

**Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hendrik Lehnert**

**Experimentelle Untersuchungen
zum Einfluss von Nesfatin-1 und dem
melanocortinergen System auf die
Energiehomöostase**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

Vorgelegt von
Anna-Maria E. Wilz
aus Offenbach am Main

Lübeck 2014

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hendrik Lehnert
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cornelis de Wit

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2015

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 09.07.2015

Promotionskommission der Sektion Medizin

Meinem Großvater Helmut Jung

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 2.1 | Grundlagen der Energiehomöostase | 3 |
| 2.2 | Direkte und indirekte Kalorimetrie | 3 |
| 2.3 | Der Hypothalamus als Regulationszentrum des Energiehaushalts | 4 |
| 2.4 | Das zentralnervöse NUCB2/Nesfatin-System | 4 |
| 2.4.1 | Synthese und Vorkommen von Nesfatin-1 | 4 |
| 2.4.2 | Zentralnervöse Effekte von Nesfatin-1 | 6 |
| 2.4.3 | Interaktionen von Nesfatin-1 mit anderen Neurotransmittersystemen | 7 |
| 2.5 | Das zentralnervöse Melanocortinsystem | 9 |
| 2.5.1 | Synthese und Vorkommen von α -MSH und ACTH | 9 |
| 2.5.2 | Zentralnervöse Effekte von α -MSH und ACTH | 9 |
| 2.5.3 | Melanocortinrezeptoren | 10 |
| 2.5.4 | Interaktionen des Melanocortinsystems mit anderen Neurotransmittersystemen | 11 |
| 2.6 | Fragestellung | 11 |
| 3 | Material und Methoden | 13 |
| 3.1 | Versuchstiere und Tierhaltung | 13 |
| 3.2 | Beschreibung der verwendeten Antikörper | 13 |
| 3.3 | Herstellung der Mikroinjektionseinheiten | 14 |
| 3.4 | Durchführung der Tierexperimente | 15 |
| 3.4.1 | Implantation der Mikroinjektionseinheiten | 15 |
| 3.4.2 | Darstellung und Erläuterung des experimentellen Designs | 18 |
| 3.4.3 | Substanzapplikation in den PVN | 22 |
| 3.4.4 | Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts | 22 |
| 3.4.5 | Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe als Maß für die Thermogenese | 22 |
| 3.4.6 | Tötung der Versuchstiere | 24 |
| 3.5 | Untersuchung der mRNA-Expression im Hypothalamus und in der NTS-Region | 24 |
| 3.5.1 | Präparation von Hypothalamus und NTS-Region | 25 |
| 3.5.2 | Gewebehomogenisierung, RNA-Gewinnung und cDNA-Synthese | 25 |
| 3.5.3 | Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) | 26 |
| 3.6 | Auswertung und statistische Analyse der Messergebnisse | 27 |
| 3.6.1 | Auswertung der Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts | 28 |
| 3.6.2 | Auswertung der Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe als Maß für die Thermogenese | 28 |
| 3.6.3 | Auswertung der Messung der mRNA-Expression | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4 | Ergebnisse | 30 |
| 4.1 | Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems (Exp. 1) | 30 |
| 4.1.1 | Kumulative Nahrungs- und Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts nach Applikation der Antikörper in den PVN | 31 |
| 4.1.2 | Nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN | 32 |
| 4.1.3 | mRNA-Expression nach Applikation der Antikörper in den PVN | 33 |
| 4.2 | Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime (Exp. 2) | 33 |
| 4.2.1 | A. Experimente während der Aktivitätsphase | 33 |
| 4.2.2 | B. Experimente während der Ruhephase | 41 |
| 5 | Diskussion | 44 |
| 5.1 | Die Bedeutung von Nesfatin-1, α-MSH und ACTH für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase | 44 |
| 5.2 | Antagonisierung von Nesfatin-1, α-MSH und ACTH nach pharmakologischer Stimulation während der Ruhephase (Exp. 1) | 45 |
| 5.3 | Antagonisierung von Nesfatin-1, α-MSH und ACTH nach Stimulation durch ein spezielles Fütterungsregime (Exp. 2) | 47 |
| 5.3.1 | Experimente während der Aktivitätsphase (Exp. 2A) | 47 |
| 5.3.2 | Experimente während der Ruhephase (Exp. 2B) | 54 |
| 6 | Zusammenfassung | 57 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 59 |
| 8 | Anhang | 64 |
| 8.1 | Angaben zur Genehmigung der Tierversuchsvorhaben | 64 |
| 8.2 | Herstellung der verwendeten Lösungen | 64 |
| 8.2.1 | Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Wasser | 64 |
| 8.2.2 | Tris-EDTA- (TE-) Puffer (pH = 7,4) | 65 |
| 8.3 | Arbeitsanweisung zur Isolierung der RNA | 65 |
| 8.4 | Arbeitsanweisung zur Synthese der cDNA | 66 |
| 8.5 | Arbeitsanweisung zur Durchführung der qRT-PCR | 67 |
| 8.6 | Abbildungen zu Exp. 1: Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems | 69 |
| 8.7 | Abbildung zu Exp. 2A: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Aktivitätsphase | 71 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 8.8 | Statistik zu Exp. 2A: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Aktivitätsphase | 71 |
| 8.8.1 | Nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN | 71 |
| 8.8.2 | Nahrungs- und Wasseraufnahme nach Applikation der Antikörper in den PVN | 72 |
| 8.9 | Abbildungen zu Exp. 2B: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Ruhephase | 73 |
| 9 | Danksagung | 75 |
| 10 | Lebenslauf | 76 |

1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| AD | Außendurchmesser |
| AgRP | Agouti-Related Peptide |
| AK | Antikörper |
| α -MSH | α -Melanozyten-stimulierendes Hormon |
| ANOVA | Varianzanalyse |
| ARC | Nucleus arcuatus |
| BMI | Body-Mass-Index |
| CART | Cocaine- and Amphetamine Regulated Transcript |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CRF | Corticotropin Releasing Factor |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HPA-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin = Serotonin |
| i.c.v. | intracerebroventrikulär |
| i.m. | intramuskulär |
| i.p. | intraperitoneal |
| ID | Innendurchmesser |
| IgG | Immunglobulin G |
| MAP | mittlerer arterieller Blutdruck |
| mCPP | meta-Chlorphenylpiperazin |
| MC3- (4/5)-R | Melanocortin-3 (-4/-5)-Rezeptor |
| mRNA | messenger (= Boten-) Ribonukleinsäure |
| MW | Mittelwert |
| Nes-1 | Nesfatin-1 |
| NPY | Neuropeptid Y |
| NTS | Nucleus tractus solitarius |
| NUCB2 | Nucleobindin 2 |
| OD | optische Dichte |
| PE | Polyethylen |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PC | Prohormonkonvertase |
| p.i. | post iniectionem |

| | |
|-----------|---|
| POMC | Proopiomelanocortin |
| PVN | Nucleus paraventricularis |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion |
| SD | Standardabweichung |
| SON | Nucleus supraopticus |
| SPSS | Statistic Package for Social Sciences |
| TE-Puffer | Tris-EDTA-Puffer |
| TH | Tyrosinhydroxylase |
| TRH | Thyreotropin Releasing Hormon |
| UCP1 | Uncoupling Protein 1 |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

2 Einleitung

2.1 Grundlagen der Energiehomöostase

Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase, also des Gleichgewichts zwischen Energiezufuhr und Energieumsatz, ist eine hochkomplexe Aufgabe, der sich jeder Organismus ununterbrochen stellen muss. Bereits eine gering, aber dauerhaft positive Energiebilanz spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Adipositas. Diese bedingt zahlreiche Komorbiditäten und stellt aufgrund ihrer steigenden Prävalenz nicht nur für den individuellen Gesundheitszustand der Betroffenen, sondern auch für das Gesundheitssystem eine ernstzunehmende Belastung dar.

Mit jeder Nahrungsaufnahme wird dem Körper chemische Energie zugeführt, die vor allem in den subkutanen und viszeralen Fettdepots gespeichert werden kann und letztlich in der Atmungskette in den zellulären Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt und somit nutzbar gemacht wird. Die Freisetzung von Energie erfolgt durch Arbeit im Sinne körperlicher Aktivität und in Ruhe vor allem durch die Abgabe von Wärme. Letztere lässt sich durch die Kalorimetrie quantifizieren.

2.2 Direkte und indirekte Kalorimetrie

Der allgemein anerkannte Goldstandard für die Quantifizierung der Wärmeproduktion von Versuchstieren ist die direkte Bestimmung der von einem Individuum abgegebenen Wärmemenge mittels eines Kalorimeters. Dennoch ist die indirekte Kalorimetrie oder Respirometrie, bei der die Wärmeproduktion über den gemessenen Sauerstoffverbrauch berechnet wird, aufgrund der geringeren Kosten und der Einfachheit in der Durchführung das derzeit weitaus häufiger angewendete Verfahren. Eine akkurate Bestimmung der Wärmeproduktion und der Stoffwechsel-Rate in von der Norm abweichenden metabolischen Zuständen ist jedoch nur mittels direkter Kalorimetrie möglich. Auch ist die indirekte Kalorimetrie für pharmakologisch beeinflusste sowie für mutante oder transgene Tiere bis heute nicht validiert (1). Darüber hinaus konnte die Entwicklung einer mit einfachen Mitteln herzustellenden neuen Variante eines Kalorimeters (2) durch Prof. em. Dr. Ingolf Lamprecht von der Freien Universität Berlin die Kosten des direkten Verfahrens deutlich reduzieren.

2.3 Der Hypothalamus als Regulationszentrum des Energiehaushalts

Die Regulation des Energiehaushalts ist ein äußerst komplizierter Vorgang. Zahlreiche zentralnervöse und periphere Systeme spielen dabei eine Rolle. Das übergeordnete Integrationssystem bildet der Hypothalamus. Bereits in den 1940er Jahren konnten Hetherington und Ranson demonstrieren, dass die Destruktion des ventromedialen Hypothalamus zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und zur Adipositas führt. Die Zerstörung seiner lateralen Areale dagegen resultiert in einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und einem konsekutiven Gewichtsverlust (3). Daraus wurde zunächst die These abgeleitet, dass das „Sättigungs-Zentrum“ im ventromedialen, das „Appetit-Zentrum“ dagegen im lateralen Hypothalamus lokalisiert sei. Neuere Erkenntnisse zeigten jedoch, dass funktionell antagonistische Neurone benachbart in demselben hypothalamischen Kerngebiet liegen können. Dies ist zum Beispiel bei den anorexigenen Proopiomelanocortin/Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (POMC/CART)- und den orexigenen Neuropeptid Y/Agouti-Related Peptide (NPY/AgRP)-Neuronen im Nucleus arcuatus (ARC) der Fall (4). Beide projizieren in den Nucleus paraventricularis (PVN), ein Kerngebiet mit besonders starker Expression des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4-R) (5). Eine Läsion des PVN führt zur Hyperphagie (6); eine Entwicklungsstörung dieses Kerngebiets resultiert in einer Adipositas (7).

Unter den zahlreichen bei der Koordination des Energiehaushalts miteinander interagierenden Systemen steht in der vorliegenden Arbeit in erster Linie das zentralnervöse Nucleobindin 2 (NUCB2)/Nesfatin-System im Fokus des Interesses. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf dem zentralnervösen Melanocortinsystem, welches funktionell eng mit dem NUCB2/Nesfatin-System verbunden ist.

2.4 Das zentralnervöse NUCB2/Nesfatin-System

2.4.1 Synthese und Vorkommen von Nesfatin-1

Das Vorläufermolekül von Nesfatin-1 (*NUCB2-encoded satiety- and fat-influencing protein-1*), NUCB2, ist ein in diversen an der Regulation des Appetits beteiligten Kernen des Hypothalamus - darunter ARC, PVN, Nucleus supraopticus (SON), lateraler Hypothalamus und Zona incerta – sowie im Nucleus tractus solitarius (NTS) des Hirnstamms exprimiertes und sezerniertes Peptid. Es setzt sich aus 396 Aminosäuren zusammen, denen eine 24 Aminosäuren lange Signalsequenz vorangeht, welche für die

Aufnahme in den Golgi-Apparat der Zelle und die Verpackung in sekretorische Vesikel verantwortlich ist. Dort erfolgt intrazellulär die weitere Prozessierung des Peptids durch Prohormonkonvertasen (PC-1/3 und PC-2) (8).

Bei Nesfatin-1 handelt es sich um das aus 82 Aminosäuren bestehende N-terminale Fragment des NUCB2. Beide Moleküle werden von den Neuronen der genannten Kerngebiete sezerniert (8). Die nicht nur im Vergleich zwischen Nagetieren und Menschen, sondern sogar im Vergleich zu Fischen bestehende Homologie der NUCB2-Aminosäuresequenz weist auf eine hohe evolutionäre Bedeutung des Peptids hin (9).

In der Hungersituation ist die Expression von Nesfatin-1 im PVN reduziert. Wird Nahrung aufgenommen, so steigt sie an (8). Eine Nesfatin-1-Immunoreaktivität wurde ausschließlich im Soma der Neurone, nicht aber in den Axonterminalen oder Varikositäten festgestellt (10). Diese Beobachtung legt eine auto- oder parakrine Sekretion und Funktion des Peptids nahe. Peripher appliziertes Nesfatin-1 kann die Blut-Hirn-Schranke ungehindert passieren; dieser Prozess war im untersuchten Konzentrationsbereich nicht sättigbar (11).

Außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) wurde NUCB2/Nesfatin-Immunoreaktivität im Fettgewebe (12) sowie in endokrinen Zellen des Magens, in den Brunner-Drüsen des Duodenums und in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas von Sprague-Dawley-Ratten und Mäusen nachgewiesen (13).

Die Expression von Nesfatin-1 ist im subkutanen Fettgewebe deutlich höher als im viszeralen und ist dort ebenso wie im Gehirn vom Ernährungszustand des Individuums abhängig. Das Peptid fördert die Differenzierung der Prä-Adipozyten zu reifen Adipozyten (12). Beim Menschen korreliert die Konzentration von Nesfatin-1 im peripheren Blut negativ mit dem Body-Mass-Index (BMI) sowie mit dem prozentualen Anteil des Fettgewebes am Körpergewicht und dem Nüchtern-Blutzuckerspiegel (14).

In den endokrinen Zellen der Magenschleimhaut wird im Vergleich zum Gehirn etwa die zehnfache Menge von Nesfatin-1 gebildet (15). Die Tatsache, dass die Expression dieses Peptids nach einer 24-stündigen Nahrungskarenz nicht nur im PVN (8), sondern auch in der Magenschleimhaut signifikant erniedrigt ist (15), weist auf einen möglichen anorexigenen Signalweg vom Gastrointestinaltrakt zu den entsprechenden Integrationszentren im Gehirn hin. Das im Pankreas gebildete Nesfatin-1 hingegen wird vornehmlich parakrin sezerniert. Aus diesem Grund ist es zwar für die Funktion der β -Zellen sowie eventuell in der Pathologie des Diabetes mellitus durchaus von Bedeutung, eine endokrine Funktion erscheint jedoch aufgrund der geringen in das Gefäßsystem abgegebenen Mengen eher unwahrscheinlich (16).

2.4.2 Zentralnervöse Effekte von Nesfatin-1

Die einmalige intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von Nesfatin-1 durch Oh-I et al. führte zu einer sechs Stunden lang anhaltenden signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme; als Folge der Gabe eines Antisense-Morpholino-Oligonukleotids gegen die NUCB2-mRNA hingegen stieg die Nahrungsaufnahme deutlich an. Versuchstiere, denen zehn Tage lang kontinuierlich Nesfatin-1 in die Seitenventrikel infundiert wurde, nahmen während jener Zeit im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Nahrung und Wasser zu sich, wobei dieser anorexigene Effekt sich während des Beobachtungszeitraums abschwächte. Zudem wiesen die Versuchstiere ab dem sechsten Versuchstag ein gleichbleibend verringertes Körpergewicht sowie eine geringere Fettgewebsmasse auf (8). Die i.c.v. Applikation der ebenfalls aus NUCB2 durch enzymatische Prozessierung gebildeten Peptide Nesfatin-2, Nesfatin-3 und Nesfatin-2/3 sowie die Injektion von gegen diese gerichteten Antikörpern zeigten dagegen keine vergleichbare Wirkung (8).

Während Stengel et al. die anorexigene Wirkung von Nesfatin-1 lediglich in der physiologischen Situation der Nahrungsaufnahme während der nächtlichen Aktivitätsphase, jedoch nicht bei der auf eine 24-stündige Fastenperiode folgenden Nahrungsaufnahme während der Ruhephase am Tage nachweisen konnten (17), gelang letzteres vor kurzem unserer Arbeitsgruppe (18). Es bleibt daher unklar, inwiefern der anorexigene Effekt von Nesfatin-1 vom Tagesrhythmus abhängig ist.

Nesfatin-1 ist weit mehr als nur ein Sättigungsmolekül. Untersuchungen von Stengel et al. ergaben, dass die i.c.v. Injektion von 5 pmol Nesfatin-1 bei Ratten innerhalb von 24 h zu einer Reduktion des Körpergewichts um $1,8 \pm 0,5$ % führt, ohne jedoch eine Veränderung der in diesem Zeitraum kumulativ aufgenommenen Nahrungsmenge zu bewirken (17). Dies deutet auf eine mögliche Stimulation des Energieumsatzes durch Nesfatin-1 hin und ergänzt die Beobachtung von Oh-I et al., wonach die Reduktion der Gewichtszunahme durch die kontinuierliche Applikation von Nesfatin-1 während der gesamten Beobachtungszeit unvermindert blieb, obwohl die anorexigene Wirkung mit der Zeit abnahm (8). Die Tatsache, dass Nesfatin-1 auch in zahlreichen Neuronen des Hirnstamms gebildet wird, die als sympathische Efferenzen zum braunen Fettgewebe fungieren, suggeriert, dass das Peptid bei der Regulation der adaptiven Thermogenese und des Energiehaushalts eine Rolle spielen könnte (19). Von unserer Arbeitsgruppe konnte mittels direkter Kalorimetrie nachgewiesen werden, dass die nicht-evaporative Wärmeabgabe von Ratten in den ersten acht Stunden nach der i.c.v. Applikation von 25 pmol Nesfatin-1 signifikant erhöht ist (18).

In einem anderen Experiment wurde bei Ratten, die dieselbe Dosis Nesfatin-1 i.c.v. erhalten hatten, ein signifikanter Anstieg der Körperkerntemperatur gemessen (20). Hierbei fiel auf, dass dieser bei Substanzapplikation zu Beginn der Dunkel- und damit Aktivitätsphase sofort, bei Substanzapplikation zu Beginn der Hell- oder Ruhephase dagegen erst mit einer Latenz von anderthalb Stunden einsetzte. Dies könnte auf eine Abhängigkeit der Nesfatin-1-Wirkung von zirkadianen Rhythmen zurückzuführen sein.

Darüber hinaus führt die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 zu einem signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP). Dieser ist höchstwahrscheinlich durch eine MC3/4-R-vermittelte Aktivierung von Neuronen, die das sympathische Nervensystem stimulieren, in hypothalamischen oder rhombenzephalen Kerngebieten wie dem NTS bedingt (21). Der hypertensive Effekt von Nesfatin-1 lässt sich durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem CRF- (Corticotropin Releasing Factor-) Rezeptor-Antagonisten blockieren (22). Eine Erhöhung der Herzfrequenz durch die zentralnervöse Applikation des Peptids konnte nur während der Ruhephase am Tage, nicht jedoch während der nächtlichen Aktivitätsphase beobachtet werden (20).

Neben den genannten metabolischen und autonomen Funktionen besitzt Nesfatin-1 auch verhaltensbiologische Effekte. An Ratten konnte gezeigt werden, dass das Peptid ängstliches Verhalten fördert (23). Bei weiblichen Ratten könnte Nesfatin-1 als Zeichen einer günstigen Energiebilanz den Zeitpunkt des Einsetzens der Pubertät beeinflussen (24).

Bislang wurde kein Rezeptor für Nesfatin-1 identifiziert. Es gibt jedoch erste Hinweise darauf, dass das Neuropeptid seine Wirkung über die Interaktion mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren entfaltet. Dabei wird eine sequentielle Aktivierung mehrerer verschiedener G-Proteine unter Beteiligung solcher sowohl vom inhibitorischen ($G_{i/o}$) als auch vom stimulierenden (G_s) Typ vermutet (19).

2.4.3 Interaktionen von Nesfatin-1 mit anderen Neurotransmittersystemen

Das NUCB2/Nesfatin-System steht in enger Verbindung mit zahlreichen anderen zentralnervösen Neurotransmittersystemen. Dazu zählen das Melanocortin- und das Serotoninsystem, das Oxytocinsystem, das sympathische Nervensystem sowie die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden- (HPA-)Achse. Nesfatin-1 wirkt hingegen offenbar unabhängig vom Leptin-System (25).

Die zentralnervöse Applikation von α -Melanozyten-stimulierendem Hormon (α -MSH) erhöht die Expression von NUCB2 im PVN, während die Gabe eines MC3- / MC4-R-Antagonisten die Wirkung von Nesfatin-1 als Sättigungssignal (8) ebenso wie den durch

Nesfatin-1 vermittelten Anstieg des MAP aufhebt (21). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Nesfatin-1-Signalgebung im Hypothalamus mit dem zentralnervösen Melanocortinsystem, welches unter 2.5 ausführlich behandelt wird, in enger Verbindung steht.

Im ARC und im PVN exprimieren nur die POMC/CART-Neurone, nicht aber die antagonistisch zu diesen wirkenden NPY/AgRP-Neurone Nesfatin-1; jedoch liegen NPY-positive Fasern in beiden Kerngebieten in direkter Nachbarschaft zu Nesfatin-1-synthetisierenden Neuronen (8) und interagieren mit diesen. So werden die orexigenen NPY/AgRP-Neurone des ARC durch Nesfatin-1 hyperpolarisiert und damit in ihrer Aktivität gehemmt (26); zudem reduziert die Applikation von Nesfatin-1 die Expression von NPY sowohl im Hypothalamus als auch im NTS (18).

Die Expression von POMC, AgRP und CRF im PVN und im ARC hingegen wird durch Nesfatin-1 nicht beeinflusst (8;18).

Auch mit dem zentralnervösen Serotoninsystem steht das NUCB2/Nesfatin-System in enger Beziehung. Die Applikation des Serotonin-1B/2C-Rezeptor (5-HT_{1B/2C})-Agonisten meta-Chlorphenylpiperazin (mCPP) führt bei Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Expression von NUCB2/Nesfatin, während diese bei Versuchstieren mit einer Mutation des 5-HT_{2C}-Rezeptors deutlich erniedrigt ist (27). Serotonin ist folglich ein potenter Aktivator des NUCB2/Nesfatin-Systems und wirkt dabei vornehmlich über zentralnervöse 5-HT_{2C}-Rezeptoren.

Zahlreiche Nesfatin-1-positive Neurone in PVN und SON coexprimieren das ebenfalls anorexigen wirkende Hormon Oxytocin (28). Die Blockade des endogenen Nesfatin-1 durch Antikörper resultiert in einer verminderten Oxytocin-Freisetzung im PVN, während die Blockade des Oxytocinrezeptors den hemmenden Effekt von Nesfatin-1 auf die Nahrungsaufnahme aufhebt (29). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die anorexigene Wirkung von Nesfatin-1 die Aktivierung oxytocinerge Signalwege im PVN beinhaltet. Von unserer Arbeitsgruppe konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden (18). Sowohl Nesfatin-1 als auch Oxytocin aktivieren POMC-Neurone im NTS (29). Diese könnten letztlich die Wirkungen beider Neuropeptide auf autonome Funktionen integrieren.

In einer weiteren Neuronenpopulation des PVN wurde eine Coexpression von Nesfatin-1 und Präpro-Thyreotropin Releasing Hormon (Präpro-TRH) in kälteresponsiven Neuronen, die an der sympathischen Regulation der Thermogenese im braunen Fettgewebe beteiligt sind, nachgewiesen (20). Wie bereits unter 2.4.2 beschrieben, nimmt das Peptid über seine anorexigene Wirkung hinaus auch auf diesem Wege Einfluss auf die Regulation des Energiehaushalts (18;19).

Auch zu benachbarten CRF-Neuronen des Hypothalamus besitzen Nesfatin-1-positive Nervenzellen synaptische Verbindungen. Nesfatin-1 i.c.v. erhöht die Plasmaspiegel von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) und Corticosteron. Dies wird als Hinweis darauf gewertet, dass Nesfatin-1 auch an der Kontrolle der HPA-Achse beteiligt ist. Darüber hinaus fällt die Nesfatin-1-induzierte Verringerung der Nahrungsaufnahme bei Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem CRF₂-Rezeptor-Antagonisten deutlich geringer aus (17).

