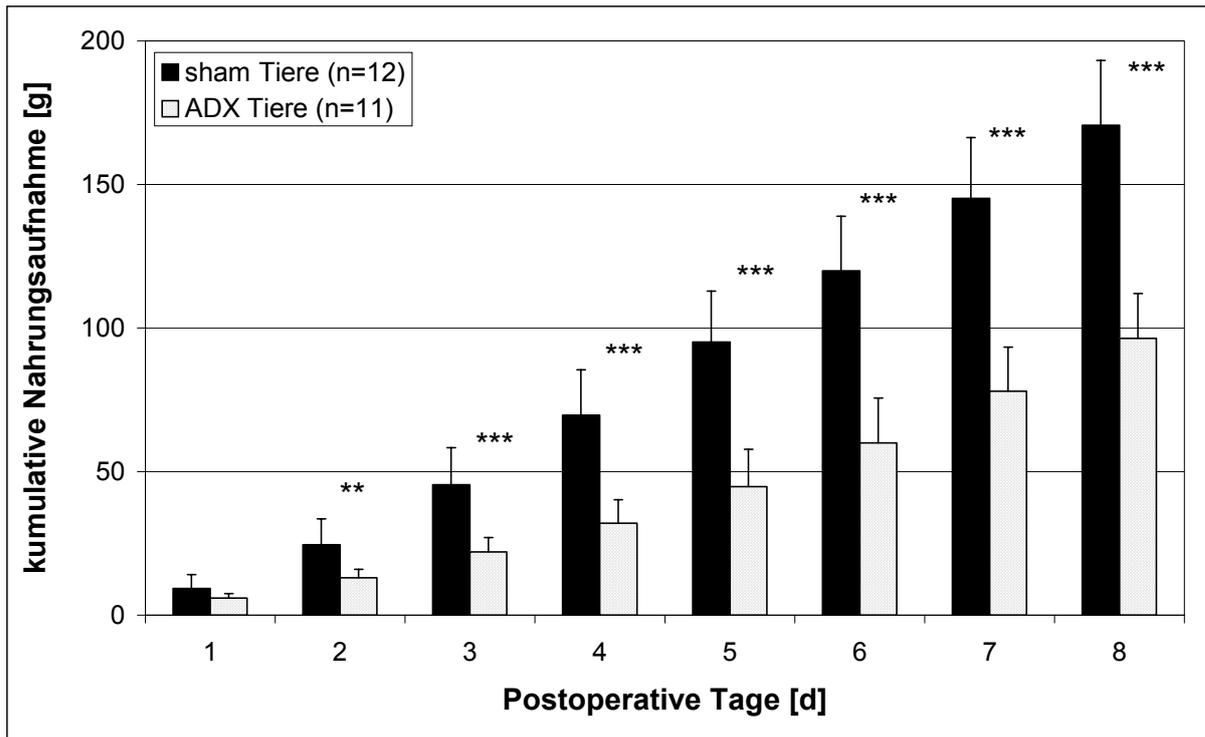


Abb. 8: Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von acht Tagen nach der Operation bei sham und ADX Tieren. Mittelwerte \pm SD. **p<0,01, *p<0,001 im Vergleich zu sham Tieren**

Entwicklung der Flüssigkeitsaufnahme postoperativ

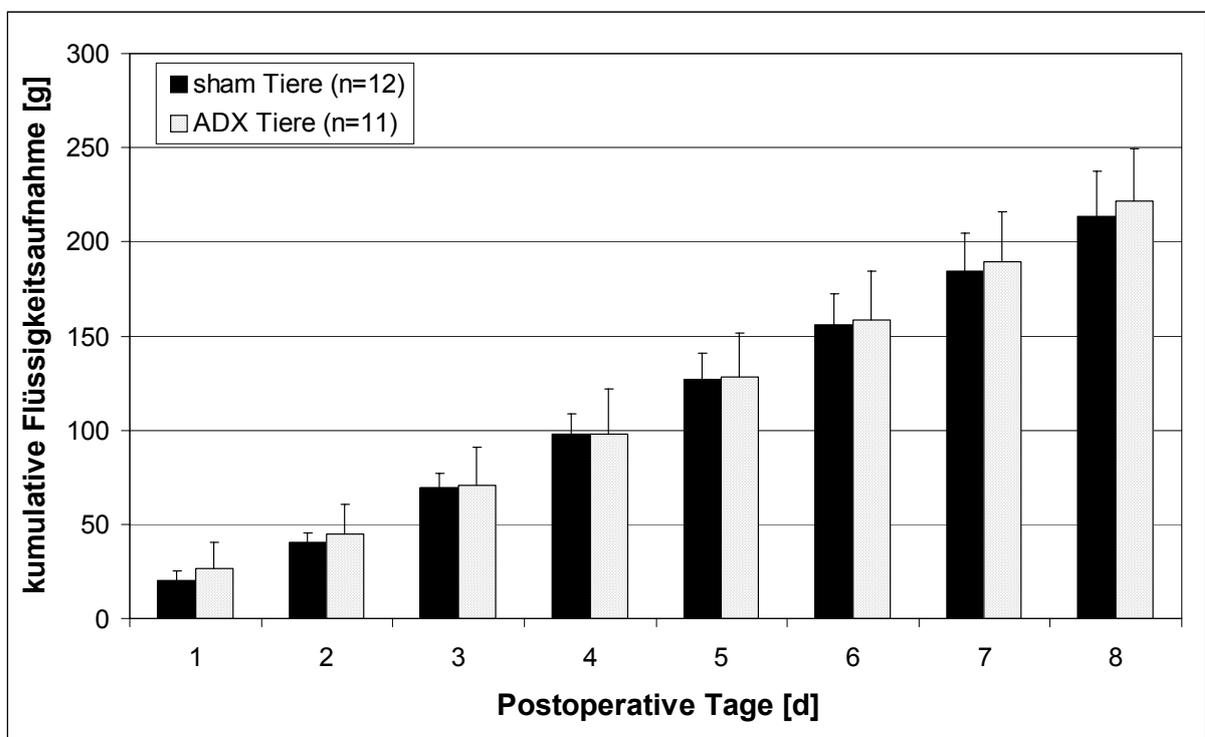


Abb. 9: Messung der kumulativen Flüssigkeitsaufnahme über einen Zeitraum von acht Tagen nach der Operation bei sham und ADX Tieren. Mittelwerte \pm SD.

Die statistische Analyse der kumulativen Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 9) während der acht Tage nach der Operation erbrachte zwischen den ADX Tieren und den sham Ratten keine signifikanten Unterschiede ($F_{1,21}=0,072$, $p=0,790$).

4.1.1 Effekte von ACTH auf die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht bei sham und ADX Tieren

Nahrungsaufnahme

Die kumulative Nahrungsaufnahme war bei einem Vergleich aller Gruppen signifikant verschieden (Abb. 10, $F_{3,19}=10,183$, $p<0,001$). Die statistische Analyse mittels einfaktorieller ANOVA ergab, dass die kumulative Nahrungsaufnahme in den einzelnen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 18).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
p	0,018	0,008	0,003	0,011	0,001	0,001
F	4,304	5,263	6,603	4,875	9,294	9,328

Tab. 18: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel nach einer 24-stündigen Hungerperiode reduzierte die kumulative Nahrungsaufnahme signifikant sowohl bei den sham Tieren als auch bei den ADX Tieren über den gesamten sechsstündigen Beobachtungszeitraum. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sind graphisch in Abb. 10 dargestellt.

Dabei betrug die Erniedrigung der kumulativen Nahrungsaufnahme bei den ACTH/sham Tieren (n=6) im Vergleich zu den phys. Kochsalzlsg./sham Tieren (n=6) nach der ersten Stunde 34,0 % und nach sechs Stunden 32,4 %. Die ACTH/ADX Tiere (n=6) zeigten im Vergleich zu den phys. Kochsalzlsg./ADX Tieren (n=5) ebenfalls eine Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme über die sechs Stunden. Ein signifikanter Unterschied konnte für die fünfte und sechste Stunde ermittelt werden. Der stärkste Effekt war mit 32,9 % nach sechs Stunden zwischen den ACTH/ADX Tieren und den phys. Kochsalzlsg./ADX zu beobachten.

Die Versuchsgruppen phys. Kochsalzlsg./sham und phys. Kochsalzlsg./ADX bzw. ACTH/sham und ACTH/ADX unterschieden sich jeweils nicht.

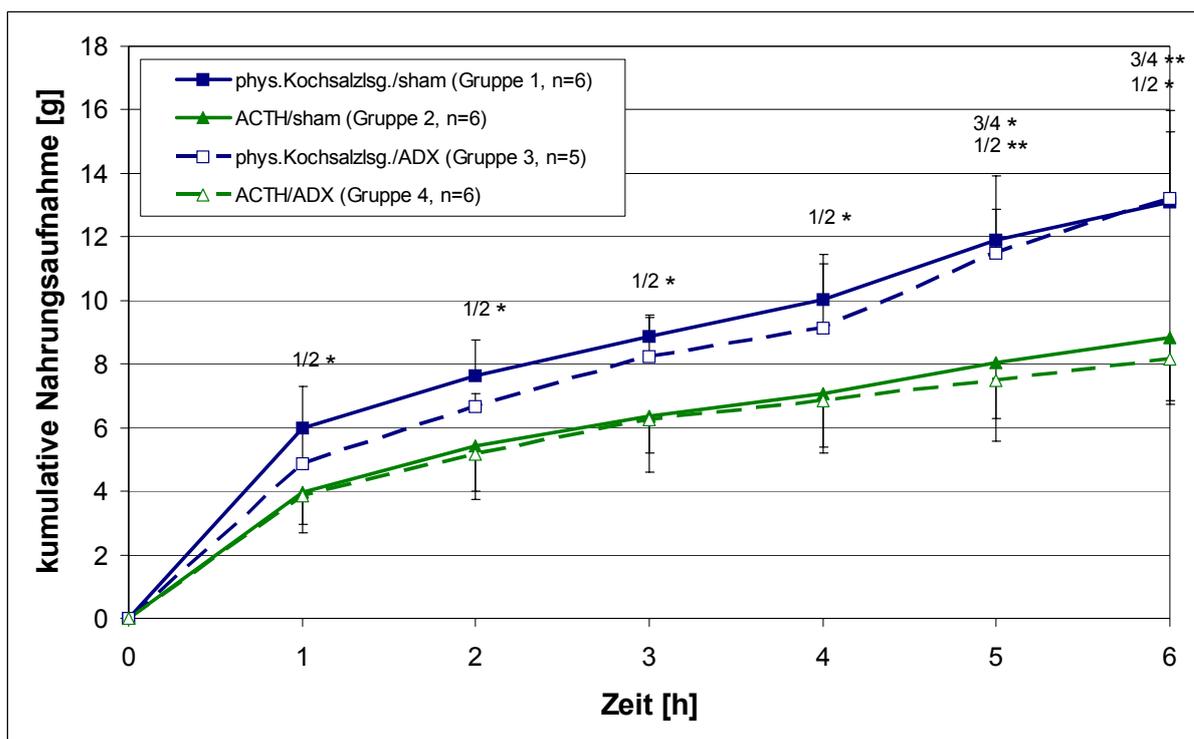


Abb. 10: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die kumulative Nahrungsaufnahme bei sham und ADX Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 3/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Flüssigkeitsaufnahme

Betrachtet man alle Gruppen im Vergleich, so war die kumulative Flüssigkeitsaufnahme signifikant unterschiedlich (Abb. 11, $F_{3,19}=30,486$, $p < 0,001$). Dass die Flüssigkeitsaufnahme der einzelnen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt unterschiedlich war, wurde durch die statistische Analyse (einfaktorieller ANOVA) nachgewiesen (p- und F-Werte siehe Tab. 19).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
p	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F	9,333	10,444	16,079	18,301	18,495	15,451

Tab. 19: Statistische Auswertung der Flüssigkeitsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die Aufnahme von Flüssigkeit war bei der Betrachtung des gesamten Beobachtungszeitraums bei den ACTH/sham Tieren (n=6) signifikant niedriger als bei den phys. Kochsalzlg./sham Tieren (n=6), wobei ein statistischer Vergleich der Messwerte zu jedem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied außer zur zweiten Stunde ergab. Die

stärkste Verringerung war mit 64,4 % nach der ersten Stunde zu beobachten; nach sechs Stunden betrug die Reduzierung immer noch 36,1 %. Bei den ACTH/ADX Tieren (n=6) wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikante Reduktion der Aufnahme von phys. Kochsalzlg. im Vergleich zu den phys. Kochsalzlg./ADX Tieren (n=5) beobachtet. Die Verminderung der kumulativen phys. Kochsalzlg.-Aufnahme betrug nach der sechsten Stunde 40,7 %; der Effekt war nach der ersten Stunde mit 59,7 % am größten. Die Aufnahme von Flüssigkeit unterschied sich nicht signifikant zwischen den phys. Kochsalzlg./sham und phys. Kochsalzlg./ADX sowie zwischen den ACTH/sham und ACTH/ADX Tieren.

In Abb. 11 sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen graphisch dargestellt.

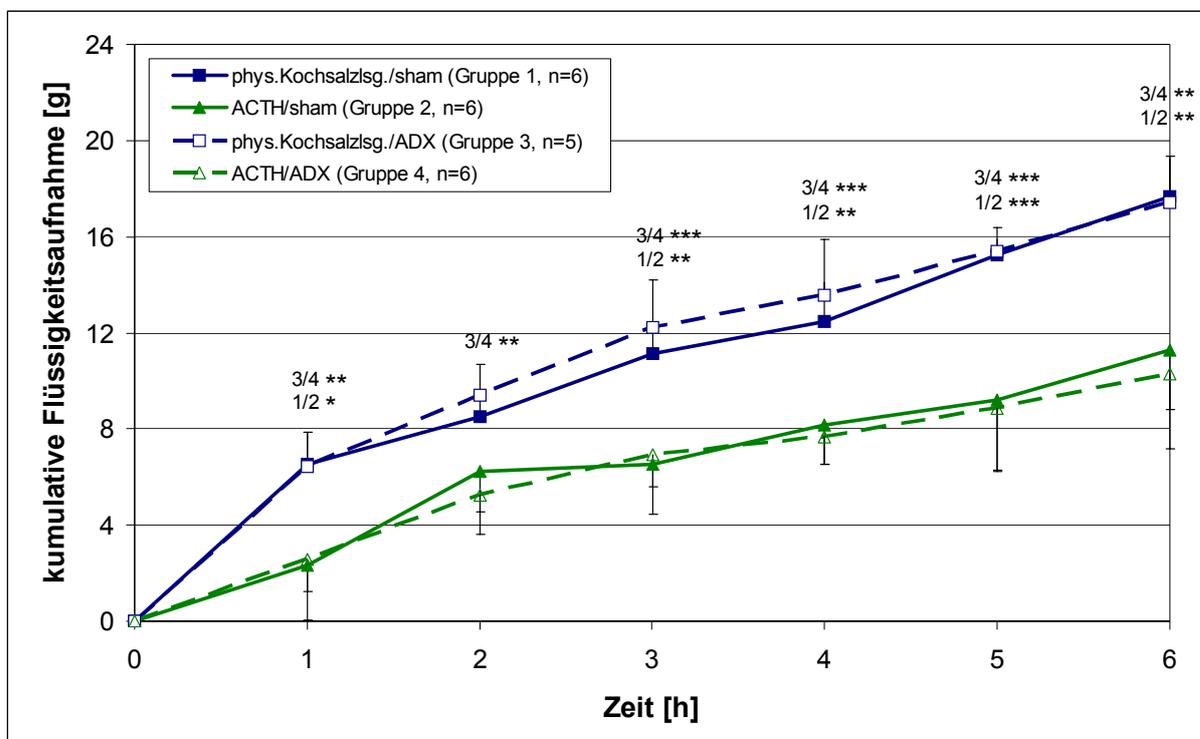


Abb. 11: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die kumulative Flüssigkeitsaufnahme bei sham und ADX Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 3/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Entwicklung des Körpergewichtes

Zum letzten Beobachtungszeitpunkt (sechs Stunden) wurde neben der Messung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme auch das Körpergewicht der Versuchstiere protokolliert. Dabei zeigte sich, dass die i.c.v. Behandlung mit ACTH sowohl bei den sham Tieren als auch bei den ADX Tieren eine signifikante Reduzierung der Zunahme des Körpergewichtes verursachte (Abb. 12, $F_{3,19} = 9,587$, $p < 0,001$).

Die mittlere Körpergewichtszunahme der sham Tiere war nach i.c.v. Applikation von ACTH um 59,6 % niedriger im Vergleich zu den mit phys. Kochsalzlsg. behandelten Kontrolltieren. ACTH reduzierte auch bei den ADX Tieren die Zunahme des Körpergewichtes (43,8 %).

Die mittlere Körpergewichtszunahme unterschied sich nicht zwischen phys. Kochsalzlsg./sham und phys. Kochsalzlsg./ADX bzw. zwischen den ACTH/sham und ACTH/ADX Tieren.

Die graphische Darstellung der Körpergewichtsentwicklung der einzelnen Gruppen ist in Abb. 12 gezeigt.

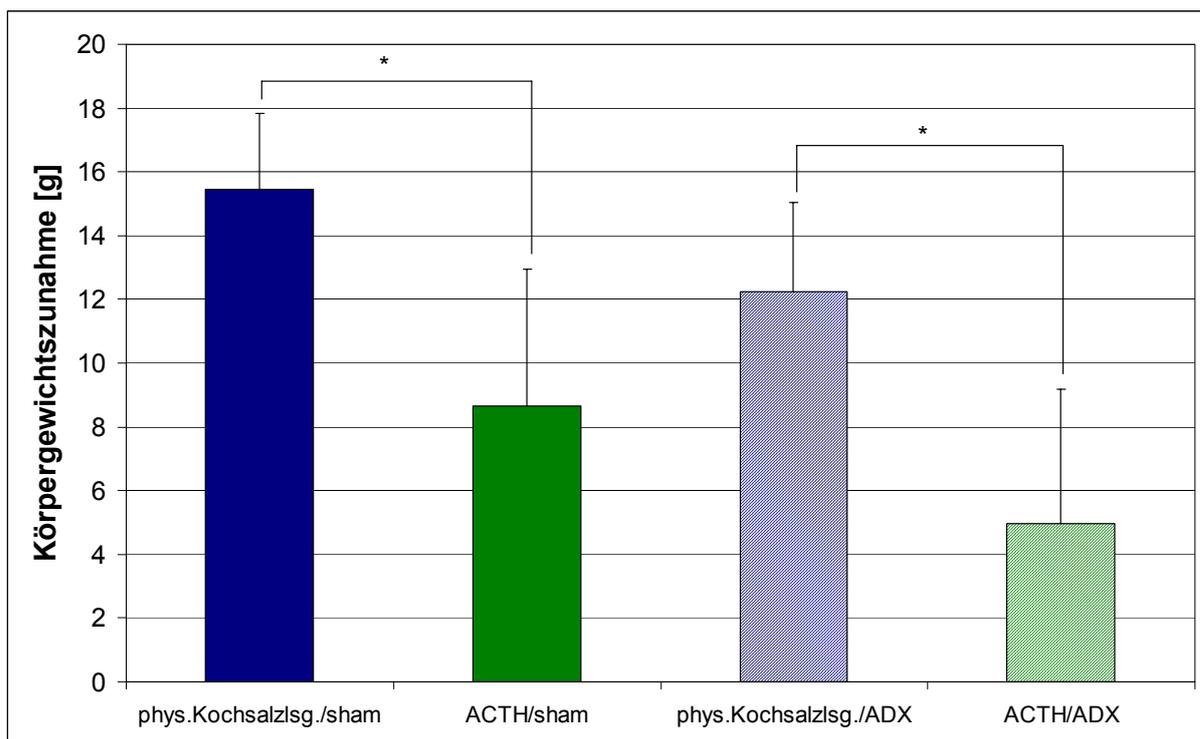


Abb. 12: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die Zunahme des Körpergewichtes bei sham und ADX Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD (n=5-6). *p<0,05 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

4.1.2 Einfluss der ADX und ACTH Applikation auf die Hormonkonzentrationen im Serum

Um festzustellen, ob die i.c.v. Applikation von ACTH zu messbaren ACTH-Konzentrationen im Serum führt, die Freisetzung von Kortikosteron aus der NNR stimuliert und die durchgeführten ADX erfolgreich waren, wurden die Serumkonzentrationen von ACTH und Kortikosteron bestimmt. Sechs Stunden nach der Applikation von ACTH bzw. phys. Kochsalzlsg. wurden die Tiere mittels Nackenschlag und Dekapitation getötet und die genannten Hormone in dem aus Dekapitationsblut gewonnenen Serum bestimmt.

Bestimmung der ACTH-Konzentration im Serum

Die ACTH-Konzentrationen im Serum waren beim Vergleich über alle Gruppen betrachtet voneinander signifikant verschieden ($F_{3,19}=5,911$, $p=0,005$). Die Abb. 13 zeigt, dass die ADX zu einer signifikanten Erhöhung des ACTH im Serum führt. Die i.c.v. Gabe von ACTH verursachte sowohl bei den sham als auch bei den ADX Tieren keine Veränderung der ACTH Serumspiegel im Vergleich zur Applikation von phys. Kochsalzlg. in den jeweiligen Vergleichsgruppen.

In Abb. 13 sind graphisch die Unterschiede der Serumkonzentrationen von ACTH zwischen den verschiedenen Gruppen dargestellt.

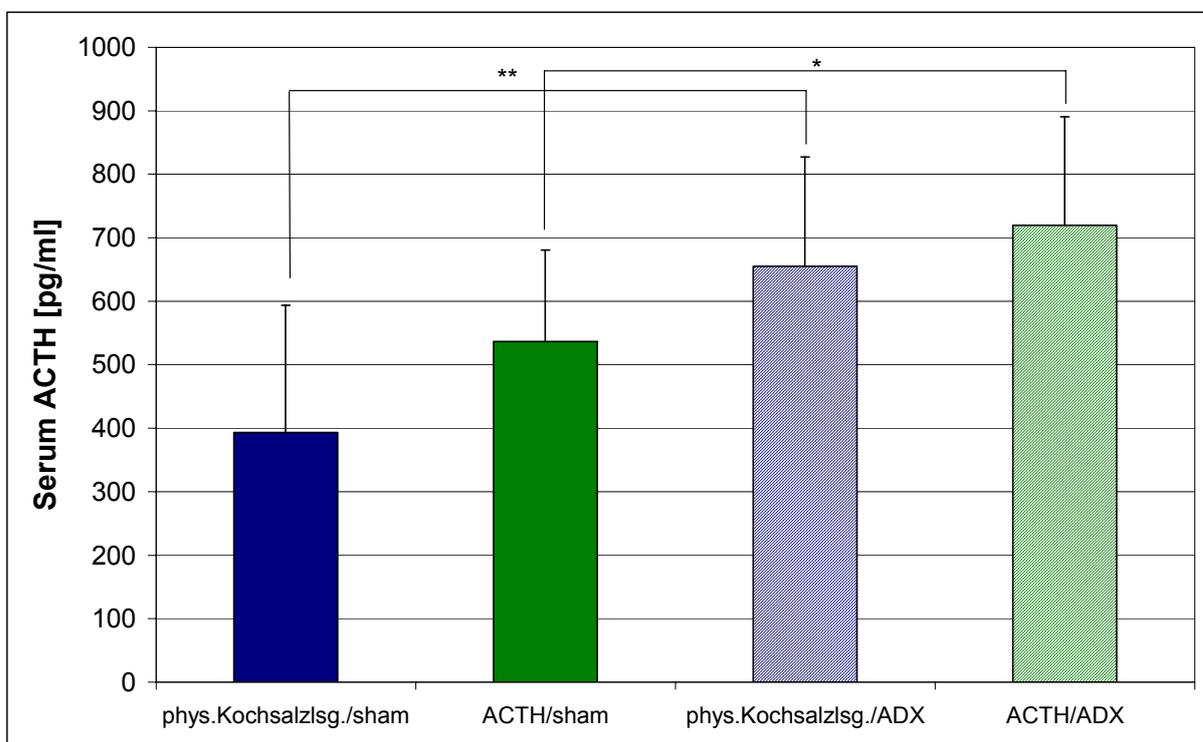


Abb. 13: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die ACTH Serumkonzentration bei sham und ADX Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD ($n=5-6$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Bestimmung der Kortikosteronkonzentration im Serum

Die Bestimmung der Kortikosteronserumkonzentrationen zeigte einen signifikanten Unterschied beim Vergleich über alle Gruppen ($F_{3,19}=50,084$, $p<0,001$).

Wie in Abb. 14 dargestellt, wurde durch die ADX das Kortikosteron im Serum signifikant erniedrigt; dies war sowohl bei ACTH als auch bei den mit phys. Kochsalzlg. behandelten Tieren im Vergleich zu ihrer entsprechenden sham-operierten Vergleichsgruppe zu beobachten. In allen in dieser Arbeit dargestellten Auswertungen wurden nur ADX Ratten mit

einem Kortikosteronspiegel von weniger als 10 ng/ml einbezogen, da man ab diesem Wert von einer vollständigen Entfernung der Nebenniere ausgehen kann (189).

Die Kortikosteronspiegel im Serum waren nach i.c.v. Applikation von ACTH sowohl bei den sham als auch den ADX Tieren nicht signifikant verschieden von mit phys. Kochsalzlsg. behandelten Ratten.

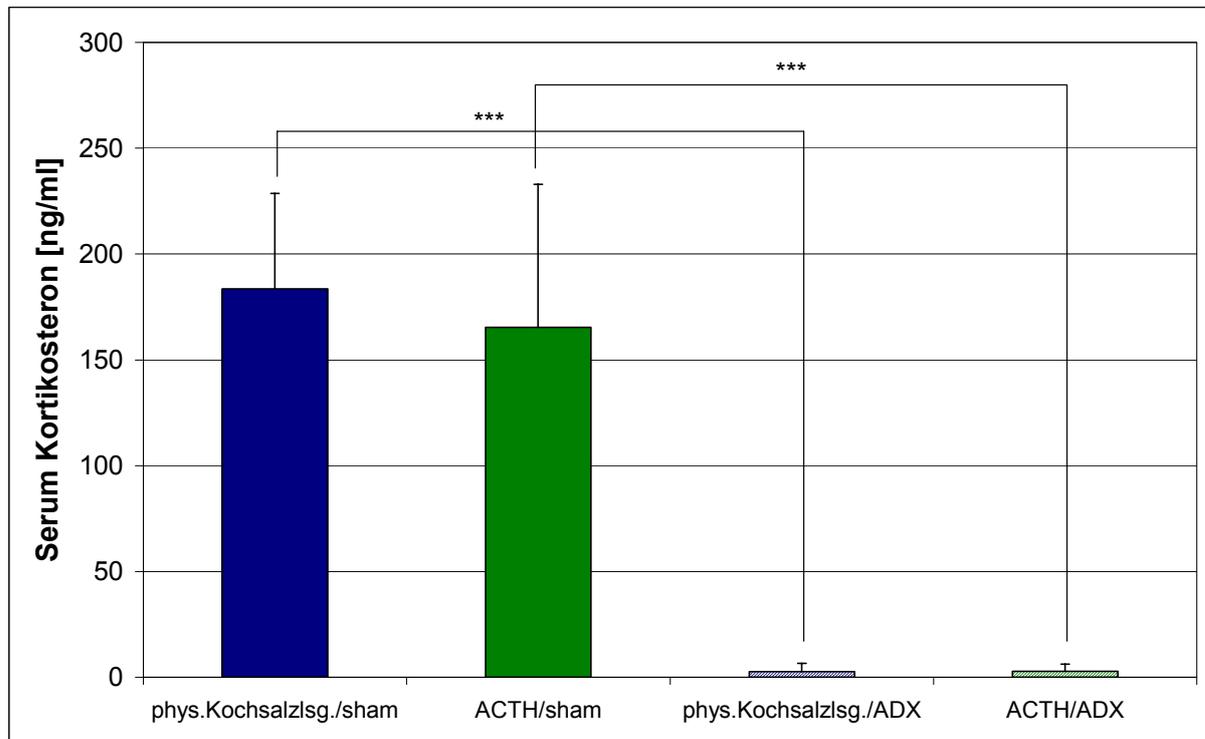


Abb. 14: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die Serumkonzentration von Kortikosteron bei sham und ADX Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=5-6). ***p<0,001 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

4.1.3 Effekte von ACTH auf die hypothalamische mRNA-Expression bei sham und ADX Tieren

In hypothalamischen Regionen wie VMN, PVN, DMN und LHA wurde der MC4-R in einer hohen Dichte nachgewiesen. Weiterhin zeigte die Ausbildung einer extremen Fettsucht bei MC4-R^{-/-} Mäusen die Beteiligung des MC4-R an der Appetitregulation. Eines der nachgeschalteten Neuropeptide des MC4-R ist BDNF, dessen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme ebenfalls nachgewiesen wurde; eine Interaktion zwischen dem MC-System und BDNF wurde bereits gezeigt (51). Aufgrund der vorliegenden Daten sollte in unserer Studie die mRNA-Expression des MC4-R und BDNF im VMN nach ACTH Applikation bzw. ADX untersucht werden. Hierzu wurde die Technik der ISH verwandt. Da in dieser Arbeit nicht das generelle Vorhandensein von bestimmten Proteinen auf mRNA-Ebene untersucht werden sollte, sondern die mRNA-Menge innerhalb einer Struktur

zwischen verschiedenen Bedingungen verglichen wurde, war ein Mitführen von Negativkontrollen (sense-Sonde), wie es in Abschnitt 3.1.9 der Material und Methoden beschrieben wurde, nicht notwendig.

MC4-R mRNA-Expression bei sham und ADX Tieren

Abb. 15 und Abb. 16 zeigen die Ergebnisse der ISH zur semi-quantitativen Bestimmung der MC4-R mRNA-Expression im VMN bei mit ACTH bzw. phys. Kochsalzlg. behandelten sham und ADX Tieren. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde die erste Auflage ausgewertet, bei der die Expositionszeit 23 Tage betrug.

Für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 15 exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

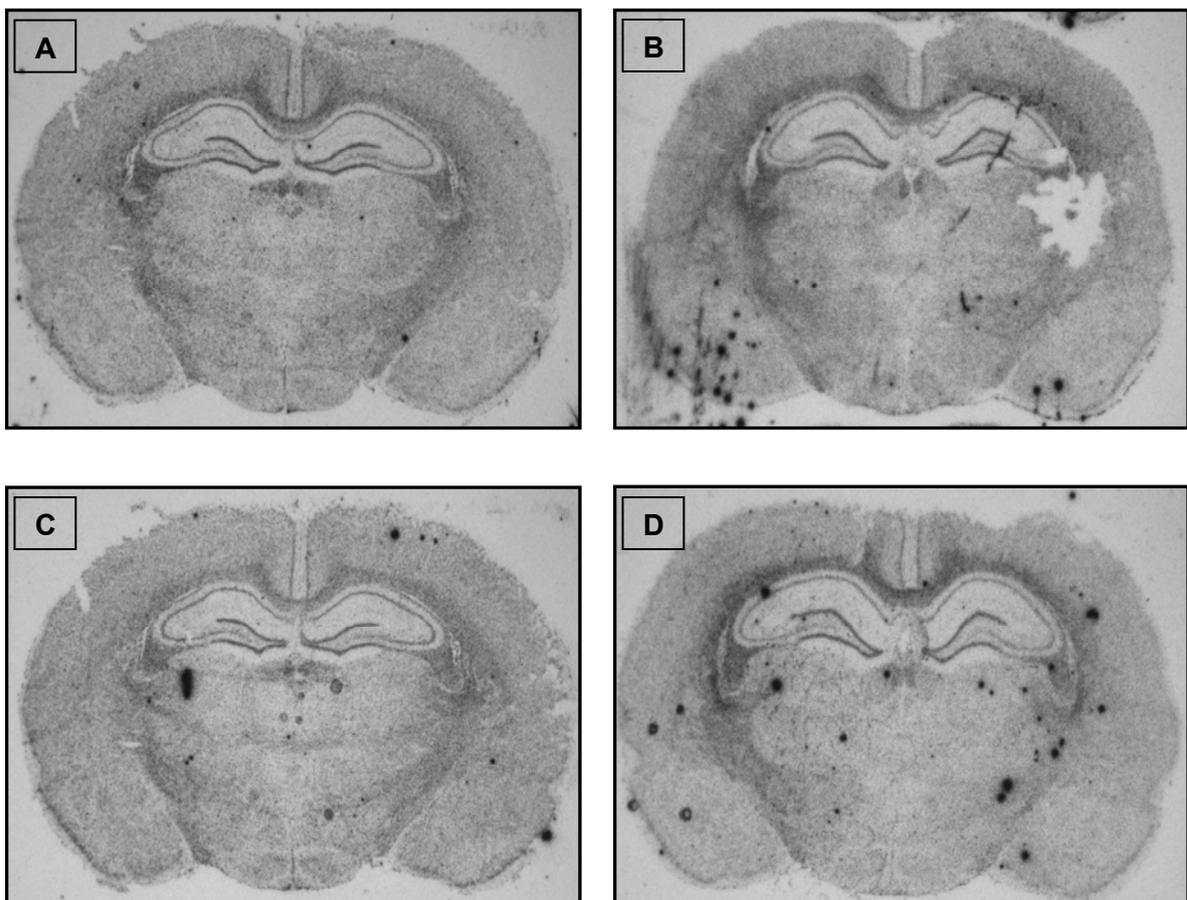


Abb. 15: MC4-R mRNA-Expression im VMN in 14 μ m-Frontalschnitten der Gehirne von sham und ADX Tieren. (A) phys. Kochsalzlg./sham, (B) ACTH/sham, (C) phys. Kochsalzlg./ADX, (D) ACTH/ADX. Gezeigt ist – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit phys. Kochsalzlg. bzw. ACTH behandelten Ratten.

In Abb. 16 sind die Grauwerte der MC4-R mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Beim Vergleich aller Gruppen untereinander zeigte sich, dass die MC4-R mRNA-Expression signifikant unterschiedlich war ($F_{3,19}=3,582$, $p=0,033$).

Die i.c.v. ACTH Applikation ($n=6$) führte zu einer signifikanten Reduzierung der MC4-R mRNA-Expression bei sham Tieren im Vergleich zur mit phys. Kochsalzlg. behandelten Gruppe ($n=6$). Auch bei den ADX Tieren bewirkte die Applikation von ACTH ($n=6$) eine verminderte MC4-R mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollapplikation ($n=5$), dies war jedoch nicht signifikant.

Die ADX hatte weder bei den mit phys. Kochsalzlg. behandelten Ratten noch bei den Tieren, die eine ACTH Applikation erhielten, Einfluss auf die MC4-R mRNA-Expression.

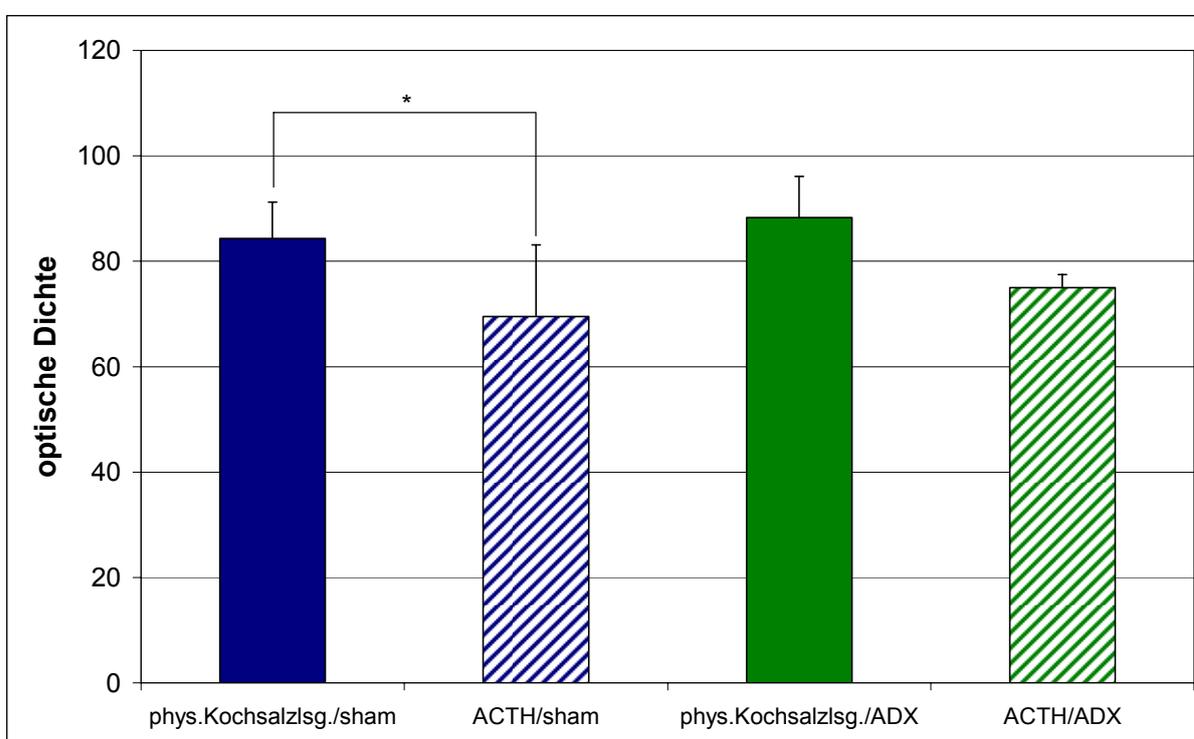


Abb. 16: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die MC4-R mRNA-Expression im VMN bei sham und ADX Tieren. Mittelwerte \pm SD ($n=5-6$). * $p<0,05$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

BDNF mRNA-Expression bei sham und ADX Tieren

Die Ergebnisse der ISH zur semiquantitativen Bestimmung der BDNF mRNA-Expression im VMN nach Behandlung der sham und ADX Tiere mit ACTH bzw. phys. Kochsalzlg. sind in Abb. 17 und Abb. 18 dargestellt. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde die erste Auflage ausgewertet, bei der die Expositionszeit 21 Tage betrug.

