

**Wirkung von rekombinantem Leptin auf den  
Energiehaushalt von Mäusen in Abhängigkeit  
vom Nahrungsangebot**

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

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Heiko Döring  
aus Körle

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
04.01.2001 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Heldmaier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ingrid Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung am 17.01.2001

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....		I
Abkürzungen.....		IV
1.	Einleitung.....	1
1.1.	Leptin: Erste Befunde über ein neues Hormon .....	1
1.2.	Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse .....	2
1.3.	Untersuchungen der systemischen Leptinwirkungen mit rekombinantem Leptin .....	4
1.3.1.	Körpermasse als Indikator für die Leptinwirkung.....	4
1.3.2.	Futteraufnahme.....	5
1.3.3.	Veränderung des Stoffwechsels .....	5
1.4.	Potentielle exogene Einflüsse auf den Energiestoffwechsel.....	6
1.5.	Zentrale vs. periphere Wirkung von Leptin .....	7
1.6.	Ziele dieser Arbeit .....	8
2.	Material und Methoden .....	10
2.1.	Versuchstiere .....	10
2.2.	Tierhaltung .....	10
2.3.	Versuchsaufbau .....	11
2.4.	Sauerstoffverbrauch .....	11
2.4.1.	Messung des Sauerstoffverbrauches.....	11
2.4.2.	Auswertung der Sauerstoffverbrauchswerte .....	13
2.4.2.1.	Berechnung der Rohwerte.....	13
2.4.2.2.	Berechnung der metabolischen Rate .....	14
2.5.	Futteraufnahme.....	14
2.6.	Körperzusammensetzung .....	15
2.7.	Plasmaleptinspiegel .....	16
2.7.1.	Gewinnung von Blutplasma.....	16
2.7.2.	Radioimmunoassay .....	16
2.7.2.1.	Prinzipielle Wirkungsweise .....	16
2.7.2.2.	Radioimmunoassay zur Bestimmung des Leptingehaltes.....	18
2.8.	Behandlung mit rekombinantem Leptin .....	19
2.9.	Versuchsserien.....	19

2.9.1.	Versuchsserie I: Futter <i>ad libitum</i> , eintägige Behandlung.....	20
2.9.2.	Versuchsserie II: Futter <i>ad libitum</i> , dreitägige Behandlung.....	20
2.9.3.	Versuchsserie III: Futter limitiert, dreitägige Behandlung.....	21
2.9.4.	Versuchsserie IV: Futter <i>ad libitum</i> , zehntägige Behandlung.....	21
2.9.5.	Versuchsserie V: Futter limitiert, zehntägige Behandlung.....	21
2.10.	Auswertung.....	22
2.10.1.	Versuchsserie I.....	22
2.10.2.	Versuchsserie II.....	22
2.10.3.	Versuchsserie III.....	23
2.10.3.1.	Übersicht.....	23
2.10.3.2.	Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der Meßwerte für die massenspezifische MR.....	23
2.10.3.3.	Bestimmung der täglichen Minima und Maxima der massenspezifischen MR.....	24
2.10.4.	Versuchsserie IV und V.....	24
3.	Ergebnisse.....	26
3.1.	Wirkung einer Kurzzeitbehandlung mit Leptin auf die Futtermaufnahme.....	26
3.1.1.	Dosis-Wirkungs-Beziehung bei einer eintägigen Behandlung bei Futter <i>ad libitum</i> .....	26
3.1.2.	Abhängigkeit des Effektes einer dreitägigen Leptinbehandlung auf die Futtermaufnahme vom Nahrungsangebot.....	28
3.2.	Wirkung einer Kurzzeitbehandlung mit Leptin auf den Sauerstoffverbrauch....	30
3.2.1.	Abhängigkeit des Effektes einer dreitägigen Leptinbehandlung auf den Energieverbrauch vom Nahrungsangebot.....	30
3.2.2.	Häufigkeitsverteilung der Meßwerte der massenspezifischen MR bei limitiertem Futterangebot.....	33
3.2.3.	Leptineffekt auf das tägliche Minimum jedoch nicht auf das Maximum der massenspezifischen MR bei limitiertem Futterangebot.....	34
3.2.4.	Dosis-Wirkungsbeziehung für den Gesamtenergieumsatz bei unterschiedlichem Nahrungsangebot.....	36
3.3.	Energiebilanz während einer zehntägigen Leptinbehandlung.....	36
3.3.1.	Verlauf der Futtermaufnahme und der Körpermasse während der Vorbereitungs- und Behandlungsperiode von Tieren mit unterschiedlichem Nahrungsangebot.....	37
3.3.2.	Veränderung von Futtermaufnahme, Körpermasse und Energieumsatz während einer zehntägigen Leptinbehandlung bei Futter <i>ad libitum</i> .....	41
3.3.3.	Veränderung von Futtermaufnahme, Körpermasse und Energieumsatz während einer zehntägigen Leptinbehandlung bei limitiertem Futterangebot.....	43

---

3.3.4.	Vergleich der Leptinwirkung auf die Futtermaufnahme und die Körpermasse bei unterschiedlichem Nahrungsangebot .....	45
3.3.5.	Vergleich der Leptinwirkung auf den Energieverbrauch bei unterschiedlichem Nahrungsangebot .....	46
3.3.6.	Auswirkungen einer zehntägigen Leptinbehandlung auf die Körperzusammensetzung bei unterschiedlichem Nahrungsangebot .....	48
3.3.6.1.	Zusammenhang zwischen Fettgehalt und Wassergehalt.....	48
3.3.6.2.	Auswirkungen der Leptinbehandlung auf den Körperfettgehalt und die fettfreie Trockenmasse .....	48
3.3.6.3.	Abhängigkeit der Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt vom Nahrungsangebot.....	53
3.3.7.	Energiebilanz der Leptinwirkung bei unterschiedlichem Nahrungsangebot .....	54
4.	Diskussion .....	56
4.1.	Abhängigkeit der Leptinwirkung von spezifischen physiologischen Zuständen .....	56
4.1.1.	Abhängigkeit der Leptinwirkung vom Ernährungszustand .....	56
4.1.2.	Abhängigkeit der Leptinwirkung vom Auftreten geregelter Stoffwechselabsenkungen der thermoregulatorischen Aktivität in der täglichen Ruhephase .....	58
4.2.	Diskussion der experimentellen Ansätze .....	62
4.2.1.	Diskussion der Applikationsform.....	62
4.2.2.	Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsserien .....	63
4.2.3.	Was ist das geeignete Maß für die Quantifizierung der Leptineffekte ? .....	64
4.2.3.1.	Die Körpermasse als problematische Bezugsgröße.....	64
4.2.3.2.	Die Körperfettmasse als entscheidende Bezugsgröße .....	65
4.2.3.3.	Der Sauerstoffverbrauch als Maß für die Leptinwirkung: absolute vs. massenspezifische MR.....	66
4.2.4.	Der Plasmaleptinspiegel als Maß für die verwendeten Leptindosierungen.....	67
4.3.	Quantitative Betrachtung der Leptinwirkung.....	68
4.4.	Kontinuum der Leptinwirkung in Bezug auf die Regelung des Körperfettes....	69
4.5.	Hinweise für die zentralnervöse Vermittlung der Leptinwirkung.....	69
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Literaturverzeichnis .....	75
7.	Danksagung .....	83

**Abkürzungen und Begriffe:**

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
<i>ad libitum</i>	im Überangebot verfügbar
ARC	Nucleus arcuatus
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>0</sub>	Leerprobe im Radioimmunoassay
BAT	Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue)
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSO <sub>4</sub>	Calciumsulfat (Trockenmittel)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Tag (day)
<i>fa/fa</i> -Ratte	Genetisch zum Übergewicht veranlagte, in Bezug auf den <i>fa</i> -Gen-Defekt homozygote Ratte
FFDM	Fettfreie Trockenmasse (fat-free dry-mass)
His <sub>6</sub> -tagged	rekombinantes murines Leptin markiert mit 6 Histidinresten
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kD	Kilo-Dalton
LD-Zyklus	Licht/Dunkel-Zyklus
log	Logarithmus, logarithmisch
MOP	mini-osmotische Pumpe
MR	Metabolische Rate [kJ], oder massenspezifische metabolische Rate [W/kg]
mRNA	<i>messenger</i> -RNA, Boten-Ribonukleinsäure
N, n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
NSB	unspezifische Bindung (non-specific binding)
NST	zitterfreie Thermogenese (non-shivering thermogenesis)
<i>ob/ob</i> -Maus	Genetisch zum Übergewicht veranlagte, in Bezug auf den <i>ob</i> -Gen-Defekt homozygote Maus
<i>ob</i> -Gen	Gen, welches das Hormon Leptin codiert

---

Ob-R	Leptin-Rezeptor
Ob-Rb	Splice-Variante des Leptinrezeptors mit langer intrazellulärer Domäne
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatpuffer in physiologischer Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
RQ	Respiratorischer Quotient
SB	Spezifische Bindung des Tracers in einem Radioimmunoassay (specific binding)
s.c.	subcutan
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
STPD	Standardbedingungen: 22°C, 760 mm Hg und 60% relative Luftfeuchte (standard temperature-pressure-dryness)
Ta	Umgebungstemperatur [°C]
Tc	Körperkerntemperatur [°C]
TO	Totalaktivität in einem Radioimmunoassay
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
$\dot{V}O_2$	Sauerstoffverbrauch [ml/min]
ZNS	Zentralnervensystem
$\alpha$ -MPT	$\alpha$ -Methyl- <i>p</i> -Tyrosin





## 1. Einleitung

### 1.1. Leptin: Erste Befunde über ein neues Hormon

Bereits 1953 wurde von Kennedy postuliert, daß es einen im Fettgewebe gebildeten und im Blut zirkulierenden Stoff geben muß, der Informationen über die Größe der endogenen Fettspeicher beinhaltet und diese dem Gehirn übermittelt. Parabiose-Experimente von Coleman Anfang der 70er Jahre mit *ob/ob*-Mäusen unterstützen diese Theorie durch die Annahme eines „Sättigungsfaktors“ im Blut, der diesen Tieren fehlen sollte (Coleman et al. 1973). Bei diesem Faktor, dem Hormon Leptin, welches 1994 von Zhang et al. durch die Entdeckung des „defekten“ *ob*-Gens bei *ob/ob*-Mäusen identifiziert wurde, handelt es sich um ein 16 kD großes Peptid. Es wird bei Tieren ohne Gen-Defekt hauptsächlich im Fettgewebe produziert und in den Blutkreislauf sezerniert. Rasch wurde deutlich, daß die Hormonkonzentration im Plasma mit der Größe der körpereigenen Fettspeicher anstieg (Zhang et al. 1994, Maffei et al. 1995, Frederich et al. 1995). Dies wies darauf hin, daß Leptin der zuvor postulierte adipostatische Sättigungsfaktor sein könnte. Die in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, daß neben der Futteraufnahme auch viele andere physiologische Funktionen von Leptin beeinflusst werden (Casanueva und Dieguez 1999, Trayhurn et al. 1999).

Zu Beginn dieser Arbeit im Jahre 1996 war insbesondere die physiologische Wirkung des Leptins auf den Energieverbrauch umstritten (Pellymounter 1995, Levin et al. 1996). Außerdem bestand Unklarheit darüber, ob das Hormon überhaupt eine physiologische Wirkung zur Begrenzung der Körperfettmasse bei normalen (Wildtyp-) Tieren besitzt oder ob die beobachteten Reaktionen nur pharmakologische Effekte widerspiegelten (Pellymounter 1995, Ahima et al. 1996, Flier 1998). Selbst bei der Vielzahl der in den letzten Jahren erschienenen Veröffentlichungen, die sich mit Veränderungen von Körpermasse und Futteraufnahme bei Leptinbehandlung befassen, fehlen bis heute Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Leptingabe, Energieverbrauch und Körperfettmasse speziell bei normalen Wildtyp-Mäusen.

## 1.2. Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse

Die lipostatische Theorie setzte voraus, daß eine Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und der Gesamtkörperfettmenge besteht. Obwohl diese Beziehung in einer Vielzahl von Untersuchungen überzeugend dargestellt wurde (Zhang et al. 1994, Frederich et al. 1995, Maffei et al. 1995, Considine und Caro 1997, Eiden et al. 2001), wurde rasch deutlich, daß erhöhte Leptinspiegel bei erhöhter Körperfettmenge immer mit Leptinresistenz verknüpft waren (Van Heek et al. 1997, Caro et al. 1996). Damit wurde die Wirkung von Leptin als adipostatischer Faktor, d.h. in seiner Rolle zur Begrenzung der Fettspeicher nach oben, in Frage gestellt. Zudem ist inzwischen bekannt, daß eine geringe Expression des Gens auch in der Plazenta (Hoggard et al. 1997, Hassink et al. 1997, Masuzaki et al. 1997), der Skelettmuskulatur (Hoggard et al. 1997, Wang et al. 1998) und dem Intestinum (Hoggard et al. 1997) stattfindet, ebenfalls Befunde, die mit der Rolle des Leptins als lipostatischer Faktor nicht ohne weiteres zu vereinbaren sind.

Die Ermittlung eines funktionell bedeutsamen Zusammenhanges zwischen dem endogenen Plasmaleptinspiegel und der Regulation der Größe der Fettspeicher wird weiterhin dadurch erschwert, daß die endogene Leptinfreisetzung von einer Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst wird. Kurzfristig variiert der Leptinspiegel tagesperiodisch (Ahima et al. 1998). Langfristig beeinflussen das Alter und das Geschlecht den Plasmaleptinspiegel (Ahren et al. 1997, Rosenbaum et al. 1996). Darüber hinaus können jahreszeitliche Veränderungen der Photoperiode eine Rolle spielen (Klingenspor et al. 1996, Bocquier et al. 1998, Drazen et al. 2000). Glucocorticoide (Becker et al. 1995, De Vos et al. 1995, Slieker et al. 1996) und bestimmte Cytokine (Grunfeld et al. 1996, Sarraf et al. 1997) wirken erhöhend auf den Leptingehalt des Blutes, wohingegen  $\beta$ -adrenerge Agonisten und c-AMP den Leptinspiegel senken (Slieker et al. 1996, Mantzoros et al. 1996). Kurzfristiges Hungern oder Fasten können den Leptinspiegel sowohl beim Tier als auch beim Menschen drastisch absenken, auch wenn es zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu nennenswerten Änderungen im Körperfettgehalt gekommen ist (Kolaczynski et al. 1996, Boden et al. 1996, Ahima et al. 1996).

Die aufgrund der Beziehung zum Triglyceridgehalt der Fettzelle anzunehmende metabolische Kontrolle der zellulären Synthese und Freisetzung von Leptin wird in Zusammenhang mit einem Nebenweg der Glycolyse, der Synthese von Glucosamin, gebracht, dessen Aktivität durch das beim Fettsäureabbau anfallende Acetyl-CoA gehemmt

wird. In zellbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Glucosamin direkt oder in acetylierter und uridylierter Form die Expression der Leptin-mRNA in Fettzellen und auch in Muskelzellen stimulieren kann (Wang et al. 1998). Eine solche Form der Regulation der Leptinproduktion würde aber eher auf eine Beziehung zum Energieflux als zur vorhandenen Speicherfettmenge hinweisen.

Desweiteren scheint das sympathische Nervensystem wesentlich an der Regulation der Produktion von Leptin im weißen Fettgewebe beteiligt zu sein. So führt bei Mäusen eine Blockade der Noradrenalin-Synthese durch Applikation von  $\alpha$ -Methyl-*p*-Tyrosin ( $\alpha$ -MPT) zu einem deutlichen Anstieg der Plasmaleptin-Konzentration (Trayhurn et al. 1998). Noradrenalin selbst sowie speziell adrenerge  $\beta_3$ -Agonisten wiederum führen zu einer deutlich verminderten Expression des *ob*-Gens, was in einem erniedrigten Plasmaleptinspiegel resultiert (Moinat et al. 1995, Gettys et al. 1996, Mantzoros et al. 1996, Sliker et al. 1996, Trayhurn et al. 1996, Dessolin et al. 1996). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, daß Leptin selbst autokrin hemmend auf die Leptinsynthese der Fettzellen wirkt (Zhang et al. 1997, Wang et al. 1999). Auch hier stellt sich die Frage, wie solche mit dem Körperfettgehalt nicht in direktem Zusammenhang stehenden kurzfristigen Änderungen des Plasmaleptinspiegels und autokrine „Feedback“-Mechanismen mit der Funktion des Hormons als adipostatischer Faktor in Einklang gebracht werden können.

Neben der Produktion von Leptin ist auch die Halbwertszeit des Hormons im Blutkreislauf von Bedeutung für den Plasmaleptinspiegel. Obwohl hauptsächlich die glomeruläre Filtration in den Nieren für die Elimination des Leptins aus dem Blutkreislauf verantwortlich ist, wird die renale Leptin clearance nicht spezifisch kontrolliert, sondern ist lediglich eine Funktion der Leptin-Konzentration im Blut (Cumin et al. 1997). Somit scheint die renale Elimination von Leptin keinen wesentlichen regulatorischen Einfluß auf den Plasmaleptinspiegel zu haben. Weitere Möglichkeiten der Extravasation von Leptin sind die Bindung an spezifische Proteine und somit eine Überführung in eine inaktive Form oder seine Dissoziation bzw. der Transport in andere Gewebekompartimente (Cumin et al. 1997). Der regulatorische Einfluß dieser Mechanismen auf den Plasmaleptinspiegel ist bisher umstritten, stellt aber einen weiteren Unsicherheitsfaktor bei der Beurteilung des Zusammenhanges zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmenge dar.

Auf der anderen Seite zeigte die Applikation von rekombinantem Leptin im Experiment jedoch eine deutliche dosisabhängige Reduktion des Körperfettgehaltes bei adipösen

*ob/ob*-Mäusen, die dieses Hormon nicht selbst produzieren können (Zhang et al. 1994). Die ersten Befunde bei Wildtyp-Mäusen waren dagegen, wie nachfolgend dargestellt wird, quantitativ nicht überzeugend. Deshalb wurde die Möglichkeit diskutiert, daß es sich bei den beobachteten Wirkungen von rekombinantem Leptin bei hohen Dosierungen nur um pharmakologische Effekte handelte und die physiologische Rolle des Leptins in der Sicherung eines unteren kritischen Körperfettgehaltes bestehen könnte (Ahima et al. 1996, Flier 1998).

### **1.3. Untersuchungen der systemischen Leptinwirkungen mit rekombinantem Leptin**

#### **1.3.1. Körpermasse als Indikator für die Leptinwirkung**

Die Applikation von rekombinantem Leptin hat bei adipösen *ob/ob*-Mäusen dramatische Auswirkungen auf die Körpermasse. Steht den Tieren Futter *ad libitum* zur Verfügung, so kann eine vierwöchige Behandlung mit intraperitonealer Applikation (i.p.) von  $300 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Leptin die Körpermasse um ca. 40% verringern, wobei diese Gewichtsreduktion hauptsächlich auf die Abnahme des Körperfettgehaltes infolge verminderter Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist (Halaas et al. 1995, Campfield et al 1995, Pelleymounter et al. 1995). Bei Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit rekombinantem Leptin war die Wirkung auf die Körpermasse dagegen fragwürdig (Campfield et al 1995, Halaas et al. 1995, Pelleymounter et al. 1995, Levin et al. 1996). Erst durch zweiwöchige Applikation von Leptin mittels subcutan implantierter mini-osmotischer Pumpen (MOP) konnte 1997 eine klare dosisabhängige Abnahme der Körpermasse von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (Halaas et al. 1997). Allerdings zeigten andere Untersuchungen, daß die Körpermasse nur einen sehr unzuverlässigen Indikator für die Veränderung des Körperfettgehaltes bei einer Leptinbehandlung von Tieren mit normalem bis niedrigem Körperfettgehalt darstellt (Stehling et al. 1997 a, Eiden et al. 2001).

### 1.3.2. Futteraufnahme

Neben einer Vielzahl von Studien, die die Wirkung von peripher appliziertem Leptin bei *ob/ob*-Mäusen untersuchten, wurde auch eine kurzfristige hemmende Wirkung von Leptin auf die Futteraufnahme von Wildtyp-Mäusen mehrfach eindeutig belegt (Pellemounter et al. 1995, Campfield et al. 1995). Bei diesen klang die Wirkung jedoch nach wenigen Tagen ab. Quantitative Dosis-Wirkungsbeziehungen für die Futteraufnahme in Beziehung zur daraus resultierenden Veränderung der Körperfettmasse wurden für Wildtyp-Mäuse aber bisher nicht dargestellt.

### 1.3.3. Veränderung des Stoffwechsels

Eine Reduktion der Fettspeicher kann prinzipiell entweder durch eine verminderte Energiezufuhr oder durch einen höheren Energieverbrauch herbeigeführt werden. Eine mögliche Stoffwechselwirkung von Leptin war 1996 zu Beginn der hier dargestellten Untersuchungen aber noch umstritten (Pellemounter et al. 1995, Levin et al. 1996). Kritikpunkte waren neben den verwandten pharmakologischen Dosen insbesondere, daß nur Kurzzeitmessungen über wenige Stunden durchgeführt wurden, die Vernachlässigung tagesperiodischer Aspekte bei der Stoffwechselformung und die fehlende Berücksichtigung der bekannten metabolischen Effekte des „meal eatings“ (Spangler und Johnson 1981) bei den „pair feeding“-Experimenten, die an Stelle von Langzeit-Stoffwechselformungen zum Nachweis eines metabolischen Effektes des Leptins verwendet wurden (Levin et al. 1996). Falsch positive Befunde können außerdem dadurch entstehen, daß die Stoffwechselformungen auf die Einheit der Körpermasse bezogen werden und sich somit bei Abnahme der Körpermasse zwangsläufig erhöhen, ohne daß dies Konsequenzen für den Energiehaushalt hat (Himms-Hagen 1997).

Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde an Ratten im Säuglingsalter zum ersten Mal eindeutig gezeigt, daß eine Behandlung mit Leptin ohne Veränderung der Nahrungsaufnahme zu einer dosisabhängigen Veränderung der Körperfettmasse führt, die energetisch auf eine entsprechende Erhöhung des Sauerstoffverbrauches zurückzuführen ist. Dabei zeigte sich, daß die Leptinwirkung nicht auf einer allgemeinen Stoffwechselsteigerung beruhte, sondern lediglich auf der Aufhebung von torporartigen Stoffwechselabsenkungen während des circadianen Minimums des juvenilen circadianen

Kerntemperaturrhythmus. Unter thermoneutralen Bedingungen, bei denen es nicht zu torporartigen Stoffwechselabsenkungen kommt, ließ sich bei juvenilen Ratten, deren Milchaufnahme experimentell kontrolliert wurde, dagegen keine Leptinwirkung feststellen (Stehling et al. 1997 b).

#### **1.4. Potentielle exogene Einflüsse auf den Energiestoffwechsel**

Gerade bei Stoffwechseluntersuchungen hat sich gezeigt, daß unterschiedliche Umgebungsbedingungen (oder gar deren Veränderungen) einen enormen Einfluß auf die zu bestimmenden Parameter haben können. So führen insbesondere bei den üblichen kleinen Labortieren bereits geringfügige Änderungen der Umgebungstemperatur zu massiven Änderungen im Sauerstoffverbrauch. Dabei spielt auch die Art und die Menge des Nahrungsangebotes eine wichtige Rolle für die Einstellung des Stoffwechselliveaus. Außerdem treten tagesperiodische Schwankungen im Energieumsatz auf.

Wildtyp-Labormäuse halten während ihrer Aktivitätsphasen in einem weiten Bereich von Umgebungstemperaturen eine Körperkerntemperatur zwischen 36 und 39°C aufrecht (Hudson und Scott 1979). Bei Kältebelastung wird dabei die sogenannte zitterfreie Thermogenese (NST = non-shivering thermogenesis) zur Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur aktiviert. Dazu wird im braunen Fettgewebe (BAT) durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien die Bildung von ATP unterbunden und die dafür bereitgestellte Energie in Form von Wärme an den Körper abgegeben. Ist allerdings das Nahrungsangebot nicht ausreichend und somit die tägliche Energiezufuhr zu gering, sind viele Kleinsäuger und Vögel in der Lage, speziell während ihrer Ruhephasen durch Reduzierung der thermoregulatorischen Wärmeproduktion Energie einzusparen. Durch diese Stoffwechselreduzierung fällt die Körperkerntemperatur mitunter drastisch ab, teilweise, je nach Spezies, sogar bis in die Nähe der Umgebungstemperatur (Herreid und Schmidt-Nielsen 1966, Hudson 1978). Diese mehr oder weniger kurzzeitig auftretenden Absenkungen des Sauerstoffverbrauches und der Körperkerntemperatur, deutlich unter das Niveau des Ruhestoffwechsels, werden als „daily torpor“ und im folgenden kurz als „Torpor“ bezeichnet. Allerdings ist diese Bezeichnung sehr unscharf definiert. Für Labormäuse wurde von Hudson und Scott (1979) Torpor durch das Auftreten von Stoffwechselraten von mehr als 25% unter den normalen

Tagesruhewerten charakterisiert. Solche Torporperioden können mehrere Stunden am Tag andauern und sind mit einer entsprechenden Absenkung der Körperkerntemperatur verbunden. Allerdings kehren die Tiere spätestens mit Beginn der Aktivitätsphase wieder auf ihr Aktivitätsniveau zurück (Himms-Hagen 1985). Somit läßt sich Torpor deutlich von dem damit verwandten Winterschlaf unterscheiden, bei dem es zu mehrere Tage oder sogar Wochen dauernden Absenkungen der Körperkerntemperatur und des Energieumsatzes kommt.

### 1.5. Zentrale vs. periphere Wirkung von Leptin

Die für die zentralnervöse Vermittlung der Leptinwirkung wesentliche lange Isoform [ObRb] des *ob*-Rezeptors wird im Bereich des Zentralnervensystems (ZNS) überwiegend im Hypothalamus exprimiert, vor allem in den Kerngebieten des Nucleus arcuatus (ARC) und des ventromedialen Hypothalamus (VMH), die mit Futteraufnahme und Metabolismus in Verbindung gebracht werden (Mercer et al. 1996, Shioda et al. 1998). Voraussetzung für die physiologische Wirkung des im Blut zirkulierenden Leptins auf zentralnervöse Zielstrukturen ist allerdings deren Zugänglichkeit für dieses relativ große Peptid. Da das ZNS infolge der kontinuierlichen Endothelauskleidung der Hirnkapillaren – die sog. Blut-Hirn-Schranke – generell für nicht lipophile höher-molekulare Substanzen nicht zugänglich ist, kommen nur zwei Möglichkeiten in Betracht: 1. der Eintritt von Leptin in das Interstitium des Gehirns in verschiedenen Bereichen ohne Blut-Hirn-Schranke, wie den sog. zirkumventrikulären Organen, und auch direkt im Bereich des ARC, oder 2. spezifische Transportmechanismen, die Leptin durch die Endothelbarriere befördern. Für beide Zugänge gibt es Hinweise (Banks et al. 1996, Campfield et al. 1996).

Schwierigkeiten gibt es bei der Abgrenzung der zentralnervös vermittelten Leptinwirkungen gegen seine vielfältigen peripheren Stoffwechseleffekte, von denen einige sättigungshemmend bzw. stoffwechselaktivierend (katabol) wirken können. So ist Leptin an einer Hemmung der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas beteiligt (Emilsson et al. 1997, Fehmann et al. 1997), wirkt stimulierend auf die Lipolyse in den Adipozyten (Frühbeck et al. 1997), fördert die Bereitstellung von Glucose (Kamohara et al. 1997) sowie die Glucoseresorption im Darm (Lostao et al. 1998). Zudem konnte an isolierten Adipozyten bei einer Behandlung mit Leptin eine verminderte Insulin-

Sensitivität nachgewiesen werden. Insbesondere kam es zu dosisabhängigen Abschwächungen des durch Insulin stimulierten Glucosetransportes, der Glycogen-Synthese und der Lipogenese (Müller et al. 1997). Bei peripherer Leptinbehandlung muß also der Frage nachgegangen werden, inwieweit die beobachteten Reaktionen zentral vermittelt sind oder auf lokalen peripheren Wirkungen beruhen.

### **1.6. Ziele dieser Arbeit**

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein effektives Behandlungsprotokoll für Wildtyp-Mäuse zu entwickeln, da die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Untersuchungen nur von schwachen und sehr variablen Wirkungen der Leptinbehandlungen von Wildtyptieren berichtet hatten. So wurde den aus unterschiedlichen Ausgangsbedingungen, insbesondere des Fütterungsstatus, resultierenden Einflüssen auf die experimentellen Befunde besonders Rechnung getragen, um zu einer zuverlässigen Beurteilung der Leptinwirkung kommen zu können. Deshalb wurde in dieser Arbeit zwischen zwei definierten Fütterungsbedingungen unterschieden: Tiere mit *ad libitum*-Fütterung und Tiere, die über längere Zeiträume an die Aufnahme einer limitierten Nahrungsmenge gewöhnt worden waren und regelmäßig Torpor zeigten.