2.5 Das zentralnervöse Melanocortinsystem

2.5.1 Synthese und Vorkommen von α -MSH und ACTH

Das Melanocortinsystem ist für die Regulation der Nahrungsaufnahme von essentieller Bedeutung. Agonisten des Melanocortinsystems sind die beiden Peptidhormone α -MSH und ACTH, die durch Konvertasen-vermittelte Prozessierung aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül, POMC, gebildet werden. Dieses wird in zahlreichen Kernen des Hypothalamus, bevorzugt in ARC und PVN, und des Hirnstamms exprimiert. Die Konzentration von α -MSH und ACTH ist in satten Versuchstieren hoch, in Versuchstieren, die einer Nahrungskarenz unterzogen wurden, jedoch niedrig (30). Die beiden POMC-Derivate binden mit etwa der gleichen Affinität an den MC3-R und den MC4-R (31) und aktivieren dieselben Signaltransduktionswege (32).

Ein weiterer Ligand des Melanocortinsystems, AgRP, wird im Hypothalamus in direkter Nachbarschaft zu den POMC-Neuronen von einer weiteren Population von Nervenzellen exprimiert und wirkt als physiologischer Antagonist an MC3-R und MC4-R (33). Das ebenfalls antagonistisch wirkende Agouti-Protein wird dagegen in peripheren Geweben – bei Nagern ausschließlich intradermal – gebildet und bestimmt bei Säugetieren gemeinsam mit α -MSH die Pigmentierung der Haut und des Haarkleides (34).

2.5.2 Zentralnervöse Effekte von α -MSH und ACTH

Die beiden Agonisten des Melanocortinsystems, α -MSH und ACTH, sind tonische Inhibitoren der Nahrungsaufnahme. In vorausgegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Applikation von α -MSH oder ACTH in den PVN von Versuchstieren, die zuvor 24 h lang gefastet hatten, zu einer signifikanten Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme führt. Dieser anorexigene Effekt konnte

jeweils durch die Gabe der auch in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen α -MSH und ACTH blockiert werden (35).

Des Weiteren ist das zentralnervöse Melanocortinsystem wesentlich an der Steuerung der adaptiven Thermogenese (36), der Regulation von Plasmainsulinspiegel und Insulinsensitivität (37) sowie an der autonomen Regulation kardiovaskulärer Funktionen beteiligt (21;22) (vergleiche hierzu auch 2.5.3).

2.5.3 Melanocortinrezeptoren

Bislang sind fünf verschiedene Melanocortinrezeptoren bekannt, von denen drei, nämlich MC3-R, MC4-R und MC5-R, im ZNS exprimiert werden.

MC3-R und MC4-R dienen der physiologischen Kontrolle der Nahrungsaufnahme, der Thermoregulation sowie der Regulation kardiovaskulärer Funktionen und der Natriuresis.

So wurde gezeigt, dass die zentralnervöse Applikation von SHU 9119, einem Antagonisten dieser Rezeptoren, die Nahrungsaufnahme steigert (33). Entsprechend verursacht eine Deletion des MC4-R bei Mäusen das *Agouti Obesity Syndrome* (33). Darüber hinaus kommt es bei Versuchstieren mit diesem Defekt zu einer gestörten Glukosetoleranz, welche der Hyperphagie und Adipositas bereits vorausgeht (37).

Die physiologische Bedeutung der MC4-R in der Regulation der Thermogenese belegen Beobachtungen an MC4-R-defizienten oder mit dem MC4-R-Antagonisten AgRP behandelten Versuchstieren, welche weder auf die Gabe einer hochkalorischen (*high-fat*) Diät noch auf eine Kälteexposition mit einer adäquaten Hochregulation der Expression von Uncoupling Protein 1 (UCP1) im braunen Fettgewebe reagieren (36). Die Aktivierung von MC4-R ist folglich essentiell für die durch das sympathische Nervensystem vermittelte diät- und kälteinduzierte Thermogenese: Zahlreiche diesen Rezeptortyp exprimierende Neurone in Kerngebieten wie beispielsweise dem PVN im Hypothalamus und dem NTS im Hirnstamm besitzen direkte Efferenzen zum braunen Fettgewebe (36). Der Melanocortinrezeptor-Antagonist NPY ist ein tonischer Inhibitor des sympathischen Nervensystems (38).

Wie bereits erwähnt, spielt das Melanocortinsystem auch in der Regulation kardiovaskulärer Funktionen eine wichtige Rolle. Die Aktivierung melanocortinerger Neurone bewirkt einen Anstieg des MAP (4), wobei ein Teil dieser Nervenzellen durch Nesfatin-1 stimuliert wird und somit dessen hypertensiven Effekt vermittelt (21). Neuesten Erkenntnissen von Yosten et al. zufolge kann α -MSH seine blutdrucksteigernde Wirkung jedoch auch unabhängig hiervon entfalten (22).

2.5.4 Interaktionen des Melanocortinsystems mit anderen Neurotransmittersystemen

Das Melanocortinsystem interagiert mit zahlreichen anderen zentralnervösen Neurotransmittersystemen. Hier sind in erster Linie das oben beschriebene NUCB2/Nesfatin- und das zentralnervöse Serotoninsystem zu nennen, doch auch zu Oxytocin- und CRF-Neuronen im PVN sowie zu zahlreichen noradrenergen Neuronen des sympathischen Nervensystems existieren wichtige Verbindungen.

So ist bekannt, dass eine Verstärkung der serotoninerger Neurotransmission an zentralnervösen 5-HT_{2C}-Rezeptoren in einer Reduktion der Nahrungsaufnahme resultiert, wohingegen eine Verminderung der präsynaptischen Verfügbarkeit von Serotonin zur Hyperphagie und konsekutiv zu einer Zunahme des Körpergewichts führt (39). 5-HT_{2C}-Rezeptor-Agonisten wie mCPP fördern das Sättigungsgefühl (40;41). Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche POMC-Neurone im ARC der Ratte diesen Rezeptortyp exprimieren und durch mCPP aktiviert werden (42). Darüber hinaus inhibieren sowohl Serotonin als auch mCPP über 5-HT_{1B}-Rezeptoren hypothalamische NPY/AgRP-Neurone (43). Serotoninerge Signale stimulieren folglich das Melanocortinsystem.

Indem α -MSH und ACTH über MC4-R sowohl CRF-Neurone im PVN (44) als auch Oxytocin-Neurone im PVN und im SON (45) sowie noradrenerge Neurone im NTS (33) des Hirnstamms aktivieren, wird die Hemmung der Nahrungsaufnahme ebenso wie die sympathische Stimulation der Thermogenese verstärkt.

Die Interaktionen des Melanocortinsystems mit Nesfatin-1 wurden bereits unter 2.4.3 ausführlich erläutert.

2.6 Fragestellung

Während die Rolle von Nesfatin-1 in der Regulation der Nahrungsaufnahme bereits gut erforscht ist, liegen bislang nur wenige Daten über seinen Einfluss auf die Thermogenese vor.

Sowohl Oh-I als auch Stengel et al. fanden deutliche Hinweise darauf, dass die zentralnervöse Applikation von Nesfatin-1 bei Ratten über die anorexigene Wirkung hinaus den Energieumsatz erhöht (8;17), und Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die i.c.v. Injektion von Nesfatin-1 zu einer Steigerung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe von Ratten führt (18). Über die Wirkung des endogenen Nesfatin-1 auf die Thermogenese ist jedoch noch nichts bekannt. Daher wurde diese in

der vorliegenden Arbeit unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen endogenes Nesfatin-1 untersucht.

Das Melanocortinsystem stellt einen wichtigen Interaktionspartner des NUCB2/Nesfatin-Systems bei der Regulation des Energiehaushalts dar (8). Obwohl seit längerem bekannt ist, dass über das sympathische Nervensystem vermittelte Projektionen von POMC-Neuronen des Hirnstamms in das braune Fettgewebe existieren (36) und dass i.c.v. appliziertes α -MSH die dortige Temperatur signifikant erhöht (46), wurde die Wirkung von endogenem α -MSH und ACTH auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe unserer Kenntnis nach noch nicht mittels direkter Kalorimetrie untersucht. Dies ist jedoch für das genaue Verständnis der Wirkung von α -MSH und ACTH auf den Energieumsatz unter physiologischen Bedingungen durchaus sinnvoll. Da die Effekte der beiden endogenen Peptide auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme von unserer Arbeitsgruppe bereits eingehend studiert wurden (35), diente zudem die Wiederholung entsprechender Messungen in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle für die Funktionalität des verwendeten Tiermodells.

Momentan ist unklar, ob der anorexigene Effekt von Nesfatin-1 vom Tagesrhythmus abhängig ist. Die Ergebnisse von Könczöl et al. (20) weisen auf eine Interaktion der Wirkung des Peptids mit zirkadianen Rhythmen hin. Die für Ratten physiologische Aktivitätsphase ist die nächtliche Dunkelphase. Aus diesem Grund führten wir unsere Messungen an Tieren, deren NUCB2/Nesfatin- und Melanocortinsystem rein physiologisch durch eine gute Sättigung aktiviert waren, zunächst während dieser Zeit durch (Exp. 2A). Um für die Planung kommender Versuchsvorhaben herauszufinden, ob die Tagesrhythmik die Wirkung von endogenem Nesfatin-1, α -MSH und ACTH im ZNS der Ratte beeinflusst, wurde eine ansonsten identisch aufgebaute weitere Versuchsreihe tagsüber während der Hellphase durchgeführt (Exp. 2B).

Die vorliegende Arbeit soll folglich einen Beitrag dazu liefern, die Funktion des endogenen Nesfatin-1 bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Thermogenese zu klären und auch die Rolle von endogenem α -MSH und ACTH in diesem Zusammenhang näher zu charakterisieren. Darüber hinaus sollen mögliche Einflüsse des Tagesrhythmus aufgedeckt werden. Die exakte Erforschung der physiologischen Regulation des Energiehaushalts ist eine essentielle Voraussetzung für die Erkennung und Behandlung von Störungen dieses Systems, wie sie sich in der Pathogenese der Adipositas widerspiegeln.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Durchführung der Tierexperimente wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt; nähere Angaben hierzu finden sich unter 8.1 im Anhang dieser Arbeit.

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten vom Stamm Wistar, welche mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 250 g von der Firma Charles River (Sulzberg, Deutschland) übernommen wurden.

Die Haltung der Tiere erfolgte in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck in einem vom Außenlicht abgeschirmten Raum, in dem eine Zeitschaltuhr einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus vorgab. Die Hellphase dauerte von sechs bis 18 Uhr.

Vom Zeitpunkt der Implantation der Mikroinjektionseinheiten an wurden die Tiere in Einzelkäfigen (Makrolon Käfig Typ III, Grundfläche 825 cm², Höhe 15 cm, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Durch die Verwendung einer Kombination von Gitter- und Stahlblechaufsätzen wurde die Käfighöhe auf insgesamt 25 cm vergrößert, um die Gefahr des Abbruchs der Mikroinjektionseinheit zu minimieren.

Außerhalb der Versuchszeiten hatten die Tiere stets freien Zugang zu Wasser und einem Alleinfuttermittel für Ratten (Altromin® 1324, Altromin, Lage, Deutschland).

3.2 Beschreibung der verwendeten Antikörper

Bei den Tierversuchen kamen Antikörper gegen Nesfatin-1 (Nes-1-AK), α -Melanozyten-stimulierendes Hormon (α -MSH-AK) und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH-AK) zum Einsatz. Die Kontrollgruppen erhielten Immunglobulin G (IgG).

Rabbit Anti-Nesfatin-1 (1-82) (Rat) Purified IgG

Herkunft: Phoenix Pharmaceuticals, INC., Burlingame, Californien, USA

Die Substanz wurde in einer Mischung aus Aqua ad iniectabilia (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's PBS (1x), PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) im Verhältnis 3:5 (im Folgenden: verdünntes PBS) in einer Konzentration von 2 μ g in 0,3 μ l gelöst.

Rabbit-Anti- α -MSH IgG

Herkunft: Peninsula Laboratories, LLC (Bachem-Group), San Carlos, Californien, USA

Der Antikörper weist laut Herstellerinformation folgende Kreuzreaktivitäten auf: α -MSH 100 %; (Nle⁴, D-Phe⁷)- α -MSH 67 %; α -MSH, Lachs 0,02 %; ACTH, Mensch (1-39) 0,02 %; ACTH (1-39), Ratte 1,25 %; β -MSH, Mensch 0 %; γ_3 -MSH 0 %; β -Endorphin, Mensch 0 %; α -Endorphin 0 %; γ -Endorphin 0 %; Met-Enkephalin 0 %.

Zum Lösen der Substanz in einer Konzentration von 2 μ g in 0,2 μ l wurde verdünntes PBS verwendet.

Rabbit-Anti-ACTH IgG

Herkunft: Peninsula Laboratories, LLC (Bachem-Group), San Carlos, Californien, USA

Für diesen Antikörper wurden folgende Kreuzreaktivitäten angegeben: ACTH (1-39), Maus, Ratte 100 %; ACTH (1-39), Mensch 100 %; ACTH (18-39), Mensch 100 %; ACTH (1-24), Mensch 0,01 %; ACTH (7-38), Mensch 0 %; α -MSH 0 %; LH-RH 0 %; PACAP-38, Mensch, Maus, Schaf, Schwein, Ratte 0 %; β -Endorphin, Ratte 0 %.

Die Lösung dieses Antikörpers erfolgte analog zu der des α -MSH-AK; beide wurden bereits vor der Applikation miteinander vermischt.

Rabbit-IgG

Herkunft: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Das IgG wurde in verdünntem PBS in einer Konzentration von 2 μ g in 0,3 μ l gelöst.

3.3 Herstellung der Mikroinjektionseinheiten

Um die Applikation der soeben beschriebenen Substanzen in den PVN zu ermöglichen, wurden Injektionssysteme hergestellt, die den Tieren unter Vollnarkose implantiert wurden.

Über eine aus einer Edelstahlkanüle (25 Gauge, Braun, Melsungen, Deutschland) hergestellte 15 mm lange Kapillare wurde ein 10 mm langer Polyethylenschlauch (PE-Schlauch) (Innendurchmesser (ID) 0,38 mm, Außendurchmesser (AD) 1,09 mm, Portex, Großbritannien) geschoben, so dass beide Komponenten bündig miteinander abschlossen. Auf die Schnittstelle wurde Sekundenkleber (Sekunden-Alleskleber Superflex Gel, UHU GmbH & Co. KG, Bühl/Baden, Deutschland) aufgetragen. Eine 30 mm lange *fused silica*-Kapillare (ID 0,075 mm, AD 0,15 mm, Laser 2000, Weßling, Deutschland) wurde in die Edelstahlkapillare eingeführt. Das auf der Seite des PE-

Schlauches überstehende Ende wurde ebenfalls mit Sekundenkleber fixiert und abschließend auf 9 mm gekürzt.

In Abb. 1 ist eine solche Injektionseinheit schematisch dargestellt.

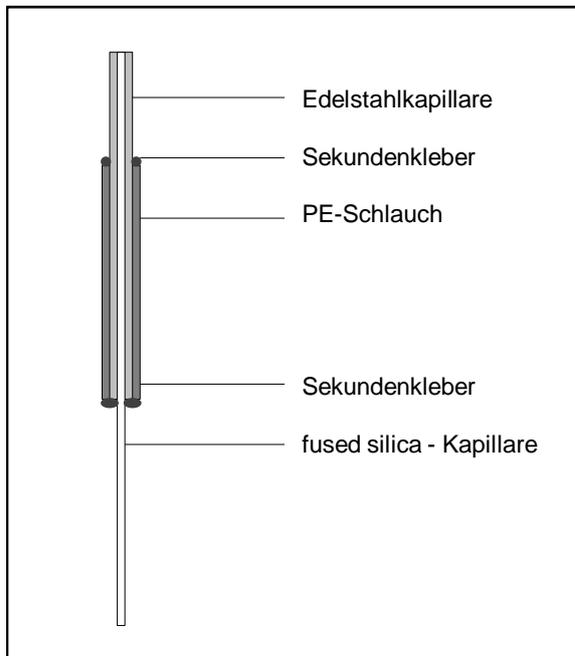


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Mikroinjektionseinheit

3.4 Durchführung der Tierexperimente

3.4.1 Implantation der Mikroinjektionseinheiten

Die stereotaktische Implantation der Mikroinjektionseinheiten in den PVN erfolgte nach einer Eingewöhnungszeit von fünf bis zehn Tagen, wenn die Tiere ein Gewicht zwischen 270 und 310 g erreicht hatten. Die dazu benötigten Koordinaten wurden dem von Paxinos und Watson erstellten stereotaktischen Atlas des Rattengehirns (47), welcher für Tiere der genannten Gewichtsklasse normiert ist, entnommen und sind in Tab. 1 dargestellt:

| Richtung | Abstand zu Bregma [cm] |
|------------------|------------------------|
| rostral / caudal | -0,18 |
| lateral | ±0,04 |
| ventral / dorsal | -0,77 |

Tab. 1: Koordinaten zur stereotaktischen Ansteuerung des PVN nach Paxinos und Watson (43)

Vor Beginn der Operation wurde mithilfe physiologischer Kochsalzlösung die Durchgängigkeit der Mikroinjektionseinheit überprüft. Anschließend wurde diese mit einem PE-Schlauch (ID 0,38 mm, AD 1,09 mm) verschlossen, sodass die Kapillare mit Flüssigkeit gefüllt blieb und somit ihr Austrocknen verhindert wurde.

Als Anästhetika wurden Ketamin (Ketavet® 100 mg/ml, Pharmacia, Erlangen, Deutschland) in einer Dosierung von 80 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) und Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einer Dosierung von 12 mg/kg Körpergewicht intramuskulär (i.m.) verabreicht.

Wenn das Fehlen sowohl des Lidreflexes als auch des Zwischenzehenreflexes eine suffiziente Narkosetiefe anzeigte, wurde die Kopfhaut von der Höhe der Augen bis zum Nacken rasiert. Auf diese Partie wurde eine Lido- und Prilocain-haltige Creme (Emla® Creme, AstraZeneca, Lage, Deutschland) aufgetragen. Mittels zweier Stifte in den Ohren und einer in ihrer Höhe ebenfalls nach den Angaben von Paxinos und Watson ausgerichteten Halterung für die oberen Nagezähne wurden die Ratten in den stereotaktischen Apparat (Föhr Medical Instruments GmbH, Pohlheim, Deutschland) eingespannt und so fixiert, dass die Oberfläche der Schädelkalotte horizontal und unbeweglich zu liegen kam.

Eine geregelte Heizmatte (CMA/150 Temperature Controller, Carnegie Medicin, Schweden) verhinderte eine Unterkühlung während der Operation. In regelmäßigen Abständen wurde die Narkosetiefe anhand der oben genannten Reflexe überprüft.

Zunächst wurde die Kopfhaut mit dem Skalpell in sagittaler Richtung inzidiert und mit vier Bulldog-Klemmen aus dem Operationsfeld gezogen. Daraufhin wurde das Periost freipräpariert und die Kalotte trocken getupft, bis sich eine optimale Sicht auf den Orientierungspunkt Bregma (den Schnittpunkt von Sutura sagittalis und Sutura coronalis) ergab. Von diesem ausgehend konnte mit der in den Mikromanipulator des stereotaktischen Apparates eingespannten Mikroinjektionseinheit entsprechend der oben genannten Koordinaten die gewünschte Trepanationsstelle aufgesucht und markiert werden. Dabei erfolgte die Auswahl der Hemisphäre für die Implantation randomisiert.

Nachdem mit dem Dentalbohrer (Typ PM3880, Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland) unter Verwendung eines Treplans (224RF, ID 1,8 mm, Meisinger, Düsseldorf, Deutschland) die Öffnung für die Kanüle geschaffen worden war, wurden um diese herum mit einem Spiralbohrer (203, D 0,6 mm, Meisinger, Düsseldorf, Deutschland) noch drei weitere Löcher gebohrt, um mithilfe rostfreier Edelstahlschrauben (1,0 mm x 4 mm, Messinger Schrauben GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) eine sichere Fixierung der Injektionseinheit zu ermöglichen (Abb. 2A). Während der Trepanationen wurde die Kalotte mehrmals mit Kochsalzlösung benetzt, um eine zu starke Erwärmung zu verhindern. Etwaige Blutungen wurden mit Clauden-Watte (Clauden®, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland) gestillt, wobei der Kontakt der Watte mit dem Gehirn vermieden wurde.

Vor dem Einsenken der Mikroinjektionseinheit in das Gehirn und ihrer Platzierung im PVN war in einigen Fällen das Eröffnen der Dura mater mithilfe einer Edelstahlkanüle vonnöten. Abschließend wurden Injektionseinheit und Schrauben mit einem Kunststoffring umgeben und in Dentalkunststoff (Paladur®, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) eingebettet (vgl. Abb. 2B). Nach dessen Aushärtung konnte das Tier aus dem stereotaktischen Apparat entnommen und zurück in seinen Käfig gelegt werden.

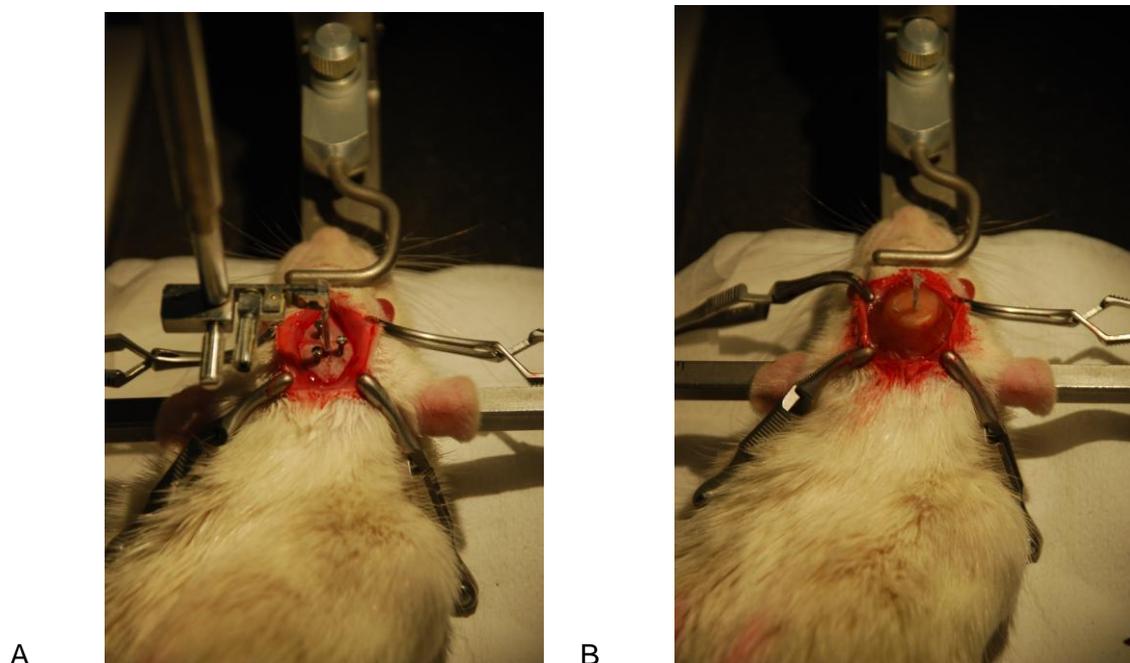


Abb. 2: Versuchstier im stereotaktischen Apparat

A: Nach Implantation der Mikroinjektionseinheit und Anbringen der Fixierungsschrauben

B: Nach Fixierung der Mikroinjektionseinheit mit Dentalkunststoff

Um den Erhalt der physiologischen Körpertemperatur zu gewährleisten, wurde bis zum Erwachen aus der Narkose eine handelsübliche 100 W Infrarot-Wärmelampe eingesetzt; hierbei wurde sichergestellt, dass das Tier nicht überhitzen konnte.

An die Implantation der Mikroinjektionseinheiten schloss sich eine Erholungsphase an, deren Dauer vom individuellen Zustand des Versuchstieres abhängig war und im Mittel sieben Tage betrug. Während dieser Zeit wurden das Fressverhalten und die Körpergewichtsentwicklung durch die tägliche Wägung von Futter, Wasser und Versuchstier kontrolliert und protokolliert.

Wenn die genannten Parameter einen stabilen Allgemeinzustand der Ratte anzeigten und das Körpergewicht mindestens 10 g über dem OP-Gewicht lag, wurde im Falle der pharmakologisch stimulierten Versuchstiere zunächst die Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts durchgeführt, an die sich jeweils im Abstand von etwa fünf Tagen zur Regeneration der Tiere und zur Ausschwemmung der applizierten Substanzen die Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe und schließlich die Dekapitation anschlossen. Im Falle der durch ein spezielles Fütterungsregime stimulierten Versuchstiere ging dagegen aus organisatorischen Gründen die kalorimetrische Messung der Bestimmung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts voraus.

3.4.2 Darstellung und Erläuterung des experimentellen Designs

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Experiment 1: Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortin-systems

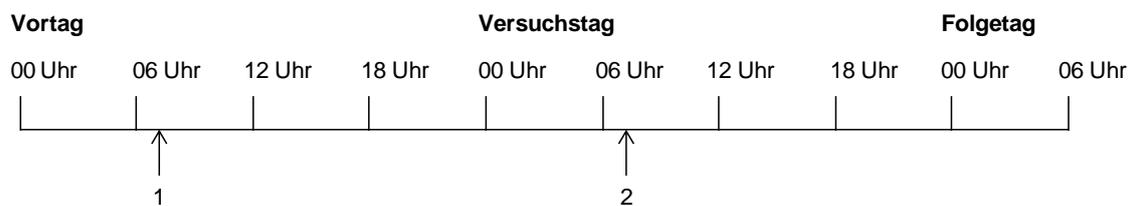
Sowohl das NUCB2/Nesfatin- als auch das Melanocortinsystem werden durch Serotonin stimuliert, was vornehmlich über 5-HT_{1B}- und 5-HT_{2C}-Rezeptoren geschieht (42). Um die Wirkung der zentralnervösen Applikation von Antikörpern gegen Nesfatin-1, α -MSH und ACTH auf den Metabolismus von Tieren, bei denen die genannten Systeme aktiviert sein sollten, untersuchen zu können, wurde daher allen Tieren mit den jeweiligen Antikörpern der 5-HT_{1B}- und 5-HT_{2C}-Agonist mCPP (Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz) injiziert.