Für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 17 exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

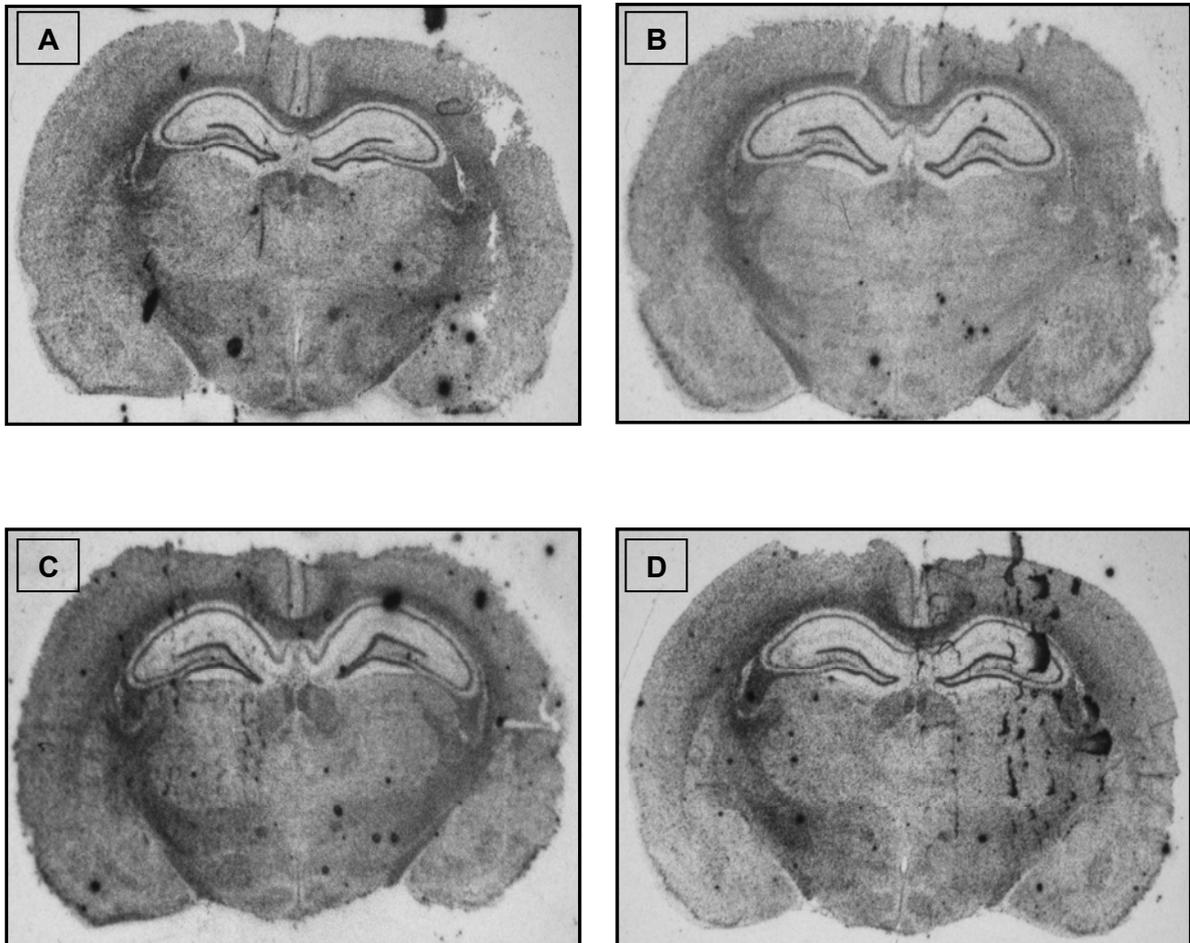


Abb. 17: BDNF mRNA-Expression im VMN in 14 μ m-Frontalschnitten der Gehirne von sham und ADX Tieren. (A) phys. Kochsalzlg./sham, (B) ACTH/sham, (C) phys. Kochsalzlg./ADX, (D) ACTH/ADX. Gezeigt ist – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit phys. Kochsalzlg. bzw. ACTH behandelten Ratten.

Die Grauwerte der BDNF mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen sind in Abb. 18 dargestellt. Die BDNF mRNA-Expression war im Vergleich über alle Gruppen signifikant unterschiedlich ($F_{3,19}=17,385$, $p<0,001$).

Bei sham Tieren führte die ACTH Gabe ($n=6$) in den lateralen Ventrikel im Vergleich zur Applikation von phys. Kochsalzlg. ($n=6$) zu einer signifikanten Erhöhung der BDNF mRNA-

Expression. In den ADX Tieren (n=6) erzeugte die Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel ebenfalls eine Erhöhung der BDNF mRNA-Expression im Vergleich zur Injektion von phys. Kochsalzlg. (n=5), dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Die ADX führte bei den Ratten nach Applikation von phys. Kochsalzlg. bzw. ACTH zu einer signifikanten Verringerung der BDNF mRNA-Expression im Vergleich zu ihrer entsprechenden sham Gruppe.

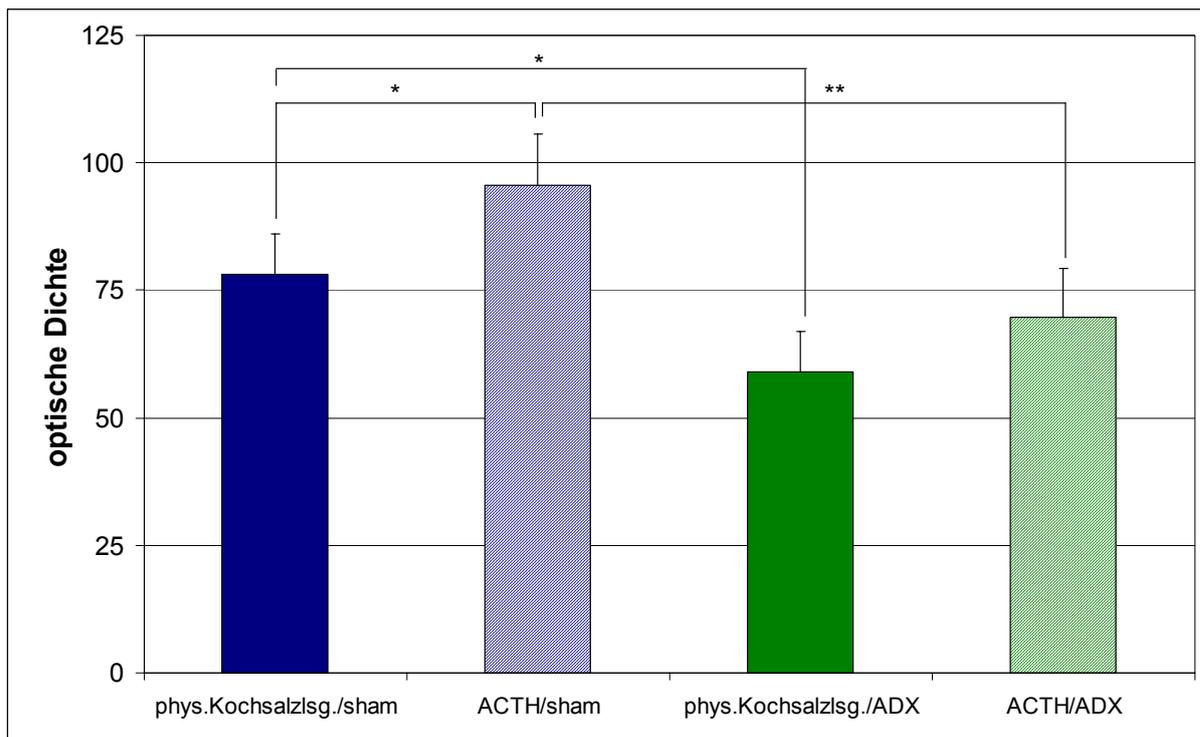


Abb. 18: Effekt einer i.c.v. ACTH Applikation auf die BDNF mRNA-Expression im VMN bei sham und ADX Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=5-6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

4.2 Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α -MSH

Für die Überprüfung der Effektivität von ACTH-AK und α -MSH-AK wurden den Tieren zunächst Mikroinjektionseinheiten in den lateralen Ventrikel und den PVN implantiert. Nach einwöchiger Erholungsphase wurde ihnen für 24 Stunden das Futter entzogen. Am darauf folgenden Morgen wurde den Tieren i.c.v. ACTH, α -MSH oder phys. Kochsalzlg. und in den PVN ACTH-AK, α -MSH-AK oder IgG (letzteres als Kontrollsubstanz) appliziert.

4.2.1 Effekte des ACTH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsveränderung bei Tieren

Nahrungsaufnahme

Bei der statistischen Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme wurde im Vergleich aller Gruppen miteinander ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt (Abb. 19, $F_{3,16}=17,915$, $p<0,001$). Die anschließende Analyse mittels einfaktorieller ANOVA ergab, dass die kumulative Nahrungsaufnahme zwischen den Gruppen zu jedem Messzeitpunkt signifikant unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 20).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	0,004	0,003	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003
F	6,802	7,168	8,435	9,661	15,160	26,196	11,879	12,329	7,083

Tab. 20: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

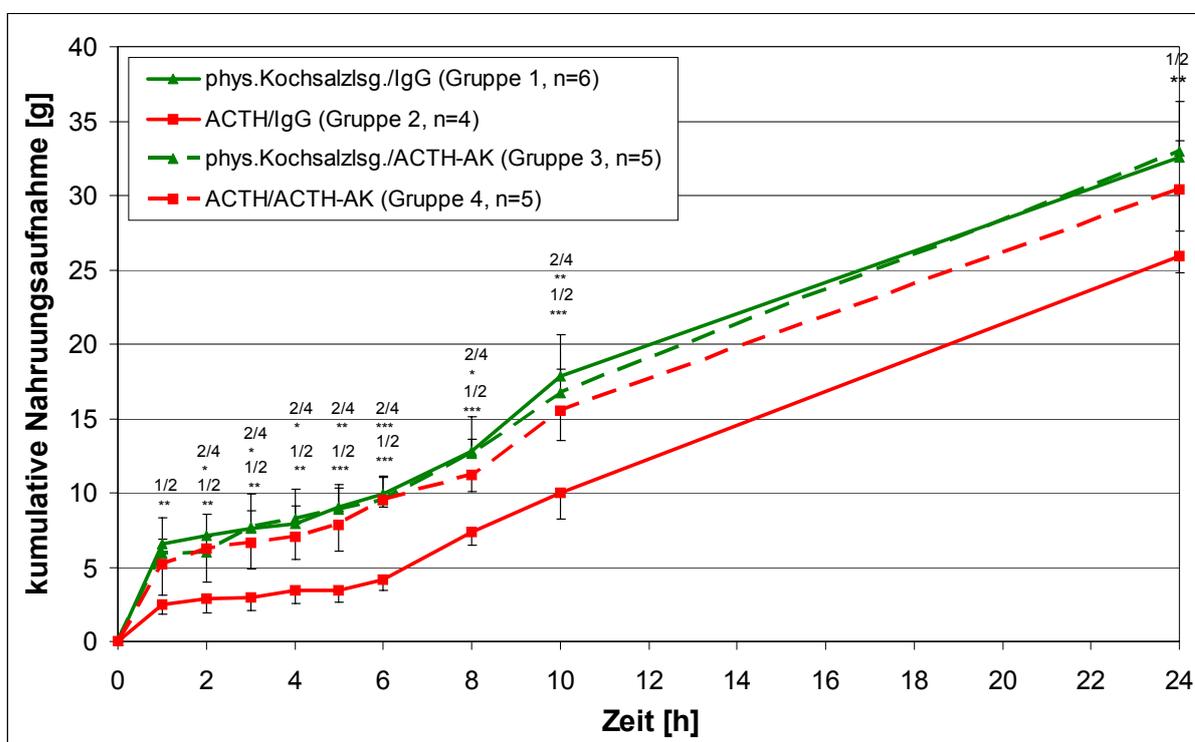


Abb. 19: Wirkung des ACTH-AK auf die kumulative Nahrungsaufnahme nach ACTH (i.c.v.) und ACTH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 2/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).**

Die Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel und IgG in den PVN (n=4) nach einer 24-stündigen Hungerperiode der Tiere führte zu einer signifikanten Verminderung der kumulativen Nahrungsaufnahme über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Stunden im Vergleich zur phys. Kochsalzlsg./IgG Gruppe (n=6). Die kumulative Nahrungsaufnahme war nach sechs Stunden um 58,3 %, nach zehn Stunden um 44,0 % und nach 24 Stunden um 20,5 % erniedrigt. Der stärkste Effekt (62,1 %) wurde eine Stunde nach der Applikation beobachtet.

Die gleichzeitige Applikation von ACTH i.c.v. und ACTH-AK in den PVN (n=5) führte zu einer signifikanten Erhöhung der kumulativen Nahrungsaufnahme von der zweiten bis zur zehnten Stunde im Vergleich zu den ACTH/IgG Tieren; die Nahrungsaufnahme war nicht signifikant unterschiedlich von den phys. Kochsalzlsg./IgG Ratten (n=5). Die aufgenommene Futtermenge der ACTH/ACTH-AK Tiere erreichte zu allen Zeitpunkten 79,4 – 96,4 % des entsprechenden Wertes der phys. Kochsalzlsg./IgG Ratten. Der Vergleich zwischen der ACTH/ACTH-AK Gruppe und der phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK Gruppe (n=5) sowie zwischen den phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK und phys. Kochsalzlsg./IgG Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied bei der kumulativen Nahrungsaufnahme.

Die signifikanten Unterschiede bei der kumulativen Nahrungsaufnahme zwischen den verschiedenen Gruppen sind in Abb. 19 graphisch dargestellt.

Wasseraufnahme

Die kumulative Wasseraufnahme war im Vergleich über alle Gruppen signifikant unterschiedlich (Abb. 20, $F_{3,16}=8,085$, $p=0,002$). Die statistische Überprüfung der Daten mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA zeigte dabei, dass die kumulative Wasseraufnahme zu mehreren Zeitpunkten unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 21).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	n.s.	0,029	0,014	0,012	0,013	0,011	n.s.	0,030	n.s.
F	1,038	3,885	4,873	5,026	4,953	5,135	2,426	3,831	2,083

Tab. 21: Statistische Auswertung der kumulativen Wasseraufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die Applikation von i.c.v. ACTH bei gleichzeitiger Gabe von IgG in den PVN (n=4) im Vergleich zur phys. Kochsalzlsg./IgG Gruppe (n=6) führte nach einer 24-stündigen Hungerperiode der Tiere zu einer Reduktion der kumulativen Wasseraufnahme. Bei der Betrachtung der einzelnen Messzeitpunkte konnte eine signifikante Erniedrigung der

kumulativen Wasseraufnahme durch ACTH/IgG vier bis sechs Stunden nach der Applikation beobachtet werden. Die kumulative Wasseraufnahme ergab nach sechs Stunden eine Verringerung um 42,7 %, nach zehn Stunden um 27,8 % und nach 24 Stunden um 11,6 %. Die maximale Erniedrigung nach der Applikation wurde nach drei Stunden (46,8 %) festgestellt.

Die Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel und die gleichzeitige Gabe von ACTH-AK in den PVN (n=5) führte hingegen zu einer Erhöhung der kumulativen Wasseraufnahme im Vergleich zu den ACTH/IgG Tieren. Dieser Effekt war zwei und sechs Stunden nach der Applikation der Substanzen signifikant und zeigte nach drei (p=0,056), vier (p=0,068) und fünf (p=0,063) Stunden einen Trend. Der Effekt der ACTH Gabe auf die Wasseraufnahme konnte durch die zusätzliche Applikation von ACTH-AK komplett blockiert werden: Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen ACTH/ACTH-AK und phys. Kochsalzlg/IgG bzw. phys. Kochsalzlg./ACTH-AK Tieren (n=5) beobachtet. Die kumulative Wasseraufnahme von phys. Kochsalzlg./ACTH-AK- und phys. Kochsalzlg/IgG-behandelten Tieren war nicht signifikant unterschiedlich.

In Abb. 20 ist die kumulative Wasseraufnahme der verschiedenen Versuchsgruppen graphisch dargestellt.

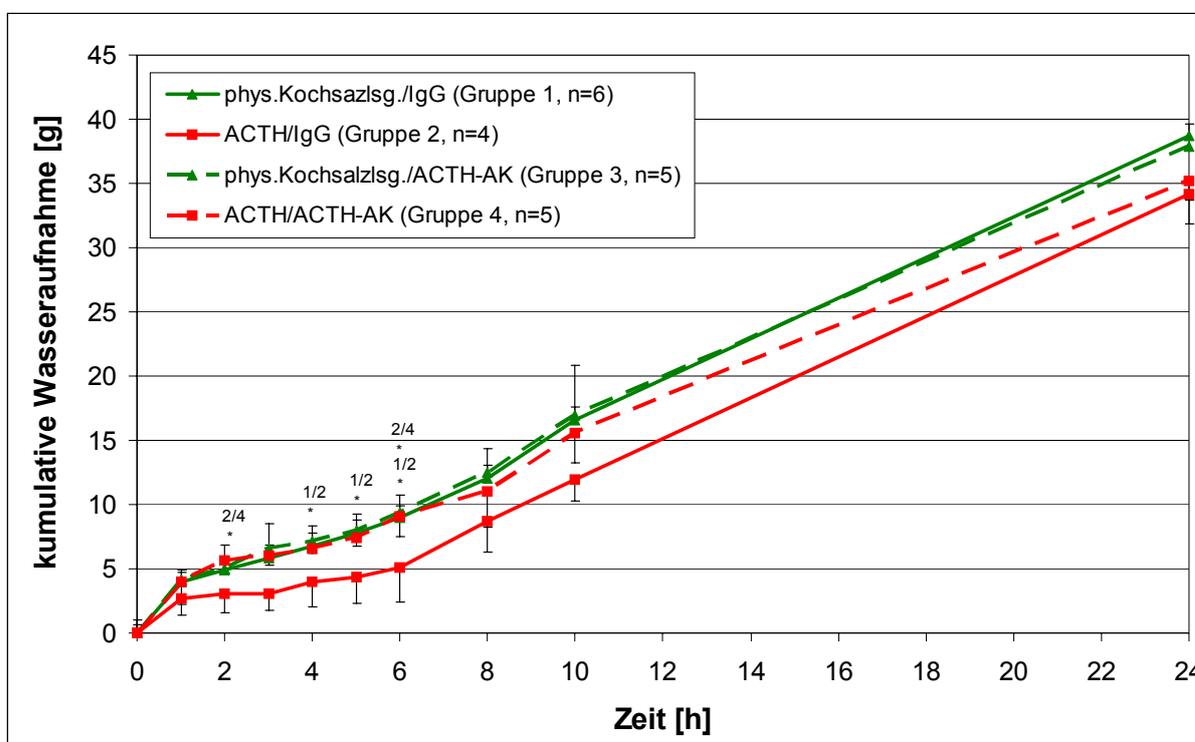


Abb. 20: Wirkung des ACTH-AK auf die kumulative Wasseraufnahme nach ACTH (i.c.v.) und ACTH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. *p<0,05 signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 2/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Entwicklung des Körpergewichtes

Die Zunahme des Körpergewichtes war sechs und 24 Stunden nach den verschiedenen Applikationen im Vergleich über alle Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 21, $F_{3,16}=1,902$, $p=0,170$).

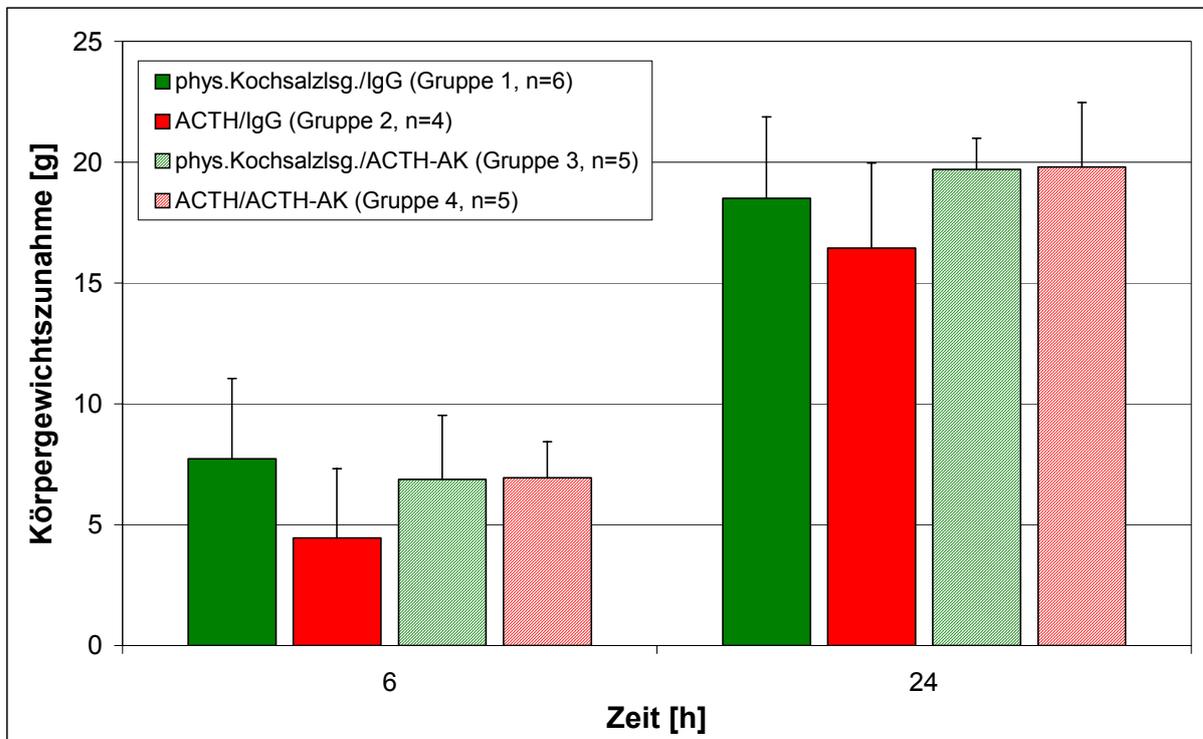


Abb. 21: Wirkung des ACTH-AK auf die Zunahme des Körpergewichtes nach ACTH (i.c.v.) und ACTH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD.

4.2.2 Effekte des α -MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei Tieren

Nahrungsaufnahme

Die Untersuchung der kumulativen Nahrungsaufnahme zeigte im Vergleich über alle Gruppen einen signifikanten Unterschied (Abb. 22, $F_{3,20}=7,242$, $p=0,003$). Die statistische Analyse mittels einfaktorieller ANOVA ergab, dass die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt unterschiedlich war (p - und F -Werte siehe Tab. 22).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	< 0,001	0,001	0,031	n.s.	n.s.	n.s.	0,026	0,038	0,037
F	13,586	9,660	3,603	1,893	2,954	2,649	3,795	3,392	3,411

Tab. 22: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

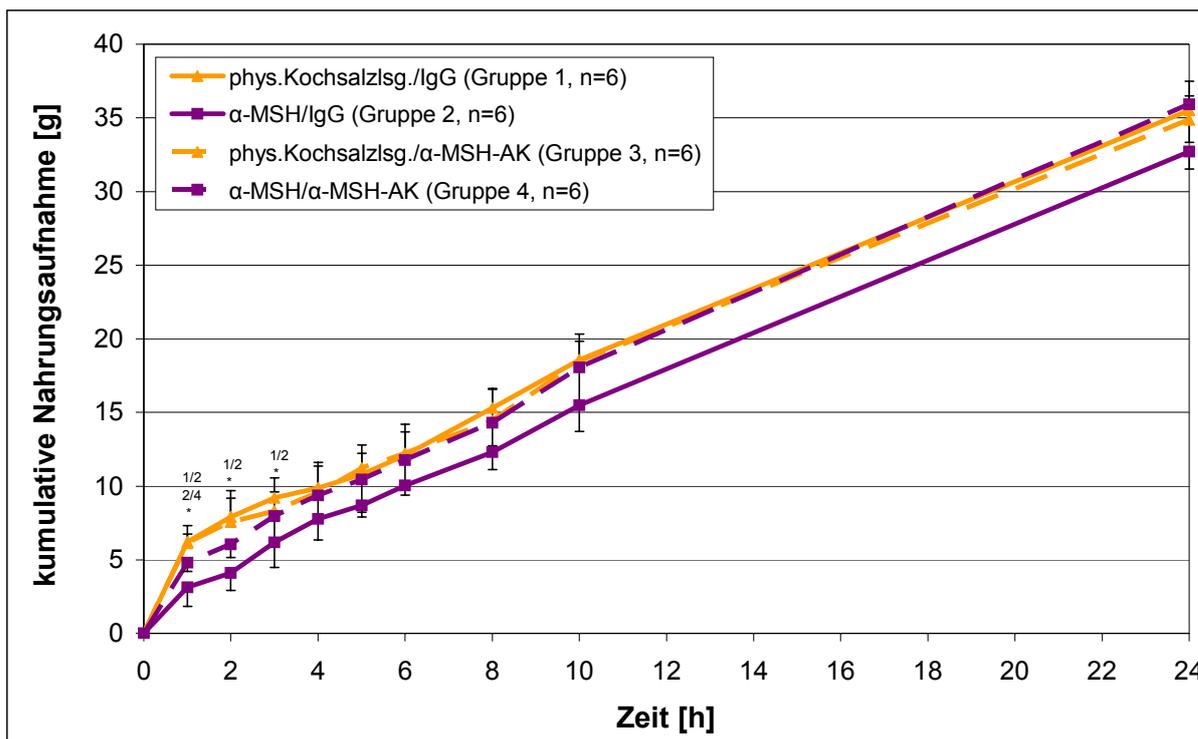


Abb. 22: Wirkung des α -MSH-AK auf die kumulative Nahrungsaufnahme nach α -MSH (i.c.v.) und α -MSH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 2/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Nach 24 Stunden Fasten der Tiere führte die i.c.v. Applikation von α -MSH und IgG in den PVN (n=6) im Vergleich zur phys. Kochsalzlg./IgG Gruppe (n=6) zu einer signifikanten Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme für die ersten drei Stunden. Diese Verminderung der kumulativen Nahrungsaufnahme betrug nach sechs Stunden 21,1 %, nach zehn Stunden 17,3 % und nach 24 Stunden 14,9 %. Der größte Effekt (55,1 %) wurde zwei Stunden nach der Applikation beobachtet.

Die gleichzeitige Applikation von α -MSH i.c.v. und α -MSH-AK in den PVN (n=6) bewirkte eine signifikante Erhöhung der kumulativen Nahrungsaufnahme nach der ersten und 24. Stunde im Vergleich zu den α -MSH/IgG Tieren. Damit war die kumulative

Nahrungsaufnahme dieser Gruppe nicht signifikant unterschiedlich von der phys. Kochsalzlg./IgG Ratten (Kontrollgruppe); die aufgenommene Futtermenge hatte zu allen Zeitpunkten 76,3 – 101,2 % des entsprechenden Wertes der Kontrollgruppe erreicht. Der Vergleich zwischen der α -MSH/ α -MSH-AK Gruppe und der phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK Gruppe (n=6) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Weiterhin wurden keine signifikanten Unterschiede in der kumulativen Nahrungsaufnahme zwischen phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK und phys. Kochsalzlg./IgG Tieren festgestellt. Die kumulative Nahrungsaufnahme der verschiedenen Gruppen ist in Abb. 22 graphisch dargestellt.

Wasseraufnahme

Die kumulative Wasseraufnahme war bei einem Vergleich aller Gruppen signifikant verschieden (Abb. 23, $F_{3,20}=3,237$, $p=0,044$). Beim Vergleich der kumulativen Wasseraufnahme zu einzelnen Zeitpunkten mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA zeigte sich, dass diese nur zur achten Stunde signifikant verschieden war (p- und F-Werte siehe Tab. 23).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s	n.s.	0,026	n.s.	n.s
F	2,193	2,074	2,931	2,591	2,148	2,528	3,81	2,776	0,409

Tab. 23: Statistische Auswertung der kumulativen Wasseraufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die i.c.v. Applikation von α -MSH (n=6) nach 24 Stunden Fasten führte tendenziell zu einer Verringerung der kumulativen Wasseraufnahme im Vergleich zur phys. Kochsalzlg./IgG Gruppe (n=6), dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Die gleichzeitige Applikation von α -MSH in den lateralen Ventrikel und α -MSH-AK in den PVN (n=6) führte zu einer Erhöhung der kumulativen Wasseraufnahme im Vergleich zu den α -MSH/IgG Tieren, jedoch war auch dies nicht signifikant. Außerdem zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den α -MSH/ α -MSH-AK Tieren und den phys. Kochsalzlg./IgG Ratten bzw. den phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK Ratten (n=6) gab.

Die Gruppe, die phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK erhielt, unterschied sich nicht signifikant von den Tieren, die mit phys. Kochsalzlg./IgG behandelt wurden.

Die Abb. 23 stellt graphisch die kumulative Wasseraufnahme der verschiedenen Gruppen dar.

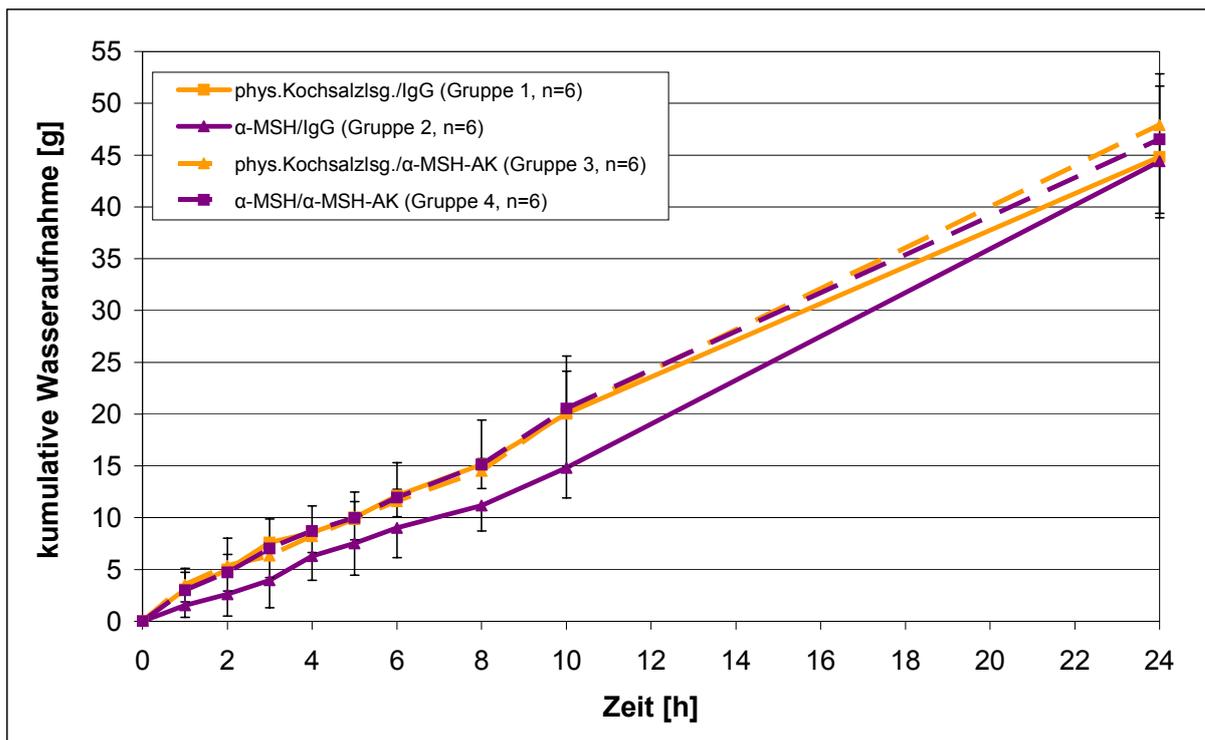


Abb. 23: Wirkung des α -MSH-AK auf die kumulative Wasseraufnahme nach α -MSH (i.c.v.) und α -MSH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD.

Entwicklung des Körpergewichtes

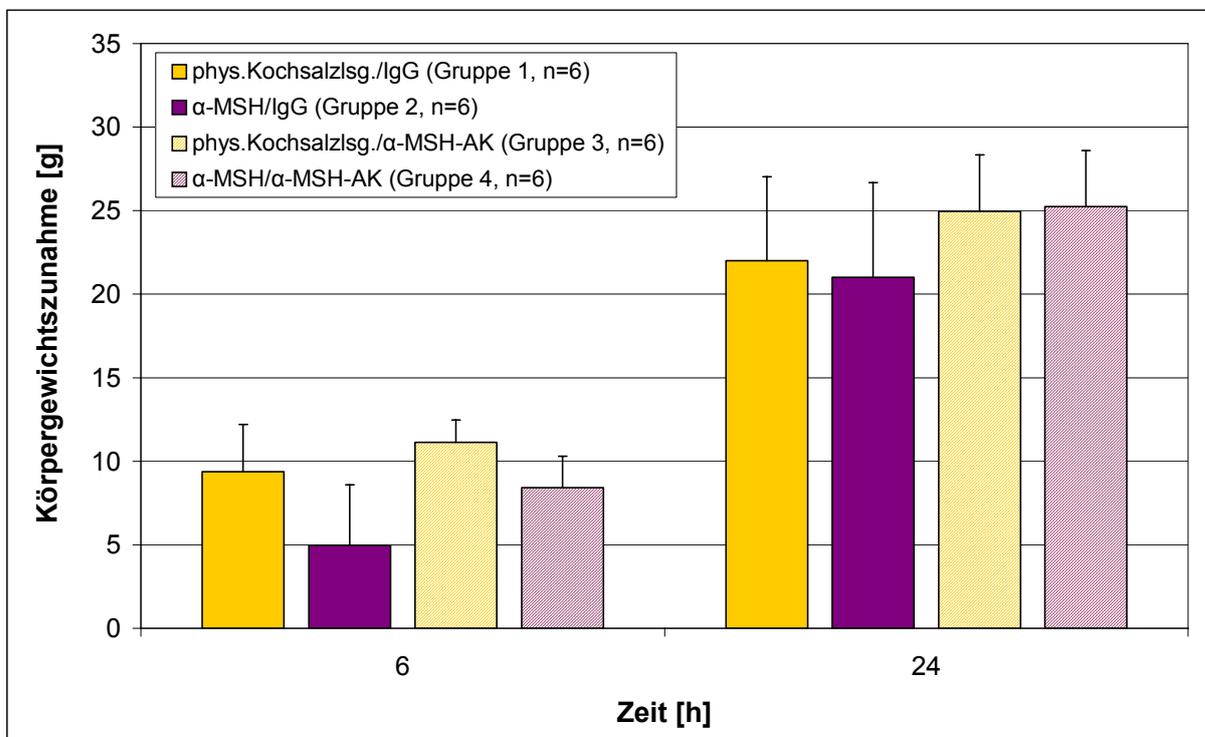


Abb. 24: Wirkung des α -MSH-AK auf die Körpergewichtszunahme nach α -MSH (i.c.v.) und α -MSH-AK (PVN) Applikation bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD.

Die Untersuchung der Körpergewichtszunahme sechs und 24 Stunden nach den verschiedenen Applikationen zeigte im Vergleich über alle Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 24, $F_{3,20}=3,049$, $p=0,052$).

4.3 Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α -MSH verursacht werden

Einige Studien haben eindrucksvoll gezeigt, dass die N-terminalen POMC Peptide, wie ACTH und α -MSH die Nahrungsaufnahme nach zentraler Applikation reduzieren (188). Aufgrund der Tatsache, dass beide Peptide aus dem gleichen Vorläuferprotein POMC entstehen und zusätzlich das α -MSH mit den ersten 13 AS des ACTH identisch ist, galt es die Frage zu beantworten, ob ACTH selbst effektiv ist die Nahrungsaufnahme zu beeinflussen oder ob die beobachteten Effekte erst nach Prozessieren von ACTH durch dabei entstehendes α -MSH verursacht werden. Hierfür wurden den Tieren zunächst Mikroinjektionseinheiten in den lateralen Ventrikel und PVN implantiert. Nach einwöchiger Erholungsphase wurde den Ratten das Futter für 24 Stunden entzogen und am nächsten Morgen i.c.v. ACTH oder phys. Kochsalzlg. appliziert. Um die Wirkung von α -MSH zu blockieren und so allein die Effekte von ACTH untersuchen zu können, wurde ein spezifischer α -MSH-AK in den PVN gegeben. Die Gabe von IgG diente als Kontrolle.