Da die zu Beginn dieser Untersuchung bekannten Studien widersprüchliche Ergebnisse über die Effekte von Leptin auf den Energieumsatz von Wildtyp-Mäusen zeigten (Pellymounter et al. 1995, Levin et al. 1996), war es das Hauptziel dieser Arbeit herauszufinden, unter welchen Bedingungen Leptin einen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch von Wildtyp-Mäusen hat. Insbesondere sollte geklärt werden, ob Leptin Torpor bei adulten Tieren in gleicher Weise unterdrücken kann, wie es bei den morgendlichen torporartigen Absenkungen der thermoregulatorischen Wärmeproduktion bei juvenilen Ratten der Fall ist (Stehling et al. 1996).

Wie oben erläutert, können bei Wildtyptieren mit niedrigem Gesamtkörperfettgehalt auch geringe Veränderungen der Fettmasse, die nur eine minimale Auswirkung auf die Gesamtkörpermasse erwarten lassen, erhebliche Änderungen der Energiereserven darstellen. Deshalb war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluß von Leptin auf die Körperzusammensetzung und insbesondere auf den Körperfettgehalt zu quantifizieren. So wurden Langzeitbehandlungen über zehn Tage durchgeführt, um im Anschluß an die



Behandlungsperioden den Fettgehalt von Tieren mit unterschiedlichen Fütterungsbedingungen vergleichen und mit der Veränderung der Energiebilanz durch Beeinflussung der Futteraufnahme und des Energieverbrauches in Verbindung setzen zu können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an weiblichen BalbC- Mäusen bzw. C57BL/6J-Mäusen (*Mus musculus*) durchgeführt, die zu Beginn der Versuche mindestens acht Wochen alt waren. Die Tiere entstammten der Zucht des W.G.-Kerckhoff-Institutes oder wurden von Charles River (Deutschland) bezogen. Alle Versuchstiere wurden mit Haltungsfutter (ALTROMIN 1324, Lage, Deutschland) mit einem Nährstoffgehalt von durchschnittlich 4% Fett, 19% Proteinen und 62% Kohlenhydraten gefüttert.

### 2.2. Tierhaltung

Die Tiere wurden in der Regel im Alter von drei Wochen von der Mutter abgesetzt und für weitere drei bis vier Wochen im Wurfverband gehalten. Zur Eingewöhnung an die Einzelhaltung wurden die Tiere im Alter von 7-12 Wochen jeweils einzeln in Kunststoff-Behälter (17 x 17 x 15 cm) gesetzt, die mit handelsüblicher Einstreu (Holzsägespäne, Altromin, Lage) ausgelegt waren. Zusätzlich wurde den Behältern für die Tiere ein ca. 5 cm langes Kunststoffrohr ( $\varnothing$  3,5 cm) sowie Zellstoff zum Nestbau beigegeben. Grundsätzlich wurde in allen Versuchen den Tieren Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Durch die tägliche Kontrolle der Futteraufnahme sowie der Körpermasse wurden die Tiere an Personen gewöhnt, die die Versuche durchführten.

Während der ersten Versuchsserie (I) wurden die Tiere in einem Licht/Dunkel-Zyklus von 12:12 h (LD-Zyklus) gehalten. In den weiteren Versuchsserien (II – V) wurden die Tiere in einem 10:14 h LD-Zyklus (Kurztag) gehalten. Die Umgebungstemperaturen ( $T_a$ ) lagen bei 22 - 24°C. Bei diesen Haltungsbedingungen war der Sauerstoffverbrauch im Tagesmittel etwa doppelt so hoch wie unter thermoneutralen Bedingungen. Die relative Luftfeuchte betrug ca. 60%. Um der Nachtaktivität der Tiere Rechnung zu tragen und Störungen in der Ruhephase zu vermeiden, erfolgte die Versorgung der Tiere jeweils in der letzten Stunde der Lichtphase.

### 2.3. Versuchsaufbau

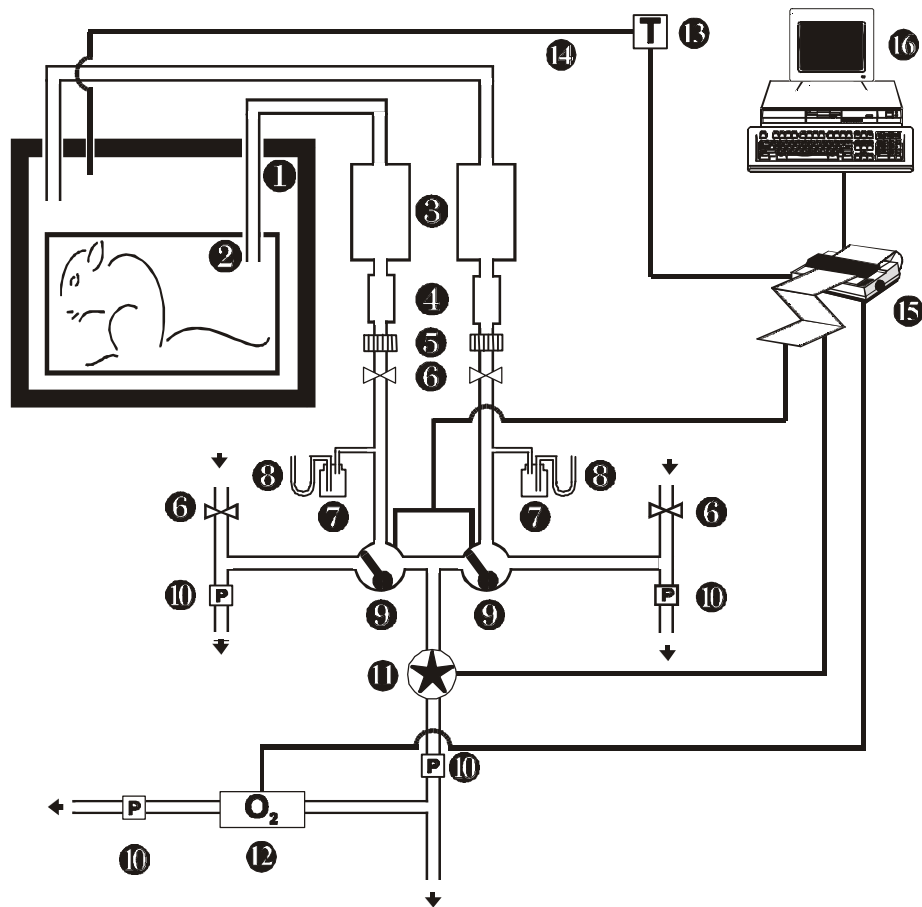
Die Versuche fanden entweder in einer Klima-Box (Modell SB500, Weiss Technik, Lindenstruth) statt, in der sowohl die Lufttemperatur als auch die relative Luftfeuchtigkeit direkt geregelt werden konnten, oder in schallisolierten ventilierten Holzboxen (56 x 41 x 60 cm Innenmaße, Eigenbau), in denen die Umgebungstemperatur und die relative Luftfeuchtigkeit über die Klimatisierung des Laboratoriums eingestellt wurden.

Die Tierbehälter waren bis auf ein zentrales Loch ( $\varnothing = \text{ca. } 0,5 \text{ cm}$ ) im Deckel luftdicht verschlossen. Die Ventilation erfolgte durch ein senkrecht durch dieses Loch in das Innere des Behälters reichendes Metallrohr, durch welches die Luft zur Messung des Sauerstoffverbrauches der Tiere abgesaugt wurde. Durch den verbleibenden Raum zwischen diesem Absaugrohr und dem Loch im Deckel konnte ausreichend Frischluft in den Tierbehälter nachströmen. Somit erfolgte die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes der Luft in einem offenem Meßsystem (Withers 1977).

### 2.4. Sauerstoffverbrauch

#### 2.4.1. Messung des Sauerstoffverbrauches

Das Sauerstoff-Meßsystem wurde jeweils vor Versuchsbeginn mit Eichgasen auf 20,0 und 21,0 % Sauerstoffgehalt - entsprechend dem Meßbereich - kalibriert. Die Atemluft der Tiere wurde mittels Membranpumpen kontinuierlich aus den Tierbehältern abgesaugt und zunächst zur Trocknung durch mit Drierite® (=  $\text{CaSO}_4$ , Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen) gefüllte Rohre geleitet (Abbildung 1). Im weiteren Verlauf wurde die so getrocknete Meßluft durch Aktivkohle-Filter zur Absorption von organischen Molekülen sowie durch Membranfilter zum Abfangen von Staubpartikeln gesaugt. Ein Teilstrom (100 ml/min) der so getrockneten und gereinigten Luft wurde zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes zu einem elektrochemischen Sauerstoffanalysator (S-3A/II, Ametek, Pittsburgh, USA) geleitet. Gleichzeitig wurde die Umgebungsluft in gleicher Weise wie die Meßluft aus der Klima-Box (bzw. den Holzboxen, s.o.) abgesaugt und simultan von einem zweiten Kanal des Meßgerätes auf ihren Sauerstoffgehalt analysiert. Der ermittelte Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft diente dabei als Referenzwert zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauches der Tiere.



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

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die kontinuierliche Messung des Sauerstoffverbrauches von Mäusen. Dargestellt sind ein Kanal für die Messung des Sauerstoffgehaltes der Atemluft der Tiere (in Meßposition) sowie der Kanal für die Messung der Umgebungsluft.

Die Luftflußrate, mit der die Luft aus den Tierbehältern gesaugt wurde, wurde mit einem elektronischen Massenflußmesser (FM 360, Tylan General, Eching) ermittelt. Als Flußrate wurde bei allen Versuchen 250 - 300 ml/min gewählt, so daß die Sauerstoffextraktion infolge der Atmung der Tiere etwa bei 0,5 % lag. Der Luftflußmesser wurde ebenfalls vor Versuchsbeginn kalibriert.

Die abgesaugte Luft aus 7 Tierbehältern sowie die Umgebungsluft zur Kontrolle des Referenzwertes wurden alternierend über jeweils 5 Minuten mittels Zeitgeber-gesteuerter Magnetventile auf Meßposition geschaltet. So wurde von jedem Tier im zeitlichen Abstand von 40 min ein gemittelter (s.u.) Meßwert für den Sauerstoffverbrauch bestimmt. Die Luft aus den Tierbehältern, die nicht auf Meßposition lagen, wurde weiterhin durch Membranpumpen kontinuierlich abgesaugt, um auch zwischen den Meßperioden einen gleichmäßigen Luftaustausch in den Behältern zu gewährleisten. Dabei wurden diese Flußraten durch Druckdifferenz-Kontrolle mittels Wassermanometern den durch den Massenflußmesser ermittelten Luftflußraten für die Meßposition angeglichen. Neben der Sauerstoffextraktion aus der Kammerluft wurden weiterhin die Luftflußrate sowie die Meßkanal-Position ermittelt und von einem Computer aufgezeichnet. Zur optischen Überwachung wurden alle anfallenden Daten parallel von einem Mehrkanal-Hybrid-Drucker (Yokowaga 3081, nbn Elektronik GmbH, Herrsching) aufgezeichnet.

## **2.4.2. Auswertung der Sauerstoffverbrauchswerte**

### **2.4.2.1. Berechnung der Rohwerte**

Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst mittels Fortran-Programmen, die speziell für das Aufzeichnungsprogramm entwickelt worden waren (Manfred Schubert, 1990). Dazu wurden die in 12-s-Intervallen aufgezeichneten Daten für jedes 5-min-Meßintervall gemittelt. Um Fehler durch noch im Meßsystem befindliche Restluft von der Messung des vorherigen Kanals auszuschließen, wurden jeweils nur die letzten 2,5 Minuten des 5-min-Meßintervalles pro Tier ausgewertet.

### 2.4.2.2. Berechnung der metabolischen Rate

Zur Berechnung des Sauerstoffverbrauches der Tiere wurde zunächst der Unterschied im prozentualen Sauerstoffgehalt zwischen Tierluft und Referenzluft ermittelt ( $\Delta O_2$  in %). Aus dieser Differenz sowie der auf Standardbedingungen (STPD) normierten Luftflußrate wurde der Sauerstoffverbrauch pro Minute ( $\dot{V}O_2$ ) errechnet. Zur Berechnung der metabolischen Rate (MR) nach der Formel für das offene System (Withers, 1977) wurde ein respiratorischer Quotient (RQ) von 0,85 - entsprechend der Zusammensetzung des Futters (s.o.) - zugrunde gelegt. Mittels der diesem RQ entsprechenden Umrechnungsfaktoren von 0,34 W pro ml  $O_2$ /min bzw. 20,4 kJ pro Liter  $O_2$  wurde die MR bzw. der tägliche Gesamtenergieverbrauch für jedes Tier berechnet. Zusätzlich wurde die massenspezifische MR mit Hilfe einer linearen Extrapolation der Körpermasse zwischen den täglichen Wägungen berechnet.

## 2.5. Futteraufnahme

Zur Bestimmung der Futteraufnahme von Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten, wurden diese einmal täglich am Ende der Lichtphase mit einer über dem täglichen Bedarf liegenden Futtermenge versorgt. Durch Rückwiegen der verbliebenen Futtermenge am darauffolgenden Tag wurde die Futtermenge ermittelt, welche die Tiere innerhalb von 24 h zu sich genommen hatten.

Den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, wurde täglich am Ende der Lichtphase eine Futtermenge zur Verfügung gestellt, die ca. 80% des normalerweise aufgenommenen täglichen Bedarfes entsprach. Dieser Bedarf war für die Tiere im Vorfeld dadurch ermittelt worden, daß ihnen über einen Zeitraum von ca. 14 Tagen vor Versuchsbeginn Futter *ad libitum* zur Verfügung gestellt wurde. Obwohl die Tiere in der Regel die angebotene Futtermenge bereits innerhalb von 4 h nach dem Fütterungszeitpunkt vollständig verzehrt hatten, wurde die Futteraufnahme am nächsten Tag kontrolliert und ggf. zurückgerechnet. Die Limitierung des Futterangebotes mußte so gewählt werden, daß einerseits die Tiere zur Einhaltung energiesparender Torporperioden veranlaßt wurden, andererseits aber eine Abnahme der Körpermasse vermieden wurde.

## 2.6. Körperzusammensetzung

Zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurden die Tiere am Ende der Versuche zunächst für wenige Sekunden mit CO<sub>2</sub> betäubt, dekapitiert und das Blut aufgefangen. Magen und Darm wurden entfernt, um den Energiegehalt von im Magen-Darm-Trakt befindlicher unverdauter Nahrung bzw. Kot bei der Messung der Körperzusammensetzung auszuschließen. Weiterhin wurde durch einen Einschnitt die Blase entleert, um einen Einfluß von Urin auf die Bestimmung des Körperwassergehaltes der Tiere auszuschließen. Durch Wiegen der verbliebenen Körpermasse wurde zunächst die Feuchtmasse der Tiere ermittelt, wobei die Menge des gewonnenen Blutes, ebenfalls durch Wägung bestimmt, zur Feuchtmasse addiert wurde.

Nach Trocknung bis zur Gewichtskonstanz bei ca. 75°C in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) ergab sich aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockenmasse die Körperwassermenge. Anschließend wurden die so getrockneten Körper in einem Extraktionsapparat nach Soxhlet (Merck-Eurolab, Frankfurt) mittels Chloroform-Extraktion entfettet. Sie wurden dazu in Papier eingepackt, um den Verlust von Körpertrockenmasse während des Extraktionsprozesses zu verhindern. Zur Entfettung wurde in einem Rundkolben Chloroform durch Erhitzen über dessen Siedepunkt (> 86°C) verdampft. Der Chloroformdampf wurde über ein Glasrohr in einen durch Wasser gekühlten Gegenstromkühler geleitet, worin das Chloroform kondensierte. Dieses wieder verflüssigte Chloroform tropfte anschließend in den Glaszylinder, in dem sich die getrockneten Körper zur Fettextraktion befanden. Das Chloroform löste dabei das Körperfett aus den Tierkörpern. Ein Überlaufrohr leitete das nun fetthaltige Chloroform in den Rundkolben zurück, in dem bei erneuter Verdampfung des Chloroforms das extrahierte Körperfett aufgrund eines höheren Siedepunktes retiniert wurde. Eine komplette Entfettung der Tierkörper wurde innerhalb <24 h erreicht. Nach 24 h war das die Tierkörper im Extraktionszylinder umgebende Chloroform völlig klar. Nach anschließender Abdampfung des Chloroforms und erneuter Trocknung im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz wurde durch Wiegen die fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat-free dry-mass) sowie der Körperfettgehalt als Differenz zur Trockenmasse vor der Extraktion bestimmt.

## **2.7. Plasmaleptinspiegel**

### **2.7.1. Gewinnung von Blutplasma**

Zur Bestimmung des Leptingehaltes wurde das nach der Dekapitierung gewonnene Blut im Sammelgefäß in Heparin-Lösung (Liquemin 5000<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) aufgenommen, um die Gerinnung des Blutes zu vermeiden. Das eingesetzte Flüssigkeitsvolumen wurde in einem Verhältnis von ca. 1:10 vorgelegt, wobei der eigentliche Verdünnungsfaktor anschließend nach Wägung des Blutes genau ermittelt wurde. Dieser Verdünnungsfaktor durch die Heparin-Lösung wurde später bei der Berechnung des eigentlichen Leptingehaltes des Blutes berücksichtigt.

Die so gewonnenen Blutproben wurden sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Blut bei 4°C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert, um das Plasma von den festen Bestandteilen des Blutes zu trennen. Das als Überstand erkennbare klare Plasma wurde in für die Bestimmung geeignete Volumina aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### **2.7.2. Radioimmunoassay**

#### **2.7.2.1. Prinzipielle Wirkungsweise**

Radioimmunoassays (RIA) dienen der quantitativen Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten wie etwa Blutplasma. Bei dem hier beschriebenen RIA handelt es sich allgemein um einen sog. Liganden-Bindungsassay, der auf einer hochaffinen Antigen-Antikörperreaktion basiert. Dabei dient das im Blutplasma enthaltene Hormon – in diesem Fall Leptin – bei einer immunologischen Reaktion als Antigen. Einem definierten Volumen an Blutplasma, in dem die zu bestimmende Menge an Antigen enthalten ist, wird wiederum eine definierte Menge eines hochspezifischen Antikörpers ( $\gamma$ -Immunglobulin, IgG) zugegeben. Die Antikörper bilden mit dem Hormon einen sog. Antigen-Antikörper-Komplex. Nach einer Inkubationszeit wird zu den gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexen eine definierte Menge an radioaktiv, z.B. mit einem  $\gamma$ -Emitter, markiertem Antigen (Radioligand, „Tracer“) zugegeben, welches bis auf die Markierung dem zu quantifizierenden Antigen entspricht. Im Plasma kommt es nun zu einer



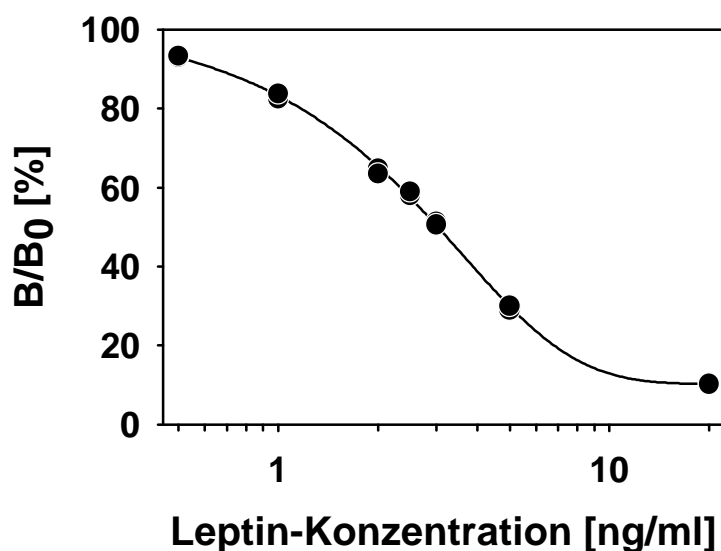
Austauschreaktion, wobei die bereits gebundenen Antigene und die radioaktiv markierten Antigene kompetitiv um die Bindungsstellen an den Antikörpern konkurrieren, d.h. radioaktiv markiertes Antigen verdrängt zum Teil nicht-markiertes Antigen von den Bindungsstellen des Antikörpers. Nach einer gewissen Inkubationszeit hat sich ein Bindungsgleichgewicht – entsprechend der jeweils primär vorliegenden Antigenkonzentrationen – eingestellt. Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Eiweißfällung mit einem Reagenz („precipitating reagent“) vom Überstand abgetrennt. Im Präzipitat läßt sich mittels eines  $\gamma$ -Counters die Radioaktivität der mit markiertem Antigen gebildeten Komplexe quantitativ bestimmen.

Zur Bewertung der gemessenen Radioaktivität sind im Normalfall drei Kontrollansätze notwendig. Die sog. To-Probe enthält lediglich die Menge an radioaktiv markiertem Tracer, die bei allen Proben eingesetzt wird. Diese Probe wird als einzige nicht präzipitiert und gibt somit die eingesetzte Menge an Radioaktivität an. Eine weitere Probe, die neben Tracer noch Lösungspuffer enthält, jedoch noch keinerlei Antikörper, zeigt nach Präzipitierung die Menge der unspezifischen Bindungen (NSB) des Tracers im Probensystem (z.B. an Gefäßwandungen) an. Der auf Basis dieser beiden Kontrollansätze ermittelte NSB/To-Faktor wird bei der Bestimmung der Radioaktivität der Proben berücksichtigt und sollte unter 5% liegen. Weitere Proben, die darüber hinaus eine definierte Menge an Antikörper enthalten, zeigen nach Präzipitierung die maximale Bindungsfähigkeit des Tracers und damit die höchstmögliche Radioaktivität bei den anschließenden Messungen an ( $B_0$ ). Dabei wird die Menge an Tracer üblicherweise so gewählt, daß etwa 50% der Antikörper mit Tracer abgesättigt sind.

Die Eichung des Assays erfolgt mittels Standardproben, denen, ausgehend von  $B_0$  (=100%), definierte Mengen von unmarkiertem Antigen in steigender Dosierung zugegeben werden. Dies führt unter identischen Inkubationsbedingungen zu einer dosisabhängig verminderten Bindung des Radioliganden an den Antikörper. Anhand der durch Doppelbestimmung aus diesen Standardansätzen erstellten Eichkurve (Abbildung 2) lassen sich dann die unbekanntes Antigenkonzentrationen der Plasmaproben ermitteln.

### 2.7.2.2. Radioimmunoassay zur Bestimmung des Leptingehaltes

Zur Bestimmung des Leptingehaltes im Plasma wurde ein Standard-Kit (Linco Maus-Leptin-RIA-Kit) verwendet. Alle benötigten Reagenzien sowie die Plasmaproben wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Zu je 100  $\mu\text{l}$  Plasma wurden 100  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer sowie 100  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h bei 4°C wurden die Proben mit 100  $\mu\text{l}$  Tracer (radioaktiv markiertes [ $^{125}\text{I}$ ]-Maus-Leptin) versetzt und anschließend für weitere 24 h bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 1 ml „precipitating reagent“ während einer 20-minütigen Inkubation bei 4°C ausgefällt. Die Proben wurden anschließend für weitere 20 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und die verbliebenen Pellets zur quantitativen Bestimmung der gebundenen Radioaktivität in den  $\gamma$ -Counter (Berthold Gamma-Probenwechsler LB 951G, Deutschland) gegeben. Anhand einer Eichkurve (Abbildung 2), die auf der Doppelbestimmung sieben verschiedener Leptinstandards basierte, konnte die Leptinkonzentration in ng/ml Plasma ermittelt werden.



**Abbildung 2:** Beispiel einer Eichkurve eines RIAs, die durch Doppelbestimmungen definierter muriner Leptin-Standards ermittelt wurde und die zur Bestimmung von Leptin-Konzentrationen in den zu untersuchenden Plasmaproben benötigt wird. Durch die semilogarithmische Darstellung ergibt sich eine sigmoide Kurve, die im mittleren Bereich annähernd linear verläuft.

Bei den mitgemessenen Kontrollansätzen lag der ermittelte  $B_0/To$ -Wert, wie vorgeschrieben, zwischen 40 und 50%. Der  $NSB/To$ -Wert lag in allen durchgeführten RIAs, wie erforderlich, unter 5%.

Für alle Tiere wurden mindestens zwei Messungen durchgeführt, die nicht alle im gleichen RIA erfolgen konnten. Deshalb wurde durch die mehrfache Messung von Pool-Proben in jedem RIA die Interassay-Variabilität ermittelt. Sowohl die Interassay-Variabilität als auch die Intraassay-Variabilität lagen unter 5%.

## **2.8. Behandlung mit rekombinantem Leptin**

Für alle Versuche wurde rekombinantes murines Leptin (His<sub>6</sub>-tagged Leptin, 166 Bp) verwendet, welches von der Firma Aventis (ehem. Hoechst Marion Roussel), Frankfurt, hergestellt und freundlicherweise für die Versuche zur Verfügung gestellt wurde. Das Peptid lag bereits in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH ~ 7,4) gelöst vor und wurde bis zur Verwendung bei -80°C in gefrorenem Zustand in geeigneten Aliquots gelagert. Bei der Verwendung unterschiedlicher Dosierungen wurde die Leptinlösung entsprechend den verwendeten Konzentrationen mit PBS verdünnt. Die Kontrolltiere erhielten den Phosphat-Puffer in gleichen Volumina (2,5 - 5 µl/g Körpermasse). Die Injektionen erfolgten subcutan (s.c.) im Nacken der Tiere.

Mit Ausnahme von Versuchsserie I (s.u.) erfolgten die Injektionen zweimal täglich im Abstand von 12 h, etwa 3 h nach Beginn der Lichtphase und 5 h nach Beginn der Dunkelphase. Diese Zeiten wurden so gewählt, daß die Injektionen, die zu Beginn der Lichtphasen durchgeführt wurden, nach Beendigung etwaiger Torporperioden bei den Tieren erfolgten, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Die Injektionszeiten während der Dunkelphasen lagen innerhalb der Aktivitätsphasen der Tiere.

## **2.9. Versuchsserien**

Alle Versuchsserien begannen mit einer mehrwöchigen Eingewöhnung der Tiere (=Vorbereitungsperiode).

### **2.9.1. Versuchsserie I: Futter *ad libitum*, eintägige Behandlung**

In Versuchsserie I wurde eine Versuchsgruppe, bestehend aus acht Tieren, verwendet, um zunächst in Kurzzeitversuchen die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen einer eintägigen Behandlung mit Leptin und der Futteraufnahme von *ad libitum* gefütterten Tieren zu ermitteln. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Verteilung der Tagesdosis auf mehrere Injektionen einen anderen Einfluß auf die Futteraufnahme hat, als wenn die gesamte Tagesdosis auf einmal verabreicht wird. Nach drei Tagen Vorlauf ohne Behandlung wurde jeweils der Hälfte der Tiere an einem Tag Leptin in unterschiedlichen Dosen ( $10 - 1200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) in ein, zwei oder vier Portionen injiziert. Wenn mehr als eine Injektion an einem Tag erfolgte, wurde die erste der Injektionen stets zu Beginn der Lichtphase verabreicht, die folgenden Injektionen folgten dann im Abstand von 12 h (bei zwei Injektionen) bzw. 6 h (bei vier Injektionen). Wurde nur eine Injektion gegeben, erfolgte diese am Ende der Lichtphase. Die verschiedenen Dosen wurden in 1 - 5 Versuchsdurchgängen getestet. Dabei erfolgten die Versuchsdurchgänge in einem Abstand von mindestens drei Tagen, wobei die Zuordnung der Tiere zu der Leptin- und Kontroll-Behandlungsgruppe randomisiert gewechselt wurde.

### **2.9.2. Versuchsserie II: Futter *ad libitum*, dreitägige Behandlung**

In Versuchsserie II wurde eine Versuchsgruppe von sieben Tieren verwendet, um während einer dreitägigen Leptinbehandlung neben dem Einfluß von Leptin auf die Futteraufnahme auch den Einfluß auf die MR von Tieren zu untersuchen, die Futter *ad libitum* erhielten. Aufgrund der Ergebnisse aus Versuchsserie I konnte die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung auf drei Leptindosen (20, 100 und 600  $\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) beschränkt werden, die jeweils verteilt auf zwei Portionen injiziert wurden. Jede der drei Dosierungen wurde zweimal in zufälliger Reihenfolge getestet, wobei die Zuteilung der Tiere zu der jeweiligen Behandlungsgruppe (Leptin oder Kontrolle) gewechselt wurde, so daß jedes Tier bei jeder Dosierung einmal als Kontrolltier und einmal als Testtier diente. Der Abstand zwischen zwei Injektionsperioden betrug dabei mindestens sechs Tage.

### 2.9.3. Versuchsserie III: Futter limitiert, dreitägige Behandlung

In Versuchsserie III wurde eine Versuchsgruppe von sieben Tieren verwendet, um während einer dreitägigen Leptinbehandlung die Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Futteraufnahme und die MR bei Tieren zu ermitteln, die lediglich eine limitierte Futtermenge erhielten. Dabei entsprach die angebotene Futtermenge von ca. 2,5 g etwa 70% der in Versuchsserie II von den *ad libitum* gefütterten Tieren aufgenommenen Futtermenge. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zur Versuchsserie II.