Die Einteilung der Versuchstiere in die vier durch die verabreichten Antikörper definierten Versuchsgruppen erfolgte randomisiert und blieb bei den unter 3.4.4 bis 3.4.6

beschriebenen Messungen der Nahrungsaufnahme und der nicht-evaporativen Wärmeabgabe sowie bei der Substanzapplikation vor der Dekapitation stets dieselbe. Das mCPP wurde ebenso wie der Nes-1-AK in 0,3 µl, der α-MSH-AK und der ACTH-AK wurden jeweils in 0,2 µl verdünntem PBS gelöst. Das Injektionsvolumen wurde bei den Tieren der Gruppen 1-3 mit verdünntem PBS auf ein einheitliches Gesamtvolumen von 1 µl ergänzt. Das Applikationsschema ist in Tab. 2 als Übersicht dargestellt. Die Substanzapplikation in den PVN erfolgte standardisiert um sieben Uhr morgens (vgl. Abb. 3). Den Ratten wurde ab dem Vortag des Versuchs für 24 Stunden die Nahrung entzogen, sodass sie zum Zeitpunkt der Applikation hungrig waren. Dies diente dazu, in den Tieren den Antrieb zur Nahrungsaufnahme zu steigern, da die Experimente während ihrer physiologischen Schlafphase, in der sie normalerweise wenig oder kein Futter zu sich nehmen, durchgeführt wurden. Wasser war dagegen zu jeder Zeit verfügbar.

| Gruppe | Gruppenbezeichnung gemäß PVN-Applikation |
|--------|---|
| G1 | IgG (2 µg) / mCPP (20 nmol) |
| G2 | Nes-1-AK (2 µg) / mCPP (20 nmol) |
| G3 | α-MSH-AK (2 µg), ACTH-AK (2 µg) / mCPP (20 nmol) |
| G4 | Nes-1-AK (2 µg), α-MSH-AK (2 µg), ACTH-AK (2 µg) / mCPP (20 nmol) |

Tab. 2: Applikationsschema - mCPP-stimulierte Tiere



- 1: Nahrungsentzug für 24 Stunden um 7 Uhr
- 2: Substanzapplikation, Beginn des Experiments um 7 Uhr

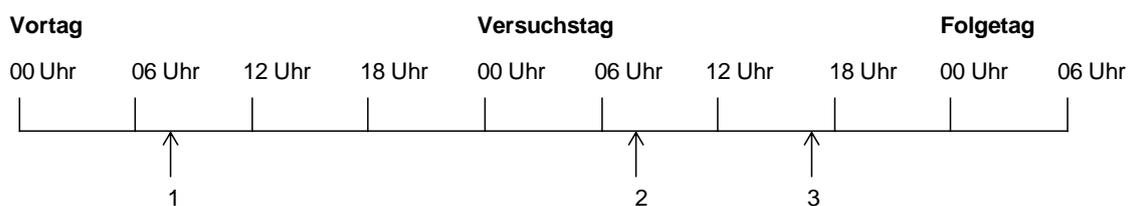
Abb. 3: Fütterungsregime - mCPP-stimulierte Tiere

Experiment 2: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime

Da es sich sowohl bei Nesfatin-1 als auch bei α -MSH und ACTH um anorexigene Neuropeptide handelt, ist ihr Spiegel postprandial im gesättigten Organismus erhöht (8;30). Darauf basierte die Vorgehensweise im zweiten Experiment, in dem eine endogene Aktivierung des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch die Nahrungsaufnahme bzw. die darauf folgende Sättigung erreicht werden sollte. Es wurden zwei Telexperimente durchgeführt.

A. Experimente während der Aktivitätsphase

Im ersten Telexperiment wurden die Effekte der Antikörpergabe auf die Nahrungsaufnahme und die Thermogenese während der physiologischen Aktivitätsphase der Ratten untersucht. Am Vortag des Versuchs wurde den Tieren um acht Uhr morgens das Futter für die Dauer von 24 Stunden entzogen und am folgenden Tag wieder zugeführt (sog. „*refeeding*“) (vgl. Abb. 4). Somit konnte die nächste Nahrungsaufnahme erst am Versuchstag selbst ab acht Uhr morgens stattfinden und die Sättigung hielt bis zur Substanzapplikation, die zu Beginn der Dunkelphase um 17 Uhr abends erfolgte, an. Dadurch sollte eine erhöhte Aktivität des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems zum Zeitpunkt der Antikörpergabe erreicht werden. Anschließend wurden die unten beschriebenen Messungen vorgenommen.

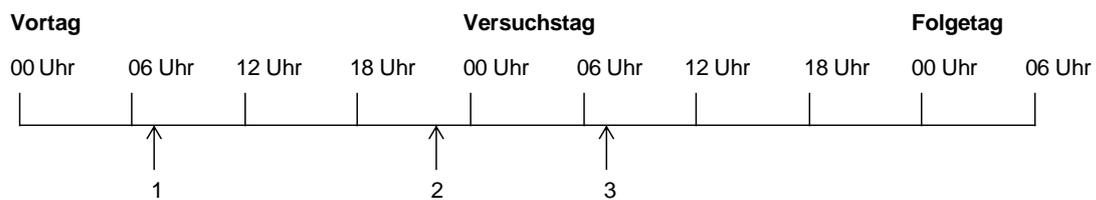


- 1: Nahrungsentzug für 24 Stunden um 8 Uhr
- 2: Refeeding für 9 Stunden um 8 Uhr
- 3: Substanzapplikation, Beginn des Experiments um 17 Uhr

Abb. 4: Fütterungsregime - Experimente während der Aktivitätsphase

B. Experimente während der Ruhephase

Im zweiten Telexperiment wurden die Messungen dagegen während der physiologischen Schlafenszeit der Ratten in der Hellphase durchgeführt. Am Tag vor dem Experiment wurde ihnen von sieben Uhr bis 22 Uhr das Futter entzogen (vgl. Abb. 5). Dadurch erfolgte die normalerweise direkt nach Beginn der Dunkel- und Aktivitätsphase einsetzende Nahrungsaufnahme später als gewöhnlich und die Tiere waren bei der Gabe der Antikörper, die um sieben Uhr morgens erfolgte, noch besonders gut gesättigt.



- 1: Nahrungsentzug für 15 Stunden um 7 Uhr
- 2: Refeeding für 9 Stunden um 22 Uhr
- 3: Substanzapplikation, Beginn des Experiments um 7 Uhr

Abb. 5: Fütterungsregime – Experimente während der Ruhephase

Die Tiere wurden wiederum randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt (siehe Tab. 3). Die Substanzapplikation in den PVN erfolgte wie bereits oben beschrieben. Für die Versuchstiere aller vier Gruppen wurde dabei ein Volumenausgleich mit PBS vorgenommen, sodass sich ebenso wie bei den pharmakologisch stimulierten Versuchstieren ein Gesamtvolumen von 1 µl ergab. Die darauf folgenden Messungen der nicht-evaporativen Wärmeabgabe sowie der Nahrungs- und Wasseraufnahme und der Veränderung des Körpergewichts wurden wie in Experiment 1 durchgeführt.

| Gruppe | Gruppenbezeichnung gemäß PVN-Applikation |
|--------|--|
| G1 | IgG (2 µg) |
| G2 | Nes-1-AK (2 µg) |
| G3 | α-MSH-AK (2 µg), ACTH-AK (2 µg) |
| G4 | Nes-1-AK (2 µg), α-MSH-AK (2 µg), ACTH-AK (2 µg) |

Tab. 3: Applikationsschema - physiologisch stimulierte Tiere

3.4.3 Substanzapplikation in den PVN

Mithilfe eines an einen PE-Schlauch (ID 0,28 mm, AD 0,61 mm) angeschlossenen Adapters (Nr. 015 116-0536-04, Technicon, Fa. Bayer Health Care Pharmaceuticals, Berlin, Deutschland) wurde eine 5 µl-Glasspritze (Microliter™ Syringe, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) mit der Edelstahlkapillare der Mikroinjektionseinheit verbunden und die entsprechenden Substanzen wurden über einen Zeitraum von etwa zwei Minuten hinweg langsam injiziert. Hierauf wurden die Injektionseinheiten wieder verschlossen und die entsprechenden Messungen durchgeführt.

3.4.4 Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts

Die Nahrungs- und Wasseraufnahme wurde durch Rückwägung bestimmt und zunächst über einen Zeitraum von sechs Stunden in einstündigen Intervallen protokolliert. Weitere Messungen fanden acht und 24 Stunden nach der Substanzapplikation statt. Initial sowie nach sechs und nach 24 Stunden wurde außerdem das Körpergewicht dokumentiert. Das Experiment wurde im gewohnten Haltungskäfig durchgeführt.

3.4.5 Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe als Maß für die Thermogenese

Konstruktion der verwendeten Kalorimeter

Die Messung der Thermogenese mittels direkter Kalorimetrie erfolgte in einem nach der Anleitung von Prof. em. Dr. Ingolf Lamprecht von der Freien Universität Berlin hergestellten Kalorimeter (2) (siehe Abb. 6). Dabei handelt es sich um eine modifizierte Campingkühlbox mit einem Peltier-Element. Statt durch das Anlegen einer elektrischen Spannung eine Temperaturdifferenz zwischen Innen- und Außenseite des Gerätes aufzubauen, dient das Peltier-Element hier als Sensor für den Wärmefluss: Eine Temperaturdifferenz zwischen Innen- und Außenseite des Elementes erzeugt eine elektrische Spannung (Seebeck-Effekt). Diese Spannung ist innerhalb des von uns verwendeten Messbereiches proportional zu der im Inneren des Gerätes erzeugten Wärme.

In jedem Kalorimeter befand sich ein Aluminiumcontainer (180 mm x 125 mm x 160 mm), der mit Hilfe von Polypropylen-Distanzstücken in einem Abstand von etwa 2 mm zu den Seitenwänden und der Hinterwand und in einem Abstand von 6 mm zum Boden und zur Vorderwand mit dem Peltier-Element gehalten wurde, um die Wärmeleitung vom Versuchstier zur Apparatur zu verhindern. Konstruktive Maßnahmen zur Verhinderung der

Wärmeleitung werden häufig bei Kalorimetern eingesetzt, da diese in großem Maß von der Kontaktfläche des Tierkörpers mit Boden und Wänden abhängig ist und daher Störungen der Messung verursachen kann. Der Transport der Wärme zu den Innenwänden des Kalorimeters und damit auch zum Peltier-Element erfolgte somit in Form von Konvektion und Wärmestrahlung. Durch einen etwa 5 mm breiten Schlitz in Bodennähe an der Hinterwand des Aluminiumcontainers konnte die Luft aus diesem in das umgebende Gehäuse des Kalorimeters entweichen.

Durch eine Membranpumpe (M2K3 DELUXE, Schemel & Goetz GmbH & Co KG, Offenbach am Main, Deutschland) mit einer Flussrate von 250 - 260 ml/min wurde die Luft mit erhöhtem Kohlendioxidgehalt über bodennah befestigte PE-Schläuche aus dem Kalorimeter abgesaugt. Mittels einer Kühleinrichtung wurde der in der abgesaugten Luft enthaltene Wasserdampf kondensiert, um eine Beschädigung der Pumpe durch Feuchtigkeit zu verhindern. Durch eine Öffnung im Deckel konnte frische Luft in das Kalorimeter einströmen.

Wie wir in Vorversuchen feststellen konnten, verhalten sich die Versuchstiere im Kalorimeter sehr ruhig. Daher gehen wir davon aus, dass Veränderungen der nicht- evaporativen Wärmeabgabe im Wesentlichen auf Veränderungen der Thermogenese zurückzuführen sind und die Wärmeabgabe infolge lokomotorischer Aktivität allenfalls als geringe systematische Störgröße einzuschätzen ist.

Vor der Durchführung kalorimetrischer Messungen wurde eine Vier-Punkt-Kalibrierung mit einem elektrischen Widerstand von 1,5 k Ω durchgeführt.

Die Apparatur wurde zu Beginn eines jeden Versuchstags überprüft, um ihre ordnungsgemäße Funktion sowie die Sicherheit der Tiere zu gewährleisten.

Durchführung der Wärmemessung

Die Kalorimeter wurden mit in ca. 80 °C heißem Wasser erhitzten handelsüblichen Gel-Packs zur schnelleren Äquilibration vorgewärmt, bis das Voltmeter (Voltcraft 820, Conrad Electronic SE, Hirschberg, Deutschland) etwa 40 mV anzeigte; erst dann wurde das Tier in das Gerät gesetzt.

Unter Verwendung geeigneter Software (VC820/840 Interface Program Ver.: 1.00) zeichnete ein Computer acht Stunden lang jede Minute die durch das Voltmeter gemessene Spannung auf.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und erhielten Futter und Wasser. Das Körpergewicht wurde vor und nach dem Experiment dokumentiert.



Abb. 6: Versuchstier im Kalorimeter

3.4.6 Tötung der Versuchstiere

Nach der letzten Applikation hatten die Tiere eine Stunde lang Zugang zu Futter und Wasser.

Die Tötung erfolgte durch Nackenschlag und Dekapitation. Das Gehirn wurde freipräpariert, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5 Untersuchung der mRNA-Expression im Hypothalamus und in der NTS-Region

Die Expression ausgewählter Neuropeptide im Hypothalamus und in der NTS-Region wurde mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real time-Polymerase Chain Reaction*: qRT-PCR) bestimmt. Aus den homogenisierten Gewebeproben wurde in einem ersten Schritt die RNA extrahiert. Anschließend wurde eine hierzu komplementäre DNA (cDNA) hergestellt, anhand derer letztlich die qRT-PCR durchgeführt werden konnte.

3.5.1 Präparation von Hypothalamus und NTS-Region

Die bei -80 °C eingefrorenen Gehirne wurden zunächst in einem Kryostaten (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) auf etwa -15 °C temperiert, damit sie eine zum Schneiden geeignete Konsistenz annehmen. Die Schnittführung orientierte sich am Atlas von Paxinos und Watson (47) und geschah mit einer Edelstahlklinge (819 Low Profile Microtome Blades, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland).

Die Präparation des Hypothalamus erfolgte nach der Methode von Palkovits und Brownstein (48). Der erste, koronare Schnitt wurde durch das Chiasma opticum (0,9 mm posterior von Bregma) geführt; mit dem zweiten wurden die Corpora mamillaria (5,9 mm posterior von Bregma) abgetrennt. Die entstandene Gehirnscheibe wurde auf die Schnittfläche des zweiten Schnittes gelegt. Mit einem weiteren Schnitt durch die Commissura anterior wurde der oberhalb des Hypothalamus liegende Hirnanteil entfernt. Abschließend wurden die lateral des Hypothalamus gelegenen Bereiche der Amygdala abgetrennt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die isolierten Hypothalami bei -80 °C gelagert.

Für die Präparation der NTS-Region wurde das durch den zweiten Schnitt abgetrennte Hirngewebe, welches das Kleinhirn und den Hirnstamm beinhaltete, benötigt. Zwei koronare Schnitte wurden 11,0 mm und 15,6 mm posterior von Bregma (und damit jeweils am kaudalen Ende des Corpus trapezoideum bzw. des Kleinhirns) durchgeführt. Die dabei entstandene Gewebescheibe wurde auf die Schnittfläche des am weitesten kaudal gelegenen Schnittes gelegt. Durch einen horizontalen Schnitt inmitten des vierten Ventrikels (7,2 mm unterhalb der Gehirnoberfläche) wurde der dorsal gelegene Teil entfernt. Daraufhin wurden diejenigen Hirnteile, die sich lateral des trigeminalen Traktes befinden, durch zwei sagittale Schnitte abgetrennt. Durch einen letzten, horizontalen Schnitt wurde der ventrale Anteil des entstandenen Gewebelockes abgesetzt. Die verbleibende obere Hälfte, welche die NTS-Region enthielt, wurde ebenso wie der Hypothalamus bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.2 Gewebehomogenisierung, RNA-Gewinnung und cDNA-Synthese

Der Lysepuffer (Nucleic Acid Purification Lysis Solution, Part. no. 4305895, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Der Hypothalamus wurde in 500 µl, die NTS-Region in 450 µl dieser Lösung mit einem Hochleistungsdispersierer (Ultra Turrax®, Janke & Kunkel, Ika-Werk, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Nach jeder Probe wurde der Dispersierstab des Gerätes in

RNase freiem Wasser (Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (0,1 %), zur Herstellung siehe 8.2.1 im Anhang) gereinigt, um eine Kontamination der folgenden Probe mit an diesem haftenden Rückständen zu verhindern.

Die Gewebelysate wurden jeweils mit 40 µl Proteinase K (Proteinase K Solution, Part. no. 43333793, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) versetzt und anschließend eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Extraktion der RNA unter Anwendung der Gewebefiltrationsmethode wurde die ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems) eingesetzt. Die hierbei verwendeten Lösungen (RNA Purification Washsolution I (Part. no. 4305891) und II (Part. no. 4305890) sowie Nucleic Acid Purification Elution Solution (Part. no. 4305893)) wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Das genaue Verfahren ist der durch unsere Arbeitsgruppe modifizierten Arbeitsanweisung von Applied Biosystems zur RNA-Isolierung mittels des genannten Gerätes zu entnehmen, welche unter 8.3 im Anhang dieser Arbeit zu finden ist.

Die Reinheit der RNA-Lösungen wurde anhand der Bestimmung ihrer optischen Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und 280 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum der aromatischen Gruppen der Proteine) mithilfe eines Spektralphotometers (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überprüft. Der aus diesen beiden Werten gebildete Quotient OD_{260}/OD_{280} lag über alle Proben gemittelt bei 2,1 und nahm für keine der Proben einen Wert kleiner als 2 an. Dies belegt die erfolgreiche Aufreinigung der RNA.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die RNA-Lösungen bei -80 °C gelagert.

Die cDNA wurde unter Verwendung von Oligo(dT)₂₀-Primern und Cloned AMV Reverser Transkriptase (Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit, Part. no. 12328040, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) im Thermocycler (T_{Gradient}, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Auch hierzu findet sich eine detaillierte Arbeitsanweisung im Anhang (siehe 8.4). Anschließend wurde die cDNA bis zum Beginn der Vervielfältigung durch die qRT-PCR bei -20 °C eingefroren.

3.5.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Um eine Quantifizierung des mRNA-Gehalts des Hypothalamus bzw. der NTS-Region zu ermöglichen, wurde die im vorangegangenen Schritt synthetisierte cDNA mittels qRT-PCR amplifiziert. Dazu wurden das 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und der Platinum® SYBR Green® qPCR SuperMix

(Cat. no. 11744-100, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Das genaue Vorgehen ist unter 8.5 im Anhang beschrieben. Die verwendeten Primer (Invitrogen) sind in Tab. 4 aufgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte zusammen mit bekannten Mengen einer Standard-cDNA, so dass unter Anwendung der Methode von Higuchi et al. (49) die mRNA-Kopienzahl errechnet werden konnte. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte, indem die errechnete Kopienzahl des Zielgens auf die Kopienzahl des als interner Standard verwendeten Referenzgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) bezogen wurde.

| Gen | GenBank Zugangsnummer | Vorwärts-Primer Rückwärts-Primer | Fragment- länge (BP) |
|----------------|--------------------------|--|-------------------------|
| POMC | AF510391 | 5´- GAA GGT GTA CCC CAA TGT CG -3´ 5´- CTT CTC GGA GGT CAT GAA GC -3´ | 211 |
| CART | NM_017110 | 5´- ACT GTC CCC GAG GAA CTT CT -3´ 5´- ATT TTG AAG CAG CAG GGA AA -3´ | 191 |
| NPY | NM_012614 | 5´-TAA CAA ACG AAT GGG GCT GT -3´ 5´- TGT CTC AGG GCT GGA TCT CT -3´ | 208 |
| AgRP | AF206017 | 5´- GCA GAC CGA GCA GAA GAT GT -3´ 5´- CTT GAA GAA GCG GCA GTA GC-3´ | 177 |
| NUCB2/Nesfatin | NM_021663 | 5´- TTT CTC TTG GTT CCG TGC GT -3´ 5´- TGG CGG TTC TAT CCT TGC A -3´ | 142 |
| CRF | NM_031019 | 5´- AAA GGG GAA AGG CAA AGA AA -3´ 5´- GTT TAG GGG CGC TCT CTT CT -3´ | 137 |
| TH | NM_012740.3 | 5´- CCA GGA CAT TGG ACT TGC ATC -3´ 5´- TGC ACC ATA AGC CTT CAG CTC -3´ | 127 |
| GAPDH | AF106860 | 5´- CCT ACC CCC AAT GTA TCC GTT -3´ 5´- TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT -3´ | 122 |

Tab. 4: GenBank-Zugangsnummern, Nukleotidsequenzen und Fragmentlängen der verwendeten Primer (BP = Basenpaare)

3.6 Auswertung und statistische Analyse der Messergebnisse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mithilfe der Software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) für Windows, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Dabei wurden Unterschiede ab $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant und ab $p \leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant bezeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). In den hier

verwendeten Abbildungen sind jeweils der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) für die entsprechenden Parameter aufgezeigt.

3.6.1 Auswertung der Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme und des Körpergewichts

Die Aufnahme von Nahrung und Wasser wurde durch Rückwägung nach ein- bzw. zweistündigen Zeitintervallen bestimmt, und es wurden jeweils MW und SD für jede Versuchsgruppe zu jedem Messzeitpunkt berechnet. Mit den ermittelten Körpergewichten wurde ebenso verfahren.

Die Mittelwerte wurden einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen unterzogen, wobei als Zwischensubjektfaktor die Substanzapplikation und als Innersubjektfaktor die verschiedenen Messzeitpunkte gewählt wurden. Zeigten sich hierbei statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$), so wurde ein Post-Hoc-Test nach Bonferroni angeschlossen.

3.6.2 Auswertung der Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe als Maß für die Thermogenese

Die vom Versuchstier produzierte nicht-evaporative Wärme wurde anhand der am Peltier-Element des Kalorimeters erzeugten thermoelektrischen Spannung unter Einbeziehung der jeweils aktuellen Kalibrierung bestimmt; sie diente als Maß für die Thermogenese. Um den Einfluss der Körpergröße als interferierende Variable zu eliminieren, wurde die aus der elektrischen Spannung berechnete Leistung jedes Versuchstieres gemäß Kleibers Gesetz (50;51) auf das mit 0,75 potenzierte Körpergewicht bezogen.

Hierbei gilt es einschränkend zu beachten, dass der Energieverbrauch nicht nur von der Körpermasse, sondern auch von seiner Zusammensetzung abhängig ist (52). Das von Kaiyala und Schwartz (53) als Alternative zur Elimination der Einflüsse sowohl des Körpergewichts als auch der Körperzusammensetzung auf den Energieverbrauch propagierte Verfahren der multiplen Regression lässt sich jedoch lediglich auf große Versuchspopulationen anwenden und war damit in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Tierzahl nicht praktikabel. Da sich die von uns eingesetzten Versuchstiere zu Beginn der Experimente in Bezug auf ihr Körpergewicht nicht signifikant voneinander unterschieden und aufgrund identischer Haltungsbedingungen auch nicht zu erwarten war, dass zwischen ihnen signifikante Unterschiede in Bezug auf die

Körperzusammensetzung bestanden, wurde daher trotz allem auf die bewährte Methode von Kleiber zurückgegriffen.

Die von einem Versuchstier abgegebene nicht-evaporative Wärme wurde über Intervalle von 15 min und 60 min gemittelt. Anschließend wurden für jedes Intervall MW und SD der Wärmeabgabe aller Tiere einer Gruppe berechnet und den unter 3.6.1 beschriebenen statistischen Analyseverfahren unterworfen.

3.6.3 Auswertung der Messung der mRNA-Expression

Zur Auswertung der Messung der mRNA-Expression wurden aus den wie unter 3.5.3 beschrieben normierten Kopienzahlen aller Versuchstiere einer Gruppe MW und SD berechnet. Die weitere statistische Analyse erfolgte wie bereits unter 3.6.1 erläutert.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der endogenen Effekte des anorexigenen Neuropeptids Nesfatin-1 sowie der Melanocortinrezeptor-Agonisten α -MSH und ACTH auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme, das Körpergewicht und die nicht-evaporative Wärmeabgabe von Ratten.

Dabei wurden zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt:

Experiment 1: Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortin-systems

Im ersten Experiment wurden Messungen an Tieren, deren NUCB2/Nesfatin- und Melanocortinsystem durch den Serotoninrezeptoragonisten mCPP pharmakologisch stimuliert werden sollten, vorgenommen. Die Versuche fanden während der Hell- und damit Ruhephase statt.