4.3.1 Einfluss von ACTH und α -MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei Tieren

Nahrungsaufnahme

Wurden alle Gruppen im Vergleich betrachtet, so war die kumulative Nahrungsaufnahme signifikant unterschiedlich (Abb. 25, $F_{3,20}=36,023$, $p<0,001$). Mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA konnte gezeigt werden, dass die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 24).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001
F	23,728	25,500	19,945	21,544	20,987	17,912	27,123	29,722	7,504

Tab. 24: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Nach einer 24-stündigen Hungerperiode verursachte die i.c.v. Applikation von ACTH und IgG in den PVN eine Verminderung der kumulativen Nahrungsaufnahme über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den phys. Kochsalzlg./IgG Tieren. Nach sechs Stunden betrug die Reduzierung der kumulativen Nahrungsaufnahme 56,5 % und nach 24 Stunden 15,7 %, der stärkste Effekt war nach der dritten Stunde (58,1 %) zu beobachten.

Die gleichzeitige Applikation von i.c.v. ACTH und α -MSH-AK in den PVN führte wie bei der phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK Gruppe ebenfalls zu einer Verringerung der kumulativen Nahrungsaufnahme über 24 Stunden. Die Reduzierung betrug nach sechs Stunden 36,5 % und nach 24 Stunden 12,7 %. Der stärkste Effekt bei der ACTH/ α -MSH-AK Gruppe war nach der ersten Stunde (54,2 %) zu beobachten.

Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen phys. Kochsalzlg./IgG und phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK bzw. ACTH/IgG und ACTH/ α -MSH-AK ermittelt werden.

In Abb. 25 ist die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Versuchsgruppen graphisch dargestellt.

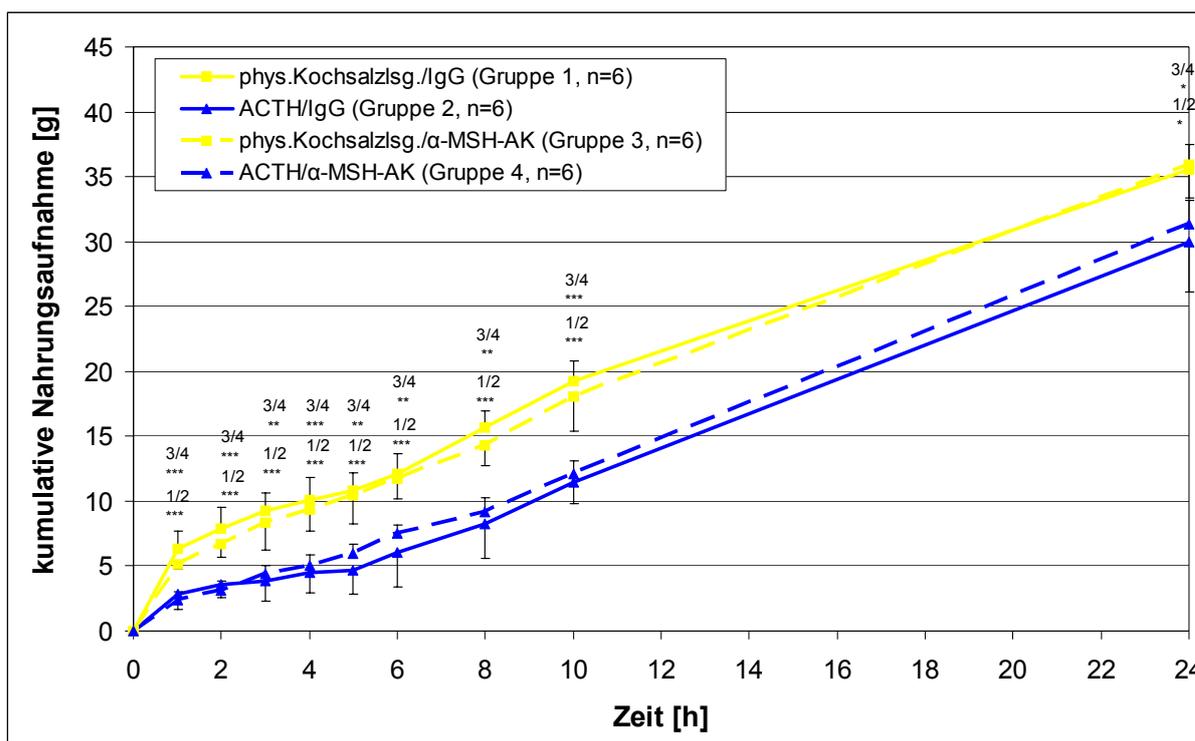


Abb. 25: Einfluss von i.c.v. ACTH und α -MSH-AK in den PVN auf die kumulative Nahrungsaufnahme bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 3/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Wasseraufnahme

Vergleicht man die kumulative Wasseraufnahme aller Gruppen miteinander, so stellt man einen signifikanten Effekt der Behandlung fest (Abb. 26, $F_{3,20}=17,946$, $p<0,001$). Die statistische Analyse (einfaktorielle ANOVA) ergab, dass die kumulative Wasseraufnahme zwischen den Gruppen zu allen Messzeitpunkten signifikant verschieden war (p - und F -Werte siehe Tab. 25).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	0,003	0,001	0,012	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
F	6,694	10,586	4,707	8,895	12,149	11,435	10,516	9,991	12,948

Tab. 25: Statistische Auswertung der kumulativen Wasseraufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

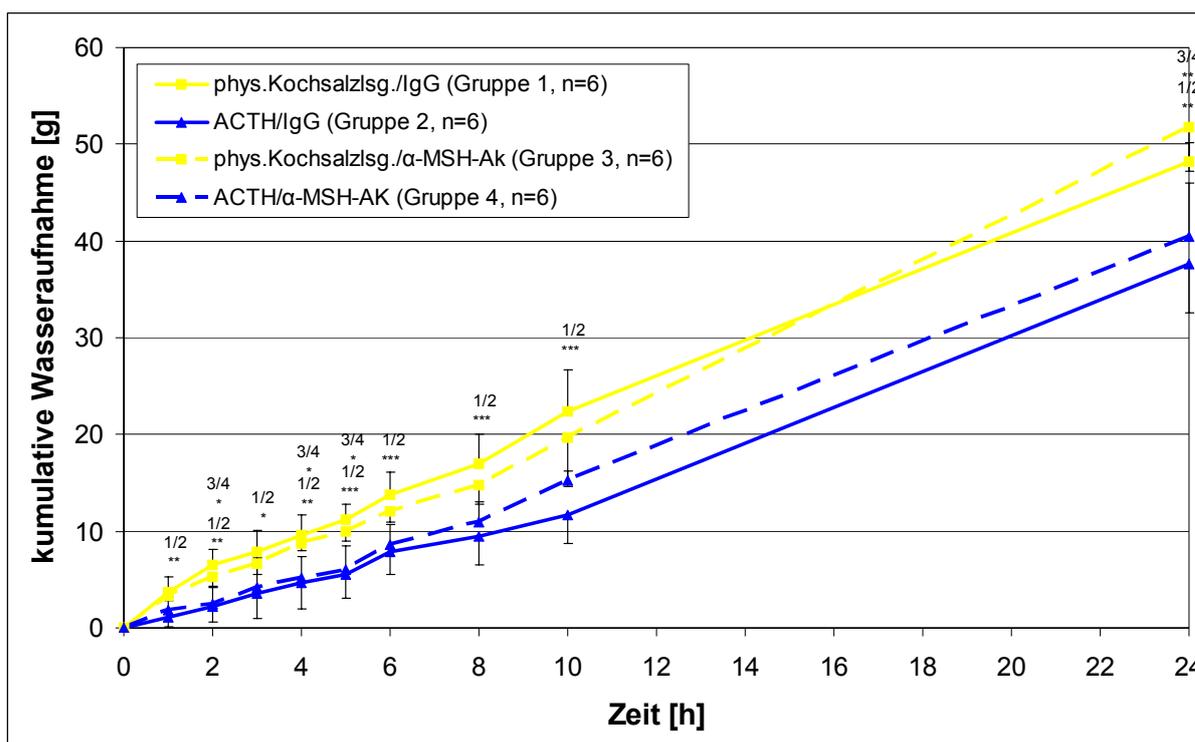


Abb. 26: Einfluss von i.c.v. ACTH und α -MSH-AK in den PVN auf die kumulative Wasseraufnahme bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 3/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Bei Tieren, die nach einer 24-stündigen Hungerperiode i.c.v. ACTH und IgG in den PVN appliziert bekamen, wurde eine Reduktion der kumulativen Wasseraufnahme über den

gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den phys. Kochsalzlg./IgG Tieren festgestellt. Die Erniedrigung der kumulativen Wasseraufnahme betrug nach sechs Stunden 42,8 % und nach 24 Stunden 21,8 %. Nach der ersten Stunde (71,2 %) war der stärkste Effekt zu beobachten.

Die Applikation von ACTH bei zusätzlicher Applikation von α -MSH-AK in den PVN führte ebenfalls zu einer Reduzierung der kumulativen Nahrungsaufnahme über 24 Stunden im Vergleich zur phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK Gruppe. Eine signifikante Erniedrigung konnte nach zwei, vier, fünf und 24 Stunden ermittelt werden. Der stärkste Effekt wurde nach der zweiten Stunde (51,1 %) beobachtet.

Die Versuchsgruppen phys. Kochsalzlg./IgG und phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK bzw. ACTH/IgG und ACTH/ α -MSH-AK unterschieden sich jeweils nicht von einander.

Die kumulative Wasseraufnahme der Versuchsgruppen ist graphisch in Abb. 26 dargestellt.

Entwicklung des Körpergewichtes

Nicht stündlich, sondern nur sechs und 24 Stunden nach der Applikation wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Im Gruppenvergleich zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Körpergewichtszunahme (Abb. 27, $F_{3,20}=18,076$, $p<0,001$). Die statistische Überprüfung der Daten mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA zeigte dabei, dass die Zunahme des Körpergewichtes sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 26).

	6 h	24 h
p	< 0,001	0,008
F	16,268	5,179

Tab. 26: Statistische Auswertung der Zunahme des Körpergewichtes zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die Zunahme des Körpergewichtes nach einer 24-stündigen Hungerperiode der Tiere war in der Gruppe ACTH/IgG im Vergleich zur phys. Kochsalzlg./IgG nach sechs Stunden signifikant niedriger (46,3 %). Nach 24 Stunden waren die Veränderungen des Körpergewichtes nicht signifikant verschieden.

Auch die i.c.v. Gabe von ACTH bei zusätzlicher Applikation von α -MSH-AK in den PVN verursachte eine signifikante Verminderung der Körpergewichtszunahme nach sechs Stunden (60,7 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK).

Die Versuchsgruppen phys. Kochsalzlsg./IgG und phys. Kochsalzlsg./ α -MSH-AK bzw. ACTH/IgG und ACTH/ α -MSH-AK unterschieden sich jeweils nicht.

Die Abb. 27 zeigt die Entwicklung der Körpergewichtszunahme nach den verschiedenen Applikationen.

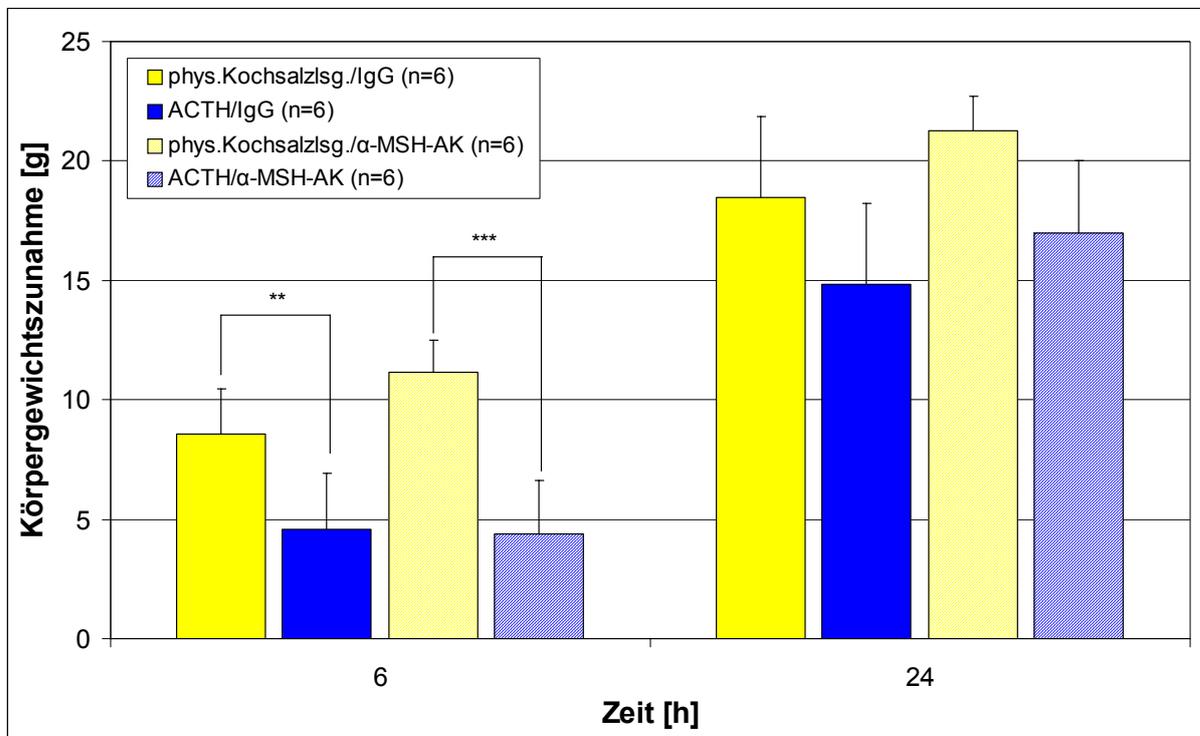


Abb. 27: Einfluss von i.c.v. ACTH und α -MSH-AK in den PVN auf die Zunahme des Körpergewichtes bei Tieren nach 24 h Fasten. Mittelwerte \pm SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

4.4 Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK bei satten und physiologisch hungrigen Tieren

Die physiologische Relevanz der endogenen Peptide ACTH und α -MSH wurde in dieser Studie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern bei satten und physiologisch hungrigen Tieren untersucht.

Die Erzeugung von satten Tieren zum Zeitpunkt der Substanzapplikation um 19 Uhr erfolgte durch den Einsatz eines speziellen Fütterungsschemas, dem die Ratten zuvor unterzogen wurden. Die Tiere bekamen zunächst für 24 Stunden die Nahrung entzogen. Am Morgen des folgenden Tages wurde ihnen dann Futter ad-libitum zur Verfügung gestellt. Da die Tiere nach dem 24-stündigen Fasten hungrig waren, begannen sie mit der Nahrungsaufnahme, sobald Futter bereitgestellt wurde – sie fraßen also während des Tages. Um für die hier dargestellten Versuche physiologisch hungrige Tiere, jedoch nicht nahrungsdeprivierte zur Verfügung zu haben, wurden die Ratten während des gesamten Experimentes ad-libitum

gefüttert. Da die Tiere entsprechend ihrem Aktivitätszyklus fast ausschließlich nachts Nahrung zu sich nahmen, waren sie zum Applikationszeitpunkt um 19 Uhr hungrig.

Durch die Verwendung der beiden oben genannten Nahrungsregimes konnten Tiere innerhalb des physiologischen Bereiches – von hungrig bis satt – untersucht werden. Unphysiologische Manipulationen, wie z.B. langes Fasten, um Hunger über das normale Maß hinaus zu erzeugen, konnten so vermieden werden. Sowohl an den satten als auch den physiologisch hungrigen Tieren wurde, wie in Material und Methoden (siehe Abschnitt 3.5) beschrieben, am Abend um 19 Uhr die zentralnervöse Applikation durchgeführt und mit der Beobachtung begonnen. Die gegen ACTH bzw. α -MSH gerichteten Antikörper wurden in den PVN appliziert; zusätzlich erhielt jedes Tier phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel, um eine Vergleichbarkeit mit den anderen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zu gewährleisten.

4.4.1 Einfluss des ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei satten und physiologisch hungrigen Tieren

a) Nahrungsaufnahme bei satten Tieren

Der Vergleich der kumulativen Nahrungsaufnahme über alle Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied (Abb. 28, $F_{3,32}=12,247$, $p<0,001$). Dass die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen zu jedem Messzeitpunkt unterschiedlich war, wurde durch statistische Analyse (einfaktorielle ANOVA) nachgewiesen (p- und F-Werte siehe Tab. 27).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	0,011	0,044	0,033	0,028	0,007	0,012	0,002	< 0,001	0,002
F	4,407	3,027	3,289	3,451	4,862	4,314	6,004	11,262	6,046

Tab. 27: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die zentrale Applikation von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. die Kombination beider Antikörper in den PVN führte zu einer Erhöhung der kumulativen Nahrungsaufnahme über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zur IgG Gruppe (p- und F-Werte siehe Tab. 28).

PVN Applikation *	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
ACTH-AK	0,017	n.s.	0,042	n.s.	0,011	0,030	0,007	< 0,001	0,002
α -MSH-AK	n.s.	n.s.	n.s.	0,030	0,025	0,018	0,004	< 0,001	0,020
ACTH-AK + α -MSH-AK	0,036	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,011	0,031

Tab. 28: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Test, p-Werte).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

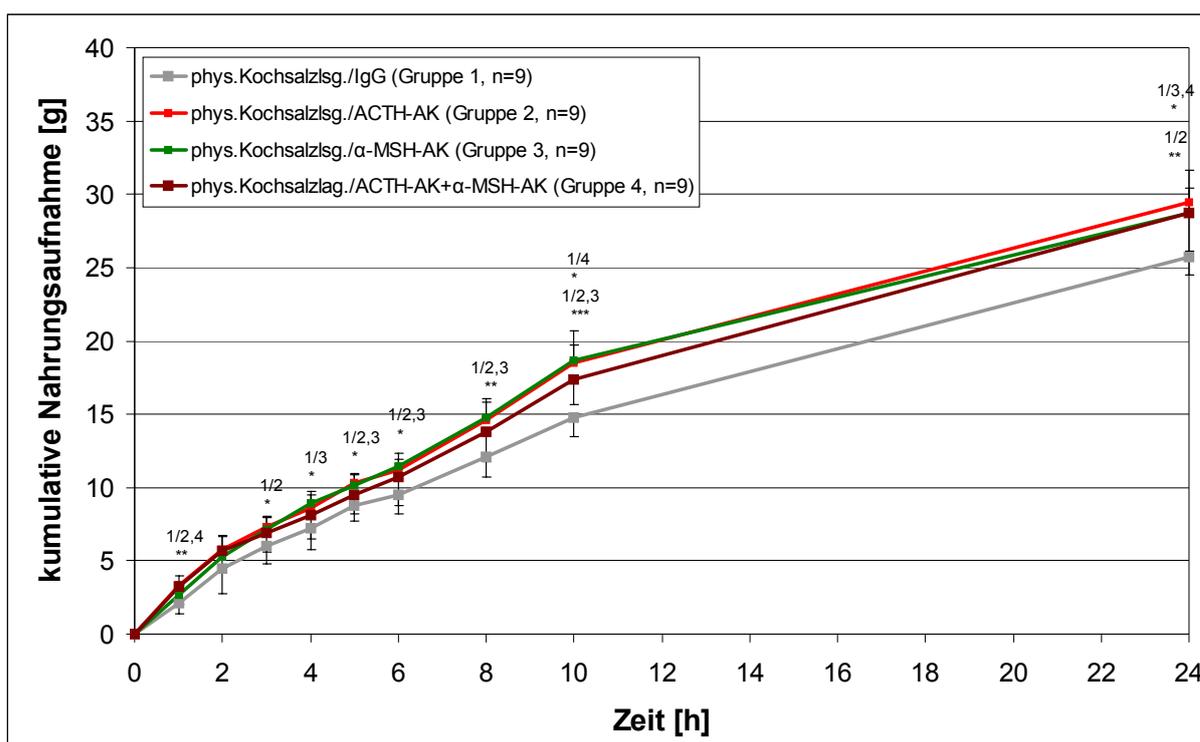


Abb. 28: Effekt des ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Nahrungsaufnahme bei sattten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 1/3, 1/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

Die kumulative Nahrungsaufnahme der sattten Versuchstiere wurde durch die ACTH-AK Applikation ($n=9$) in den PVN im Vergleich zur IgG Applikation ($n=9$) nach der ersten, dritten und von der fünften Stunde bis zum Ende des Experimentes signifikant erhöht. Die Applikation von α -MSH-AK ($n=9$) verursachte ebenfalls eine signifikante Zunahme der kumulativen Nahrungsaufnahme von der vierten Stunde bis zum Ende des Versuches im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wie in Abb. 28 graphisch dargestellt, haben beide AK vergleichbaren Einfluss auf die Nahrungsaufnahme.

Die kombinierte Applikation beider AK (n=9) führte im Vergleich zur IgG Applikation ebenfalls zu einer Steigerung der kumulativen Nahrungsaufnahme, wobei ein signifikanter Unterschied nach der ersten, zehnten und 24. Stunde festgestellt wurde.

Beim Vergleich der drei unterschiedlichen Antikörperapplikationsvarianten untereinander wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

b) Nahrungsaufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren

Im Gegensatz zu den sattten Tieren (Abb. 28) zeigten die physiologisch hungrigen Ratten bei der kumulativen Nahrungsaufnahme keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich über alle Versuchsgruppen (Abb. 29, $F_{3,33}=0,661$, $p=0,582$).

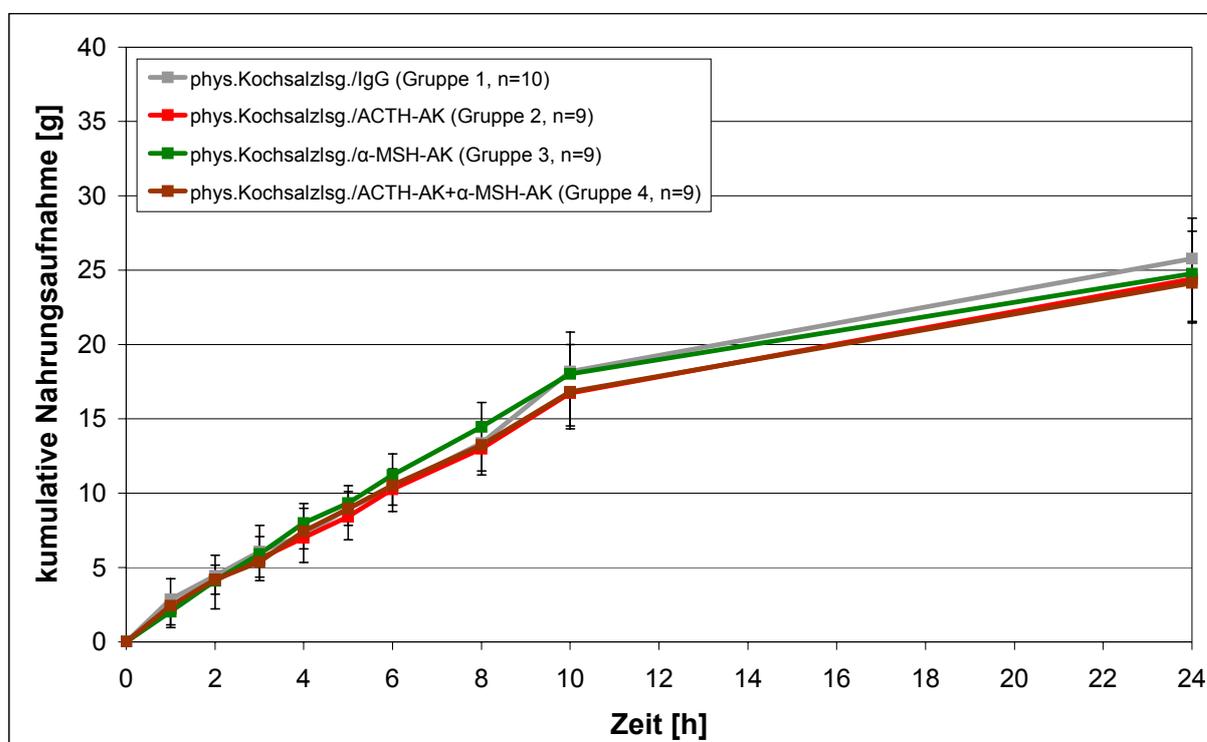


Abb. 29: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Nahrungsaufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

a) Wasseraufnahme bei sattten Tieren

Ebenso die Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zeigte auch die Analyse der kumulativen Wasseraufnahme beim Vergleich über alle Gruppen einen signifikanten Unterschied ($F_{3,32}=8,584$, $p<0,001$). Die statistische Analyse mittels einfaktorieller ANOVA zeigte, dass die kumulative Wasseraufnahme der einzelnen Gruppen ab der dritten Stunde bis zum Ende des Experimentes signifikant verschieden war (p- und F-Werte siehe Tab. 29).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
p	n.s.	n.s.	0,045	0,003	0,001	0,006	0,008	0,003	0,002
F	2,692	2,658	2,990	5,753	7,003	4,979	4,660	5,692	6,032

Tab. 29: Statistische Auswertung der kumulativen Wasseraufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die zentrale Applikation von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. die Gabe einer Kombination beider Antikörper in den PVN führte zu einer Steigerung der kumulativen Wasseraufnahme über den gesamten 24-stündigen Beobachtungszeitraum (p- und F-Werte siehe Tab. 13).

PVN Applikation *	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h	24 h
ACTH-AK	—	—	0,043	0,003	0,001	0,007	0,010	0,004	0,002
α -MSH-AK	—	—	n.s.	n.s.	0,028	0,029	0,038	0,023	0,020
ACTH-AK + α -MSH-AK	—	—	n.s.						

Tab. 30: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Test, p-Werte).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

Im Vergleich zur IgG Gruppe (n=9) steigerte die ACTH-AK Applikation (n=9) die kumulative Wasseraufnahme signifikant von der dritten Stunde bis zum Ende des Experimentes bei den satteten Tieren. Zu einer signifikanten Erhöhung ab der fünften Stunde führte auch die Applikation von α -MSH-AK (n=9) in den PVN. Die Effekte der beiden AK auf die kumulative Wasseraufnahme waren sehr ähnlich.

Die gemeinsame Applikation von ACTH-AK und α -MSH-AK (n=9) verursachte wie die einzelne AK Applikation eine Steigerung der kumulativen Wasseraufnahme, diese unterschied sich jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrollgruppe.

Die drei unterschiedlichen Antikörperapplikationsvarianten unterschieden sich nicht signifikant von einander.

Die Ergebnisse aus diesem Experiment sind in Abb. 30 graphisch dargestellt.

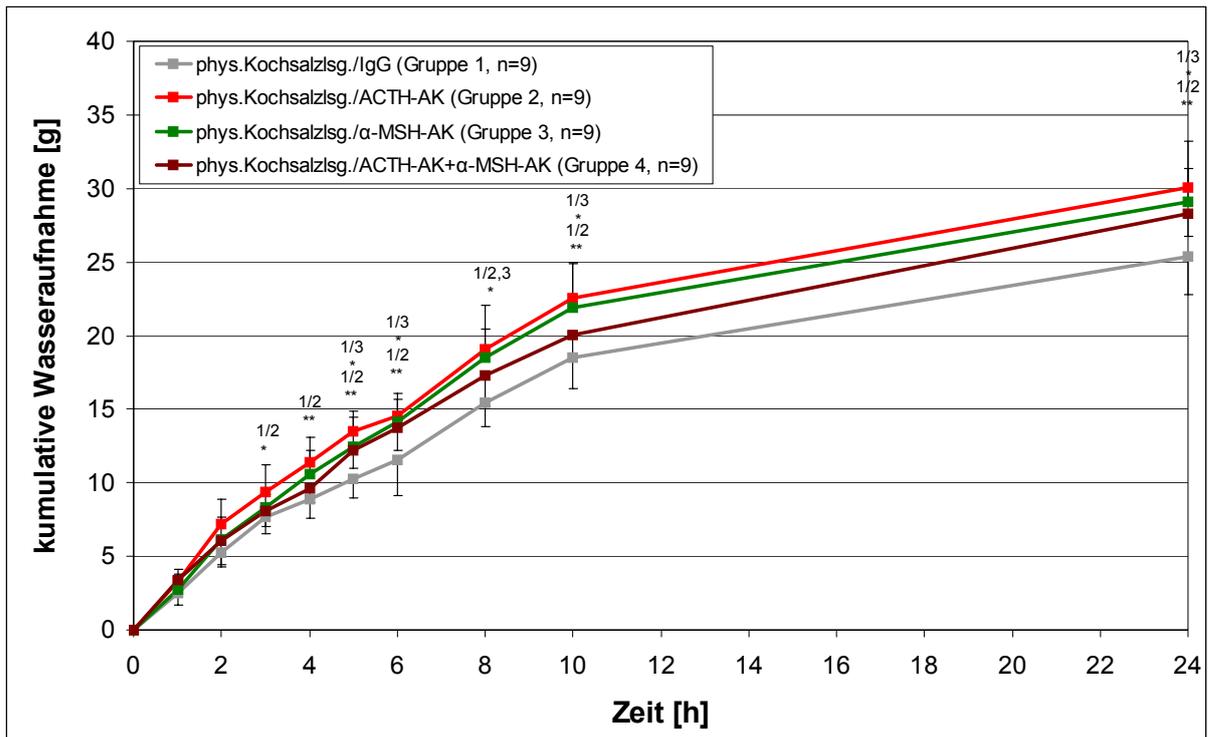


Abb. 30: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Wasseraufnahme bei sattten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 1/3 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) Wasseraufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren

Anders als bei den sattten Tieren (Abb. 30) ergab sich bei den physiologisch hungrigen Tieren kein statistisch signifikanter Unterschied bei der kumulativen Wasseraufnahme im Gruppenvergleich (Abb. 31, $F_{3,33}=0,787$, $p=0,510$).

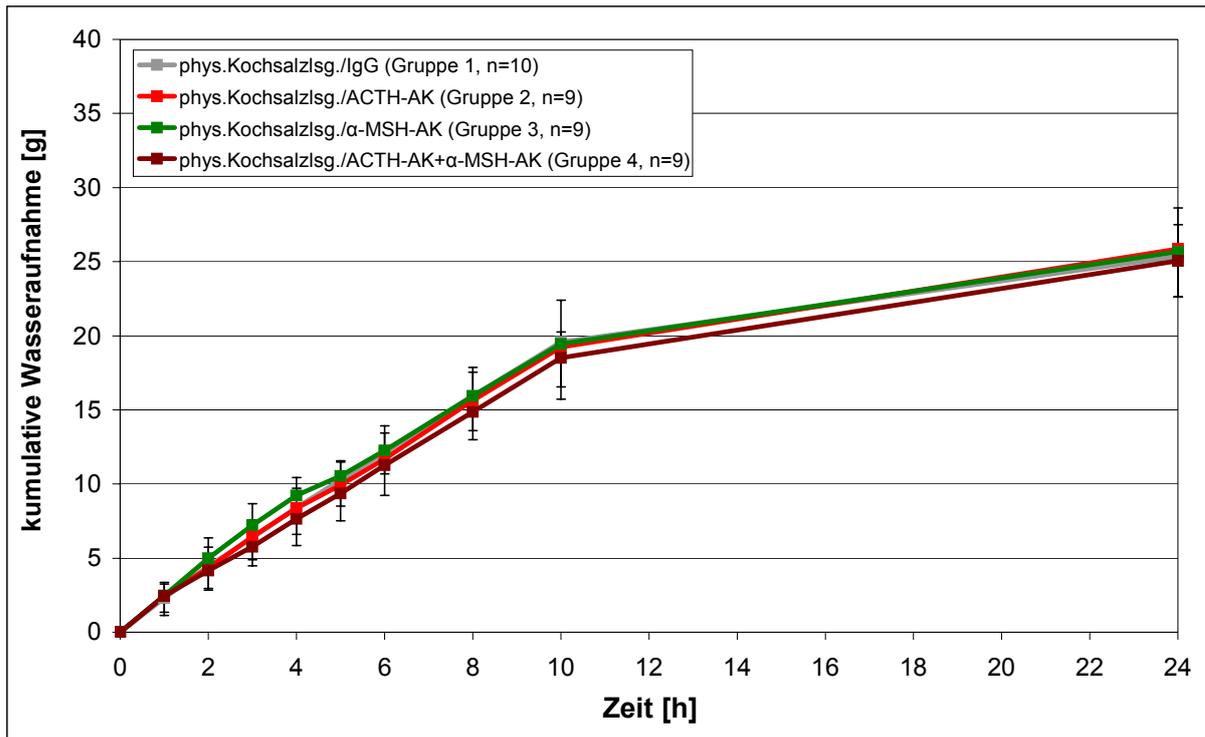


Abb. 31: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Wasseraufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

a) Entwicklung des Körpergewichtes bei sattten Tieren

Neben der Nahrungs- und Wasseraufnahme wurde das Körpergewicht der Tiere sechs und 24 Stunden nach den zentralnervösen Applikationen bestimmt. Die Körpergewichtszunahme war signifikant verschieden bei einem Vergleich über alle Gruppen (Abb. 32, $F_{3,32}=3,357$, $p<0,031$). Die statistische Analyse (einfaktorielle ANOVA) ergab, dass dies nur nach 24 Stunden signifikant war (p - und F -Werte siehe Tab. 31).

	6 h	24 h
p	n.s.	0,008
F	0,975	4,664

Tab. 31: Statistische Auswertung der Zunahme des Körpergewichtes zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die PVN-Applikation von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. der Kombination beider Antikörper erhöhte die Körpergewichtszunahme bei den sattten Versuchstieren signifikant nach 24 Stunden im Vergleich zu den mit IgG behandelten Kontrolltieren (p - und F -Werte siehe Tab.

32). Die drei Antikörperapplikationsvarianten unterschieden sich hierbei nicht signifikant voneinander (Abb. 32).

PVN Applikation *	6 h	24 h
ACTH-AK	—	0,037
α -MSH-AK	—	0,026
ACTH-AK + α -MSH-AK	—	0,021

Tab. 32: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Tests, p-Wert).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

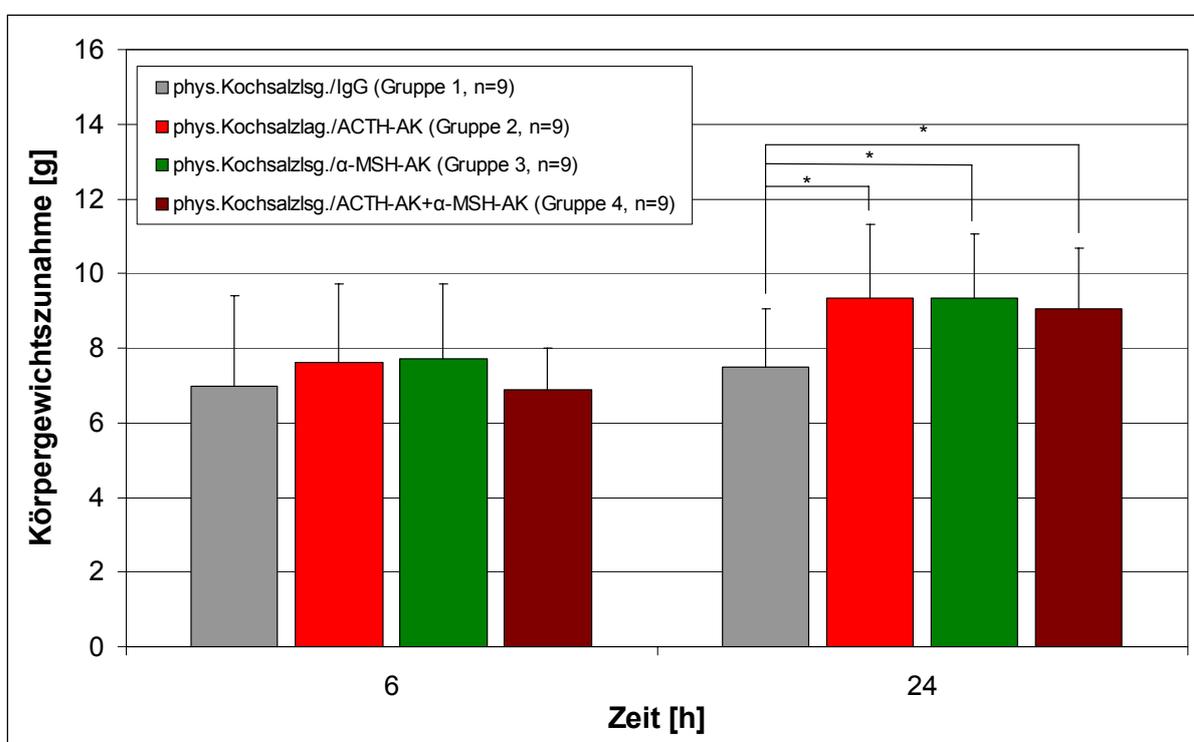


Abb. 32: : Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Zunahme des Körpergewichtes bei satten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$ zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) Entwicklung des Körpergewichtes bei physiologisch hungrigen Tieren

Genau wie bei den Versuchsgruppen der Experimente mit satten Tieren wurde das Körpergewicht der physiologisch hungrigen Ratten sechs und 24 Stunden nach der Antikörperapplikation bestimmt. Jedoch wurde bei einem Vergleich über alle Gruppen im Gegensatz zu den satten Tieren (Abb. 32) kein signifikanter Unterschied bei der Körpergewichtszunahme festgestellt (Abb. 33, $F_{3,33}=0,263$, $p=0,852$).