### 2.9.4. Versuchsserie IV: Futter *ad libitum*, zehntägige Behandlung

Um die Wirkung von Leptin auf die Körperzusammensetzung erfassen zu können, wurde in dieser Versuchsserie an drei Versuchsgruppen mit je sieben Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten, die Wirkung einer zehntägigen Leptinbehandlung mit einer Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  untersucht. Dabei dienten jeweils 3 - 4 Tiere als Kontroll-Behandlungsgruppe und die anderen als Leptin-Behandlungsgruppe. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte anhand der Körpermassen und der Futteraufnahmen während der letzten fünf Tage vor Behandlungsbeginn (Vorlauf), so daß die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen anfangs minimal waren. Die tägliche Futteraufnahme wurde in dieser Versuchsserie bei allen Tieren, sowie die MR bei zwei der drei Versuchsgruppen ermittelt. Die Tiere wurden 8 – 10 h nach der letzten Injektion am Anfang der Lichtphase getötet, um die Körperzusammensetzung und den Plasmaleptinspiegel zu bestimmen.

### 2.9.5. Versuchsserie V: Futter limitiert, zehntägige Behandlung

In Versuchsserie V wurde an drei Versuchsgruppen mit je sieben Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, analog zu Versuchsserie IV die Wirkung einer zehntägigen Leptinbehandlung mit einer Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  untersucht. Dabei entsprach die angebotene Futtermenge von ca. 2,9 g etwa 85% der in Versuchsserie IV von den *ad libitum* gefütterten Tieren aufgenommenen Futtermenge. In einer der drei Versuchsgruppen starben zwei Kontrolltiere als Folge eines technischen Defekts, so daß sich die Anzahl der ausgewerteten Tiere auf 19 reduzierte.

## **2.10. Auswertung**

Bei allen angewandten statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Wenn nicht anders angegeben, wurden die statistischen Berechnungen mit dem Programm SigmaStat (SPSS Cooperation, Chicago, USA) durchgeführt. Zur Ermittlung von Korrelationskoeffizienten wurden gängige Standardverfahren zur Bestimmung von Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate herangezogen. Sind Konfidenzintervalle dargestellt, so begrenzen diese den Bereich, in dem die Regressionsgerade mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegt. Bei Regressionsgeradenvergleichen wurden mittels eines hauseigenen Programmes zunächst die Regressionsgeraden auf Parallelität geprüft und anschließend auf Unterschiede im y-Achsenabschnitt (Brownlee 1965) untersucht.

### **2.10.1. Versuchsserie I**

In Versuchsserie I wurde für jeden Tag eines Versuchsdurchganges zunächst die Differenz in der Futteraufnahme von Leptin- und Kontroll-Behandlungsgruppe gebildet. Aus diesen Differenzen wurden dann Mittelwerte ( $\pm$  SEM) für alle Versuchsdurchgänge mit gleicher Dosis berechnet. Weiterhin wurde mit den Differenzwerten für den Tag nach der eintägigen Behandlung eine Regressionsanalyse zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung durchgeführt.

### **2.10.2. Versuchsserie II**

Da die graphische Auswertung zeigte, daß die Variabilität der Meßwerte der gleichen Tiere zwischen verschiedenen Versuchsdurchgängen mit gleicher Behandlung größer war als die Variabilität bei gleich behandelten Tieren im selben Versuchsdurchgang, wurden zur quantitativen Auswertung für jeden Tag die Differenzen zwischen den Werten jedes mit Leptin behandelten Tieres und dem Mittelwert seiner Kontrolltiere im betreffenden Versuchsdurchgang berechnet. Aus diesen Differenzwerten wurden dann für jede Dosierung die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) bestimmt und zur Darstellung der Effekte der Leptinbehandlung verwendet. Außerdem wurde die Differenz in der kumulativen Futteraufnahme während der dreitägigen Behandlungsperioden analog ausgewertet. Die

Auswertung von Körpermasse und MR basierte auf entsprechenden Differenzbildungen zum Mittelwert der Kontrolltiere. Für die Körpermasse wurden dabei die Unterschiede zwischen dem Mittelwert über drei Vorlaufstage zum Wert am Tag nach der Behandlung ausgewertet. Für die MR wurden für jeden der drei Behandlungstage die mittleren Unterschiede des Gesamtenergieumsatzes zum Mittel der gleichzeitig mit PBS behandelten Kontrolltiere ermittelt. Die Signifikanz der Korrelationen zwischen den Differenzwerten zum Kontrollmittel und dem Logarithmus der Leptin-Dosis wurde durch einseitige Tests ermittelt, da die Richtung der durch Leptin verursachten Wirkungen bekannt war: negativ für die Futteraufnahme und Körpermasse und positiv für die MR (Halaas et al. 1995, Pelleymounter et al. 1995, Stehling et al. 1996).

### **2.10.3. Versuchsserie III**

#### **2.10.3.1. Übersicht**

Die Auswertung erfolgte prinzipiell wie bei Versuchsserie II beschrieben. Zusätzlich wurden für die Versuchsserie III die Häufigkeitsverteilung und die täglichen Minima und Maxima der massenspezifischen MR, wie unten beschrieben, bestimmt. Die statistische Auswertung der Dosisabhängigkeit der Extremwerte der massenspezifischen MR erfolgte wie für den Gesamtenergieumsatz in Versuchsserie II beschrieben.

#### **2.10.3.2. Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der Meßwerte für die massenspezifische MR**

In Versuchsserie III wurde die Häufigkeitsverteilung der massenspezifischen MR im Bereich von 1-40 W/kg ausgewertet, wobei die auf ganze Zahlen gerundeten Meßwerte Klassen von 1 W/kg zugeteilt wurden. Dabei wurden die gesamten Meßwerte aller Tiere (N=7) verwendet und getrennt nach Behandlungstyp (drei Leptindosen und PBS) ausgewertet. Für jede der drei Leptin-Dosierungen sowie die Kontrollbehandlung wurde die Häufigkeit des Auftretens einzelner Meßwerte prozentual zur Gesamtheit aller Werte innerhalb der ausgewerteten Zeitperiode (=100%) dargestellt. Zum Vergleich wurden die Werte aus den drei Tagen Vorlauf für jede der Behandlungsarten in gleicher Weise dargestellt.

### **2.10.3.3. Bestimmung der täglichen Minima und Maxima der massenspezifischen MR**

In Versuchsserie III erfolgte außerdem die Bestimmung der täglichen Minima und Maxima der massenspezifischen MR jeweils in drei 24 h-Perioden, und zwar zunächst ohne Behandlung (Vorlauf) und anschließend während der Behandlung mit Leptin bzw. PBS. Zunächst wurden zur Kurvenglättung für jedes Tier gleitende Mittelwerte über jeweils fünf aufeinanderfolgende Meßwerte gebildet. Voraussetzung für die Bildung eines Mittelwertes war dabei, daß diese fünf Meßwerte innerhalb eines 4 h-Meßintervalles lagen, d.h. daß keine längeren Unterbrechungen der sequentiellen Messung des Sauerstoffverbrauches zwischen diesen Meßwerten stattgefunden hatten. Um zu verhindern, daß die gesuchten Extremwerte genau auf den Anfang bzw. das Ende der auszuwertenden 24 h-Periode fielen, erfolgte, wie in früheren Untersuchungen an jungen Ratten (Dissertation Nüßlein 1992), die Bestimmung der Minima in Perioden, die um 0<sup>o</sup> Uhr begannen und die Bestimmung der Maxima in Perioden, die um 12<sup>o</sup> Uhr begannen.

### **2.10.4. Versuchsserie IV und V**

Zunächst wurde zur graphischen Darstellung des Verlaufs von Futteraufnahme, Körpermasse und Energieumsatz in den beiden Versuchsserien für jede der drei Versuchsgruppen an jedem Tag des fünftägigen Vorlaufs und der zehntägigen Behandlungsperiode die Differenz zwischen den Mittelwerten der Leptin-Behandlungsgruppe und der Kontroll-Behandlungsgruppe bestimmt. Außerdem wurden für diese Versuchsserien auch die Mittel der Absolutwerte dieser Größen im Vorlauf und in der Behandlungsperiode berechnet. Auf Grund der Variabilität zwischen den Versuchsgruppen wurde die Versuchsgruppe als Faktor neben dem Behandlungstyp bei der statistischen Auswertung und zur Ermittlung von gewichteten Mittelwerten mittels zweifaktorieller Varianzanalyse berücksichtigt. Da nur die gleichzeitig erhobenen Daten mit Ausnahme der Behandlung unter identischen Bedingungen ermittelt wurden, erfolgte die Auswertung von Versuchsserien IV und V dabei zunächst getrennt und separat für Vorlauf und Behandlungsperiode. Für die Futteraufnahme und die MR stellten die Vorlaufwerte Mittelwerte über fünf Tage dar. Bei der Berechnung der Mittelwerte für die Behandlungsperiode wurde der erste Tag der Behandlung als Übergangstag nicht



berücksichtigt. Folglich gingen nur neun der zehn Behandlungstage in die Kalkulation ein. Für die Beurteilung der Leptinwirkung auf die Körpermasse wurden die Werte am letzten Tag des Vorlaufes und am letzten Tag der Behandlungsperiode in gleicher Weise mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse analysiert. Die Daten aus der Bestimmung der Körperzusammensetzung wurden ebenfalls unter Berücksichtigung der Versuchsgruppe einer zwei-faktoriellen Varianzanalyse unterzogen.

Auf einen statistischen Vergleich der Absolutwerte zwischen den beiden Versuchsserien wurde verzichtet, weil sie zeitlich getrennt und nicht in den gleichen Versuchsgruppen erhoben worden waren. Stattdessen wurden die prozentualen Änderungen der gemessenen Parameter in den beiden Versuchsserien ermittelt, um in den beiden Serien den Vergleich der Ausgangswerte zu ermöglichen.

Zum abschließenden statistischen Vergleich der Leptineffekte unter beiden Fütterungsbedingungen wurde nach Differenzbildung zum eigenen Vorlauf für jedes Tier der Unterschied zum Mittelwert der entsprechenden Kontrolltiere berechnet. Dabei wurde im Falle der täglich erhobenen Daten des Sauerstoffverbrauches und der Futteraufnahme zunächst für jedes einzelne Tier der Unterschied zwischen seinem 24 h-Mittel aus dem fünftägigen Vorlauf und seinem 24 h-Mittel aus dem neuntägigen Behandlungszeitraum berechnet. Anschließend wurden die so ermittelten Werte für die mit Leptin behandelten Tiere als Differenzen zum Mittel ihrer Kontrolltiere ausgedrückt. Für die Fettmasse, FFDM und Feuchtmasse, für die nur Werte am Versuchsende ermittelt werden konnten, wurde für jedes mit Leptin behandelte Tier die Differenz zum Mittelwert der Kontrolltiere seiner Versuchsgruppe berechnet. Da durch diese Differenzbildung Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ausgeglichen werden konnten, konnten diese Daten mittels t-Test auf ihre Signifikanz gegen Null getestet werden.

### 3. Ergebnisse

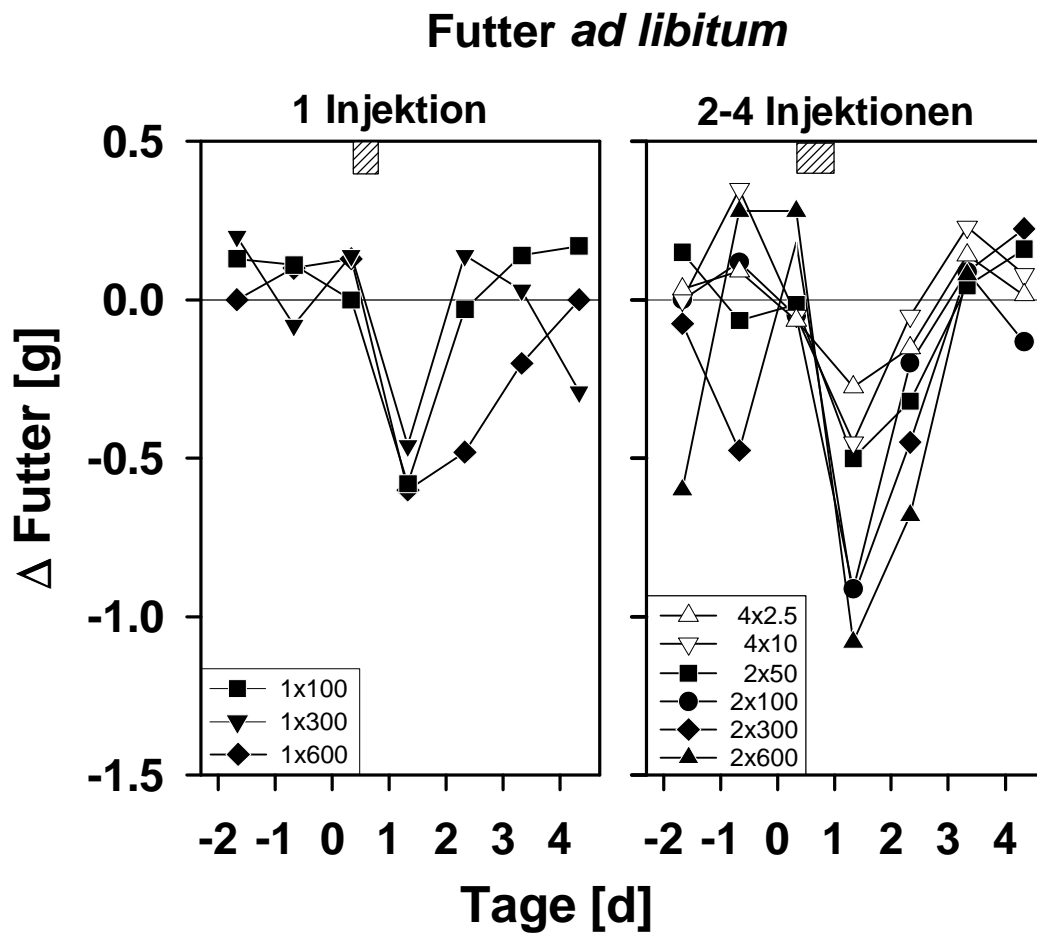
#### 3.1. Wirkung einer Kurzzeitbehandlung mit Leptin auf die Futteraufnahme

##### 3.1.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung bei einer eintägigen Behandlung bei Futter *ad libitum*

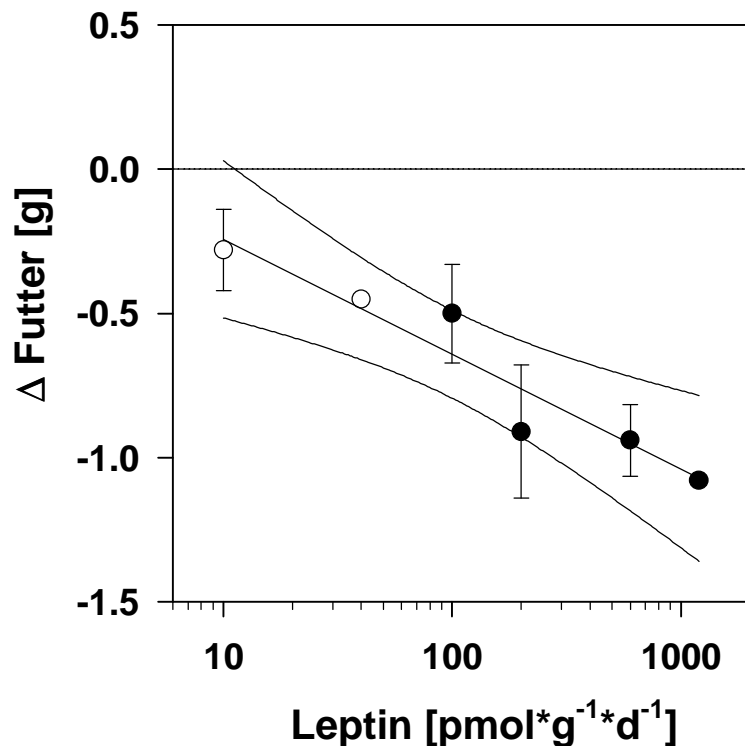
Um die wirksame Dosis für Langzeitbehandlungen zu ermitteln, wurden bei einer Versuchsgruppe, die Futter *ad libitum* erhielt, zunächst Leptinbehandlungen über einen Tag durchgeführt (Versuchsserie I). Dabei wurde untersucht, ob die Verteilung der Tagesdosis auf mehrere Injektionen einen Einfluß auf die Reaktionen hat. In Abbildung 3 wird für verschiedene Dosierungen der durchschnittliche Unterschied in der täglichen Futteraufnahme zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrolltieren gezeigt. Bereits bei einer einmaligen Behandlung mit Leptin wird dabei eine Hemmung der Futteraufnahme deutlich, eine Dosisabhängigkeit ist jedoch nicht klar erkennbar.

Wurden zwei Injektionen pro Tag jeweils am Beginn und am Ende der Lichtphase gegeben oder sogar die Tagesdosis auf insgesamt vier Injektionen (im Abstand von sechs Stunden) verteilt, so war die Wirksamkeit insbesondere bei den höheren Dosierungen größer, als wenn die gleiche Dosis auf einmal gegeben wurde. Außerdem war bei Verteilung auf zwei Injektionen auch bei niedriger Dosierung noch eine deutliche Nachwirkung am folgenden Tag, also mehr als 24 h nach der letzten Injektion, erkennbar.

In Abbildung 4 ist die Dosis-Wirkungskurve für mehrmalige Injektionen gezeigt. Dabei wird deutlich, daß zumindest bei niedrigen Dosierungen bei einer Verteilung der Tagesdosis auf vier Injektionen keine deutlich größere Wirksamkeit auftrat, als wenn die Tagesdosis verteilt auf zwei Injektionen gegeben wurde. Deshalb wurde eine gemeinsame Regression ermittelt. Die minimale effektive Tagesdosis lag offenbar bei der Verteilung auf vier Injektionen in der Nähe von  $10 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Um jedoch möglichst deutliche Effekte zu erzielen, wurden für die weiteren Versuche Dosierungen zwischen 20 und  $600 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , verteilt auf zwei Injektionen, verwendet.



**Abbildung 3:** Mittlere Differenzen in der täglichen Futtermittelaufnahme zwischen vier mit Leptin behandelten Tieren und vier Kontrolltieren aus einer Versuchsgruppe, die Futter *ad libitum* erhielt. Gezeigt sind die Veränderungen der Futtermittelaufnahme in Reaktion auf eine (links) bzw. 2-4 Injektionen (rechts) innerhalb eines Tages (Tag 0) nach einer Vorlaufperiode von drei Tagen. Die Datenpunkte sind in der Mitte der Zeitintervalle angegeben, in denen die Messung der Futtermittelaufnahme erfolgte. Es wurden zwischen 1 und 5 Versuchsdurchgänge pro Dosis durchgeführt (SEM sind zum Zweck der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Die schraffierten Balken markieren die Zeitspannen, in denen die Injektionen erfolgten.

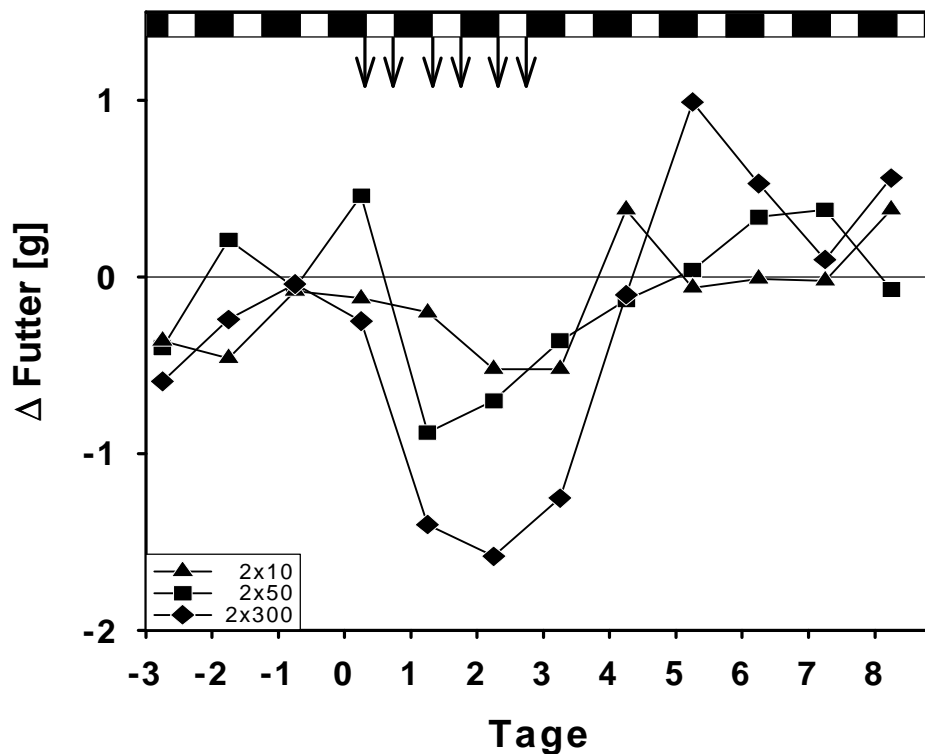


**Abbildung 4:** Dosisabhängige Veränderung der Futteraufnahme bei Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten, in einer 24 h-Periode nach der Behandlung mit Leptin, bei der die Tagesdosis verteilt auf 2 Injektionen (●) bzw. 4 Injektionen (○) verabreicht wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Differenzen in der Futteraufnahme von jeweils vier mit Leptin behandelten Tieren und jeweils vier Kontrolltieren aus mehreren Versuchsdurchgängen (N=4-5) pro Dosis sowie Regressionen mit 95% Konfidenzintervallen für die Werte der einzelnen Versuchsdurchgänge. Bei den ohne SEM dargestellten Werten wurde nur ein Versuchsdurchgang durchgeführt.

### 3.1.2. Abhängigkeit des Effektes einer dreitägigen Leptinbehandlung auf die Futteraufnahme vom Nahrungsangebot

Bei einer dreitägigen Behandlung mit zwei Injektionen pro Tag bei Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten (Versuchsserie II), zeigte sich ebenfalls eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung im Bereich zwischen 20 und 600 pmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (Abbildung 5). Da die Futteraufnahme der Tiere in der Regel während der Aktivitätsphase erfolgte, ließ sich am ersten Tag der Behandlung noch kein Effekt feststellen, da die erste Injektion am Beginn

der Lichtphase und somit erst im Anschluß an die Aktivitätsphase der laufenden Futtermeßperiode erfolgte. Entsprechend dieser zeitlichen Verschiebung am Anfang trat in der Futtermeßperiode nach Ende der Injektionen (Tag 4) noch ein deutlicher Effekt auf. Bei der dreitägigen Behandlung war jedoch im Gegensatz zur eintägigen Behandlung keine Nachwirkung am darauffolgenden Tag mehr zu erkennen. Während die Kontrolltiere im Mittel etwa 10,5 g Futter (3,5 g/d) während der dreitägigen Behandlungsperiode aufnahmen, führte die Behandlung mit Leptin zu einer kumulativen Abnahme des Futterverbrauches um 1,3 g, 1,7 g bzw. 4,2 g mit steigender Dosierung ( $r=-0,73$ ,  $p<0,001$  für die Korrelation zwischen Änderung des Futterverbrauches und der Leptindosis).



**Abbildung 5:** Mittlere Differenzen in der täglichen Futteraufnahme zwischen sieben mit Leptin behandelten Tieren (20, 100 bzw. 600 pmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) und ihren jeweiligen Kontrolltieren vor, während und nach einer dreitägigen Behandlung bei Futter *ad libitum*. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils zwei Versuchsdurchgängen. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelphasen, die Pfeile die Zeitpunkte der Injektionen. Die Datenpunkte sind in der Mitte der Zeitintervalle dargestellt, in denen die Messungen der Futteraufnahme erfolgten (SEM sind zum Zweck der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

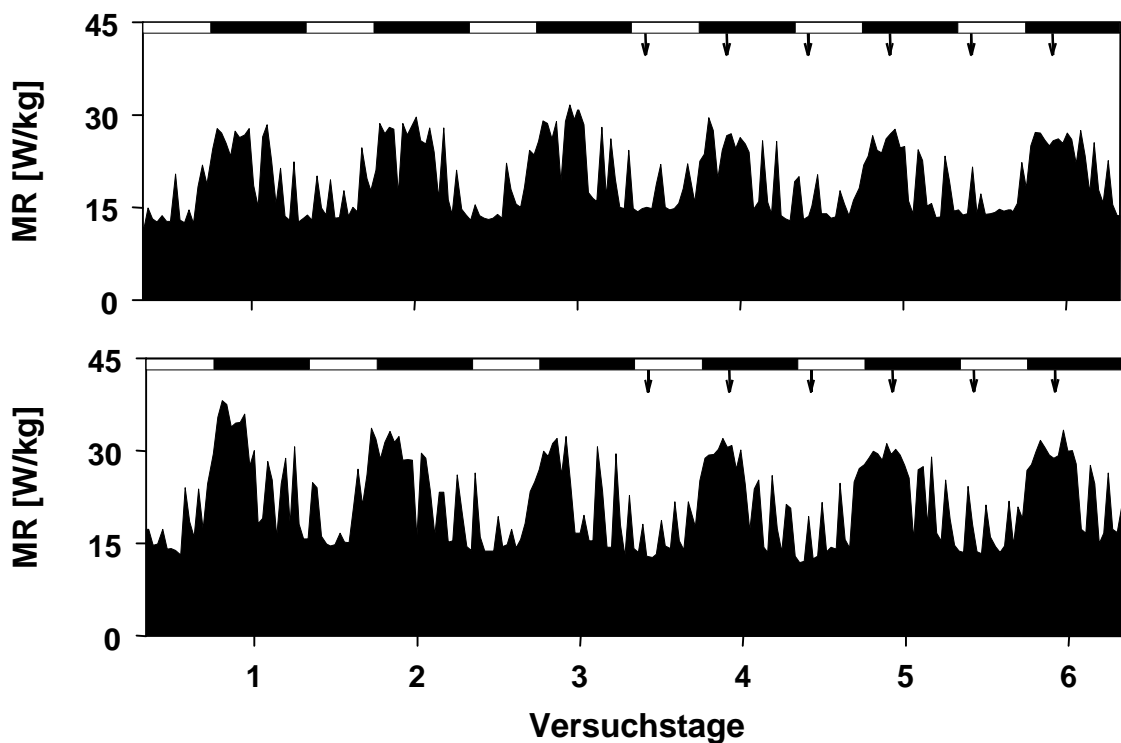
Wurde den Tieren dagegen über eine längere Zeit vor Versuchsbeginn täglich nur eine limitierte Futtermenge (2,3-2,5 g/d) verabreicht (Versuchsserie III), nahmen sie auch während der dreitägigen Behandlungsperiode immer das gesamte Futter auf. Dabei wurde das Futter sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit Leptin behandelten Tieren in der Regel innerhalb von 4 h nach Fütterung verzehrt. Bei der höchsten Leptindosierung war die Futteraufnahme der Tiere, die nur eine limitierte Futtermenge erhielten, somit deutlich größer als die bei den Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten. Die unveränderte Futteraufnahme unter Leptinbehandlung bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, beruht somit nicht darauf, daß die ihnen angebotene Futtermenge unterhalb derjenigen lag, die von mit Leptin behandelte Tieren spontan aufgenommen wurde.