Experiment 2: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime

Im zweiten Experiment waren die Tiere zum Zeitpunkt der Substanzapplikation gesättigt, wodurch das NUCB2/Nesfatin- und das Melanocortinsystem sich in einem endogen aktivierten Zustand befanden. Es setzte sich aus zwei Teilexperimenten zusammen, die sich darin unterschieden, dass die Messungen entweder während der physiologischen Aktivitätsphase der Tiere im Dunklen (A) oder aber tagsüber während der Ruhephase der Tiere (B) durchgeführt wurden.

4.1 Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortin-systems (Exp. 1)

Durch die Applikation von mCPP in den PVN sollten das NUCB2/Nesfatin-System und das Melanocortinsystem hungriger Versuchstiere aktiviert werden, um somit eine vermehrte Expression der anorexigenen Neuropeptide Nesfatin-1, ACTH und α -MSH zu erreichen. Die genannten Peptide wurden bei einem Teil der Tiere wie unter 3.4.2

beschrieben durch die gleichzeitige Gabe entsprechender Antikörper selektiv antagonisiert (vgl. Applikationsschema Tab. 2).

4.1.1 Kumulative Nahrungs- und Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts nach Applikation der Antikörper in den PVN

Zum Zeitpunkt der Substanzapplikation bestanden hinsichtlich des Körpergewichts der Versuchstiere keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier experimentellen Gruppen (MW = 277,9 g, SD = 17,1 g; $F = 0,733$, $p = 0,541$).

Die Ergebnisse der Messung der Nahrungsaufnahme nach Applikation der Antikörper in den PVN sind in Abb. 7 dargestellt. Die ANOVA mit Messwiederholungen zeigte, dass während der ersten 24 Stunden post iniectionem (p.i.) zwischen den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Nahrungsaufnahme bestanden ($F = 0,413$, $p = 0,745$).

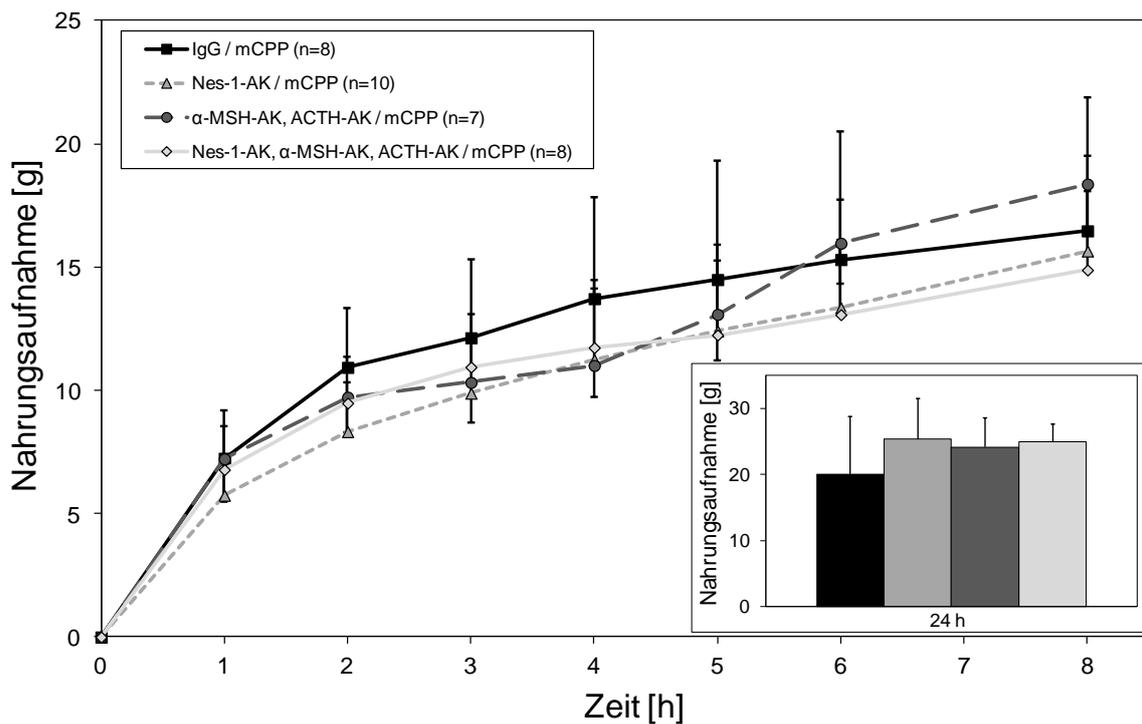


Abb. 7: Kumulative Nahrungsaufnahme mCPP-stimulierter Tiere nach Substanzapplikation in den PVN

Das Insert zeigt die nach 24 h erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

Auch in Bezug auf die Wasseraufnahme in den ersten 24 Stunden p.i. ($F = 0,133$, $p = 0,940$) und die Veränderung des Körpergewichts sechs und 24 Stunden nach der

Applikation ($F = 0,883$, $p = 0,461$) waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Die entsprechenden Daten sind unter 8.6 im Anhang dieser Arbeit abgebildet (Abb. 19 bzw. Abb. 20).

4.1.2 Nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN

Zu Beginn der Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe bestand in Bezug auf das Körpergewicht kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der verschiedenen experimentellen Gruppen (MW = 304,0 g, SD = 21,1 g; $F = 0,879$, $p = 0,463$).

Die Ergebnisse der Kalorimetrie sind Abb. 8 zu entnehmen. Die statistische Analyse (ANOVA mit Messwiederholungen) bewertete die Unterschiede zwischen den Gruppen als nicht signifikant ($F = 1,635$, $p = 0,203$).

Die Halbwertszeit von mCPP beträgt im Gehirn der Ratte nur etwas mehr als eine Stunde (54). Daher wurde besonderes Augenmerk auf die ersten vier Stunden nach der Applikation gelegt. Für diese wurden zusätzlich die Mittelwerte der nicht-evaporativen Wärmeabgabe der Versuchstiere in Intervallen von 15 min berechnet. Auch hier waren jedoch keinerlei signifikante Ergebnisse zu verzeichnen ($F = 1,659$, $p = 0,198$, siehe auch Abb. 21 unter 8.6 im Anhang).

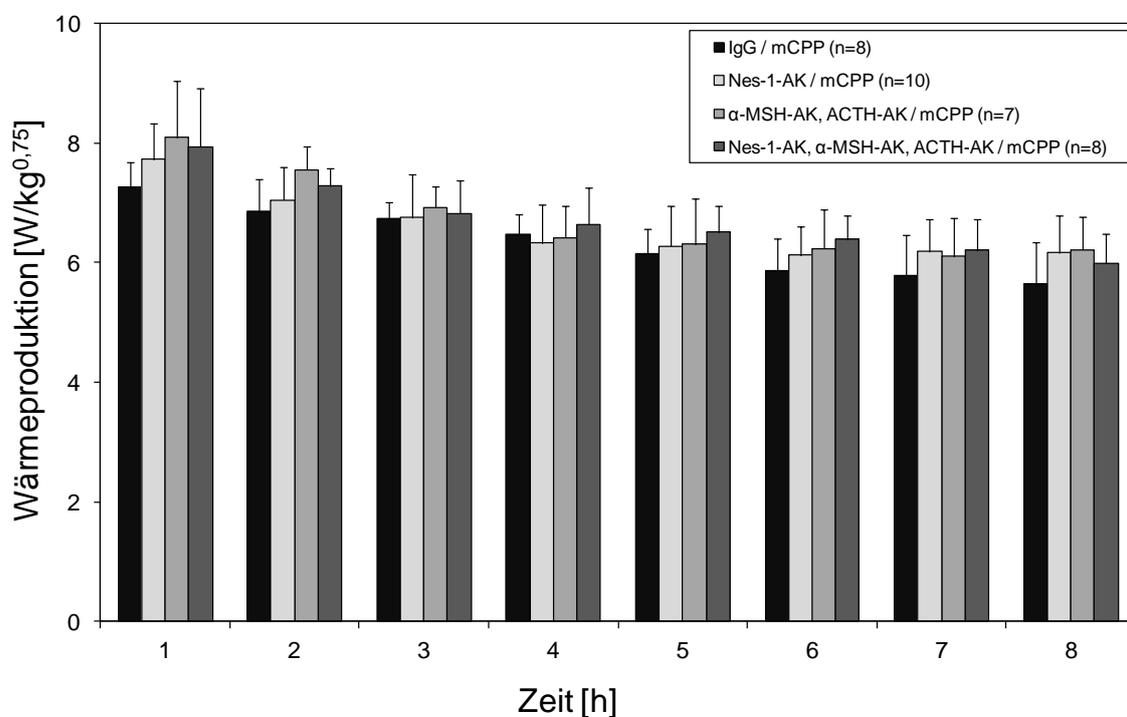


Abb. 8: Nicht-evaporative Wärmeabgabe mCPP-stimulierter Tiere nach Substanzapplikation in den PVN

4.1.3 mRNA-Expression nach Applikation der Antikörper in den PVN

Nachdem weder die Messung der metabolischen Parameter noch die der Thermogenese einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ergeben hatte, wurde auf die Quantifizierung der hypothalamischen mRNA sowie der mRNA in der NTS-Region verzichtet.

4.2 Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime (Exp. 2)

Bei den Versuchstieren in Experiment 2 waren das NUCB2/Nesfatin- und das Melanocortinsystem zum Zeitpunkt der Antikörperapplikation in den PVN endogen aktiviert, da diese Tiere besonders gut gesättigt waren. Somit waren die Spiegel der anorexigenen Neuropeptide Nesfatin-1, ACTH und α -MSH physiologisch erhöht.

Um die Funktion und Interaktion der oben genannten Systeme bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und der Thermogenese auch im Hinblick auf den Tagesrhythmus untersuchen zu können, gliederte sich dieser Versuchsteil in zwei Teilerperimente.

4.2.1 A. Experimente während der Aktivitätsphase

Im ersten Teilerperiment wurden die Effekte der Antikörper-Applikation (gemäß Applikationsschema in Tab. 3 unter 3.4.2) auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe und die Nahrungsaufnahme satter Versuchstiere während ihrer physiologischen Aktivitätsphase untersucht.

Nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN

Das Körpergewicht der Tiere der vier experimentellen Gruppen unterschied sich zu Beginn des Experiments nicht signifikant (MW = 292,8 g, SD = 12,7 g; $F = 1,169$, $p = 0,335$).

Bei der Messung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe mittels direkter Kalorimetrie zeigten sich während der Gesamtbeobachtungszeit von acht Stunden nach der Applikation der Antikörper hoch signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen ($F = 4,964$, $p = 0,006$). Die Ergebnisse sind in Abb. 9 graphisch dargestellt.

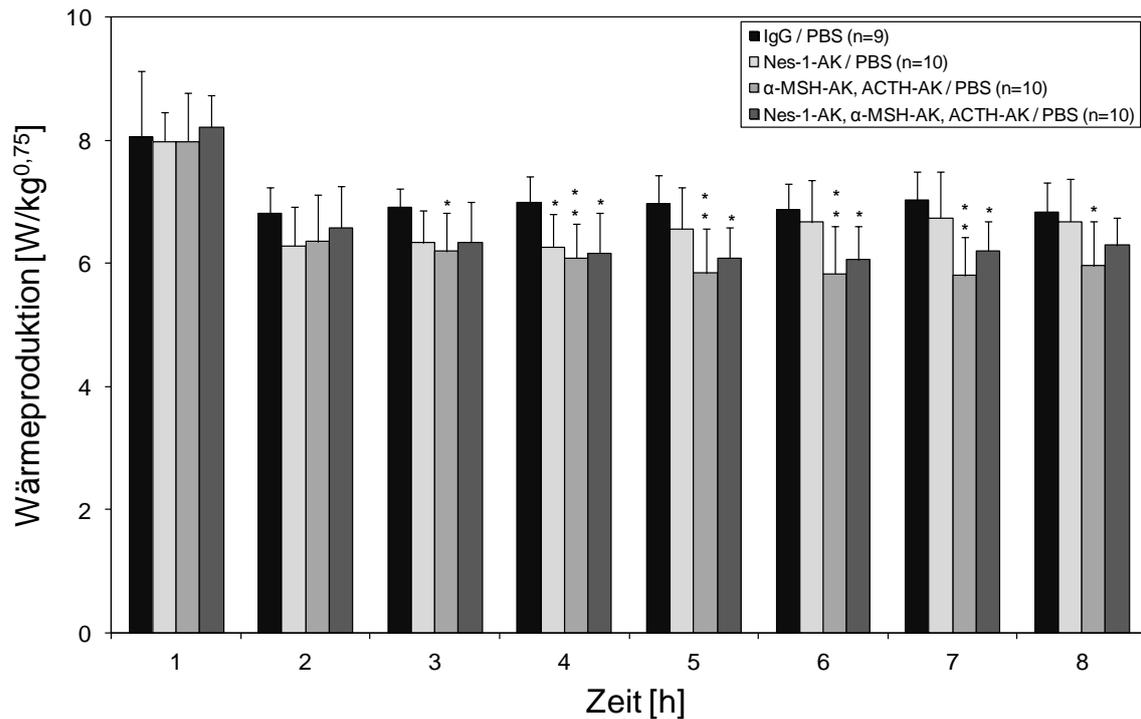


Abb. 9: Nicht-evaporative Wärmeabgabe physiologisch stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Aktivitätsphase

Die statistische Analyse mittels univariater ANOVA ergab, dass signifikante Unterschiede von der dritten bis zur achten Stunde p.i. bestanden (F- und p-Werte siehe Tab. 9 unter 8.8.1 im Anhang).

Im anschließend durchgeführten Bonferroni-t-Test zeigte sich, dass die Thermogenese derjenigen Tiere, die Antikörper gegen Nesfatin-1 erhalten hatten, nur in der vierten Stunde p.i. signifikant reduziert war, die Thermogenese derjenigen dagegen, die Antikörper gegen α -MSH und gegen ACTH erhalten hatten, in den Stunden drei bis acht p.i. Die mit einer Kombination aus allen drei Antikörpern behandelten Tiere gaben in den Stunden vier bis sieben p.i. signifikant weniger Wärme ab als die der Kontrollgruppe. Einen Überblick über die ermittelten p-Werte bietet Tab. 10 unter 8.8.1 im Anhang.

Nahrungs- und Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts nach Applikation der Antikörper in den PVN

Bei der Applikation der Antikörper in den PVN waren die Versuchstiere der vier experimentellen Gruppen hinsichtlich ihres Körpergewichts nicht signifikant voneinander verschieden (MW = 311,7 g, SD = 16,0 g; F = 1,608, p = 0,211).

Was die kumulative Nahrungsaufnahme angeht, so unterschieden sich die Versuchstiere der verschiedenen Gruppen während der ersten 24 Stunden nach Applikation der

Antikörper hoch signifikant voneinander ($F = 6,162$, $p = 0,002$). Die Ergebnisse dieses Versuchsteils sind in Abb. 10 graphisch dargestellt.

Diejenigen Tiere, denen Antikörper gegen α -MSH und ACTH in den PVN appliziert worden waren, nahmen in der ersten und dritten Stunde p.i. signifikant mehr Nahrung auf als die der Kontrollgruppe. Dasselbe war bei den Tieren, die Antikörper gegen Nesfatin-1 erhalten hatten, acht und 24 Stunden p.i. der Fall. Die anhand der univariaten ANOVA ermittelten F- und p-Werte für die verschiedenen Messzeitpunkte sind Tab. 11, die p-Werte aus dem Bonferroni-t-Test Tab. 12 unter 8.8.2 im Anhang zu entnehmen.

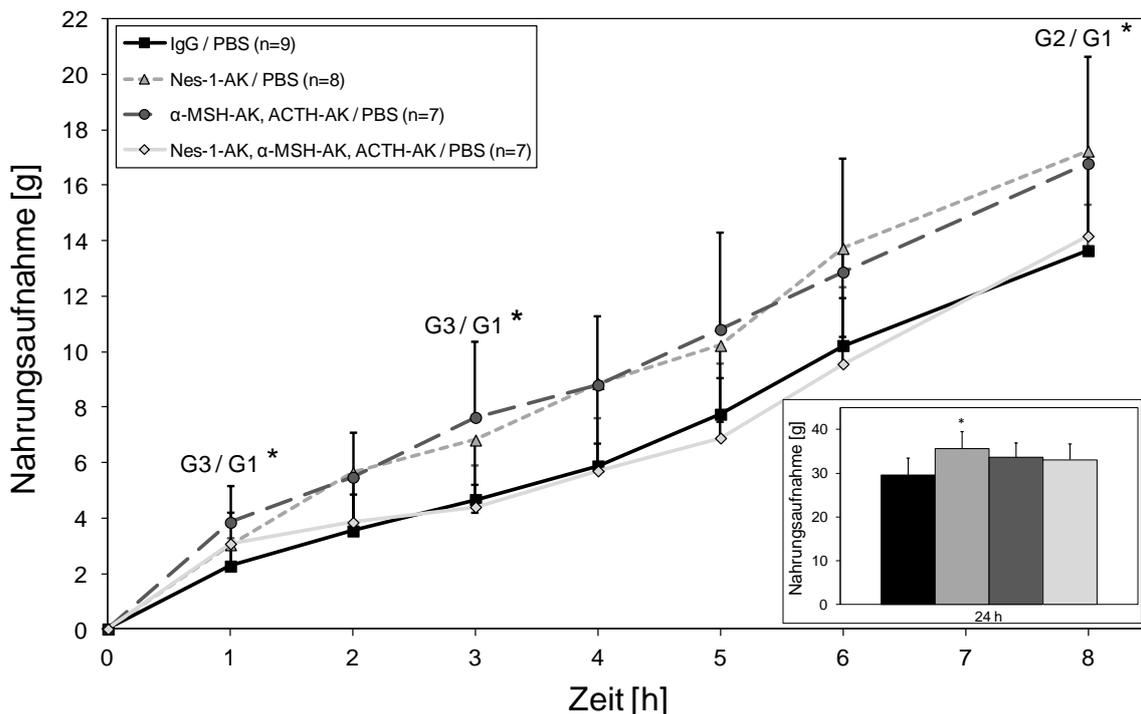


Abb. 10: Kumulative Nahrungsaufnahme physiologisch stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Aktivitätsphase

Das Insert zeigt die nach 24 h erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

Auch das Ergebnis der Messung der Wasseraufnahme der Versuchstiere während der ersten 24 Stunden erwies sich als statistisch hoch signifikant ($F = 5,172$, $p = 0,006$). Tab. 13 unter 8.8.2 im Anhang bietet einen Überblick über die für jeden Messzeitpunkt berechneten F- und p-Werte.

Die Tiere, denen Antikörper gegen Nesfatin-1 appliziert worden waren, hatten zu den Messzeitpunkten 6 h, 8 h und 24 h p.i. signifikant mehr Wasser zu sich genommen als die der Kontrollgruppe (siehe Abb. 11 sowie zur Statistik Tab. 14 unter 8.8.2 im Anhang).

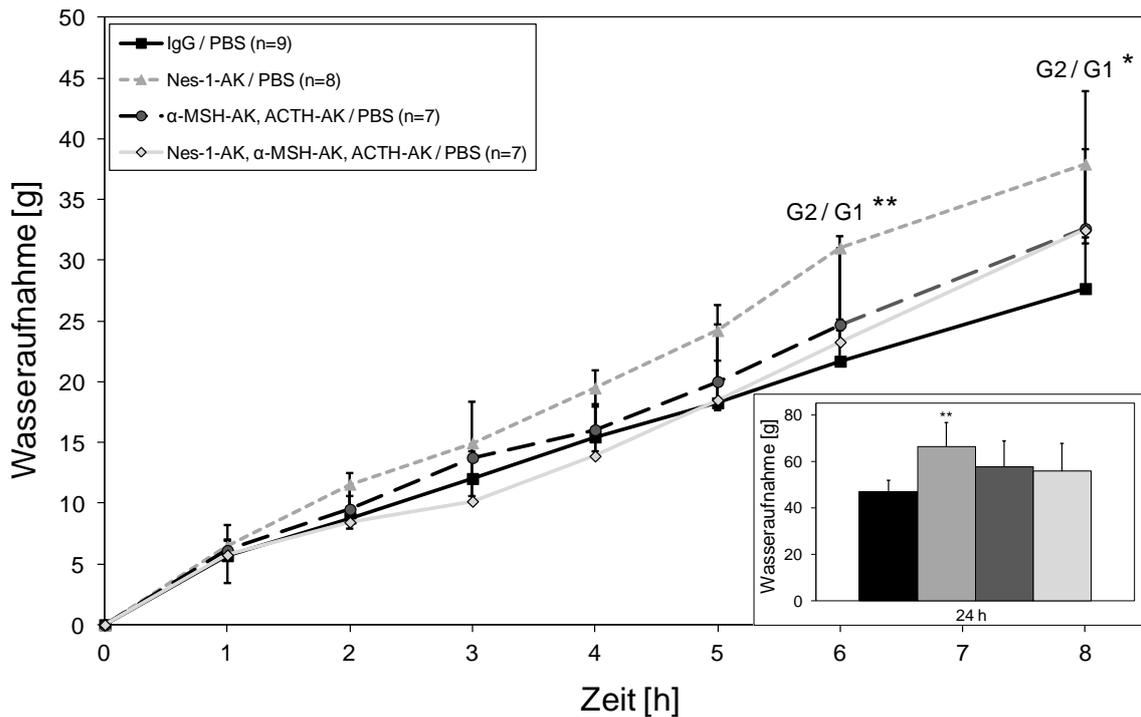


Abb. 11: Kumulative Wasseraufnahme physiologisch stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Aktivitätsphase

Das Insert zeigt die nach 24 h erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

In Bezug auf die Veränderung des Körpergewichts ergab die univariate ANOVA mit Messwiederholungen bei gemeinsamer Auswertung der Messzeitpunkte 6 h und 24 h p.i. keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen ($F = 2,787$, $p = 0,060$; vergleiche auch Abb. 22 unter 8.7 im Anhang).

mRNA-Expression im Hypothalamus nach Applikation der Antikörper in den PVN

Zum Zeitpunkt der Dekapitation betrug das Körpergewicht der Tiere im Mittel 337,3 g (SD = 19,3 g); es bestanden in dieser Hinsicht keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen ($F = 1,214$, $p = 0,320$).

POMC und CART

Die abendliche Applikation von Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK oder Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK in den PVN satter Versuchstiere hatte einen statistisch hoch signifikanten Effekt auf die Expression der POMC-mRNA im Hypothalamus ($F = 6,141$, $p = 0,002$; vergleiche hierzu Abb. 12A).

Dabei reduzierte die Gabe von α -MSH-AK und ACTH-AK die Expression der POMC-mRNA hoch signifikant ($p = 0,002$); die Behandlung mit einer Kombination aus Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK bewirkte ebenfalls eine signifikante Verminderung ($p = 0,029$). Bei denjenigen Tieren, die nur Nes-1-AK erhalten hatten, kam es dagegen nur zu einer geringfügigen Reduktion der POMC-mRNA-Expression, welche keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,399$).

In Bezug auf die Expression der CART-mRNA im Hypothalamus ließen sich unabhängig von der Art der injizierten Antikörper keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen feststellen ($F = 2,448$, $p = 0,082$; siehe Abb. 12B).

NPY und AgRP

Die Expression der NPY-mRNA im Hypothalamus wurde durch die Applikation der Antikörper hoch signifikant verändert ($F = 10,771$, $p = 0,000$, vergleiche hierzu Abb. 12C). Die Gabe von Nes-1-AK ($p = 0,000$), α -MSH-AK und ACTH-AK ($p = 0,010$) oder einer Kombination dieser drei Antikörper ($p = 0,000$) führte jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der NPY-mRNA-Expression.

Bei der Untersuchung der Expression der AgRP-mRNA zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen ($F = 4,364$, $p = 0,012$). Wie aus Abb. 12D ersichtlich, exprimierten diejenigen Tiere, die mit einer Kombination aus Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK behandelt worden waren, größere Mengen des Peptids als die der Kontrollgruppe ($p = 0,030$).