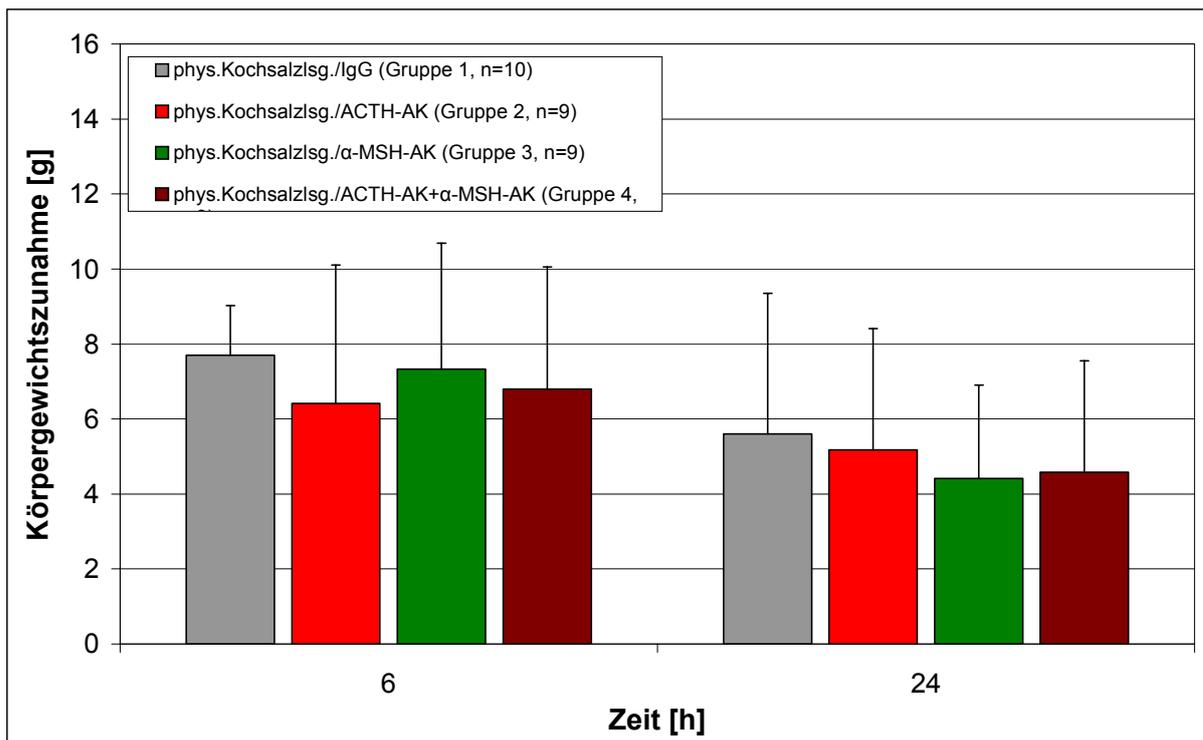


Abb. 33: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Zunahme des Körpergewichtes bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

4.5 Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression bei satt und physiologisch hungrigen Tieren

Im vorherigen Experiment (4.4) wurde wegen der mehrfachen konsekutiven Applikation von Antikörpern keine Untersuchung zur Peptidexpression durchgeführt, da dies ohnehin nur für die jeweils letzte Applikation möglich gewesen wäre und eine Tötung 24 Stunden nach der Applikation zu spät für die Beobachtung von Veränderungen der mRNA-Expression ist. Daher wurden weitere Versuche nach dem bereits unter Punkt 3.5 der in Material und Methoden beschriebenen Schemata durchgeführt. Wiederum wurden satte und physiologisch hungrige Tiere erzeugt, die um 19 Uhr einmalig eine Applikation in den lateralen Ventrikel und den PVN erhielten und zehn Stunden nach Substanzgabe getötet wurden.

4.5.1 Einfluss des ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei satt und physiologisch hungrigen Tieren

a) Nahrungsaufnahme bei satt Tieren

Die kumulative Nahrungsaufnahme ist signifikant unterschiedlich in einem Vergleich über alle Gruppen (Abb. 34, $F_{3,15}=11,191$, $p<0,001$). Die statistische Analyse mittels einfaktorieller

ANOVA ergab, dass die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen ab der zweiten Stunde bis zum Ende des Experimentes signifikant verschieden war (p- und F-Werte siehe Tab. 33).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h
p	n.s.	0,002	0,007	0,004	0,018	0,024	0,004	0,021
F	2,566	8,155	5,870	6,860	4,591	4,214	6,802	4,408

Tab. 33: Statistische Auswertung der kumulativen Nahrungsaufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die zentralen Applikationen von ACTH-AK, α -MSH-AK in den PVN und die kombinierte Gabe von beiden Antikörpern führten zu Erhöhungen der kumulativen Nahrungsaufnahme über den zehnstündigen Beobachtungszeitraum (p- und F-Werte siehe Tab. 34).

PVN Applikation *	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h
ACTH-AK	—	0,007	0,015	0,031	n.s.	n.s.	0,048	n.s.
α -MSH-AK	—	0,002	0,011	0,004	0,018	0,040	0,010	0,040
ACTH-AK + α -MSH-AK	—	n.s.	n.s.	0,023	n.s.	0,042	0,006	0,032

Tab. 34: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Tests, p-Wert).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

Im Vergleich zur IgG Gruppe erhöhte die ACTH-AK Applikation die kumulative Nahrungsaufnahme signifikant nach der zweiten bis vierten und nach der achten Stunde. Die Applikation von α -MSH-AK verursachte ebenfalls eine signifikante Steigerung der kumulativen Nahrungsaufnahme von der zweiten Stunde bis zum Ende des Versuches. Wie in Abb. 34 graphisch dargestellt, besitzen die beiden AK vergleichbare Effekte auf die kumulative Nahrungsaufnahme.

Wie die Einzelapplikation verursachte die Gabe beider Antikörper bei den satten Tieren eine Erhöhung der kumulativen Nahrungsaufnahme, wobei im Vergleich zur IgG Gruppe ein signifikanter Unterschied zur vierten und sechsten bis achten Stunde beobachtet wurde.

Beim Vergleich der drei Antikörperapplikationsvarianten untereinander wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

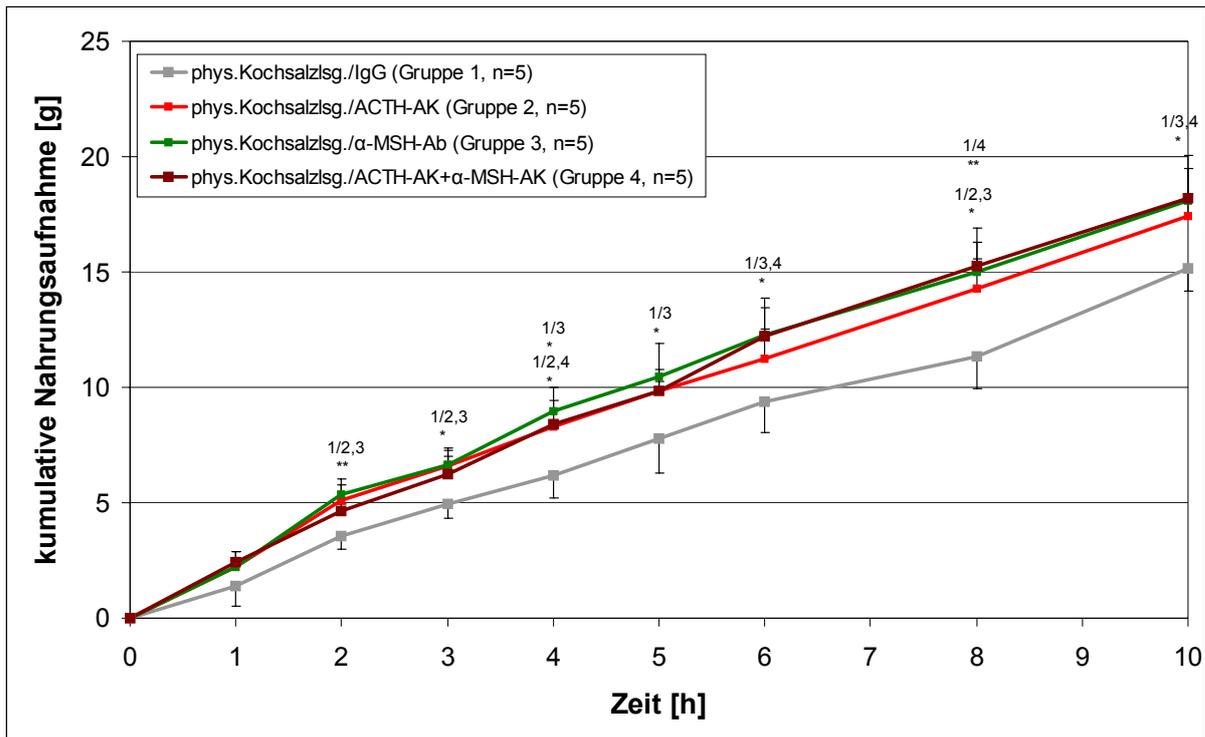


Abb. 34: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Nahrungsaufnahme bei sattten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 1/3, 1/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) Nahrungsaufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren

Im Gegensatz zu den sattten Tieren ergab die statistische Analyse der kumulativen Nahrungsaufnahme bei den physiologisch hungrigen Ratten im Vergleich über alle Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 35, $F_{3,15}=0,488$, $p=0,695$).

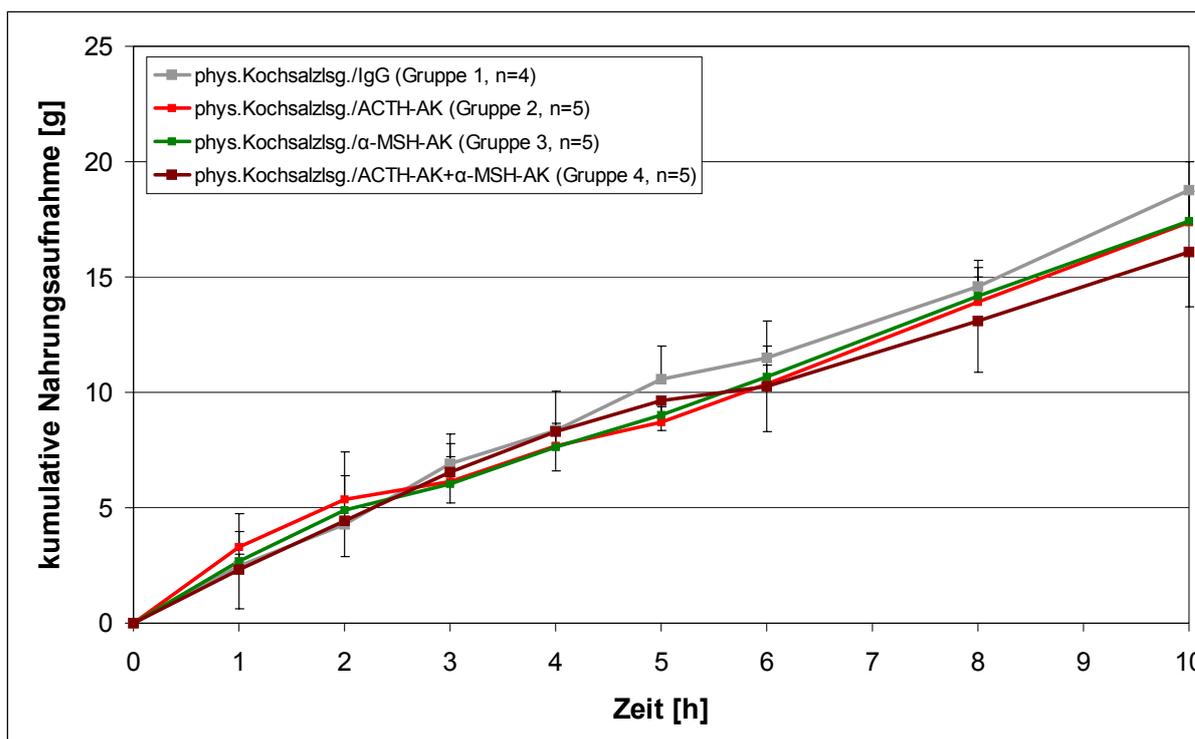


Abb. 35: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Nahrungsaufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

a) Wasseraufnahme bei sattten Tieren

Beim gemeinsamen Vergleich aller Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der kumulativen Wasseraufnahme (Abb. 36, $F_{3,15}=15,893$, $p<0,001$). Mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA konnte nachgewiesen werden, dass die kumulative Wasseraufnahme der einzelnen Gruppen nach der zweiten Stunde und von der fünften Stunde bis zum Ende des Experimentes (10 Stunden) unterschiedlich war (p- und F-Werte siehe Tab. 35).

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h
p	n.s.	0,039	n.s.	n.s.	0,001	< 0,001	0,004	0,001
F	0,223	3,586	2,282	2,701	8,699	15,379	7,040	9,418

Tab. 35: Statistische Auswertung der kumulativen Wasseraufnahme zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Alle drei Applikationsvarianten (ACTH-AK, α -MSH-AK, ACTH-AK + α -MSH-AK) führten im Vergleich zur Kontrollgruppe (p- und F-Werte siehe Tab. 36) zu einer Steigerung der kumulativen Wasseraufnahme über den Beobachtungszeitraum von zehn Stunden.

PVN Applikation *	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	10 h
ACTH-AK	—	0,041	—	—	0,005	< 0,001	0,031	0,002
α -MSH-AK	—	n.s.	—	—	0,004	< 0,001	0,004	0,004
ACTH-AK + α -MSH-AK	—	n.s.	—	—	0,004	< 0,001	0,011	0,004

Tab. 36: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Tests, p-Wert).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

Nach zwei Stunden und von der fünften Stunde bis zum Ende des Experimentes erhöhte die ACTH-AK Applikation die kumulative Wasseraufnahme signifikant bei den sattten Tieren. Die Applikation von α -MSH-AK bzw. beider Antikörper zusammen verursachte eine signifikante Zunahme von der fünften Stunde bis zum Ende des Versuches. Wie in Abb. 36 dargestellt ist, besitzen der ACTH-AK und α -MSH-AK einen vergleichbaren Einfluss auf die kumulative Wasseraufnahme.

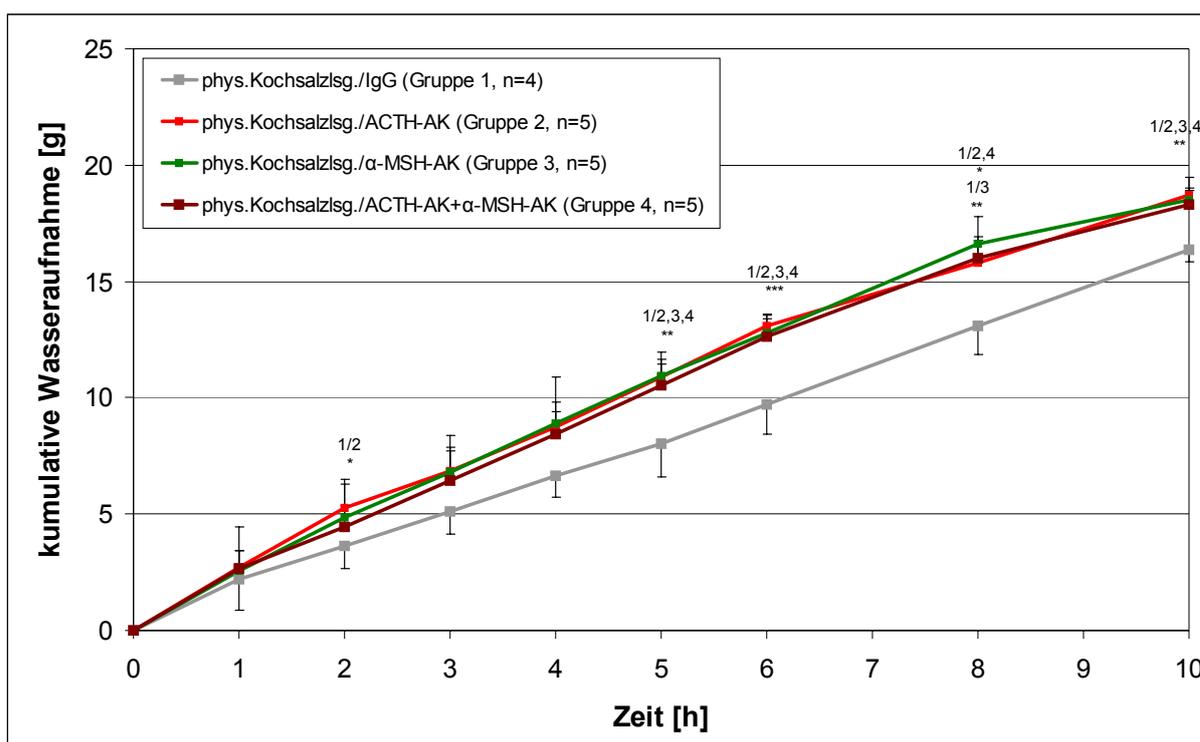


Abb. 36: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die kumulative Wasseraufnahme bei sattten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 signifikante Unterschiede in einfaktorieller ANOVA. 1/2, 1/3, 1/4 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) Wasseraufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren

Anders als bei den satten Tieren (Abb. 36) zeigte die kumulative Wasseraufnahme im Vergleich über die Gruppen bei den physiologisch hungrigen Tieren, wie bereits bei der kumulativen Nahrungsaufnahme beobachtet, keine signifikanten Unterschiede (Abb. 37, $F_{3,15}=1,022$, $p=0,411$).

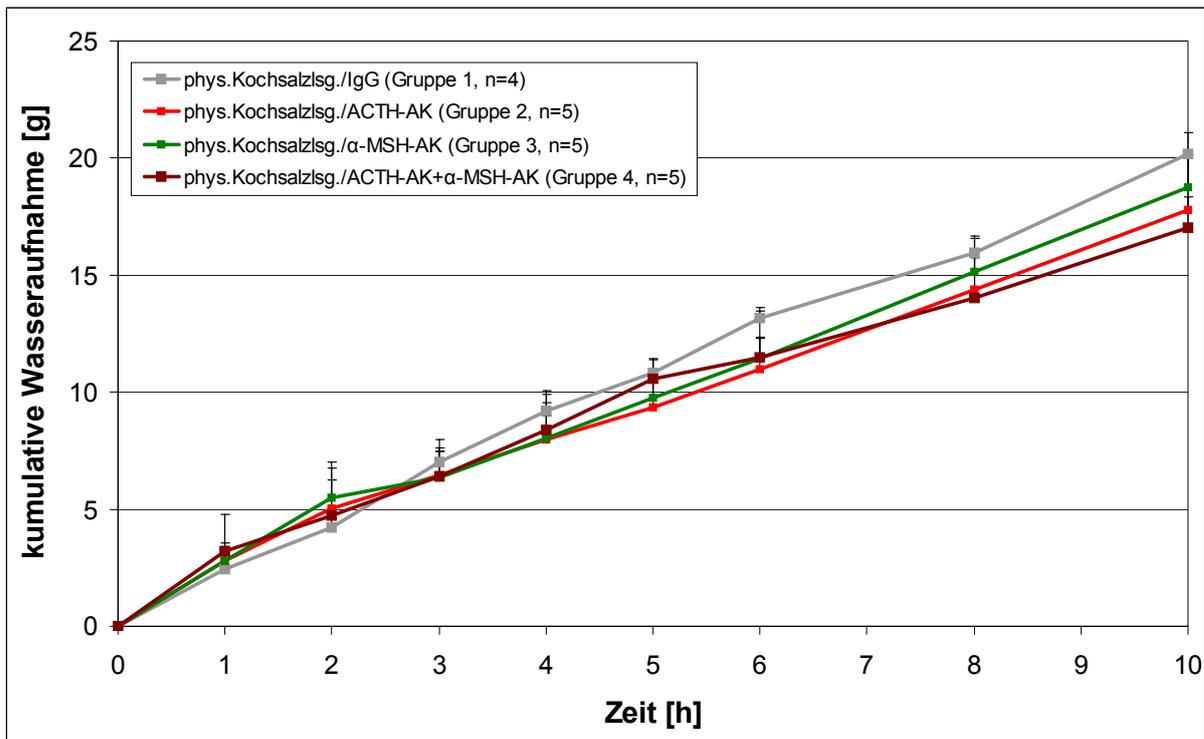


Abb. 37: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Wasseraufnahme bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

a) Entwicklung des Körpergewichtes bei satten Tieren

Die Zunahme des Körpergewichtes der Versuchstiere wurde sechs und 10 Stunden nach den Applikationen in Ventrikel und PVN bestimmt. Bei einer statistischen Untersuchung über alle Gruppen zeigte sich ein signifikanter Effekt der Behandlung auf die Körpergewichtszunahme (Abb. 38, $F_{3,15}=5,848$, $p<0,007$). Die statistische Analyse mittels einfaktorieller ANOVA zeigte, dass die Körpergewichtszunahme der einzelnen Gruppen nur nach zehn Stunden signifikant verschieden war (p- und F-Werte siehe Tab. 37).

	6 h	10 h
p	n.s.	0,007
F	1,240	5,848

Tab. 37: Statistische Auswertung der Zunahme des Körpergewichtes zu den verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (Vergleich über alle Gruppen, einfaktorielle ANOVA).

Die zentrale Applikation von ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. der Kombination von beiden Antikörpern in den PVN führte zu einer signifikanten Erhöhung der Körpergewichtszunahme nach zehn Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe (p- und F-Werte siehe Tab. 38).

PVN Applikation *	6 h	10 h
ACTH-AK	—	0,022
α -MSH-AK	—	0,023
ACTH-AK + α -MSH-AK	—	0,014

Tab. 38: Statistischer Vergleich der AK-Applikationen mit der Kontrollgruppe (Bonferroni t-Tests, p-Wert).

* alle Versuchstiere erhielten zusätzlich phys. Kochsalzlsg. in den lateralen Ventrikel (2,5 μ l)

Die Messung der Zunahme des Körpergewichtes nach zehn Stunden zeigte eine signifikante Veränderung nach Applikation aller drei Applikationsvarianten (ACTH-AK, α -MSH-AK, Kombination aus beiden Antikörpern). Beim Vergleich der Varianten untereinander wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

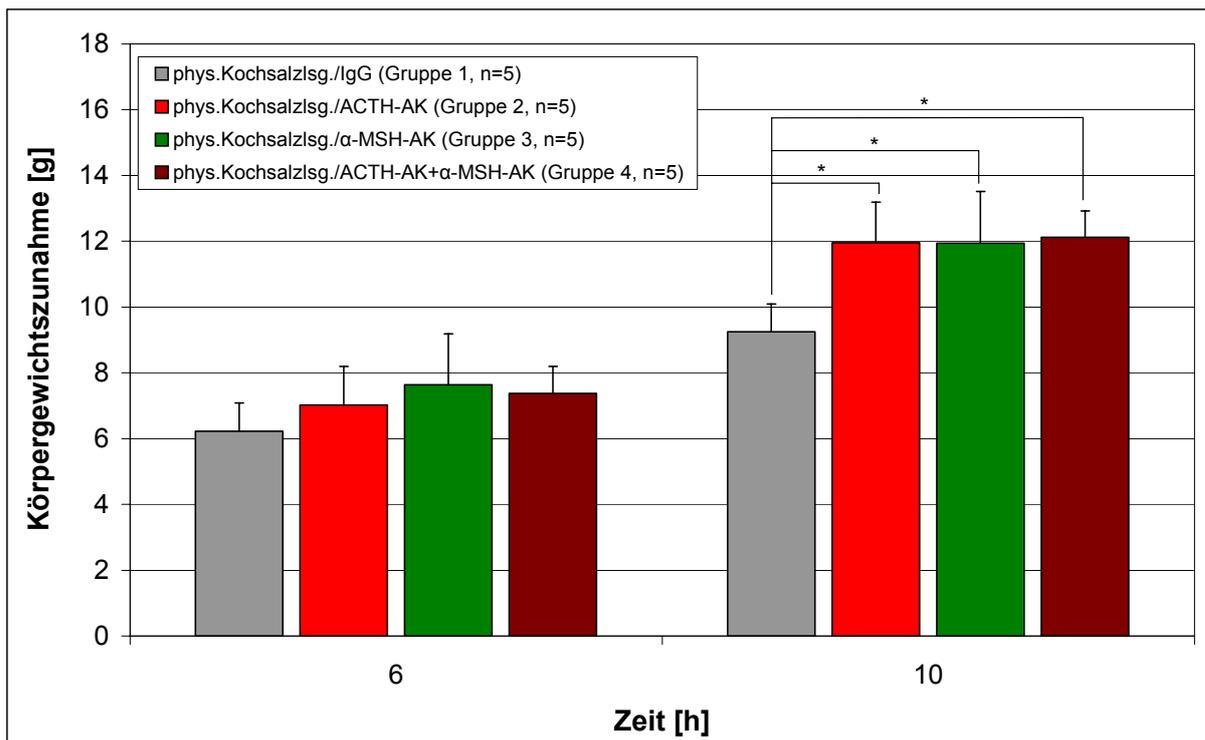


Abb. 38: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Zunahme des Körpergewichtes bei satten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$ signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) Entwicklung des Körpergewichtes bei physiologisch hungrigen Tieren

Außer der Nahrungs- und Wasseraufnahme wurde das Körpergewicht der Tiere sechs und zehn Stunden nach der Substanzapplikation bestimmt. Die Körpergewichtszunahme war im Gruppenvergleich nicht signifikant verschieden (Abb. 39, $F_{3,15}=0,618$, $p=0,614$).

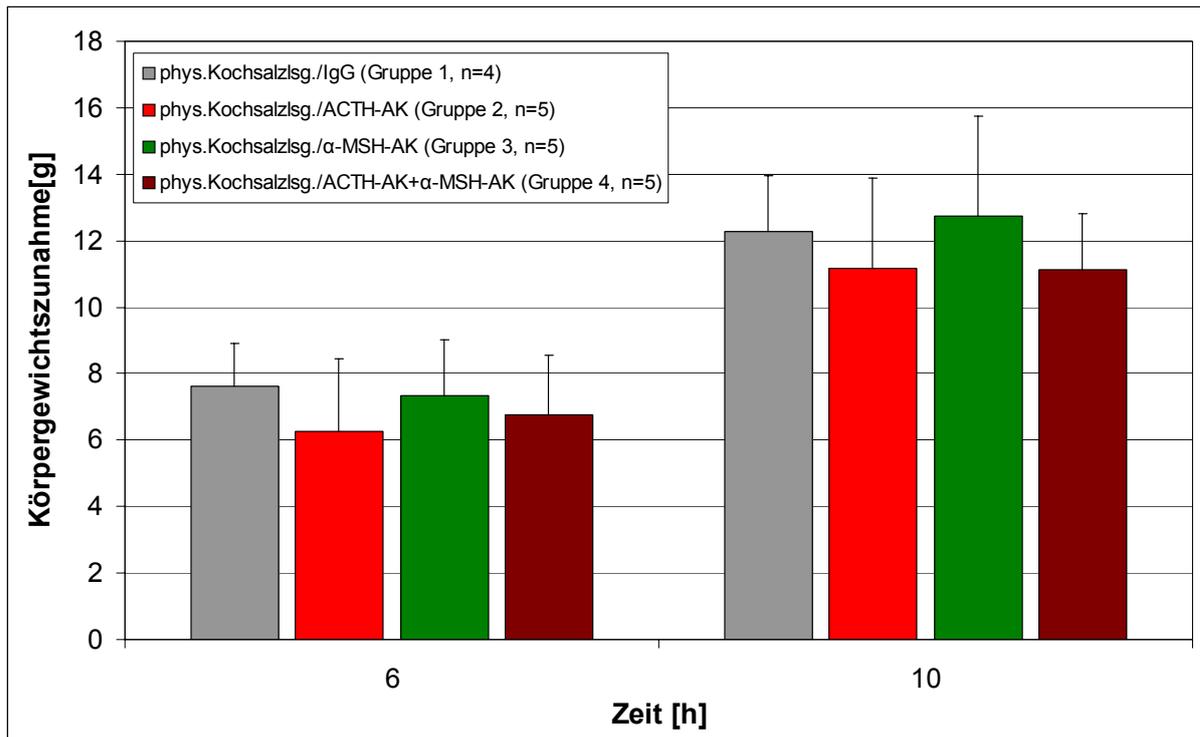


Abb. 39: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die Zunahme des Körpergewichtes bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD.

4.5.2 Einfluss von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression bei satten und physiologisch hungrigen Tieren

Die Daten von Xu et al. haben gezeigt, dass es eine Interaktion zwischen dem MC-System und BDNF gibt (51). Aus den Ergebnissen unseres ersten Experimentes (siehe Abschnitt 4.1) ist bekannt, dass die Applikation von exogenem ACTH sowohl die BDNF als auch die MC4-R mRNA Expression beeinflusst. In diesem Experiment sollte jedoch der Einfluss des endogenen ACTH bzw. α -MSH auf die Neuropeptidexpression in hypothalamischen Kernstrukturen untersucht werden. Wie im Abschnitt 4.1.3 bereits beschrieben, wurden speziell hergestellte Oligonucleotidsonden eingesetzt, um mittels ISH die mRNA Expression von MC4-R und BDNF im VMN semiquantitativ zu bestimmen.

a) MC4-R mRNA-Expression bei satten Tieren

Abb. 40 und Abb. 41 zeigen die Ergebnisse einer ISH zur semi-quantitativen Bestimmung der MC4-R mRNA-Expression im VMN bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten satten Tieren. Für die Analyse der MC4-R mRNA-Expression wurde die zweite Auflage ausgewertet, bei der die Expositionszeit 35 Tage betrug.

in Abb. 40 ist für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

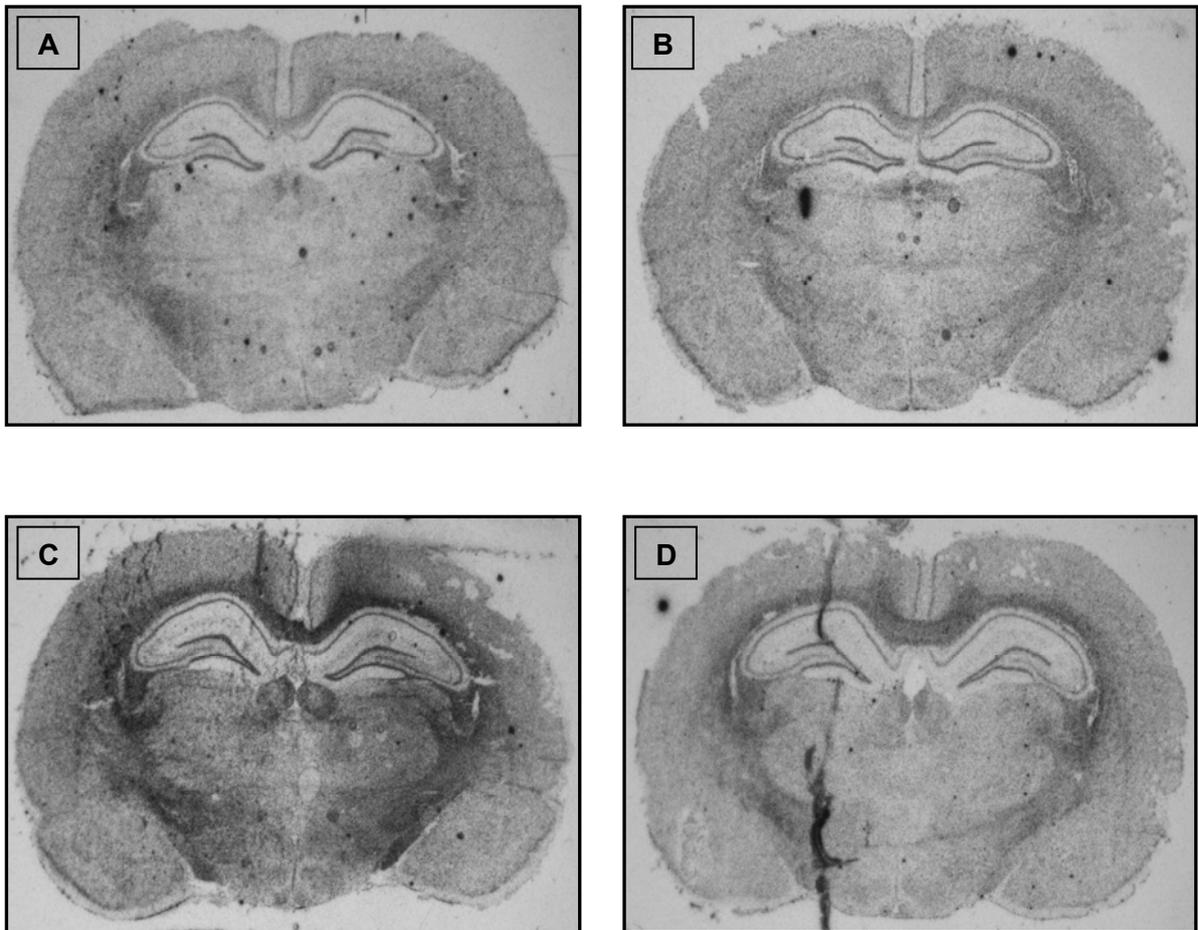


Abb. 40: MC4-R mRNA-Expression im VMN in 14 μ m-Frontalschnitten der Gehirne von sattten Tieren. (A) phys. Kochsalzlg./IgG, (B) phys. Kochsalzlg./ACTH-AK, (C) phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK, (D) phys. Kochsalzlg./ACTH-AK + α -MSH-AK. Gezeigt wird – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten Ratten.

In Abb. 41 sind die Grauwerte der MC4-R mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Beim Vergleich aller Gruppen untereinander zeigte sich, dass die MC4-R mRNA-Expression signifikant unterschiedlich war ($F_{3,19}=3,582$, $p=0,033$).

Die zentrale Applikation von ACTH-AK (n=4), α -MSH-AK (n=5) und der Kombination aus beiden AK (n=5) führte zu einer signifikanten Erhöhung der MC4-R mRNA-Expression im Vergleich zu den mit IgG behandelten Tieren (n=5).

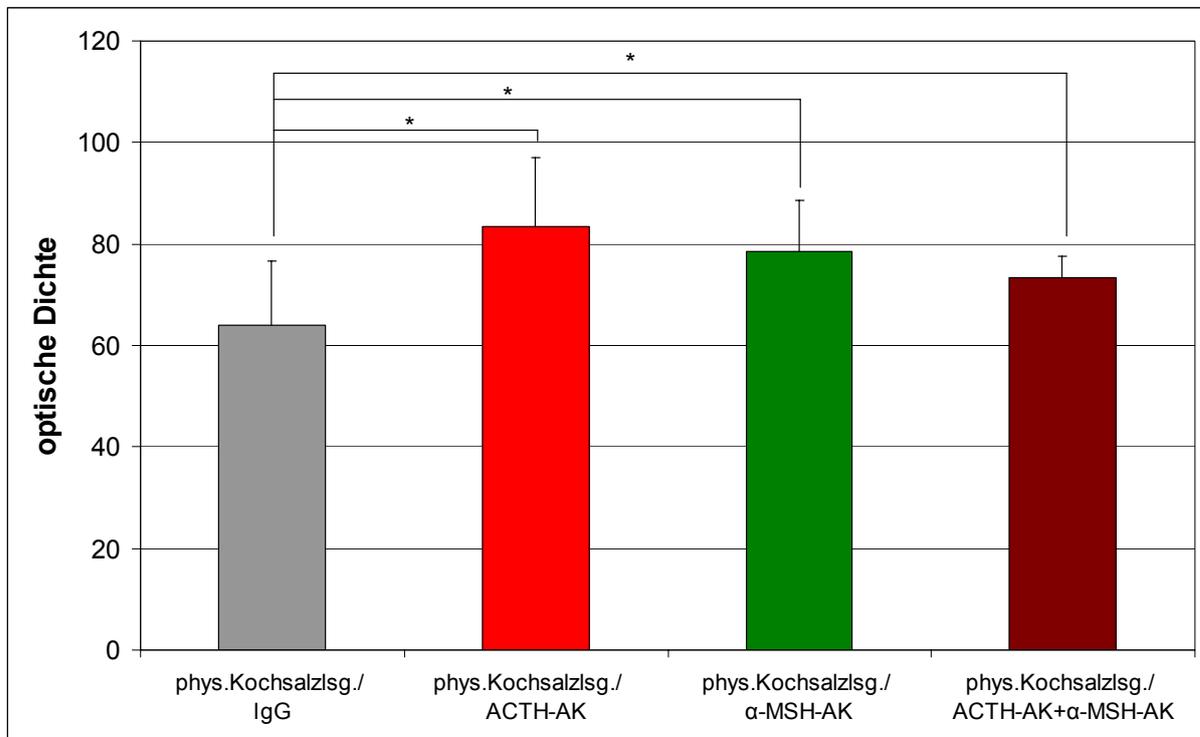


Abb. 41: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die MC4-R mRNA-Expression im VMN bei satteten Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=4-5). *p<0,05 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) MC4-R mRNA-Expression bei physiologisch hungrigen Tieren

Abb. 42 und Abb. 43 zeigen die Ergebnisse einer ISH zur semi-quantitativen Bestimmung der MC4-R mRNA-Expression im VMN bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten physiologisch hungrigen Tieren. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls für die Analyse der MC4-R mRNA-Expression die zweite Auflage ausgewertet, bei der die Expositionszeit 35 Tage betrug.