### **3.2. Wirkung einer Kurzzeitbehandlung mit Leptin auf den Sauerstoffverbrauch**

#### **3.2.1. Abhängigkeit des Effektes einer dreitägigen Leptinbehandlung auf den Energieverbrauch vom Nahrungsangebot**

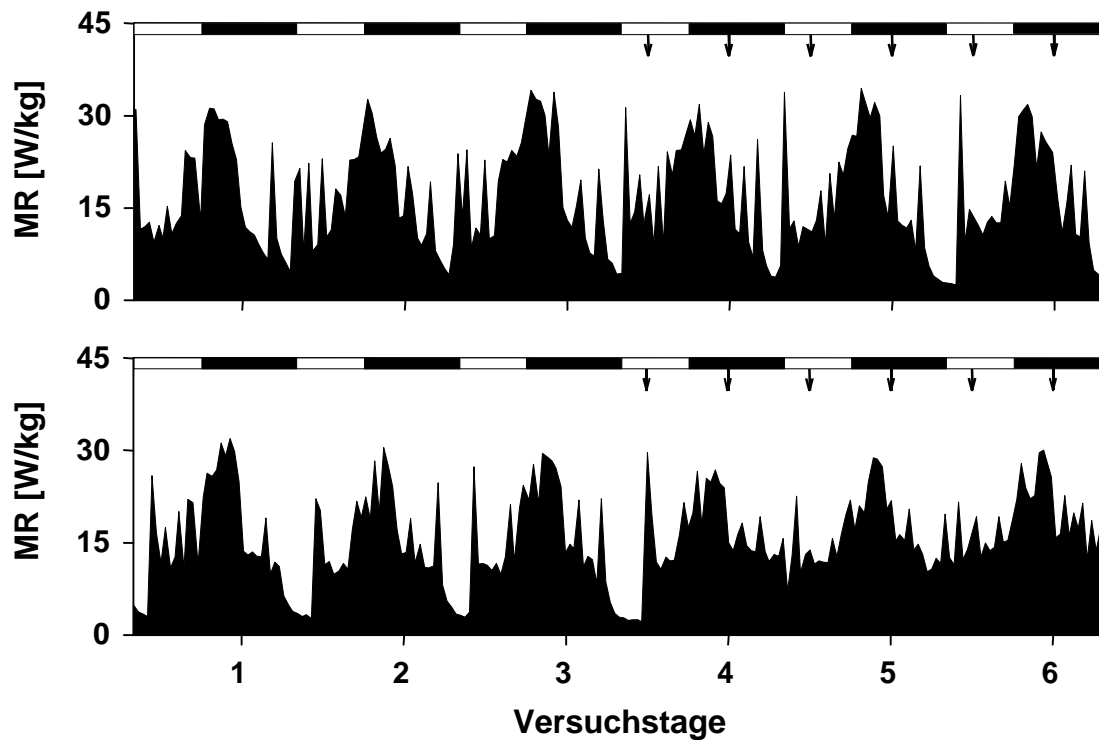
Neben der Futteraufnahme wurden in den Versuchsserien II + III die Wirkungen der Leptinbehandlung auf den Tagesgang des massenspezifischen Energieumsatzes im Vergleich sowohl zu den jeweiligen Kontrolltieren als auch zu den jeweils der Behandlung vorausgegangenen Tagen ermittelt. In Abbildung 6 sind exemplarisch Einzelverläufe des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches von je einem mit Leptin behandelten Tier und einem Kontrolltier dargestellt, die Futter *ad libitum* erhielten. Injektionen mit Leptin (2 x tgl.) über drei Tage bewirkten keinerlei Veränderungen weder im Vergleich zum Kontrolltier noch zum eigenen Vorlauf. Die morgendlichen Ruhewerte lagen etwas unter 15 W/kg, Werte von 10 W/kg wurden nicht unterschritten. Während der abendlichen Aktivitätsphasen wurden Werte um 30 W/kg erreicht.

In Abbildung 7 sind exemplarisch Einzelverläufe des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches von je einem mit Leptin behandelten Tier und einem Kontrolltier dargestellt, die beide eine limitierte Futtermenge erhielten. Diese Tiere zeigten gegenüber den *ad libitum* gefütterten Tieren eine deutlich stärkere Absenkung des Energieumsatzes während der Ruhephasen bis auf Werte unter 5 W/kg, ein Niveau, das deutlich unter dem von Hudson und Scott (1979) definierten kritischen Wert einer Stoffwechselabsenkung um mehr als 25% für Torporperioden lag. Vorversuche haben gezeigt, daß bei Absenkung des



**Abbildung 6:** Exemplarische Einzelverlaufsabbildung der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) von einem mit PBS behandelten Tier (oben) und einem mit Leptin behandelten Tier ( $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , unten), die beide Futter *ad libitum* erhielten. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelphasen, die Pfeile die Zeitpunkte der Injektionen.

Sauerstoffverbrauches in dieser Größenordnung die Körperkerntemperatur der Tiere auf  $34^{\circ}\text{C}$  und bei längerer Dauer sogar bis unter  $30^{\circ}\text{C}$  absank (Schmidt et al. 1997). Der Beginn dieser Stoffwechselabsenkungen unter das normale Ruheniveau erfolgte bereits in der zweiten Hälfte der Dunkelphase. Am Ende der Torporperioden kam es häufig zu einem stark überschießenden Anstieg der MR, bevor das normale Tagesniveau von etwas unter  $15 \text{ W/kg}$  eingestellt wurde. Dieses Niveau entsprach ungefähr dem Tagesniveau der *ad libitum* gefütterten Tiere. Bereits während des zweiten Teils der Lichtphase begann der Energieverbrauch anzusteigen und erreichte am Anfang der Dunkelphase ähnlich hohe Werte wie bei Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten.



**Abbildung 7:** Exemplarische Einzelverlaufsabbildung der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) von einem mit PBS behandelten Tier (oben) und einem mit Leptin behandelten Tier ( $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , unten), die beide eine limitierte Futtermenge erhielten. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelphasen, die Pfeile die Zeitpunkte der Injektionen.

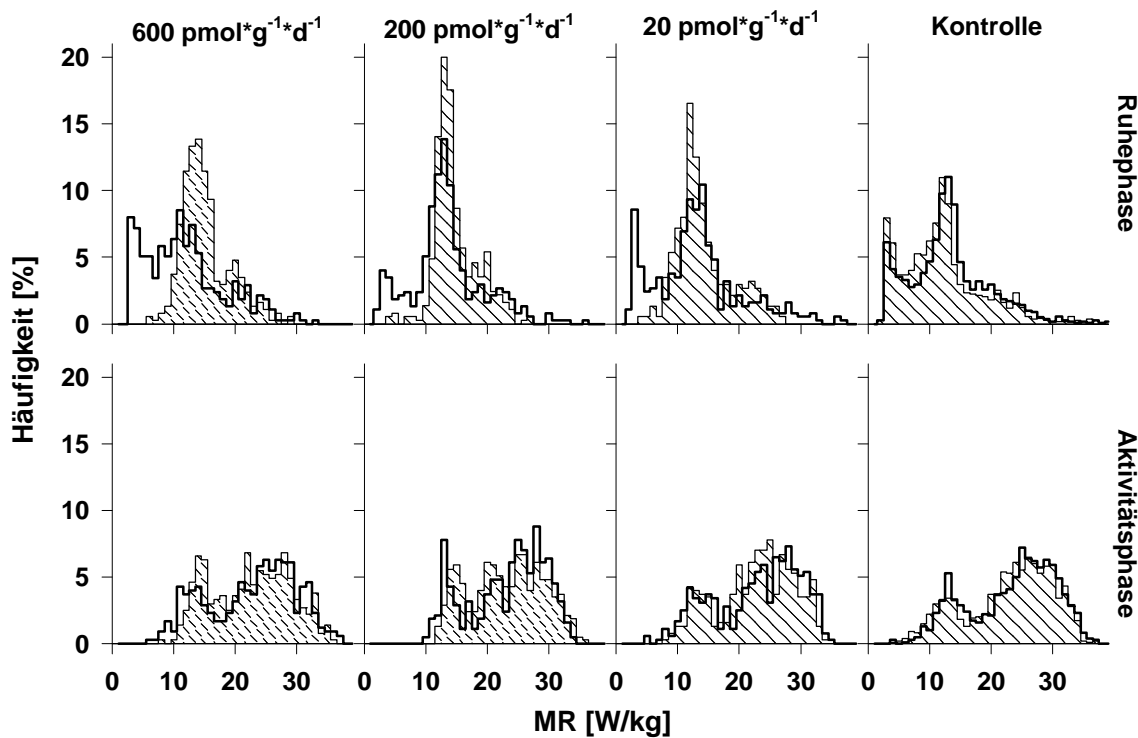
Obwohl Torporperioden nicht immer so regelmäßig auftraten, wie in dem in Abbildung 7 dargestellten Beispiel, zeigten alle Tiere vor den Behandlungen wiederholt, wenn auch nicht täglich, Absenkungen des Sauerstoffverbrauches gegen Ende der Dunkelphase bis auf unter  $5 \text{ W/kg}$ . Während die Kontrolltiere auch bei der Behandlung mit PBS diese Stoffwechselabsenkungen fortführten, waren sie bei den mit Leptin behandelten Tieren während der Behandlung aufgehoben. Ihre Ruhewerte entsprachen denen von Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten. Die Verbrauchswerte während der Aktivitätsphasen blieben jedoch durch die Leptinbehandlung völlig unbeeinflusst.



### 3.2.2. Häufigkeitsverteilung der Meßwerte der massenspezifischen MR bei limitiertem Futterangebot

In Abbildung 8 ist für die Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten (Versuchsserie III), die Häufigkeit des Auftretens einzelner Meßwerte prozentual zur Gesamtheit aller Werte aus den betreffenden Auswertungszeiträumen für die verschiedenen Behandlungen (drei Leptin-Dosierungen bzw. PBS) dargestellt. Zur besseren graphischen Auflösung ist die Häufigkeitsverteilung getrennt für den Zeitraum von 03:00 Uhr bis 15:00 Uhr (Ruhephase) sowie 15:00 Uhr bis 03:00 Uhr (Aktivitätsphase) dargestellt. Diese Einteilung erfolgte empirisch so, daß die täglichen Minima bzw. Maxima in allen Fällen im Bereich der gewählten zwölfstündigen Ruhe- bzw. Aktivitätsphasen auftraten. Innerhalb einer jeden Teilabbildung wird die Häufigkeitsverteilung der Meßwerte während der dreitägigen Behandlungsperioden mit der Häufigkeitsverteilung in den ebenfalls dreitägigen Vorlaufperioden verglichen. Eine solche Betrachtung ist sinnvoll möglich, weil es während der Leptinbehandlung von Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, zu keiner signifikanten Veränderung der Körpermasse kam (vgl. 3.3.4.).

Die Darstellung in Abbildung 8 zeigt deutlich, daß in der Ruhephase unter der Behandlung mit Leptin die MR nicht unter 5 W/kg absank und nur ein geringer Prozentsatz der Werte unter 10 W/kg lag, während vor der Behandlung eine größere Anzahl von Meßwerten unter 5 W/kg zu finden war. Diese Leptin-induzierte Verschiebung der Verteilung zu höheren Werten der MR ist bei jeder der drei Dosierungen erkennbar. In der Aktivitätsphase lagen nahezu alle Verbrauchswerte sowohl unter der Leptinbehandlung als auch im Vorlauf oberhalb von 10 W/kg; es ist im gesamten Spektrum der Energieverbrauchswerte kein Unterschied zwischen Behandlungsperiode und Vorlauf erkennbar. Dies gilt für jede der drei Dosierungen gleichermaßen. Bei der mit PBS behandelten Kontrollgruppe sind die Verteilungsmuster für die Behandlungsperiode und den Vorlauf sowohl in der Aktivitäts- als auch in der Ruhephase praktisch deckungsgleich. Somit läßt sich ausschließen, daß die subcutanen Injektionen an sich einen Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch hatten.



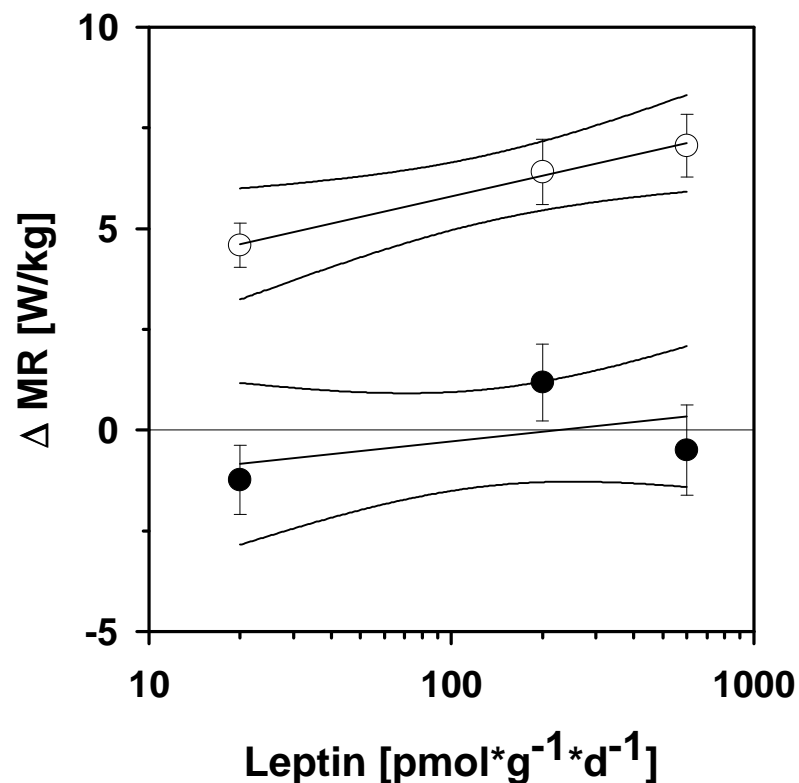
**Abbildung 8:** Häufigkeitsverteilung aller Meßwerte (2,5 min-Mittel) der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) von sieben Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Gezeigt ist die Verteilung auf Intervalle von 1 W/kg für alle Meßwerte aus den jeweils dreitägigen Vorlaufperioden (weiße Flächen, dicke Linien) und Behandlungsperioden (schraffierte Flächen) bei verschiedenen Leptindosierungen sowie bei der Kontrollbehandlung mit PBS. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Häufigkeitsverteilungen getrennt für 12 h-Perioden dargestellt, die das tägliche Minimum (Ruhephase, 03<sup>oo</sup> - 15<sup>oo</sup> Uhr) bzw. Maximum (Aktivitätsphase, 15<sup>oo</sup> - 03<sup>oo</sup> Uhr) umfaßten.

### 3.2.3. Leptineffekt auf das tägliche Minimum jedoch nicht auf das Maximum der massenspezifischen MR bei limitiertem Futterangebot

Für alle Tiere aus Versuchsserie III wurden die fünf höchsten und niedrigsten aufeinander folgenden Meßwerte des Sauerstoffverbrauchs für jeden Versuchstag bestimmt. Bei Betrachtung aller so ermittelten täglichen Minima des Energieumsatzes zeigt sich, daß bei einer Leptinbehandlung lediglich 14% der Werte unter 10 W/kg lagen und keiner der Werte unter 5 W/kg. Im Gegensatz dazu lagen 78% der Minimumwerte der mit PBS

behandelten Kontrolltiere mit gleicher Körpermasse unter 10 W/kg und 52% sogar unter 5 W/kg.

Für die Ermittlung der dosisabhängigen Veränderungen in der massenspezifischen MR im täglichen Minimum und Maximum von Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, wurden die Differenzen der massenspezifischen MR zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den jeweiligen Kontrolltieren berechnet (Abbildung 9). Dabei erwies sich die Erhöhung der massenspezifischen MR der mit Leptin behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren während der täglichen Minima als deutlich dosisabhängig. Die massenspezifische MR während der täglichen Maxima blieb im Vergleich zu den Kontrolltieren dagegen unverändert.



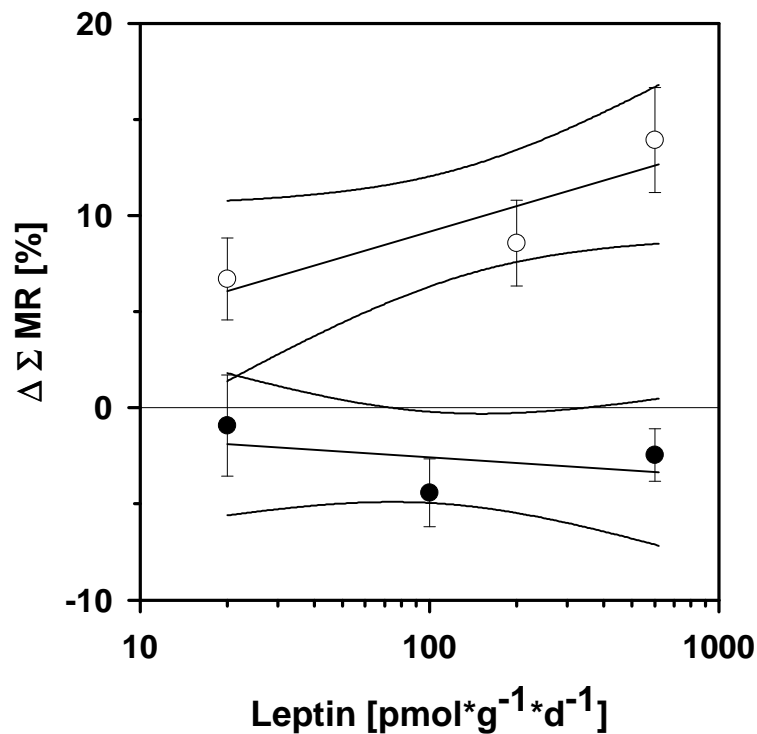
**Abbildung 9:** Dosisabhängigkeit der durchschnittlichen Veränderungen ( $\pm$  SEM) der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) im täglichen Minimum (O,  $r=0,51$ ,  $p<0,01$ ) und Maximum (●,  $r=0,19$ ) von Tieren ( $N=7$ ), die eine limitierte Futtermenge erhielten. Für jedes mit Leptin behandelte Tier wurden für jeden der drei Behandlungstage die mittleren Unterschiede der Werte zum Mittelwert der gleichzeitig mit PBS behandelten Kontrolltiere berechnet. Außerdem sind die Regressionen der Einzelwerte mit 95% Konfidenzintervallen dargestellt.

### **3.2.4. Dosis-Wirkungsbeziehung für den Gesamtenergieumsatz bei unterschiedlichem Nahrungsangebot**

In Abbildung 10 sind die prozentualen Unterschiede im Gesamtenergieumsatz über die drei Behandlungstage bei den mit Leptin behandelten Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren dargestellt. Bei limitierter Futtermenge hatten die Kontrolltiere einen durchschnittlichen Gesamtenergieumsatz von 26 kJ pro Tag. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte sich, bezogen auf diesen Durchschnittswert, bei den mit Leptin behandelten Tieren ein dosisabhängiger Anstieg der MR um ca. 5-15% über dieses Niveau. Die *ad libitum* gefütterten Tiere hatten vor der Behandlung einen ähnlichen Gesamtenergieumsatz, wie die Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Hier ergab sich, wiederum bezogen auf den Durchschnittswert der Kontrolltiere, selbst bei der höchsten der Leptin-Dosierungen kein Anstieg im Energieumsatz. Vielmehr bestand im Gegenteil eine Tendenz zur Verringerung der Verbrauchswerte im Vergleich zu den Kontrolltieren.

### **3.3. Energiebilanz während einer zehntägigen Leptinbehandlung**

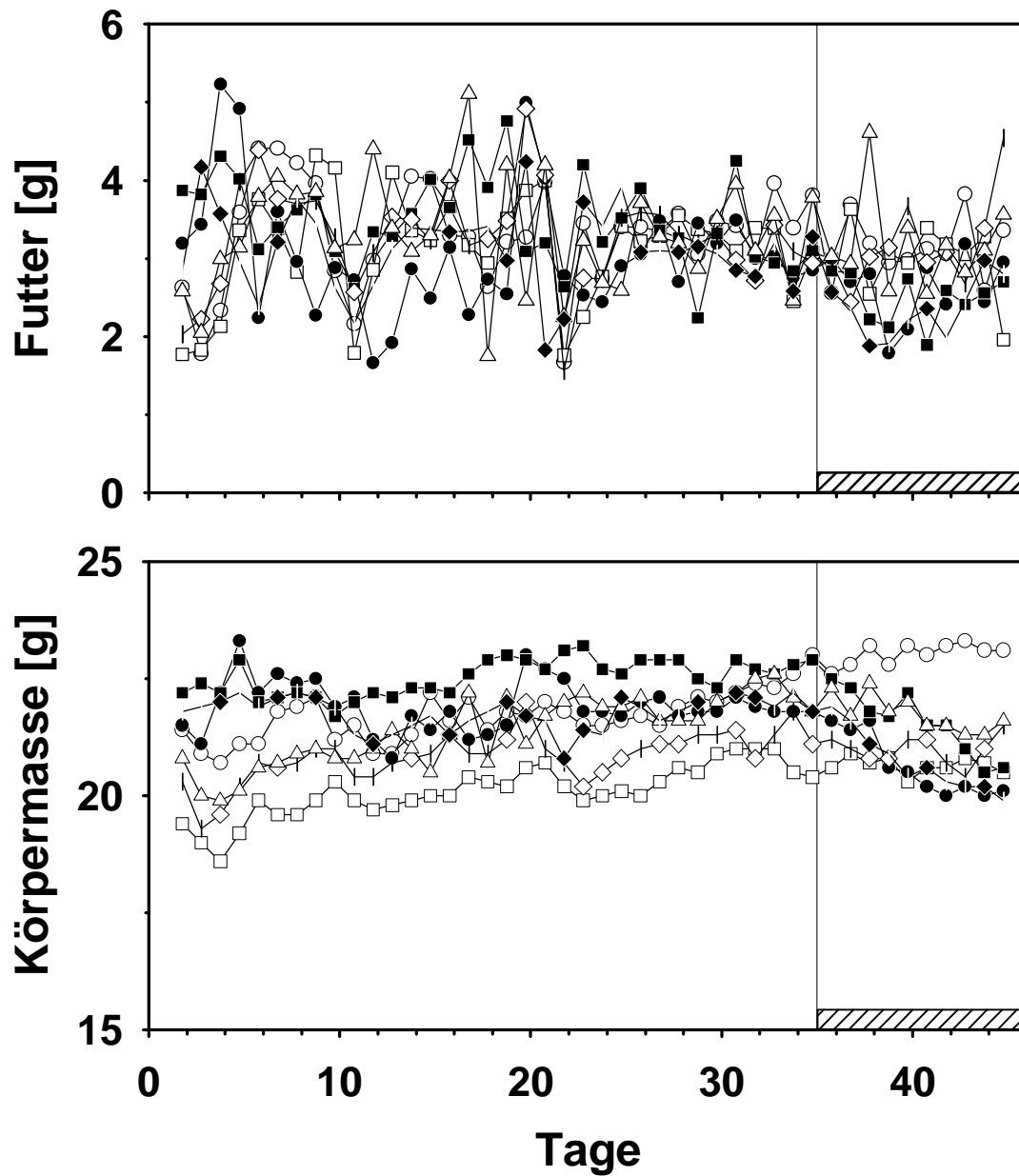
Da die Kurzzeitbehandlung keine zuverlässigen Aussagen über die Veränderung der Körperzusammensetzung und der Energiebilanz unter Leptinwirkung ermöglichte, wurde die Behandlung mit einer Tagesdosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  auf zehn Tage ausgedehnt. Bevor mit einer Langzeitbehandlung begonnen wurde, wurden die Tiere über vier bis sechs Wochen an die Einzelhaltung und die Fütterungsbedingungen gewöhnt, bis sich stabile Ausgangsbedingungen eingestellt hatten. Zur Kontrolle wurden täglich die Körpermasse und die Futteraufnahme der einzelnen Tiere überwacht. Diese auch bei den Kurzzeitbehandlungen in ähnlicher Form durchgeführte Vorbereitungsperiode war für die Langzeitbehandlungen, bei denen nur eine Behandlungsperiode durchgeführt werden konnte, von besonderer Wichtigkeit.



**Abbildung 10:** Dosisabhängigkeit der durchschnittlichen Veränderungen ( $\pm$  SEM) des Gesamtenergieverbrauchs bei einer dreitägigen Leptinbehandlung von Tieren ( $N=7$ ), die Futter *ad libitum* erhielten ( $\bullet$ ,  $r = -0,12$ ) und bei Tieren ( $N=7$ ), die eine limitierte Futtermenge erhielten ( $\circ$ ,  $r = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ). Für beide Gruppen sind die durchschnittlichen Werte für jedes mit Leptin behandelte Tier als prozentuale Unterschiede zum Mittelwert der gleichzeitig mit PBS behandelten Kontrolltiere dargestellt. Weiterhin sind die Regressionen für die Einzeldaten mit 95% Konfidenzintervallen dargestellt.

### 3.3.1. Verlauf der Futteraufnahme und der Körpermasse während der Vorbereitungs- und Behandlungsperiode von Tieren mit unterschiedlichem Nahrungsangebot

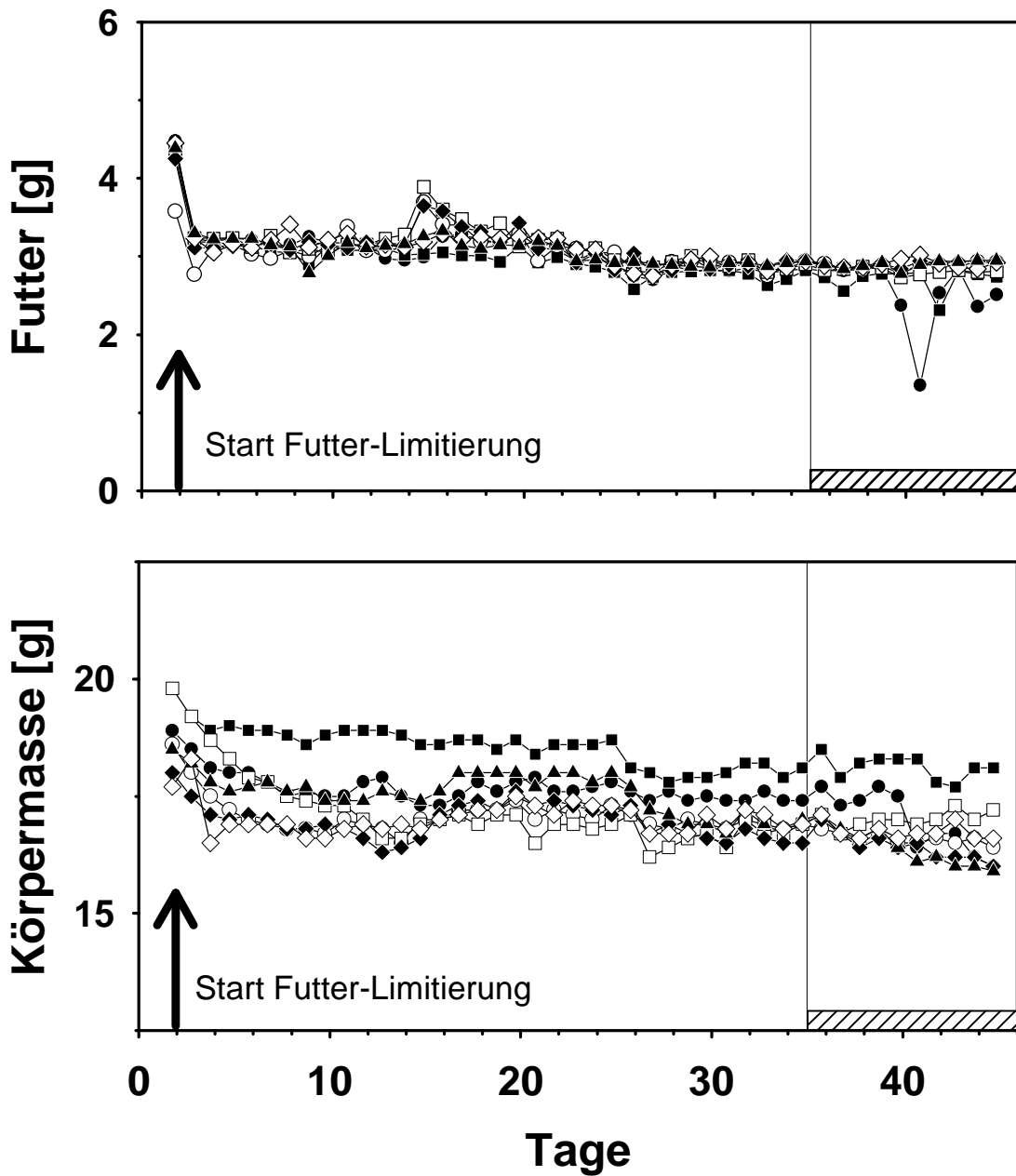
Abbildung 11 verdeutlicht beispielhaft die Vorbereitungs- und Behandlungsperiode eines Langzeitversuches für eine der drei Versuchsgruppen aus je sieben Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten (Versuchsserie IV). Über mehrere Wochen ergab sich eine erhebliche Schwankungsbreite in der Futteraufnahme und der Körpermasse. Erst nachdem sich sowohl die Futteraufnahme als auch die Körpermasse stabil verhielten, wurden die Tiere in die Leptin- und Kontroll-Behandlungsgruppe eingeteilt. Dabei wurden die Tiere so auf



**Abbildung 11:** Verlauf der täglichen Futteraufnahme (oben) und der Körpermasse (unten) während der Vorbereitungsperiode und der Behandlungsperiode einer Versuchsgruppe von 7 Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten. Die Linie markiert den Beginn der Behandlungsperiode (Balken), in der die Tiere täglich mit Leptin ( $2 \times 100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , ●) bzw. PBS (○) injiziert wurden.

die beiden Gruppen verteilt, daß die mittlere Körpermasse und die mittlere Nahrungsaufnahme der beiden Gruppen während der letzten fünf Tage vor Behandlungsbeginn (= ausgewerteter Vorlauf) weitgehend übereinstimmten. Bei der als Beispiel dargestellten Versuchsgruppe sind bereits in dieser Form der Darstellung die Reduktionen der Futtermenge und der Körpermasse der mit Leptin behandelten Tiere während der Behandlungsperiode deutlich zu erkennen.