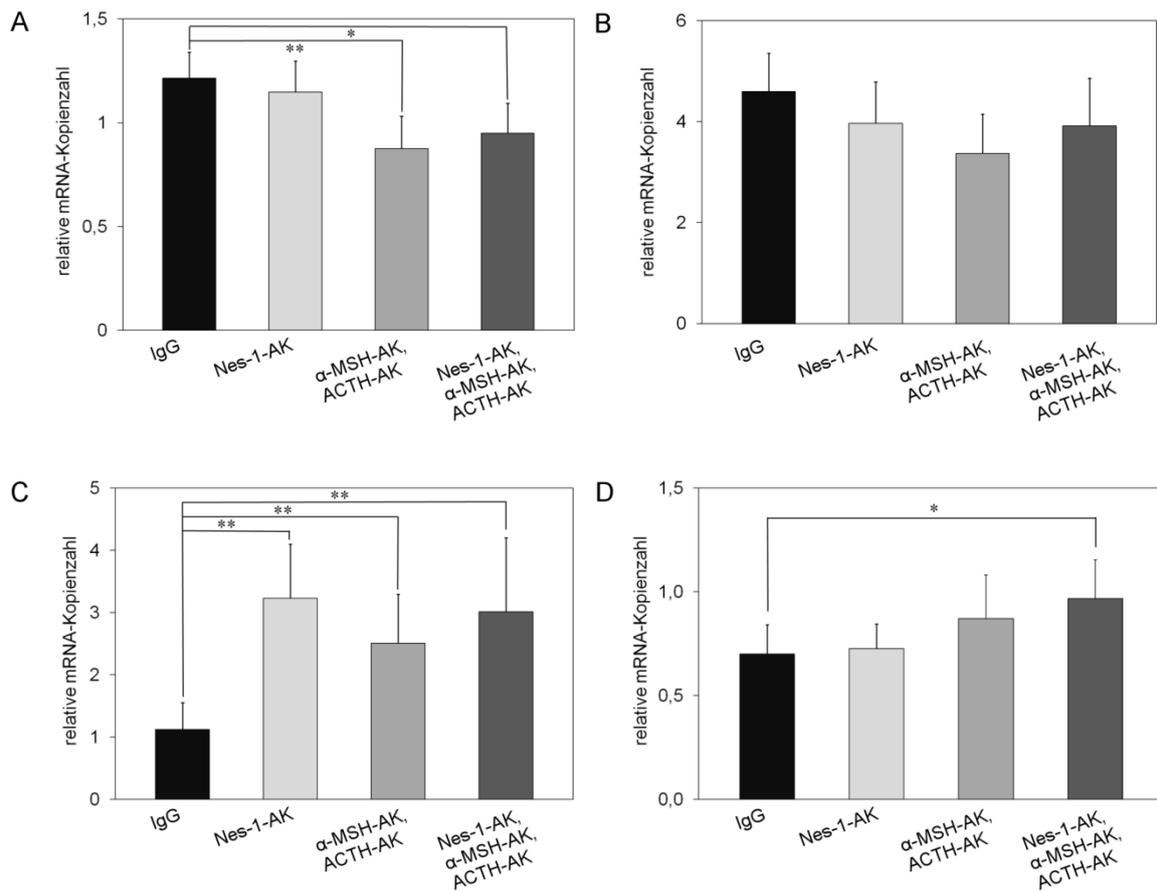


Abb. 12: Expression der Agonisten und Antagonisten des Melanocortinsystems im Hypothalamus

A: POMC; B: CART; C: NPY; D: AgRP

NUCB2 und CRF

Bei der quantitativen Bestimmung der Expression der NUCB2-mRNA im Hypothalamus zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit verschiedenen Antikörpern behandelten Versuchstieren ($F = 2,071$; $p = 0,125$; siehe auch Abb. 13A).

In Bezug auf die Expression von CRF hingegen unterschieden sich die vier experimentellen Gruppen signifikant voneinander ($F = 3,472$, $p = 0,028$). Diejenigen Tiere, die Antikörper gegen α -MSH und ACTH erhalten hatten, bildeten weniger CRF-mRNA als die Tiere der Kontrollgruppe ($p = 0,022$) (siehe Abb. 13B).

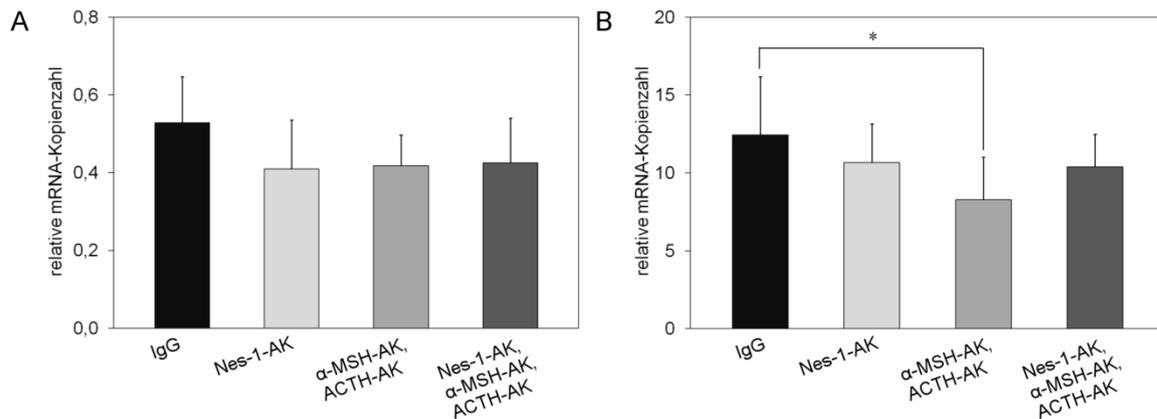


Abb. 13: Expression von NUCB2 (A) und CRF (B) im Hypothalamus

mRNA-Expression in der NTS-Region nach Applikation der Antikörper in den PVN

POMC und CART

Ähnlich wie im Hypothalamus hatte die abendliche Applikation der verschiedenen Antikörper auch in der NTS-Region einen hoch signifikanten Effekt auf die Expression der POMC-mRNA ($F = 9,908$; $p = 0,000$). Sowohl die Gabe von α -MSH-AK und ACTH-AK als auch die einer Kombination aus Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK verminderte diese hoch signifikant ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,008$). Dagegen zeigte die Injektion von Nes-1-AK allein keine vergleichbare Wirkung ($p = 1,000$) (siehe auch Abb. 14A).

Die Expression der CART-mRNA in der NTS-Region blieb durch die Antikörpergabe unbeeinflusst ($F = 1,072$; $p = 0,375$; siehe auch Abb. 14B).

NPY

Was die Expression der NPY-mRNA in der NTS-Region angeht, so zeigten sich ebenso wie im Hypothalamus hoch signifikante Unterschiede zwischen den vier experimentellen Gruppen ($F = 8,034$; $p = 0,000$). Durch die Applikation von Nes-1-AK ($p = 0,001$) sowie von α -MSH-AK und ACTH-AK ($p = 0,002$) kam es wie aus Abb. 14C ersichtlich jeweils zu einer hoch signifikanten Steigerung der Expression. Auch die gemeinsame Verabreichung aller drei Antikörper zeigte einen statistisch signifikanten Effekt ($p = 0,012$).

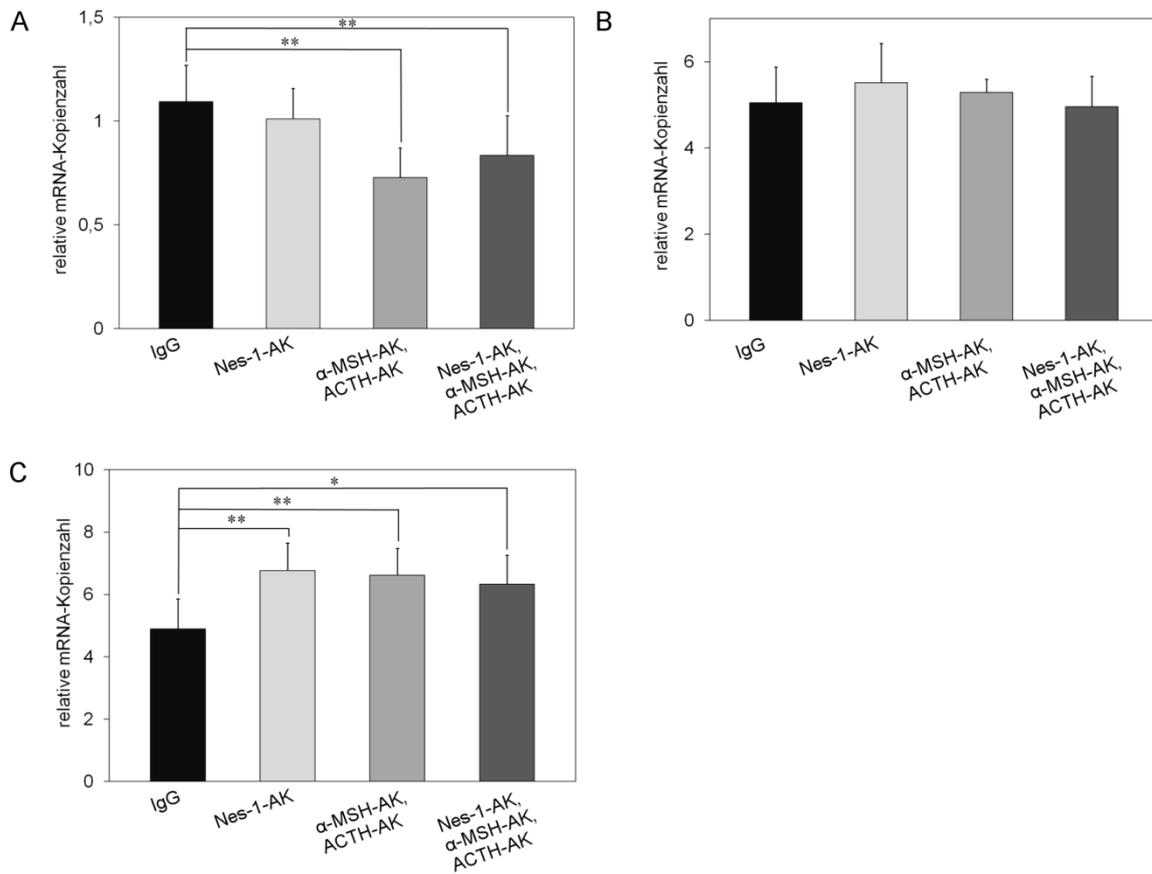


Abb. 14: Expression der Agonisten und Antagonisten des Melanocortinsystems in der NTS-Region

A: POMC; B: CART; C: NPY

NUCB2 und Tyrosinhydroxylase (TH)

Bei der quantitativen Bestimmung der Expression der NUCB2-mRNA in der NTS-Region ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen nachweisen ($F = 0,954$; $p = 0,472$; vergleiche hierzu Abb. 15A).

Gleiches gilt für die Expression der TH-mRNA in diesem Kerngebiet ($F = 0,464$, $p = 0,709$; siehe auch Abb. 15B).

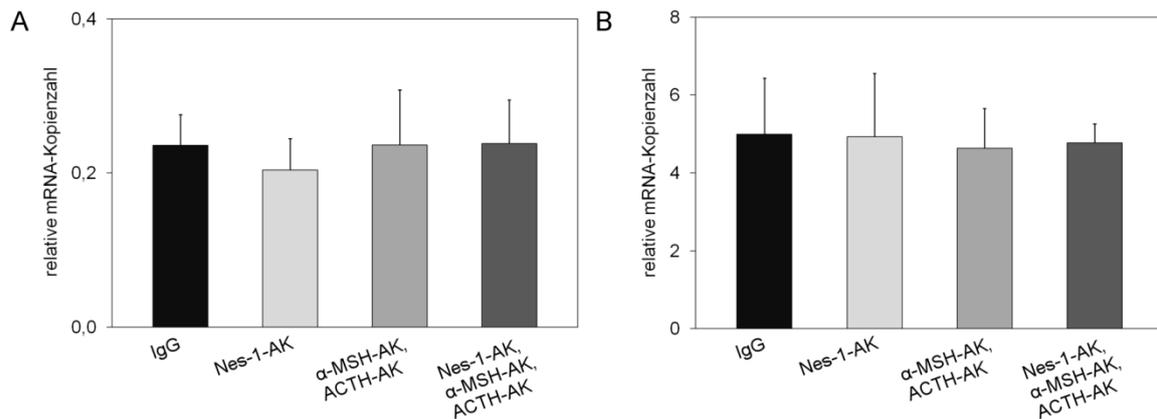


Abb. 15: Expression von NUCB2 (A) und TH (B) in der NTS-Region

4.2.2 B. Experimente während der Ruhephase

In einem zweiten Teilexperiment wurden die Messungen der Nahrungsaufnahme und der nicht- evaporativen Wärmeabgabe tagsüber und damit während der physiologischen Schlafenszeit der Tiere durchgeführt. Das Applikationsschema blieb dabei im Vergleich zu Exp. 2A gänzlich unverändert (vgl. hierzu Tab. 3 unter 3.4.2).

Nicht- evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN

Die Tiere der vier Gruppen waren zu Versuchsbeginn in Bezug auf ihr Körpergewicht nicht signifikant voneinander verschieden (MW = 309,7 g, SD = 10,5 g; $F = 0,295$, $p = 0,829$).

Die Ergebnisse der kalorimetrischen Messung, die in Abb. 16 dargestellt sind, wurden einer ANOVA mit Messwiederholungen unterzogen, welche keine signifikanten Unterschiede im Vergleich aller Gruppen miteinander ergab ($F = 1,491$, $p = 0,238$).

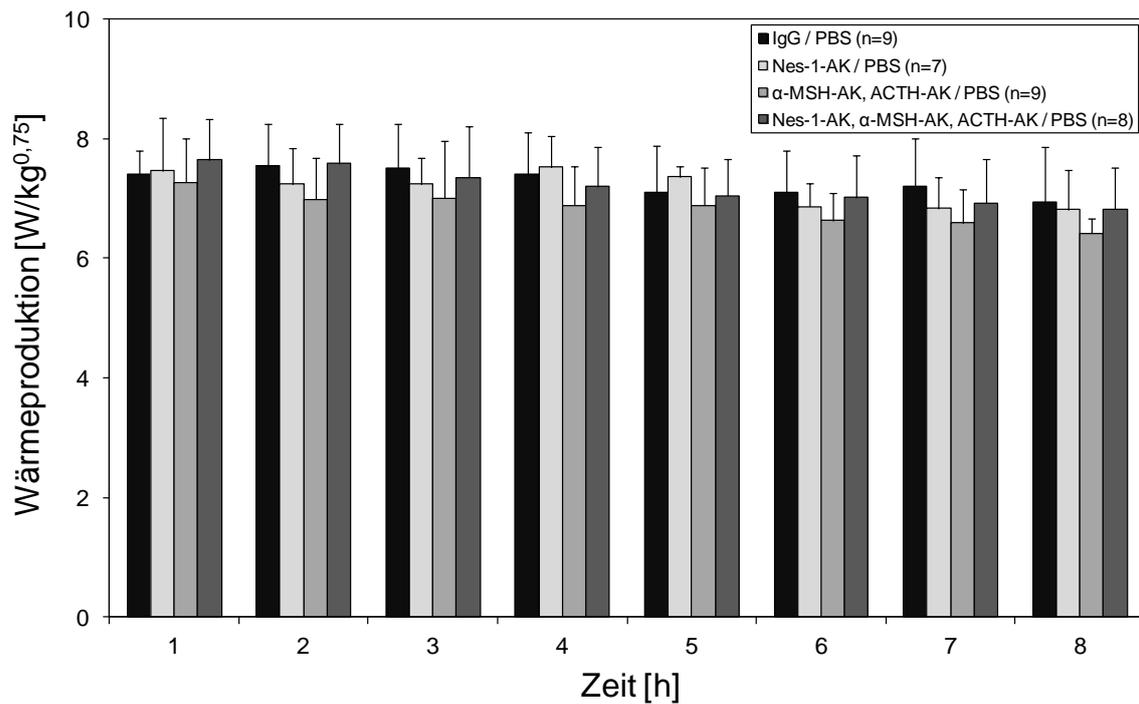


Abb. 16: Nicht-evaporative Wärmeabgabe physiologisch stimulierter Tiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Ruhephase

Kumulative Nahrungs- und Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts nach Applikation der Antikörper in den PVN

Zum Zeitpunkt der Substanzapplikation bestand in Bezug auf das Körpergewicht kein signifikanter Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen (MW = 331,2 g, SD = 14,2 g; $F = 0,312$, $p = 0,817$).

Die Ergebnisse der Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme sind Abb. 17 zu entnehmen; die Daten zur kumulativen Wasseraufnahme und zur Veränderung des Körpergewichts werden unter 8.9 im Anhang gezeigt (Abb. 23 bzw. Abb. 24).

In der ANOVA mit Messwiederholungen erwiesen sich die Unterschiede, die während der 24-stündigen Beobachtungszeit zwischen den Gruppen bestanden, für sämtliche oben genannte Parameter als statistisch nicht signifikant (kumulative Nahrungsaufnahme: $F = 0,463$, $p = 0,711$; kumulative Wasseraufnahme: $F = 0,057$, $p = 0,982$; Veränderung des Körpergewichts: $F = 0,259$, $p = 0,854$).

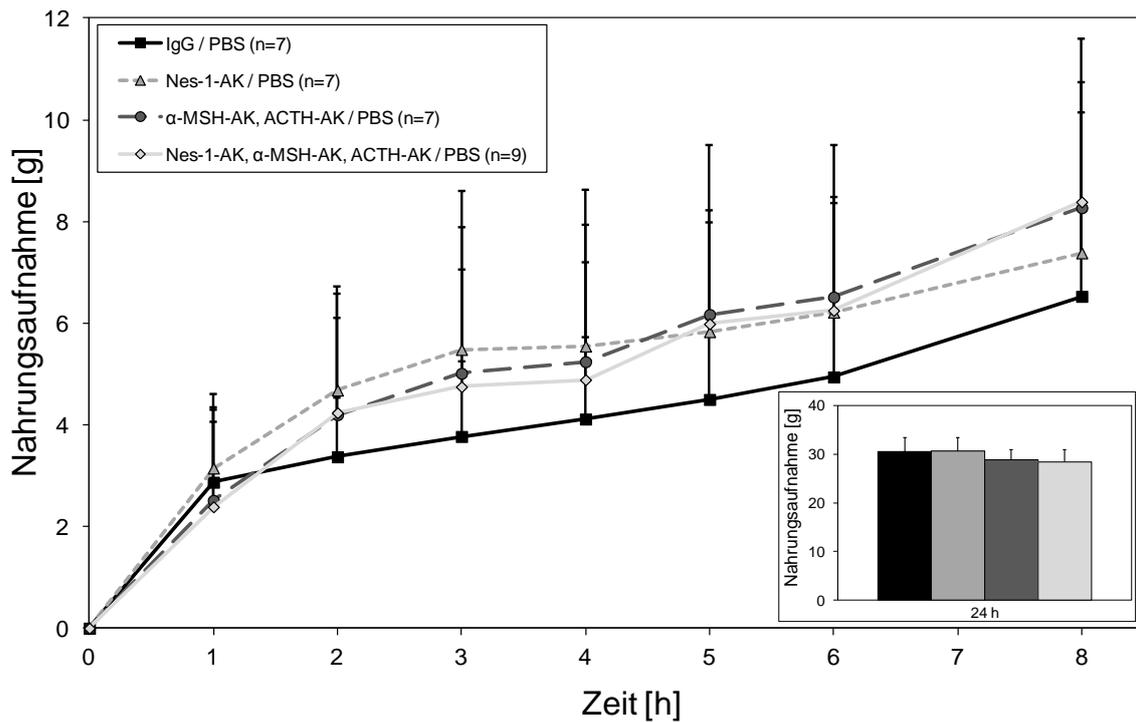


Abb. 17: Kumulative Nahrungsaufnahme physiologisch stimulierter Versuchstiere nach der Substanzapplikation in den PVN während der Ruhephase

Das Insert zeigt die nach 24 h erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

mRNA-Expression nach Applikation der Antikörper in den PVN

Da die vorausgegangenen Messungen kein statistisch signifikantes Ergebnis erbracht hatten, erfolgte in diesem Telexperiment keine quantitative Bestimmung der mRNA in Hypothalamus und NTS.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH für die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase

Wie bereits einleitend ausführlich beschrieben wurde, sind sowohl das NUCB2-Prozessierungsprodukt Nesfatin-1 als auch die beiden POMC-Derivate α -MSH und ACTH von herausragender Bedeutung für die Regulation des Energiehaushalts. Diese Neuropeptide werden besonders stark in hypothalamischen Kerngebieten, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich sind (PVN, ARC), sowie im NTS des Hirnstamms, der maßgeblich an der Steuerung der Thermogenese beteiligt ist, exprimiert (8;33). Ihre Expression ist bei hungrigen Versuchstieren niedriger als bei satten (8;30) und kann zum Beispiel durch die Behandlung mit dem Serotoninrezeptoragonisten mCPP gesteigert werden (27;40).

Nesfatin-1 wurde 2006 als hypothalamisches Sättigungsmolekül identifiziert (8). Die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 reduziert die Nahrungsaufnahme (8;18) und erhöht die nicht-evaporative Wärmeabgabe von Ratten (18).

Ein essentieller Interaktionspartner des NUCB2/Nesfatin-Systems ist das zentralnervöse Melanocortinsystem (8). Dessen Agonisten α -MSH und ACTH hemmen tonisch die Nahrungsaufnahme (33;35). Darüber hinaus wird die durch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems ausgelöste diät- oder kälteinduzierte Steigerung der Thermogenese im braunen Fettgewebe vornehmlich über zentralnervöse Melanocortinrezeptoren vermittelt (36).

Da in der Literatur bereits zahlreiche auf einer pharmakologischen Applikation der Neuropeptide basierende Daten vorliegen, diente die vorliegende Arbeit speziell der Untersuchung der Funktion des endogenen Nesfatin-1, α -MSH und ACTH bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Thermogenese unter Berücksichtigung etwaiger Einflüsse des Tagesrhythmus der Versuchstiere.

Zu diesem Zweck wurde nach der Applikation von Antikörpern gegen Nesfatin-1, gegen α -MSH und ACTH oder gegen alle drei Moleküle in den PVN männlicher Wistar-Ratten die nicht-evaporative Wärmeabgabe derselben mittels direkter Kalorimetrie bzw. ihre Nahrungs- und Wasseraufnahme mittels Rückwägung bestimmt. Zudem wurde die Expression verschiedener Neuropeptide in Hypothalamus und NTS untersucht.

5.2 Antagonisierung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH nach pharmakologischer Stimulation während der Ruhephase (Exp. 1)

Um für unsere Messungen einen möglichst hohen Spiegel der Neuropeptide Nesfatin-1, α -MSH und ACTH zu erreichen, wurden das NUCB2/Nesfatin-System und das Melanocortinsystem der Versuchstiere in Experiment 1 pharmakologisch stimuliert. Zu diesem Zweck wurde der 5-HT_{1B/2C}-Agonist mCPP appliziert.

Da die Messungen am Tage und damit in der Hellphase, während der Ratten als nachtaktive Tiere schlafen, erfolgten, sollte durch eine 24-stündige Nahrungskarenz der Antrieb der Versuchstiere zur Nahrungsaufnahme während ihrer physiologischen Ruhephase gesteigert werden.

Die morgendliche Applikation von mCPP und Antikörpern gegen Nesfatin-1, gegen α -MSH und ACTH oder gegen alle drei Neuropeptide in den PVN hungriger Versuchstiere bewirkte - verglichen mit den Tieren der Kontrollgruppe, welche mCPP und IgG erhalten hatten - keine signifikante Veränderung der nicht-evaporativen Wärmeabgabe sowie der Nahrungs- und Wasseraufnahme und der Körpergewichtszunahme während der ersten 24 Stunden p.i.

Weshalb in unserem Modell die selektive Antagonisierung von Nesfatin-1 und bzw. oder α -MSH und ACTH trotz der mit der Gabe von mCPP beabsichtigten pharmakologischen Aktivierung des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems keine signifikanten Effekte zeigte, bleibt weitgehend unklar. Naheliegend erscheinen zunächst zwei mögliche Ursachen: Zum einen könnte der Versuch einer serotonergen Stimulation der genannten Neuropeptidsysteme durch die Gabe von mCPP nicht erfolgreich gewesen sein. In diesem Falle waren die Spiegel von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH im ZNS der hungrigen Versuchstiere vermutlich zu niedrig, als dass die Inhibition ihrer Wirkung messbare Veränderungen hätte hervorrufen können. Zum anderen könnte die Blockade an einer mangelhaften Funktion der verwendeten Antikörper gescheitert sein, was jedoch wenig wahrscheinlich ist, da die Wirksamkeit derselben anderweitig durchaus belegt werden konnte (s.u.).

Eventuell bestehende Unterschiede der Wirkung von mCPP im hungrigen im Vergleich zum satten Organismus sind unserer Kenntnis nach bisher noch nicht untersucht worden. Sowohl Heisler et al. (43) als auch Lam et al. (55) hatten das Ansprechen von POMC-Neuronen auf eine serotonerge Stimulation ausschließlich bei ad libitum gefütterten Mäusen zu Beginn der Dunkelphase beobachtet. Möglicherweise sind extrem hungrige Tiere für eine serotonerge Aktivierung des Melanocortin- und des NUCB2/Nesfatin-Systems wenig empfindlich, was beispielsweise mit einer veränderten Expression

entsprechender Rezeptoren zusammenhängen könnte. Auch zum Einfluss des Applikationszeitpunkts auf die Wirkung von mCPP sind uns keine Daten bekannt.