Für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 42 exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

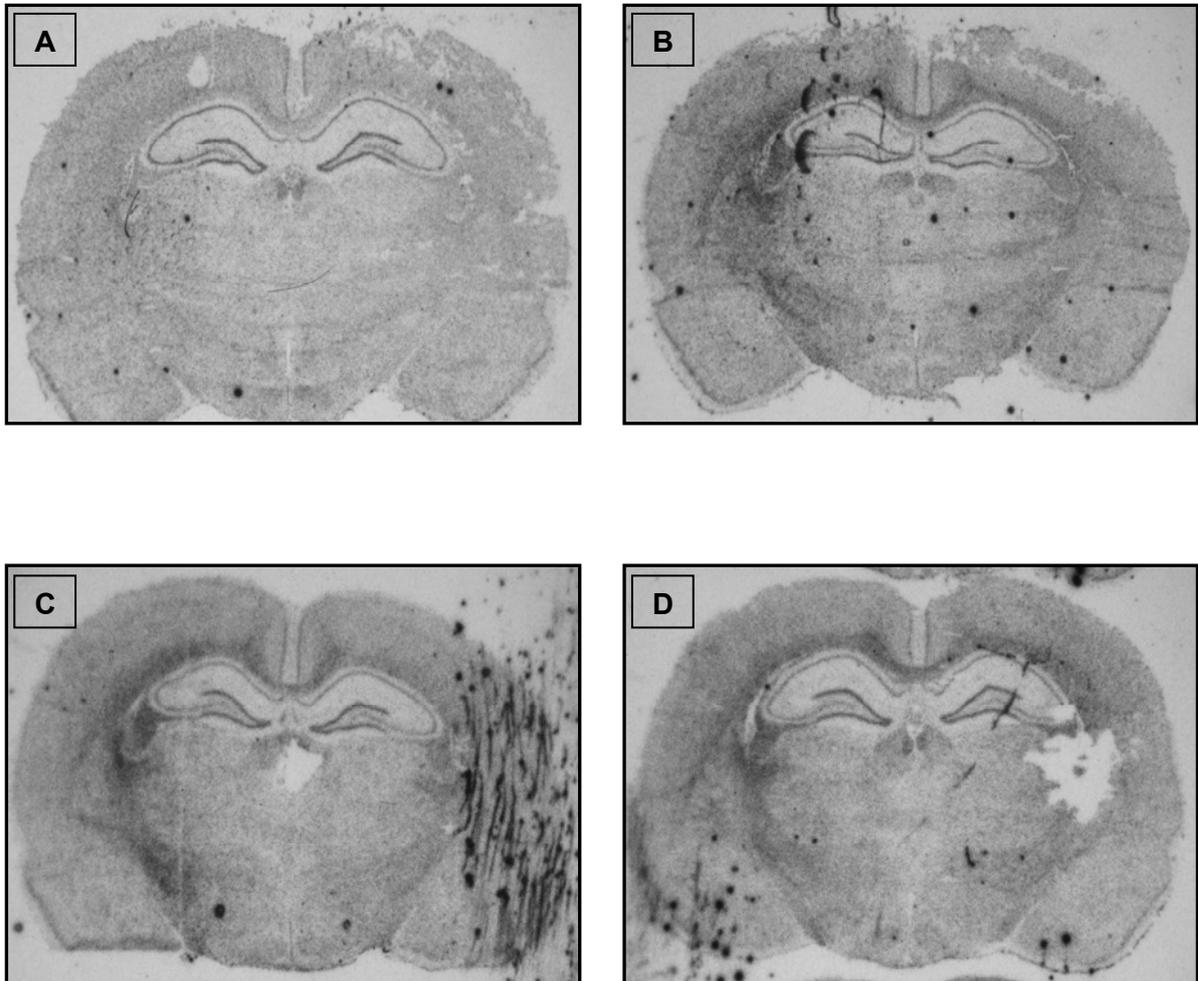


Abb. 42: MC4-R mRNA-Expression im VMN in 14 μ m-Frontalschnitten der Gehirne von physiologisch hungrigen Tieren. (A) phys. Kochsalzlsg./IgG, (B) phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK, (C) phys. Kochsalzlsg./ α -MSH-AK, (D) phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK + α -MSH-AK. Gezeigt wird – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten Ratten.

In Abb. 41 sind die Grauwerte der MC4-R mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Die statistische Untersuchung zeigte keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich aller Versuchsgruppen ($F_{3,19}=3,582$, $p=0,847$).

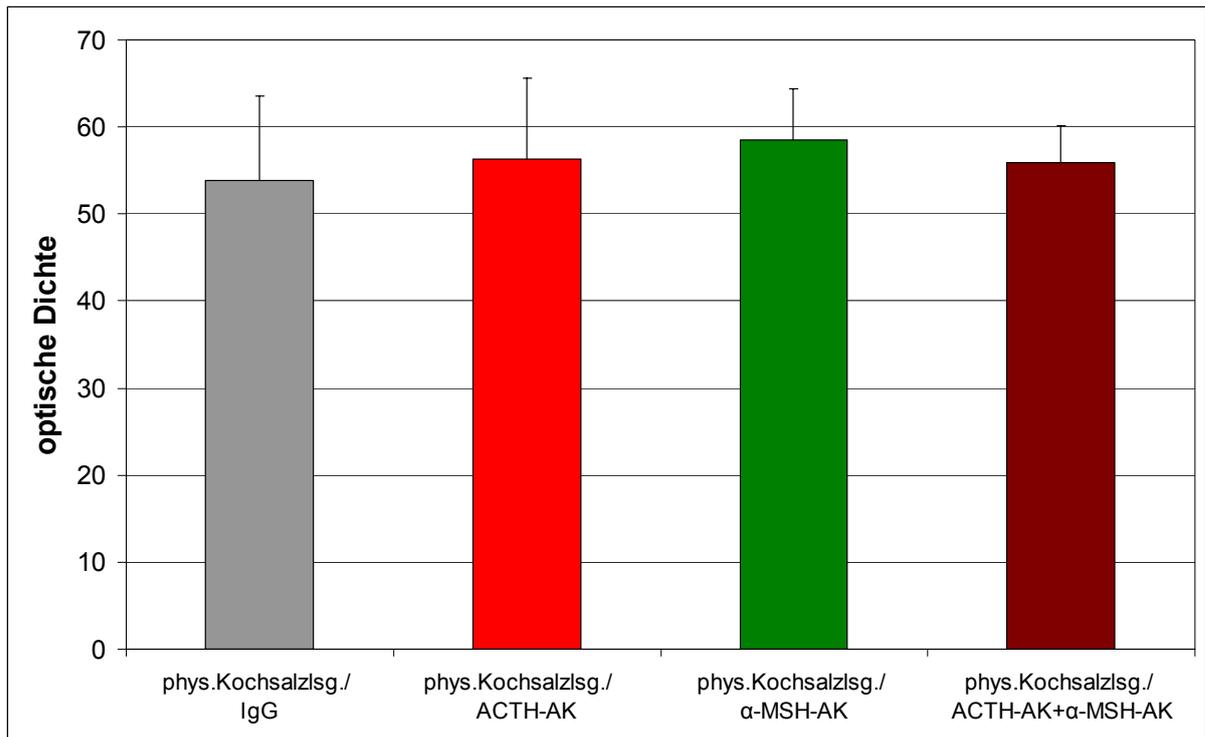


Abb. 43: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die MC4-R mRNA-Expression im VMN bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=5).

a) BDNF mRNA-Expression bei satten Tieren

Die Ergebnisse einer ISH zur semi-quantitativen Bestimmung der BDNF mRNA-Expression im VMN bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten satten Tieren sind in Abb. 44 und Abb. 45 dargestellt. Für die Analyse der BDNF mRNA-Expression wurde die zweite Auflage ausgewertet, bei der die Expositionszeit 35 Tage betrug.

In Abb. 44 ist für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

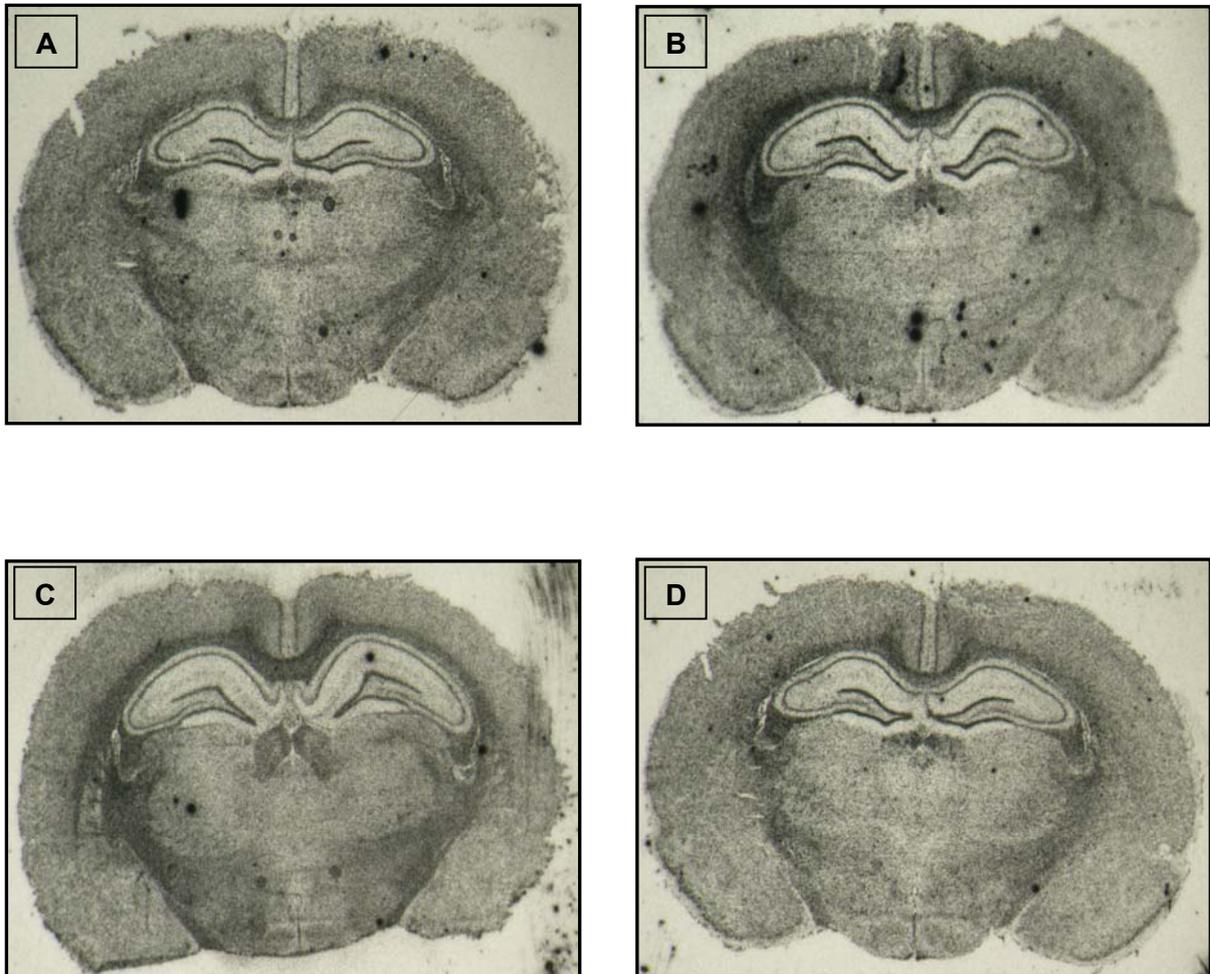


Abb. 44: BDNF mRNA-Expression im VMN in 14 μ m-Frontalschnitten der Gehirne von satten Tieren. (A) phys. Kochsalzlg./IgG, (B) phys. Kochsalzlg./ACTH-AK, (C) phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK, (D) phys. Kochsalzlg./ACTH-AK + α -MSH-AK. Gezeigt wird – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten Ratten.

Die Grauwerte der BDNF mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen sind in Abb. 45 dargestellt. Beim Vergleich aller Gruppen untereinander zeigte sich, dass die BDNF mRNA-Expression signifikant unterschiedlich war ($F_{3,19}=3,582$, $p=0,033$).

Eine signifikante Verringerung der BDNF mRNA-Expression konnte nach der zentralen Applikation von ACTH-AK (n=5), α -MSH-AK (n=5) und der Kombination aus beiden AK (n=5) im Vergleich zu den mit IgG behandelten Tieren (n=4) nachgewiesen werden.

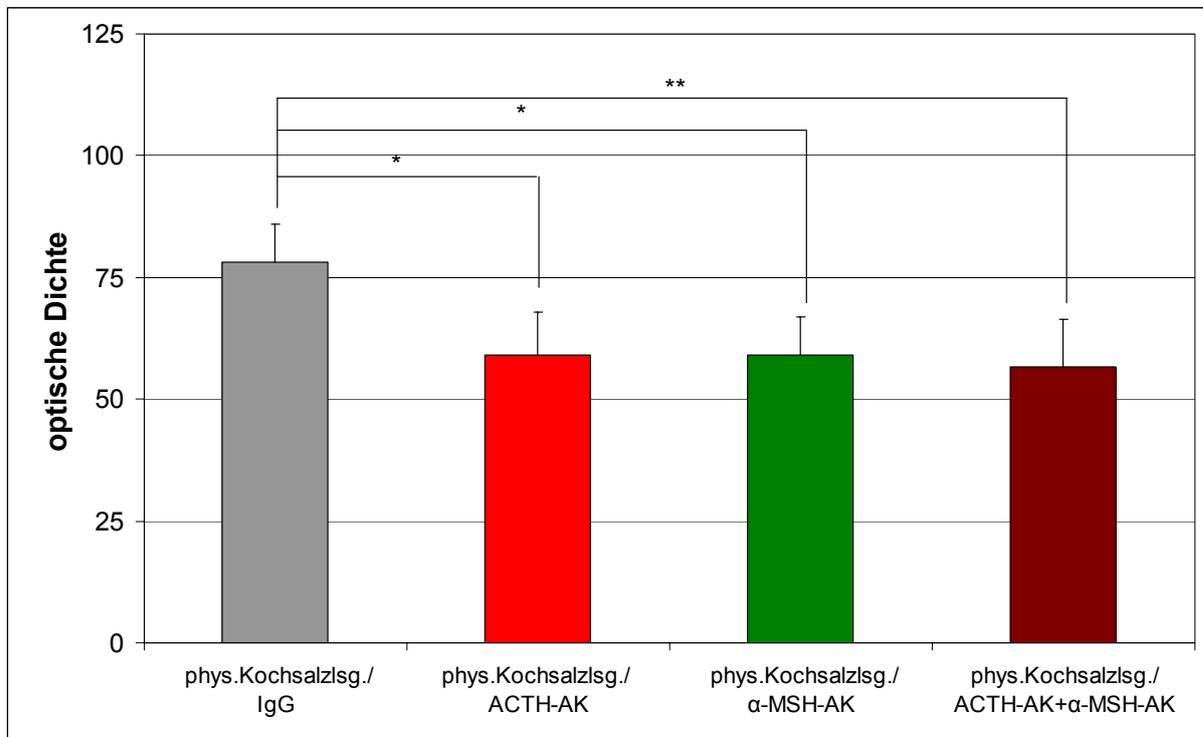


Abb. 45: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die BDNF mRNA-Expression im VMN bei satten Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=4-5). *p<0,05 zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im Bonferroni t-Test (post hoc).

b) BDNF mRNA-Expression bei physiologisch hungrigen Tieren

Abb. 46 und Abb. 47 zeigen die Ergebnisse einer ISH zur semi-quantitativen Bestimmung der BDNF mRNA-Expression im VMN bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten physiologisch hungrigen Tieren. Auch die Analyse der BDNF mRNA-Expression der physiologisch hungrigen Tiere erfolgte anhand der zweiten Auflage, bei der die Expositionszeit 35 Tage betrug.

Für alle vier verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 46 exemplarisch ein Bild eines Rattengehirnes dargestellt. Es handelt sich um die Originalaufnahmen, die wie in Abschnitt 3.8.2 beschrieben, ausgewertet wurden.

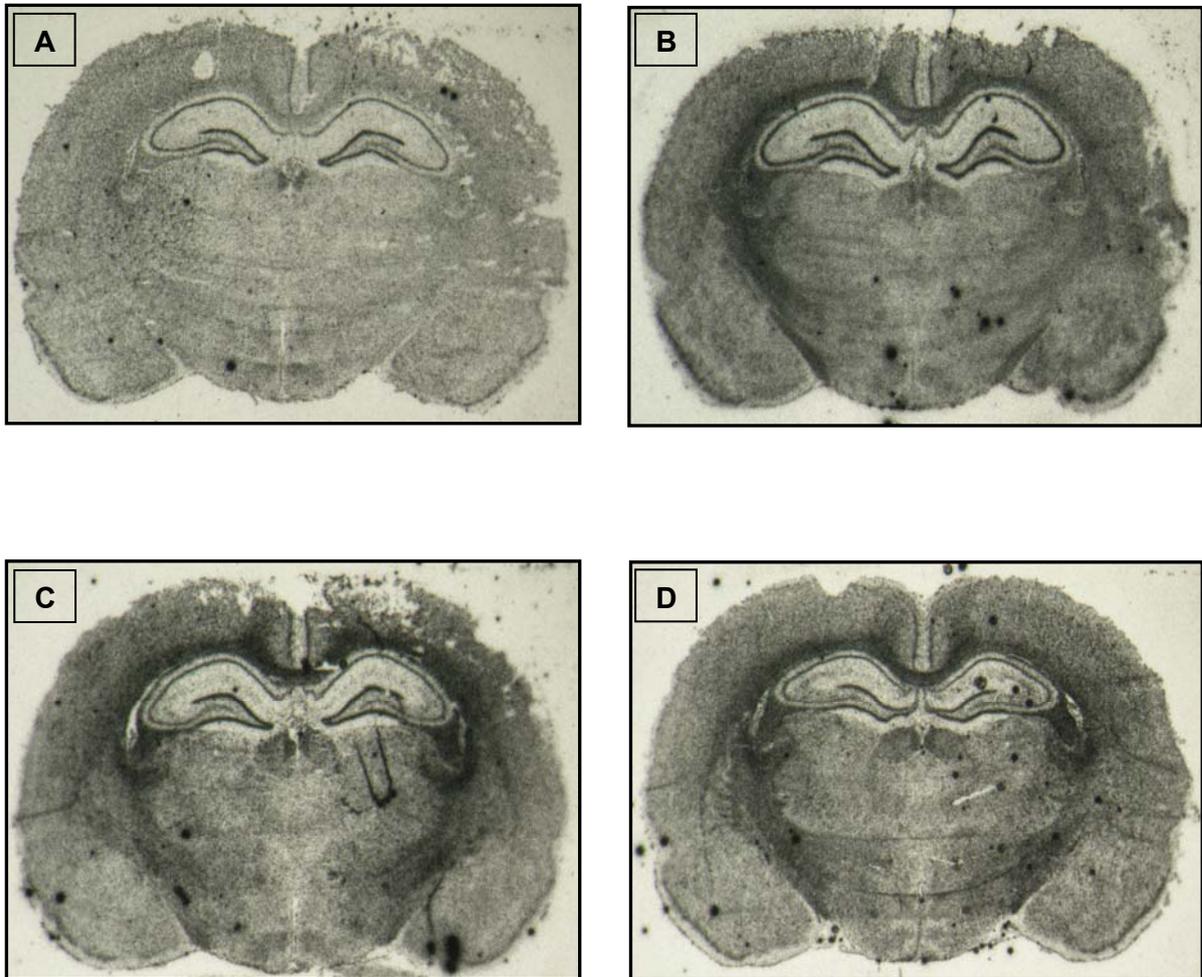


Abb. 46: BDNF mRNA-Expression im VMN in 14 μm -Frontalschnitten der Gehirne von physiologisch hungrigen Tieren. (A) phys. Kochsalzlsg./IgG, (B) phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK, (C) phys. Kochsalzlsg./ α -MSH-AK, (D) phys. Kochsalzlsg./ACTH-AK + α -MSH-AK. Gezeigt wird – am Beispiel von repräsentativen Einzelschnitten – das nach Durchführung einer radioaktiven ISH auf dem Röntgenfilm sichtbare Hybridisierungsmuster bei mit ACTH-AK, α -MSH-AK bzw. IgG behandelten Ratten.

Die Grauwerte der BDNF mRNA-Expression im VMN der verschiedenen Versuchsgruppen sind in Abb. 47 dargestellt. Die mRNA-Expression des BDNF war im Gruppenvergleich nicht signifikant verschieden ($F_{3,19}=0,618$, $p=0,614$).

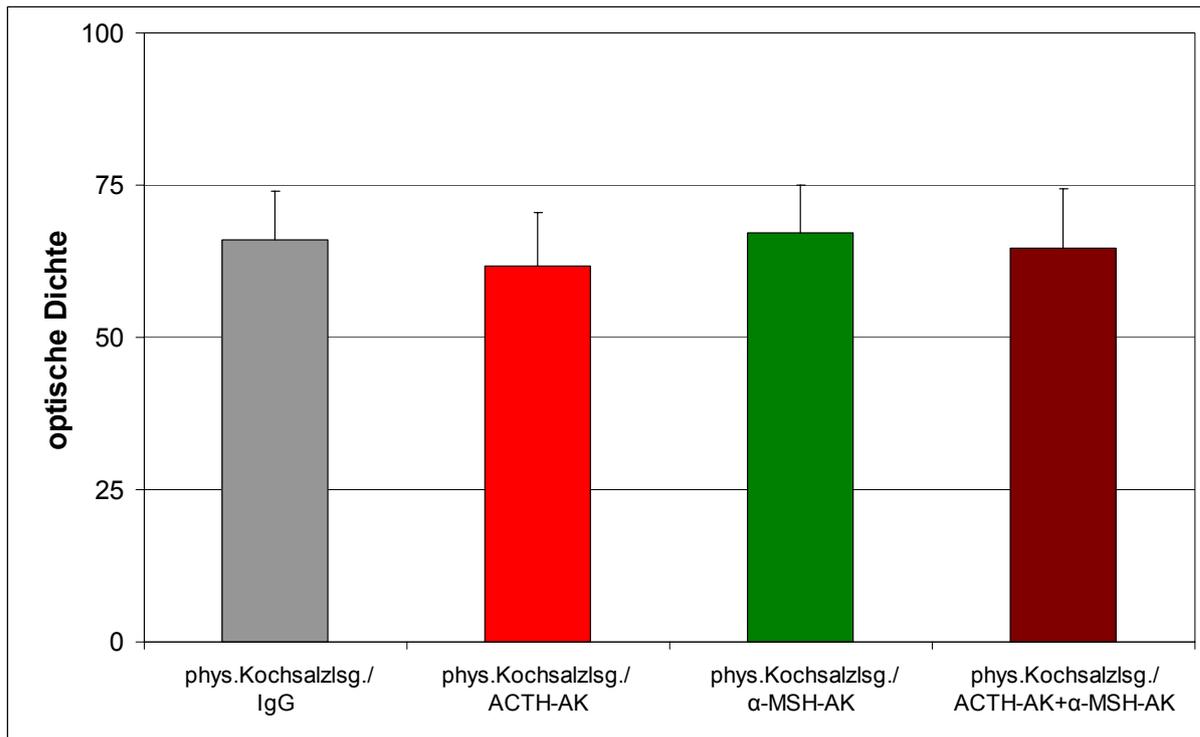


Abb. 47: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die BDNF mRNA-Expression im VMN bei physiologisch hungrigen Tieren. Mittelwerte \pm SD (n=5).

4.6 Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-Antikörpern bei ad-libitum gefütterten Tieren

Mit Hilfe eines subchronischen Applikationsschema sollte der Einfluss von ACTH-AK auf Nahrungs- und Wasseraufnahme, sowie die Entwicklung des Körpergewichtes bei ad-libitum gefütterten Tieren untersucht werden. Hierfür wurde den Tieren zunächst eine Mikroinjektionseinheit in den PVN implantiert. Nach einwöchiger Erholungsphase wurde den Ratten zweimal täglich (8 Uhr und 18 Uhr) der ACTH-AK oder IgG als Kontrolle in den PVN appliziert. Durch die getrennte Betrachtung der Nahrungsaufnahme während des Tages (= satte Tiere) bzw. während der Nacht (= hungrige Tiere) konnte der Einfluss der ACTH-AK in Abhängigkeit vom Ernährungszustand untersucht werden.

4.6.1 Effekte des ACTH-AK auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Körpergewichtsentwicklung bei ad-libitum gefütterten Tieren

Nahrungsaufnahme

Die Messung der Nahrungsaufnahme während des Tages (Messung von 8 Uhr bis 18 Uhr) war bei einem Vergleich der Gruppen über alle Versuchstage hochsignifikant verschieden (Abb. 48, $F_{1,12}=38,951$, $p<0,001$). An allen Versuchstagen wurde im t-Test eine signifikante

Erhöhung der Nahrungsaufnahme während des Tages der ACTH-AK Gruppe (n=7) im Vergleich zu den IgG Tieren (n=7) festgestellt.

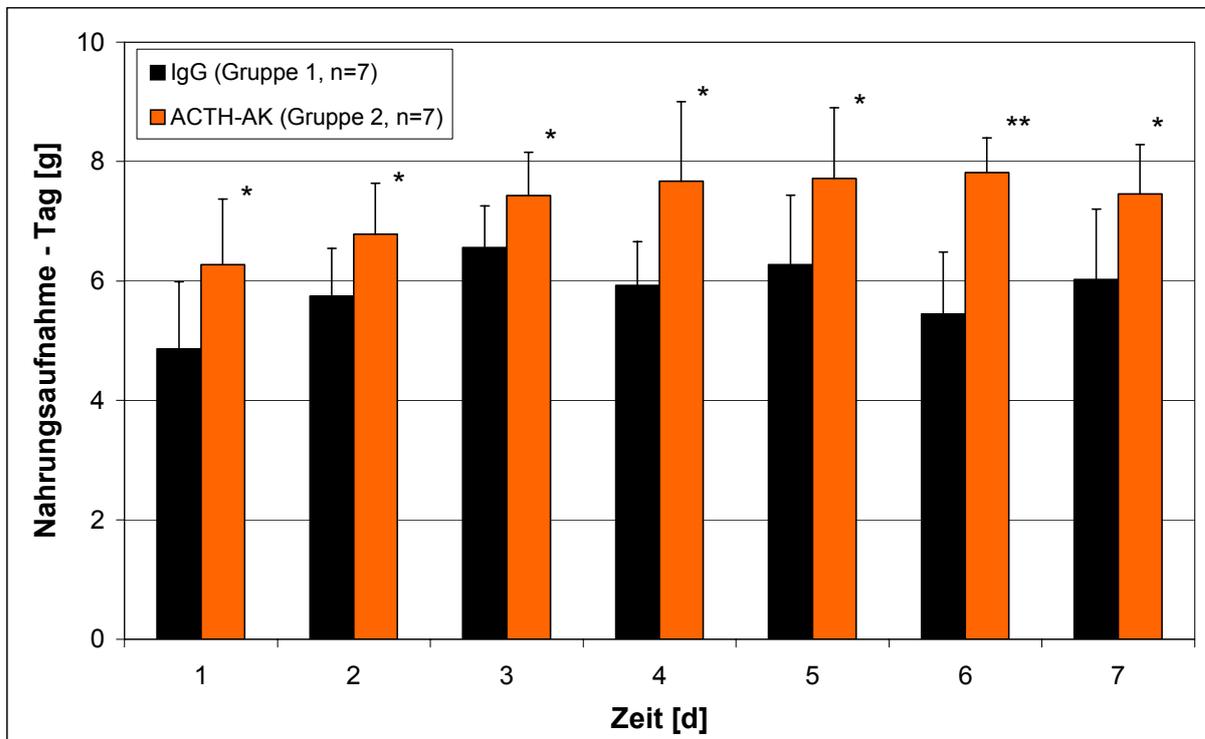


Abb. 48: Messung der Nahrungsaufnahme während des Tages nach ACTH-AK Applikation bei ad-libitum gefütterten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zu IgG Tieren

Die statistische Analyse der Nahrungsaufnahme während der Nacht (Messung von 18 Uhr bis 8 Uhr) erbrachte über alle Versuchstage einen signifikanten Unterschied zwischen den ACTH-AK Tieren und den IgG Tieren ($F_{1,12}=9,062$, $p=0,011$). Jedoch zeigte die Betrachtung der Nahrungsaufnahme an jedem einzelnen Versuchstag mit Hilfe des t-Testes keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen (Abb. 49).

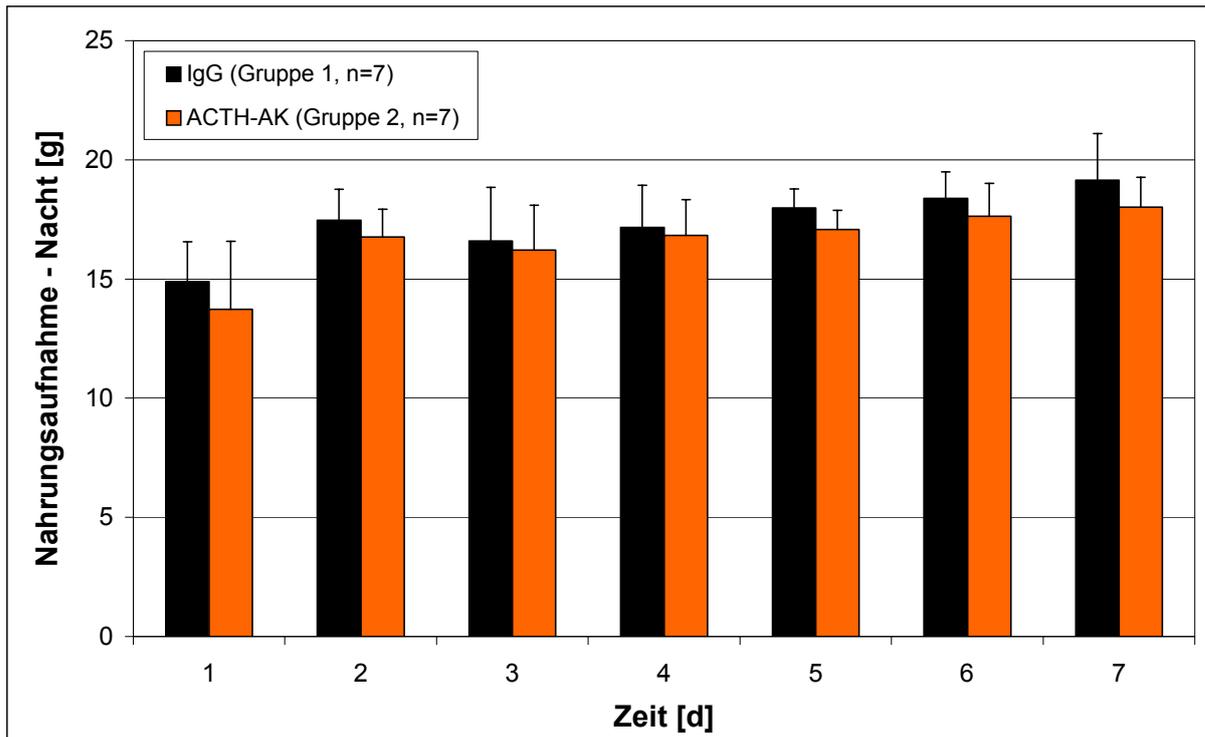


Abb. 49: Messung der Nahrungsaufnahme während der Nacht nach ACTH-AK Applikation bei ad-libitum gefütterten Tieren. Mittelwerte \pm SD.

An den sieben aufeinander folgenden Tagen, wenn die Nahrungsaufnahme über den ganzen Tag (Messung von 8 Uhr bis 8 Uhr des Folgetages) betrachtet wurde, zeigte sich zwischen den Versuchsgruppen (ACTH-AK und IgG) kein signifikanter Unterschied ($F_{1,12}=4,683$, $p=0,051$, Daten nicht gezeigt).

Wasseraufnahme

Wie die Auswertung der Nahrungsaufnahme während des Tages (Messung von 8 Uhr bis 18 Uhr) zeigte auch die Analyse der Wasseraufnahme über den gleichen Versuchszeitraum beim Vergleich der Gruppen einen signifikanten Unterschied ($F_{1,12}=40,181$, $p<0,001$). Die statistische Analyse mit Hilfe des t-Testes zeigte eine signifikante Erhöhung der Wasseraufnahme während des Tages bei der ACTH-AK Gruppe ($n=7$) im Vergleich zu den IgG Tieren ($n=7$) an verschiedenen Versuchstagen. (Abb. 50).

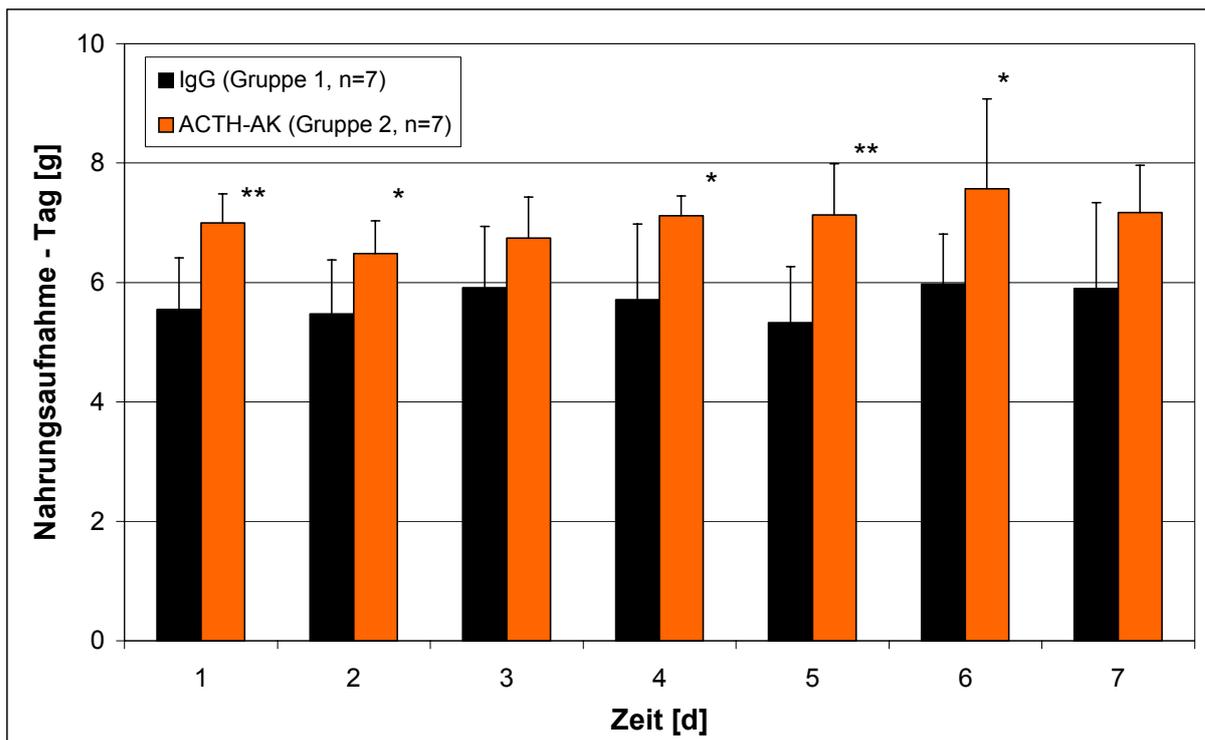


Abb. 50: Messung der Wasseraufnahme während des Tages nach ACTH-AK Applikation bei ad-libitum gefütterten Tieren. Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zu IgG Tieren

Die statistische Analyse der Wasseraufnahme während der Nacht (Messung von 18 Uhr bis 8 Uhr) erbrachte zwischen den ACTH-AK Tieren und den IgG Tieren über alle Versuchstage keinen signifikanten Unterschied (Abb. 51, $F_{1,12}=0,294$, $p=0,597$).