Abbildung 12 verdeutlicht analog den Verlauf von Futtermenge und Körpermasse bei einer der drei Versuchsgruppen von sieben Tieren, die während der Vorbereitungs- und Behandlungsperiode täglich eine limitierte Futtermenge erhielten (Versuchsserie V). Mit Beginn der Fütterung einer limitierten Futtermenge nahm die Körpermasse zunächst deutlich ab, bevor sie sich allmählich auf einem niedrigeren Niveau stabilisierte. Durch minimale Veränderungen der Futtermenge wurde dafür gesorgt, daß einerseits regelmäßig Torporperioden auftraten, andererseits die Körpermasse nicht weiter absank. Diese Vorbereitungsperiode nahm mehrere Wochen in Anspruch, bis hinreichend stabile Bedingungen erreicht waren, um mit der Leptin- bzw. PBS-Behandlung beginnen zu können. In der Regel wurde bei limitiertem Nahrungsangebot das gesamte Futter aufgenommen. Jedoch fanden sich im Unterschied zu den Kurzzeitversuchen, in denen auch bei Leptinbehandlung keinerlei Reduktion der Futtermenge festzustellen war, während der längeren Behandlung mit Leptin, wie das in Abbildung 12 gezeigte Beispiel demonstriert, vereinzelt Tiere, die die zugeteilte Futtermenge nicht vollständig aufnahmen. In der Körpermasse war andererseits bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, auch während der längeren Leptinbehandlung gegenüber den Kontrolltieren kein unterschiedlicher Verlauf festzustellen.



**Abbildung 12:** Verlauf der täglichen Futtermenge (oben) und der Körpermasse (unten) während der Vorbereitungsperiode und der Behandlungsperiode einer Versuchsgruppe von 7 Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Die Linie markiert den Beginn der Behandlungsperiode (Balken), in der die Tiere täglich mit Leptin ( $2 \times 100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , ●) bzw. PBS (○) injiziert wurden.

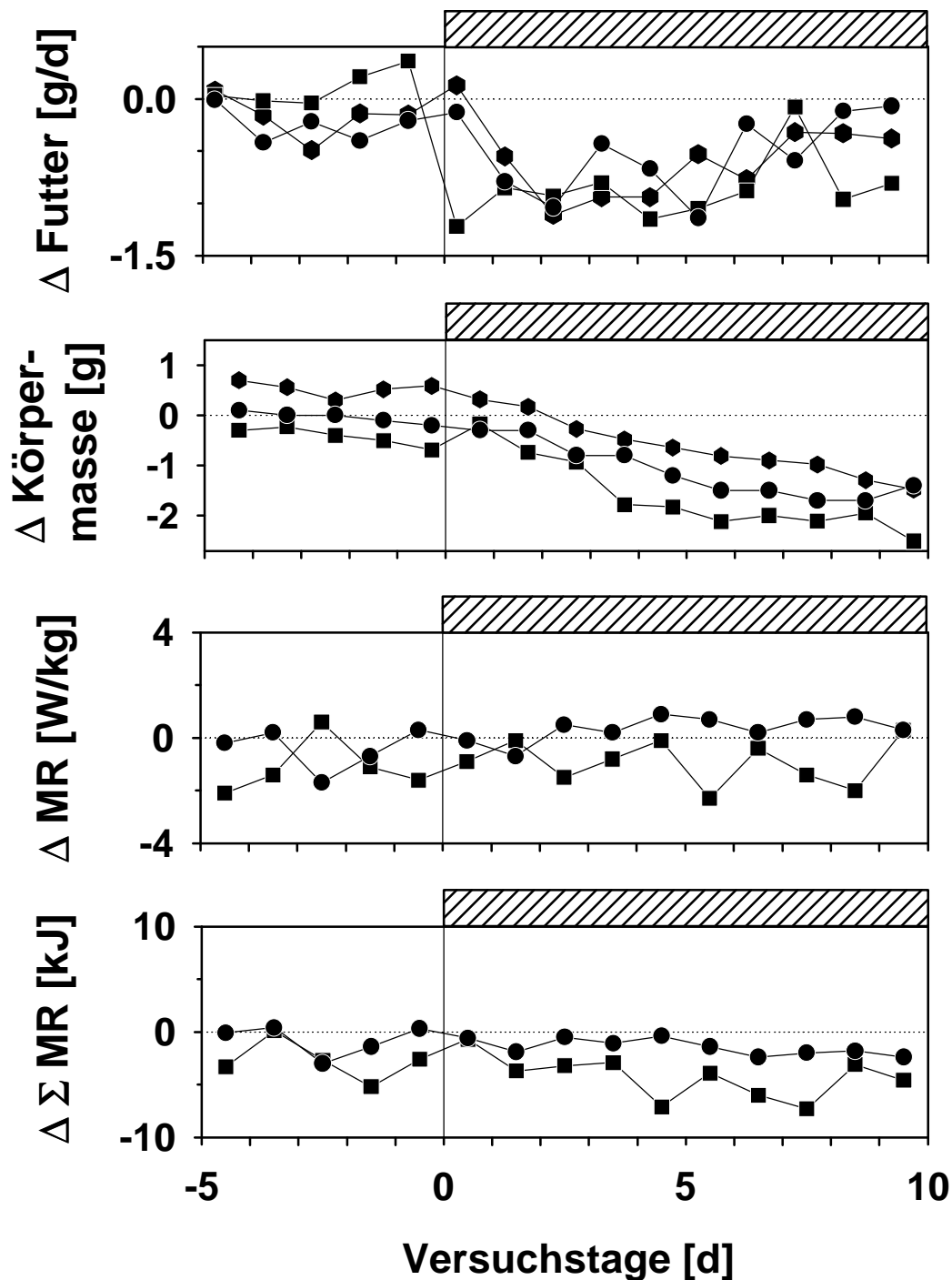


### 3.3.2. Veränderung von Futteraufnahme, Körpermasse und Energieumsatz während einer zehntägigen Leptinbehandlung bei Futter *ad libitum*

Um eine Übersicht über den Behandlungseffekt der Langzeitbehandlung bei allen *ad libitum* gefütterten Versuchsgruppen zu erhalten (Versuchsserie IV), wurde innerhalb jeder der drei Versuchsgruppen während des fünftägigen Vorlaufs und der zehntägigen Behandlungsperiode täglich die Differenz in der Futteraufnahme, der Körpermasse und dem Energieumsatz zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und ihren Kontrolltieren ermittelt (Abbildung 13). Die Nulllinien in dieser Abbildung stellen also den Mittelwert der 3-4 Kontrolltiere einer Versuchsgruppe dar.

Vom zweiten bis sechsten Tag kam es zur stärksten Senkung der Futteraufnahme bei den mit Leptin behandelten Tieren, danach verminderte sich die Differenz in der Futteraufnahme gegenüber den Kontrolltieren. Die Körpermasse zeigte zwischen dem zweiten und dritten Tag den deutlichsten Abfall. Ab dem sechsten Behandlungstag begann die Abnahme der Körpermasse abzuflachen. Der massenspezifische Sauerstoffverbrauch blieb von der Leptinbehandlung unbeeinflusst. Entsprechend der Abnahme in der Körpermasse um ca. 1-2 g gegen Ende der Behandlungsperiode war eine geringe Erniedrigung des Gesamtsauerstoffverbrauches gegenüber den Kontrolltieren festzustellen.

Bei der in Abbildung 13 gewählten Darstellungsform wird deutlich, daß sich trotz der angestrebten gleichmäßigen Verteilung der Tiere auf die Leptin- und Kontroll-Behandlungsgruppen initiale Unterschiede der mit Leptin behandelten Tiere zum Kontrollmittel nicht vollständig vermeiden ließen. Es war deshalb bei der späteren quantitativen Auswertung der Leptinwirkung (siehe 3.3.7.) auf die Energiebilanz wichtig, nicht nur die Differenz zwischen den Werten der mit Leptin behandelten Tiere und der Kontrolltiere zu betrachten, sondern diese jeweils auch zu den Differenzen dieser Gruppen während des Vorlaufs in Beziehung zu setzen.



**Abbildung 13:** Differenz im Tagesmittel der Futtermenge, der Körpermasse, der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) und dem täglichen Gesamt-Energieverbrauch ( $\Sigma$  MR) zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrolltieren der drei Versuchsgruppen, die Futter *ad libitum* erhielten. Jede der Linien mit unterschiedlichen Symbolen stellt die Differenz innerhalb einer Versuchsgruppe dar, die Nulllinie repräsentiert das Mittel der jeweiligen Kontrolltiere. Die MR wurde nur bei zwei der drei Versuchsgruppen registriert. Gezeigt sind die Daten aus dem fünftägigen Vorlauf und der zehntägigen Behandlungsperiode (Balken).

### **3.3.3. Veränderung von Futteraufnahme, Körpermasse und Energieumsatz während einer zehntägigen Leptinbehandlung bei limitiertem Futterangebot**

Abbildung 14 zeigt in entsprechender Weise einen Überblick über die Unterschiede im Vorlauf und in der zehntägigen Behandlungsperiode von drei Versuchsgruppen, die nur eine limitierte Futtermenge erhielten (Versuchsserie V). Entsprechend der Zuteilung des Futters war die Futteraufnahme der Leptin-Behandlungsgruppe im Vorlauf identisch mit der der Kontrolltiere. Wie bei den Kurzzeituntersuchungen blieb die Futteraufnahme auch in den ersten drei Behandlungstagen zu der der Kontrolltiere gleich. Ab dem fünften Behandlungstag kam es jedoch in zwei der drei Versuchsgruppen wiederholt zu geringen Absenkungen des Mittelwertes der mit Leptin behandelten Tiere im Vergleich zu dem ihrer Kontrolltiere. Diese Unterschiede beruhen darauf, daß einzelne Tiere (drei der insgesamt elf mit Leptin behandelten Tiere aus dieser Versuchsserie) an einzelnen Tagen das angebotene Futter nicht vollständig aufnahmen, nicht jedoch auf einer generellen Senkung der Futteraufnahme aller mit Leptin behandelten Tiere (siehe Abbildung 12). Bei Betrachtung der Körpermassen in Abbildung 14 zeigt sich, daß es bei den mit Leptin behandelten Tieren nicht zu einem Abfall kam, sondern initial sogar zu einem schwachen Anstieg.

Wie oben ausführlich für Versuchsserie III dargestellt, traten auch in dieser Versuchsserie bei den Kontrolltieren wiederholt Torporperioden auf, die bei den mit Leptin behandelten Tieren langfristig zuverlässig unterdrückt wurden und die Grundlage für die in Abbildung 14 gezeigten Veränderungen des Tagesmittels der MR gegenüber den Kontrolltieren bildeten. So traten während der Behandlungsperioden bei den Kontrolltieren in mehr als 90%, bei den mit Leptin behandelten Tieren dagegen nur in weniger als 30% der Fälle metabolische Raten unter 10 W/kg auf. Bei der Betrachtung der massenspezifischen MR ergab sich ab dem zweiten Tag der Leptinbehandlung ein deutlicher Anstieg bei den mit Leptin behandelten Tieren gegenüber ihren Kontrolltieren. Da sich die Körpermasse während der Behandlungsperiode nur minimal änderte, zeigte der Gesamtsauerstoffverbrauch einen analogen Verlauf.

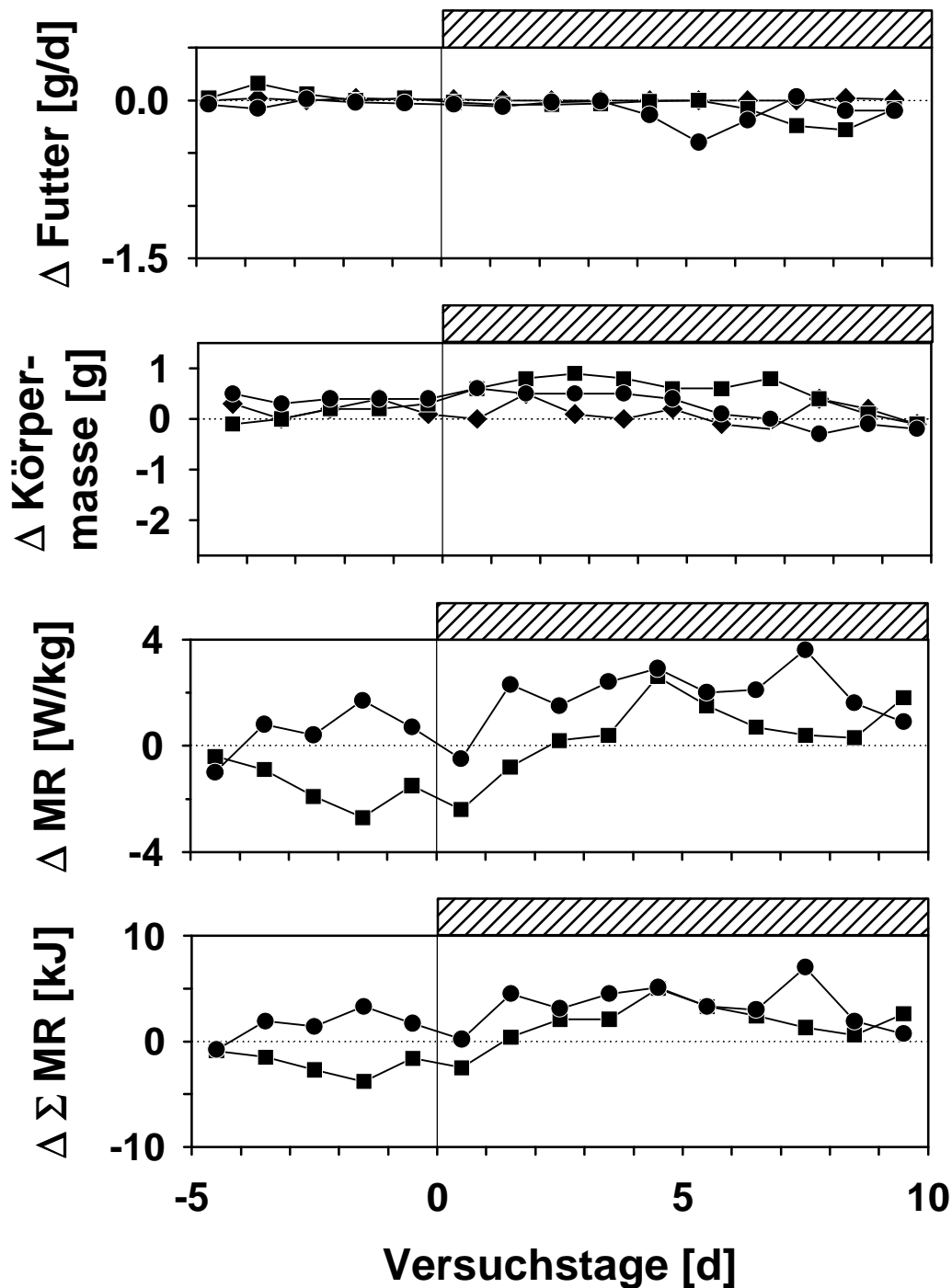
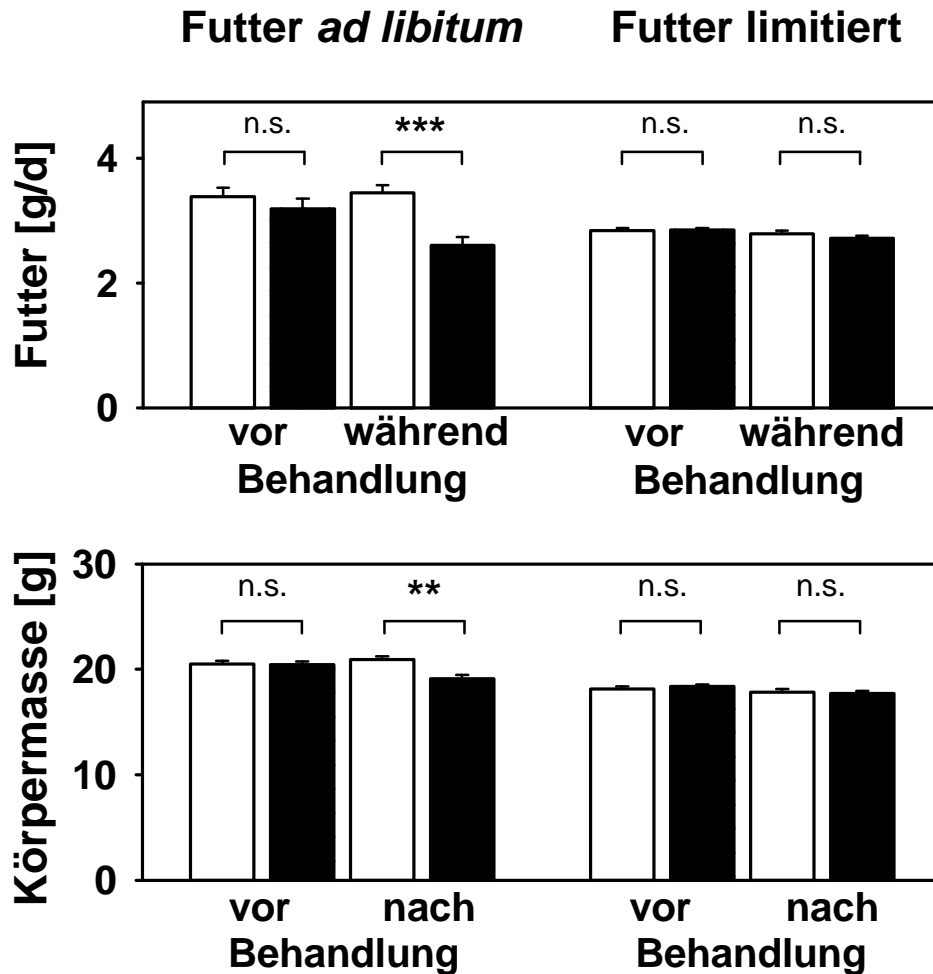


Abbildung 14: Differenz im Tagesmittel der Futtermenge, der Körpermasse, der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) und dem täglichen Gesamt-Energieverbrauch ( $\Sigma$  MR) zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrolltieren der drei Versuchsgruppen, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Jede der Linien mit unterschiedlichen Symbolen stellt die Differenz innerhalb einer Versuchsgruppe dar, die Nulllinie repräsentiert das Mittel der jeweiligen Kontrolltiere. Die MR wurde nur bei zwei der drei Versuchsgruppen registriert. Gezeigt sind die Daten aus dem fünftägigen Vorlauf und der zehntägigen Behandlungsperiode (Balken).

### 3.3.4. Vergleich der Leptinwirkung auf die Futtermengeaufnahme und die Körpermasse bei unterschiedlichem Nahrungsangebot

In Abbildung 15 sind die jeweils mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse mit Versuchsgruppe und Behandlung als Faktoren (siehe 2.10.4.) bestimmten gewichteten Mittelwerte von Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten, und solchen, die nur eine limitierte Futtermenge erhielten, einander gegenübergestellt. In Bezug auf die Nahrungsaufnahme läßt sich feststellen, daß nur bei den Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten, die Leptinbehandlung zu einer signifikanten Abnahme im Vergleich zu der der Kontroll-Behandlungsgruppe führte, und zwar im Mittel um 24%. Hierbei muß allerdings der bereits im Vorlauf bestehende nicht signifikante Unterschied von 6% zwischen den Behandlungsgruppen berücksichtigt werden (vgl. hierzu 3.3.7). Bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, war die Futtermengeaufnahme bei den mit Leptin behandelten Tieren und den Kontrolltieren im Vorlauf identisch. Während der Behandlungsperiode sank zwar die Futtermengeaufnahme der mit Leptin behandelten Tiere im Mittel um 5% unter die der Kontrolltiere ab, doch dieser nur auf eine zeitweilige Reduktion der Nahrungsaufnahme von drei der elf Tiere zurückzuführende Unterschied war nicht signifikant ( $p=0,24$ ). Obwohl durch die Limitierung der angebotenen Futtermenge diese Tiere im täglichen Mittel vor der Behandlung ca. 16% weniger Futter als die *ad libitum* gefütterten Tiere aufnahmen, verzehrten sie während der Leptinbehandlung geringfügig mehr (4%), als die *ad libitum* versorgten Tiere unter der gleichen Behandlung.

Wie Abbildung 15 weiterhin zeigt, ergab sich in Bezug auf die Körpermasse bei den *ad libitum* gefütterten Tieren vor der Behandlung kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Während die Kontrolltiere bis zum Ende der Behandlungsperiode noch ca. 2% an Körpermasse zunahm, nahm die Körpermasse der mit Leptin behandelten Tiere ab und lag am Ende der Behandlungsperiode mit 9% signifikant unter der der Kontrolltiere. Die Körpermasse der Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, war im Mittel um ca. 12% kleiner als die der Tiere, die Futter *ad libitum* erhielten, wobei weder am Ende des Vorlaufes noch am Ende der Behandlungsperiode ein Unterschied in der Körpermasse zwischen der Leptin- und der Kontroll-Behandlungsgruppe festzustellen war.



**Abbildung 15:** Gewichtete Mittelwerte ( $\pm$  SEM,  $n=8-11$ ) der Futteraufnahme und der Körpermasse von allen Tieren aus jeweils drei Versuchsgruppen für jede der beiden Fütterungsbedingungen. Kontroll-Behandlungsgruppe = weiß, Leptin-Behandlungsgruppe = schwarz. \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , n.s. = nicht signifikant.

### 3.3.5. Vergleich der Leptinwirkung auf den Energieverbrauch bei unterschiedlichem Nahrungsangebot

Entsprechend zur Futteraufnahme wurden auch die massenspezifische MR und der Gesamtsauerstoffverbrauch im Vorlauf und in der Behandlungsperiode ausgewertet. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren war in der massenspezifischen MR weder während des Vorlaufs noch während der Behandlungsperiode ein Unterschied ( $<2\%$ ) zwischen der Leptin-Behandlungsgruppe und der Kontroll-Behandlungsgruppe festzustellen (Abbildung 16). Der mittlere tägliche Gesamtenergieumsatz der Leptin-Behandlungsgruppe unterschied sich während des Vorlaufs zwar ebenfalls nicht signifikant

von dem ihrer Kontrolltiere, lag aber bereits um ca. 5% niedriger. Der Unterschied vergrößerte sich proportional zur Abnahme der Körpermasse während der Behandlungsperiode auf 9% und wurde damit signifikant.

Abbildung 16 zeigt weiterhin für die Kontrolltiere, daß die massenspezifische MR der Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, im Mittel knapp 10% höher war als die der *ad libitum* gefütterten Tiere; dies entsprach ihrer geringeren Körpermasse. Der mittlere Gesamtenergieumsatz während des Vorlaufs lag bei limitierter Futtermenge um etwa 5% niedriger als bei den *ad libitum* versorgten Tieren und unterschied sich nicht zwischen Kontroll- und Leptin-Behandlungsgruppe.

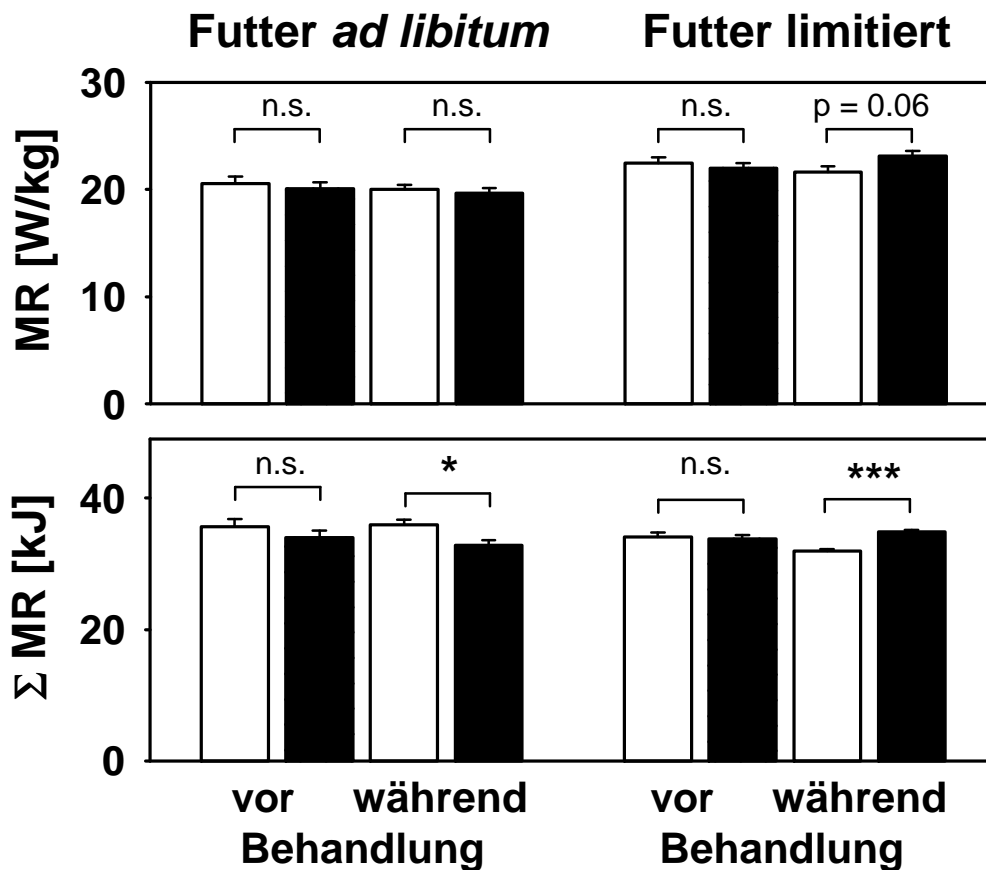


Abbildung 16: Gewichtete Mittelwerte ( $\pm$  SEM,  $n=6-8$ ) der durchschnittlichen täglichen massenspezifischen metabolischen Rate (MR) und des mittleren täglichen Gesamt-Energieverbrauches ( $\Sigma$  MR) der Tiere aus jeweils zwei Versuchsgruppen für jede der Fütterungsbedingungen, bei denen der Sauerstoffverbrauch gemessen wurde. Kontroll-Behandlungsgruppe = weiß, Leptin-Behandlungsgruppe = schwarz. \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$ , n.s. = nicht signifikant.

Während der Behandlungsperiode bestand bei den Kontrolltieren eine geringe Tendenz zu einem weiteren Abfall der massenspezifischen MR, während sie sich bei den mit Leptin behandelten Tieren im Vergleich dazu um 7% erhöhte, wobei dieser Anstieg knapp die Signifikanzgrenze verfehlte ( $p=0,06$ ). In Bezug auf den Gesamtenergieumsatz kam es bei den mit Leptin behandelten Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg um 10% im Vergleich zu den Kontrolltieren, bei denen der Gesamtenergieumsatz in der Behandlungsperiode etwas absank. Interessanterweise entsprach der Gesamtenergieumsatz der mit Leptin behandelten Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, während der Behandlungsperiode in etwa dem der Kontrolltiere aus der Gruppe, die Futter *ad libitum* erhielt.

### **3.3.6. Auswirkungen einer zehntägigen Leptinbehandlung auf die Körperzusammensetzung bei unterschiedlichem Nahrungsangebot**

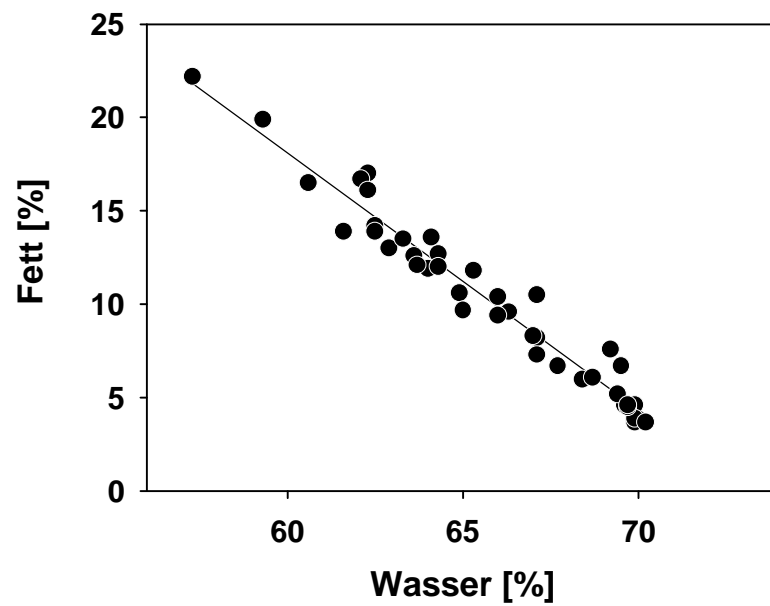
#### **3.3.6.1. Zusammenhang zwischen Fettgehalt und Wassergehalt**

Zur Kontrolle der Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde zunächst der prozentuale Körperfettgehalt in Abhängigkeit vom prozentualen Körperwassergehalt dargestellt (Abbildung 17). Die Beziehung zwischen Körperfettgehalt und Körperwassergehalt ist bei Tieren gleichen Alters äußerst stabil und kann somit zur methodischen Kontrolle der Meßwerte herangezogen werden. Deutliche Abweichungen einzelner Tiere von der Korrelation würden auf eine unsaubere bzw. fehlerhafte Bestimmung der Körperzusammensetzung hinweisen (z.B. Verlust von Trockensubstanz während des Wiegeprozesses usw.). Dies ist bei den hier verwendeten Tieren nicht der Fall.