Einige Befunde deuten in der Tat darauf hin, dass ohne eine wirkungsvolle Stimulation der Expression von NUCB2 und POMC die Applikation von Antikörpern gegen ihre Prozessierungsprodukte bei Nahrungskarenz zu keinen messbaren Effekten führt. So hatten frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergeben, dass die zentralnervöse Applikation von Antikörpern gegen α -MSH und ACTH am Abend (also in direktem Anschluss an die Ruhephase und vor der nächtlichen Nahrungsaufnahme) bei Ratten, die zu diesem Zeitpunkt physiologisch hungrig sind, keine Steigerung der Nahrungsaufnahme bewirkt (35). Experimente anderer Gruppen hatten gezeigt, dass zur Reduktion der Nahrungsaufnahme beim Füttern von Tieren in der Hell- und damit Ruhephase nach vorausgegangener nächtlicher Nahrungskarenz deutlich höhere Dosen von Nesfatin-1 erforderlich sind als bei ad libitum-gefütterten Tieren in der Dunkel- oder Aktivitätsphase (17). Dies wird als ein Indiz für die Interaktion von Nesfatin-1 mit zentralnervösen Neuropeptidsystemen, die speziell während der nächtlichen Phase der physiologischen Nahrungsaufnahme aktiviert werden, gewertet.

In Bezug auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe gibt es unserer Kenntnis nach in der Literatur bislang keine vergleichbaren Daten, was eine Beurteilung unserer Ergebnisse erschwert. Angesichts der Tatsache, dass die Antikörper gegen α -MSH und ACTH bereits in vorhergehenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt worden waren (35) und auch die Applikation des Nes-1-AK in Experiment 2A dieser Arbeit durchaus signifikante Effekte hatte, können wir jedoch eine Wirkungslosigkeit der Substanzen nahezu ausschließen, sodass das Ausbleiben eines messbaren Effektes auf die Thermogenese hier ebenfalls am ehesten auf eine mangelnde Effektivität der Stimulation durch mCPP zurückzuführen ist.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass durch das im Rahmen dieser Arbeit angewandte kalorimetrische Verfahren lediglich die nicht-evaporative Wärmeabgabe, nicht hingegen die Wärmeabgabe durch Verdunstung und der Wärmeverlust durch die Belüftung der Apparatur quantifiziert werden können. Somit wird die Wärmeabgabe der Versuchstiere insgesamt unterschätzt. Aufgrund der Tatsache, dass hiervon alle Versuchstiere gleichermaßen betroffen sind, sollte dies jedoch zu keiner Verzerrung der zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen gemessenen relativen Effekte führen. Zur Optimierung des Verfahrens müssen in künftigen Experimenten die Luftfeuchtigkeit sowie die Temperaturdifferenz zwischen Zu- und Abluft gemessen werden, um somit auch die evaporative Wärmeabgabe zu quantifizieren.

5.3 Antagonisierung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH nach Stimulation durch ein spezielles Fütterungsregime (Exp. 2)

Während in Experiment 1 eine pharmakologische Stimulation des NUCB2-Nesfatin- und des Melanocortinsystems vorgenommen wurde, basierte Experiment 2 auf einem rein physiologischen Ansatz. Es ist bekannt, dass sowohl NUCB2 (8) als auch POMC (30) bei satten Versuchstieren stärker exprimiert werden als bei hungrigen. Um die Spiegel an endogenem Nesfatin-1, α -MSH und ACTH zu erhöhen, wurden daher die Versuchstiere einem speziellen Fütterungsregime unterzogen: Jeder Applikation ging eine 24-stündige Nahrungskarenz voraus, die von einer neunstündigen Periode gefolgt wurde, in der die Tiere unbeschränkten Zugang zu Futter hatten. Direkt im Anschluss daran wurden gegen Nesfatin-1 und gegen α -MSH und ACTH gerichtete Antikörper appliziert; dadurch erfolgte die Injektion der Antikörper in den PVN in kürzerem Abstand zur Nahrungsaufnahme der Ratten und die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt besonders gut gesättigt.

5.3.1 Experimente während der Aktivitätsphase (Exp. 2A)

Da unser Interesse der Wirkung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH in einer durch äußere Faktoren möglichst ungestörten, physiologischen Situation galt und unter anderem die Nahrungsaufnahme, Aktivitäts- und Ruhephasen sowie zahlreiche neuroendokrine Regulationsmechanismen eine Abhängigkeit vom Tagesrhythmus zeigen, führten wir unsere Messungen zunächst während der nächtlichen Aktivitätsphase der Versuchstiere durch.

Nach der abendlichen Applikation von Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK oder einer Kombination aus diesen dreien in den PVN satter Versuchstiere zeigten sich sowohl in Bezug auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe als auch in Bezug auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Nicht-evaporative Wärmeabgabe

Die Applikation von Antikörpern gegen Nesfatin-1 in den PVN satter Versuchstiere zu Beginn der Aktivitätsphase bewirkte während der vierten Stunde p.i. eine signifikante Reduktion der nicht-evaporativen Wärmeabgabe. Die Antagonisierung von α -MSH und ACTH verminderte die Wärmeabgabe von der dritten Stunde an bis zur achten; nach Applikation von Antikörpern gegen alle drei Neuropeptide blieb sie von der dritten bis zur siebten Stunde signifikant erniedrigt.

Bisher liegen nur wenige Daten zur Funktion von Nesfatin-1 bei der Regulation des Energiehaushalts vor. Kürzlich hatten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen Hinweise darauf entdeckt, dass Nesfatin-1 auch über seine anorexigene Wirkung hinaus Einfluss auf die Energiehomöostase nimmt (8;17). Diese Hypothese wird unter anderem durch die Beobachtung gestützt, dass Nesfatin-1 in zahlreichen Neuronen des Hirnstamms exprimiert wird, die sympathische Efferenzen in das braune Fettgewebe besitzen (19). Des Weiteren führt die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 zu einer Zunahme der Körperkerntemperatur (20).

Kürzlich gelang es unserer Arbeitsgruppe erstmalig, mithilfe der direkten Kalorimetrie den Effekt von Nesfatin-1 auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe von Ratten zu quantifizieren: Während der Aktivitätsphase der Tiere erhöht die i.c.v. Applikation von exogenem Nesfatin-1 diese von der dritten bis zur sechsten Stunde p.i. signifikant (18).

Während in jener Arbeit Nesfatin-1 in pharmakologischer Dosis (25 pmol / Versuchstier) appliziert worden war, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig in diesem Zusammenhang der Spiegel des endogenen Neuropeptids manipuliert; es liegen daher keine vergleichbaren Daten aus der Literatur vor. Es ist aber zu erwarten, dass die bei der Manipulation von Nesfatin-1 im physiologischen Bereich auftretenden Effekte weniger stark ausgeprägt sind als die nach pharmakologischer Gabe gemessenen. Das könnte erklären, warum wir in unserem Experiment nur während der vierten Stunde p.i. eine statistisch signifikante Reduktion der nicht-evaporativen Wärmeabgabe durch Nesfatin-1 beobachteten.

Diesbezüglich ist gewiss zu bedenken, dass unser Tiermodell aufgrund des Verzichts auf eine artifizielle Verstärkung der Expression von Nesfatin-1 hoch sensibel gegenüber Störungen jeglicher Art ist. Eben jene eng an physiologischen Konditionen orientierte Vorgehensweise zur Untersuchung der Funktion von endogenem Nesfatin-1, α -MSH und ACTH stellt jedoch die besondere Zielsetzung und wissenschaftliche Bedeutung unseres Experimentes dar: Anders als in Experimenten mit pharmakologischer Applikation von Neuropeptiden oder der Manipulation der Neuropeptid- oder Rezeptorexpression z. B. in transgenen Tiermodellen gehen wir davon aus, dass in unseren Experimenten die akute Applikation von jeweils 2 μ g Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK nur zu einer Reduktion der verfügbaren Menge der drei Neuropeptide im Rahmen der physiologischen Schwankungsbreite und für eine begrenzte Dauer führt.

Auch in Bezug auf das Melanocortinsystem erbrachte die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse: Unsere Daten belegen, dass endogenes α -MSH und ACTH eine stimulierende Wirkung auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe besitzen.

In der Literatur finden sich deutliche Belege dafür, dass in supraphysiologischen Dosen appliziertes α -MSH die Thermogenese von Nagetieren stimuliert. So wurde beispielsweise von Yasuda et al. (46) ein Anstieg der Temperatur im braunen Fettgewebe nach der i.c.v. Injektion von α -MSH beschrieben. Die i.p. Applikation des synthetischen α -MSH-Analogons [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH führt bei Mäusen unabhängig von der Nahrungsaufnahme zu einer starken und anhaltenden Zunahme des Grundumsatzes (56). In der indirekten Kalorimetrie zeigen transgene Mäuse mit einer Überexpression von α -MSH unter einer hochkalorischen Diät einen höheren Sauerstoffverbrauch in Ruhe und einen niedrigeren respiratorischen Quotienten als Wildtyp-Tiere (57).

Über einen entsprechenden Effekt der endogenen Neuropeptide war jedoch unserer Kenntnis nach bisher noch nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals mittels direkter Kalorimetrie bestätigt und ergänzt werden, wofür die Studien von Voss-Andreae et al. schon 2007 das Fundament gelegt hatten (36): Jene Arbeitsgruppe hatte nicht nur die Existenz einer anatomischen Verbindung zwischen MC4-R-positiven Neuronen in Hypothalamus und Hirnstamm und dem braunen Fettgewebe nachgewiesen, sondern auch demonstriert, dass MC4-R-defiziente Tiere unfähig zur diät- und kälteinduzierten Steigerung der Thermogenese sind. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen lässt sich nun schließen, dass endogenes α -MSH und ACTH bei gesättigten Versuchstieren mit intaktem Melanocortinsystem eine wichtige Rolle in der basalen Regulation der nicht-evaporativen Wärmeabgabe spielen. Ob daran allerdings beide Agonisten dieses Systems beteiligt sind oder aber α -MSH oder ACTH allein diese für die Koordination von Energieaufnahme und -abgabe essentielle Funktion erfüllt, wird erst eine Folgearbeit mit selektiver Antagonisierung der einzelnen Neuropeptide und erneuter Durchführung kalorimetrischer Messungen zeigen können.

Die Applikation einer Kombination von Antikörpern gegen alle drei Neuropeptide zeigte keine additive Wirkung. Diese Beobachtung unterstützt Befunde in der aktuellen Literatur, nach denen die Wirkung von Nesfatin-1 vom Melanocortinsystem abhängig ist. Dies äußert sich unter anderem darin, dass die Vorbehandlung mit dem MC3/4-R-Antagonisten SHU 9119 den anorexigenen Effekt von Nesfatin-1 auslöscht (58).

Nahrungsaufnahme, Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts

In Bezug auf die Nahrungsaufnahme unterschieden sich sowohl die Tiere, die mit Antikörpern gegen Nesfatin-1 behandelt worden waren, als auch diejenigen, denen Antikörper gegen α -MSH und ACTH appliziert worden waren, signifikant von denen der Kontrollgruppe.

Die Applikation des in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers gegen Nesfatin-1 (2 μ g Rabbit Anti-Nesfatin-1 (1-82) (Rat) Purified IgG der Fa. Phoenix Pharmaceuticals) in den

PVN männlicher Wistar-Ratten bewirkt unseren Ergebnissen zufolge erst acht und 24 Stunden p.i. eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Erhöhung der kumulativ aufgenommenen Nahrungsmenge. Von Oh-I et al. konnte an demselben Tierstamm gezeigt werden, dass die i.c.v. Injektion eines anderen Antikörpers gegen Nesfatin-1 (8 µg Nesfatin Ab24 IgG, generiert im Kaninchen durch die genannte Arbeitsgruppe selbst) zu einer schon während der ersten sechs Stunden p.i. signifikanten Steigerung der Nahrungsaufnahme führt (8). Neben eventuellen Unterschieden in der Effektivität und Pharmakodynamik der Antikörper könnte dieser Diskrepanz die bereits erwähnte interindividuelle Variabilität der Aktivität des NUCB2/Nesfatin-Systems zugrunde liegen.

Die bereits in einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe beschriebene signifikante Steigerung der Nahrungsaufnahme nach zentralnervöser Applikation von Antikörpern gegen α -MSH und ACTH (35) konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Dies bestätigt nicht nur die Funktion der beiden Peptide als endogene Sättigungsmoleküle, sondern belegt auch als eine Art Positivkontrolle die Funktionalität unseres Tiermodells.

Neben der Nahrungsaufnahme wurde auch das Trinkverhalten der Tiere nach Applikation der Antikörper in den PVN untersucht. Die Gabe von Nes-1-AK führte zu einer sechs, acht und 24 Stunden p.i. signifikant erhöhten Wasseraufnahme. Ein hemmender Einfluss von i.c.v. appliziertem Nesfatin-1 auf die Wasseraufnahme war umgekehrt von Yosten et al. bereits beschrieben worden (21). Dieselbe Gruppe hatte beobachtet, dass die Gabe eines Antisense-Morpholino-Oligonukleotids gegen die NUCB2-mRNA bei Ratten, deren Durst durch die Verabreichung von Angiotensin II pharmakologisch stimuliert wurde, zu einer signifikanten Steigerung der Trinkmenge führt (59). In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass endogenes Nesfatin-1 auch unter physiologischen Bedingungen das Trinkverhalten moduliert und das Peptid daher an der neuroendokrinen Regulation des Wasserhaushalts beteiligt zu sein scheint.

Wenngleich kürzlich von unserer Arbeitsgruppe eine Steigerung der kumulativen Wasseraufnahme nach einer Behandlung mit Antikörpern gegen α -MSH und ACTH nachgewiesen wurde (35), konnte dieses Ergebnis hier nicht reproduziert werden.

Während des 24-stündigen Beobachtungszeitraums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts, obwohl dies angesichts der positiven Energiebilanz, die sich aus den stimulierenden Effekten der Antikörpergabe auf die Nahrungsaufnahme und ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Energieabgabe in Form von trockener Wärme ergibt, zu erwarten gewesen war. Vermutlich lassen sich solche Veränderungen aufgrund der vergleichsweise geringen Effekte der Modulation endogener Peptid-Spiegel auf die Nahrungsaufnahme erst bei chronischer Behandlung mit Nes-1-AK und bzw. oder α -MSH-AK und ACTH-AK feststellen.

mRNA-Expression im Hypothalamus und in der NTS-Region

Um die der Wirkung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH auf die Nahrungsaufnahme und die nicht-evaporative Wärmeabgabe zugrunde liegenden zellulären Mechanismen zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Neuropeptide im Hypothalamus und in der NTS-Region im Hirnstamm quantitativ bestimmt. Beide Kerngebiete sind essentiell an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt.

Im Hypothalamus befinden sich wie bereits einleitend erwähnt POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone in direkter Nachbarschaft zueinander und interagieren über zahlreiche synaptische Verbindungen miteinander (5). Die Applikation von α -MSH-AK und ACTH-AK in den PVN bewirkte hier ebenso wie die Applikation einer Kombination aus Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK eine signifikante Reduktion der Expression der POMC-mRNA. Dieser Beobachtung liegt vermutlich indirekt die Desinhibition der NPY/AgRP-Neurone in ARC und PVN durch die Antagonisierung der MC4-R-Agonisten zugrunde: Werden NPY/AgRP-Neurone aktiviert, so üben sie ihrerseits eine hemmende Wirkung auf benachbarte POMC/CART-Neurone aus (33).

Die Gabe von Nes-1-AK allein zeigte dagegen keinen Effekt auf die POMC-mRNA-Expression. Da die i.c.v. Applikation von Nesfatin-1 in den Experimenten von Oh-I et al. (8) sowie in denen unserer Arbeitsgruppe (18) die Expression von POMC (wie auch die von CART, AgRP und CRH) in ARC und PVN ebenfalls nicht beeinflusste (8;18), fügt sich dieser Befund gut in die aktuelle Datenlage ein.

Auch die Expression der CART-mRNA blieb durch sämtliche hier verwendeten Antikörper in Übereinstimmung mit der aktuellen Datenlage unbeeinflusst. Die zentrale Applikation von Nesfatin-1 durch unsere Arbeitsgruppe hatte ebenfalls keine quantitative Veränderung der CART-mRNA in Hypothalamus und NTS-Region bewirkt (18); von Shimizu et al. war lediglich nach peripherer (i.p.) Injektion von Nesfatin-1 eine Zunahme der Expression von CART im NTS, nicht aber im ARC gemessen worden. Über den Einfluss des Melanocortinsystems auf die Synthese von CART ist bislang nur wenig bekannt. Von Dhillon et al. (60) wurde eine inhibitorische Wirkung des Melanocortinrezeptorantagonisten AgRP auf die Expression von CART im Hypothalamus beschrieben, weshalb bei Applikation von α -MSH-AK und ACTH-AK eventuell ein ähnlicher Effekt zu erwarten gewesen wäre. Wir konnten einen solchen in unseren Experimenten jedoch nicht nachweisen.

Die Expression der NPY-mRNA wurde dagegen sowohl durch die Injektion von Nes-1-AK als auch durch die von α -MSH-AK und ACTH-AK sowie die aller drei Substanzen in den PVN signifikant erhöht. Tiere, die mit einer Kombination von Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK behandelt worden waren, exprimierten die AgRP-mRNA deutlich stärker als die der Kontrollgruppe. Beides ist wahrscheinlich eine direkte Wirkung der oben bereits

beschriebenen Desinhibition hypothalamischer NPY/AgRP-Neurone durch eine verminderte Signalwirkung am MC4-R. Dass im Falle von NPY die Applikation von Nes-1-AK allein einen hoch signifikanten Effekt zeigt, ergänzt die Ergebnisse von Price et al. (26) sowie unserer eigenen Arbeitsgruppe (18): Beide hatten bereits die inhibitorische Wirkung von i.c.v. appliziertem Nesfatin-1 auf hypothalamische NPY-Neurone beschrieben. Wir können nun postulieren, dass auch das endogene Peptid in dieser Weise wirkt und somit NPY-Neurone an der Vermittlung zentralnervöser Nesfatin-1-Signale beteiligt sind. Ferner spricht der hier erhobene Befund in besonderem Maße für die Funktionalität des verwendeten Nes-1-AK. Weshalb hingegen die Expression der AgRP-mRNA weder durch die alleinige Applikation von Nes-1-AK noch von α -MSH-AK und POMC-AK, sondern lediglich durch die kombinierte Gabe aller drei Antikörper signifikant erhöht wurde, bleibt unklar. NPY und AgRP werden im Hypothalamus von derselben Neuronenpopulation exprimiert. Diese wird, wie sich aus der hoch signifikanten Steigerung der NPY-Expression schließen lässt, bereits durch z. B. die alleinige Gabe von Nes-1-AK desinhibiert. Daher war zu erwarten, dass auch die AgRP-mRNA vermehrt synthetisiert werden würde, was jedoch nicht der Fall war. Vermutlich existieren für NPY und AgRP trotz ihrer Coexpression und ihrer synergistischen Wirkung auf den Energiehaushalt differenzielle Regulationsmechanismen, die sich allerdings anhand unserer Experimente nicht näher charakterisieren lassen.

Hinsichtlich der Expression des Vorläufermoleküls von Nesfatin-1, NUCB2, unterschieden sich die Versuchstiere der verschiedenen Gruppen nicht signifikant voneinander. Im Hinblick darauf, dass die Synthese dieses Neuropeptides durch α -MSH stimuliert wird (8), wäre bei dessen Antagonisierung durch die Applikation von Antikörpern gegen α -MSH (und ACTH) eine Verringerung seiner Expression zu erwarten gewesen. Das Ausbleiben des erwarteten Effektes könnte darauf hindeuten, dass α -MSH (und ACTH) für die Regulation der NUCB2/Nesfatin-Expression unter physiologischen Bedingungen nicht relevant sind. Gleichzeitig muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass möglicherweise sehr diskrete Veränderungen der quantitativen mRNA-Expression innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite mit den von uns angewendeten Methoden nicht nachweisbar sein könnten.

Generell ist bei der Bewertung diesbezüglicher Messergebnisse zu berücksichtigen, dass die Bestimmung der quantitativen mRNA-Expression nur zu einem einzigen Zeitpunkt, nämlich dem der Dekapitation der Versuchstiere eine Stunde p.i., erfolgen kann. Es ist bekannt, dass eine gewisse Latenz zwischen der Initiation der Transkription im Zellkern und dem Beginn der Proteinsynthese im Zytoplasma besteht (61) und dass auch die posttranslationale Prozessierung von NUCB2 in den aktiven Metaboliten Nesfatin-1 einige Zeit dauert. Aus diesem Grunde ist es wahrscheinlich, dass zur kurzfristigen

bedarfsgerechten Erhöhung der extrazellulär wirksamen Konzentration von Nesfatin-1 - wie auch von α -MSH und ACTH - zunächst auf in sekretorischen Vesikeln gespeicherte Vorräte derselben (29;62) zurückgegriffen wird, bevor eine mRNA-Synthesesteigerung zur Regeneration jener erfolgt. Eventuell hätte erst ein etwas längeres Abwarten zu messbaren Veränderungen der Expression geführt.

Neben den Agonisten und Antagonisten des Melanocortinsystems interagieren Nesfatin-1-positive Neurone des Hypothalamus auch mit den dortigen CRF-Neuronen, welche an der Vermittlung der anorexigenen Wirkung des Peptids beteiligt sind (17). Die Gabe von Nes-1-AK beeinflusste die Expression der CRF-mRNA in unserem experimentellen Ansatz jedoch nicht. Die Behandlung mit α -MSH-AK und ACTH-AK führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der CRF-mRNA. Da die CRF-Neurone des PVN MC4-R exprimieren und über diese aktiviert werden können (63), ist die verminderte Synthese des Peptids die logische Konsequenz der durch die Antikörpergabe reduzierten tonischen Stimulation dieser Nervenzellen. Es bleibt jedoch offen, weshalb eine Kombination aus Nes-1-AK, α -MSH-AK und ACTH-AK diesen Effekt nicht ebenfalls hervorrufen konnte.

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression von POMC, CART, NPY und NUCB2 in der NTS-Region korrelieren eng mit den im Hypothalamus erhobenen Befunden, was darauf hindeutet, dass die beiden Kerngebiete gemeinsamen Regulationsmechanismen unterliegen. Dies ist eine bemerkenswerte integrative Leistung des ZNS, insbesondere wenn man bedenkt, dass Hypothalamus und NTS nicht nur in einiger räumlicher Entfernung zueinander liegen, sondern sich auch strukturell und im Hinblick auf die qualitative und quantitative Neuropeptidexpression deutlich voneinander unterscheiden. So werden beispielsweise POMC und CART im NTS nicht wie in PVN und ARC coexprimiert (64), sondern von verschiedenen Nervenzellen gebildet; und während nahezu alle NPY-synthetisierenden Neurone des ARC auch AgRP exprimieren, ist dieses Peptid im NTS kaum detektierbar (65). Dennoch erfolgt eine fein abgestimmte Koordination der Steuerung der Nahrungsaufnahme, die vor allem den hypothalamischen Kerngebieten obliegt, und der maßgeblich vom Hirnstamm ausgehenden Regulation der Thermogenese: Hypothalamus und Hirnstamm kooperieren bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase.

Da der Hirnstamm ein wichtiges Zentrum der Regulation autonomer Funktionen, darunter auch die Thermogenese im braunen Fettgewebe, durch den Sympathikus darstellt, wurde in der NTS-Region auch die Expression der mRNA der TH, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Katecholaminsynthese katalysiert, untersucht. Obwohl die TH in zahlreichen Neuronen des NTS mit Nesfatin-1 coexprimiert wird (66), zeigten sich nach Applikation der Antikörper keine signifikanten Veränderungen der TH-

mRNA-Expression. Passend dazu hatte in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe auch die i.c.v. Injektion von Nesfatin-1 selbst diese nicht beeinflusst (18). Vermutlich genügten in beiden Fällen die Menge des präsynaptisch bereits in Sekretionsvesikeln gespeicherten Transmitters Noradrenalin und die physiologische Reserve an TH für die Vermittlung der durch die Aktivierung des Sympathikus induzierten Effekte.

5.3.2 Experimente während der Ruhephase (Exp. 2B)

Die Durchführung von Messungen, bei denen Ratten als Versuchstiere eingesetzt werden, während ihrer nächtlichen Aktivitätsphase stellt zweifellos den Goldstandard dar, wenn u.a. die Nahrungsaufnahme unter physiologischen Konditionen am Tiermodell untersucht werden soll, da die Tiere während dieser Zeit etwa 80% ihres Futters zu sich nehmen (67). Dieses Vorgehen wurde daher von uns in Experiment 2A gewählt.

Allerdings ist die Durchführung der Experimente während der Abendstunden und der Nacht mit einem hohen Aufwand für den Experimentator verbunden. Eine inverse Haltung der Versuchstiere mit Umkehr des Tag-Nacht-Rhythmus wäre zwar methodisch die beste Lösung gewesen, war jedoch in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck zum gegebenen Zeitpunkt technisch unmöglich. Es würde daher eine deutliche Erleichterung für künftige Versuchsvorhaben bedeuten, wenn Experimente wie unser Experiment 2A zwar unter sonst identischen Bedingungen, jedoch tagsüber während der Hellphase durchgeführt werden könnten. Um zu untersuchen, ob dieses Vorgehen zu denselben oder zumindest sehr ähnlichen Ergebnissen führt, wiederholten wir unsere Experimente an satten Versuchstieren und legten den Zeitpunkt der Substanzapplikation auf den Beginn der Hellphase fest. Der Applikation ging wie in Experiment 2A ein 24-stündiger Nahrungsentzug gefolgt von einer neunstündigen *refeeding*-Phase voran.