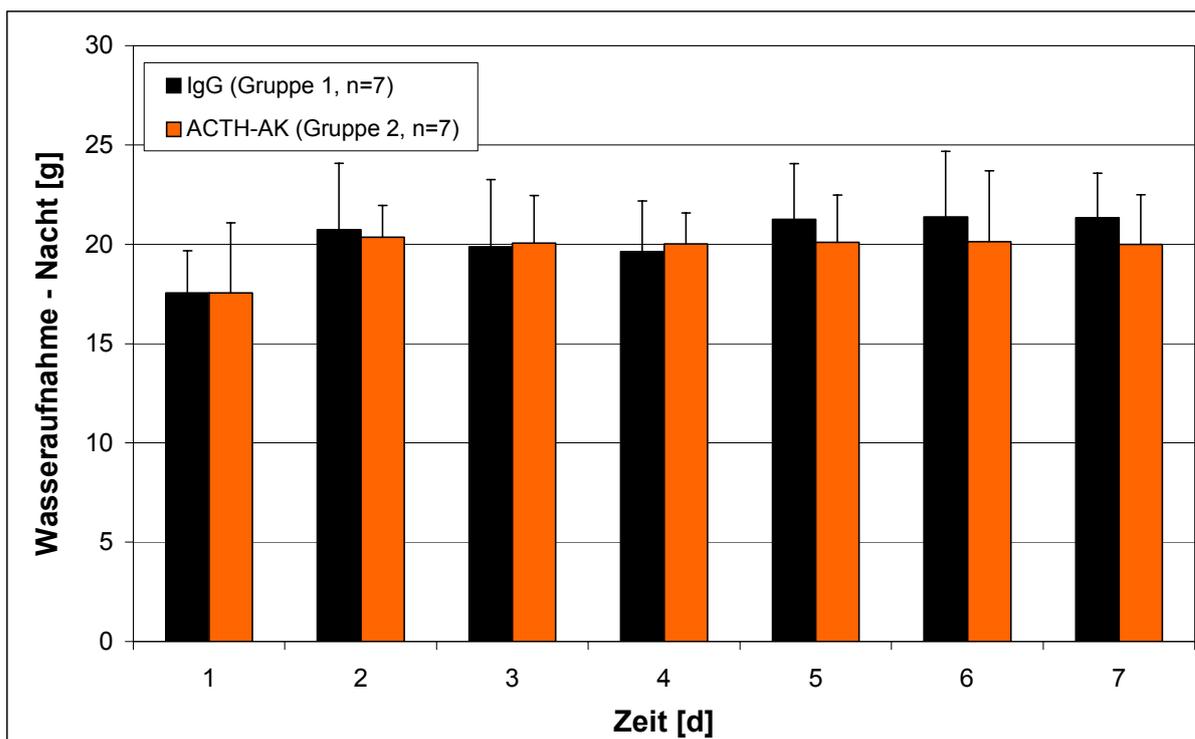


Abb. 51: Messung der Wasseraufnahme während der Nacht nach ACTH-AK Applikation bei ad-libitum gefütterten Tieren. Mittelwerte \pm SD.

Die Betrachtung der Wasseraufnahme über den ganzen Tag (Messung von 8 Uhr bis 8 Uhr des Folgetages) an den sieben aufeinander folgenden Tagen zeigte zwischen den Versuchsgruppen (ACTH-AK und IgG) keinen signifikanten Unterschied ($F_{1,12}=0,791$, $p=0,391$, Daten nicht gezeigt).

Entwicklung des Körpergewichtes

Die Entwicklung des Körpergewichtes wurde nach subchronischer Applikation (jeweils morgens und abends) von ACTH-AK ($n=7$) bzw. IgG ($n=7$) über sieben Tage untersucht. Die statistische Analyse ergab, dass sich die Veränderungen des Körpergewichtes zwischen den beiden Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant unterschieden ($F_{1,12}=0,007$, $p=0,934$).

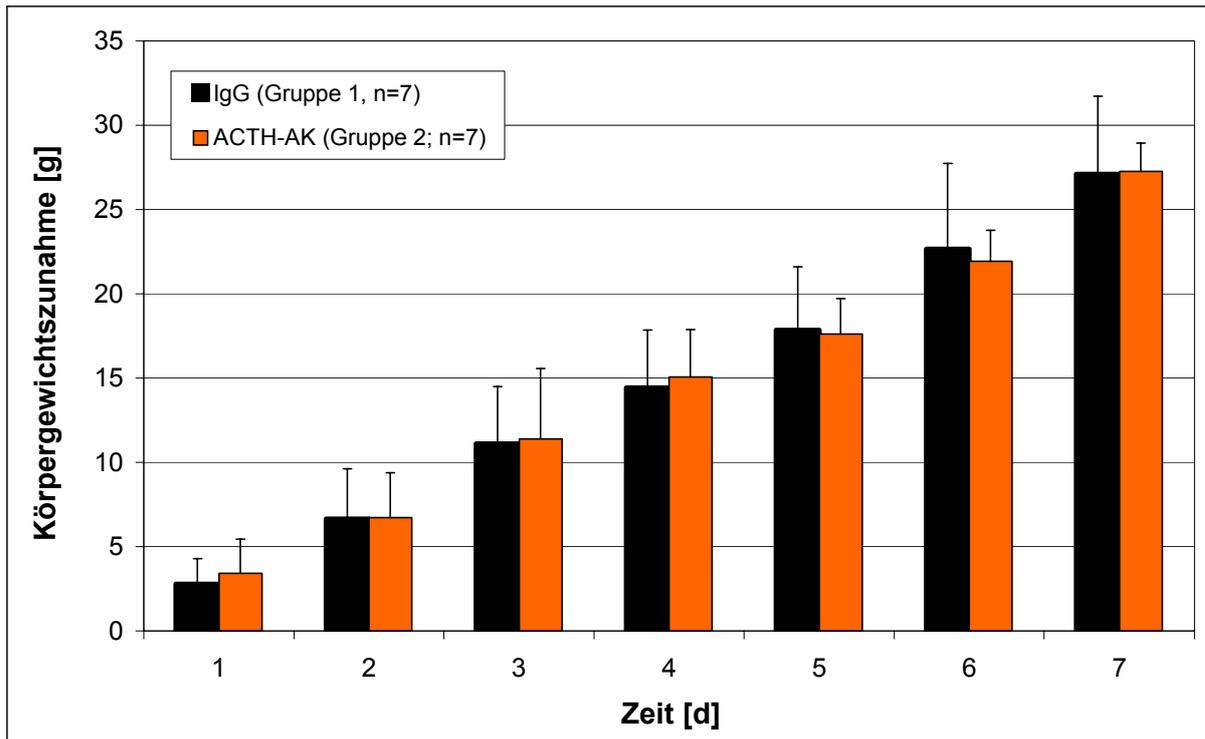


Abb. 52: Veränderung des Körpergewichtes nach ACTH-AK Applikation (zweimal täglich) über einen Zeitraum von sieben Tagen. Mittelwerte \pm SD.

5 Diskussion

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte die physiologische Rolle des endogenen ACTH innerhalb der Appetitregulation untersucht werden. ACTH ist ein Hormon des melanokortinergen Systems, das wie α -MSH durch eine Serie post-translationaler proteolytischer Spaltungen aus POMC entsteht. Da α -MSH über die PC2 direkt aus dem ACTH gebildet wird, sind die ersten 13 AS des ACTH vollständig identisch mit α -MSH (siehe Abschnitt 2.3.3). Zudem konnte in zahlreichen Bindungsstudien gezeigt werden, dass beide Peptide mit gleicher Affinität an die für die Appetitregulation bedeutsamen Rezeptoren, wie MC4-R und MC3-R, binden (siehe Abschnitt 2.3.7) und mit ähnlicher Potenz die cAMP Akkumulation in einer MC4-R exprimierenden Zelllinie stimulieren (188).

Dass die Melanokortine einen Einfluss im ZNS besitzen, konnte schon in den frühen fünfziger Jahren nachgewiesen werden, da die Applikation von ACTH in die CSF oder in bestimmte Hirnareale, besonders Gebiete, die sich in der Umgebung des dritten Ventrikel befinden, zu einer komplexen Verhaltensveränderung der Tiere führte (131). Mitte der achtziger Jahre wurden dann die ersten Untersuchungen hinsichtlich eines potenziellen Einflusses auf die Appetitregulation durchgeführt (125;137). Diese Studien zeigten, dass die Applikation von ACTH-(1-24) die Nahrungsaufnahme signifikant sowohl in hungrigen als auch in ad-libitum gefütterten Tieren reduziert.

Die zentralnervöse Applikation von ACTH hat u.a. auch zur Folge, dass das Peptid aus dem ZNS in die Peripherie gelangt und dort die Nebennieren stimuliert, die ihrerseits vermehrt Kortikosteron freisetzen. Da die Freisetzung der GC zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führt, wirkt dies den zentralnervösen anorexigenen Effekten des ACTH entgegen (s.u.). Um die peripheren Wirkungen von ACTH zu blockieren, wurde im ersten Experiment dieser Arbeit bei der Hälfte der Tiere eine bilaterale ADX durchgeführt.

Wie oben dargestellt, gibt es eine Reihe von Erkenntnissen über die Wirkung einer pharmakologischen Applikation von POMC-Derivaten. Die Bedeutung des endogenen ACTH bei der Appetitregulation hingegen ist noch nicht untersucht worden. Jedoch ist gerade das Studium physiologisch relevanter Mechanismen von größter Bedeutung für die Erforschung neurophysiologischer Grundlagen der Appetitregulation, da pathophysiologische Veränderungen des MC-Systems beim Menschen zur Entstehung von Übergewicht beitragen (siehe Abschnitt 2.4). Dieses ist letztlich nur über die Untersuchung der Wirkung endogen produzierter Neuropeptide möglich, die physiologischen Regulationsmechanismen unterliegen.

Um die potentielle Relevanz des endogenen ACTH zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit spezifische Antikörper gegen ACTH bzw. α -MSH in verschiedenen Fütterungsschemata benutzt. Mit diesen Experimenten war es möglich zu zeigen, dass neben dem α -MSH auch das ACTH eine physiologische Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes spielt.

Bedeutung der Glukokortikoide für die Energiebalance

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass Glukokortikoide (GC), wie Kortikosteron bei Ratten und Mäusen und Kortisol beim Menschen, die Energiebalance über periphere und zentrale Mechanismen regulieren können (190). Die GC werden aus dem Vorläufer Cholesterol gebildet und von der Nebenniere in einem zirkadianen Rhythmus oder als Reaktion auf Stress in die Blutzirkulation abgegeben.

Die GC-Synthese in der Nebennierenrinde (NNR) wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achsen (HPA)-Aktivität kontrolliert. Die HPA-Achse ist ein organübergreifendes homöostatisches System, das die Gluconeogenese, angeborene und adaptive Immunität und Entzündungsreaktionen kontrolliert. Sie stellt eine fein regulierte Verbindung zwischen dem neuroendokrinen System und dem Immunsystem dar, sowohl im Bezug auf Stress als auch im Hinblick auf zirkadiane Regulation. Zudem ist die HPA-Achse die wichtigste hormonelle Regulationsmöglichkeit, mit der das ZNS auf das Immunsystem Einfluss nimmt.

Der PVN des Hypothalamus reagiert auf Stresseinflüsse, indem er CRF und Vasopressin über das Pfortadersystem in die Adenohypophyse ausschüttet. Diese reagiert auf die beiden Neuropeptide mit der Synthese und Ausschüttung von ACTH in den peripheren Blutkreislauf. ACTH induziert dann auf der Ebene der NNR die Synthese und Freisetzung von GC (191). Dieses HPA-System steht über negative Rückkopplung im Gleichgewicht, wobei GC sowohl die Synthese und Sekretion von ACTH in der Adenohypophyse als auch von CRF im Hypothalamus inhibieren.

Die Wirkung der GC wird über die Bindung an den Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt, wobei dieser Rezeptortyp in der Peripherie, aber auch in hypothalamischen Kerngebieten, die an der Regulation der Energiebalance beteiligt sind, lokalisiert ist. Einen funktionellen Hinweis für die Beteiligung der GC an der Appetitregulation zeigten Experimente, in denen Kortikosteron sowie eines seiner Analoga zentral appliziert wurden, denn dies führte zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme und damit zur Ausbildung von Fettsucht (192;193).

5.1 Experiment 1: Einfluss von ACTH in sham und ADX Tieren

Mit Hilfe des ersten Experimentes sollte die Wirkung einer zentralnervösen ACTH Applikation auf die Nahrungsaufnahme untersucht werden. Um die peripheren Effekte von ACTH zu

unterbinden, wurde in diesem Experiment bei einem Teil der Versuchstiere eine bilaterale Adrenalektomie durchgeführt. Nach der ADX erhielten die Tiere phys. Kochsalzlg. anstatt Trinkwasser, um den wegen des ADX-bedingten Aldosteron-Mangels erhöhten Verlust an Mineralien auszugleichen. Mit dieser Mineralsubstitution sind Ratten in der Lage, ohne GC-Substitution bei einer Adrenalektomie über einen längeren Zeitraum weiterzuleben, wie es in der Arbeit von Thomas et al. für eine Dauer von zwei Wochen beschrieben wurde (194).

Nach einer einwöchigen Erholungsphase wurde den Tieren das Futter für 24 Stunden entzogen und am folgenden Morgen ACTH oder phys. Kochsalzlg. in den lateralen Ventrikel appliziert. ACTH wurde in einer Dosis von 2,1 nmol/5 μ l/Ratte (entspricht 9,3 μ g/5 μ l/Ratte) verwendet. Diese Dosierung entspricht in etwa der eingesetzten Menge in der Arbeit von Al-Barazanji et al., die bei i.c.v. Applikationen von ACTH und seinen Fragmenten, wie α -MSH, in Ratten eine Dosis von 2,5 nmol/5 μ l/Ratte verwendet haben (188).

Übereinstimmend mit anderen Studien (137;188) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die i.c.v. Injektion von ACTH in sham und ADX Tieren zu einer signifikanten Reduzierung der Nahrungsaufnahme führt. Die stärkste Erniedrigung der Nahrungsaufnahme wurde mit 34 % während der ersten Stunde nach der Behandlung in den sham Ratten beobachtet und nach sechs Stunden (33 %) bei den ADX Tieren.

In einer Studie von Al-Barazanji et al. konnte weiterhin gezeigt werden, dass neben ACTH auch dessen C- und N-terminale Fragmente die Nahrungsaufnahme von Ratten nach 24 Stunden Fasten beeinflussen (188). Es zeigte sich, dass die Gabe von α -MSH, einem N-terminalen Fragment des ACTH, eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme verursacht. Im Gegensatz dazu führte die i.c.v. Applikation der C-terminalen Fragmente, wie ACTH-(18-39) und ACTH-(22-39), zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme. Durch eine stabile Transfektion des MC4-R in HEK-293 Zellen und anschließende cAMP Messung konnte nachgewiesen werden, dass der orexigene Effekt dieser Fragmente nicht über den MC4-R vermittelt wird.

Die Injektion von melanokortinergen Peptiden, wie ACTH und α -MSH, in die CSF oder in spezifische Hirnregionen von Säugetieren induziert ein komplexes Verhaltenssyndrom (131). Auf der Basis dieser Beobachtungen erscheint es denkbar, dass diese Verhaltensveränderungen auch die Hemmung der Nahrungsaufnahme ausgelöst haben. Jedoch zeigte sich, dass die Dauer des anorexigenen Effektes um ein Vielfaches länger ist, als die durch ACTH ausgelösten Verhaltensveränderungen anhalten. In der vorliegenden Studie konnte durch die Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel eine signifikante Reduzierung der Nahrungsaufnahme in den Tieren über einen Zeitraum von sechs Stunden beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde das übermäßige Putzen und das vermehrte Strecken und Gähnen der Tiere durch verschiedene Arbeitsgruppen nur während der ersten

und zweiten Stunde nach der Behandlung beobachtet (195;196). Dadurch scheint es unwahrscheinlich, dass die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme durch das veränderte Verhalten hervorgerufen wurde.

Neben der Analyse der Nahrungsaufnahme wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Flüssigkeitsaufnahme nach Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel untersucht. Die Gabe von ACTH verursachte eine signifikante Reduzierung der Flüssigkeitsaufnahme in den sham und ADX Tieren. Der Effekt war wie bei der Nahrungsaufnahme in beiden Gruppen bis zum Ende des Experimentes, d.h. über sechs Stunden, zu beobachten. Um zu untersuchen, ob der Effekt auf die Wasseraufnahme unabhängig von der Nahrungsaufnahme ist, müssten Versuche durchgeführt werden, in denen den Tieren vollständig die Nahrung entzogen wird oder allen Versuchsgruppen nur soviel Futter zur Verfügung gestellt wird, wie die Gruppe mit der niedrigsten Nahrungsaufnahme zu sich nimmt (pair feeding).

Der Vergleich der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie des Körpergewichtes zwischen den ADX und sham Tieren zeigte nach Applikation von ACTH bzw. phys. Kochsalzlg. keine signifikanten Unterschiede. Diese Befunde lassen vermuten, dass das zentral applizierte ACTH nicht in ausreichender Menge in die Peripherie gelangt, um dort die Kortikosteronfreisetzung zu stimulieren.

In den hier diskutierten Versuchen wurden die Tiere sechs Stunden nach i.c.v. Applikation von ACTH bzw. phys. Kochsalzlg. getötet und die ACTH- und Kortikosteronspiegel bestimmt. Es war nach dieser Zeit nicht zu erwarten, dass noch Veränderungen der peripheren Spiegel dieser Hormone nachweisbar sind, da die Plasmahalbwertszeiten von acht Minuten (ACTH) (197) bzw. 15 - 25 Minuten (Kortikosteron) (197) relativ kurz sind.

Über den zeitlichen Verlauf von ACTH- und Kortikosteronspiegeln ist aus Experimenten, in denen Ratten einem Stressor ausgesetzt wurden, bekannt, dass ACTH bereits fünf Minuten nach Beginn des Stressses ansteigt (Maximum nach ca. zehn Minuten), während das Kortikosteron erst später folgt, mit einem Maximum nach 15 Minuten. Nach Erreichen des maximalen Wertes fallen die Spiegel beider Hormone wieder schnell im Verlauf von 20 bzw. 30 Minuten auf basales Niveau ab. Solche Experimente, bei denen in Folge von Stress Anstiege von ACTH und Kortikosteron induziert werden, sind jedoch mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nur bedingt vergleichbar. Der zeitliche Verlauf in welchem ACTH aus dem Gehirn in die Peripherie gelangt und dort die Freisetzung von Kortikosteron induziert, wurde bisher nicht untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass 30 Minuten nach Applikation von 0,68 nmol ACTH i.c.v. (im Vergleich zu 2,1 nmol in unserer Studie) periphere ACTH Konzentrationen von 450 pg/ml gemessen werden, wobei im Vergleich dazu die mit phys. Kochsalzlg. behandelten Tiere Werte von 80 pg/ml aufwiesen (198). Über den weiteren Verlauf liegen keine Daten vor, aber wegen der o.g. kurzen Halbwertszeit von

ACTH ist es unwahrscheinlich, dass die i.c.v. Gabe der Substanz zu peripheren Anstiegen über viele Stunden hinweg führt.

Tatsächlich ergab die Messung des Serum ACTH sechs Stunden nach Applikation von ACTH oder phys. Kochsalzlg. bei sham Tieren eine geringfügige (nicht signifikante) Erhöhung von ACTH im Plasma (536 pg/ml) gegenüber sham Tieren mit Kontroll-Applikation (393 pg/ml). Die ACTH-Spiegel der sham-operierten Tiere mit phys. Kochsalzlg. i.c.v. sind im Vergleich mit der Literatur sehr hoch. In Abhängigkeit von Stamm und Tageszeit sind basale ACTH-Spiegel von 60-80 pg/ml publiziert (198;199). Letztlich können hier nur Experimente mit einer Dauerkatheterisierung der Tiere Aufschluss bringen, mit Hilfe derer den Tieren stressfrei in kurzen zeitlichen Abständen nach der i.c.v. Applikation Blut abgenommen werden kann.

Die von uns beobachteten erhöhten ACTH-Spiegel könnten durch den indirekt mit der Tötung verbundenen Stress und die dadurch verursachte Ausschüttung von ACTH erklärt werden. Zwar ist die Dekapitation die schnellste für Ratten geeignete Tötungsmethode, jedoch wurden die Tiere durch die Entnahme aus ihrer gewohnten Umgebung und den Transport in den Raum, in dem sie getötet wurden, bereits gestresst. Langfristige Effekte des OP-Stresses sind hingegen als Ursache für die erhöhten ACTH-Spiegel unwahrscheinlich: So konnten Weidenfeld et al. zeigen, dass bei sham-operierten Ratten die basalen ACTH Spiegel wieder normal sind (199).

Bei der Messung der Kortikosteron-Spiegel konnten in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede zwischen den ACTH i.c.v. (165 ng/ml) und phys. Kochsalzlg. i.c.v. (183 ng/ml) behandelten Tieren festgestellt werden. Die Kortikosteron-Spiegel sind anders als die in dieser Arbeit gemessenen ACTH-Spiegel im Vergleich mit Daten aus der Literatur nicht wesentlich erhöht. Es ist bekannt, dass als Folge von Stress ACTH innerhalb weniger Minuten auf ein zehnfaches des basalen Niveaus ansteigt, wohingegen Kortikosteron erst nach 15 min (199) einen signifikanten Anstieg zeigt. Man kann spekulieren, dass die Tiere in einem Zeitraum getötet wurden, in denen der ACTH-Anstieg schon manifest war, Kortikosteron aber noch normal.

Wie zu erwarten war, ergab sich bei der Untersuchung des Blutes der ADX-Tiere ein vollkommen anderes Bild. In die Auswertung aller Experimente wurden nur Tiere einbezogen, deren Kortikosteronspiegel unter 10 µg/ml lag. Dies traf auf alle ADX-Tiere zu, so dass von einer vollständigen Entfernung der Nebenniere ausgegangen werden kann. Wie wegen des fehlenden Kortikosteron-Feedbacks zur Hypophyse, aber auch zu den übergeordneten kortikotrophen Zentren des Hypothalamus, zu erwarten war, wurden bei den ADX-Tieren mit Kontrollapplikation i.c.v. im Vergleich zur Literatur erhöhte ACTH-Spiegel

von 654 µg/ml gemessen. Die Applikation von ACTH i.c.v. führte zu keinem weiteren signifikanten Anstieg (719 µg/ml).

Aus früheren Studien weiß man, dass die ADX einen relativ schweren Eingriff für die Tiere darstellt, der eine einwöchige Erholungszeit der Tiere notwendig macht. Während dieser Zeit wurden täglich die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht der Tiere protokolliert, um die Genesung der Tiere zu kontrollieren und zu dokumentieren. Dabei zeigte sich, dass die ADX Tiere über einen Zeitraum von acht Tagen signifikant weniger Nahrung aufnahmen und auch weniger Gewicht zunahmen. Auffallend jedoch war, dass die Flüssigkeitsaufnahme nicht signifikant unterschiedlich war. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Befunden von Yamasaki et al., die zeigen konnten, dass die Gesamtfüssigkeitsaufnahme bei den ADX Tieren im Vergleich zu den sham Tieren nicht unterschiedlich war (200).

Wie zu Beginn der Diskussion dargestellt, führt Kortikosteron zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme. Es wird diskutiert, dass hieran Veränderungen der zentralnervösen hypothalamischen Expression von POMC beteiligt sind. Daher ist die totale Entfernung der Nebenniere von entscheidender Bedeutung, um den Einfluss von Kortikosteron vollständig auszuschalten.

Deshalb wurden in dieser Studie nur ADX Tiere mit einem zirkulierenden Kortikosteron von 10 ng/ml in die statistische Analyse einbezogen. Die Untersuchung der POMC mRNA-Expression im Hypothalamus nach einer ADX führte in der Literatur zu gegensätzlichen Erkenntnissen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die POMC und AgRP mRNA Expression im medial basalen Hypothalamus (MBH) von ADX Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert wird (115;189). Es gibt jedoch auch andere Studien, die eine Erhöhung der POMC mRNA-Expression im Hypothalamus nach der ADX gefunden haben (201).

Der Hypothalamus ist eine der wichtigsten zentralnervösen Strukturen, die an der Appetitregulation beteiligt sind. Dass der MC4-R eine entscheidende Rolle spielt, wird zum einen durch die hohe Dichte von MC4-R in hypothalamischen Regionen, wie VMN, PVN, DMN und LHA unterstützt und zum anderen durch MC4-R knock-out Mäuse (MC4-R^{-/-}), die zur Ausbildung einer extremen Fettsucht neigen. Eine Arbeit aus dem Jahre 2003 zeigte zum ersten Mal eine Interaktion zwischen dem MC-System und BDNF (51). Aufgrund dieses Hintergrundes wurde in der vorliegenden Arbeit der Gehalt an BDNF und MC4-R im ZNS auf mRNA-Ebene untersucht. Die i.c.v. ACTH Applikation in den lateralen Ventrikel bewirkte eine signifikante Erhöhung der BDNF mRNA-Expression im VMN in den sham Tieren und den ADX Tieren. Die durchgeführte ADX führte zu einer signifikanten Verringerung der BDNF

mRNA-Expression in den mit phys. Kochsalzlg. und ACTH behandelten Tieren. Während i.c.v. appliziertes ACTH die BDNF Expression in den sham und ADX Tieren erhöhte, wurde die MC4-R mRNA-Expression nur in den sham Tieren signifikant erniedrigt. In den ACTH behandelten Tieren erreichte die Abnahme der Expression kein Signifikanzniveau. Die ADX hatte weder bei den mit phys. Kochsalzlg. behandelten Ratten noch bei den Tieren, die eine ACTH Applikation erhielten, Einfluss auf die MC4-R mRNA-Expression.

Wie in der Einleitung (siehe Punkt 2.1.2.4) bereits dargestellt, gehört BDNF zur Familie der Neurotrophine und wird in hohen Konzentrationen im VMN exprimiert (202). Des Weiteren wurden moderate Mengen an BDNF mRNA im PVN und LHA nachgewiesen.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der BDNF eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase spielt. Die chronische i.c.v. BDNF Infusion (1-6 µg/Tag) über 14 Tage unterdrückte bei männlichen Long-Evans-Ratten den Appetit und führte zu einem starken Gewichtsverlust (203). Sowohl die zentrale als auch die periphere Applikation von BDNF senkt auch in db/db Mäusen (Leptin-Rezeptor defizient) die Nahrungsaufnahme und erhöht den Energieverbrauch (204). Mäuse, die eine homozygote oder heterozygote Deletion im BDNF-Gen besitzen (53), entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Hyperphagie und zeigen im Erwachsenenalter Fettsucht (205).

Eine Studie von Xu et al. zeigte, dass das MC-System die BDNF mRNA-Expression im VMN reguliert (51), denn zum einen erhöhte die Injektion von MT-II, einem MC4-R Agonisten, die mRNA Level des BDNF im VMN von Mäusen nach einer Hungerperiode von 24 Stunden. Zum anderen zeigten A^y Mäuse, die das Agouti-Protein überexprimieren, wie es unter Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben wurde, eine reduzierte BDNF mRNA-Expression im VMN (51).

Untersuchungen von Merlio et al. unterstreichen die bedeutende Rolle von BDNF in der Appetitregulation und besonders dessen Bedeutung für das MC-System (206): Mäuse mit MC4-R Defizienz bilden eine Hyperphagie aus, die besonders bei Ernährung mit hochkalorischem Futter zu einer exzessiven Körpergewichtszunahme führt. Eine zentrale BDNF Infusion in diese Tiere unterdrückt die Hyperphagie und damit auch die exzessive Körpergewichtszunahme. Die Wirkung des BDNF wird durch Bindung an den BDNF Rezeptor (TrkB) vermittelt, der in zahlreichen Regionen des Hypothalamus, wie VMN und PVN exprimiert wird (206). Mutationen im TrkB führen entsprechend zu einer Hyperphagie und schwerer Fettsucht (51).

5.2 Experiment 2: Effektivität spezifischer AK in der Blockade von exogenem ACTH und α -MSH

5.2.1 Wahl des Versuchsdesigns

In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass die Applikation von exogenem ACTH die Nahrungsaufnahme reduziert, wie es auch in anderen Studien gezeigt werden konnte (137;188). Jedoch wurden bisher keine Experimente publiziert, die sich mit der physiologischen Rolle des endogenen ACTH im Rahmen der Appetitregulation beschäftigen. Wie in der Einleitung beschrieben wurde, entstehen α -MSH und ACTH aus dem gleichen Vorläuferprotein (siehe Abschnitt 2.3.3) und binden mit vergleichbarer Potenz an den MC3-R und MC4-R (siehe Abschnitt 2.3.7). Aufgrund dieser Voraussetzungen ist der Einsatz von klassischen Untersuchungsmethoden, wie der Einsatz von Rezeptorantagonisten und Oligonucleotid-Sonden (207), die gegen die mRNA von Peptiden gerichtet sind, nicht möglich. Als Alternative wurde in der vorliegenden Arbeit der Einsatz von spezifischen Antikörpern gewählt, die in der Lage sind, ihre entsprechenden Liganden effektiv zu binden und damit deren Wirkung zu blockieren.

Der Einsatz von Antikörpern, um die Wirkung von Neuropeptiden zu hemmen, hat im Vergleich zu anderen Methoden zahlreiche Vorteile. So ist es nicht erforderlich, dass sie intrazelluläre Kompartimente erreichen, um die neuropeptiderge Wirkung zu inhibieren und sie sind innerhalb von biologischen Geweben sehr stabil (208-210). Zudem konnte gezeigt werden, dass Antikörper nach ihrer Injektion in den lateralen Ventrikel innerhalb von wenigen Stunden durch das Hirngewebe diffundieren (211) und sich an Stellen, die das immunogene Epitop exprimieren, konzentrieren (212).

Turnbull et al. konnten zeigen, dass nach einer i.c.v. Injektion von 5 μ l Antiserum Antikörper nicht nur in verschiedenen Hirnregionen, sondern 30 Minuten nach der Applikation auch im systemischen Plasma nachweisbar waren (213). Die Applikation von 2 μ l Antiserum in den Globus pallidus, einer Region, die sehr weit vom lateralen Ventrikel entfernt ist, erzeugte nachweisbare Plasmalevel der injizierten Antikörper nach vier Stunden. Diese Beobachtungen machen eigentlich Kontrollexperimente notwendig, bei denen der Antikörper peripher appliziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde auf solche Experimente verzichtet, da mit Hilfe des ersten Experimentes (siehe 5.1) gezeigt werden konnte, dass der anorexigene Effekt des ACTH zentral vermittelt wird und das in die Peripherie gelangte ACTH die GC nicht nachweisbar stimuliert. Weiterhin besitzt ACTH in der Peripherie selbst keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, wie in Experimenten mit subkutaner Injektion von ACTH (100 μ g/kg und 200 μ g/kg) gezeigt werden konnte (214).

5.2.2 Wahl des Injektionsortes und der Dosis für die Antikörperapplikation

Wie unter Abschnitt 2.1.1 der Einleitung beschrieben, wurde durch zahlreiche Versuche, in denen gezielte Läsionen in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus gesetzt wurden, dessen Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt aufgedeckt. Innerhalb des ARC, der am ventralen Rand des Hypothalamus liegt und an den dritten Ventrikel grenzt, findet die Synthese orexigener (NPY, AgRP) und anorexigener (POMC, CART) Neuropeptide statt. Hauptsächlicher Zielort dieser Neuropeptide ist der PVN. Die Neuronen des PVN exprimieren in großer Menge u.a. den MC4-R, an den α -MSH bindet und seine Wirkung ausübt. Aufgrund dieser Tatsache wurde diese Gehirnregion in der vorliegenden Arbeit als Injektionsgebiet für die Antikörperapplikation gewählt.

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien, in denen Antikörper eingesetzt wurden, um selektiv Effekte von Peptiden zu blockieren. Die eingesetzten Dosen in den Arbeiten reichen von 1 μ g/Ratte (215) bis hin zu 15 μ g/Ratte (216) bei Applikation in den lateralen Ventrikel. Es liegen keine Veröffentlichungen vor, in denen die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten AK (s.u.) eingesetzt wurden. Da in unseren Experimenten die Applikation der AK direkt in einen hypothalamischen Kern (PVN) erfolgte, entschied sich unsere Arbeitsgruppe für eine eher niedrigere Dosis von 2 μ g/Ratte, gelöst in 1 μ l phys. Kochsalzlg. Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper (ACTH-AK, α -MSH-AK) wurden bei der Firma Bachem AG (Weil am Rhein, Deutschland) erworben. In Tab. 39 sind die Daten der Kreuzreaktivitäten der beiden Antikörper mit verschiedenen Peptiden dargestellt.

<u>ACTH-AK</u>		<u>α-MSH-AK</u>	
Peptide	% Kreuzreaktivität	Peptide	% Kreuzreaktivität
ACTH (Ratte)	100	α -MSH	100
ACTH (Mensch)	100	ACTH (Mensch)	0,02
ACTH-(18-39) (=CLIP) (Mensch)	100	ACTH (Ratte)	1,25
α -MSH	0	β -, γ -MSH	0
β -End	0	α -, β -, γ -End	0

Tab. 39: Kreuzreaktivität des ACTH-AK und α -MSH-AK mit anderen Peptiden

Diese Daten zeigen, dass der eingesetzte ACTH-AK keine Kreuzreaktivität zum α -MSH oder anderen strukturell verwandten Peptiden, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen, besitzt. Eine 100%-ige Kreuzreaktivität wurde zum ACTH-(18-39) (= CLIP) gefunden. In einer Studie

wurde gezeigt, dass dieses C-terminale Fragment nach i.c.v. Injektion in Tieren im Gegensatz zum ACTH die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht signifikant erhöht (188). Eine Blockierung von CLIP, einem natürlich im Hypothalamus vorkommenden Peptid, würde somit gegensätzliche Effekte, wie die Antagonisierung von ACTH, bewirken. Es ist somit vorstellbar, dass diese Effekte sich gegenseitig aufheben würden. Die Ergebnisse der nachfolgenden Experimente (siehe Abschnitt 3.5 und 3.6) haben jedoch gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen die Effekte des endogenen ACTH sehr stark sind und Veränderungen der Nahrungsaufnahme trotz der Kreuzreaktivität mit dem orexigen wirkenden CLIP nachweisbar waren. Die Daten der Firma Bachem AG zeigten auch eine 1,25%-ige Kreuzreaktivität des α -MSH-AK mit Ratten ACTH. Diese sehr geringe Kreuzreaktivität ist aber für die praktische Anwendung zu vernachlässigen.

Bei der Untersuchung der Effektivität des ACTH-AK wurde für die i.c.v. ACTH Applikation (1 nmol/Ratte) im Gegensatz zum ersten Experiment nur die Hälfte der dort verwendeten ACTH-Dosis (2 nmol/Ratte) eingesetzt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine i.c.v. Dosis von 4 μ g/Ratte (entspricht 0,9 nmol/Ratte) ausreicht, um eine anorexigene Wirkung über neun Stunden auszulösen (125). Da der Anteil an exogen zugeführten ACTH verringert wurde, konnte die eingesetzte AK-Menge relativ gering gehalten werden. Für die Testung des α -MSH-AK wurde die gleiche Konzentration an α -MSH (1 nmol/Ratte) eingesetzt, da auch für dieses Peptid zahlreiche Studien vorliegen, die den anorexigenen Effekt bei Applikation dieser Dosis in den lateralen Ventrikel nachgewiesen haben (118).

5.2.3 Einsparung von Versuchstieren

Aus dem Tierschutzbericht des Jahres 2003 geht hervor, dass die Bundesregierung bestrebt ist, die Anzahl von Tierversuchen weiter abzubauen (217) und auf das gemäß dem wissenschaftlichen Erkenntnisstand unerlässliche Maß zu beschränken (Tierschutzgesetz vom 25.05.1998 §9). Vor allem Versuchstierersatzmethoden werden durch die Bundesregierung in hohem Maße gefördert.

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht auf in-vitro Experimente ausgewichen werden, da die physiologische Relevanz eines Peptides nur im intakten Organismus untersucht werden kann. Es konnten ebenfalls keine Organokulturen als Ersatz benutzt werden, da in dieser Arbeit funktionelle Untersuchungen im Vordergrund stehen und dafür der gesamte Organismus einbezogen werden muss.

Um aber dennoch den Leitlinien der Bundesregierung zu folgen, wurde durch ein spezielles Versuchsdesign die Anzahl der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit auf ein Minimum reduziert. In den Experimenten zwei bis vier wurden bei jedem Tier drei verschiedene

Behandlungsvarianten getestet. Zwischen den einzelnen Behandlungen lag eine fünftägige Ausschwemmphase.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich diese Methode zumindest für Peptide bewährt hat (218). Sogar die Zeit der Ausschwemmphase wurde durch mehrere Arbeitsgruppen auf drei bzw. vier Tage reduziert (30;219). So erhielt in einer Arbeit jede Ratte jeweils α -MSH, β -MSH und phys. Kochsalzlg., wobei zwischen den Behandlungen drei Tage lagen (219).