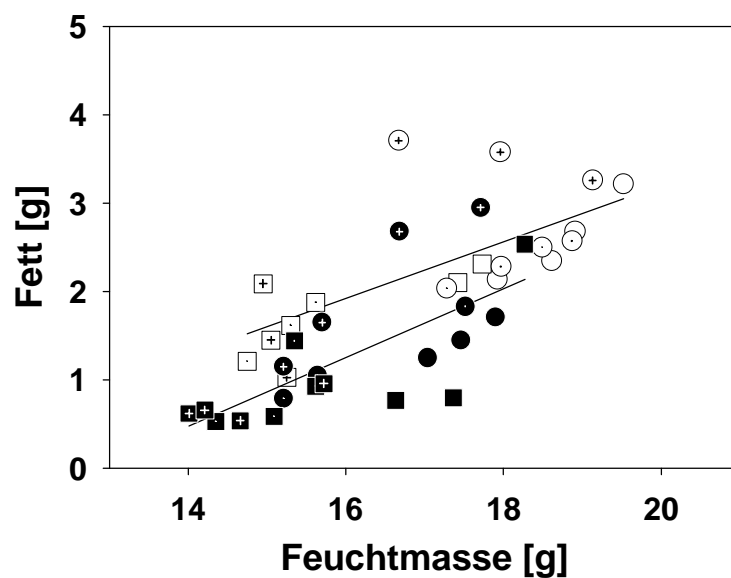
#### **3.3.6.2. Auswirkungen der Leptinbehandlung auf den Körperfettgehalt und die fettfreie Trockenmasse**

Setzt man die Körperfettmasse am Ende der zehntägigen Behandlungsperioden in Relation zur Feuchtmasse, so zeigt sich bei den Kontrolltieren ebenso wie bei den mit Leptin behandelten Tieren eine deutliche positive Korrelation (Abbildung 18), und zwar





**Abbildung 17:** Korrelation zwischen prozentualem Körperfettgehalt und prozentualem Körperwassergehalt aller untersuchten Tiere ( $r = -0,98$ ).



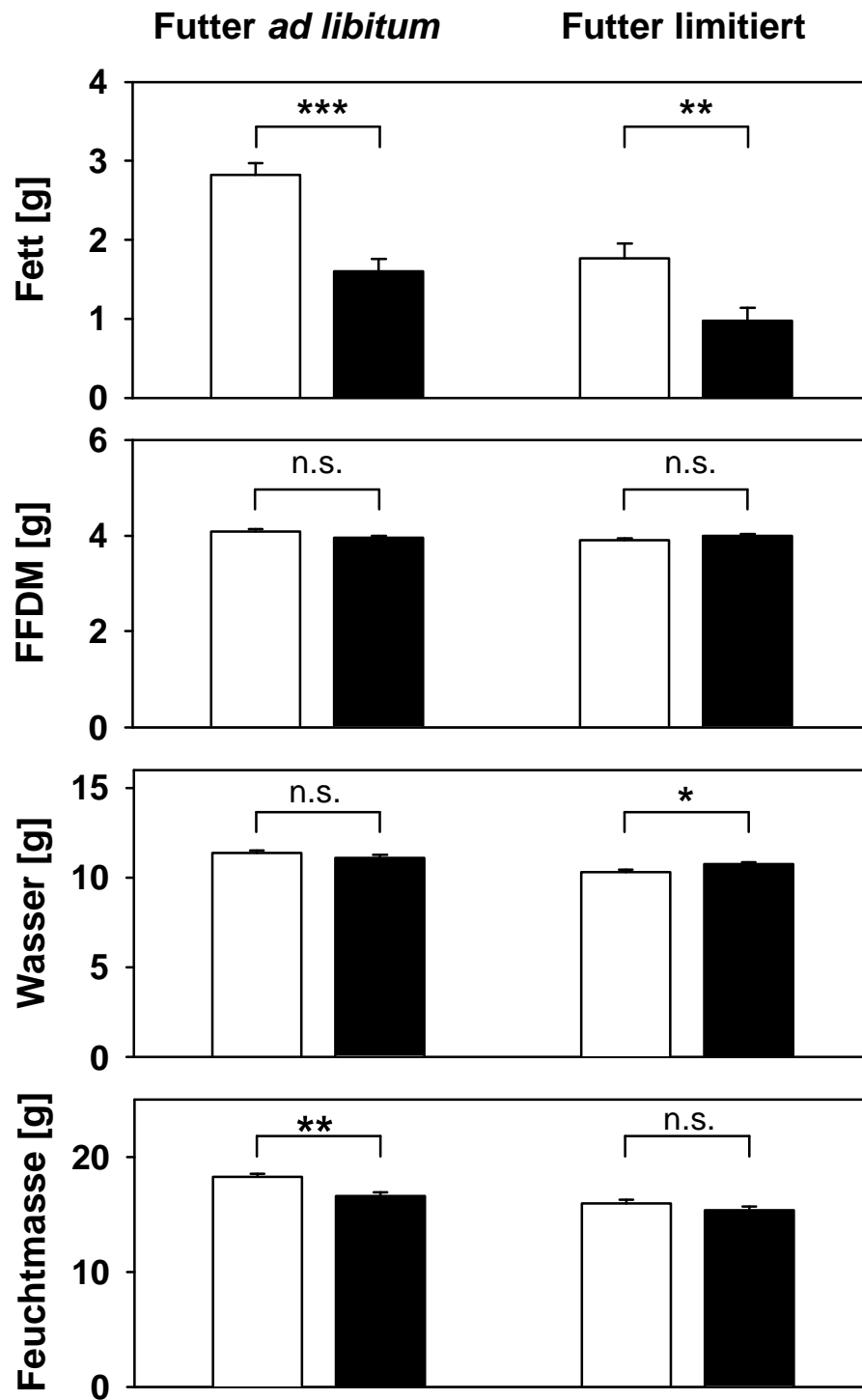
**Abbildung 18:** Korrelationen zwischen Körperfettmasse und Körperfeuchtmasse von Tieren, die Futter *ad libitum* (Kreise) bzw. eine limitierte Futtermenge (Quadrate) erhalten hatten. Geschlossene Symbole zeigen mit Leptin behandelte Tiere ( $r = 0,71$ ), offene Symbole die Kontrolltiere ( $r = 0,69$ ). Verschiedene Versuchsgruppen sind durch verschiedene Symbole dargestellt.

unabhängig davon, ob die Tiere *ad libitum* oder mit einer limitierten Futtermenge ernährt wurden. Die Regressionsgerade für die mit Leptin behandelten Tiere ist signifikant ( $p < 0,01$  für den Vergleich der y-Achsenabschnitte) nach unten verschoben gegenüber der für die Kontrolltiere. Sie hatten also bei gleicher Feuchtmasse eine deutlich niedrigere Fettmasse.

Durch diese Darstellungsform wird deutlich, daß erhebliche Unterschiede im Ausgangsfettgehalt der verschiedenen Versuchsgruppen auch bei gleichem Nahrungsangebot auftraten. Trotz dieser Unterschiede sieht man deutlich, daß die Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, überwiegend im unteren Bereich der Geraden lagen, wenngleich es zu einer gewissen Überlappung der Gruppen kam. Dies war insbesondere bedingt durch eine der Versuchsgruppen, die eine limitierte Futtermenge erhielten, wobei deren im Durchschnitt höhere Körpermasse wahrscheinlich darauf zurückzuführen war, daß die Tiere dieser Gruppe zu Beginn der Behandlung deutlich älter waren als die der anderen beiden Gruppen. Weiterhin fällt auf, daß Tiere aus einer der Versuchsgruppen, die Futter *ad libitum* erhielten, auffallend höhere Körperfettwerte aufwiesen als die der anderen beiden Versuchsgruppen, obwohl hier kein Altersunterschied bestand. Bei dieser Gruppe handelte es sich um BalbC-Mäuse, die vom Züchter gekauft waren, während alle anderen Gruppen aus der hauseigenen Zucht stammten. Diese Tiere unterschieden sich jedoch nur in ihrem Ausgangskörperfettgehalt, während die Abnahme der Körperfettmasse unter der Leptinbehandlung der bei den anderen Gruppen entsprach.

Angesichts dieser Variabilität ist die nachgewiesene Korrelation zwischen Feuchtmasse und Körperfettmasse bei den Kontrolltieren ein wichtiges Prüfkriterium, denn es zeigt, daß unabhängig von den gezeigten Einflußgrößen die Einteilung in möglichst ähnliche Behandlungsgruppen anhand der Körpermasse (siehe 2.9.4.) auch einer annähernden Übereinstimmung der Behandlungsgruppen im Bezug auf die Körperfettmasse vor Versuchsbeginn bedeutete. Andererseits unterstreichen die beschriebenen Zusammenhänge die Notwendigkeit, bei der statistischen Auswertung die Versuchsgruppe als Faktor zu berücksichtigen.

Wird unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, so zeigt das gewichtete Mittel der Kontrolltiere, daß die Körperfettmasse der Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, etwa um 1/3 kleiner war als die der Tiere, die Futter *ad libitum* erhielten (Abbildung 19). Die mit Leptin behandelten Tiere, die Futter *ad libitum* erhielten, hatten am Ende der



**Abbildung 19:** Körperfettgehalt, fettfreie Trockenmasse (FFDM), Körperwasser und Feuchtmasse nach einer 10-tägigen Behandlung von Tieren, die Futter *ad libitum* (links) oder eine limitierte Futtermenge (rechts) erhalten hatten. Kontroll-Behandlungsgruppe = weiß, Leptin-Behandlungsgruppe = schwarz. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , n.s.= nicht signifikant

Behandlungsperiode ca. 43% weniger Fett als die Kontrolltiere. Für die mit Leptin behandelten Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, ergab sich mit einer Abnahme der Fettmasse um 45% anteilmäßig der gleiche Effekt ungeachtet des niedrigeren Ausgangsfettgehaltes dieser Versuchsgruppe. Dem entspricht, daß die absolute Abnahme in der Körperfettmasse bei den *ad libitum* gefütterten Tieren mit 1,2 g etwa um 35% größer war als bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten.

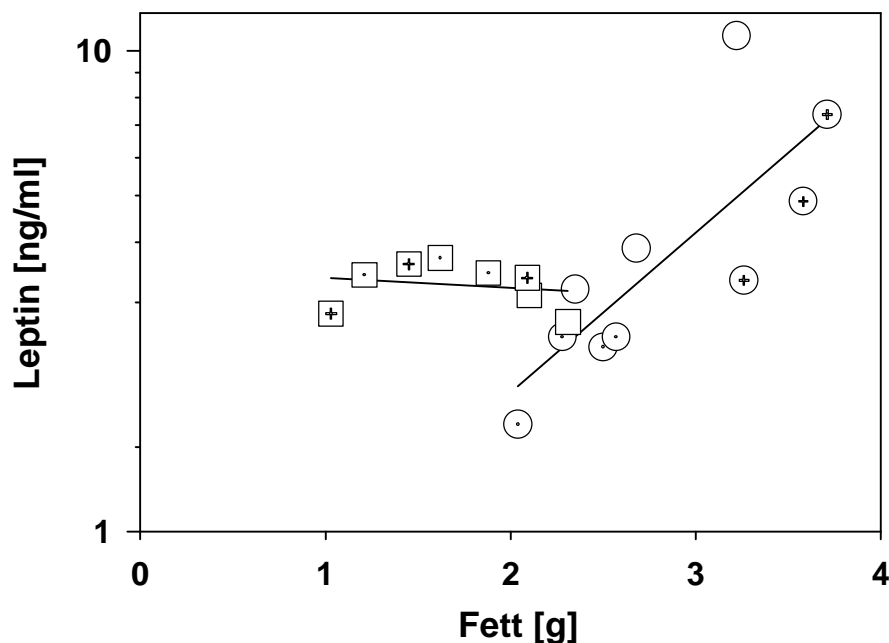
Die FFDM der Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, war nur um 4% kleiner als bei den Tieren, die Futter *ad libitum* erhielten (Abbildung 19). Unter beiden Ernährungsbedingungen wurde die FFDM nicht signifikant durch die Leptinbehandlung beeinflusst (Abnahme um 2-3%). Interessant ist, daß dabei trotz der nahezu identischen FFDM deutliche Unterschiede im Körperwasser in Abhängigkeit von den Ernährungsbedingungen auftraten (Abbildung 19). Der Körperwassergehalt der Kontrolltiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, war um ca. 10% kleiner als bei den Kontrolltieren, die Futter *ad libitum* erhielten. Diese Beobachtung ist besonders dann wichtig, wenn der Energieumsatz, wie es häufig der Fall ist, auf die „lean body mass“ (= FFDM + Wasser) bezogen wird. Sie ist hier also zwischen den Fütterungsgruppen deutlich verschieden, wobei dieser Unterschied fast ausschließlich auf das nicht stoffwechselaktive Wasser zurückzuführen ist. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren war nach der Behandlung mit Leptin mit einer Abnahme um 2% gegenüber den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied im Körperwasser festzustellen. Im Gegensatz dazu hatten die Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, nach Behandlung mit Leptin geringfügig aber dennoch signifikant mehr Körperwasser als ihre Kontrolltiere. Dieses zunächst verwirrende Ergebnis wird verständlich, wenn man es in Beziehung zur Feuchtmasse (s.u.) setzt. Dann kommt es, bezogen auf die jeweilige Feuchtmasse (s.u.), sowohl bei den *ad libitum* gefütterten Tieren als auch bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, unter Leptinbehandlung zu einer Erhöhung des Wassergehaltes um etwa 5%.

Ergänzend ist in Abbildung 19 noch die Feuchtmasse dargestellt, bei der im Gegensatz zur (Lebend-) Körpermasse Unterschiede im Magen-Darm-Füllungszustand ausgeschlossen werden können. Etwaige Änderungen stimmen jedoch erfahrungsgemäß weitgehend mit denen der Körpermasse überein (siehe 3.3.4.), wiederum ergab sich ein Unterschied von mehr als 10% zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Die Feuchtmasse zeigte ebenso wie die Körpermasse bei den mit Leptin behandelten Tieren, die Futter *ad libitum*

erhielten, eine signifikante neunprozentige Abnahme gegenüber ihren Kontrolltieren. Bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, war dagegen lediglich eine vierprozentige, nicht signifikante Abnahme unter der Leptinbehandlung festzustellen.

### 3.3.6.3. Abhängigkeit der Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt vom Nahrungsangebot

In Abbildung 20 sind die Korrelationen zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse der Kontrolltiere aus beiden Fütterungsgruppen dargestellt. Die Plasmaleptinspiegel der mit Leptin behandelten Tiere wurden nicht ausgewertet, weil der Leptingehalt nach Bolusinjektionen einen ausgeprägten Zeitgang aufweist, der sinnvolle Punktmessungen nicht zulässt. Während bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine deutliche positive Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt bestand, war bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, überraschenderweise kein Zusammenhang festzustellen. Der Leptinspiegel war bei diesen Tieren unabhängig von der Körperfettmasse konstant niedrig.

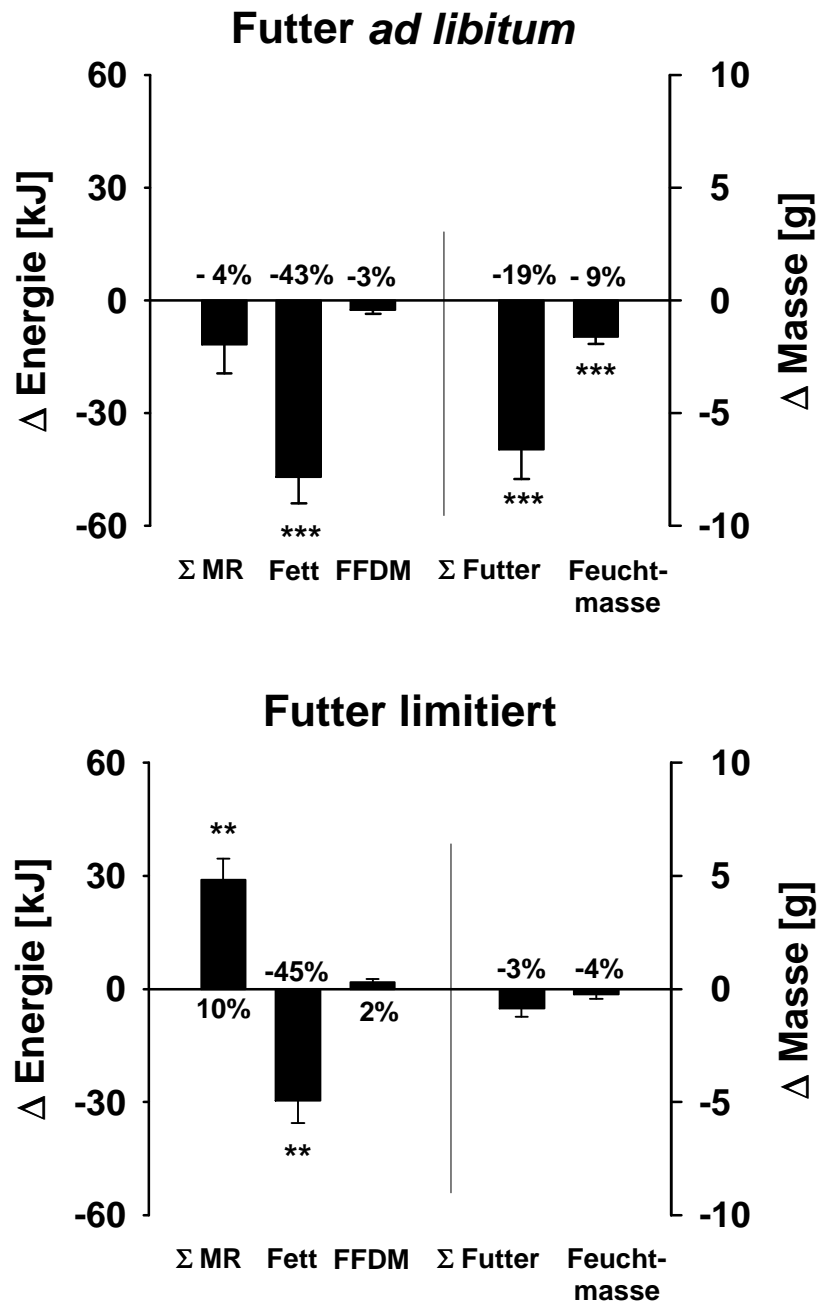


**Abbildung 20:** Korrelation zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse bei Kontrolltieren, die Futter *ad libitum* erhalten hatten (Kreise,  $r = 0,79$ ,  $p < 0,01$ ) und Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhalten hatten (Quadrate,  $r = -0,2$ ). Die Abhängigkeit ist einfach logarithmisch dargestellt.

### 3.3.7. Energiebilanz der Leptinwirkung bei unterschiedlichem Nahrungsangebot

In Abbildung 21 sind die Unterschiede in der Energiebilanz von Tieren, die mit Leptin behandelt wurden, und den jeweiligen Kontrolltieren für beide Fütterungsbedingungen (Versuchsserie IV und V) zusammengefaßt. Bei den hier dargestellten Änderungen im Energieverbrauch und in der Futteraufnahme sind durch vorausgehende Differenzbildungen zum Mittel des eigenen Vorlaufs die Einflüsse von Unterschieden zwischen den Tieren bzw. von bereits im Vorlauf bestehenden Unterschieden zwischen den Gruppen kompensiert worden.

Die Abnahme im Körperfettgehalt bei den *ad libitum* gefütterten Tieren war energetisch um  $\frac{1}{3}$  größer als bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten. Prozentual waren die Abnahmen relativ zu den jeweiligen Kontrolltieren jedoch gleich. Bei den mit Leptin behandelten *ad libitum* gefütterten Tieren war der Energieverbrauch geringfügig (4%) aber nicht signifikant niedriger als der ihrer Kontrolltiere. Gleichzeitig ergab sich eine erhebliche Reduktion der Energieaufnahme, denn die Futteraufnahme war im Vergleich zu den Kontrolltieren um 19% niedriger. Bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, spielte die Änderung der Futteraufnahme für den Unterschied in der Energiebilanz zwischen Tieren, die mit Leptin behandelt wurden, und den Kontrolltieren dagegen keine Rolle. Stattdessen entsprach der um ca. 30 kJ gesteigerte Energieverbrauch nahezu vollständig dem Energiegehalt der abgebauten Körperfettmenge.



**Abbildung 21:** Zusammenfassung der Wirkungen einer 10-tägigen Behandlung mit Leptin ( $2 \times 100 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ) bei Tieren, die Futter *ad libitum* (oben) bzw. eine limitierte Futtermenge erhalten hatten (unten). Dargestellt sind Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der energetischen Unterschiede (links) und der Unterschiede in den Massen (rechts) im Vergleich zum Mittel der Kontrolltiere, wobei für Futter und MR die Differenzen zum eigenen Vorlauf berücksichtigt wurden. Weiterhin sind die prozentualen Abweichungen vom Kontrollmittel angegeben. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Σ MR und Σ Futter sind Summen über 9 Tage. Fett = Körperfettmasse, FFDM = fettfreie Trockenmasse.

## 4. Diskussion

Wesentliche neue Befunde dieser Arbeit waren die Demonstration der alternativen Wirkung einer Behandlung mit rekombinantem Leptin auf die Nahrungsaufnahme bzw. den Energieverbrauch von Tieren, die unbegrenzten bzw. limitierten Zugang zum Futter hatten, und der Nachweis einer auf die Ruhephase beschränkten dosisabhängigen Stoffwechselwirkung von rekombinantem Leptin bei adulten Wildtyptieren (Döring et al. 1998 a). Ein weiterer wesentlicher Befund dieser Arbeit ist der Nachweis einer prozentual gleichen Wirkung von rekombinantem Leptin auf die Körperfettmasse von Tieren mit unbegrenzter bzw. limitierter Futtersversorgung, der eine zentrale Koordination der beiden Effektorsysteme wahrscheinlich macht (Döring et al. 1998 b). Somit wurde es möglich, an adulten Labormäusen den funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden für die Energiebilanz wesentlichen Wirkungen des Leptins einerseits auf die Energiezufuhr und andererseits auf die Energiedissipation unter zwei charakteristischen Ernährungsbedingungen quantitativ aufzuzeigen, nämlich bei Futter *ad libitum* und bei einer chronisch auf ca. 80% der *ad libitum* Aufnahme reduzierten Futtersversorgung.

### 4.1. Abhängigkeit der Leptinwirkung von spezifischen physiologischen Zuständen

#### 4.1.1. Abhängigkeit der Leptinwirkung vom Ernährungszustand

In der Allgemeinheit war bei Entdeckung des neuen Hormons seine appetit-hemmende Wirkung auf besonderes Interesse gestoßen (Rink 1994), weil daran zunächst Hoffnungen auf eine Therapiemöglichkeit der weltweit zunehmenden Adipositas geknüpft wurden. Dagegen sind unter natürlichen Lebensbedingungen, unter denen kein chronischer Nahrungsüberfluß auftritt, die Wirkungen des Leptins auf energetisch kostspielige Aktivitäten, wie die metabolische Kälteabwehr (Schmidt et al. 1997, Nuesslein-Hildesheim et al 1998) und die Reproduktion (Chehab et al. 1996, 1997, Ahima et al. 1997), wesentlich wichtiger.

Die hemmenden Effekte von Leptin auf die Futterraufnahme sind mittlerweile wiederholt beschrieben worden (Pellemounter et al. 1995, Campfield et al. 1995, Halaas et al. 1995, Mistry et al. 1997, Pellemounter 1997) und bestätigen sich hier für die *ad libitum* gefütterten Tiere sowohl in den Kurzzeitversuchen als auch in den Langzeitversuchen. Ein



wesentlicher neuer Befund dieser Arbeit ist jedoch, daß einer klaren, dosisabhängigen hemmenden Wirkung von Leptin auf die Futteraufnahme bei unbegrenztem Nahrungsangebot eine unveränderte Futteraufnahme bei limitierter Fütterung gegenübersteht. Dies kann nicht darauf beruhen, daß das Potential für die Hemmwirkung des Leptins auf die Futteraufnahme erschöpft ist, da die Futteraufnahme bei den *ad libitum* gefütterten Tieren deutlich unter das Niveau der Futtermenge, die den limitiert gefütterten Tieren bei gleicher Leptindosis angeboten wurde, gehemmt wurde.

Obwohl Leptin nicht nur als Sättigungshormon unter der Bedingung eines unbegrenzten Nahrungsangebotes wirkt, sondern auch die kompensatorisch übersteigerte Futteraufnahme am Ende einer Fastenperiode dämpfen kann (Ahima et al. 2000), war es also nicht in der Lage, die Futteraufnahme von Tieren zu unterdrücken, die an die rasche Aufnahme einer limitierten Futtermenge zu einer bestimmten Tageszeit gewöhnt waren. Das heißt, daß die appetit-hemmende Wirkung bei einer unter natürlichen Lebensbedingungen keineswegs ungewöhnlichen Situation nicht nachweisbar war.

Die übliche *ad libitum* Versorgung von Labortieren mit einem ernährungsphysiologisch balancierten aber geschmacklich monotonen Standardfutter, bei der eine deutliche Appetithemmung durch Leptin nachweisbar ist, stellt dagegen eine unter normalen Lebensbedingungen sehr seltene Form der Nahrungsversorgung dar. Weiterhin ist auch der Aktivitätsaufwand zur Futteraufnahme unter *ad libitum*-Fütterungsbedingungen minimal und ergibt somit ebenfalls eine für die Natur untypische Situation. Andererseits entsprechen diese Standardfütterungsbedingungen auch nicht der typischen Versorgungssituation von Menschen in westlichen Industrienationen, die durch eine Überversorgung mit hochkalorischer, sensorisch attraktiver und abwechslungsreicher Nahrung gekennzeichnet ist. Werden Labortiere mit einer entsprechenden Nahrung konfrontiert („cafeteria-diet“), kommt es ebenfalls häufig zu Adipositas (Sclafani und Springer 1976) und Leptinresistenz (Frederich et al. 1995, Widdowson et al. 1998), d. h. die Funktion von Leptin als Appetitzügler ist stark vom Nahrungsangebot abhängig und stellt keineswegs den Regelfall dar.

Auch die Betrachtung der Leptinspiegel bei den beiden Kontrollgruppen mit unterschiedlichem Nahrungsangebot weist bereits auf eine Abhängigkeit der Leptinwirkung vom Ernährungszustand hin. Während bei den *ad libitum* versorgten Tieren eine klare positive Korrelation zwischen Plasmaleptin und Körperfettgehalt besteht und

bisherige Befunde bestätigt (Frederich et al. 1995, Considine 1997), ist bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, überraschenderweise keinerlei Beziehung zwischen beiden Parametern festzustellen. Daß bei den *ad libitum* versorgten Tieren bei gleichem Körperfettgehalt und kürzer zurückliegender letzter Nahrungsaufnahme teilweise niedrigere Plasmaleptinspiegel auftreten als bei den im Futter limitiert gehaltenen Tieren, weist darauf hin, daß es bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, zu einer chronischen Veränderung der Regulation des Plasmaleptinspiegels kommen könnte. Für eine weitere Klärung dieses überraschenden Befundes wären jedoch wiederholte Messungen in früheren Phasen der Adaptation an eine limitierte Futtermenge und zu verschiedenen Tageszeiten nötig.

#### **4.1.2. Abhängigkeit der Leptinwirkung vom Auftreten geregelter Stoffwechselabsenkungen der thermoregulatorischen Aktivität in der täglichen Ruhephase**

Eine Wirkung von Leptin auf den Energieumsatz war auf Grund der Stoffwechselstörungen zwar bei Tieren, denen das funktionelle Hormon fehlt, zu erwarten (Himms-Hagen et al. 1985), aber auch bei adulten Wildtyptieren ließen sich Stoffwechseleffekte des Leptins nicht ohne weiteres zweifelsfrei nachweisen. Untersuchungen an Ratten im Säuglingsalter wiesen erstmals daraufhin, daß die Stoffwechselwirkung des Leptins nur auf eine Stoffwechsellage beschränkt sein könnte, bei der es zu einer torporartigen Drosselung der thermoregulatorischen Aktivität kommt (Stehling et al. 1996, Stehling et al. 1997 b, Schmidt et al. 1997, Eiden et al. 2001). Entsprechend können die Stoffwechseleffekte von Leptin bei *ob/ob* Mäusen interpretiert werden, die ebenfalls bei normalen Haltungstemperaturen torporartige Zustände aufweisen (Himms-Hagen 1984, Himms-Hagen 1985, Gavrilova et al. 1999).