Die morgendliche Applikation von Antikörpern gegen Nesfatin-1, gegen α -MSH und ACTH oder gegen alle drei Neuropeptide in den PVN satter Versuchstiere bewirkte weder in Bezug auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe noch in Bezug auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie das Körpergewicht eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe, obgleich bei abendlicher Applikation (Exp. 2A) alle der genannten Effekte aufgetreten waren. Dies soll nachfolgend im Detail diskutiert werden.

Nicht-evaporative Wärmeabgabe

Unseren Messungen zufolge vermindert die Injektion von Nes-1-AK und bzw. oder α -MSH-AK und ACTH-AK die nicht-evaporative Wärmeabgabe satter Versuchstiere zwar während ihrer Aktivitätsphase hoch signifikant, zeigt jedoch während der Ruhephase

keine entsprechende Wirkung. Dies lässt vermuten, dass endogenes Nesfatin-1, α -MSH und ACTH keinen signifikanten Einfluss auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe von Ratten während ihrer Ruhephase besitzen, wobei hier wiederum einschränkend auf die hohe Störanfälligkeit unseres eng an physiologischen Zuständen orientierten Tiermodells und die limitierte Sensitivität der angewandten Methoden hingewiesen werden muss.

Die Thermogenese ist bei müden oder schlafenden Tieren im Vergleich zu wachen und aktiven Tieren bereits deutlich erniedrigt (68), sodass ihre physiologische Variabilität während der Ruhephase stark verringert sein könnte. Möglicherweise ist die Sensitivität, mit der die regulatorischen Zentren des Energiehaushalts der Ratte auf katabole neuroendokrine Signale ansprechen, tagsüber reduziert.

Aufgrund des hier angewendeten speziellen Fütterungsregimes war zu erwarten gewesen, dass durch die gute Sättigung der Tiere eine ausreichende Menge der relevanten Peptide verfügbar wäre. Da jedoch ihre Antagonisierung am Tage im Gegensatz zur Nacht keine messbare Auswirkung auf die nicht-evaporative Wärmeabgabe hatte und nach unserer Kenntnis keine Daten über etwaige Einflüsse der Tageszeit auf die basale Synthese von Nesfatin-1 und POMC vorliegen, ist es vorstellbar, dass eine zirkadiane Rhythmik den Effekt der Antikörpergabe konterkariert.

Nahrungsaufnahme, Wasseraufnahme und Veränderung des Körpergewichts

Auch in Bezug auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie die Veränderung des Körpergewichts besteht in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Inkongruenz zwischen den Resultaten der Messungen während der Aktivitätsphase und den Resultaten der Messungen während der Ruhephase: Erstere hatten eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme 24 Stunden sowie der Wasseraufnahme sechs, acht und 24 Stunden nach der Applikation von Nes-1-AK gezeigt; bei letzteren blieben dagegen beide Parameter unverändert.

Zunächst ist festzuhalten, dass die Tiere aufgrund ihrer Müdigkeit tagsüber einen geringen Antrieb zur Nahrungsaufnahme zeigen, der durch die von uns initiierten Veränderungen der beiden Neuropeptidsysteme innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite nicht maßgeblich gesteigert wird. Auch liegt die Vermutung nahe, dass entweder die Nesfatin-1-Signalgebung selbst einer zirkadianen Rhythmik unterliegt oder eine Interaktion mit anderen Transmittersystemen besteht, bei denen das der Fall ist. Diese Annahme ließe sich gut mit den Beobachtungen von Stengel et al. vereinbaren, die den anorexigenen Effekt von Nesfatin-1 ($0,05 \mu\text{g}$ ($\cong 5 \text{ pmol}$) i.c.v.) bei Ratten nur während der nächtlichen Aktivitätsphase, nicht aber während der auf eine 24-stündige Karenz folgenden *refeeding*-Periode während der Ruhephase am Tage nachweisen konnten (17). In einem vorausgegangenen Experiment unserer Arbeitsgruppe hingegen wurde

durchaus eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme durch die morgendliche Applikation von Nesfatin-1 beobachtet (18); es ist jedoch zu bedenken, dass dabei eine Dosis des Peptids eingesetzt wurde (25 pmol je Versuchstier), die die Konzentration von Nesfatin-1 im Hypothalamus wahrscheinlich weit über das physiologische Maß hinaus erhöhte.

In Bezug auf die Wirkung von α -MSH und ACTH hatte eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe ergeben, dass die abendliche Applikation von Antikörpern gegen die beiden POMC-Derivate in den PVN satter Versuchstiere eine Steigerung der in den darauffolgenden 24 Stunden aufgenommenen Nahrungsmenge und eine vermehrte Körpergewichtszunahme zur Folge hatte (35). Im Falle der Nahrungsaufnahme konnten wir dieses Ergebnis in Telexperiment 2A reproduzieren (vergleiche hierzu 5.3.1). Dass der genannte Effekt in dieser Messreihe dagegen trotz Verwendung derselben Antikörper in identischer Dosierung nicht auftrat, spricht dafür, dass der morgendliche Applikationszeitpunkt als einziges unterscheidendes Merkmal der beiden Versuchsdesigns eine entscheidende Einflussgröße darstellt. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch das Melanocortinsystem in Bezug auf die Kontrolle der Nahrungsaufnahme vom Tagesrhythmus abhängig ist oder andere anorexigene Peptide, die einer zirkadianen Rhythmik unterliegen, sowie der verhaltensbiologische Effekt der Müdigkeit der Tiere die Auswirkungen der Blockade von α -MSH und ACTH in den Morgenstunden konterkarieren.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass sich die Ergebnisse unserer Experimente während der nächtlichen Aktivitätsphase der Ratten bei ansonsten identischer Durchführung der Messungen am Tage nicht reproduzieren ließen. Dies ist als klarer Hinweis darauf zu werten, dass die Wirkung von Nesfatin-1 ebenso wie die der beiden POMC-Derivate stets im Kontext ihrer Wechselwirkungen mit einem äußerst komplexen Netzwerk von Transmittern und Peptiden, die an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt sind, zu betrachten ist. Offenbar ist der Tagesrhythmik der Versuchstiere dabei eine bedeutende Rolle zuzumessen. Die Durchführung der Experimente während der physiologischen Aktivitätsphase der Versuchstiere ist und bleibt das Vorgehen erster Wahl zur Untersuchung der Regulation des Energiehaushalts durch endogene Neuropeptide.

6 Zusammenfassung

Das zentralnervöse NUCB2/Nesfatin-System und Melanocortinsystem sind essentiell an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Bei Nesfatin-1 handelt es sich um ein anorexigenes und die Thermogenese steigerndes Neuropeptid, dessen Precursor NUCB2 in zahlreichen hypothalamischen Kerngebieten, darunter ARC und PVN, exprimiert wird. Der Rezeptor, über den die verschiedenen Funktionen von Nesfatin-1 vermittelt werden, ist bislang unbekannt. Es gilt jedoch als erwiesen, dass eine enge Interaktion mit dem Melanocortinsystem besteht, dessen Agonisten α -MSH und ACTH ebenfalls eine anorexigene Wirkung besitzen und die diät- und kälteinduzierte Thermogenese im braunen Fettgewebe stimulieren.

Ein Großteil der bisher erhobenen Daten zur Funktion und Bedeutung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH stützt sich auf die pharmakologische Applikation der genannten Peptide oder entsprechender Analoga. In der vorliegenden Arbeit wurde dagegen mittels Applikation von Antikörpern gegen Nesfatin-1, gegen α -MSH und ACTH oder gegen alle drei Moleküle in den PVN männlicher Wistar-Ratten die Wirkung der endogenen Neuropeptide auf Nahrungsaufnahme und Thermogenese untersucht. Dies geschah in zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Im ersten Experiment erfolgten die Messungen an hungrigen Tieren, deren NUCB2/Nesfatin- und Melanocortinsystem pharmakologisch stimuliert wurden (Exp. 1), im zweiten dagegen an Tieren, bei denen die genannten Systeme durch eine gute Sättigung physiologisch aktiviert waren (Exp. 2). Letzteren Ansatz wendeten wir in einem Telexperiment während der Aktivitätsphase (Exp. 2A) und in einem anderen während der Ruhephase an (Exp. 2B).

Trotz pharmakologischer Stimulation war bei hungrigen Versuchstieren während ihrer Ruhephase (Exp. 1) kein signifikanter Effekt der Antagonisierung von Nesfatin-1, α -MSH und ACTH auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme, das Körpergewicht und die nicht-evaporative Wärmeabgabe messbar.

Hingegen bewirkte die Behandlung gesättigter, aber nicht exogen durch z. B. pharmakologische Manipulation stimulierter Versuchstiere mit Nes-1-AK und bzw. oder α -MSH-AK und ACTH-AK während der Aktivitätsphase (Exp. 2A) statistisch signifikante Veränderungen der nicht-evaporativen Wärmeabgabe, der Nahrungs- und Wasseraufnahme sowie der Expression der mRNA von POMC, NPY, AgRP und CRH. Dabei liegt die Bedeutung der vorliegenden Arbeit vornehmlich darin, dass hier erstmals mittels direkter Kalorimetrie nachgewiesen werden konnte, dass sowohl endogenes Nesfatin-1 als auch endogenes α -MSH und ACTH die nicht-evaporative Wärmeabgabe

stimulieren. Ferner konnte die inhibitorische Wirkung derselben Peptide auf die Nahrungs- und Wasseraufnahme als eine Art Positivkontrolle zur Bestätigung der Funktionalität des verwendeten Tiermodells reproduziert werden.

Im Gegensatz dazu ließen sich bei Durchführung identischer Messungen an gesättigten, pharmakologisch nicht stimulierten Versuchstieren während ihrer Ruhephase (Exp. 2B) keinerlei signifikante Effekte feststellen, was die Vermutung nahe legt, dass das NUCB2/Nesfatin- und das Melanocortinsystem in ihrer Funktion einer zirkadianen Rhythmik unterliegen.

Durch unsere Experimente wird folglich unter Anwendung eines eng an physiologischen Konditionen orientierten Tiermodells die anorexigene und die Thermogenese steigernde Funktion von endogenem Nesfatin-1, α -MSH und ACTH im ZNS gesättigter Versuchstiere belegt. Ferner ergeben sich daraus Hinweise auf das Vorhandensein einer zirkadianen Rhythmik, welche die Wirkung der genannten Peptide beeinflusst und künftig durch genauere Untersuchungen näher zu charakterisieren sein wird.

Die vorliegende Arbeit bedeutet einen weiteren Schritt zum Verständnis der komplexen Wirkung des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems auf die Energiehomöostase und belegt, dass neben α -MSH und ACTH auch Nesfatin-1 ein potentiell hoch bedeutsames therapeutisches Target in der Kontrolle der Adipositas darstellt.

7 Literaturverzeichnis

1. **Kaiyala KJ, Ramsay DS** 2011 Direct animal calorimetry, the underused gold standard for quantifying the fire of life. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 158:252-264
2. **Wesolowski T, Schaarschmidt B, Lamprecht I** 1985 A poor man's calorimeter (PMC) for small animals. *J Thermal Analysis* 30:1403-1413
3. **Hetherington AW RS** 1940 Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 78:149-172
4. **Cone RD** 2005 Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-578
5. **Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB** 2005 Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123:493-505
6. **Weingarten HP, Chang PK, McDonald TJ** 1985 Comparison of the metabolic and behavioral disturbances following paraventricular- and ventromedial-hypothalamic lesions. *Brain Res Bull* 14:551-559
7. **Holder JL, Jr., Butte NF, Zinn AR** 2000 Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9:101-108
8. **Oh I, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M** 2006 Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443:709-712
9. **Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S** 2010 Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS One* 5:e15201
10. **Foo KS, Brismar H, Broberger C** 2008 Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 156:563-579
11. **Pan W, Hsueh H, Kastin AJ** 2007 Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 28:2223-2228
12. **Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS** 2010 Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 151:3169-3180
13. **Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y** 2010 Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 16:1735-1741
14. **Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh I, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M** 2010 Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clin Endocrinol (Oxford)* 73:484-490
15. **Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Tache Y, Sachs G, Lambrecht NW** 2009 Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 150:232-238

16. **Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C** 2010 Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol* 204:255-263
17. **Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Monnikes H, Lambrecht NW, Tache Y** 2009 Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 150:4911-4919
18. **Wernecke K, Lambrecht I, Jöhren O, Lehnert H, Schulz C** 2014 Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity (Silver Spring)* 22:1662-1668
19. **Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ** 2007 Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148:5088-5094
20. **Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S, Varga J, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, Toth ZE** 2012 Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes (London)* 36:1514-1521
21. **Yosten GL, Samson WK** 2009 Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R330-R336
22. **Yosten GL, Samson WK** 2014 Neural circuitry underlying the central hypertensive action of nesfatin-1: melanocortins, corticotropin releasing hormone and oxytocin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306:R722-R727
23. **Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H** 2008 Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 201:115-123
24. **Garcia-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M** 2010 Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 45:281-290
25. **Shimizu H, Oh I, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M** 2009 Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 150:662-671
26. **Price CJ, Samson WK, Ferguson AV** 2008 Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 1230:99-106. Epub;2008 Jul 1.:99-106
27. **Nonogaki K, Ohba Y, Sumii M, Oka Y** 2008 Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT_{2C} receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 372:186-190
28. **Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T** 2008 Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149:1295-1301
29. **Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh I, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T** 2009 Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10:355-365

30. **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
31. **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
32. **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
33. **Cone RD** 2006 Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 27:736-749
34. **Gantz I, Fong TM** 2003 The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E468-E474
35. **Schulz C, Paulus K, Lobmann R, Dallman M, Lehnert H** 2010 Endogenous ACTH, not only alpha-melanocyte-stimulating hormone, reduces food intake mediated by hypothalamic mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E237-E244
36. **Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, Stuart RC, Nilni EA, Cone RD, Fan W** 2007 Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology* 148:1550-1560
37. **Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, Zhou J, Marks DL, Cone RD** 2000 The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141:3072-3079
38. **Cassaglia PA, Shi Z, Li B, Reis WL, Clute-Reinig NM, Stern JE, Brooks VL** 2014 Neuropeptide Y acts in the paraventricular nucleus to suppress sympathetic nerve activity and its baroreflex regulation. *J Physiol* 592:1655-1675
39. **Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK** 2010 Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav* 97:84-91
40. **Samanin R, Mennini T, Ferraris A, Bendotti C, Borsini F, Garattini S** 1979 Chlorophenylpiperazine: a central serotonin agonist causing powerful anorexia in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 308:159-163
41. **Kitchener SJ, Dourish CT** 1994 An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5-HT1B, 5-HT1C and 5-HT2 receptor agonists using the post-prandial satiety sequence in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 113:369-377
42. **Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro JB, Marcus JN, Holstege H, Lee CE, Cone RD, Elmquist JK** 2002 Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* 297:609-611
43. **Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, Liu HY, Zigman JM, Balthasar N, Kishi T, Lee CE, Aschkenasi CJ, Zhang CY, Yu J, Boss O, Mountjoy KG, Clifton PG, Lowell BB, Friedman JM, Horvath T, Butler AA, Elmquist JK, Cowley MA** 2006 Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 20:51:239-249
44. **Heisler LK, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, Yeo GS, O'Rahilly S, Colmers WF, Elmquist JK, Tecott LH** 2007 Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci* 27:6956-6964

45. **Sabatier N, Caquineau C, Dayanithi G, Bull P, Douglas AJ, Guan XM, Jiang M, van der Ploeg L, Leng G** 2003 Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis. *J Neurosci* 23:10351-10358
46. **Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H** 2004 Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:235-239
47. **Paxinos G, Watson C** 1986 *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego
48. **Palkovits M, Brownstein M.** 1987 *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. Elsevier Science Ltd. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
49. **Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R** 1993 Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-1030
50. **Kleiber M** 1947 Body size and metabolic rate. *Physiol Rev* 27:511-541
51. **Kleiber M** 1932 Body size and metabolism. *Hilgardia* 6:315-351
52. **Butler AA, Kozak LP** 2010 A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes* 59:323-329
53. **Kaiyala KJ, Schwartz MW** 2011 Toward a more complete (and less controversial) understanding of energy expenditure and its role in obesity pathogenesis. *Diabetes* 60:17-23
54. **Fuller RW, Snoddy HD, Mason NR, Owen JE** 1981 Disposition and pharmacological effects of m-Chlorophenylpiperazine in rats. *Neuropharmacology* 20:155-162
55. **Lam DD, Przydzial MJ, Ridley SH, Yeo GS, Rochford JJ, O'Rahilly S, Heisler LK** 2008 Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology* 149:1323-1328
56. **Hoggard N, Rayner DV, Johnston SL, Speakman JR** 2004 Peripherally administered [Nle⁴,D-Phe⁷]-alpha-melanocyte stimulating hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti-related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and ob/ob mice. *J Mol Endocrinol* 33:693-703
57. **Lee M, Kim A, Chua SCJr, Obici S, Wardlaw SL** 2007 Transgenic MSH overexpression attenuates the metabolic effects of a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E121-E131
58. **Shimizu H, Oh I, Okada S, Mori M** 2009 Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J* 56:537-543
59. **Yosten GL, Redlinger L, Samson WK** 2012 Evidence for a role of endogenous nesfatin-1 in the control of water drinking. *J Neuroendocrinol* 24:1078-1084
60. **Dhillon WS, Small CJ, Stanley SA, Jethwa PH, Seal LJ, Murphy KG, Ghatgei MA, Bloom SR** 2002 Hypothalamic interactions between neuropeptide Y, agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* 14:725-730
61. **Ben Ari Y, Brody Y, Kinor N, Mor A, Tsukamoto T, Spector DL, Singer RH, Shav-Tal Y** 2010 The life of an mRNA in space and time. *J Cell Sci* 123:1761-1774

-
62. **Loh YP, Kim T, Rodriguez YM, Cawley NX** 2004 Secretory granule biogenesis and neuropeptide sorting to the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *J Mol Neurosci* 22:63-71
 63. **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
 64. **Ellacott KL, Halatchev IG, Cone RD** 2006 Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology* 147:3190-3195
 65. **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
 66. **Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T** 2010 Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany, NY)* 2:775-784
 67. **Sidlo J, Zaviacic M, Kvasnicka P** 1995 Night and day differences in the food-intake of laboratory rats Wistar and Koletsky strains. *Bratisl Lek Listy* 96:655-657
 68. **Schmidek WR, Zachariassen KE, Hammel HT** 1983 Total calorimetric measurements in the rat: influences of the sleep-wakefulness cycle and of the environmental temperature. *Brain Res* 288:261-271

8 Anhang

8.1 Angaben zur Genehmigung der Tierversuchsvorhaben

Die in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente wurden vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

Eine Ausnahmegenehmigung für die Durchführung von Tierversuchen gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes wurde der Experimentatorin am 20.01.2011 erteilt.

Tierversuchsanträge

1. Bedeutung von Nesfatin-1 in der Homöostase des Körpergewichts - Interaktion mit hypothalamischen Neurotransmittersystemen

| | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Aktenzeichen: | V312-72241.122-4(3-1/09) |
| Datum des Genehmigungsschreibens: | 12.02.2009 |
| Datum der Verlängerung: | 25.01.2012 |

2. Funktion des endogenen Nesfatin-1 bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Thermogenese – Einfluss von Ernährungszustand und Tagesrhythmus

| | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Aktenzeichen: | V312-7224.122-4(66-5/12) |
| Datum des Genehmigungsschreibens: | 30.07.2012 |

8.2 Herstellung der verwendeten Lösungen

8.2.1 Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Wasser

Materialien:

500 ml Aqua bidest.

500 µl DEPC

Methodik:

1. DEPC unter dem Abzug zum Aqua bidest. geben, gut schütteln
2. Lösung in einem fest verschlossenen Gefäß einen Tag lang unter dem Abzug stehen lassen
3. Lösung bei 121 °C 20 min lang autoklavieren

8.2.2 Tris-EDTA- (TE-) Puffer (pH = 7,4)

Materialien:

Trizma ® Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

DEPC-Wasser (s.o.)

1 M HCl

Methodik:

Herstellung von 1 l einer 10 x TE-Stammlösung durch

1. Lösung von 1,21 g Trizma ® Base in 800 ml DEPC-Wasser (unter stetigem Rühren)
2. Einstellung des pH-Werts auf 7,5 durch Zugabe von 1 M HCl
3. Zugabe von 3,72 g EDTA in 100 ml DEPC-Wasser (unter stetigem Rühren)
4. Bestimmung des pH-Werts, Einstellung auf 8,0 durch Zugabe von 1 M HCl
5. Vereinigung der beiden Lösungen
6. Bestimmung des pH-Werts, Einstellung auf 7,4 durch Zugabe von 1 M HCl
7. Auffüllen auf 1 l durch Zugabe von DEPC-Wasser

8.3 Arbeitsanweisung zur Isolierung der RNA

1. Verdauung der Gewebelysate durch die Zugabe von Proteinase K (5 µl je 250 µl Lysat) während einer Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur
2. Isolierung der RNA unter Verwendung der ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wie folgt:

| Schritt | Beschreibung | Volumen (μl) | Zeit (s) | Vakuum (%) |
|---------|--|---------------------------|----------|------------|
| | Wells mit RNA-Aufreinigungs-Waschlösung 1 befeuchten | 50 | | |
| 1 | Lysat hinzufügen | 250 | 180 | 80 |
| 2 | RNA-Aufreinigungs-Waschlösung 1 hinzufügen | 500 | 180 | 80 |
| 3 | RNA-Aufreinigungs-Waschlösung 2 hinzufügen | 300 | 180 | 80 |
| 4 | RNA-Aufreinigungs-Waschlösung 2 hinzufügen | 200 | 120 | 60 |
| 5 | RNA-Aufreinigungs-Waschlösung 2 hinzufügen | 200 | 120 | 60 |
| 6 | Prä-Elutions-Vakuum | | 300 | 90 |
| 7 | RNA-Aufreinigungs-Elutionslösung hinzufügen | 75 | 120 | 40 |

Tab. 5: Arbeitsschritte zur Isolierung der RNA (nach Anleitung der Firma Applied Biosystems)

- Lagerung der Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Durchführung der cDNA-Synthese

Nähere Angaben zu den verwendeten Chemikalien und Geräten finden sich unter 3.5.2.

8.4 Arbeitsanweisung zur Synthese der cDNA

- Pipettieren von Primer, RNA und dNTP-Mix in die Reaktionsgefäße:

| Komponente | Menge (μl) je Probe |
|-----------------------|----------------------------------|
| Oligo (dT)20 - Primer | 1 |
| RNA | 9 |
| 10 mM dNTP-Mix | 2 |

Tab. 6: Komponenten der Inkubate zur Primer-Denaturierung

- Mischen auf einem Rüttler für etwa 30 s
- Denaturierung von RNA und Primern durch Inkubation im Thermocycler (TGradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min

4. Herstellung des Master Mix (auf Eis):

| Komponente | Menge (μl) je Probe |
|---|----------------------------------|
| 5x cDNA-Synthese-Puffer | 4 |
| 0,1 M DTT | 1 |
| RNase Out TM (40 U / μl) | 1 |
| DEPC-Wasser | 1 |
| Cloned AMV RT (15 U / μl) | 1 |

Tab. 7: Komponenten des Master Mix

5. Pipettieren von 8 μl des Master Mix in jedes Reaktionsgefäß
6. Mischen auf einem Rüttler für etwa 30 s
7. Inkubation der Reaktionsgefäße im vorgeheizten Thermocycler bei 50 °C für 60 min
8. Beendigung der Reaktion durch Inkubation bei 85 °C für 5 min
9. Lagerung bei -20 °C bis zur Durchführung der qRT-PCR

Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Geräten sind Abschnitt 3.5.2 zu entnehmen.

8.5 Arbeitsanweisung zur Durchführung der qRT-PCR

1. Pipettieren des Primer Mix:

| Komponente | Volumen (μl) je Probe |
|---|------------------------------------|
| Super Mix | 12,5 |
| Vorwärts-Primer (10 pmol / μl) | 0,75 |
| Rückwärts-Primer (10 pmol / μl) | 0,75 |
| DEPC-Wasser | 9 |

Tab. 8: Komponenten des Primer Mix

2. Herstellung von fünf Verdünnungsstufen (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 und 10^3) des jeweiligen Standards durch Zugabe von Tris-EDTA- (TE-) Puffer (zur Anfertigung der Pufferlösung siehe 8.2.2)
(Ausnahme: CRF, hier werden die Verdünnungsstufen 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 und 10^6 hergestellt)
3. Pipettieren von 23 μl Primer Mix in alle Wells einer 96-Well-Platte

4. Zugeben von 2 µl TE-Puffer (2 Wells), Standard (2 Wells / Verdünnungsstufe) oder cDNA (1 Well / Probe)
5. Überziehen der Platte mit einer selbstklebenden Folie
6. Zentrifugation bis 1000 Umdrehungen (Jouan GR412, Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland)
7. Einsetzen der Platte in den Thermocycler (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland); Programmierung desselben wie folgt:

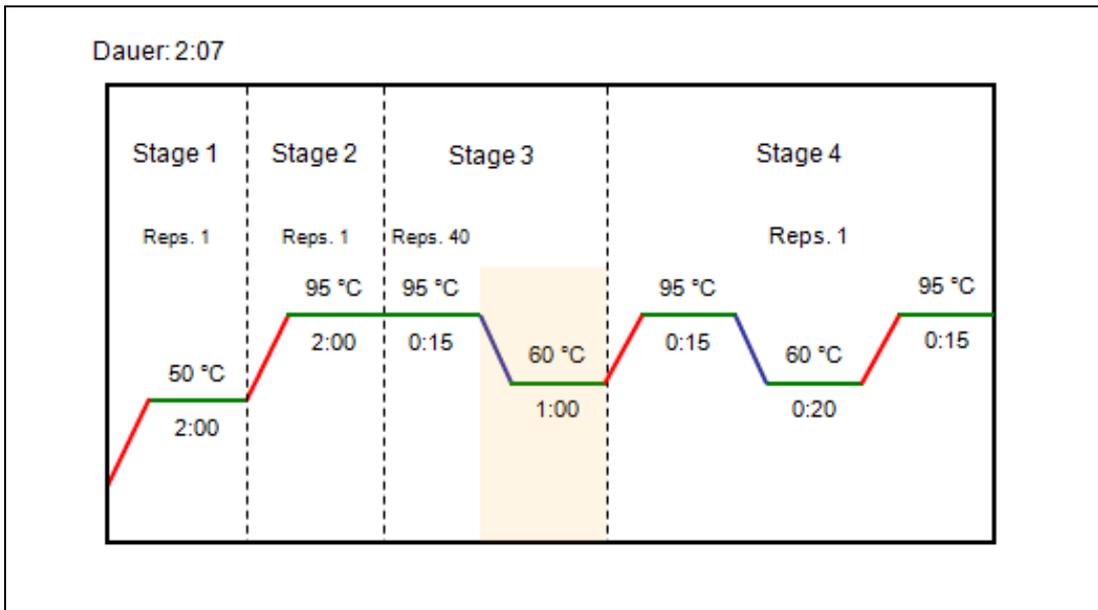


Abb. 18: Temperaturverlauf im Thermocycler

Nähere Angaben zu den verwendeten Chemikalien und Geräten finden sich unter 3.5.3.

8.6 Abbildungen zu Exp. 1: Pharmakologische Stimulation des NUCB2/Nesfatin- und des Melanocortinsystems

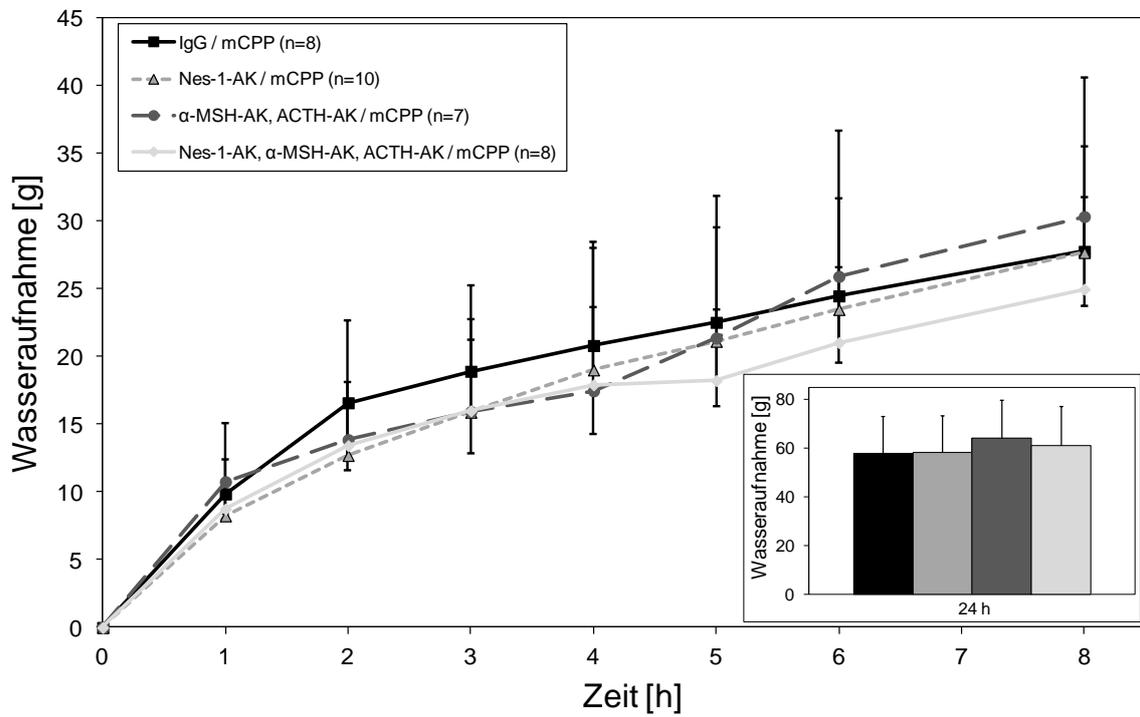


Abb. 19: Kumulative Wasseraufnahme mCPP-stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN

Das Insert zeigt die nach 24 erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

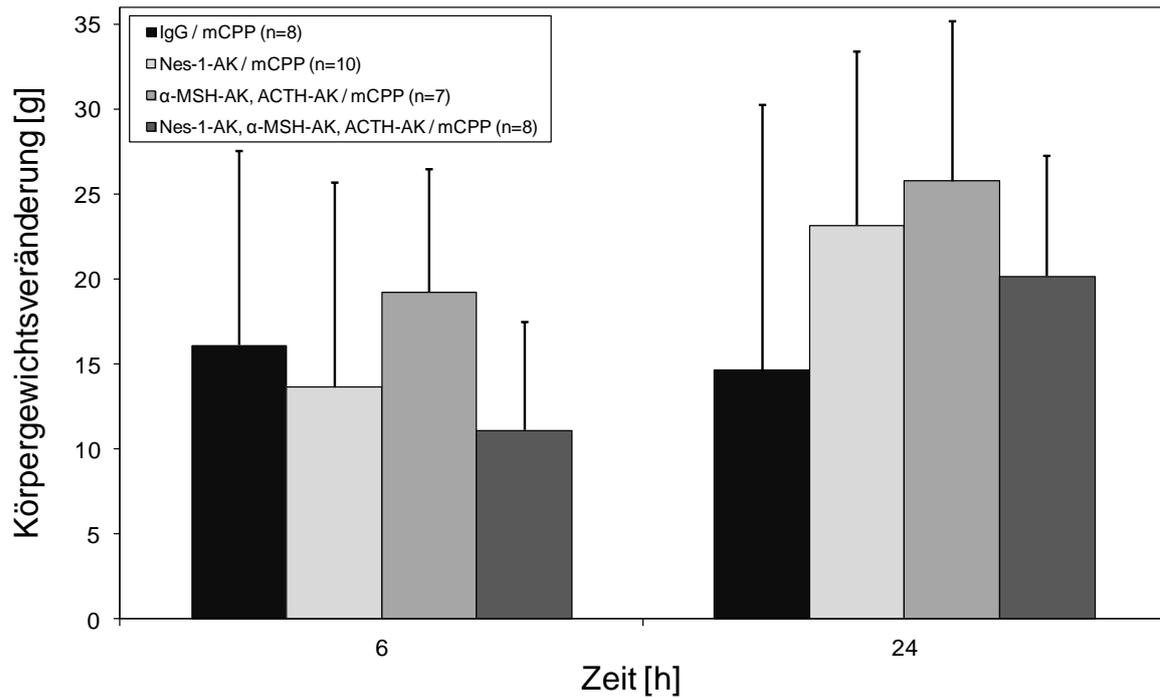


Abb. 20: Veränderung des Körpergewichts mCPP-stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN

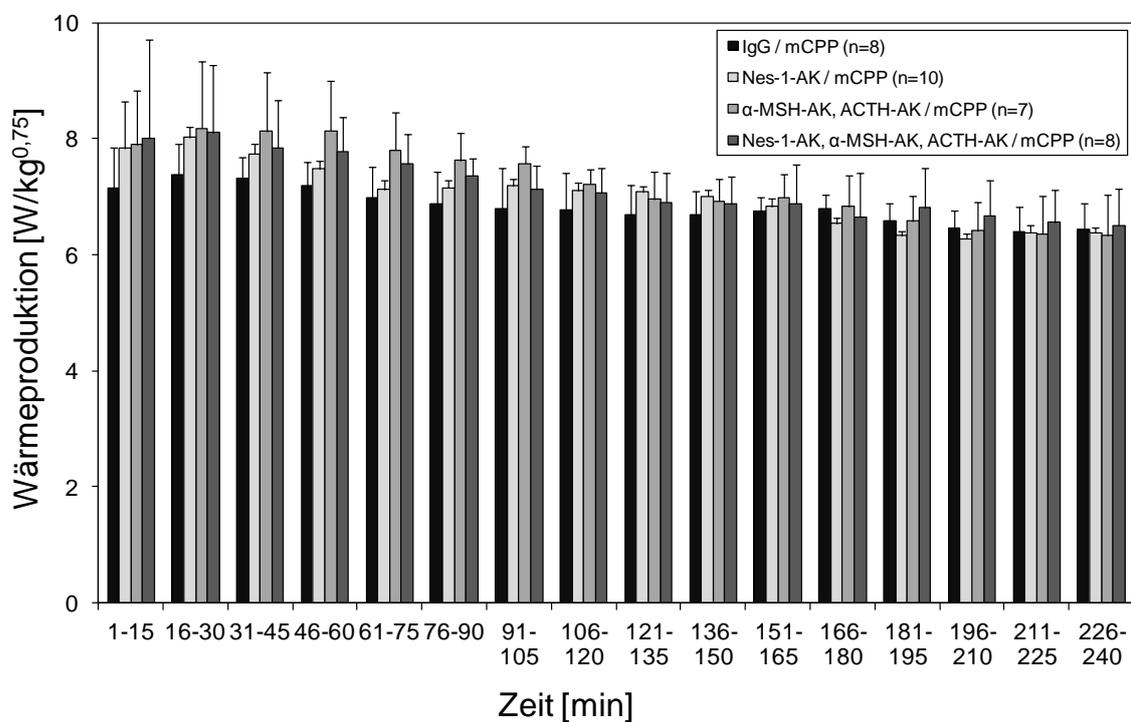


Abb. 21: Nicht-evaporative Wärmeabgabe mCPP-stimulierter Versuchstiere während der ersten vier Stunden nach Substanzapplikation in den PVN (15 min-Intervalle)

8.7 Abbildung zu Exp. 2A: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Aktivitätsphase

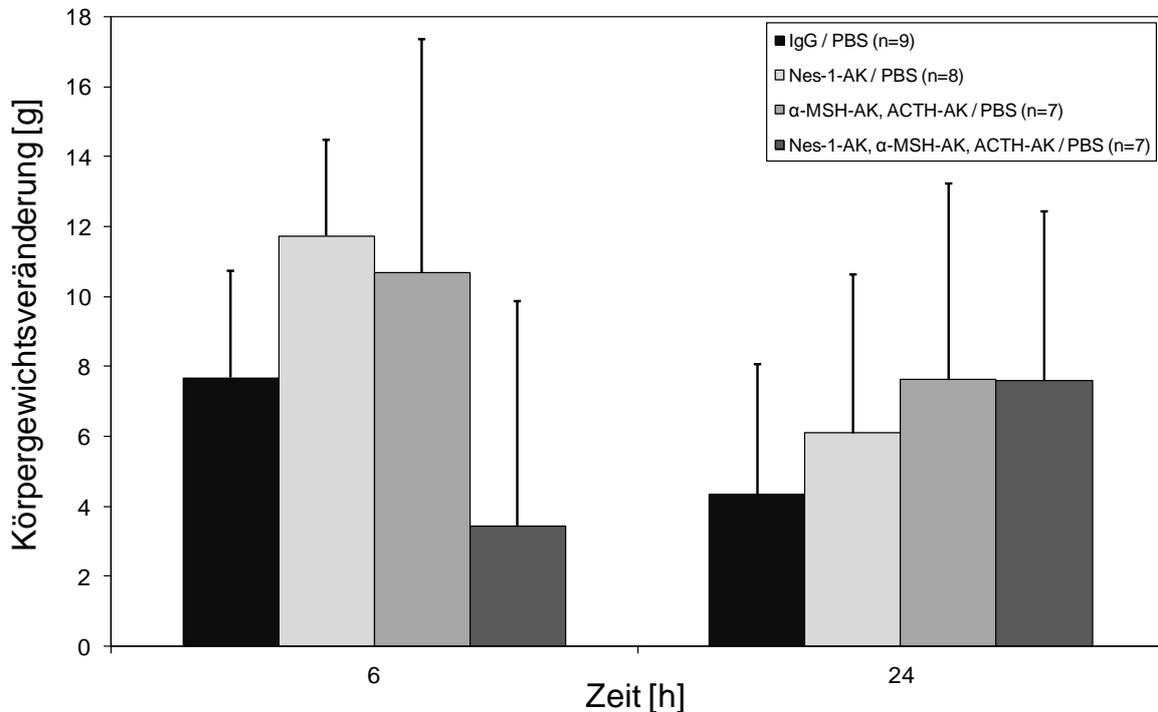


Abb. 22: Veränderung des Körpergewichts physiologisch stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Aktivitätsphase

8.8 Statistik zu Exp. 2A: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Aktivitätsphase

8.8.1 Nicht-evaporative Wärmeabgabe nach Applikation der Antikörper in den PVN

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h | 8 h |
|---------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| F-Wert | 0,231 | 1,300 | 3,079 | 5,248 | 6,687 | 6,018 | 8,171 | 4,219 |
| p-Wert | 0,874 | 0,290 | 0,040 | 0,004 | 0,001 | 0,002 | 0,000 | 0,012 |

Tab. 9: Statistische Auswertung der Thermogenese während der ersten acht Stunden p.i. (Vergleich über alle Gruppen, univariate ANOVA)

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 7 h | 8 h |
|-------------------------------------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Nes-1-AK | 1,000 | 0,500 | 0,165 | 0,040 | 0,845 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| α -MSH-AK, ACTH-AK | 1,000 | 0,782 | 0,046 | 0,007 | 0,001 | 0,005 | 0,000 | 0,017 |
| Nes-1-AK, α -MSH-AK, ACTH-AK | 1,000 | 1,000 | 0,194 | 0,015 | 0,017 | 0,046 | 0,028 | 0,325 |

Tab. 10: Statistische Analyse der Thermogenese der einzelnen experimentellen Gruppen während der ersten acht Stunden p.i. (p-Werte im Bonferroni-t-Test; Vergleich mit der Kontrollgruppe)

8.8.2 Nahrungs- und Wasseraufnahme nach Applikation der Antikörper in den PVN

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 8 h | 24 h |
|-----------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| F-Wert | 2,779 | 3,269 | 5,023 | 5,148 | 4,132 | 3,689 | 3,775 | 3,953 |
| p-Wert | 0,060 | 0,036 | 0,007 | 0,006 | 0,016 | 0,024 | 0,022 | 0,019 |

Tab. 11: Statistische Analyse der Nahrungsaufnahme während der ersten 24 Stunden p.i. (Vergleich über alle Gruppen, univariate ANOVA)

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 8 h | 24 h |
|--|--------------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|
| Nes-1-AK | 0,937 | 0,099 | 0,187 | 0,049 | 0,325 | 0,119 | 0,055 | 0,014 |
| α -MSH-AK, ACTH-AK | 0,047 | 0,189 | 0,032 | 0,070 | 0,144 | 0,492 | 0,153 | 0,228 |
| Nes-1-AK, α -MSH-AK, ACTH-AK | 0,921 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,421 |

Tab. 12: Statistische Analyse der Nahrungsaufnahme der einzelnen experimentellen Gruppen während der ersten 24 Stunden p.i. (p-Werte im Bonferroni-t-Test; Vergleich mit der Kontrollgruppe)

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 8 h | 24 h |
|-----------|-------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|--------------|
| F-Wert | 0,357 | 3,612 | 3,780 | 3,884 | 2,621 | 4,627 | 3,966 | 5,697 |
| p-Wert | 0,784 | 0,026 | 0,022 | 0,020 | 0,071 | 0,010 | 0,018 | 0,004 |

Tab. 13: Statistische Analyse der Wasseraufnahme während der ersten 24 Stunden p.i. (Vergleich über alle Gruppen, univariate ANOVA)

| Zeit p.i. | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h | 5 h | 6 h | 8 h | 24 h |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|--------------|
| Nes-1-AK | 1,000 | 0,058 | 0,199 | 0,091 | 0,106 | 0,010 | 0,011 | 0,002 |
| α -MSH-AK, ACTH-AK | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,222 |
| Nes-1-AK, α -MSH-AK, ACTH-AK | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,466 |

Tab. 14: Statistische Analyse der Wasseraufnahme der einzelnen experimentellen Gruppen während der ersten 24 Stunden p.i. (p-Werte im Bonferroni-t-Test; Vergleich mit der Kontrollgruppe)

8.9 Abbildungen zu Exp. 2B: Stimulation des NUCB2/Nesfatin-Systems und des Melanocortinsystems durch ein spezielles Fütterungsregime – Messungen während der Ruhephase

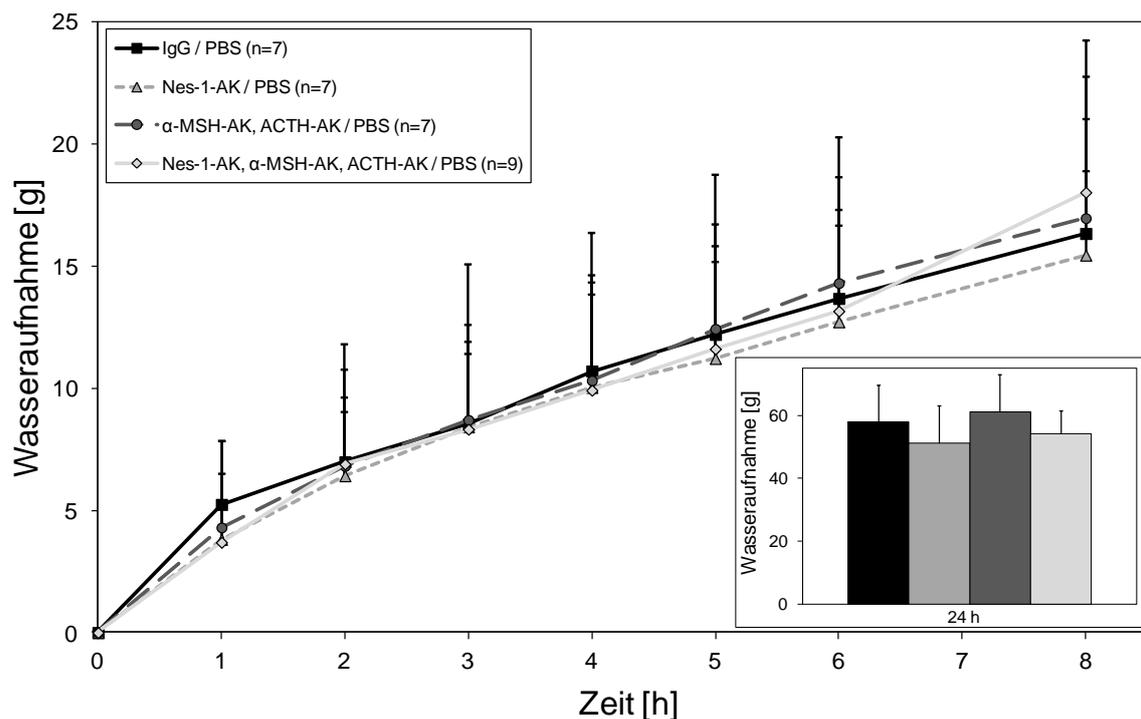


Abb. 23: Kumulative Wasseraufnahme physiologisch stimulierter Versuchstiere nach der Substanzapplikation in den PVN während der Ruhephase

Das Insert zeigt die nach 24 erhobenen Messwerte (von links nach rechts: G1, G2, G3, G4).

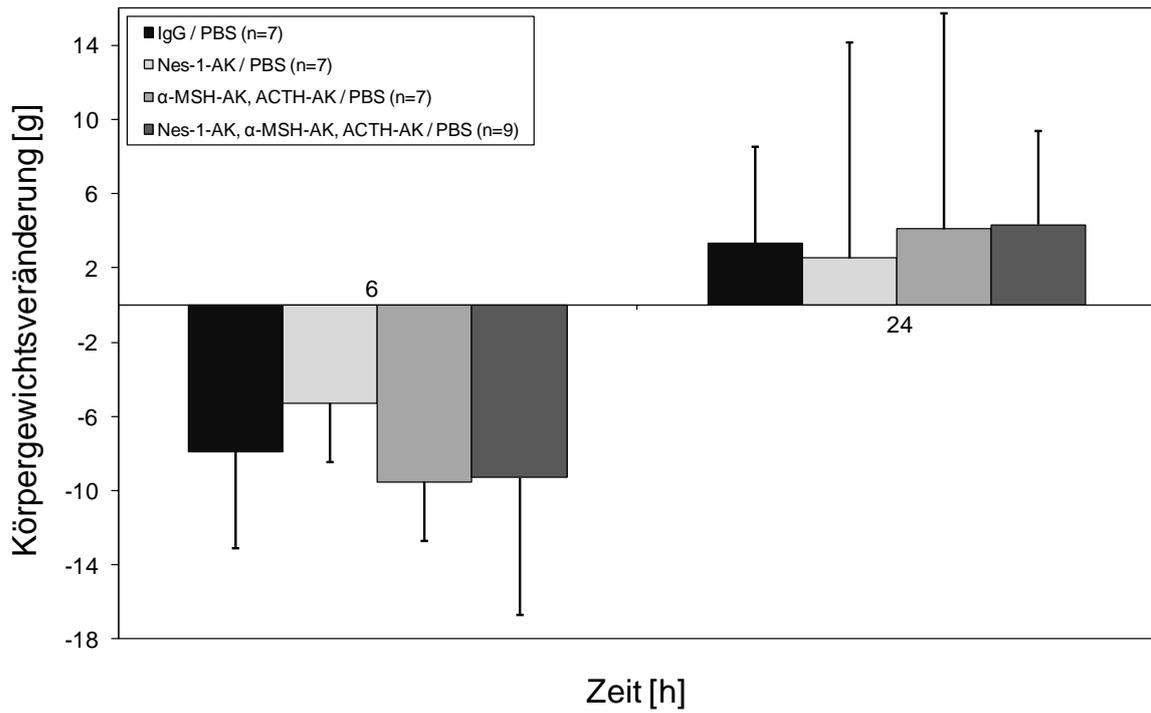


Abb. 24: Veränderung des Körpergewichts physiologisch stimulierter Versuchstiere nach Substanzapplikation in den PVN während der Ruhephase

9 Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle zunächst Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hendrik Lehnert für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, welche einen wichtigen Schritt in meinem persönlichen und beruflichen Werdegang bedeutet. Seine fachlichen Anregungen leisteten einen wertvollen Beitrag zu ihrem Gelingen.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. rer. nat. Carla Schulz, die mich in den vergangenen Jahren von der Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur Fertigstellung dieser Dissertation begleitet hat, für ihre stets zuverlässige und professionelle Betreuung.

Ebenso herzlich danke ich Frau Dr. rer. nat. Kerstin Wernecke, die mir insbesondere bei der tierexperimentellen und laborchemischen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und dabei durch nichts aus der Ruhe zu bringen war.

Frau Angela Oldörp danke ich für die praktische Anleitung im Labor und vor allem für zahlreiche Hilfestellungen organisatorischer Art, die eine große Erleichterung für mich bedeuteten.

Für all die schönen Aufmunterungen und ihre Besuche während der langen Versuchstage und -nächte möchte ich mich bei Lena Burmeister bedanken. Es war eine unvergessliche Zeit!

Meinem Bruder Benedikt verdanke ich die Lösung sämtlicher Computerprobleme, die bei der Erstellung dieser Dissertationsschrift auftraten und an denen ich ohne seinen Rat wohl so manches Mal verzweifelt wäre.

Ganz zum Schluss und doch ganz besonders gilt mein Dank meinen Eltern, die mit mir durch alle Höhen und Tiefen dieser Dissertation gingen - für ihr allzeit offenes Ohr und ihre liebevolle Unterstützung.

10 Lebenslauf

Name: Anna-Maria Eleonore Wilz
Geburtsdatum: 15.07.1989
Geburtsort: Offenbach am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig



Schulbildung

1995-1999 Joseph-von-Eichendorff-Schule Obertshausen
1999-2008 Marienschule der Ursulinen Offenbach am Main

Studium

seit 2008 Universität zu Lübeck
2010 Physikum

Famulaturen:

03/2011 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Günther in Obertshausen /
Hausen
08/2012 Onkologie, Städtische Kliniken Offenbach am Main
09/2012 Kardiologie, Städtische Kliniken Offenbach am Main
02/2013 Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus
Lübeck
03/2013 Poliklinik für Rheumatologie, Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Lübeck
08/2013 Dermatologie, Praxis Dres. med. Zimmermann und Bauer in
Heusenstamm

Wissenschaftliche Tätigkeit:

seit 2011 Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik I der Universität zu
Lübeck: „Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von
Nesfatin-1 und dem melanocortinergen System auf die
Energiehomöostase“

Sprachkenntnisse:

Englisch fließend in Schrift und Sprache

Grundkenntnisse in Französisch

Großes Latinum