5.2.4 Einfluss von ACTH und die Effektivität des ACTH-AK im in-vivo Experiment

Zur Überprüfung der Effektivität des ACTH-AK wurde den Tieren nach 24 Stunden Fasten i.c.v. ACTH und in einem zeitlichen Abstand von fünf Minuten der AK in den PVN appliziert.

Die Gabe von ACTH (1 nmol/Ratte) in den lateralen Ventrikel führte zu einer signifikanten Verringerung der Nahrungs- und Wasseraufnahme; wir konnten in dieser Studie die Ergebnisse aus dem ersten Experiment reproduzieren. Aufgrund des längeren Beobachtungszeitraums von 24 Stunden, im Gegensatz zu sechs Stunden im ersten Experiment, können wir weitere Aussagen über die Dauer des anorexigenen Effektes des ACTH machen. Es zeigte sich, dass die Nahrungsaufnahme durch die ACTH Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe (phys. Kochsalzlg./IgG) über 24 Stunden signifikant reduziert war. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Befunden von Al-Baranzaji et al., die ebenfalls nach 24 Stunden noch einen signifikanten Effekt beobachten konnten (188).

Vergleichbar mit den Ergebnissen des ersten Experimentes konnten wir durch die zentrale Applikation von ACTH ebenfalls eine signifikante Verringerung der Wasseraufnahme über sechs Stunden beobachten. Im Gegensatz zur Nahrungsaufnahme konnten wir keine signifikanten Unterschiede bei der Wasseraufnahme nach der sechsten Stunde feststellen. Bisher liegen keine Daten aus der Literatur vor, in denen bereits vergleichbare Untersuchungen durchgeführt wurden. Solche Informationen wären von großem Interesse, da sich die ACTH Effekte deutlich von den Effekten des α -MSH, das keine Wirkung auf die Wasseraufnahme besitzt (siehe nächster Abschnitt), unterscheidet.

Wie unter Abschnitt 5.1. schon beschrieben, würde es sinnvoll sein, in weiteren Tierversuchen zu untersuchen, ob die erniedrigte Wasseraufnahme abhängig oder unabhängig von der Nahrungsaufnahme ist. Auch hier sind Experimente mit nahrungsdeprivierten Tieren als auch Studien mit einem pair feeding Design denkbar.

Das Körpergewicht der Tiere wurde in diesem Experiment sechs und 24 Stunden nach der zentralen Applikation von ACTH bestimmt. Es zeigte sich zu beiden Zeitpunkten eine Verminderung des Körpergewichtes, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Die Arbeitsgruppe von Al-Barazanji et al. fanden nach 24 Stunden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (188).

Weiterhin fällt auf, dass die Tiere in beiden Versuchsgruppen (ACTH/IgG, phys. KochsalzlsG./IgG) über sechs Stunden weniger an Gewicht zugenommen haben als die vergleichbaren Tiere (d.h. sham operierten Tiere) im ersten Experiment (ACTH/sham, phys. KochsalzlsG./sham). Die Kontrolltiere (phys. KochsalzlsG./sham) des ersten Experimentes haben über sechs Stunden 15 g zugenommen und die phys. KochsalzlsG./IgG Ratten des zweiten Versuches nur 8 g. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den ACTH behandelten Tieren mit sham Operation des ersten Experimentes, die 8 g zugenommen haben, während die Ratten (ACTH/IgG) im zweiten Versuch nur 5 g an Gewicht zunahmen. Beim Vergleich der aufgenommenen Nahrung sechs Stunden nach dem Applikationszeitpunkt zeigte sich, dass die sham Tiere beider Gruppen, d.h. ACTH i.c.v. und Kontrolltiere, jeweils 4 g mehr Nahrung zu sich genommen hatten als die vergleichbaren Ratten im zweiten Experiment. Es scheint, dass auch die sham Tiere durch die Operation, trotz einer Erholungszeit von sieben Tagen, noch ein Nahrungsdefizit aufholen mussten.

Durch die gleichzeitige Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel und dem ACTH-AK in den PVN konnten wir nachweisen, wie effektiv der gewählte AK war, den anorexigenen Effekt seines Liganden zu blockieren. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die ACTH/ACTH-AK Gruppe sechs Stunden nach der Applikation der Substanzen 96,4 % der aufgenommenen Nahrungsmenge der Kontrolltiere (phys. KochsalzlsG./IgG) erreicht hat. Ähnliche Ergebnisse konnten wir zum gleichen Zeitpunkt bei der Wasseraufnahme feststellen, denn hier nahmen die Tiere gleich viel Wasser zu sich. Die Ergebnisse für den ACTH-AK zeigten deutlich, dass die durch das anorexigen wirkende Peptid ACTH verringerte Nahrungs- und Wasseraufnahme der Tiere vollständig blockiert werden konnte. Damit wurde gezeigt, dass der ACTH-AK in-vivo die Fähigkeit besitzt, die Wirkung seines Liganden effektiv zu hemmen.

Die alleinige Applikation des ACTH-AK in den PVN führte zu keiner Erhöhung der Nahrungs- bzw. Wasseraufnahme im Vergleich zur phys. KochsalzlsG./IgG Gruppe. Dieser Beobachtung ist eine Konsequenz des in dieser Arbeit eingesetzten experimentellen Designs, in dem den Tieren zunächst für 24 Stunden das Futter entzogen wurde, wodurch die endogenen POMC und damit auch ACTH-Level zum Zeitpunkt der ACTH-AK Applikation um 9 Uhr gering waren. Dass die endogenen POMC-Spiegel nach dem Fasten signifikant abnehmen, wurde bereits in der Studie von Pritchard et al. gezeigt (220). Dadurch ist kein Substrat vorhanden, das vom AK gebunden und dessen Wirkung damit blockiert werden kann.

5.2.5 Einfluss von α -MSH und die Effektivität des α -MSH-AK im in-vivo Experiment

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einzelne i.c.v. Applikation von α -MSH (1 nmol/Tier) in Wistar-Ratten nach 24 Stunden Fasten zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme führt. Übereinstimmend mit anderen Studien konnte eine signifikante Verminderung nur innerhalb der ersten drei Stunden nach Applikation nachgewiesen werden. In einer Studie wurde gezeigt, dass i.c.v. appliziertes α -MSH dosis-abhängig (1 nmol, 3 nmol, 6 nmol - jeweils pro Tier) nach einer, zwei und vier Stunden die Nahrungsaufnahme signifikant bei Wistar-Ratten reduziert (118). Nur die beiden hohen Dosen konnten auch einen signifikanten Effekt nach acht Stunden erzeugen. An Ratten, die 16 Stunden gefastet hatten, führte die i.c.v. Applikation der im Vergleich zu unserer Studie etwa doppelten Dosis α -MSH (2,5 nmol/Tier) zu einer signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme innerhalb der ersten zwei Stunden (188). Eine Dosis von 10 μ g/Ratte (entspricht 6 nmol/Ratte) führte auch bei ad-libitum gefütterten Tieren nach i.c.v. Applikation zu einer signifikanten Verringerung der Nahrungsaufnahme nach sechs Stunden, obwohl kein Unterschied nach drei Stunden zu beobachten war (166).

In der vorliegenden Studie bewirkte die Injektion von α -MSH im Gegensatz zur i.c.v. Applikation von ACTH bei den Versuchstieren nach 24 Stunden Fasten zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Wasseraufnahme. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Daten der Arbeitsgruppe von Millington et al., die ebenfalls bei i.c.v. Applikation von 1 μ mol α -MSH zu Beginn der Dunkelphase keinen Effekt auf Tiere nach einer Fastenzeit von 48 Stunden nachweisen konnte (166). In einer weiteren Studie wurde männlichen Wistar-Ratten für 24 Stunden bei freiem Zugang zu Futter das Trinkwasser entzogen und am nächsten Morgen zwischen zehn und elf Uhr erfolgte die Applikation von 5 μ g α -MSH (entspricht 3 nmol) in den lateralen Ventrikel (219). Auch in dieser Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen α -MSH-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studien und unserer Untersuchung belegen somit, dass α -MSH keinen Einfluss auf die Wasseraufnahme besitzt.

Neben der Untersuchung der Nahrungs- und Wasseraufnahme wurde auch das Körpergewicht nach sechs und 24 Stunden protokolliert. Eine Reduktion des Körpergewichtes wurde in unserer Studie zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. Vergleichbares zeigten auch Al-Baranzanji et al. bei Applikation von 2,5 nmol α -MSH pro Tier (188). Auch die i.c.v. Gabe von 50 μ g/Tier (entspricht 30 nmol/Tier), einer im Vergleich zu unserer Arbeit zwölffachen Dosis, hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht (218).

Im Gegensatz zu den vorher diskutierten einmaligen Applikationen wurde mit Hilfe einer chronischen Infusion von α -MSH (24 μ g/Tag/Ratte, entspricht 14,4 nmol/Tag/Ratte) in den

lateralen Ventrikel eine signifikante Reduzierung der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes über 24 Stunden induziert. Die Infusion wurde über sechs Tage durchgeführt, wobei an den folgenden Tagen die Wirkungen von α -MSH auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht nicht mehr nachweisbar waren (218). Der Verlust der Wirksamkeit trotz anhaltender Infusion von α -MSH könnte entweder durch eine Herunterregulation der MC-R oder kompensatorische Veränderungen nachgeschalteter oder paralleler neuronaler Signalwege erklärt werden. Die Effekte nach einmaliger Applikation von α -MSH unterscheiden sich von den Effekten, die durch die synthetischen Melanokortinagonisten MT-II und Nle4DPhe7 α -MSH (NDP-MSH) erzielt wurden: beide wirkten länger und stärker. Die i.c.v. Injektion von MT-II (1 nmol) löste bei Long-Evans-Ratten eine über 48 Stunden anhaltende Anorexie aus und verursachte einen signifikanten Gewichtsverlust nach vier, 24 und 48 Stunden (221). Auch die NDP-MSH Applikation (6 nmol) in den lateralen Ventrikel von Ratten verursachte eine signifikante Erniedrigung der Nahrungsaufnahme über 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe (222). Diese Beobachtungen lassen sich durch die höhere Affinität der beiden Peptide an den MC4-R und den weniger schnellen Abbau durch entsprechende Enzyme erklären (223), so dass es zu einer lang anhaltenden Aktivierung des MC-Signalweges kommt.

Mit den gleichen Experimenten, wie für den ACTH-AK beschrieben, wurde die Effektivität des α -MSH-AK untersucht. Die gleichzeitige Applikation von i.c.v. α -MSH und α -MSH-AK in den PVN führte dazu, dass die Tiere zu allen Beobachtungszeitpunkten etwa gleich viel Nahrung wie die Kontrollgruppe (phys. Kochsalzlg./IgG) zu sich nahmen (76,3 – 101,2 %). Der durch α -MSH ausgelöste anorexigene Effekt konnte also durch die zusätzliche Gabe des α -MSH-AK komplett blockiert werden. Diese Daten zeigen damit eindrucksvoll, dass der gewählte AK in der Lage ist, die Wirkung seines Liganden in-vivo effektiv zu hemmen.

5.3 Experiment 3: Überprüfung, ob die Effekte von exogenem ACTH durch das Peptid selbst oder das Prozessierungsprodukt α -MSH verursacht werden

Sowohl unsere Experimente also auch andere Versuche belegen, dass die zentrale Applikation von ACTH die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Jedoch kann aus unseren vorangegangenen Experimenten (siehe Abschnitt 5.1 und 5.2) bzw. Versuchen von anderen Arbeitsgruppen (137;188) nicht abgeleitet werden, ob für die beobachtete Wirkung auf den Appetit ACTH oder eines seiner durch proteolytische Spaltung aus diesem Peptid entstehenden Produkte wie α -MSH verantwortlich ist.

Im Hypothalamus spielen die vom POMC-abstammenden Peptide wie ACTH und α -MSH eine kritische Rolle in der Regulation des Appetits über die Bindung an den MC4-R und

MC3-R. Mit Hilfe der PC1 entsteht ACTH durch proteolytische Spaltung aus POMC. In einem zweiten Schritt entsteht durch PC2 unter Beteiligung diverser Co-Enzyme α -MSH.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde Versuchstieren nach Applikation von ACTH in den lateralen Ventrikel der α -MSH-AK in den PVN injiziert. Die gleichzeitige Applikation von ACTH und α -MSH-AK führte im Vergleich zur phys. Kochsalzlg./ α -MSH-AK Gruppe zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme über 24 Stunden. Nach sechs Stunden betrug die Reduzierung 36,5 %. Diese Daten sind vergleichbar mit denen der ACTH/IgG Gruppe, denn im Vergleich zur selben Kontrollgruppe erreichten sie eine Verminderung der Nahrungsaufnahme von 48,3 %. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass ACTH selbst in der Lage ist effektiv den Appetit zu reduzieren: Die Blockade von α -MSH durch seinen AK war ohne Effekt.

Die Generierung von Knockout-Tieren ist für die experimentelle Fragestellung in dieser Arbeit nicht sinnvoll, da die PC nicht nur an der Prozessierung von POMC zu ACTH, α -MSH und diversen weiteren, unter Punkt 2.3.3 der Einleitung angesprochenen Peptiden, beteiligt sind, sondern auch eine Rolle bei der Entstehung von zahlreichen anderen Peptiden, wie z.B. Insulin und CART spielen (224;225). Dadurch würden erzielte Ergebnisse nicht allein auf die Beeinflussung der POMC-Prozessierung zurückzuführen sein.

5.4 Experiment 4: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK in sattten und physiologisch hungrigen Tieren

Um die biologische Funktion putativer Neuropeptide innerhalb des ZNS aufzuklären, bedarf es einer großen Anzahl von verschiedenen Versuchsansätzen. Zunächst wird die biologische Aktivität von Peptiden in Hinblick auf Verhaltensveränderungen oder physiologische Auswirkungen beurteilt, die nach der Applikation der Peptide in den lateralen Ventrikel oder in definierte Gehirnregionen stattfinden. Weiterhin sind Studien notwendig, die sich mit der Lokalisation und Regulation des Neuropeptides und dessen Rezeptoren beschäftigen, um ein anatomisches Bild zu liefern, dass die mögliche zentralnervöse Aktivität des Peptides unterstützt. Die besten Hinweise auf die Funktion eines Peptides werden jedoch oft mit Studien erzielt, die die biologische Auswirkung einer Hemmung der Synthese des endogenen Neuropeptides untersuchen.

Wie unter Punkt 5.2.1 geschildert, war dies für die Untersuchung von ACTH und α -MSH nicht möglich. Daher wurden die in Abschnitt 5.2.4 und 5.2.5 beschriebenen ACTH-AK bzw. α -MSH-AK eingesetzt, um in Experimenten unter möglichst physiologischen Bedingungen die Relevanz von endogenem ACTH in der Appetitregulation zu untersuchen.

5.4.1 Abhängigkeit der ACTH- bzw. α -MSH-Wirkung vom Ernährungszustand der Tiere

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Versuchsansätze (satte und physiologisch hungrige Tiere) gewählt, um die physiologische Relevanz des endogenen ACTH bei der Regulation der Nahrungsaufnahme zu untersuchen.

Die Erzeugung von satten Tieren zum Zeitpunkt der Substanzapplikation um 19 Uhr erfolgte durch den Einsatz eines speziellen Fütterungsschemas, dem die Ratten zuvor ausgesetzt wurden. Wie bereits geschildert (siehe Abschnitt 3.5) wurde den Tieren zunächst für 24 Stunden die Nahrung entzogen, danach wurde ihnen um 9 Uhr des folgenden Tages das Futter ad-libitum zur Verfügung gestellt. Durch die 24-stündige Fastenzeit waren die Tiere hungrig, so dass sie nach Bereitstellung des Futters sofort mit der Nahrungsaufnahme begannen. Zum Versuchsbeginn, der Applikation der Substanzen um 19 Uhr, waren die Tiere daher satt.

Um für die hier dargestellten Versuche physiologisch hungrige Tiere, jedoch nicht nahrungsdeprivierte Versuchstiere zur Verfügung zu haben, wurden die Ratten während des gesamten Experimentes ad-libitum gefüttert. Da die Tiere entsprechend ihrem Aktivitätszyklus fast ausschließlich nachts Nahrung zu sich nahmen, waren sie zum Applikationszeitpunkt um 19 Uhr hungrig.

ACTH-AK bzw. α -MSH-AK Wirkung auf verschiedene Parameter in satten Tieren

Bei den satten Tieren verursachte die Applikation sowohl von ACTH-AK als auch α -MSH-AK in den PVN eine Erhöhung der Nahrungs- und Wasseraufnahme, die zu fast allen Beobachtungszeitpunkten (über 24 Stunden) das Signifikanzniveau erreichte. Eine additive Wirkung des Effektes konnte bei keinem der beiden Parameter durch die kombinierte Applikation beider Antikörper beobachtet werden.

Interessanterweise sind Effekte nach α -MSH-AK Gabe bei der Wasseraufnahme zu beobachten, die darauf schließen lassen, dass das endogene α -MSH an der Regulation des Trinkens beteiligt ist. Im Gegensatz zur offensichtlich vorhandenen Bedeutung physiologischer endogener α -MSH-Spiegel wurde in dem Experiment mit exogener Applikation von α -MSH (siehe Abschnitt 5.2), bei vermutlich niedrigen endogenen Leveln, keine Steigerung der Trinkmenge beobachtet.

Neben der Nahrungs- und Wasseraufnahme wurde sechs und 24 Stunden nach der AK-Applikation das Körpergewicht bestimmt. Es zeigte sich, dass nach 24 Stunden sowohl die ACTH-AK Gabe als auch die α -MSH-AK Applikation das Körpergewicht im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhten. Auch hier war die kombinierte Gabe der beiden AK nicht effektiver als die einzelnen AK Applikationen.

Wir spekulieren, dass bei den satten Tieren dieses Experimentes die endogenen Level der orexigen wirkenden Peptide ACTH und α -MSH hoch waren und daher eine Stimulation der MC4-R vorlag (220).

Durch Gabe der oben genannten AK wurden ACTH und α -MSH gebunden, standen daher weniger oder nicht mehr als Liganden am MC4-R zur Verfügung und konnten daher ihre orexigene Wirkung nicht mehr ausüben. Diese Befunde lassen vermuten, dass nicht nur α -MSH, sondern auch ACTH eine physiologische Bedeutung bei der Appetitregulation hat.

Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass durch die Gabe der ACTH-AK die Prozessierung von ACTH α -MSH beeinträchtigt wird. Wenn man hypothetisch von einer solchen Blockierung ausgeht, weisen unsere Ergebnisse dennoch darauf hin, dass endogenes ACTH bei satten Tieren eine physiologische Wirkung ausübt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben eine schnelle Steigerung der Nahrungsaufnahme gezeigt, die bereits 1-2 Stunden nach der ACTH-AK Applikation signifikant war (signifikant nach der ersten Stunde im Experiment 5 bzw. nach der zweiten Stunde im Experiment 5). Diese Beobachtung kann nur durch die AK-blockierte Wirkung des endogenen ACTH erklärt werden, da zu diesem Zeitpunkt, selbst bei vollständiger Blockierung der Prozessierung, noch von einem Vorhandensein von α -MSH im Hypothalamus ausgegangen werden kann. Dieses wird unterstützt durch die relativ lange Halbwertszeit des Peptides von ca. 30 min (im menschlichen Plasma 20 min (226), in der CSF von Ratten 33 min (227)). Über die Halbwertszeit von α -MSH im Gehirnparenchym und hier besonders im Hypothalamus ist nichts bekannt, so dass nur die Plasma bzw. CSF-Halbwertszeiten herangezogen werden können, um eine ungefähre Einschätzung zu erhalten.

Eine andere Möglichkeit, wie die Effekte des ACTH-AK auf die Nahrungsaufnahme diskutiert werden könnten, wäre, dass nicht ACTH selbst, sondern sein Spaltprodukt α -MSH diese Effekte ausgelöst hat. Dass dieses nicht der Fall ist, konnten wir mit Hilfe des dritten Experimentes, in dem die Tiere i.c.v. ACTH und α -MSH-AK in den PVN appliziert bekamen, nachweisen. Denn hier zeigte sich, wie unter Abschnitt 5.3. schon diskutiert wurde, dass ACTH selbst einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme besitzt: die Gabe eines α -MSH-AK vermindert nicht die Effekte von i.c.v. appliziertem ACTH.

Die schnelle Prozessierung des ACTH zu α -MSH wirft Fragen zur biologischen Bedeutung des ACTH auf. So wird in der Literatur von einem Verhältnis ACTH/ α -MSH von 1:20 berichtet (220;228). Jedoch unterstützt die Beobachtung von Al-Baranzanji et al. (188), dass ACTH über einen Zeitraum von sechs Stunden den Appetit stärker supprimiert als α -MSH, eine putative Rolle von ACTH. In der hier vorliegenden Arbeit wurden ACTH und α -MSH in zwei unabhängigen Experimenten (siehe Wirksamkeit der AK, Abschnitt 5.2) gegeben, so dass ein unmittelbarer Vergleich zwischen den entsprechenden Tiergruppen leider nicht möglich ist. Die Beobachtung aus der Studie von Al-Baranzanji et al. ist besonders in dem

Zusammenhang interessant, dass in den letzten Jahren zunehmend eine Regulation von PC1 und PC2 unter variablen Ernährungsbedingungen, wie auch unter Leptinrezeptorstimulation, diskutiert wird. So ist denkbar, dass über diese Regulationsmechanismen die Verhältnisse von POMC, ACTH und α -MSH reguliert und so die Stimulation der MC-R beeinflusst werden können. Bisher vorliegende Daten zeigen, dass auf diesem Gebiet noch ein großer Forschungsbedarf besteht.

Dass die kombinierte Gabe der beiden AK nicht zu einer weiteren Steigerung der Nahrungsaufnahme geführt hat, könnte zum einen darin begründet sein, dass der Appetit der Tiere schon durch die Applikation eines AK maximal stimuliert wurde und der zweite AK somit keinen weiteren, messbaren Einfluss ausüben konnte. Die Aufnahme von 30 g Futter pro Tag in den beiden AK-Gruppen (ACTH-AK, α -MSH-AK) entspricht etwa der Menge an Nahrung, die eine Ratte vergleichbaren Gewichts (290 g) nach 24 Stunden aufnehmen kann. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der ACTH-AK so an ACTH bindet, dass aus sterischen Gründen die proteolytische Spaltung durch PC verhindert wird und somit kein α -MSH entsteht. Die zusätzliche Gabe des α -MSH-AK bleibt damit ohne Auswirkung, da ohnehin kein α -MSH mehr entsteht, das gebunden werden kann. Weiterhin ist die Varianz zwischen den einzelnen Tieren relativ groß, so dass kleine Unterschiede, also ggf. auch weitere Steigerungen in der Nahrungsaufnahme nicht nachweisbar waren.

ACTH-AK bzw. α -MSH-AK Wirkung auf verschiedene Parameter in phys. hungrigen Tieren

Im Gegensatz zu den satten Tieren besaß die Applikation von ACTH-AK bzw. α -MSH-AK bei den physiologisch hungrigen Tieren keinen signifikanten Einfluss auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie auf die Änderung des Körpergewichtes. Auch die kombinierte AK-Applikation blieb ohne Wirkung. Wir spekulieren, dass bei diesen Tieren, im Gegensatz zu den satten Tieren der ersten Versuchsreihe, die endogenen Level von ACTH und α -MSH gering waren. Die Gabe von Antikörpern blieb daher ohne Wirkung.

Unsere Befunde, dass nur in satten Tieren, nicht aber in hungrigen, die Gabe von ACTH-AK und α -MSH-AK einen Effekt auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme hat, unterstützen unsere Hypothese, dass die POMC Level sich in Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Tiere verändern. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Pritchard et al., in denen gezeigt werden konnte, dass in ad-libitum gefütterten Tieren die POMC Level sowohl in der CSF als auch im Hypothalamus im Vergleich zu Ratten, die über 24 Stunden gefastet haben, erhöht sind (220). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Verfügbarkeit von POMC und ACTH vom Ernährungszustand abhängig ist und in satten Ratten hohe endogene ACTH-Level vorliegen. Pritchard et al. konnte keine signifikanten Unterschiede in den α -MSH-Level unter den verschiedenen Fütterungsregimes finden, obwohl wir durch die vorliegenden Daten eine effektive Stimulation der Nahrungsaufnahme durch ACTH-AK und α -MSH-AK

nachweisen konnten. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass beide vom POMC-abstammenden Peptide unter physiologischen Bedingungen die Nahrungsaufnahme in sattten Tieren unterdrücken.

5.5 Experiment 5: Effekt von ACTH-AK und α -MSH-AK auf die hypothalamische mRNA-Expression in sattten und physiologisch hungrigen Tieren

Neben der physiologischen Relevanz des ACTH innerhalb der Appetitregulation wurden in diesem experimentellen Ansatz die neuronalen Veränderungen untersucht, die durch die ACTH-AK bzw. α -MSH-AK Applikation ausgelöst wurden.

In dieser Studie wurden wie im vierten Experiment (siehe Abschnitt 5.4) durch zwei verschiedene Fütterungsschemata satte und physiologisch hungrige Tiere erzeugt. Diesen Tieren wurde um 19 Uhr entweder ACTH-AK oder α -MSH-AK appliziert und für die anschließenden zehn Stunden die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie das Körpergewicht protokolliert; anschließend wurden sie getötet. An den entnommenen Gehirnen dieser Tiere wurde die Expression von MC4-R und BDNF mRNA untersucht.

ACTH-AK- bzw. α -MSH-AK-Wirkung auf verschiedene Parameter in sattten Tieren

Auch in diesem Experiment verursachte die Applikation von sowohl ACTH-AK als auch α -MSH-AK in den PVN eine signifikante Erhöhung der Nahrungs- und Wasseraufnahme bei sattten Versuchstieren. Eine additive Wirkung des Effektes durch die kombinierte Applikation beider Antikörper konnte bei keinem der beiden Parameter beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind somit übereinstimmend mit denen aus dem Experiment 4 (siehe Abschnitt 5.4). Die Analyse der Zunahme des Körpergewichtes zeigte einen signifikanten Effekt der AK Applikation nach zehn Stunden. Vergleichbar mit dem vierten Experiment sind die Daten nach sechs Stunden nicht signifikant verschieden. Hiermit wird somit noch einmal bestätigt, dass sowohl ACTH als auch α -MSH eine wichtige Rolle in der Appetitregulation spielen.

ACTH-AK- bzw. α -MSH-AK-Wirkung auf verschiedene Parameter in physiologisch hungrigen Tieren

Die Befunde aus dem Experiment 4 konnten wir in diesem Experiment bestätigen: Die AK Applikation von ACTH und α -MSH erzeugte in den physiologisch hungrigen Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie in der Zunahme des Körpergewichtes im Vergleich zu den Tieren, die mit phys. Kochsalzlg. behandelt wurden.

Bei den geringen endogenen Leveln von ACTH und α -MSH, die durch das Fütterungsschemata erzeugt wurden, konnten die applizierten AK keine Wirkung ausüben.

ACTH-AK- bzw. α -MSH-AK- Wirkung auf die hypothalamische mRNA-Expression in satten Tieren

Die Expression der BDNF mRNA wurde in den satten Tieren durch die ACTH-AK und α -MSH-AK Applikation im Vergleich zur phys. Kochsalzlsg. Gruppe signifikant verringert. Wie schon unter Abschnitt 5.4 beschrieben wurde, sind bei satten Tieren die endogenen Level der POMC-abstammenden Peptide relativ hoch. Die applizierten AK blockierten die Wirkung von ACTH und α -MSH auf die BDNF mRNA-Expression, was zu einer Reduzierung der mRNA-Menge dieses nachgeschalteten Peptids im VMN führte. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Befunden von Xu et al., die gezeigt haben, dass durch ein zweitägiges Fasten, was ebenfalls zu einer Abnahme der POMC Menge führt, die Level der BDNF mRNA im VMN im Vergleich zu satten Tieren oder ad-libitum um 2/3 reduziert werden (51). Der inhibitorische Effekt der Nahrungsdeprivation auf die BDNF mRNA-Expression im VMN wurde durch die zusätzliche Gabe von MT-II, einem Melanokortinrezeptoragonisten, zum Teil aufgehoben. Die Level der BDNF mRNA nach MT-II Applikation waren im Vergleich mit den satten Tieren immer noch signifikant geringer, dies lässt darauf schließen, dass entweder der Turnover des MT-II zu schnell ist, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen, bzw. noch andere Signalwege, die durch den Ernährungszustand reguliert werden, die BDNF mRNA Expression beeinflussen (51).

Im Gegensatz zur Verringerung der BDNF mRNA Expression im VMN wurde durch die AK Applikation (ACTH-AK, α -MSH-AK und der Kombination von beiden AK) eine signifikante Erhöhung der MC4-R mRNA Arbeit nachgewiesen. Das Fehlen der Liganden des MC4-R bewirkte somit eine vermehrte Expression dieses Rezeptortypes im VMN.

ACTH-AK- bzw. α -MSH-AK-Wirkung auf die hypothalamische mRNA-Expression in physiologisch hungrigen Tieren

Durch die AK-Applikationen in den PVN konnte in physiologisch hungrigen Tieren kein Einfluss auf die mRNA-Expression des BDNF und MC4-R erzielt werden. Dies ist wahrscheinlich in der geringen POMC Expression und den dadurch geringen Level an ACTH und α -MSH im Hypothalamus begründet: die Applikation von ACTH-AK und α -MSH-AK bleibt ohne Wirkung und damit werden auch keine in ihrer Expression von ACTH und α -MSH abhängigen Peptid-mRNAs, wie die von MC4-R und BDNF, beeinflusst.

5.6 Experiment 6: Einfluss einer subchronischen Applikation von ACTH-AK bei ad-libitum gefütterten Tieren

In den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ACTH die Nahrungsaufnahme selbst beeinflussen kann. Deshalb wurde mit Hilfe dieses Experimentes in einem subchronischen Applikationsschema untersucht, ob die Gabe von ACTH-AK

(2 x täglich) einen Einfluss auf Nahrungs- und Wasseraufnahme der Tiere sowie die Entwicklung des Körpergewichtes über einen mehrtägigen Zeitraum besitzt. Nachtaktive Tiere, wie Ratten und Mäuse nehmen während des ganzen Tag-Nacht-Zyklus nicht gleichmäßig Nahrung auf, sondern die meiste Nahrung wird während der Nacht konsumiert (229). Aus diesem Grund wurde in dem vorliegenden Experiment die tägliche Änderung der Nahrungsaufnahme sowie der anderen Parameter sowohl für die Tag- als auch die Nachtphase getrennt untersucht. Damit konnte in diesem Experiment untersucht werden, ob die Antikörper-Applikation einen unterschiedlichen Einfluss in Abhängigkeit von der Tageszeit und damit dem Ernährungszustand der Tiere besitzt.

In unseren Experimenten zeigte sich, dass die Ratten, die immer freien Zugang zu Futter und Wasser hatten, durch die ACTH-AK Applikation eine signifikant erhöhte Nahrungsaufnahme während des Tages im Vergleich zu den Kontrolltieren (IgG Gruppe) besaßen. Im Gegensatz dazu konnten wir keine Unterschiede bei der Nahrungsaufnahme während der Nacht beobachten. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Befunden aus anderen Experimenten dieser Arbeit, in denen gezeigt werden konnte, dass ACTH-AK keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme besitzen, wenn die endogenen POMC-Level gering sind (siehe Abschnitt 5.4). Wie bereits diskutiert wurde, sind solche niedrigen ACTH und α -MSH Level in hungrigen Tieren nachweisbar. Dieses belegen zahlreiche Studien, in denen die Tiere 24 Stunden gefastet haben (220). In satten Tieren hingegen sind die endogenen Spiegel der POMC-abstammenden Peptide relativ hoch. Die Applikation der ACTH-AK in den Morgenstunden (8 Uhr) verursachte eine Blockierung des endogenen ACTH, was dann zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme der Tiere führte.

Wie aufgrund der Beobachtung, dass bei Betrachtung der Nahrungsaufnahme über 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden konnten, zu erwarten war, unterscheidet sich die Veränderung des Körpergewichtes zwischen ACTH-AK und IgG Tieren nicht.

Vergleichbare Ergebnisse wie für die Nahrungsaufnahme haben sich bei der Untersuchung der Wasseraufnahme gezeigt. Auch hier hatte die Applikation der ACTH-AK während des Tages einen signifikanten Einfluss, jedoch konnten wir im Vergleich zur IgG Gruppe keine Veränderungen während der Nacht feststellen.