Bei vielen kleinen Säugetieren und Vögeln treten bei Kältebelastung und Nahrungsmangel Energieeinsparungen durch teilweise Aufgabe der Euthermie während der täglichen Ruhephase (Heldmeier und Steinlechner 1981, Geiser et al. 1998, Wang und Wolowyk 1987) auf. Bei mehrtägigem Fasten wurden geregelte Stoffwechsel- und Kerntemperaturabsenkungen unter das normale circadiane Minimum bei adulten Warmblütern bis zur Größe der Ratte (Sakurada et al. 2000) und der Taube (Graf und

Necker 1979) nachgewiesen. Diese moderaten Stoffwechselabsenkungen ähneln dem „daily torpor“ kleinerer Säugetiere insofern, daß es sich hierbei ebenfalls um keinen Zusammenbruch der Regulation handelt, sondern um eine vorübergehende Regelung auf erniedrigtem Niveau. Der Unterschied zum „daily torpor“, bei dem sich die Kerntemperatur der Umgebungstemperatur weitgehend annähert, ist also graduell und beruht nicht auf einer allgemein anerkannten Definition. Für Labormäuse wurde von Hudson und Scott (1979) eine Stoffwechselabsenkung um mehr als 25% unter die normalen Ruhewerte als Torpor definiert. Diese und ähnliche Definitionen leiden jedoch darunter, daß die Definition des „Normalwertes“ problematisch ist. Wird dagegen die Kerntemperatur zur Definition herangezogen, ergibt sich das Problem, daß je nach Umgebungstemperatur und Dauer der gleichen Stoffwechselabsenkung sehr unterschiedliche Kerntemperaturen erreicht werden. Um sich von willkürlichen Grenzziehungen zu lösen, wurde in dieser Arbeit im Zweifelsfall, z.B. zur Beschreibung des juvenilen Tagesrhythmus, der Begriff der torporartigen Absenkung verwendet. Geeigneter als die Verwendung eines definierten Schwellenwertes zur Definition von Torpor erscheint es in der vorliegenden Arbeit deshalb, die Frequenz anzugeben, mit der verschiedene Grenzwerte, z.B. von 10 W/kg und 5 W/kg, unterschritten werden. Darüber hinaus ist bei der in Abbildung 8 gewählten Darstellungsform die Häufigkeit des Auftretens von Stoffwechselwerten unter jeden beliebigen Grenzwert leicht ablesbar. Auf eine Erhebung von Körpertemperatur-Daten wurde in dieser Arbeit verzichtet, weil sie für den im Vordergrund stehenden energetischen Aspekt nicht wichtig sind und der Zusammenhang zwischen Sauerstoffverbrauch und Körperkerntemperatur bei Labormäusen von Hudson und Scott (1979) bereits detailliert untersucht worden ist.

Die hier zusammengefaßten Untersuchungen zeigen durch kontinuierliche Stoffwechselmessungen erstmals eine quantitativ bedeutsame Steigerung der Stoffwechselrate bei mit Leptin behandelten adulten Wildtyptieren, die ausschließlich auf einer Disinhibierung von torporartigen Zuständen in den täglichen Ruhephasen von Tieren mit limitierter Futtermittellieferung beruht. Im Gegensatz dazu wurden keinerlei Anzeichen für eine Steigerung der motorischen Aktivität durch Leptin oder überhaupt für eine Anhebung der Stoffwechselaktivität über den Normalwert bei Tieren mit *ad libitum* Futtermittellieferung beobachtet.

Die durch die Leptinbehandlung ausgelöste Stoffwechselsteigerung bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, kontrastiert bei den hier gezeigten Untersuchungen mit einer sogar geringfügigen Abnahme im Sauerstoffverbrauch der *ad libitum* gefütterten Tiere, die allerdings im Verbrauchsprofil der Tiere nicht in Erscheinung tritt, sondern sich erst bei der Betrachtung des täglichen Gesamtenergieumsatzes bemerkbar macht. Als Ursache dieser Stoffwechselreduktion kommt in Anbetracht der deutlichen Hemmung der Futteraufnahme eine verminderte Motoraktivität in Frage, da die Futteraufnahme selbst als energieverbrauchender Prozeß vermindert ist. Zum anderen sind Folgeprozesse, wie z.B. die verminderte Verdauungsaktivität, in Betracht zu ziehen, die zu einer Verminderung der obligatorischen diät-induzierten Thermogenese führen könnten (Girardier und Stock 1981). Dagegen ist zwar keine Reduktion der fakultativen, sympathisch vermittelten diät-induzierten Thermogenese unter Leptinbehandlung anzunehmen, jedoch gibt es aber offensichtlich auch keinerlei Hinweise auf die häufig vermutete Steigerung der sympathisch vermittelten Thermogenese über den Normalwert (Schmidt et al. 1997).

Offensichtlich spielen somit gerade bei Betrachtung der Leptinwirkung auf den Sauerstoffverbrauch die Nahrungsbedingungen eine besondere Rolle. So zwang erst die Reduktion des Nahrungsangebotes die Tiere zur energiesparenden Torporbildung und somit zu einem im Tagesverlauf gegenüber *ad libitum* versorgten Tieren reduzierten Sauerstoffverbrauch, der die Voraussetzung für das Eintreten der Stoffwechselwirkung des Hormons zu sein scheint. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen aber auch, daß das Verbrauchsniveau nicht generell angehoben wird, da das Aktivitätsniveau nahezu unbeeinflusst bleibt (Stehling et al. 1996, Döring et al. 1998 a). So erklären sich zum Teil auch die widersprüchlichen Aussagen über das Ausbleiben bzw. Auftreten von Stoffwechseleffekten (Halaas et al. 1997) daraus, daß in den früheren Untersuchungen nur punktuelle Messungen des Sauerstoffverbrauches für wenige Stunden ohne Berücksichtigung der Ruhe- bzw. Aktivitätsphasen der Tiere durchgeführt wurden und häufig fälschlicherweise der massenspezifische Sauerstoffverbrauch zu Grunde gelegt wurde.

Folgeuntersuchungen bei einem Marsupalier von ähnlicher Körpergröße (*Sminthopsis macroura*), der bei vorübergehendem Nahrungsentzug bei moderater Kältebelastung ausgeprägte Torporperioden zeigt, bestätigten die hier für die Labormaus gezogenen Schlüsse (Geiser et al. 1998). So wurde ebenfalls eine deutliche Verminderung der Torporperioden, aber keinerlei Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch oder die

Körperkerntemperatur im Tagesmaximum beobachtet. Diese Befunde an einer Marsupalierart weisen auf die entwicklungsgeschichtlich frühe Entstehung der disinhibitorischen Leptinwirkung auf die thermoregulatorische Energieeinsparung und ihre Unabhängigkeit vom Vorkommen des thermogenetisch aktiven BAT hin.

Eine wesentliche Voraussetzung für den Nachweis einer Leptinwirkung auf die Stoffwechselrate scheint das Vorliegen einer unter der Thermoneutralzone liegenden Umgebungstemperatur zu sein. Unter thermoneutralen Bedingungen treten bei Ratten im Säuglingsalter keine tagesperiodischen Veränderungen der Stoffwechselaktivität auf (Nuesslein-Hildesheim und Schmidt 1994). Unter diesen Bedingungen ließen sich auch keinerlei Stoffwechselwirkungen einer Leptinbehandlung nachweisen (Stehling et al. 1997 b). Ähnliche Beobachtungen wurden bei adulten sibirischen Hamstern unter thermoneutralen Bedingungen im Kurztag gemacht (Schmidt et al. 1997), obwohl diese Tiere unter diesen Bedingungen auch bei freiem Zugang zu Futter einen deutlichen Tagesgang der Körperkerntemperatur und der metabolischen Rate mit ausgeprägten Torporperioden zeigten (Heldmaier und Steinlechner 1981, Heldmaier et al. 1982). Jedoch weisen Untersuchungen der Körperzusammensetzung dieser Tiere nach einer zehntägigen Behandlung mit Leptin unter ähnlichen Versuchsbedingungen daraufhin, daß dennoch unter thermoneutralen Kurztag-Bedingungen eine Stoffwechselsteigerung unter Leptinbehandlung auftreten könnte (Klingenspor et al. 2000). Allerdings sind auch bei Mäusen bei Umgebungstemperaturen, die nur wenige Grad unter der Thermoneutralzone liegen, bereits Stoffwechseleffekte einer Leptinbehandlung nachweisbar (Steinbrück und Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse) und die Bestimmung der Thermoneutralzone bei Kleinsäugetern ist mit erheblichen Unsicherheiten verknüpft. Trotz dieser Unsicherheiten sprechen diese Befunde jedoch einheitlich dafür, daß Leptin auf jeden Fall nur unter solchen Umständen eine Stoffwechselwirkung zeigt, unter denen ohne Behandlung eine tagesperiodische Drosselung der Stoffwechselaktivität und Absenkung der Körperkerntemperatur unter das normale Tagesminimum auftritt.

## 4.2. Diskussion der experimentellen Ansätze

### 4.2.1. Diskussion der Applikationsform

Zur Ermittlung wirkungsvoller Dosierungen bezüglich eines Leptin-Effektes auf die Futtermittelaufnahme von Mäusen erwiesen sich Kurzzeitbehandlungen über einen Tag bei *ad libitum*-Fütterung als ausreichend. Dabei zeigte sich, daß durch eine Verteilung der gleichen Tagesdosis auf zwei Injektionen eine Steigerung der Wirksamkeit erreicht werden konnte (Pelley-Mounter et al. 1995). Trotz Unklarheit über eine konkrete Halbwertszeit des Hormons im Blutkreislauf (Cumin et al. 1996, Müller et al. 1997) haben die Kurzzeitversuche zeigen können, daß im Vergleich zur zweimaligen Injektion durch eine Verteilung der Tagesdosis auf vier Injektionen und somit eine Verkürzung der Zeit zwischen den Injektionen von 12 h auf 6 h keine weitere nennenswerte Effektsteigerung erzielt werden konnte. Darüber hinaus erwies sich die zweimalige Injektion als am praktikabelsten, da mit weiteren Injektionen auch häufigere Störungen der Tiere verbunden gewesen wären. Desweiteren fiel die Wahl der Applikationsform auf die subcutane Injektion (s.c.), die im Vorfeld mit der intravenösen (i.v.) und intraperitonealen (i.p.) Applikation verglichen wurde und sich bei wesentlich geringerer Streß-Belastung für die Tiere als gleichermaßen effektiv erwies. Da die Tiere durch die langen Vorbereitungsphasen an die Handhabung gewöhnt waren, führten die subcutanen Injektionen im Nacken zu keinen erkennbaren Streßreaktionen.

Da, wie oben diskutiert (s. 3.2.1.), nicht täglich Torporperioden auftraten, wurde für die Bestimmung von Leptineffekten auf den Sauerstoffverbrauch die Behandlungsdauer auf drei Tage ausgedehnt. Auf diese Weise konnten auch bei einer geringen N-Zahl die Häufigkeiten des Auftretens von Stoffwechselraten unter kritischen Schwellenwerten (Torporperioden) vor und nach den Leptinbehandlungen sinnvoll miteinander verglichen werden.

Der beträchtliche Aufwand in der Vorbereitungsphase machte es erforderlich, für die Kurzzeitversuche die Tiere wiederholt im Experiment einzusetzen. Dabei wurde allerdings darauf geachtet, daß die Tiere nach einem Versuchsdurchgang erst wieder normale Ausgangswerte der im Verlauf meßbaren Parameter, wie Körpermasse, Futtermittelaufnahme und Sauerstoffverbrauch, erreicht hatten, bevor ein neuer Versuchsdurchgang begann. Da die Tiere für die Bestimmung der Körperzusammensetzung getötet werden müssen, war es

aufgrund dieser Versuchsanordnung folglich nicht möglich, diese Parameter – insbesondere den Körperfettgehalt – zu bestimmen. Dementsprechend bestand keine Möglichkeit, anhand dieser Kurzzeitversuche eine Energiebilanz aufzustellen. Darüber hinaus erwies es sich für die Bestimmung der Körperzusammensetzung als sinnvoll, den Behandlungszeitraum auf zehn Tage auszudehnen, so daß sich minimale Effekte auf die verschiedensten Parameter aus dem Streubereich möglicher täglicher Schwankungen heraus aufsummieren konnten und somit quantitativ als tatsächlicher Effekt erfaßbar wurden.

Die Verwendung von mini-osmotischen Pumpen, die den Vorteil haben, daß sie über den ganzen Versuchszeitraum konstante Mengen an Leptin abgeben, wurde hier nicht in Betracht gezogen, da zu Beginn dieser Studie noch nicht klar war, wie lange das Peptid bei Körpertemperatur im Inneren der Pumpen stabil und funktionsfähig bleibt. Die Injektionen dagegen boten den Vorteil, daß das verwendete Leptin bis zu den Injektionszeiten gekühlt gelagert werden konnte. Darüber hinaus war so der Vergleich mit den Behandlungen in den Kurzzeitversuchen möglich, für die eine Verwendung von MOPs nicht in Frage kam.

#### **4.2.2. Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsserien**

Um die Vergleichbarkeit der Daten innerhalb der Versuchsserien zu ermöglichen, wurden zunächst die Behandlungsgruppen innerhalb einer jeden Versuchsgruppe miteinander verglichen. Die Differenzbildung für jedes einzelne Tier zum Kontrollmittelwert normierte die Daten innerhalb jeder Versuchsgruppe unabhängig von unterschiedlichen Ausgangswerten. Diese Form der Auswertung erleichterte insbesondere deshalb den Vergleich innerhalb einer Versuchsserie, da erhebliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden, da nicht immer Gruppen aus hauseigener Zucht zur Verfügung standen. Bei Kauf von einer externen Zucht ist damit zu rechnen, daß die Tiere unter anderen Haltungsbedingungen (Ta, Futter, usw.) aufgewachsen sind als die übrigen Tiere. Ein solcher Unterschied machte sich jedoch lediglich in den Absolutwerten, insbesondere in einem veränderten Körperfettgehalt, bemerkbar. Die ermittelten Unterschiede zum Kontrollmittel lagen dagegen in der Größenordnung der übrigen Tiere. Die Verwendung von einer Gruppe C57BL/6J-Mäusen diente ursprünglich dem Zweck festzustellen, ob diese Tiere eher zur Torporbildung neigen als die Albinomäuse. Da sich

diese Tiere jedoch in Bezug auf sämtliche erfaßten Parameter wie die BalbC-Tiere in der gleichen Versuchsserie verhielten, wurden diese in eine gemeinsame Betrachtung einbezogen. Desweiteren wurden bei Vergleichen der Unterschiede in den Absolutwerten zwischen den Versuchsgruppen diese mittels zwei-faktorieller Varianzanalyse berücksichtigt, indem die Versuchsgruppe neben der Behandlungsgruppe als Faktor einfloß. Die Unterschiede zwischen Leptin- und Kontroll-Behandlungsgruppe aus den Langzeitversuchen wurden für die Ermittlung der Energiebilanz herangezogen. Im Falle der für die Futteraufnahme und die MR berechneten Mittelwerte wurden zusätzlich mögliche Veränderungen in den Behandlungsgruppen zwischen Vorlauf und Behandlungsperiode berücksichtigt.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wären problematisch gewesen, wenn statistische Vergleiche zwischen den beiden Fütterungsbedingungen notwendig gewesen wären. Da der Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen jedoch qualitativer - d.h. ein Einfluß von Leptin trat auf oder trat nicht auf - und nicht quantitativer Natur war, stellte dies jedoch kein Problem dar.

#### **4.2.3. Was ist das geeignete Maß für die Quantifizierung der Leptineffekte ?**

##### **4.2.3.1. Die Körpermasse als problematische Bezugsgröße**

Die Körpermasse der Tiere ist neben der Futteraufnahme eine leicht meßbare Bezugsgröße und wird sehr häufig zur Quantifizierung der Leptineffekte verwendet. Auch diese Studie zeigt, daß die Körpermasse bei den *ad libitum* versorgten Tieren entsprechend der verminderten Nahrungsaufnahme durch eine Leptinbehandlung abnimmt. Das Ausbleiben jeglicher Veränderung in der Körpermasse nach zehntägiger Behandlung mit Leptin bei Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, zeigt jedoch die Problematik der Verwendung dieses Maßes für die Beurteilung einer Leptinwirkung. Die deutliche Veränderung der Körperzusammensetzung in dieser Behandlungsgruppe spiegelt sich nicht in der Körpermasse wider.

Studien an juvenilen Ratten haben gezeigt, daß die nach einer zehntägigen Behandlung mit Leptin festgestellte Reduktion der Lebendmasse zu 15 % auf verringerten Magen- und Darm-Füllungszuständen beruht und weitere 30 % auf Unterschiede im



Körperwassergehalt zurückzuführen sind (Eiden et al. 2001). Lediglich 40 % der Unterschiede in der Körpermasse waren auf Unterschiede im energetisch entscheidenden Körperfettgehalt zurückzuführen. Obwohl bei der hier ausgewerteten Feuchtmasse die durch Magen-, Darm- und Blasen-Füllung auftretenden Unterschiede ausgeschlossen sind, erweist sich diese als Bezugsgröße ähnlich problematisch, da auch hier die Unterschiede im Körperwasser noch nicht berücksichtigt sind.

Bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, steht insbesondere der Unterschied von 45% (ca. 0,8 g) Körperfett im Vergleich zu den Kontrolltieren im Widerspruch zum fehlenden Unterschied in der terminalen Körpermasse. Sivitz et al. haben aber 1997 zeigen können, daß mit Leptin behandelte Ratten unter Fasten vermehrt Wasser aufnehmen und weniger Urin abgeben. Obwohl in den hier vorgelegten Studien weder die Wasseraufnahme noch die Urinabgabe protokolliert wurden, stehen die Daten des endgültigen Körperwassergehaltes der im Futter limitiert gehaltenen Mäuse mit diesen Beobachtungen im Einklang. So bietet der Anstieg im Körperwassergehalt auch eine Möglichkeit, den zeitweiligen Anstieg der Körpermasse im Verlauf der zehntägigen Leptinbehandlung zu erklären.

#### **4.2.3.2. Die Körperfettmasse als entscheidende Bezugsgröße**

Da es bei den Betrachtungen der Leptineffekte in erster Linie um den energetischen Aspekt geht, liegt es nahe, unter diesen Bedingungen nur den energetisch relevanten Parameter Körperfett für die Beurteilung der Effekte in Betracht zu ziehen. Dies gilt insbesondere, da die FFDM von einer Leptinbehandlung weitgehend unbeeinflusst bleibt (vorliegende Daten, Pellemounter et al. 1995, Campfield et al. 1995, Halaas et al. 1995, Eiden et al. 2001). Dementsprechend lassen sich die Unterschiede im Körperfettgehalt energetisch präzisieren und im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch für eine Energiebilanzierung heranziehen. Zusätzlich muß allerdings der Frage nachgegangen werden, durch welche Effektoren die Änderungen in der Körperfettmasse hervorgerufen werden.

#### 4.2.3.3. Der Sauerstoffverbrauch als Maß für die Leptinwirkung: absolute vs. massenspezifische MR

Während die Bestimmung der Futtermittelaufnahme recht einheitlich und ohne größere methodische Probleme in verschiedenen Studien einen Nachweis einer Leptinwirkung auf die Energieaufnahme erlaubte, ergaben sich bei der Ermittlung von Stoffwechseleffekten große Diskrepanzen. Neben den bereits einleitend erwähnten Problemen, wie z.B. die Beschränkung auf nur punktuell durchgeführte Kurzzeitmessungen, ergaben sich vor allem interpretatorische Probleme bei der Beurteilung der Stoffwechseleffekte. Zum einen wurden die Sauerstoffverbrauchswerte auf die Körpermasse der Tiere bezogen, zum anderen wurde der absolute Sauerstoffverbrauch unabhängig von der Körpermasse energetisch betrachtet. In der vorliegenden Arbeit war der auf die Körpermasse bezogene Sauerstoffverbrauch für die Betrachtung der Häufigkeitsverteilung aufgetretener Meßwerte dieser massenspezifischen MR sinnvoll, da es bei den im Futter limitiert gehaltenen Tieren nicht zu einer Veränderung der Körpermasse gekommen ist. Sobald jedoch eine Veränderung der Körpermasse in Folge einer Leptinbehandlung eintritt, wird die Verwendung der massenspezifischen MR problematisch (Himms-Hagen 1997). So weist der in dieser Studie gezeigte Verlauf der massenspezifischen MR der mit Futter *ad libitum* versorgten Tiere keinen veränderten Verlauf während einer zehntägigen Leptinbehandlung auf, bei Betrachtung des für die Energiebilanz entscheidenden absoluten Sauerstoffverbrauches ist dagegen eine deutliche Abnahme zu erkennen.

Zur Beurteilung von quantitativen Effekten des Leptins auf den Energieumsatz erweist sich somit die Betrachtung des absoluten Sauerstoffverbrauches als zwingend notwendig. Dies gilt auch für energetische Betrachtungen der Unterschiede zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Die massenspezifische MR der Tiere, die eine limitierte Futtermenge erhielten, erweckt zunächst den Eindruck, diese Tiere hätten einen höheren Stoffwechsel als die *ad libitum* gefütterten Tiere. Ein solcher Bezug ist völlig irreführend, da die Körpermasse der Tiere mit limitierter Futtermittelversorgung wesentlich niedriger ist, wobei sich die niedrigere Körpermasse nur durch eine niedrigere Fettmenge ergibt, während die fettfreie Trockenmasse der Tiere beider Fütterungsgruppen nahezu gleich ist. Auch der Bezug des Sauerstoffverbrauches auf die „lean body mass“ würde letztlich zu Fehlschlüssen führen, da diese Tiere zwar die gleiche FFDM, aber einen höheren Anteil des nicht stoffwechselaktiven Wassers aufweisen. Bei Betrachtung des absoluten Sauerstoffverbrauches zeigt sich dagegen, daß der Energieverbrauch der Tiere mit

limitierter Futtermittellversorgung um 5-10% niedriger war als der der Tiere, die Futter *ad libitum* erhielten. Somit wird eine für die Energiebilanz erhebliche Energieeinsparung deutlich.

#### 4.2.4. Der Plasmaleptinspiegel als Maß für die verwendeten Leptindosierungen

Die Betrachtung des Plasmaleptinspiegels wurde auf die Kontrolltiere beschränkt, da durch die Bolusinjektionen bei den mit Leptin behandelten Tieren kein stabiler Plasmaleptinspiegel ermittelt werden konnte. Ein größerer Abstand zwischen der letzten Leptininjektion und dem Tötungszeitpunkt hätte zwar die Ermittlung eines endogenen Plasmaleptinspiegels auch der mit Leptin behandelten Tiere ermöglicht, allerdings wäre in dieser Zeit eine daraus resultierende Veränderung der Futteraufnahme und des Sauerstoffverbrauches nicht auszuschließen gewesen. Zudem hätten auch auf diese Art keine Aussagen über den Zeitverlauf oder das zeitliche Mittel der Leptinspiegel der behandelten Tiere gemacht werden können, die den beobachteten Effekten zugrunde liegen.

Zur Beurteilung der verwendeten Dosierungen mußte also auf Literaturbefunde zurückgegriffen werden. Studien an juvenilen Ratten unterschiedlicher Altersstufen, bei denen der Einfluß von Leptin auf den Körperfettgehalt untersucht wurde (Eiden et al. 2001), haben gezeigt, daß bei kontinuierlicher Applikation von rekombinantem Leptin über einen breiten Bereich bei logarithmischer Skalierung der Dosis eine lineare Erhöhung des Plasmaleptinspiegels erfolgt. Außerdem ergab sich über den gesamten untersuchten Bereich von 5 - 100 pmol · g<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> eine log-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung. Eine log-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung wurde ebenfalls bei zweimal täglichen Injektionen im Bereich zwischen 5 und 600 pmol · g<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> nachgewiesen (Eiden et al. 2001, Stehling et al. 1997 a). Obwohl die niedrigste der hier verwendeten Dosierungen von 20 pmol · g<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> deutlich näher an den bei juvenilen Ratten ermittelten physiologischen Bereich heran kam (Eiden et al. 2001) als die für die Langzeitbehandlungen verwendete Dosis von 200 pmol · g<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, wurde gerade diese eher pharmakologische Dosis gewählt, um sicher zu gehen, einen deutlich meßbaren Effekt zu erhalten. Aufgrund der sowohl in detaillierten Studien bei juvenilen Ratten (Eiden et al. 2001), wie in dieser Arbeit in den Kurzzeitversuchen beobachteten log-linearen Dosis-Wirkungsbeziehung, die den Bereich

von 20 - 600 pmol· g<sup>-1</sup>· d<sup>-1</sup> umspannt, sind aus den bei den Langzeitversuchen beobachteten Effekten bei einer relativ hohen Dosierung jedoch Rückschlüsse auf die Wirkungen im physiologischen Bereich möglich.

### **4.3. Quantitative Betrachtung der Leptinwirkung**

Die vorliegende Untersuchung zeigt erstmals sowohl eine Dosis-Wirkungsbeziehung für die Leptinwirkung auf die Futteraufnahme wie auf den Energieverbrauch auf (Döring et al. 1998a). Eine quantitative Beziehung zur resultierenden Veränderung des Körperfettgehaltes wurde hier zudem durch die Bestimmung des Gesamtkörperfettgehaltes nach einer zehntägigen Leptinbehandlung mit einer Dosis von 200 pmol· g<sup>-1</sup>· d<sup>-1</sup> hergestellt. Die Reduktion des Körperfettgehaltes um etwa 45% bei dieser Dosis weist auf eine ähnliche Empfindlichkeit bei den adulten Mäusen wie bei Ratten in der zweiten Lebenswoche hin, für die ebenfalls detaillierte Untersuchungen der Beeinflussung des Körperfettgehaltes durch eine zehntägige Leptinbehandlung mit zweimal täglicher Injektion vorliegen. Da es bei kontinuierlicher Applikation zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve kommt, sind direkte Vergleiche mit den Effekten einer Behandlung älterer Jungtiere mit mini-osmotischen Pumpen nicht möglich. In den Arbeiten von Halaas et al. (1997) und Harris et al. (1998) wurden genaue Bestimmungen einer Dosisabhängigkeit der Leptinwirkung bei adulten Wildtypmäusen in einem breiten Bereich durch den Einsatz von MOPs vorgenommen. Allerdings war die Beurteilung der Effekte eingeschränkt, da nur in einer der beiden Arbeiten, in der nur die Dosisabhängigkeit der prozentualen Veränderungen der Körpermasse untersucht wurde (Halaas et al. 1997), eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden konnte. In der zweiten Arbeit (Harris et al. 1998), in der zwar nicht der Gesamtkörperfettgehalt sondern die Größe der einzelnen Fettdepots bestimmt wurde, ließ sich dagegen eine Leptinwirkung bei Wildtypmäusen nur bei sehr hohen Dosen nachweisen. Die Diskrepanz zwischen den beiden Arbeiten läßt sich durch die Unklarheit über viele methodische Details nicht nachvollziehen. Während auch aus den meisten anderen Veröffentlichungen über adulte Tiere keine quantitativen Dosis-Wirkungsbeziehungen für den Körperfettgehalt von Wildtyptieren ableitbar sind, ergaben Untersuchungen mit zweimal täglichen Injektionen bei Hamstern im Langtag ebenfalls eine ähnliche Empfindlichkeit wie bei Ratten in der zweiten Lebenswoche (Klingenspor et al. 2000, Eiden et al. 2001), während die Tiere im

Kurztag bereits bei einer Dosis von etwa  $10 - 15 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  eine Reduktion des Körperfettgehaltes um 40% zeigten (Klingenspor et al. 2000).

#### **4.4. Kontinuum der Leptinwirkung in Bezug auf die Regelung des Körperfettes**

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot durch eine Leptinbehandlung einerseits die Nahrungsaufnahme gehemmt und andererseits der thermoregulatorische Energieumsatz gesteigert werden kann. Bemerkenswert ist, daß bei den durch die Unterschiede in der Futtermittellieferung gegebenen Unterschieden der Fettdepots in beiden Gruppen die gleiche Leptindosierung zu vergleichbaren prozentualen Abnahmen im Körperfettgehalt führte, obwohl unterschiedliche Effektorsysteme (Veränderung der Nahrungsaufnahme bzw. des Energieverbrauches) in Erscheinung traten. Das Ausbleiben eines Effektes auf die Futteraufnahme bei limitierter Futtermittellieferung zeigt, wie zuvor das Ausbleiben eines Leptin-Effektes auf den Sauerstoffverbrauch bei den *ad libitum* gefütterten Tieren, daß das Hormon auf jeweils einen der hier beschriebenen Parameter wirken kann, ohne daß ein Effekt auf den anderen Parameter nachweisbar ist. Das bedeutet, daß Trugschlüsse möglich sind, falls nur ein Parameter als Maß für eine Leptinwirkung verwendet wird. Zudem zeigten Untersuchungen an jungen Ratten nach dem Absetzen, daß bei Leptin-Dosierungen, die eine hochsignifikante Erniedrigung des Körperfettgehaltes um 30% bewirkten, nur kleine, nicht signifikante Änderungen der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauches nachweisbar waren. Offensichtlich können sich also minimale, einzeln im Streuungsbereich nicht nachweisbare Änderungen jeweils eines der beiden Effektorsysteme über entsprechend lange Zeiträume zu einer massiven Beeinflussung des Körperfettgehaltes addieren (Eiden et al. 2001). Insgesamt zeigen diese Befunde deutlich, wie wichtig die Veränderung des Körperfettgehaltes zur quantitativen Beurteilung der Effektivität einer Leptinbehandlung auf den Energiehaushalt ist.