6 Abkürzungsverzeichnis

³⁵ S-ATP	Deoxyadenosin 5' [alpha [³⁵ S]thio] triphosphate
3V	3. Ventikel
-/-	homozygoter Träger eines defekten Allels eines Gens
α-MSH	alpha-Melanozyten-stimulierendes Hormon
β-MSH	beta-Melanozyten-stimulierendes Hormon
β-END	beta-Endorphin
β-LPH	beta-Lipotropin
γ-LPH	gamma-Lipotropin
γ-MSH	gamma-Melanozyten-stimulierendes Hormon
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Außendurchmesser
ADX	Adrenalektomie
AgRP	Agouti-related protein
AK	Antikörper
AM	Amygdala
Aqua dest.	Aqua destillata
ARC	Nucleus arcuatus
AS	Aminosäure
A ^Y	lethal yellow Agouti Maus
BDNF	Brain-derived neurotrophic Faktor
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CART	Cocain-Amphetamin-regulierte Transkript
CC	Corpus callosum
CCK	Cholecystokinin
CCX	cerebraler Kortex
CLIP	Corticotropin-like intermediate lobe peptide
CPE	Carboxypeptidase E
cpm	counts per minute
CRH	Corticotropin-Releasing Faktor
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
Da	Dalton
DA-α-MSH	desacetyl-α-MSH
db/db	Diabetes
DMN	dorsomedialer Hypothalamus

DV	dorsal – ventral
fa/fa	Zucker
GABA	Gammaaminobuttersäure
GC	Glucocorticoide
GC-G	Guanin/Cytosin-Gehalt
GHS-R	Wachstumshormon-Sekretagoga Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HI	Hippocampus
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
i.c.v.	intracerebroventrikulär
IgG	Immunglobulin G
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	γ -Immunglobuline
ID	Innendurchmesser
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IR	Insulinrezeptor
ISH	in-situ Hybridisierung
JAK	Janus-Kinase
JP	joining peptide
K	Lysin
L	lateral
LHA	lateraler Hypothalamus
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MCH	Melanin-konzentrierendem Hormon
MC-R	Melanokortinrezeptor
ME	Eminentia mediana
MM	Molekulargewicht
MPO	präoptischen Kern
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT-II	Melanotan-II
N-AT	N-Acetyltransferase
NNR	Nebennierenrinde
NPY	Neuropeptid Y
NPY-R	Neuropeptid Y Rezeptor
NTS	Nucleus tractus solitarii der caudalen Medulla oblongata

ob/ob	obese
Ob-R	Leptinrezeptor
OC	Chiasma opticum
PAM	Peptidylglycyl- α -amidierende-Monooxygenase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Prohormonkonvertase
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PFA	perifornikale Region
phys. Kochsalzlg.	physiologischer Kochsalzlösung
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	paraventriculärer Hypothalamus
R	Arginin
RC	rostral - caudal
RIA	Radioimmunoassay
s.c.	subcutan
SE	Septum
SSC	Natriumcitratpuffer
STAT	Signaltransduktoren und –aktivatoren der Transkription
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase
TH	Thalamus
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRH	Thyrotropin-Releasing Hormon
Trk-B	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase-B Rezeptor
VMN	ventromedialer Hypothalamus
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

1. **Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS** 2001 Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 108:712-718
2. **Hebebrand J, Hesecker H, Himmelmann GW, Schaefer H, Remschmidt H** 1994 Altersperzentilen für den Body-Mass aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflussfaktoren. *Akt Ernähr Med* 19:259-265
3. **Hetherington A, Ranson S** 1940 Hypothalamic Lesions and Adiposity in the Rat. *Anatomical Record* 78:149-172
4. **Brobeck JR** 1946 Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev* 26:541-559
5. **Barsh GS, Schwartz MW** 2002 Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 3:589-600
6. **Levin BE, Routh VH** 1996 Role of the brain in energy balance and obesity. *Am J Physiol* 271:R491-R500
7. **Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW, Bray GA** 1986 Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol* 251:R1221-R1227
8. **Bernardis LL, Bellinger LL** 1998 The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Proc Soc Exp Biol Med* 218:284-306
9. **Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P** 1996 Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116
10. **Havrankova J, Brownstein M, Roth J** 1981 Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia* 20 Suppl:268-73.:268-273
11. **Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ** 2001 The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5:S63-7.:S63-S67
12. **Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS** 1991 Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10931-10935
13. **Seeley RJ, Payne CJ, Woods SC** 1995 Neuropeptide Y fails to increase intraoral intake in rats. *Am J Physiol* 268:R423-R427
14. **Elmquist JK, Flier JS** 2004 Neuroscience. The fat-brain axis enters a new dimension. *Science* 304:63-64

15. **Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS** 1999 Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68-100
16. **Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S** 2005 Appetite control. *J Endocrinol* 184:291-318
17. **Campbell RE, Grove KL, Smith MS** 2003 Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 973:223-232
18. **Lu XY, Barsh GS, Akil H, Watson SJ** 2003 Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23:7863-7872
19. **Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF** 1993 Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 611:18-24
20. **Menzaghi F, Heinrichs SC, Pich EM, Tilders FJ, Koob GF** 1993 Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y. *Brain Res* 618:76-82
21. **Huang Q, Rivest R, Richard D** 1998 Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (*ob/ob*) mice. *Endocrinology* 139:1524-1532
22. **Lechan RM, Fekete C** 2006 Chapter 12: The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153C:209-235.:209-235
23. **Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Tatro JB, Rand WM, Lechan RM** 2000 alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 289:152-156
24. **Bernardis LL, BOX BM, STEVENSON JA** 1963 Growth following hypothalamic lesions in the weanling rat. *Endocrinology* 72:684-92.:684-692
25. **Bernardis LL** 1970 Participation of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the "feeding center" and water intake circuitry of the weanling rat. *J Neurovisc Relat* 31:387-398
26. **Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T** 1998 Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402:460-474
27. **Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T** 1998 The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15043-15048

28. **Broberger C** 2005 Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 258:301-327
29. **Chen P, Williams SM, Grove KL, Smith MS** 2004 Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. *J Neurosci* 24:5091-5100
30. **Kim MS, Rossi M, Abusnana S, Sunter D, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Heath MM, Stanley SA, Seal LJ, Bhatti JR, Smith DM, Ghatei MA, Bloom SR** 2000 Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49:177-182
31. **de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG** 1998 The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327
32. **Nahon JL** 1994 The melanin-concentrating hormone: from the peptide to the gene. *Crit Rev Neurobiol* 8:221-262
33. **Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR** 1999 Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-1105
34. **Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przyppek R, Kanarek R, Maratos-Flier E** 1996 A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247
35. **Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E** 1998 Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396:670-674
36. **Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK** 1998 Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402:442-459
37. **Campbell RE, Smith MS, Allen SE, Grayson BE, Ffrench-Mullen JM, Grove KL** 2003 Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J Neurosci* 23:1487-1497
38. **Horvath TL, Diano S, van den Pol AN** 1999 Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19:1072-1087
39. **Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K** 1999 Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264:101-104
40. **Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G** 1999 Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48:2132-2137
41. **Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T** 1993 Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268:15174-15179

42. **Lindblom J, Schioth HB, Larsson A, Wikberg JE, Bergstrom L** 1998 Autoradiographic discrimination of melanocortin receptors indicates that the MC3 subtype dominates in the medial rat brain. *Brain Res* 810:161-171
43. **Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD** 1994 Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8:1298-1308
44. **Oberto A, Mele P, Zammaretti F, Panzica G, Eva C** 2003 Evidence of altered neuropeptide Y content and neuropeptide Y1 receptor gene expression in the hypothalamus of pregnant transgenic mice. *Endocrinology* 144:4826-4830
45. **Fathi Z, Cunningham AM, Iben LG, Battaglino PB, Ward SA, Nichol KA, Pine KA, Wang J, Goldstein ME, Iismaa TP, Zimanyi IA** 1997 Cloning, pharmacological characterization and distribution of a novel galanin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 51:49-59
46. **Stanley BG, Chin AS, Leibowitz SF** 1985 Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull* 14:521-524
47. **Kyrkouli SE, Stanley BG, Seirafi RD, Leibowitz SF** 1990 Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides* 11:995-1001
48. **Kelly J, Alheid GF, Newberg A, Grossman SP** 1977 GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 7:537-541
49. **Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K** 1997 Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138:947-954
50. **Ohata H, Suzuki K, Oki Y, Shibasaki T** 2000 Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res* 861:1-7
51. **Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF** 2003 Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-742
52. **Sugiyama N, Kanba S, Arita J** 2003 Temporal changes in the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 115:69-77
53. **Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R** 2001 Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15:1748-1757
54. **Kaplan DR, Miller FD** 2000 Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391

-
55. **Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H** 1992 Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51:513-532
 56. **Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS** 2004 A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7:1187-1189
 57. **Huang EJ, Reichardt LF** 2001 Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.:677-736
 58. **Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L** 1998 A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-688
 59. **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K** 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033
 60. **O'brien SN, Welter BH, Price TM** 1999 Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 259:695-698
 61. **Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, .** 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161
 62. **Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS** 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252
 63. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM** 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546
 64. **Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte DJ** 1992 Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13:387-414
 65. **Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW** 2003 Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 9:795-800
 66. **Banks WA** 2004 The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 490:5-12
 67. **Bagdade JD, Bierman EL, Porte D, Jr.** 1967 The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 46:1549-1557
 68. **Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW** 1993 Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92:1824-1830
 69. **Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte D, Jr., Woods SC** 1986 Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite* 7:381-386

70. **Menendez JA, Atrens DM** 1991 Insulin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res* 555:193-201
71. **Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP**, . 1992 Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608-3616
72. **Williams G, Gill JS, Lee YC, Cardoso HM, Okpere BE, Bloom SR** 1989 Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 38:321-327
73. **White JD, Olchovsky D, Kershaw M, Berelowitz M** 1990 Increased hypothalamic content of preproneuropeptide-Y messenger ribonucleic acid in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 126:765-772
74. **Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2000 Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141:4255-4261
75. **Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S** 2001 Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 280:904-907
76. **Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML** 2001 Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50:707-709
77. **Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR** 2001 Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50:2540-2547
78. **Hewson AK, Dickson SL** 2000 Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12:1047-1049
79. **Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M** 2003 Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144:1506-1512
80. **Larsson LI, Rehfeld JF** 1978 Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry* 58:23-31
81. **Moran TH, Kinzig KP** 2004 Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G183-G188
82. **Fried M, Mayer EA, Jansen JB, Lamers CB, Taylor IL, Bloom SR, Meyer JH** 1988 Temporal relationships of cholecystokinin release, pancreatobiliary secretion, and gastric emptying of a mixed meal. *Gastroenterology* 95:1344-1350
83. **Sahu A** 1998 Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology* 139:4739-4742

-
84. **Moran TH, Schwartz GJ** 1994 Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol* 9:1-28
 85. **de Weerth A, Pisegna JR, Huppi K, Wank SA** 1993 Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of the human cholecystokinin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 194:811-818
 86. **Monnikes H, Lauer G, Arnold R** 1997 Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat. *Brain Res* 770:277-288
 87. **Wang L, Barachina MD, Martinez V, Wei JY, Tache Y** 2000 Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul Pept* 92:79-85
 88. **Cone RD** 2006 Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 27:736-749
 89. **Castrucci AM, Hadley ME, Sawyer TK, Wilkes BC, al Obeidi F, Staples DJ, de Vaux AE, Dym O, Hintz MF, Riehm JP, .** 1989 Alpha-melanotropin: the minimal active sequence in the lizard skin bioassay. *Gen Comp Endocrinol* 73:157-163
 90. **Pintar JE, Schachter BS, Herman AB, Durgerian S, Krieger DT** 1984 Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testis. *Science* 225:632-634
 91. **Chen CL, Chang CC, Krieger DT, Bardin CW** 1986 Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology* 118:2382-2389
 92. **Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M** 1998 Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18:6631-6640
 93. **Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ** 1983 Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature* 306:374-376
 94. **Can G, Abdel-Malek Z, Porter-Gill PA, Gill P, Boyce S, Grabowski GA, Nordlund J, Farooqui J** 1998 Identification and sequencing of a putative variant of proopiomelanocortin in human epidermis and epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol* 111:485-491
 95. **Ermak G, Slominski A** 1997 Production of POMC, CRH-R1, MC1, and MC2 receptor mRNA and expression of tyrosinase gene in relation to hair cycle and dexamethasone treatment in the C57BL/6 mouse skin. *J Invest Dermatol* 108:160-165
 96. **Farooqui JZ, Medrano EE, Abdel-Malek Z, Nordlund J** 1993 The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. *Ann N Y Acad Sci* 680:508-10.:508-510
 97. **Slominski A, Paus R, Wortsman J** 1993 On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 93:C1-C6

98. **Whitfield PL, Seeburg PH, Shine J** 1982 The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersions with repetitive DNA. *DNA* 1:133-143
99. **Takahashi H, Hakamata Y, Watanabe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa S** 1983 Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene. *Nucleic Acids Res* 11:6847-6858
100. **Autelitano DJ, Lundblad JR, Blum M, Roberts JL** 1989 Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annu Rev Physiol* 51:715-26.:715-726
101. **Liotta AS, Loudes C, McKelvy JF, Krieger DT** 1980 Biosynthesis of precursor corticotropin/endorphin-, corticotropin-, alpha-melanotropin-, beta-lipotropin-, and beta-endorphin-like material by cultured neonatal rat hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1880-1884
102. **Cool DR, Normant E, Shen F, Chen HC, Pannell L, Zhang Y, Loh YP** 1997 Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88:73-83
103. **Bergeron F, Leduc R, Day R** 2000 Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* 24:1-22
104. **Pritchard LE, Turnbull AV, White A** 2002 Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172:411-421
105. **Tsigos C, Crosby SR, Gibson S, Young RJ, White A** 1993 Proopiomelanocortin is the predominant adrenocorticotropin-related peptide in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 76:620-624
106. **Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M** 1990 Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52:441-447
107. **Bergendahl M, Wiemann JN, Clifton DK, Huhtaniemi I, Steiner RA** 1992 Short-term starvation decreases POMC mRNA but does not alter GnRH mRNA in the brain of adult male rats. *Neuroendocrinology* 56:913-920
108. **Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV** 1998 Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47:294-297
109. **Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, Seeley RJ** 1999 Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci* 19:2362-2367
110. **Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG** 1997 Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46:2119-2123
111. **Hakansson ML, Meister B** 1998 Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68:420-427

-
112. **Bousquet C, Zatelli MC, Melmed S** 2000 Direct regulation of pituitary proopiomelanocortin by STAT3 provides a novel mechanism for immuno-neuroendocrine interfacing. *J Clin Invest* 106:1417-1425
 113. **Kim EM, Grace MK, Welch CC, Billington CJ, Levine AS** 1999 STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *Am J Physiol* 276:R1320-R1326
 114. **Mizuno TM, Makimura H, Silverstein J, Roberts JL, Lopingco T, Mobbs CV** 1999 Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti-related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. *Endocrinology* 140:4551-4557
 115. **Wardlaw SL, McCarthy KC, Conwell IM** 1998 Glucocorticoid regulation of hypothalamic proopiomelanocortin. *Neuroendocrinology* 67:51-57
 116. **Bousquet C, Ray DW, Melmed S** 1997 A common pro-opiomelanocortin-binding element mediates leukemia inhibitory factor and corticotropin-releasing hormone transcriptional synergy. *J Biol Chem* 272:10551-10557
 117. **Emeson RB, Eipper BA** 1986 Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus. *J Neurosci* 6:837-849
 118. **Abbott CR, Rossi M, Kim M, AlAhmed SH, Taylor GM, Ghatei MA, Smith DM, Bloom SR** 2000 Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res* 869:203-210
 119. **O'Donohue TL, Handelmann GE, Chaconas T, Miller RL, Jacobowitz DM** 1981 Evidence that N-acetylation regulates the behavioral activity of alpha-MSH in the rat and human central nervous system. *Peptides* 2:333-344
 120. **Cornish J, Callon KE, Mountjoy KG, Bava U, Lin JM, Myers DE, Naot D, Reid IR** 2003 alpha -melanocyte-stimulating hormone is a novel regulator of bone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E1181-E1190
 121. **Bolognia J, Murray M, Pawelek J** 1989 UVB-induced melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. *J Invest Dermatol* 92:651-656
 122. **Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M** 1996 Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1313:130-138
 123. **Catania A, Airaghi L, Manfredi MG, Vivirito MC, Milazzo F, Lipton JM, Zanussi C** 1993 Proopiomelanocortin-derived peptides and cytokines: relations in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 66:73-79
 124. **Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M** 2003 New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 994:133-40.:133-140
 125. **Poggioli R, Vergoni AV, Bertolini A** 1986 ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* 7:843-848

126. **Tsuji S, Bray GA** 1989 Acetylation alters the feeding response to MSH and beta-endorphin. *Brain Res Bull* 23:165-169
127. **Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U** 1999 Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5:1066-1070
128. **Wilson MG, Nicholson WE, Holscher MA, Sherrell BJ, Mount CD, Orth DN** 1982 Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinology* 110:941-954
129. **Eberle AN** 1988 *The Melanotropins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action*. Karger
130. **Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA** 1994 Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 93:2258-2262
131. **Ferrari W, Floris E, Paulesu F** 1955 [A peculiar impressive symptomatology induced in the dog by injections of ACTH injected into the cisterna magna.]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 31:862-864
132. **Ferrari W, Gessa GL, Vargiu L** 1963 Behavioral effects induced by intracisternally injected ACTH and MSH. *Ann N Y Acad Sci* 104:330-45.:330-345
133. **Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S** 1979 Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423-427
134. **Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, Skottner A** 2000 New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res* 42:393-420
135. **Bertolini A, Vergoni W, Gessa GL, Ferrari W** 1969 Induction of sexual excitement by the action of adrenocorticotrophic hormone in brain. *Nature* 221:667-669
136. **Bertolini A, Poggioli R, Vergoni AV** 1988 Cross-species comparison of the ACTH-induced behavioral syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 525:114-29.:114-129
137. **Vergoni AV, Poggioli R, Bertolini A** 1986 Corticotropin inhibits food intake in rats. *Neuropeptides* 7:153-158
138. **Barsh GS, Ollmann MM, Wilson BD, Miller KA, Gunn TM** 1999 Molecular pharmacology of Agouti protein in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* %20;885:143-52.:143-152
139. **Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP** 1992 Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71:1195-1204
140. **Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, .** 1994 Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802
141. **Willard DH, Bodnar W, Harris C, Kiefer L, Nichols JS, Blanchard S, Hoffman C, Moyer M, Burkhart W, Weiel J, .** 1995 Agouti structure and function:

- characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist. *Biochemistry* 34:12341-12346
142. **Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL** 1997 Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11:593-602
 143. **Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR, Van der Ploeg LH** 1997 ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 237:629-631
 144. **Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ** 1999 Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 19:RC26
 145. **Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL** 1997 Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 17:273-274
 146. **Morton GJ, Mystkowski P, Matsumoto AM, Schwartz MW** 2004 Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides* 25:667-674
 147. **Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ** 2000 Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-R52
 148. **Lu XY, Nicholson JR, Akil H, Watson SJ** 2001 Time course of short-term and long-term orexigenic effects of Agouti-related protein (86-132). *Neuroreport* 12:1281-1284
 149. **Haskell-Luevano C, Holder JR, Monck EK, Bauzo RM** 2001 Characterization of melanocortin NDP-MSH agonist peptide fragments at the mouse central and peripheral melanocortin receptors. *J Med Chem* 44:2247-2252
 150. **Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T** 1994 Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem* 269:13162-13166
 151. **Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE** 1996 Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 218:638
 152. **Luger TA, Lotti T** 1998 Neuropeptides: role in inflammatory skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10:207-211
 153. **Wikberg JE** 1999 Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol* 375:295-310
 154. **Labbe O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M** 1994 Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 33:4543-4549
 155. **Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, Yamada T** 1994 Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1214-1220

-
156. **Griffon N, Mignon V, Facchinetti P, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P** 1994 Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1007-1014
 157. **Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD** 1997 Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91:789-798
 158. **van der KM, Adan RA, Entwistle ML, Gispen WH, Burbach JP, Tatro JB** 1998 Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands. *Endocrinology* 139:2348-2355
 159. **de Wied D, Jolles J** 1982 Neuropeptides derived from pro-opiocortin: behavioral, physiological, and neurochemical effects. *Physiol Rev* 62:976-1059
 160. **Gonzalez MI, Celis ME, Hole DR, Wilson CA** 1993 Interaction of oestradiol, alpha-melanotrophin and noradrenaline within the ventromedial nucleus in the control of female sexual behaviour. *Neuroendocrinology* 58:218-226
 161. **Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, Johnson KR, Mountjoy KG, Cone RD** 1994 Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome* 5:503-508
 162. **Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T** 1993 Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268:8246-8250
 163. **Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB, Cone RD** 1993 Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8856-8860
 164. **Desarnaud F, Labbe O, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M** 1994 Molecular cloning, functional expression and pharmacological characterization of a mouse melanocortin receptor gene. *Biochem J* 299:367-373
 165. **Takeuchi S, Takahashi S** 1998 Melanocortin receptor genes in the chicken--tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol* 112:220-231
 166. **Millington GW, Tung YC, Hewson AK, O'Rahilly S, Dickson SL** 2001 Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat. *Neuroscience* 108:437-445
 167. **Hinney A, Becker I, Heibult O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum M, Remschmidt H, Hebebrand J** 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* 83:3737-3741
 168. **Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A** 1998 Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-157

-
169. **Krude H, Gruters A** 2000 Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 11:15-22
170. **Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, Delplanque J, Keogh JM, Luan J, Wareham NJ, Yeo GS, Bhattacharyya S, Froguel P, White A, Farooqi IS, O'Rahilly S** 2002 A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 11:1997-2004
171. **Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F** 1997 Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131-141
172. **Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho RE, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH** 2000 Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 9:145-154
173. **Santini F, Maffei M, Ceccarini G, Pelosini C, Scartabelli G, Rosellini V, Chiellini C, Marsili A, Lisi S, Tonacchera M, Agretti P, Chiovato L, Mammoli C, Vitti P, Pinchera A** 2004 Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 89:904-908
174. **Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O** 2005 Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:219-224
175. **Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S** 1998 A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111-112
176. **Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P** 2000 Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106:253-262
177. **Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J** 1999 Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1483-1486
178. **Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD** 1999 Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21:119-122
179. **Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH** 2000 Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 26:97-102

180. **Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD** 2000 A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141:3518-3521
181. **Lee YS, Poh LK, Loke KY** 2002 A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1423-1426
182. **Paxinos G, Watson C** 1986 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego
183. **Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ** 1998 Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J Physiol* 508:289-300
184. **Gall JG, Pardue ML** 1969 Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378-383
185. **John HA, Birnstiel ML, Jones KW** 1969 RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
186. **Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Handel M, Kriebitzsch J, Holtt V** 1999 Rational design of oligonucleotide probes to avoid optimization steps in in situ hybridization. *Brain Res Brain Res Protoc* 4:82-91
187. **Schrober D.** 1999 Untersuchung der Expression Synapsen-assoziiierter Proteine im Gehirn von *Rattus norvegicus* durch radioaktive in situ Hybridisierung. Dissertation. Universität Hamburg.
188. **Al-Barazanji KA, Miller JE, Rice SQ, Arch JR, Chambers JK** 2001 C-terminal fragments of ACTH stimulate feeding in fasted rats. *Horm Metab Res* 33:480-485
189. **Savontaus E, Conwell IM, Wardlaw SL** 2002 Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res* 958:130-138
190. **Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF** 1995 Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *Am J Physiol* 268:R142-R149
191. **Rivier C, Vale W** 1983 Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305:325-327
192. **Tempel DL, Leibowitz SF** 1994 Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 6:479-501
193. **Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, Boss O, Ricquier D, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud F** 1999 Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 48:365-370
194. **Thomas GB, Bennett PA, Carmignac DF, Robinson IC** 2000 Glucocorticoid regulation of growth hormone (GH) secretagogue-induced growth responses and GH secretagogue receptor expression in the rat. *Growth Horm IGF Res* 10:45-52

195. **Gispén WH, Wiegant VM, Greven HM, de Wied D** 1975 The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci* 17:645-652
196. **Gispén WH, Isaacson RL** 1981 ACTH-induced excessive grooming in the rat. *Pharmacol Ther* 12:209-246
197. **Sainio EL, Lehtola T, Roininen P** 1988 Radioimmunoassay of total and free corticosterone in rat plasma: measurement of the effect of different doses of corticosterone. *Steroids* 51:609-622
198. **Von Frijtag JC, Croiset G, Gispén WH, Adan RA, Wiegant VM** 1998 The role of central melanocortin receptors in the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal-axis and the induction of excessive grooming. *Br J Pharmacol* 123:1503-1508
199. **Weidenfeld J, Feldman S** 2000 Effects of adrenalectomy and corticosterone replacement on the hypothalamic-pituitary response to neural stimuli. *Brain Res* 877:73-78
200. **Yamasaki K, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC** 1990 Preferential saline or water intake by pinealectomized, adrenalectomized, and pinealectomized-adrenalectomized male rats. *Braz J Med Biol Res* 23:1177-1180
201. **Beaulieu S, Gagne B, Barden N** 1988 Glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content of rat hypothalamus. *Mol Endocrinol* 2:727-731
202. **Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF** 2000 BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19:1290-1300
203. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Gollub M, Wellman C** 1996 The effects of intrahippocampal BDNF and NGF on spatial learning in aged Long Evans rats. *Mol Chem Neuropathol* 29:211-226
204. **Nakagawa T, Ogawa Y, Ebihara K, Yamanaka M, Tsuchida A, Taiji M, Noguchi H, Nakao K** 2003 Anti-obesity and anti-diabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:557-565
205. **Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L** 1999 Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15239-15244
206. **Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith ML, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O** . 1993 Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10:151-164
207. **Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De SE, Harris RB** 1998 The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 9:1601-1606
208. **Tilders FJ, van Oers JW, White A, Menzaghi F, Burlet A** 1990 Antibodies to neuropeptides: biological effects and mechanisms of action. *Adv Exp Med Biol* 274:135-46.:135-146

-
209. **van Oers JW, Tilders FJ** 1991 Antibodies in passive immunization studies: characteristics and consequences. *Endocrinology* 128:496-503
 210. **van Oers JW, van Bree C, White A, Tilders FJ** 1992 Antibodies to neuropeptides as alternatives for peptide receptor antagonists in studies on the physiological actions of neuropeptides. *Prog Brain Res* 92:225-34.:225-234
 211. **Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM** 1992 Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J Neurochem* 59:1570-1573
 212. **Thomas LB, Book AA, Schweitzer JB** 1991 Immunohistochemical detection of a monoclonal antibody directed against the NGF receptor in basal forebrain neurons following intraventricular injection. *J Neurosci Methods* 37:37-45
 213. **Turnbull AV, Rivier CL** 1998 Intracerebroventricular passive immunization. II. Intracerebroventricular infusion of neuropeptide antisera can inhibit neuropeptide signaling in peripheral tissues. *Endocrinology* 139:128-136
 214. **Vergoni AV, Poggioli R, Marrama D, Bertolini A** 1990 Inhibition of feeding by ACTH-(1-24): behavioral and pharmacological aspects. *Eur J Pharmacol* 179:347-355
 215. **Okamoto S, Kimura K, Saito M** 2001 Anorectic effect of leptin is mediated by hypothalamic corticotropin-releasing hormone, but not by urocortin, in rats. *Neurosci Lett* 307:179-182
 216. **Lu N, Wang Y, Blecha F, Fels RJ, Hoch HP, Kenney MJ** 2003 Central interleukin-1beta antibody increases renal and splenic sympathetic nerve discharge. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1536-H1541
 217. **Deutscher B** 2003 Tierschutzbericht 2003, Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes. Gesetzestext
 218. **McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW** 2000 Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R695-R703
 219. **Kask A, Rago L, Wikberg JE, Schioth HB** 2000 Differential effects of melanocortin peptides on ingestive behaviour in rats: evidence against the involvement of MC(3) receptor in the regulation of food intake. *Neurosci Lett* 283:1-4
 220. **Pritchard LE, Oliver RL, McLoughlin JD, Birtles S, Lawrence CB, Turnbull AV, White A** 2003 Proopiomelanocortin-derived peptides in rat cerebrospinal fluid and hypothalamic extracts: evidence that secretion is regulated with respect to energy balance. *Endocrinology* 144:760-766
 221. **Thiele TE, van Dijk G, Yagaloff KA, Fisher SL, Schwartz M, Burn P, Seeley RJ** 1998 Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion. *Am J Physiol* 274:R248-R254
 222. **Brown KS, Gentry RM, Rowland NE** 1998 Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Regul Pept* 78:89-94

-
223. **Haskell-Luevano C, Hendrata S, North C, Sawyer TK, Hadley ME, Hruby VJ, Dickinson C, Gantz I** 1997 Discovery of prototype peptidomimetic agonists at the human melanocortin receptors MC1R and MC4R. *J Med Chem* 40:2133-2139
224. **Wang J, Xu J, Finnerty J, Furuta M, Steiner DF, Verchere CB** 2001 The prohormone convertase enzyme 2 (PC2) is essential for processing pro-islet amyloid polypeptide at the NH2-terminal cleavage site. *Diabetes* 50:534-539
225. **Stein J, Steiner DF, Dey A** 2006 Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications. *Peptides* 27:1919-1925
226. **Ashton H, Millman JE, Telford R, Thompson JW, Davies TF, Hall R, Shuster S, Thody AJ, Coy DH, Kastin AJ** 1977 Psychopharmacological and endocrinological effects of melanocyte stimulating hormones in normal man. *Psychopharmacology* 19;55:165-172
227. **De Rotte AA, Bouman HJ, Wimersma Greidanus TB** 1980 Relationships between alpha-MSH levels in blood and in cerebrospinal fluid. *Brain Res Bull* 5:375-381
228. **Perello M, Stuart RC, Nilni EA** 2007 Differential effects of fasting and leptin on pro-opiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (Epub ahead of print)
229. **Le Magnen J** 1971 Advances in studies on the physiological control and regulation of food intake. In: *Progress in physiological psychology*. London-New York: Academic Press IV:203-261

8 Anhang

8.1 Liste der verwendeten Substanzen

Name	Summenformel	MM in g/mol	Bezugsquelle
Chloroform	CHCl ₃	119,38	Sigma, Taufkirchen
Deoxyadenosin 5`[alpha- ³⁵ S]thio]triphosphate			Sigma, Taufkirchen
Denhardt`s Solution (50mg/5ml)			Sigma, Taufkirchen
DEPC	C ₆ H ₁₀ O ₅	162,14	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat		~500.000	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	142,00	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	154,20	Sigma, Taufkirchen
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292,25	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	Apotheke, Magdeburg
Formamid (deionisiert)	CH ₃ NO	45,03	Sigma, Taufkirchen
Hefe tRNA (Typ X-SA)			Sigma, Taufkirchen
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238,30	Sigma, Taufkirchen
Isoamylalkohol	C ₅ H ₁₂ O	88,15	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	KCl	74,55	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	136,10	Sigma, Taufkirchen
Lachs Sperma DNA			Gibco, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Sigma, Taufkirchen
Na ₃ -Citrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O	294,10	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	NaOH		Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	(CH ₂ O) _n	30,03	Sigma, Taufkirchen
Rotiphenol	C ₆ H ₆ O	94,11	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	HCl	36,46	Sigma, Taufkirchen
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase			Promega, Mannheim
Trizma® Base	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,14	Sigma, Taufkirchen

Tab. 40: Chemikalien

Name	Wirtstier	Bezugsquelle
α-MSH-Antikörper	Kaninchen	Bachem AG, Weil am Rhein
ACTH-Antikörper	Kaninchen	Bachem AG, Weil am Rhein
IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Seelze

Tab. 41: Antikörper

Name	Bezugsquelle
Ketanest® 50 mg/ml	Parke-Davis GmbH Berlin, Freiburg
Rompun® 2 %	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Vetranquil® 1 %	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf

Tab. 42: Anästhetika

8.2 Liste der verwendeten Materialien

Operationsmaterialien	Hersteller
chirurgische Instrumente	Firma Burchardt, Mainz
chirurgisches Nahtmaterial Vicryl 4-0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Clauden®-Watte	Lohmann, Neuwied
Dental-Zement Aqua Cem®	DeTrey GmbH, Konstanz
Edelstahlschrauben	Messinger Schrauben GmbH, Frankfurt am Main
fused silica - Kapillare	Laser 2000, Weßling
Hamiltonspritze, 5µl	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizmatte: Temperatur-Controller, CMA/150	Carnegie Medicin, Stockholm, Schweden
Kanülen, diverse Größen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pattex Sekundenkleber Blitz Kleber Gel	Henkel KGaA, Düsseldorf
Polyethylenschlauch	Portex, Kent, England
Skapelle	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Spritzen, Injekt 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen, Omnifix 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Wundklammern N. Michel 7,5 x 1,75 mm	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

Tab. 43: Operationsmaterialien

Name	Bezugsquelle
Biomax MR Film	Kodak, Stuttgart
Einbettmedium, Jung	Leica, Nussloch
Oligonucleotide	Biomers, Ulm
Parafilm	American National Can TM, Greenwich, USA
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Szintillatorflüssigkeit, Rotiszint® eco plus	Roth, Karlsruhe

Tab. 44: sonstige Materialien

8.3 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Dentalbohrer	Reco-Dental, Wiesbaden
stereotaktische Apparatur	Föhr Medical Instruments, Pohlheim

Tab. 45: Geräte für die Operation

Gerät	Hersteller
Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Gammazähler	EG & G Bertold, Bad Wildbad
Megafuge 3,0 R, Hereaus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Milli-Q-Water-Purification-Systems	Millipore, Milford, England
Kryostat	Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim
Rüttler, Reax top	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Wallac Counter, 1450 MicroBeta	Trilux, Freiburg
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach

Tab. 46: sonstige Geräte

8.4 Pufferlösungen für die in-situ Hybridisierung

Alle verwendeten Substanzen dürfen nur mit Spateln entnommen und in Bechergläser gegeben werden, die RNase frei sind. Hierfür werden die Spatel und Bechergläser für mehrere Stunden bei 180 °C im Trockenschrank erhitzt und bis zur Benutzung ohne zwischenzeitlichen Hautkontakt gelagert. Für die Herstellung von RNase freien Rührfischen werden diese zunächst für 24 Stunden in Wasser mit 0,1 % DEPC gelagert und anschließend autoklaviert.

8.4.1 Herstellung von Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS)

Material:

- Aqua dest.
- DEPC
- NaCl
- Na₂HPO₄
- KCl
- KH₂PO₄

Methode:

für 1 l einer 10 x PBS Stammlösung mit pH = 7,3

1. 80,06 g NaCl, 2,01 g KCl, 6,11g Na₂HPO₄ und 1,91 g KH₂PO₄ unter Rühren in Aqua dest. lösen (Flüssigkeitsmenge etwas geringer als endgültige Menge)
2. pH-Wert bestimmen und gegebenenfalls mit NaOH einstellen
3. auf endgültige Menge mit Aqua dest. auffüllen
4. Zugabe von 1 ml DEPC und gut schütteln, 24 Stunden stehen lassen

5. autoklavieren

Für eine 1 x PBS Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

8.4.2 Herstellung von Natriumcitratpuffer (SSC)

Material:

- Aqua dest.
- DEPC
- NaCl
- Na₃-Citrat

Methode:

für 1 l einer 10 x SSC Stammlösung mit pH = 7,0

1. 87,66 g NaCl und 44,12 g Na₃-Citrat unter Rühren in Aqua dest. lösen (Flüssigkeitsmenge etwas geringer als endgültige Menge)
2. pH-Wert bestimmen und gegebenenfalls mit 1 M HCl einstellen
3. auf endgültige Menge mit Aqua dest. auffüllen
4. Zugabe von 1 ml DEPC und gut schütteln, 24 Stunden stehen lassen
5. autoklavieren

Für eine 1 x SSC Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

8.4.3 Herstellung von Tris-EDTA-Puffer (TE)

Material:

- DEPC-Wasser
- EDTA
- Trizma[®] Base

Methode:

für 1 l einer 10 x TE Stammlösung

1. 1,21 g Trizma[®] Base unter Rühren in 800 ml DEPC-Wasser lösen
2. pH-Wert bestimmen und auf 7,5 mit 1 M HCl einstellen
3. 3,72 g EDTA unter Rühren in 100 ml DEPC-Wasser lösen

-
4. pH-Wert bestimmen und auf 8,0 mit 1 M HCl einstellen
 5. beide Lösungen vereinigen und mit DEPC-Wasser auf 1 l auffüllen

Für eine 1 x TE Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

8.4.4 Herstellung von Hybridisierungspuffer

Material:

- Formamid
- HEPES
- NaCl
- Dithiothreitol
- EDTA
- Dextransulfat
- Denhardt's Solution
- Lachs Sperma DNA
- Hefe tRNA

Methode:

für 20 ml Hybridisierungslösung

1. 10 ml Formamid, 2 g Dextransulfat und 308,4 mg Dithiothreitol mischen und vortexen bis sich alles gelöst hat
2. Zugabe von 47,7 mg HEPES, 701,2 mg NaCl, 7,44 mg EDTA, 0,4 ml Denhardt's Solution, 2 mg Lachs Sperma DNA und 2 mg Hefe tRNA
3. auf endgültige Menge mit DEPC-Wasser auffüllen

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die mir in irgendeiner Form geholfen und so zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die es mir ermöglichte meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern und einen wichtigen Schritt für meinen weiteren Werdegang bedeutet. Seine Anregungen waren stets hilfreich und trugen zur Bereicherung dieser Arbeit bei.

Herrn PD Dr. med Ralf Lobmann, den kommissarischen Leiter der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten für die Möglichkeit die Arbeit in dieser Abteilung durchzuführen. Zudem ermöglichte mir Herr PD Dr. Lobmann die Teilnahme an verschiedenen Kongressen, bei denen ich Teile meiner Arbeit präsentieren konnte.

Frau Dr. Carla Schulz für ihre hervorragende Betreuung während der Planung und Durchführung der Experimente sowie der Anfertigung der schriftlichen Arbeit. Sie verstand es mich in fachlicher aber auch in persönlicher Hinsicht immer neu zu motivieren.

Darüber hinaus möchte ich allen Freunden danken, die sich immer wieder für Diskussionen über meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt haben und mir dabei helfen Zweifel auszuräumen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets auf jede nur erdenkliche Weise bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt haben und ohne deren Unterstützung mein bisheriger Werdegang nicht möglich gewesen wäre.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

Zentrale Bedeutung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) bei der Regulation des Körpergewichtes – experimentelle Untersuchungen zum Wirkmechanismus

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 24.04.2007

Kerstin Paulus

11 Lebenslauf

Dipl.-Biol. Kerstin Paulus

geboren am 29. Juli 1978 in Magdeburg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1985 – 1991	Grundschule in Magdeburg (Hugo-Launicke Schule)
1991 – 1997	Gymnasium in Magdeburg (Bettina-von-Arnim Schule) Abschluss: Abitur

Hochschulbildung:

1997 - 1999	Grundstudium der Biologie (Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg)
1999 - 2003	Hauptstudium der Biologie (Schwerpunkt: Neurobiologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg)
Okt. 2001- Mai 2003	Anfertigung der Diplomarbeit an der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
Mai 2003	Hochschul-Abschluss: Diplom-Biologin
Mai 2003 -	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Anfertigung der Promotionsarbeit an der Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg

12 Publikationen

- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Central nervous effects of leptin and insulin on hippocampal leptin and insulin receptor expression following a learning task in wistar rats. *Neuropsychobiology* 51: 100-106, 2005
- Schulz C., Paulus K., Lehnert H.: Central nervous and metabolic effects of intranasally applied leptin. *Endocrinology* 145: 2696-2701, 2004

- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Role of hypothalamic ACTH and α -MSH in appetite regulation – an in-situ hybridization study of BDNF and MC4-receptor mRNA expression. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 115, Suppl.1, P01-137, 2007
- Scholz T., Scheumann K., Paulus K., Lehnert H., Schulz C.: Effects of rosiglitazone on pancreatic islet 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in a murine model of diet-induced obesity. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 115, Suppl.1, P02-054, 2007
- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Endogenous adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in the regulation of food intake. 88th Annual Meeting of the Endocrine Society, Abstract, P1-253, 2006
- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Role of central nervous ACTH in the regulation of food intake. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 114, Suppl.1, S27, P38, 2006
- Fliedner S., Paulus K., Lehnert H., Schulz C.: Brain and peripheral uptake and distribution of 125J-leptin following intranasal application. 7th European Congress of Endocrinology, Göteborg, 2005
- El-Haschimi K., Schulz C., Rüter W., Paulus K., Lehnert H.: Effects of Metyrapone on food intake, body weight and leptin signalling in the brain in diet-induced obesity (DIO). *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 112, Suppl.1, S49, P100, 2004
- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Effects of Metyrapone on food intake, body weight and leptin signalling in the brain in diet-induced obesity (DIO). *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 112, Suppl.1, S74, P187, 2004
- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Zentralnervöse Effekte von Leptin und Insulin auf hippocampal-vermittelte Gedächtnisprozesse. *Diabetes und Stoffwechsel* 12, Suppl.1, S 97, 2003
- Schulz C., Paulus K., Lehnert H.: Central nervous and metabolic actions of intranasally applied leptin. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 111, Suppl.1, S10, V27, 2003
- Paulus K., Schulz C., Lehnert H.: Central nervous effects of leptin and insulin on hippocampal memory formation. 85th Annual Meeting of the Endocrine Society, Abstract, S18, P1-209, 2003
- Schulz C., Paulus K., Lehnert H.: Central nervous and metabolic actions of intranasally applied leptin. 85th Annual Meeting of the Endocrine Society, Abstract, S48, OR2-3, 2003