#### **4.5. Hinweise für die zentralnervöse Vermittlung der Leptinwirkung**

Schon bei den anfänglichen Betrachtungen des Leptins ausschließlich als Sättigungssignal ging man primär von einer zentralnervösen Vermittlung aus. Mittlerweile sind allerdings

mehrere Rezeptorsubtypen in der Peripherie entdeckt und beschrieben worden (Tartaglia et al. 1995, Elmquist et al. 1997), und auch die für die Signalübermittlung verantwortlich gemachte lange Form findet sich auch in vielen Gewebetypen der Peripherie (Hoggard et al. 1997). Dementsprechend wurde auch eine Beteiligung peripherer Effekte an der Regulation der Nahrungsaufnahme in Betracht gezogen. So könnte z.B. der appetithemmende Leptineffekt sekundär zur Wirkung des Hormons auf die Fettmobilisierung sein (Rafael und Herling 2000).

Überzeugender sind allerdings nach wie vor die Hinweise auf die direkte Wirkung von Leptin auf zentralnervöse Neurone als Grundlage seiner Effekte auf die Nahrungsaufnahme. Daß Leptin zentral als Hemmer der Nahrungsaufnahme wirken kann, wurde durch i.c.v. - Applikation des Peptids demonstriert (Stephens et al. 1995). Dabei ist die wirksame Dosis um ein vielfaches geringer als die minimale wirksame periphere Dosis. Als zentraler Wirkungsort erscheint vor allem der Hypothalamus als wahrscheinlich, wobei es speziell für den Nucleus arcuatus (ARC) als Zielstruktur übereinstimmende Hinweise gibt, die mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen gewonnen wurden (Rauch et al. 2000, Hübschle et al. 2000).

Für eine primäre zentralnervöse Vermittlung des disinhibitorischen Effektes von Leptin auf die thermoregulatorische Energieeinsparung sprechen sowohl theoretische Überlegungen als auch experimentelle Befunde. Die Tatsache, daß eine durch Leptin induzierbare Stoffwechselsteigerung nur auf die Disinhibition eines torporartig erniedrigten Stoffwechsels zurückzuführen ist (Stehling et al. 1996, Geiser et al. 1998, Döring et al. 1998 a), schließt eine primär periphere Wirkung aus, denn es gibt keine Hinweise darauf, daß circadiane Anpassungen der Körperkerntemperatur bzw. der thermoregulatorischen Wärmebildung auf einer peripher generierten Rhythmik beruhen könnten. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Hypometabolismus bei *fa/fa*-Zuckerratten, bei denen durch einen genetischen Defekt der Leptinrezeptor funktionsunfähig und somit Leptin wirkungslos ist, nicht auf einem peripheren Defekt des BAT als wesentlichem thermoregulatorischen Organ beruht, sondern vielmehr auf einer gestörten sympathisch-adrenergen Ansteuerung des BAT, also auf einem zentralnervösen Defizit (Körtner et al. 1994, Krief und Bassin 1991).

Vor allem aber ist die durch verschiedene Effektoren bedingte identische prozentuale Reduktion der Körperfettmasse, die hier demonstriert wurde, nicht ohne eine zentrale

---

Verarbeitung des Leptinsignals erklärbar. Obwohl die Reaktionsmuster bei Tieren mit *ad libitum* bzw. limitierter Futtermittellversorgung zunächst völlig verschieden wirken, resultieren sie in einer analogen Wirkung auf die Körperfettreserven. Diese Beobachtung bestätigt somit eindrucksvoll die Rolle von Leptin als dem lange postulierten, vom Fettgewebe gebildeten und zentral registrierten lipostatischen Signal (Kennedy 1953, Zhang et al. 1994). Jedoch zeigt die überraschende Aufhebung der Proportionalität zwischen Plasmaleptinspiegel und Körperfettgehalt bei den Tieren mit limitierter Futtermittellversorgung, daß es der weiteren experimentellen Klärung bedarf, wie das zeitliche Muster des endogen freigesetzten Leptins geregelt wird, um unter wechselnden Ernährungsbedingungen seine Funktion als Signalmolekül für den Körperfettgehalt erfüllen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Mit der Entdeckung des Hormons Leptin ist 1994 ein im Blut zirkulierender Stoff gefunden worden, der vor allem im weißen Fettgewebe produziert wird und Informationen über die körpereigenen Fettresourcen an das Gehirn weiterleitet. Die Rolle von Leptin als „Sättigungssignal“ war zu Beginn dieser Arbeit bereits mehrfach belegt, allerdings herrschte noch Unklarheit über einen physiologisch relevanten Einfluß auf die Regulation des Körperfettgehaltes bei Wildtyp-Labortieren. Ein Einfluß von Leptin auf die Regulation der Energieabgabe war ebenfalls noch umstritten. Das Ziel dieser Arbeit war es somit, Effekte von Leptin auf die Nahrungsaufnahme einerseits und den Sauerstoffverbrauch andererseits dosisabhängig zu erfassen und die Auswirkungen auf die Gesamtkörperfettmasse zu quantifizieren. Dazu wurden Untersuchungen an adulten Wildtyp-Mäusen durchgeführt, die entweder Futter *ad libitum* oder nur ca. 80% der normalerweise aufgenommenen Futtermenge erhielten.

Die Tiere wurden während der Versuche bei 22-24°C und einem 10:14 h Licht/Dunkel-Zyklus einzeln in Kunststoffbehältern gehalten, so daß eine kontinuierliche Messung des Sauerstoffverbrauches möglich war. Zudem wurden Futteraufnahme und Körpermasse täglich durch Wägung bestimmt. Sobald sich nach einer mehrwöchigen Vorlaufphase stabile Ausgangsbedingungen ausgebildet hatten, wurden Leptin-Injektionen (zwischen 20 und 600 pmol · g<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, s.c.) zweimal täglich zu Beginn der Licht- und Dunkelphase gegeben, nachdem Vorversuche eine deutlich bessere Wirksamkeit bei der Verteilung der Tagesdosis auf zwei Injektionen gezeigt hatten.

Unter einer dreitägigen Leptinbehandlung ergab sich bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine dosisabhängige Reduktion der Futteraufnahme, jedoch keine Änderung der metabolischen Rate. Bei den Tieren mit limitierter Futtermenge führte selbst die höchste Dosis nicht zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, obwohl die im Mittel aufgenommene Menge unter diesen Bedingungen deutlich über der der Tiere lag, die Futter *ad libitum* erhielten. Andererseits ergab sich bei den Tieren, die eine limitierte Futtermenge erhielten, ein dosisabhängiger Anstieg der metabolischen Rate. Dieser beruhte ausschließlich auf einer Unterdrückung von torporartigen Stoffwechselabsenkungen, die bei limitierter Nahrungsversorgung am Ende der Dunkelphase (Beginn der Ruhephase) auftraten. Ein Einfluß auf den Energieumsatz



während der Aktivitätsphasen war nicht festzustellen. Somit erhöht Leptin nicht generell den Energieumsatz, sondern hemmt selektiv nur die torporartigen Stoffwechsellenkungen während der Ruhephasen.

Um einen meßbaren Effekt auf die Körperzusammensetzung zu erzielen, wurde die Behandlung mit einer Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  auf zehn Tage ausgedehnt. Bei diesen Langzeitversuchen bestätigte sich nicht nur das Fehlen einer Stoffwechselerhöhung bei den *ad libitum* gefütterten Tieren, sondern es zeigte sich sogar ein leichter signifikanter Abfall der MR. Bei den im Futter limitiert gehaltenen Tieren kam es auch bei längerer Behandlungsdauer zu einem deutlichen Anstieg der täglichen Energieumsatzes aber wiederum nicht zu einer signifikanten Veränderung der Futteraufnahme.

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Trocknung und einem Chloroform-Extraktionsverfahren zeigte, daß bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine Abnahme des Körperfettgehaltes um 43% gegenüber den Kontrolltieren zu verzeichnen war. Trotz der niedrigeren Gesamtkörperfettmasse der im Futter limitiert gehaltenen Tiere, kam es bei diesen während der Behandlung ebenfalls zu einer vergleichbar starken prozentualen Abnahme des Körperfettgehaltes um 45% im Vergleich zu ihren Kontrolltieren. Die fettfreie Trockenmasse blieb dagegen von der Leptinbehandlung unbeeinflusst. Auf Grund von unterschiedlichen Veränderungen im Wassergehalt zeigte die Körpermasse nur bei den *ad libitum* gefütterten Tieren eine signifikante Abnahme (9%), während die Körpermasse der Tiere mit limitierter Futtermittellversorgung unverändert blieb. Die Befunde machten außerdem deutlich, daß die Erfassung des Energieumsatzes zu Fehleinschätzungen führen kann, wenn er auf die Körpermasse oder auf die fettfreie Körpermasse bezogen wird; nur durch die Erfassung der Änderungen des Gesamtsauerstoffverbrauches können die Leptineffekte auf die Energiebilanz korrekt ermittelt werden.

Der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis der Beschränkung der Leptinwirkung auf eine Stoffwechsellenthemmung während der Ruhephasen sowie einer prozentual gleichen Wirkung auf die Körperfettmasse, die in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot alternativ über eine Verminderung der Futteraufnahme bzw. eine Erhöhung des Energieverbrauches zustande kommt, sind nicht ohne eine zentrale Koordination der Leptineffekte im Sinne einer Regulation der Größe der Fettspeicher zu erklären. Insgesamt belegen die aus Beobachtungen an adulten, normalgewichtigen Wildtypmäusen abgeleiteten Schlußfolgerungen somit eindrucksvoll die physiologische Rolle von Leptin als dem lange

postulierten, vom Fettgewebe gebildeten und zentral registrierten lipostatischen Signal, auch wenn es bisher unklar ist, wie das zeitliche Muster des endogen gebildeten Hormons so geregelt wird, daß es dieser Rolle gerecht werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

**Ahima, R.S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier und J.S. Flier.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252, 1996.

**Ahima, R.S., J. Dushay, S.N. Flier, D. Prabakaran und J.S. Flier.** Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *Journal of Clinical Investigation* 99: 391-395, 1997.

**Ahima, R.S., D. Prabakaran und J.S. Flier.** Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation* 101: 1020-1027, 1998.

**Ahima, R.S., C.B. Saper, J.S. Flier und J.K. Elmquist.** Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21: 263-307, 2000.

**Ahren, B., S. Mansson, R.L. Gingerich und P.J. Havel.** Regulation of plasma leptin in mice – influence of age, high-fat diet, and fasting. *American Journal of Physiology* 42: R-113-119, 1997.

**Banks, W.A., A.J. Kastin, W. Huang, J.B. Jaspan und L.M. Maness.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305-311, 1996.

**Becker, D.J., L.N. Ongemba, V. Brichard, J.C. Henquin und S.M. Brichard.** Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. *FEBS Letters* 371: 324-328, 1995.

**Bocquier, F., M. Bonnet, Y. Faulconnier, M. Guerre-Millo, P. Martin und Y. Chilliard.** Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reproduction, Nutrition, Development* 38: 489-498, 1998.

**Boden, G., X. Chen, M. Mozzoli und I. Ryan.** Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81: 3419-3423, 1996.

**Brownlee, K.A.** Statistical theory and methodology in science and engineering. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney, 1965.

**Campfield, L.A., F.J. Smith, Y. Guisez, R. Devos und P. Burn.** Recombinant mouse ob protein – evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549, 1995.

**Campfield, L.A., F.J. Smith und P. Burn.** The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Hormone & Metabolic Research* 28: 619-632, 1996.

**Caro, J.F., J.W. Kolaczynski, M.R. Nyce, J.P. Ohannesian, I. Opentanova, W.H. Goldman, R.B. Lynn, P.L. Zhang, M.K. Sinha und R.V. Considine.** Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161, 1996.

**Casanueva, F.F. und C. Dieguez.** Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 20: 317-363, 1999.

**Chehab, F.F., M.E. Lim und R. Lu.** Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 12: 318-320, 1996.

**Chehab, F.F., K. Mounzih, R. Lu und M.E. Lim.** Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275: 88-90, 1997.

**Coleman, D.L.** Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9: 294-298, 1973.

**Considine, R.V. und J.F. Caro.** Leptin and the regulation of body weight. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29: 1255-1272, 1997.

**Cumin, F., H.P. Baum und N. Levens.** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 20: 1120-1126, 1996.

**De Vos, P., R. Saladin, J. Auwerx und B. Staels.** Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *Journal of Biological Chemistry* 270: 15958-15961, 1995.

**Dessolin, S., M. Schalling, O. Champigny, F. Lonnqvist, G. Ailhaud, C. Dani und D. Ricquier.** Leptin gene is expressed in rat brown adipose tissue at birth. *FASEB Journal* 11 (5): 382-387, 1997.

**Döring, H., K. Schwarzer, B. Nuesslein-Hildesheim und I. Schmidt.** Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 22: 83-88, 1998 a.

**Döring, H., K. Schwarzer und I. Schmidt.** Unterschiedliche Effektorsysteme vermitteln gleiche Leptinwirkung auf den Körperfettgehalt von Mäusen. *Akt. Ernähr. Med.* 23: 247, 1998 b.

**Drazen, D.L., L.J. Kriegsfeld, J.E. Schneider und R.J. Nelson.** Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod. *American Journal of Physiology* 278: R1401-R1407, 2000.

**Eiden, S., G. Preibisch und I. Schmidt.** Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *Journal of Physiology* 530.1: 131-139, 2001.

**Elmqvist, J.K., R.S. Ahima, E. Maratos-Flier, J.S. Flier und C.B. Saper.** Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138, 839-842, 1997.

- Emilsson, V., Y.L. Liu, M.A. Cawthorne, N.M. Morton und M. Davenport.** Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46: 313-316, 1997.
- Fehmann, H.C., C. Peiser, H.P. Bode, M. Stamm, P. Staats, C. Hedetoft, R.E. Lang und B. Goke.** Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* 18: 1267-1273, 1997.
- Flier, J.S.** What's in a name ? In search of leptins physiologic role. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 1407-1413, 1998.
- Frederich, R.C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B.B. Lowell und J.S. Flier.** Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine* 1: 1311-1314, 1995.
- Frühbeck, G., M. Aguado und J.A. Martinez.** In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 240: 590-594, 1997.
- Gavrilova, O., L.R. Leon, B. Marcus-Samuels, M.M. Mason, A.L. Castle, Refetoff, C. Vinson und M.L. Reitman.** Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14623-14628, 1999.
- Geiser, F., G. Körtner und I. Schmidt.** Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *American Journal of Physiology* 275: R1627-R1632, 1998.
- Gettys, T.W., P.J. Harkness und P.M. Watson.** The  $\beta_3$ -adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137: 4054-4057, 1996.
- Girardier L. und M.J. Stock.** *Mammalian thermogenesis*. Eds. Girardier, L., Stock, M.J., Chapman and Hall, London, New York 1981.
- Graf, R. und R. Necker.** Cyclic and non-cyclic variations of spinal cord temperature related with temperature regulation in pigeons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 380: 215-220, 1979.
- Grunfeld, C., C. Zhao, J. Fuller, A. Pollack, A. Moser, J. Friedman und K.R. Feingold.** Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2152-2157, 1996.
- Halaas, J.L., K.S. Gajiwala, M. Maffei, S.L. Cohen, B.T. Chait, D. Rabinowitz, R.L. Lallone, S.K. Burley und J.M. Friedman.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546, 1995.
- Halaas, J.L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein, D.A. Denton und J.M. Friedman.** Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 94: 8878-8883, 1997.

**Harris, R.B.S., J. Zhou, S.M. Redmann Jr., G.N. Smagin, S. R. Smith, E. Rodgers und J.J. Zachwieja.** A leptin dose-response study in obese (*ob/ob*) and lean (+/?) mice. *Endocrinology* 139, 8-19, 1998.

**Hassink, S.G., E. Delancey, D.V. Sheslow, S.M. Smithkirwin, D.M. Oconnor, R.V. Considine, I. Opentanova, K. Dostal, M.L. Spear, K. Leef, M. Ash, A.R. Spitzer und V.L. Funanage.** Placental leptin - an important new growth factor in intrauterine and neonatal development. *Pediatrics* 100(1): E11-E16, 1997.

**Heldmaier G. und S. Steinlechner.** Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Oecologia* 48: 265-270, 1981.

**Heldmaier G., S. Steinlechner und J. Rafael.** Nonshivering thermogenesis and cold resistance during seasonal acclimatization in the Djungarian hamster. *Journal of Comparative Physiology B*149: 1-9, 1982.

**Herreid C.F. und K. Schmidt-Nielsen.** Oxygen consumption, temperature and water loss in bats from different environments. *American Journal of Physiology* 211(5): 1108-1112, 1966.

**Himms-Hagen, J.** Nonshivering thermogenesis. *Brain Research Bulletin* 12(2): 151-160, 1984.

**Himms-Hagen, J.** Food restriction increases torpor and improves brown adipose tissue thermogenesis in *ob/ob* mice. *American Journal of Physiology* 248: E531-E539, 1985.

**Himms-Hagen, J.** On rising energy expenditure in *ob/ob* mice. *Science* 276: 1132, 1997.

**Hoggard, N., L. Hunter, J.S. Duncan, L.M. Williams, P. Trayhurn und J.G. Mercer.** Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Science* 94: 11073-11078, 1997.

**Hudson, J. W.** Shallow daily torpor: A thermoregulatory adaptation. In: *Strategies in the cold: natural torpidity and thermogenesis*. Eds. L. C. Wang and J. W. Hudson. New York and London, Academic: 67-108, 1978.

**Hudson, J. W. und I. M. Scott.** Daily torpor in the laboratory mouse, *mus musculus* var. albino. *Physiological Zoology* 52, 205-218, 1979.

**Hübschle, T., E. Thom, S. Klaus, W. Meyerhof und J. Roth.** IL-6-induced nuclear translocation of Stat-3-immunoreactivity in the rat brain and its role in fever mediation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 439 Suppl. 6: R-419, 2000.

**Kamohara, S., R. Burcelin, J.L. Halaas, J.M. Friedman und M.J. Charron.** Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377, 1997.

**Kennedy, G.C.** The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London* 140: 578-592, 1953.

**Klingenspor, M., A. Dickopp, G. Heldmaier und S. Klaus.** Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS Letters* 399: 290-294, 1996.

- Klingenspor, M., H. Niggemann und G. Heldmaier.** Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Journal of Comparative Physiology B* 170: 37-43, 2000.
- Kolaczynski, J.W., R.V. Considine, J. Ohannesian, C. Marco, I. Opentanova, M.R. Nyce, M. Myint und J.F. Caro.** Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45: 1511-1515, 1996.
- Körtner, G., O. Petrova, S. Vogt und I. Schmidt.** Sympathetically and nonsympathetically mediated onset of excess fat deposition in Zucker rats. *American Journal of Physiology* 267: E947-E953, 1994.
- Krief, S. und R. Bazin.** Genetic Obesity: is the defect in the sympathetic nervous system? A review through developmental studies in the preobese rat. *Genetic Obesity* 198: 528 – 538, 1991.
- Levin, N., C. Nelson, A. Gurney, R. Vandlen und F. Desauvage.** Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proceedings of the National Academy of Science* 93: 1726-1730, 1996.
- Lostao, M.P., E. Urdaneta, E. Martinezanso, A. Barber und J.A. Martinez.** Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Letters* 423: 302-306, 1998.
- Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R.E. Pratley, G.H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone und S. Ranganathan.** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155-1161, 1995.
- Mantzoros, C.S., D.Q. Qu, R.C. Frederich, V.S. Susulic, B.B. Lowell, E. Maratos-Flier und J.S. Flier.** Activation of  $\beta_3$  adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45: 909-914, 1996.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori und K. Nakao.** Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine* 3: 1029-1033, 1997.
- Mercer, J.G., N. Hoggard, L.M. Williams, C.B. Lawrence, L.T. Hannah und P. Trayhurn.** Localization of the leptin receptor mRNA and the long form splice variant (OB-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain region by in situ hybridization. *FEBS Letters* 387, 113-116, 1996.
- Mistry, A.M., A.G. Swick und D.R. Romsos.** Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *Journal of Nutrition* 127: 2065-2072, 1997.
- Moinat, M., C. Deng, P. Muzzin, F. Assimacopoulos-Jeannet, J. Seydoux, A.G. Dulloo und J.P. Jacobino.** Modulation of obese gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Letters* 373: 131-134, 1995.

**Müller, G., J. Ertl, M. Gerl und G. Preibisch.** Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 10585-10593, 1997.

**Nüßlein, B.** Der juvenile circadiane Kerntemperatur-Rhythmus von Ratten: Physiologische Grundlagen und synchronisierende Faktoren. Dissertation, 1992.

**Nuesslein-Hildesheim, B. und I. Schmidt.** Is the circadian core temperature rhythm of juvenile rats due to a periodic blockade of thermoregulatory thermogenesis ? *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 427: 450-454, 1994.

**Nuesslein-Hildesheim, B., H. Döring und I. Schmidt.** Amplitude adjustment of the juvenile rat's circadian rhythm of metabolism: a paradigmatic mode of energy saving. In: *Biological Clocks. Mechanisms and Applications*. Excerpta Medica International Congress Series 1152, Eds. Touitou Y, Elsevier Science B. V., Amsterdam, pp. 419-422, 1998.

**Pelleymounter, M.A., M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone und F. Collins.** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269: 540-543, 1995.

**Pelleymounter, M.A.** Leptin and the physiology of obesity. *Current Pharmaceutical Design* 3: 85-98, 1997.

**Rafael, J. und A.W. Herling.** Leptin effect in ob/ob mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation. *American Journal of Physiology* 278: R790-R795, 2000.

**Rauch M., T. Riediger, H.A. Schmied und E. Simon.** Orexin A activates leptin-responsive neurons in the acute nucleus. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 440: 699-703, 2000.

**Rink TJ.** In search of a satiety factor. *Nature* 372: 406-407, 1994.

**Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S.B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu und R.L. Leibel.** Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81: 3424-3427, 1996.

**Sakurada, S., O. Shido, N. Sugimoto, Y. Hiratsuka, T. Yoda und K. Kanosue.** Autonomic and behavioural thermoregulation in starved rats. *Journal of Physiology - London* 526: 417-424, 2000.

**Sarraf, P., R.C. Frederich, E.M. Turner, G. Ma, N.T. Jaskowiak, D.J. Rivet, J.S. Flier, B.B. Lowell, D.L. Fraker und H.R. Alexander.** Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *Journal of Experimental Medicine* 185: 171-175, 1997.

**Schmidt, I., H. Döring, O. Stehling, B. Nuesslein-Hildesheim, S. Steinlechner und K. Schwarzer.** Leptin disinhibits rather than stimulates sympathetically mediated energy expenditure. In: *Leptin – The Voice of Adipose Tissue*, Eds. Blum, W.F., Kiess, W., Rascher, W.; J&J Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig, 133-139, 1997.



- Sclafani A. und D. Springer.** Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology and Behavior* 17: 461-471, 1976.
- Shioda, S., H. Funahashi, S. Nakajo, T. Yada, O. Maruta und Y. Nakai.** Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neuroscience Letters* 243, 41-44, 1998.
- Sivitz, W.I., S.A. Walsh, D.A. Morgan, M.J. Thomas und W.G. Haynes.** Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 138: 3395-3401, 1997.
- Sliker, L.J., K.W. Sloop, P.L. Surface, A. Kriauciunas, F. LaQuier, Manetta, J. Bue-Valleskey und T.W. Stephens.** Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *Journal of Biological Chemistry* 271: 5301-5304, 1996.
- Spangler, E. und D.E. Johnson.** Influence of feeding pattern on energy balance and activity in rats. *Journal of Nutrition* 111 (7), 1297-1304, 1981.
- Stehling, O., H. Döring, J. Ertl, G. Preibisch und I. Schmidt.** Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *American Journal of Physiology* 271: R1770-R1774, 1996.
- Stehling, O., H. Döring, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Olbert und I. Schmidt.** Leptin doses halving the body fat of lean pups are not effective in genetically obese (fa/fa) rat pups. In: *Leptin – The Voice of Adipose Tissue*, Eds. Blum, W.F., Kiess, W., Rascher, W.; J&J Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig, 140-147, 1997 a.
- Stehling, O., H. Döring, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Olbert und I. Schmidt.** Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 434: 694-697, 1997 b.
- Stephens, T.W., M. Basinski, P.K. Bristow, J.M. Bue-Valleskey, S.G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H.M. Hsiung, A. Kriauciunas, W. MacKellar, P.R. Rosteck Jr, B. Schoner, D. Smith, F.C. Tinsley, X.-Y. Zhang und M. Heiman.** The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377, 530-532, 1995.
- Tartaglia, L.A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G.J. Richards, L.A. Campfield, F.T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K.J. Moore, J.S. Smutko, G.G. Mays, E.A. Woolf, C.A. Monroe und R.I. Tepper.** Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 272, 1263-1271, 1995.
- Trayhurn, P., J.S. Duncan, D.V. Rayner und L.J. Hardie.** Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 228: 605-610, 1996.
- Trayhurn, P., J.S. Duncan, N. Hoggard und D.V. Rayner.** Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proceedings of the Nutrition Society* 57: 413-419, 1998.

**Trayhurn, P., N. Hoggard, J.G. Mercer und D.V. Rayner.** Leptin: fundamental aspects. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 23 Suppl 1: 22-28, 1999.

**Van Heek, M., D.S. Compton, C.F. France, R.P. Tedesco, A.B. Fawzi, M.P. Graziano, E.J. Sybertz, C.D. Strader und H.R. Davis, Jr.** Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *Journal of Clinical Investigation* 99: 385-390, 1997.

**Wang, J.L., R. Liu, M. Hawkins, N. Barzilai und L. Rossetti.** A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688, 1998.

**Wang, J.L., R. Liu, L.S. Liu, R. Chowdhury, N. Barzilai, J.Z. Tan und L. Rossetti.** The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nature Medicine* 5: 895-899, 1999.

**Wang L.C.H. und M.W. Wolowyk.** Torpor in mammals and birds. *Canadian Journal of Zoology* 66:133-137, 1988.

**Widdowson, P.S., R. Upton, L. Pickavance, R. Buckingham, M. Tadayyon, J. Arch und G. Williams.** Acute hyperleptinemia does not modify insulin sensitivity in vivo in the rat. *Hormone and Metabolic Research* 30: 259-262, 1998.

**Withers, P.C.** Measurement of  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , and evaporative water loss with a flow-through mask. *Journal of Applied Physiology*. 42:120-123, 1977.

**Zhang, Y., M. Olbort, K. Schwarzer, B. Nuesslein-Hildesheim, M. Nicolson, E. Murphy, T.J. Kowalski, I. Schmidt und R.L. Leibel.** The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 240: 492-495, 1997.

**Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold und J.M. Friedman.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.

## 7. Danksagung

Zum Abschluß möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung, Ratschläge und Geduld die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung sowie ihren unermüdlichen Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Eckhart Simon danke ich für die Genehmigung, die Arbeit in seiner Abteilung des Max-Planck-Institutes für physiologische und klinische Forschung, Kerckhoff-Institut, anfertigen zu dürfen, sowie für die freundliche Unterstützung bei allen angefallenen Fragen.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Gerhard Heldmaier an der Philipps-Universität Marburg, der sich freundlicherweise als Erstgutachter zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt der Firma Aventis (ehem. Hoechst Marion Roussel, Frankfurt) und im Speziellen Herrn Gerald Preibisch für die freundliche Bereitstellung des rekombinanten Leptins.

Ein weiterer Dank gilt allen Angestellten des Kerckhoff-Institutes, von der Verwaltung über den Hausmeister und die EDV-Abteilung bis hin zu unserer hervorragenden Werkstatt, von denen mir sicher jede/r einmal dienlich gewesen ist und ohne deren Hilfe meine Arbeit ungleich schwieriger zu absolvieren gewesen wäre.

Letztendlich gilt mein Dank den vielen Kollegen und Kolleginnen aus meiner Arbeitsgruppe, die mich nicht nur während dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben, sondern darüber hinaus auch für ein hervorragendes Arbeitsklima gesorgt haben:

Oliver Stehling, Barbara Nüßlein-Hildesheim, Knut Schwarzer, Martin Olbort, Corinna Schölch, Carmen Hufnagel, Kerstin Voigt, Michael Vollmer, Susanne Jursch, Sandra Söhler, Sandra Eiden, Roswitha Bender, Diana Fuchs und Irene Küchenmeister.

Besonders hervorheben aus dieser Riege möchte ich Knut Schwarzer, der mir vor allem bei der Statistik zur Seite stand und mir darüber hinaus zu einem guten Freund geworden ist, Sandra Eiden, die mir besonders in der Endphase und beim Verfassen dieser Arbeit behilflich war, sowie Carmen Hufnagel, die mir über die Arbeit hinaus auch privat eine wichtige Stütze war und mir hoffentlich in diesem Sinne noch lange zur Seite steht.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre.