

Aus dem Max-Planck-Institut
für physiologische und klinische Forschung
W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim

eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Untersuchungen des Leptin-Systems und des Stoffwechsels
juveniler Ratten:
Zwei Adipositas-Modelle**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
CORINNA SCHÖLCH

Gießen 2001

Aus dem Max-Planck-Institut
für physiologische und klinische Forschung
W.G. Kerckhoff-Institut Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. E. Simon

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

**Untersuchungen des Leptin-Systems und des Stoffwechsels
juveniler Ratten:
Zwei Adipositas-Modelle**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
CORINNA SCHÖLCH
Tierärztin aus Pforzheim (Baden-Württemberg)

Gießen 2001

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Simon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Medizinische Bedeutung der Adipositas	1
1.1.1. Adipositas als Regulationsstörung	2
1.1.2. Modelle der Adipositas	2
1.2. Die Regelung der Energiereserven als Verständnisgrundlage der Regulationsstörung „Adipositas“	3
1.2.1. Rolle des Energieverbrauchs als Stellgröße in der Energiehomöostase	4
1.2.2. Kurzzeitregulation der Energiereserven über die Nahrungsaufnahme	5
1.2.3. Langzeitregulation der Energiereserven über das Hormon Leptin	5
1.2.3.1. Übersicht über die Funktion und die Bildung von Leptin	5
1.2.3.2. Leptin als Signal in den Regelkreisen der Energiehomöostase	8
1.2.3.3. Der Leptinrezeptor	9
1.3. Bedeutung des Hypothalamus für die Regulation der Energiehomöostase	10
1.3.1. Überwindung der Bluthirnschranke	11
1.3.2. Übersicht über die an der Regulation beteiligten hypothalamischen Areale	12
1.3.2.1. Der Nucleus Arcuatus - Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Energiehomöostase	14
1.3.2.2. Der laterale Hypothalamus und der Nucleus Ventromedialis	15
1.3.2.3. Der Nucleus Paraventricularis	16
1.4. Aufgabenstellung	17
1.4.1. Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung	17
1.4.2. Adipositas-Modell II: Chemische Läsionierung des zentralen Leptin-Targets durch Monosodiumglutamat	20
1.4.2.1. Physiologischer Hintergrund: Der juvenile Tagesrhythmus der Ratte	20

1.4.2.2.	Chemische Läsionierung durch Monosodiumglutamat	20
1.4.2.3.	MSG-Behandlung als Adipositas-Modell	22
1.5.	Ziele der Arbeit	22
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	25
2.2.	Tierexperimentelle Versuchsansätze	26
2.2.1.	Adipositas-Modell I: postnatale Überernährung	26
2.2.2.	Adipositas-Modell II: Läsionierung des zentralen Leptintargets	28
2.2.3.	Ergänzende immunhistochemische Analysen	30
2.3.	Physiologische Analysen	31
2.3.1.	Plasmagewinnung	31
2.3.2.	Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung	32
2.3.3.	Bestimmung von Feuchtmasse, Trockenmasse, fettfreier Trocken- und Fettmasse	32
2.3.4.	Künstliche Aufzucht	33
2.3.4.1.	Versuchsaufbau	33
2.3.4.2.	Ernährung	34
2.3.4.3.	Kontinuierliche Messung der Körpertemperatur	35
2.3.4.4.	Einstellen der Umgebungstemperatur auf die Bedingungen einer moderaten Kältebelastung	36
2.3.4.5.	Sauerstoffmessung	36
2.4.	Weitere analytische Methoden	38
2.4.1.	Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion	38
2.4.1.1.	Isolierung von DNA aus Gewebe	38

2.4.1.2.	Grundlagen der PCR	38
2.4.1.3.	PCR-Protokoll und Auftrennung der Produkte	39
2.4.1.4.	Restriktionsverdau	40
2.4.1.5.	Elektrophorese	40
2.4.2.	Biochemische Methoden	42
2.4.2.1.	Grundlagen zur Plasmaleptinbestimmung mittels Radioimmunoassay	42
2.4.2.2.	Durchführung der Plasmaleptinbestimmung	43
2.4.2.3.	Ermittlung des Plasmaleptingehaltes anhand der RIA-Werte	45
2.4.3.	Leptin-Rezeptor-Bindungsstudien an Hypothalamushomogenaten	46
2.4.3.1.	Grundprinzip der Bindungsstudien	46
2.4.3.2.	Gewebe-Präparation	47
2.4.3.3.	Assay-Bedingungen	47
2.4.3.4.	Durchführung der Bindungsassays	47
2.5.	Histologie	48
2.5.1.	Gewebefixation durch transkardiale Fixation	48
2.5.2.	Nisslfärbung mit Kresylviolett	49
2.5.3.	Immunzytochemie	50
2.5.3.1.	Prinzip der Immunzytochemie	50
2.5.3.2.	Immunzytochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Fos und des Neuropeptids Y im Hypothalamus des Rattengehirnes	53
2.6.	Auswertung	55
2.6.1.	Auswertung der Sauerstoffverbrauchswerte von künstlich aufgezogenen Tieren	55
2.6.1.1.	Berechnung der Rohwerte	55
2.6.1.2.	Berechnung der metabolischen Rate	55
2.6.1.3.	Bestimmung der circadianen Minima und Maxima im massenspezifischen Sauerstoffverbrauch und der Kerntemperaturen	56

2.6.2.	Statistik	56
2.6.2.1.	Regressionsanalysen	57
2.6.2.2.	Varianzanalyse	57
2.6.2.3.	Multifaktorielle Varianzanalyse	58
2.6.3.	Mikroskopische Auswertung der histologischen Untersuchung	58

3. ERGEBNISSE

3.1.	Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung	61
3.1.1.	Einfluß postnataler Überernährung auf die Körperzusammensetzung von Zuckerratten (+/+ und +/fa) und Wistarratten	61
3.1.1.1.	Veränderungen von Feuchtmasse und Körperfettmasse bei Zuckerratten	61
3.1.1.2.	Entwicklung genotypspezifischer Unterschiede in der Körperzusammensetzung bei Aufzucht in normalen und kleinen Nestern	63
3.1.1.3.	Auswirkungen postnataler Überernährung bei einem anderen Rattenstamm	66
3.1.2.	Einfluß postnataler Überernährung auf die Plasmaleptinspiegel von Wildtyp- und heterozygoten Zuckerratten sowie von Wistarratten	70
3.1.2.1.	Korrelation von Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse	70
3.1.2.2.	Geschlechts- und genotypspezifische Unterschiede in den Plasmaleptinspiegeln von Zuckerratten bei Aufzucht im normalen oder kleinen Nest	72
3.1.3.	Einfluß der Leptinbehandlung auf die Körperzusammensetzung von im kleinen Nest aufgezogenen juvenilen Zucker- und Wistarratten	73
3.1.3.1.	Veränderungen im Körperfettgehalt	73
3.1.3.2.	Weitere durch die Leptinbehandlung hervorgerufene Veränderungen in der Körperzusammensetzung	77
3.1.4.	Genotypspezifische Unterschiede der Leptinrezeptorbindung im Hypothalamus von Zuckerratten	79

3.2. Adipositas-Modell II: Chemische Läsionierung des zentralen Leptin-Targets durch Monosodiumglutamat	81
3.2.1. Physiologische Parameter	81
3.2.1.1. Wirkungen der MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung natürlich aufgezogener Wildtyp-Zuckerratten	82
3.2.1.1.1. Einfluß der MSG-Behandlung auf das Lebendgewicht	82
3.2.1.1.2. Wirkungen der MSG-Behandlung auf den Wassergehalt, den Körperfettgehalt und die FFDM	83
3.2.1.2. Wirkungen einer MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung künstlich aufgezogener Rattenwelpen	85
3.2.1.3. Einfluß einer MSG-Behandlung auf den Metabolismus zehn Tage alter Zuckerratten	87
3.2.1.4. Energiebilanz	90
3.2.1.5. Auswirkungen einer MSG-Behandlung auf die Plasmaleptinspiegel zehn Tage alter Zuckerratten	91
3.3. Histologische Ergebnisse	91
3.3.1. Immunhistochemische Befunde zur Transmission des Leptinsignals	92
3.3.1.1. Leptin-induzierte Expression des Transkriptionsfaktors Fos in hypothalamischen Kerngebieten der zehn Tage alten Zuckerratte	92
3.3.1.2. Nachweis NPY-erger Projektionen des ARC zum PVN	93
3.3.2. Nachweis von MSG-induzierten Läsionen mit Kresylviolett-Färbung	93
4. DISKUSSION	
4.1. Die Säugephase-kritische Entwicklungsperiode für Rattenwelpen	97
4.2. Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung	98
4.2.1. Körpergewichtszunahme durch Änderungen in der thermoregulatorischen Aktivität	98
4.2.2. Fettakkumulation durch vermehrte Energieaufnahme	100
4.2.3. Mögliche Mechanismen der Verstärkung eines Genotypeffekts	102

4.2.4.	Physiologische Hintergründe einer erworbenen Leptinresistenz	104
4.2.5.	Ausblick	110
4.3.	Adipositas-Modell II	111
4.3.1.	Histochemische Grundlage möglicher MSG-Wirkungen	111
4.3.2.	Histologisches Korrelat der Zielstrukturen der MSG-Wirkung	112
4.3.3.	Herabgesetztes Körpergewicht durch reduzierte Energieaufnahme	115
4.3.4.	Reduktion des Körperfettgehaltes durch Änderungen in der Energiebilanz	115
4.3.5.	Ursachen für die MSG-induzierte Adipositas im Adulttier	117
4.3.6.	Ausblick	119
5.	ZUSAMMENFASSUNG	121
6.	SUMMARY	124
7.	ABKÜRZUNGEN	126
8.	LITERATURVERZEICHNIS	128
9.	DANKSAGUNG	153

1. EINLEITUNG

1.1. Medizinische Bedeutung der Adipositas

Für das Überleben von Mensch und Tier war die Fähigkeit zur Speicherung von Energie im Fettgewebe stets eine wesentliche Voraussetzung. In der heutigen Zeit hat diese Fähigkeit in den Industrienationen durch das geregelte Nahrungsangebot bzw. -überangebot an vitaler Bedeutung verloren. Übergewicht und diabetische Stoffwechselstörungen haben in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen. In allen Altersstufen steigt die Prävalenz für Adipositas (Seidell 1997). Besorgnis erregend ist aber vor allem die zunehmende Adipositas im Kindes- und Jugendalter in den USA und auch Europa (Harlan 1993; Cernerud 1993; Troiano et al. 1995). Bedenkt man die Folgekrankheiten, die durch Übergewicht hervorgerufen werden können, zu ihnen gehören unter anderem Diabetes mellitus II, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheiten und Dyslipidämie, aber auch Erkrankungen des respiratorischen Systems und des Bewegungsapparates (Übersichten bei Bray 1987), so gewinnt diese Entwicklung zusätzlich an medizinischer Bedeutung. Besonders in den letzten Jahren wurde deshalb die Notwendigkeit erkannt, präventiv gegen Übergewicht und diabetische Stoffwechselerkrankungen vorzugehen (Knowler et al. 1995; Guillaume 1996), vor allem, da die Erfolgsaussichten bei der Behandlung einer manifesten Adipositas nur gering sind (Serdula et al. 1993). Von besonderer Bedeutung ist die Erforschung der Entstehungsmechanismen von Adipositas, die in Interaktionen von genetischen und Umweltfaktoren zu suchen sind (Perussé et al. 1998). In den letzten Jahren hat die genetische Ursachenforschung bei der Entstehung extremer Adipositas erhebliche Fortschritte gemacht (Chagnon et al. 2000), dennoch kommt insbesondere der Suche nach nicht-genetischen, ätiopathogenetisch relevanten Faktoren eine vermehrte Bedeutung zu, da vor allem bei einer milden Adipositas genetische Ursachen als Grund alleine nicht in Frage kommen können (Perussé et al. 1998). Im Rahmen der Erforschung der Ätiopathogenese von Übergewicht könnte daher der Auffindung von Risikofaktoren eine Schlüsselrolle zukommen, da sich hierdurch Möglichkeiten zur Primär- oder Sekundärprävention eröffnen könnten.

1.1.1. Adipositas als Regulationsstörung

Der die Adipositas kennzeichnende Aufbau übermäßiger Fettdepots und das daraus resultierende Übergewicht sind das Ergebnis von Störungen komplexer Regelvorgänge, an denen sowohl periphere als auch zentralnervöse Mechanismen beteiligt sind. Daß beim Menschen und bei vielen Säugetieren normalerweise eine relative Konstanz der Fettmasse über einen langen Zeitraum nach Erreichen des Erwachsenenalters besteht, ist in anbetracht der Schwankungen in der Energieaufnahme und der Variabilität des Energieverbrauchs ein bemerkenswertes Phänomen. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die an der Energiezufuhr mit der Nahrung und an der Energiedissipation über den Stoffwechsel angreifenden Regulationsprozesse nur ansatzweise aufgeklärt, und dementsprechend sind die gegenwärtigen Vorstellungen über die Regulation von Körpergewicht und Fettmasse teilweise noch hypothetisch. Allgemein wird die Tendenz eines Organismus, unter Inanspruchnahme seiner Regelsysteme ein dynamisches Gleichgewicht zur Sicherung seiner Lebens- und Leistungsfähigkeit innerhalb eines bestimmten Änderungsbereichs der Umweltbedingungen aufrecht zu erhalten, als Homöostase bezeichnet (Wiesner und Ribbeck 1983). Adipositas ist insoweit eine Störung der Energiehomöostase.

1.1.2. Modelle der Adipositas

Ein Weg zur Aufklärung von Störungen der Energiehomöostase ist die Untersuchung von Tiermodellen, in denen definierbare Komponenten der Regelung der Körperfettdepots defekt sind. Dazu gehören zum Beispiel Zuchtstämme von Nagern, bei denen Adipositas als erbliche Störung auftritt; dies gilt für die sog. Zuckerratten, die *ob/ob*-Mäuse und die *db/db*-Mäuse. Zur Zeit werden mit dem Knock-out-Verfahren weitere Modelle dieser Art generiert. Ein anderer Weg zur Erzeugung von Adipositas-Modellen ist das Setzen definierter zentralnervöser Läsionen, die zur Adipositas führen. Weniger eindeutig sind die Grundlagen von Modellen, bei denen infolge von Stoffwechselstörungen beim Muttertier oder von frühpostnatalen Ernährungsstörungen eine Tendenz zur Adipositas entsteht. Die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung bedient sich des Adipositas-Modells der postnatalen Überernährung, teilweise in Kombination mit einem genetischen Adipositas-Modell sowie eines Läsionsmodells. Da juvenile Tiere untersucht werden, ist außer der Änderung von Fettdepots die Zunahme der fettfreien Körpermasse infolge des Wachstums im

Untersuchungszeitraum zu berücksichtigen. Die beiden Adipositas-Modelle werden in Kap. 1.4.1. und 1.4.2. näher beschrieben.

1.2. Die Regelung der Energiereserven als Verständnisgrundlage der Regulationsstörung „Adipositas“

Das Ziel der Energiehomöostase, die relative Konstanz der Energiedepots, kann durch die Regelung verschiedener, die Energiebilanz beeinflussender regulatorischer Aktivitäten erreicht werden. Diese Aktivitäten sind der Energieverbrauch, die Energieaufnahme mit der Nahrung und Wachstums- oder Involutionsprozesse. Das hochkomplexe neurohormonale Regelsystem versucht, durch wechselseitige Anpassung dieser Aktivitäten die Fluktuationen der Energiebilanz und damit der Energiedepots hinsichtlich der Amplitude und der Dauer zu minimieren (Woods et al. 1998). Längerfristig bleibt die in Form von Fett angelegte Energiereserve des adulten Organismus stabil, wenn der verwertbare Energiegehalt der aufgenommenen Nahrung dem Gesamtenergieverbrauch entspricht, der durch Wärmeproduktion, Muskelarbeit und biochemische Fixierung in Struktur- und Funktionsgeweben bedingt ist. Störungen im Energiehaushalt im Sinne einer positiven Bilanz der Fettreserven durch Überwiegen der Speicherung gegenüber dem Energieverbrauch führen zu Adipositas. Beim wachsenden Organismus erfordert der Nachweis von Adipositas die vergleichende Berücksichtigung der durch Wachstum entstehenden Zunahme der fettfreien Körpermasse einschließlich der proportionalen Vergrößerung des Anteils an Fettgewebe.

Der Organismus begegnet den Erfordernissen des Energieverbrauchs kurzfristig mit der Regulation der Nahrungsaufnahme. Damit können im allgemeinen rasche temporäre Änderungen des Energiebedarfs ausgeglichen werden wie der durch die Auseinandersetzung mit der Umwelt erzwungene Energiebedarf für wechselnde körperliche Aktivitäten und die thermoregulatorischen Erfordernisse der Wärmebildung durch Kältezittern oder zitterfreie Thermogenese (NST). Normalerweise entstehen diese Anforderungen auf der Grundlage eines konstanten Erhaltungsstoffwechsels. Darüberhinaus sind Regulationsprozesse erforderlich, mit denen der Organismus temporären, endogen verursachten, teilweise längerfristigen Änderungen der Energiebilanz begegnen kann. Dies gilt einerseits für akute Störgrößen, z.B. aufgrund der Einflüsse metabolisch wirksamer Hormone wie Insulin und Katecholamine, die wegen Erfordernissen anderer Regelsysteme aktiviert werden. Andererseits können auch längerfristige Zusatzbelastungen wirksam werden, die

physiologisch, wie im Falle der Schwangerschaft, oder pathologisch, wie im Falle von Erkrankungen oder Hungerzuständen, bedingt sein können und als chronische, sog. homöorhetische Störgrößen beschrieben werden (Houseknecht et al. 1998).

Über die Regulation des Energiehaushaltes wurden viele Theorien entwickelt (Levin et al. 1996). Wichtige Elemente dieses Kontrollsystems sind auf der einen Seite Hormone, die im Verhältnis zur Körperfettmasse sezerniert werden (z.B. Leptin und Insulin) und als Signale wirken könnten, auf der anderen Seite Gehirnstrukturen, die der zentralen Regulation dienen. In Reaktion auf Zustände einer negativen Energiebilanz werden regulativ anabole Aktivitäten verstärkt. Die Folge davon ist eine vermehrte Futteraufnahme und, falls diese den Energieverbrauch übersteigt, eine Energiespeicherung in Form von Fett. Umgekehrt kann es als Reaktion auf Zustände einer positiven Energiebilanz zu einer Verstärkung kataboler Wirkungen kommen, die zu einer Abnahme der Futteraufnahme und, falls diese den Energieverbrauch unterschreitet, zu einer Reduktion der Energiespeicherung führt (Levin 2000). Durch diesen Zyklus kann die Regulierung des Energiehaushaltes und somit auch des Körpergewichtes über einen langen Zeitraum erfolgen. Aufgrund der vielen, regulatorisch eingreifenden Komponenten kann es an vielen Stellen zu Störungen des Regelkreises kommen, das heißt, die aufgenommene Energie spiegelt nicht mehr die benötigte Energie wider, was zu einer vermehrten Akkumulation von Energie in Form von Fett führt (Ahima et al. 1996).

1.2.1. Rolle des Energieverbrauchs als Stellgröße in der Energiehomöostase

Weil wesentliche Komponenten des Energieverbrauchs obligatorisch sind oder durch wechselnde Umwelteinflüsse oder Funktionszustände des Organismus erzwungen werden, bestehen nur eingeschränkte Möglichkeiten, durch Variation des Energieverbrauchs zur Regelung der Energiehomöostase beizutragen. Von diesen Möglichkeiten wird in der Form reduzierter körperlicher Aktivität sowie durch teilweisen Verzicht auf die Aufrechterhaltung der normalen Körpertemperatur in der Form des Torpors bei kleineren Warmblütern Gebrauch gemacht (Eckert 1986; Geiser et al. 1988), aber auch durch Senkung des Grundumsatzes bei großen Tieren oder beim Mensch im Hungerzustand (Leibel und Hirsch 1984; Leibel et al. 1995). Als Reaktion auf ein aktuelles Überangebot an Nahrung kann der Organismus den Energieverbrauch durch die fakultative diät-induzierten Thermogenese in mäßigem Umfang regulativ erhöhen (Stock und Rothwell 1986). Diese

Regelungsmöglichkeiten sind jedoch bei normaler Regulation und ausreichender Verfügbarkeit von Nahrung quantitativ gering. Soweit sie bei Störungen der Energiehomöostase in den untersuchten Tiermodellen eine Rolle spielen, wird darauf bei der Darstellung und Diskussion der Energiebilanzierung eingegangen.

1.2.2. Kurzzeitregulation der Energiereserven über die Nahrungsaufnahme

Eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme scheint die für den Zellstoffwechsel verfügbare Glucose zu spielen, wie Mayer schon 1955 in seiner glucostatischen Hypothese postulierte. Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß abnehmende Verfügbarkeit von Glucose sehr gut mit Leerkontraktionen des Magens korreliert ist. Daraus wurde geschlossen, daß dieser Faktor „Verfügbarkeit von Glucose“ ein entscheidender Parameter für die Auslösung der Nahrungsaufnahme ist (Mayer 1955). Weiter gestützt wird diese glucostatische Hypothese der Kontrolle der Nahrungsaufnahme durch die Existenz von entsprechenden Glucorezeptoren. Sie befinden sich in der Leber, im Magen und im Dünndarm, aber auch im Zwischenhirn, was die Beteiligung eines zentralen Stimulus bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme bedeutet.

Wenn man die Komplexität biologischer Regelkreise bedenkt, erscheint es eher unwahrscheinlich, daß eine solch wichtige Körperfunktion ausschließlich über den Plasmaspiegel der Glucose geregelt wird, was zur Formulierung der „multifaktoriellen Theorie“ der Kontrolle der Nahrungsaufnahme Anlaß gab (Novin 1983).

1.2.3. Langzeitregulation der Energiereserven über das Hormon Leptin

1.2.3.1 Übersicht über die Funktion und Bildung von Leptin

Viele Jahre haben Wissenschaftler das Hormon oder den Metaboliten gesucht, der ausgehend vom Fettgewebe den Status der Energiereserven an das Gehirn und andere Gewebe vermittelt, wodurch dann angemessene Änderungen der Futteraufnahme und des Energieverbrauchs zur Aufrechterhaltung der Energiebilanz veranlaßt werden konnten. Kennedy war 1953 der erste, der eine lipostatische Theorie formulierte, in der postuliert wurde, daß vom Fettgewebe Signale ausgehen, durch die die Nahrungsaufnahme geregelt wird. Er stellte die Hypothese auf, daß der Hypothalamus die Konzentration eines solchen zirkulierenden Metaboliten mißt. Spätere Versuche an parabiotischen Tieren, bei denen durch chirurgische Verbindung von

normalen und adipösen Tieren eine Verbindung ihrer Blutgefäßsysteme geschaffen wurde, lieferten Hinweise auf ein stoffliches Signal, das die Größe der Fettdepots anzeigt (Hervey 1959). Zusätzliche Parabiose-Studien mit *ob/ob*-Mäusen (Hausberger 1959), *db/db*-Mäusen (Coleman 1973) und *fa/fa*-Ratten (Harris et al. 1987) bestätigen dies. 1994 wurde schließlich das stoffliche Signal, ein Hormon, entdeckt, das den Namen Leptin erhielt (Halaas et al. 1995) sowie das dazugehörige Gen („*ob*-Gen“), welches durch die Gruppe um Friedman (Rockefeller Universität) nachgewiesen werden konnte (Zhang et al. 1994). Leptin besteht aus 164 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 16 kD (Zhang et al. 1994). Viele offene Fragen konnten daraufhin beantwortet werden, unter anderem, wie es zu der extremen Adipositas der *ob/ob*-Mäuse kommt. Zhang et al. 1994 konnten zeigen, daß diese Tiere auf Grund einer Mutation des *ob*-Gens nicht in der Lage sind, funktionsfähiges Leptin zu bilden, und bestätigten damit die Hypothese von Coleman, der schon 1973 postuliert hatte, daß diese Adipositas die Folge eines fehlenden „Sättigungssignales“ sei. Auch bei zahlreichen anderen Vertebraten gelang es, eine dem *ob*-Gen von Mäusen homologe Basensequenz nachzuweisen (Zhang et al. 1994), und bald konnte die Existenz von Leptin im menschlichen Plasma festgestellt werden (Halaas et al. 1995). Da es sehr schnell gelang, das Leptinprotein rekombinant herzustellen, konnten die Vorstellungen über die Funktion des Leptins für die Regulation der Energiebilanz experimentell abgesichert und deutlich gemacht werden, daß Leptin eher ein lipostatisches als nur ein „Sättigungssignal“ ist.

Seit dieser Zeit sind unzählige Studien durchgeführt worden, um die zentrale Rolle des Leptins in der Aufrechterhaltung der Energiebilanz zu ergründen. In der Tat scheint Leptin sich auf sämtliche Gewebe- und Organsysteme auszuwirken, die etwas mit der Regulierung des Energiehaushalts zu tun haben, und wirkt deshalb möglicherweise als ein Regulator der Energie-Homöostase (Houseknecht et al. 1998). Darüber hinaus zeigten neue Studien, daß die Funktionen dieses Hormones umfassender und bedeutender sind als bisher angenommen. Leptin spielt auch eine Rolle in der Immunabwehr (Lord et al. 1998), in der Angiogenese (Sierra-Honigmann et al. 1998), in der Hämatopoese und Osteogenese (Pighetti et al. 1999), in der Gehirnentwicklung (Steppan and Swick 1999; Ahima et al. 1999) und ist ferner maßgeblich am Reproduktionsgeschehen beteiligt (Zamorano et al. 1997; Bi et al. 1999). Schwierigkeiten gibt es bei der Abgrenzung der zentralnervös vermittelten Leptinwirkung gegen seine vielfältigen peripheren Stoffwechseleffekte, von denen einige die Nahrungsaufnahme hemmen bzw. den Stoffwechsel aktivieren können (katabole Wirkung). So ist Leptin an einer Hemmung der Insulinsekretion der β -Zellen 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 Glukose (Kamohara et al. 1997) sowie die Glukoseresorption 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 Glukosetransportes, der Glykogensynthese und der Lipogenese (Müller et al. 1997).

Hauptsächlich produziert wird Leptin im weißen Fettgewebe (Zhang et al. 1994), doch auch das braune Fettgewebe kann, insbesondere bei Juvenilen, zur Leptinproduktion beitragen (Zhang et al. 2001). Während das weiße Fettgewebe überwiegend die Funktion eines Energiedepots hat, und zwar bei allen Tierarten, ob adult oder juvenil, besteht die Funktion des braunen Fettgewebes bei kleinen Säugern, sowie temporär postnatal auch bei größeren Säugern, einschließlich des Menschen, in der Umwandlung von chemischer Energie in Wärme, wobei durch sympathische Stimulation die thermoregulatorische Thermogenese gesteigert wird, indem durch die Entkopplung des Protonentransports in den Mitochondrien bei der Oxidation von Fettsäuren Wärme freigesetzt und damit die zelluläre Energieabgabe erhöht wird (Needergard und Cannon 1998). Exprimiert wird Leptin aber auch in der Mukosa des Magen-Fundus (Bado et al. 1998), im Skelett-Muskel (Wang et al. 1999), in der Plazenta, im Uterus (Masuzaki et al. 1997) und in der Milchdrüse (O'Brien et al. 1999). Masuzaki et al. (1997) konnten zeigen, daß Leptin während der Schwangerschaft von Zellen des Amnions gebildet wird. Neue Studien zeigen, daß sogar das Gehirn selbst und die Hypophyse in der Lage zu sein scheinen, Leptin zu exprimieren (Morash et al. 1999). Trotz der zahlreichen Bildungsorte von Leptin ist der Plasmaleptinspiegel normalerweise jedoch eng mit der Körperfettmasse (Zhang et al. 1994; Frederich et al. 1995; Considine und Caro 1997; Eiden et al. 2001) und der Fettzellgröße (Mason et al. 1998) korreliert. In vitro sezernieren isolierte Fettzellen Leptin proportional zum Füllungsgrad der Zelle (Hamilton et al. 1995). Bekannt ist aber auch, daß die Produktion an Leptin-mRNA pro Gramm Fett sehr stark abhängig ist von der Lage des Fettdepots (Masuzaki et al. 1995). Trotzdem ergibt sich in Populationsdaten eine enge Korrelation zwischen den Plasmaleptinspiegeln und der Gesamtkörperfettmenge. Jedoch wurde rasch deutlich, daß erhöhte Leptinspiegel bei gleichzeitig erhöhter Körperfettmenge immer mit einer Leptinresistenz verknüpft waren (Caro et al. 1996; Van Heek et al. 1997), so daß ein funktionell bedeutsamer Zusammenhang zwischen Plasmaleptinspiegel und Begrenzung der Fettspeicherung in Frage gestellt werden konnte (Ahima und Flier 2000). Die Ermittlung eines Zusammenhanges zwischen dem endogenen Plasmaleptinspiegel und der Größe der Fettspeicher wird dadurch erschwert, daß mit der endogenen Leptinfreisetzung im

Fettgewebe eine Vielzahl weiterer Faktoren interagieren. 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). Darüberhinaus können jahreszeitliche Veränderungen der Photoperiode eine Rolle spielen (Klingenspor et al. 1996; Drazen et al. 2000). Ein fallender Insulinspiegel wird als entscheidendes regulatorisches Signal für die Unterdrückung der Leptin-Expression angesehen (Boden et al. 1996). Glukokortikoide erhöhen die Transkriptionsrate des Leptin-Gens, Katecholamine reduzieren diese (Sliker et al. 1996). Zu der Gruppe weiterer negativer Regulatoren zählen unter anderem β -adrenerge Agonisten und cAMP (Sliker 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 (Boden et al. 1996; Ahima et al. 1996).

1.2.3.2. Leptin als Signal in den Regelkreisen der Energiehomöostase

Trotz der mit zunehmender Adipositas ansteigenden Plasmaleptinspiegel wird die Abhängigkeit der Funktion von Systemen der negativen Rückkopplung vom Leptinsignal dadurch belegt, daß die periphere Injektion von Leptin, das als gentechnisch gewonnenes rekombinantes Peptid seit einiger Zeit zur Verfügung steht, zu einer dosisabhängigen Verringerung der Körpermasse (Halaas et al. 1997) und der Körperfettmasse von Tieren mit normalem Körperfettgehalt führt (Stehling et al. 1996; Campfield et al. 1995; Pellemounter et al. 1998; Eiden et al. 2001). Bei *ob/ob*-Mäusen, die nicht in der Lage sind das Hormon zu bilden (Zhang et al. 1994), führt die Applikation von rekombinantem Leptin zu einer dramatischen Verringerung der Körpermasse um ca. 40 %, wobei diese Gewichtsreduktion hauptsächlich auf die Abnahme des Körperfettgehaltes infolge verminderter Nahrungsaufnahme, aber auch infolge Normalisierung des Energiestoffwechsels, zurückzuführen ist (Halaas et al. 1995; Campfield et al. 1995; Pellemounter et al. 1995; Levin et al. 1996). An Ratten im Säuglingsalter konnte auch zum ersten Mal eindeutig gezeigt werden, 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 Anhebung 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, während eine kurze Kälteexposition diese sofort sichtbar machte (Stehling et al. 1997 b).

Sicher belegt ist die Signalfunktion des Leptins in der Regelung der Fettdepots auch durch genetische Adipositas-Modelle, wie die *fa/fa*-Zuckerratte, bei der die für die Rückkopplung erforderlichen Leptinrezeptoren defekt sind (Chua et al. 1996; Takaya et al. 1996; Wu-Peng et al. 1997). Unklar bleibt dagegen bis heute, wie es bei nicht genetisch bedingten Formen der Adipositas zur Entwicklung einer Leptinresistenz, gekennzeichnet durch das Fortbestehen einer positiven Energiebilanz trotz erhöhter Plasmaleptinspiegel und Insensitivität gegen rekombinantes Leptin, kommt (Caro et al. 1996; Van Heek et al. 1997). Die Ursachen dieser Störung können auf vielen Ebenen der komplizierten Signalkette liegen, die zwischen dem Leptinrezeptor und der neurohormonalen Steuerung der Eingangs- und Ausgangsparameter der Energiebilanz (Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch) existieren.

1.2.3.3. Der Leptinrezeptor

Über die Funktion der Leptinrezeptoren gibt es inzwischen eine Reihe interessanter Vorstellungen. Sie beruhen auf der Klonierung der Leptinrezeptoren, deren Sequenzen im Jahr 1995 entschlüsselt werden konnten (Tartaglia et al. 1995). Diese Rezeptoren gehören zur Familie der Cytokinrezeptoren und bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranalen Domäne und einer intrazellulären Domäne (Tartaglia et al. 1997). Bis heute wurden sechs verschiedene Varianten des Rezeptors identifiziert, die das Ergebnis alternativer Splicevorgänge in der cytoplasmatischen Domäne sind, wohingegen die extrazelluläre Domäne bei allen Varianten gleich lang zu sein scheint (Chen et al. 1996; Lee et al. 1996). Die Splicevariante *Ob-Rb* codiert für einen Rezeptor mit langer intrazellulärer Domäne, von der man annimmt, daß sie die Signaltransduktion vermittelt, weil nur diese Form des Rezeptors auf Grund ihrer Struktur in der Lage ist, die JAK (janus kinase)-STAT (signal transducers and activators of transcription) Signalkaskade zu aktivieren (Vaisse et al. 1996). Andere Varianten, darunter eine lösliche Form des Leptinrezeptors, ohne transmembrane Domäne, fungieren möglicherweise für den Leptintransport über die Blut-Hirnschranke oder andere Barrieren (Tartaglia et al. 1995; Lee et al. 1996). Membranebundene Rezeptor-Isoformen finden sich im Plexus chorioideus und sind dort

möglicherweise am Transport des Leptins zwischen dem Blut- und dem Cerebrospinalflüssigkeitsraum beteiligt (Banks et al. 1996).

Die Regulation der Größe der Fettspeicher unter dem Einfluß des Leptins wird durch hypothalamische signaltransduzierende Leptinrezeptoren vermittelt. Daneben sind Leptinrezeptoren auch in vielen peripheren Organen, unter anderem in der Lunge, Niere, Leber, Herz, Muskel und den Ovarien nachgewiesen worden (Hoggard et al. 1997; Lee et al. 1996). In vitro-Experimente zeigen, daß Leptin direkt Effekte auf die β -Zellen des Pankreas, Leberzellen, braune und weiße Fettzellen sowie auf die Ovarien hat (Collins et al. 1996; Gainsford et al. 1996; Takahashi et al. 1996; Müller et al. 1997). Darüber hinaus ist die Form des Leptinrezeptors mit langer intrazytoplasmatischer Domäne auch in braunen und weißen Fettzellen lokalisiert worden, was auf eine mögliche autokrine Kontrolle der Leptinproduktion schließen läßt (Lollmann et al. 1997; Zhang et al. 1997). Die lange Form des Leptinrezeptors konnte in beinahe jedem Gewebe lokalisiert werden, allerdings wird er mit Ausnahme des Hypothalamus in den meisten Geweben in einer sehr geringen Anzahl exprimiert (Ghilardi et al. 1996; Mercer et al. 1996).

1.3. Bedeutung des Hypothalamus für die Regulation der Energiehomöostase

Der Hypothalamus als ventrale Komponente des Zwischenhirns (Diencephalon) stellt das wichtigste zentralnervöse Integrationszentrum autonomer Regelkreise dar. Er ist als integrative Instanz wesentlich an der Homöostase der Körpertemperatur (Simon et al. 1986; Simon 1997), der Nahrungsaufnahme (Leibowitz 1980), der zirkadianen Rhythmik (Aschoff et al. 1982), sowie des Salz- und Wasserhaushalts (Andersson 1978; Bie 1980; Gerstberger et al. 1997) bei allen Vertebraten beteiligt.

Die Hypothese, daß Strukturen des Hypothalamus eine entscheidende Rolle für die Regulation der Futterraufnahme spielen sollten, wurde schon früh postuliert (Kennedy 1953). Untermuert wurde diese Hypothese nach der Entdeckung des neuen Hormons Leptin durch Studien, die vor allem die Exprimierung der langen Form des Rezeptors (*OB-Rb*) im Hypothalamus zeigten (Mercer et al. 1996; Schwartz et al. 1996). Durch den Nachweis der Expression des Protoonkogens *c-Fos* nach peripherer Leptininjektion konnte eine Aktivierung hypothalamischer Neurone durch Leptin nachgewiesen werden (Elmqvist 1997). *C-Fos* wird unmittelbar nach zellulärer Stimulation transkribiert und gilt als spezifischer Indikator für neuronale Aktivität auf der Ebene des Zentralnervensystems (Hamamura et al. 1992). Die Beobachtung, daß Tiere mit Läsionen im Hypothalamus auf Sättigungssignale reagieren, aber

die Größe ihrer Fettmasse nicht regulieren können (Grill et al. 1988; Seeley et al. 1994), läßt die Vermutung zu, daß der Hypothalamus die entscheidende Region für die Integration der Signale darstellt.

1.3.1. Überwindung der Bluthirnschranke

Eine Voraussetzung für die vermutete zentrale Wirkung des im Blut zirkulierenden Leptins ist die Überwindung der Bluthirnschranke, die durch das dichte, unfenestrierte Endothel der Hirnkapillaren prinzipiell für größere Moleküle, insbesondere Peptide eine Barriere darstellt. Durch Diffusion zugänglich sind nur umschriebene, zu den Hirnventrikeln randständige Strukturen ohne Bluthirnschranke, die sogenannten Circumventrikulären Organe (CVOs). Die circumventrikulären Organe weisen Eigenschaften auf, welche sie von anderen Hirnstrukturen unterscheiden. Sie sind stark vaskularisiert mit ausgedehnten perivaskulären Zwischenräumen, besitzen Neurone und Gliazellen und sind gegenüber der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) durch ein dichtes Ependym mit intermittierenden Tanyzyten (spezialisierte Gliazellen) abgegrenzt (Leonhardt 1980). Obwohl „tight junctions“ zwischen den ependymalen Zellen eine passive Diffusion von Substanzen aus der Cerebrospinalflüssigkeit in die CVOs verhindern, wird angenommen, daß die Tanyzyten einen kontrollierten Transport bestimmter Substanzen zwischen CSF und perivaskulären Räumen der CVOs vermitteln. Das wichtigste Charakteristikum der CVOs jedoch liegt im Nichtvorhandensein der für cerebrale Kapillaren üblichen „tight junctions“ im Bereich des Kapillarendothels, welche sonst das Korrelat der Blut-Hirn-Schranke darstellen. Das Kapillarendothel ist somit für zirkulierende Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 40 000 Dalton durchlässig. Aufgrund dieser Eigenschaften können periphere Signalmoleküle oder neuronale Signale zwischen Blutgefäßsystem und Gehirn im Bereich der CVOs von Neuronen und/oder Gliazellen perzipiert werden (McKinley et al. 1990). Ein CVO-ähnliches Endothel weist auch ein hypothalamisches Kerngebiet auf, der Nucleus Arcuatus (ARC) (Gross 1992), dem eine entscheidende Rolle bei der zentralnervösen Integration und Vermittlung innerhalb der Regulation der Futteraufnahme und der Aufrechterhaltung der Energiebalance zukommt. Durch ihre Lage außerhalb der Blut-Hirn-Schranke ist es für einen Teil der Neurone des ARC möglich, direkt Signale aus der Peripherie zu empfangen, wie zirkulierende adrenale und gonadale Steroide, ebenso wie große Peptide, Leptin und Insulin, und die Signale, die über die Zerebrospinalflüssigkeit in das interstitielle Kompartiment des Kerngebietes transportiert werden. Untermauert wurde die kritische Rolle des ARC in der

Regulierung der Energiebilanz durch den Nachweis einer außerordentlich hohen Anzahl von Leptinrezeptoren in diesem Kerngebiet (Mercer et al. 1996). Für andere Hirnareale mit hoher Rezeptordichte ist das Vorhandensein eines aktiven Transportmechanismus, der Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke in diese Gehirnareale transportiert, nachgewiesen worden (Banks et al. 1996).

1.3.2. Übersicht über die an der Regulation beteiligten hypothalamischen Areale

Versuche zu einer Lokalisation bestimmter, für die Regelung der Energiehomöostase wichtiger Regulationsleistungen innerhalb des Hypothalamus zu gelangen, haben zunächst zur Vorstellung einer dualen Funktionsverteilung geführt. Lange betrachtete man den lateralen Hypothalamus (LHA) als Hungerzentrum, während der Nucleus Ventromedialis des Hypothalamus (VMH) als Sättigungszentrum angesehen wurde (Anand und Brobeck 1951). Wenngleich dieses „Dual-Center“-Konzept sehr viele frühere Arbeiten beeinflusste und auch heute wieder vielfach diskutiert wird, weiß man heute, daß die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase und mit ihr die Regulation der Futteraufnahme ein komplexer Vorgang ist, der mehrere hypothalamische Kerngebiete, sowie medulläre Strukturen involviert (Levin und Routh 1996; Emond et al. 2001). Durch chemische und elektrische Läsionierung distinkter hypothalamischer Kerngebiete, konnte die Funktion einzelner Gebiete besser charakterisiert werden. Elektrische Läsionierung des Nucleus Paraventricularis (PVN), des Nucleus Arcuatus (ARC) oder des Nucleus Ventromedialis des Hypothalamus (VMH) führten zu Hyperphagie und Adipositas (Tokunaga et al. 1986), weshalb ihnen eine Rolle bei der Begrenzung der Futteraufnahme zugesprochen wurde. Eine Zerstörung des Nucleus Dorsomedialis (DMH) dagegen resultierte in einer Hyposensibilität gegenüber Leptin (Bernardis und Bellinger 1998). Läsionen des lateralen Hypothalamus führen zu Aphagie und Gewichtsverlust (Stricker et al. 1978). Eine schematische Darstellung der in die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase involvierten hypothalamischen Kerngebiete ist in Abb. 1 gegeben. Untermuert wird die Schlüsselrolle dieser Kerngebiete durch die Identifizierung von Leptin-Rezeptoren in allen diesen Gebieten (Hakansson et al. 1998; Mercer et al. 1996; Shioda et al. 1998; Yarnell et al. 1998). Dadurch war ein wichtiger Schritt in der Entschlüsselung der zentralnervösen Vermittlung von Wirkungen des peripheren Leptins gemacht. Nach der Identifizierung der Kerngebiete gelang es, die Exprimierung einer Vielzahl unterschiedlicher Neuropeptide, die regulatorisch in die Futteraufnahme und den Energieverbrauch eingreifen, nachzuweisen.

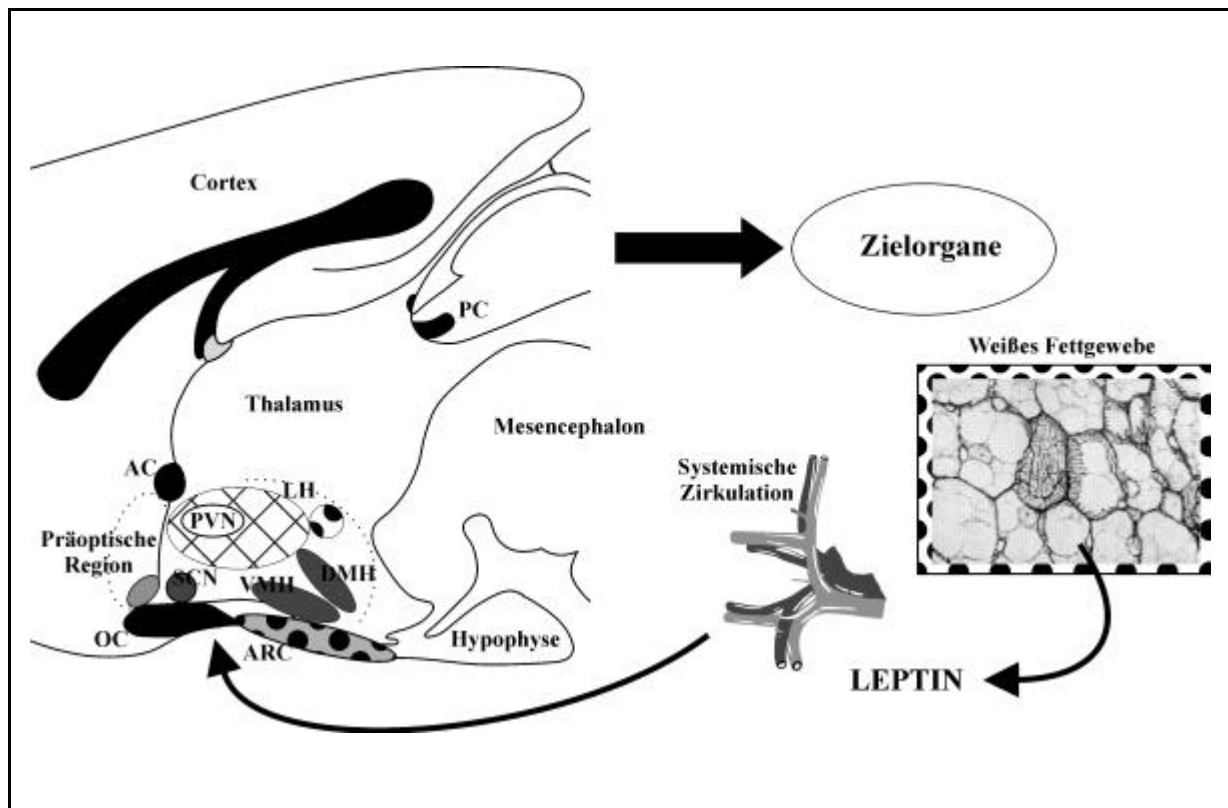


Abb.1: In die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase integrierte hypothalamische Kerngebiete.

Schematische Darstellung hypothalamischer Kerngebiete, die in die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase involviert sind. Schraffiert dargestellt sind die hypothalamischen Kerngebiete, an denen für die Regulierung der Energiebilanz wichtige Neuropeptide angreifen. Dunkelgrau dargestellt sind Kerngebiete, die die Energiebilanz regulierende efferente Signale generieren. Hellgrau dargestellt sind hypothalamische Strukturen, die eine durchlässige Blut-Hirn-Schranke besitzen. Gepunktet dargestellt sind zentrale und periphere Produktionsorte energieregulatorischer Signale.

Abkürzungen: ARC: Nucleus arcuatus, OC: Chiasma opticum, VMH: Nucleus ventromedialis, DMH: Nucleus dorsomedialis, SCN: Nucleus suprachiasmaticus, PVN: Nucleus paraventricularis, LH: lateraler Hypothalamus, AC: Commissura anterior.

(nach Kalra et al. 1999)

1.3.2.1. Der Nucleus Arcuatus – Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Energiehomöostase

Der Nucleus Arcuatus ist an der Basis des Hypothalamus lokalisiert, jeweils beiderseits des dritten Ventrikels. Seine Ausdehnung verläuft vom caudalen Ende des Chiasma opticum bis hin zu den Mamillarkörpern. Ihm wird eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase zugesprochen (Kalra et al. 1999), unter anderem weil von den vielen verschiedenen hypothalamischen Neuropeptiden, die eine substantielle Rolle in der Regulation der Futteraufnahme spielen, allein vier in den Neuronen des ARC exprimiert werden. Es sind das Neuropeptid Y, das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH), das agouti-related protein (AGRP) und das Neuropeptid cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART).

NPY ist eines der am häufigsten vorkommenden Neuropeptide im Gehirn von Säugetieren. Es kann überall im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen werden. Eine zentrale Verabreichung von NPY ist einer der potentesten Stimulatoren der Futteraufnahme überhaupt, seine orexigenen Effekte wurden erstmals von Stanley et al. (1984) beschrieben. Ein niedriger Plasmaleptinspiegel steigert die NPY mRNA-Expression im ARC, was eine Steigerung der Futteraufnahme zur Folge hat. NPY wird von den medialen Zellen des ARC gebildet (Baskin et al. 1999 b) und hat nicht nur eine regulatorische Funktion für die Energie-Homöostase über die Futteraufnahme, sondern es kann auch die Aktivität der sympathischen Innervation des braunen Fettgewebes vermindern (Billington et al. 1994; Egawa 1991), was zu einer Abnahme der Wärmeproduktion und damit zu einer effizienteren Energiespeicherung führt. NPY produzierende Zellen des ARC bilden Konnektivitäten zum PVN aus (Sawchenko 1998), der als Integrationszentrum für die Regulation des Energiehaushaltes angesehen wird, da ein Teil seiner Axone zu sympathisch präganglionären Zellpopulationen in der Medulla und im thorakalen Rückenmark (intermediolateral column: IML) projizieren (Saper et al. 1976; Sawchenko und Swanson 1983). Von der IML gehen u.a. die sympathisch präganglionären Neurone aus, über die das BAT innerviert wird (Paxinos 1995; Foster et al. 1982). Eine intraventrikuläre Verabreichung von NPY führt daher über eine gesteigerte Futteraufnahme und durch eine herabgesetzte thermoregulatorische Thermogenese innerhalb weniger Tage zu einer substantiellen Zunahme der Fettmasse (Stanley et al. 1986).

Ein ebenfalls von den Neuronen des ARC gebildetes Neuropeptid ist α -MSH. Es ist neben weiteren Neuropeptiden ein Spaltungsprodukt des Vorläufer-Proteins Proopiomelanocortin

(POMC). Das α -MSH wird von Neuronen des lateralen Bereichs des ARC exprimiert (Watson et al. 1979) und bindet mit einer hohen Affinität an MC3- und MC4-Rezeptoren (Fan et al. 1997; Schiöth et al. 1997). Das Melanocortin-System hat eine gegenüber dem NPY-System antagonistische Wirkung. Seine Ausschüttung senkt die Futteraufnahme. Fasten reduziert die Expression von POMC mRNA im Hypothalamus (Schwartz et al. 1997). Über Konnektivitäten der POMC produzierenden Neurone des ARC zum PVN führt α -MSH zu einer Steigerung der Thermogenese im braunen Fettgewebe (Kiss et al. 1984).

Ein endogener Antagonist des α -MSH ist das von den medialen, NPY-ergen Neuronen des ARC produzierte AGRP. Dieses dem Agouti-Protein verwandte Neuropeptid bindet wie α -MSH an MC3- und MC4-Rezeptoren, d.h. die antagonistische Wirkung von AGRP kommt durch kompetitive Verdrängung bei der Rezeptorbindung zustande (Ollmann et al. 1997). AGRP gilt deshalb als ein Neuropeptid, das die Feineinstellung des α -MSH Systems bewirkt. Mediale Neuronen des ARC koexprimieren AGRP und NPY (Broberger et al. 1998), von denen AGRP der potentere Stimulator der Futteraufnahme ist: eine intracerebroventrikuläre Verabreichung dieses Neuropeptids führt zu dramatischen Körpergewichtszunahmen (Wilson et al. 1999).

1995 entdeckte man in den lateralen Zellen des ARC ein Neuropeptid, das bei zentraler Verabreichung zu einer Verminderung der Futteraufnahme führte: cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) (Douglass et al. 1995). Laterale Neurone des ARC koexprimieren CART und POMC. CART besitzt wie α -MSH katabole Effekte.

1.3.2.2. Der laterale Hypothalamus und der Nucleus Ventromedialis

Der Nachweis von melanin-concentrating hormone (MCH) (Bittencourt et al. 1992) sowie der Orexine A und B in den Neuronen des lateralen Hypothalamus (Sakurai 1999) und physiologische Untersuchungen über die Bedeutung dieser Neuropeptide legten nahe, daß der laterale Hypothalamus eine Rolle bei der Stimulierung der Futteraufnahme spielt. Injektionen von Orexin A und MCH, nicht jedoch von Orexin B, in den lateralen Ventrikel von Ratten führte zu Steigerungen der Futteraufnahme (Qu et al. 1996; Haynes et al. 1999; Sakurai 1999). Dieser Effekt könnte physiologisch durch orexigene Neurone induziert sein, die vom lateralen Hypothalamus zu NPY-ergen Zellen des ARC projizieren (Horvath et al. 1999), denn die Mehrzahl der ARC-Neurone wird durch Orexin A erregt (Rauch et al. 2000). Durch Hungern (Qu et al. 1996) und niedrige Plasma-Leptin-Spiegel (Frederich et al. 1995) steigt

die Expression der mRNA beider Neuropeptide an. Darüber hinaus resultiert die Zerstörung des MCH-Genes in herabgesetzter Futtermittelaufnahme und somit vermindertem Körpergewicht (Shimada et al. 1998). Zusätzlich existieren Projektionen α -MSH- und CART-exprimierender Neurone des ARC zum lateralen Hypothalamus und stellen damit eine Verknüpfung der beiden Kerngebiete her (Elmqvist et al. 1999).

Auch der Nucleus ventromedialis (VMH) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Energiebilanz. Läsionen des VMH verursachen einen rapiden Anstieg der Leptin- und Insulinplasmaspiegel (Suga et al. 1999) und eine Verringerung des zentralen Sympathikotonus; daraus resultiert eine Herabsetzung der Wärmebildung im BAT, Hyperphagie und langanhaltende unphysiologische Körpergewichtszunahme (Storlien et al. 1972; Mogenson 1975). Eine elektrische Stimulierung des VMH führt zu einer Steigerung der Wärmebildung im BAT (Chen et al. 1998). Wenngleich es bis heute keinen Hinweis auf die Expression orexigen oder anorexigen wirkender Neuropeptide innerhalb des VMH gibt, führen Mikroinjektionen von NPY (Currie und Coscina 1997), Galanin (Kyrkouli et al. 1990) und Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in den VMH zu einer Steigerung der Futtermittelaufnahme, während Injektionen von Leptin hemmend wirken (Satoh et al. 1997). Interessanterweise hemmt auch die Mikroinjektion von Urocortin, einem potenten anorexigenen Peptid, in den VMH die Futtermittelaufnahme (Ohata et al. 2000). Zudem führen Injektionen von Leptin in den VMH zu einer dramatischen Erhöhung der Glukoseaufnahme im Herz, BAT und Skelettmuskel, was wahrscheinlich über β -adrenerge Mechanismen des Sympathikus vermittelt wird (Minokoshi et al. 1999). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß der VMH eine Rolle als Empfänger und Vermittler unterschiedlicher Signalmoleküle der Futtermittelaufnahme spielt. Diese Hypothese wird untermauert durch eine Vielzahl neuronaler Verbindungen, die der VMH mit mehreren unterschiedlichen, für die Futtermittelaufnahme wichtigen Kerngebieten besitzt (Luiten und Room 1980; Kristensen et al. 1998; Elmqvist et al. 1998).

1.3.2.3. Der Nucleus Paraventricularis

Neben der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes spielt der PVN auch eine Rolle in der Regulation des Energiehaushalts. Sowohl seine parvo- als auch seine magnozellularen Anteile exprimieren die lange Form des Leptinrezeptors (Yarnell et al. 1998). Von seinen Neuronen wird ein weiteres Neuropeptid gebildet, das regulierend in den Energiehaushalt eingreift und durch Insulin und Leptin reguliert wird: das corticotropin releasing hormone (CRH) (Alonso

et al. 1986). CRH ist ein anorexigen wirkendes Agens. Seine zentrale Verabreichung reduziert die Futtermittelaufnahme und das Körpergewicht (Spina et al. 1996; Jeanrenaud und Rohner-Jeanrenaud 2000).

Neben der Produktion von Nahrungsaufnahme regulierenden Peptiden spielt der PVN eine Rolle bei der Regelung energieverbrauchender Prozesse. Dorsale, ventrale und laterale parvocelluläre Unterkerne des PVN projizieren zu sympathisch präganglionären Zellpopulationen in der Medulla und im thorakalen Rückenmark (IML) (Saper et al. 1976; Sawchenko und Swanson 1983; Elias et al. 1998). Auf diesem Wege kann durch Beeinflussung der sympathischen Innervation des braunen Fettgewebes dessen Thermogeneseleistung moduliert werden (Paxinos 1995; Foster et al. 1982).

1.4. Aufgabenstellung

Daß in den für die Energiehomöostase wichtigen Kerngebieten des Hypothalamus, insbesondere im ARC, zahlreiche Neurone mit Leptinrezeptoren nachgewiesen wurden, entspricht der Bedeutung des Leptins bei der Regulation der Körperfett-Depots, die phänomenologisch durch die besprochenen Gendefekt-Modelle der Adipositas und durch Leptinapplikation belegt wird. Hinweise darauf, daß außerdem nichtgenetische Faktoren an der Ätiopathogenese der Adipositas beteiligt sind, auch solche, die in frühen prä- und postnatalen Entwicklungsstadien aus der Umwelt auf die Regelsysteme der Energiehomöostase einwirken und zu persistierenden Regulationsstörungen führen können, waren die Grundlage für die Aufgabenstellung der vorliegenden Untersuchung. Sie konzentrierte sich speziell auf Änderungen im Leptinsystem und deren Auswirkungen auf die Energiehomöostase anhand zweier bekannter Adipositas-Modelle, die während der Säuglings-Phase in Bezug auf die Körperentwicklung und das Stoffwechselverhalten analysiert wurden.

1.4.1. Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung

Von besonderer Bedeutung bei diesem Modell sind sog. kritische Entwicklungsperioden (critical periods). Eine solche Entwicklungsperiode stellt die Zeit post partum für Säugetiere dar (Kennedy 1957). Definitionsgemäß ist dies ein Zeitraum, in dem der Organismus bzw. das zu betrachtende System sensitiver als zu anderen Zeitpunkten für exogene Alterationen und daraus resultierende Veränderungen endogener Variablen ist, mit Folgen weit über den Zeitpunkt der Einwirkung der „Noxe“ hinaus (Colombo 1982). Nach Scott (1962) ist

weiterhin charakteristisch, daß das Ergebnis dieser Alteration irreversibel und im späteren Leben weitestgehend nicht kompensierbar ist. Diese Zusammenhänge sind, soweit die Schädigung durch endogene Veränderungen in kritischen neuronalen Entwicklungsphasen erfolgt, auch als funktionelle Teratologie bezeichnet worden (Dörner und Plagemann 1994). Experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, daß zum Beispiel Hyperinsulinismus während kritischer Entwicklungsphasen zu einer permanenten zentralnervösen Fehlorganistaion führen kann (Dörner 1976; Dörner 1989; Dörner und Plagemann 1994; Plagemann et al. 1999 b). Für die Körpergewichts- bzw. Adipositasentwicklung ist dieses Konzept unter anderem von Dietz aufgegriffen worden (1994), wonach die intrauterine sowie die perinatale Periode als kritische Entwicklungsperioden definiert wurden, in denen pathophysiologische Alterationen die spätere Adipositasentstehung begünstigen können (Ravelli et al. 1976; Hales und Barker 1992; Dörner und Plagemann 1994; Levin und Govek 1998). Experimentelle und klinische Studien haben gezeigt, daß perinatale Überernährung einen Risikofaktor für die spätere Entstehung von Übergewicht und den damit verbundenene metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen (metabolisches Syndrom) darstellt (Kramer et al. 1985; Dörner und Plagemann 1994; Levin 2000). Desweiteren führen beim Menschen metabolische Störungen wie Hyperglykämie und Hyperinsulinämie von Foeten diabetischer Mütter zur Prädisposition für eine spätere Adipositas (Dörner und Plagemann 1994; Plagemann et al. 1997). Übergewicht, das in einer solchen kritischen, juvenilen Periode entsteht, kann bis in das Erwachsenenalter hinein persistieren (Rolland-Cachera 1987; Rosenbaum et al. 1997).

Experimentell kann postnatale Über- oder auch Unterernährung durch Reduzierung oder Erhöhung der Zahl von einem Muttertier gesäugter Welpen erreicht werden (Parkes 1926) und repräsentiert deshalb ein angemessenes Modell, um Überernährung in einer kritischen perinatalen Periode zu untersuchen (Aubert et al. 1980; Fiorotto et al. 1991; Plagemann et al. 1992; Voits et al. 1996; Heidel et al. 1999; Plagemann et al. 1999 a,b; Davidowa und Plagemann 2000). Entsprechend diesen Untersuchungen bewirkt die Aufzucht in kleinen Nestern eine erhöhte Milch- und damit Energieaufnahme während der Säugeperiode, was zu einer persistierenden, signifikanten Erhöhung des Körpergewichtes und des Körperfettgehaltes führt. Die der durch perinatale Manipulationen ausgelösten Hyperphagie, Adipositas und den damit zusammenhängenden metabolischen Störungen im adulten Tier zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht hinreichend geklärt worden (Faust et al. 1980), gesichert ist aber, daß sowohl Ratten- als auch Mäusewelpen ohne genetische Prädisposition zum Übergewicht durch diese Behandlung Zunahmen im Körpergewicht und

auch im Körperfettgehalt beim Absetzen entwickeln (Aubert et al. 1980; Fiorotto et al. 1991; Plagemann et al. 1992; Heidel et al. 1999; Plagemann et al. 1999 a,b).

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß einer postnatalen Überernährung auf Wildtyp-Zuckerratten und auf heterozygote Zuckerratten, die Träger eines defekten *fa*-Allels sind, untersucht. Im Jahr 1961 wurde erstmals eine Mutation beschrieben, die bei Kreuzungstieren des Sherman-Rattenstammes mit dem Merck Stamm M spontan aufgetreten war (Zucker und Zucker 1961). Der aus heterozygoten Tieren abgeleitete Rattenstamm wird heute als Merck Strain 13 M oder nach seinen Erstbeschreibern als „Zuckerratten“ bezeichnet. Bei der *fa*-Mutation des Leptinrezeptors handelt es sich um eine Punktmutation, die zur Folge hat, daß es zu einem Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des Rezeptors kommt (Chua et al. 1996; Takaya et al. 1996). Dieser Gendefekt beeinträchtigt erheblich die Translokation des Rezeptors in die Zellmembran (Chua et al. 1996). Homozygote Träger dieses *fa*-Gendefektes entwickeln eine früh beginnende und lebenslang andauernde exzessive Fettakkumulation, die beim adulten Tier zu extremer Adipositas und damit verbunden zu einer Vielzahl weiterer Stoffwechselstörungen führt (Zucker und Zucker 1961; Bray 1977). Die Einbeziehung der heterozygoten *+fa*-Ratte als Untersuchungsmodell erschien angezeigt, obwohl Wildtyp-Zuckerratten und heterozygote Träger des *fa*-Allels unter Standardverhältnissen äußerlich nicht voneinander unterscheidbar sind, was mit einem rezessiven Erbgang des Gendefektes erklärt wurde (Zucker und Zucker 1961). Untersuchungen der letzten Jahre zur Rolle des Leptinrezeptor-Defektes als Ursache genetisch bedingter Fettsucht haben jedoch gezeigt, daß die Auswirkungen des Defektes keinem rein rezessiven Erbgang folgen. Bei Vorhandensein nur eines *fa*-Allels ist postnatal ein in der ersten Lebenswoche kodominanter und in der dritten Lebenswoche partiell dominanter Einfluß auf das Körperwachstum und den Körperfettgehalt nachweisbar (Truett et al., 1995; Schwarzer et al., 1997; Olbort 1998; Kraeft et al., 1999). Durch die Verwendung molekularbiologisch identifizierter Tiere konnten so frühere Hinweise auf Heterozygoten-Unterschiede im Jungtier eindeutig verifiziert werden (Phillips und Clearly 1994; Truett et al. 1995; Schwarzer et al. 1997). Neuere Untersuchungen belegen die Interaktion zwischen perinatalen Umweltfaktoren und einer genetischen Prädisposition für Adipositas bezüglich einer persistierenden Störung der Regulation der Energiereserven bei Sprague-Dawley Ratten (Levin und Govek 1998). In der vorliegenden Studie wurden, neben den zur Untersuchung von Gen-Umweltinteraktionen herangezogenen Zuckerratten, vergleichend die bisher überwiegend als Modell für postnatale Überernährung verwendeten Wistaratten untersucht (Plagemann et al. 1992; Voits et al. 1996; Heidel et al. 1999; Plagemann et al. 1999 a,b; Davidowa und Plagemann 2000).

1.4.2. Adipositas-Modell II: chemische Läsionierung des zentralen Leptin-Targets durch Monosodiumglutamat

1.4.2.1. Physiologischer Hintergrund: Der juvenile Tagesrhythmus der Ratte

Bei moderater Kältebelastung zeigen vor allem Individuen pigmentierter Rattenzuchtstämme während der Säugephase einen ausgeprägten endogenen circadianen Rhythmus ihrer Körperkerntemperatur (Nüßlein 1992; Nüßlein-Hildesheim et al. 1995), als dessen Ursache eine circadiane Änderung der thermoregulatorischen Wärmebildung nachgewiesen wurde (Nüßlein 1992; Redlin et al. 1992; Nüßlein-Hildesheim und Schmidt 1994). Dieser Tagesgang der Körperkerntemperatur der juvenilen Ratten tritt unabhängig von äußeren Zeitgebern auf (Nüßlein und Schmidt 1990; Nüßlein 1992; Nüßlein-Hildesheim und Schmidt 1994 b) und ist charakterisiert durch eine Torpor-ähnliche Absenkung sowohl der Körpertemperatur als auch der metabolischen Rate im circadianen Minimum der Tiere infolge Herabsetzung der thermoregulatorischen Thermogenese im braunen Fettgewebe (Redlin et al. 1992). Die temporäre Verminderung der Aktivität des braunen Fettgewebes dokumentiert sich in parallelen Veränderungen der GDP-Bindung in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes (BAT) (Redlin et al. 1992).

Die Ausprägung des Körperkerntemperatur-Rhythmus der Jungtiere weist auffallende Abweichungen vom Tagesgang bei adulten Ratten auf. Die Körperkerntemperatur (T_c) im circadianen Minimum kann bei mittlerer Kältebelastung Werte um 30 °C erreichen (Nüßlein und Schmidt 1994), während die T_c im Tagesgang adulter Ratten auch unter Kältebelastung im normothermen Bereich bleibt (Himms-Hagen et al. 1986). Unter thermoneutralen Bedingungen, das bedeutet innerhalb von Temperaturbereichen, in denen die Körpertemperatur ohne Einsatz eines zusätzlichen Wärmebildungsmechanismus und ohne Kühlung durch Wasserverdunstung konstant gehalten werden kann, zeigt die T_c bei Jungtieren im Unterschied zu adulten Ratten (Heusner 1972) keinen Tagesrhythmus (Nüßlein et al. 1989).

1.4.2.2. Chemische Läsionierung durch Mononatriumglutamat

Neurotoxische Aminosäuren sind ein vielfach beschriebenes neurobiologisches Werkzeug, um in spezifischen hypothalamischen Gebieten mit fehlender oder unvollständiger Blut-Hirnschranke ein Absterben von Neuronen zu verursachen, ohne diese Gebiete passierende

Axone zu schädigen (Meister 1991). Die für diese chemische Läsionierung am häufigsten verwandte Aminosäure ist Glutamat, das in sehr hohen Dosen angewandt, eine Übererregung von Neuronen hervorruft, die schließlich auf Grund einer Erschöpfung zellulärer Regulationsmechanismen den Tod der Zelle nach sich zieht (Haldemann und McLennan 1972). Fünf bis zehn Stunden nach der Verabreichung von Monosodiumglutamat (MSG) scheint die Nekrose der Dendriten und der Somata von Neuronen beendet zu sein. Begleitet wird der Vorgang von Neuronophagie durch infiltrierte Makrophagen (Olney 1971). Dieser neurotoxische Effekt trifft allerdings nur neuronale Systeme, auf die Glutamat als Neurotransmitter wirkt und die somit den entsprechenden Rezeptor exprimieren; Gliazellen und passierenden Axonen fehlt der notwendige Rezeptor, und sie sind deshalb nicht in die Läsionierung miteingeschlossen (Coyle und Schwarcz 1976).

Autoradiographien haben gezeigt, daß es sich bei den Gebieten, die die größte Sensitivität gegenüber MSG haben, um die sog. circumventriculären Organe (CVO) (s. Kap. 1.3.1.) handelt, die keine, oder um Kerngebiete, die eine teilweise offene Blut-Hirn-Schranke besitzen (Olney 1969). Dies trifft auf den Nucleus Arcuatus (ARC) zu, und er ist nach peripherer Verabreichung von Glutamat am stärksten von den Läsionen betroffen (Olney 1969). Eine einzelne subcutane Injektion von 0,25 mg MSG pro Gramm Körpergewicht postnatal führt schon nach vier Stunden zu einer deutlichen Reduzierung der Anzahl an Neuronen im Nucleus Arcuatus (ARC) (Meister 1991). Höhere Dosen erhöhen die Anzahl zugrunde gehender Neurone. Mit einer Dosis von 4 mg MSG pro Gramm Körpergewicht werden fast 80 % der Neurone des ARC zerstört (Meister 1991). Auf diese Weise führt MSG zu einer Zerstörung einer Vielzahl von Neuronen vor allem im ARC, weshalb Glutamat sehr häufig für die Charakterisierung der neuroendokrinen Rolle des ARC benützt wird. Ependymzellen, Gliazellen, passagierende Axone anderer Kerngebiete und die Blutgefäße des ARC bleiben unberührt (Meister 1991). Eine hochdosierte Behandlung mit MSG führt auch zu Zerstörungen anderer circumventriculärer Organe, also Gebiete mit offener Blut-Hirnschranke, die deshalb von zirkulierendem Glutamat gut erreicht werden können. Zu diesen Glutamat-sensitiven CVOs gehört unter anderem das Organum vasculosum der Lamina terminalis, das Subfornikalorgan und die Area Postrema (Olney 1969; 1977). Neben diesen werden auch der Nervus opticus und die innere Schicht der Retina in Mitleidenschaft gezogen, was zur Erblindung der Tiere führt (Olney 1969).

1.4.2.3. MSG-Behandlung als Adipositas-Modell

Postnatale Behandlung mit MSG führt dazu, daß beim adulten Tier eine ausgeprägte Adipositas bei verminderter Körpergröße zu beobachten ist (Olney, 1969, 1971; Olney et al. 1977). Laut Literaturberichten wird die MSG-induzierte Adipositas offenbar nicht durch Hyperphagie hervorgerufen, sondern soll metabolischen Ursprungs sein, und zwar wird der signifikant erhöhte Körperfettgehalt adulter Tiere unter anderem mit der Begünstigung der Fettdeposition auf Kosten des Körperwachstums und mit einer Energieeinsparung infolge verminderter thermogenetischer Aktivität des braunen Fettgewebes erklärt (Morris et al. 1998; Tokuyama und Himms-Hagen 1986; Tsukahara et al. 1998; Yoshida et al. 1985). Die postnatale Behandlung von Labornagern mit MSG entwickelte sich zu einem der häufig verwendeten Tiermodelle zur Untersuchung der Adipositas auslösenden Mechanismen.

Neben Adipositas kommt es aber auch zu einer Vielzahl neuro-endokriner Störungen durch die Zerstörung der Hypothalamisch-Hypophysären-Adrenocorticalen-Achse. In erheblichem Maße gestört wird auch das Fortpflanzungsgeschehen (Meister 1991). Wie andere Adipositas-Modelle weisen auch durch MSG-Behandlung adipös gewordene Mäuse und Ratten erhöhte Leptin-Spiegel auf (Frederich et al. 1995; Morris et al. 1998), die eine Leptinresistenz vermuten lassen. Neonatal mit MSG behandelte Ratten zeigen weder bei peripherer (Dawson 1997) noch bei zentraler Leptin-Verabreichung (Tang-Christensen et al. 1999) eine Verminderung der Futteraufnahme. Die Zerstörung von Leptin-Rezeptoren, die von den Neuronen des ARC exprimiert werden, wird als Grund für die Leptin-Resistenz angesehen (Dawson et al. 1997; Tang-Christensen et al. 1999).

1.5. Ziele der Arbeit

Mit den vorgelegten Untersuchungen soll versucht werden, auf der Grundlage von zwei unterschiedlichen Tiermodellen die Kenntnisse über die Pathogenese der Adipositas zu erweitern. Wichtig ist es in diesem Zusammenhang, die frühen postnatalen Normabweichungen zu erfassen, weil in späteren Phasen, insbesondere beim adulten Tier, primäre Ursachen nicht mehr sicher gegen sekundäre Folgen abzugrenzen sind.

Mit dem ersten Adipositas-Modell sollten die Veränderungen in der Körperzusammensetzung, die durch eine postnatale Überernährung entstehen, untersucht werden. Da die bereits zuvor zitierten Hinweise vermuten lassen, daß es dabei zu einer Interaktion normalerweise rezessiver genetischer Defekte mit Umweltfaktoren in der Weise

kommen kann, daß nur eine bestimmte Umweltkonstellation den Gendefekt phänotypisch manifest werden läßt (Bouchard 1996; Hebebrand et al. 2000), interessierte beim untersuchten Tiermodell, wie sich der *fa*-Gendefekt unter den Bedingungen der Überernährung verhält, und welche Konsequenzen sich dadurch hinsichtlich der Körperzusammensetzung und das Leptin-Systems ergeben. Um Rückschlüsse auf eventuell vorliegende Unterschiede zwischen Rattenstämmen aufzudecken, wurden neben Zuckerratten auch Wistarratten in die Untersuchung mit einbezogen. Es soll desweiteren die Frage geklärt werden, ob postnatale Überernährung die physiologische Antwort der Tiere auf exogene Leptinapplikationen verändert. Um funktionelle Veränderungen auch eventuell auf zentralnervöser Ebene nachweisen zu können, wurde die hypothalamische Leptinrezeptorbindung in die Auswertung der Daten mit einbezogen¹.

Bei dem zweiten Adipositas-Modell wurden die Wirkungen einer MSG-Behandlung innerhalb der ersten zehn Lebenstage von Ratten untersucht. Von besonderem Interesse war die Wirkung der chemischen Läsionierung des zentralen Leptin-Targets auf den Stoffwechsel der juvenilen Ratten, besonders vor dem Hintergrund der bereits vorgestellten Berichte, nach denen die beim adulten Tier sich manifestierende, durch MSG verursachte Adipositas nicht durch Hyperphagie, sondern durch Umlenkung des Metabolismus zugunsten der Fettdeposition und durch Einschränkung der metabolischen Temperaturregulation im braunen Fettgewebe bedingt ist, die beim juvenilen Tier eine besondere Bedeutung besitzt. Die Untersuchungen der Körperzusammensetzung und des Plasmaleptinspiegels hatten das Ziel herauszufinden, inwieweit sich die beim adulten Tier manifeste Adipositas schon in der frühen juvenilen Phase andeutet, und welche Rolle das Leptin dabei spielt.

Die Analyse der hypothalamischen Funktions- und Strukturänderungen der MSG-Behandlung beim juvenilen Tier war außerdem unter dem Gesichtspunkt interessant, daß sich das Gehirn verschiedener Säugetiere bei der Geburt in sehr unterschiedlichen Reifestadien befindet und die Ratte zu den Tierarten gehört, bei denen das Gehirn bei der Geburt noch relativ undifferenziert ist. Es reift erst im Verlauf der ersten drei postnatalen Wochen (Sherwood und Timiras 1970) und dürfte deshalb für frühe postnatale Noxen, eingeschlossen eine Behandlung mit MSG, besonders anfällig sein. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die Stoffwechsel- und Hormon-Untersuchungen durch histochemische Analysen ergänzt.

¹ Die Versuche zur hypothalamischen Leptinrezeptorbindung wurde von T. Ziska und A. Plagemann, Berlin, durchgeführt.

Eine der Fragestellungen war dabei, welche Rolle der ARC als Vermittler von zentralen Leptineffekten in dieser frühen Entwicklungsphase spielt. Als Indikator möglicher Leptinwirkungen wurde zusätzlich die Expression des Fos-Proteins als Marker für neuronale Aktivität auf der Ebene des Zentralnervensystems (Dragunow und Faull 1989; Hamamura et al. 1992) bestimmt.

Die thermoregulatorische Thermogenese wird, wie oben erwähnt, unter anderem durch das Neuropeptid Y, vermutlich über NPY-erge Projektionen zu parvozellulären Anteilen des PVN, moduliert. Diese wiederum projizieren zu sympathisch präganglionären Neuronen, von denen die sympathische Innervierung des BAT ausgehen. Daher wurde immunhistochemisch untersucht, ob die NPY-ergen Konnektivitäten zwischen für die Energiehomöostase wichtigen Kerngebieten schon am postnatalen Tag zehn bei der juvenilen Ratte ausgebildet sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Im Rahmen der Untersuchung zweier Adipositas-Modelle an juvenilen Ratten wurden überwiegend reinerbige Zuckerratten (13M) und nur in einzelnen Fällen Nachkommen von Hybridtieren aus Kreuzungen zwischen Zuckerratten und Brown Norway-Ratten, mit über 96 % des Erbgutes von Zuckerratten, aus der Zuchtkolonie des W.G. Kerckhoff-Institutes in Bad Nauheim verwendet. Ein Teil der Tiere aus dieser Population weisen eine Punktmutation im für den Leptinrezeptor codierenden Gen auf. Bei homozygotem Vorliegen dieses Gendefektes (*fa/fa*) kommt es zu einer übermäßigen Fettdeposition, die ab der vierten Lebenswoche phänotypisch erkennbar wird. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Tiere herangezogen, die sich bezüglich ihres Gewichtes normal entwickeln und kein defektes Gen tragen (+/+); ferner wurden für den Leptinrezeptordefekt heterozygote Tiere (+/*fa*) verwendet. Lediglich für die Untersuchung von Leptinrezeptor Bindungsstudien an Hypothalamus-Homogenaten (s. Kap. 2.4.3.) wurden *fa/fa*-Tiere miteinbezogen. Um darüber hinaus den Einfluß der verschiedenen Behandlungsformen auf unterschiedliche Rattenstämme zu ermitteln, wurden bei beiden Adipositas-Modellen auch Wistar-Ratten aus eigener Zucht (Kerckhoff-Institut) verwendet.

Die Tiere waren in einem fensterlosen Raum bei einer konstanten Temperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % untergebracht. Die Beleuchtung war in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet (9 Uhr Licht aus). Adulte Tiere wurden in Gruppen von bis zu vier Tieren in Makrolon-Käfigen (M4) auf Holzgranulateinstreu gehalten. Trächtige Weibchen wurden eine Woche vor ihrem errechneten Wurftermin in Einzelkäfigen (M 3) isoliert und verblieben dort mit ihren Jungtieren bis zum Absetzen. Die Tiere erhielten pelletiertes Zuchtfutter (Altromin 1314) und Wasser ad libitum.

Zur Zucht von Zuckerratten konnten nur weibliche +/+ und +/*fa*-Tiere verwendet werden, *fa/fa*-Weibchen hingegen sind steril. Bei den männlichen Tieren konnten alle drei Genotypen zur Zucht eingesetzt werden, *fa/fa*-Männchen allerdings sind nur zu ~ 10 % fertil. Der Zyklusstand der Weibchen wurde durch Vaginalabstriche festgestellt und danach die Paarungen abgestimmt. Auch ein erfolgreicher Deckakt wurde durch den Nachweis von Spermien im Vaginalsekret überprüft. Da nach einer Paarung erst am 16. Tag die Gravidität

sicher visuell erkennbar ist, wurden am Tag vier und gegebenenfalls auch noch später Zykluskontrollen durchgeführt, um nicht trächtig gewordene Weibchen schnell wieder zur Zucht einsetzen zu können. Für Adipositas-Modell II wurden ausschließlich Wildtyp (+/+)-Zuckerratten verwendet, die aus der Kreuzung von Wildtyp (+/+)-Tieren hervorgingen.

2.2. Tierexperimentelle Versuchsansätze

2.2.1. Adipositas-Modell I: postnatale Überernährung

Im ersten Adipositas-Modell wurden die Folgen einer postnatalen Überernährung auf den Energiehaushalt juveniler Ratten untersucht. Zur Unterscheidung wurden die Tiere am ersten Tag post natum durch eine subcutane Tätowierung der Pfoten mit Drawing Ink (Pelikan, Hannover) markiert. Würfe heterozygoter Eltern wurden zusätzlich genotypisiert. Am Tag drei post natum wurde dann der normale Wurf (zehn bis zwölf Tiere) auf vier Tiere reduziert (kleines Nest: SL), die am Tag 21 zur Bestimmung der Körperzusammensetzung dekapitiert wurden (Serie I). In der Serie II wurden zu Vergleichszwecken Tiere im normalen Nest (NL), das heißt zehn bis zwölf Tiere pro Wurf, großgezogen, deren Körperzusammensetzung ebenfalls am Tag 21 bestimmt wurde. Auf der Grundlage der Genotypisierung wurden jedem Nest jeweils definierte Genotypen zugeordnet.

Die Anzahl der Tiere aus der Serie I und II sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Rattenstamm	Genotyp	Geschlecht	Behandlung = Nestgröße	n
Serie I :				
Zuckerratten	+/+	Weibchen	SL	10
	+/+	Männchen	SL	10
	+/fa	Weibchen	SL	16
	+/fa	Männchen	SL	14
Wistarratten		Weibchen	SL	8
		Männchen	SL	14
Serie II :				
Zuckerratten	+/+	Weibchen	NL	15
	+/+	Männchen	NL	11
	+/fa	Weibchen	NL	12
	+/fa	Männchen	NL	14
Wistarratten		Weibchen	NL	29
		Männchen	NL	22
Gesamtzahl				n=175

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere der Serie I und II aufgetrennt nach Genotyp, Geschlecht und Behandlung (SL = kleines Nest; NL = normales Nest).

Zwei weitere Versuchsserien wurden zur Untersuchung der Wirkungen exogener Leptingaben bei der postnatalen Überernährung herangezogen. Hierzu wurden Tiere der Serien III, die wie oben beschrieben im kleinen Nest aufgezogen wurden, von Tag 1 bis Tag 21 mit rekombinantem murinen His-tagged Leptin (molare Masse = 17570 D, Herstellung siehe Müller et al. 1997) behandelt, das von Aventis Pharma (Frankfurt), zur Verfügung gestellt worden war. In der Serie IV wurden Wistarraten in einem normalen Nest aufgezogen und ebenfalls mit Leptin behandelt. 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. Die Leptinlösung wurde entsprechend den verwendeten Konzentrationen mit PBS verdünnt. Die Injektionen erfolgten zweimal täglich im Abstand von 12 h, kurz nach Beginn der Licht- oder Dunkelphase subcutan im Nacken, da die Wirksamkeit des Leptins erhöht werden kann, wenn die Tagesdosis auf zwei Injektionen verteilt wird (Döring 2001). In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß keine signifikanten Unterschiede zur Wirkung von rekombinantem murinen Leptin mit einer Molmasse von 16 kD (Schmidt et al. 1997) festzustellen waren. Wurfgeschwistern im gleichen Nest wurde zur Kontrolle die gleichen Volumina PBS injiziert.

Die Anzahl der Tiere aus der Serie III und IV sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Rattenstamm	Genotyp	Geschlecht	Behandlung= Nestgröße	Leptin-Dosis	Leptin-Behandelt n	PBS-behandelt n
Serie III :						
Zuckerratten	+/+	Weibchen	SL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	5	5
	+/+	Männchen	SL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	4	5
	+/ <i>fa</i>	Weibchen	SL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	8	8
	+/ <i>fa</i>	Männchen	SL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	8	8
Wistarratten		Männchen	SL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	6	6
Serie IV :						
Wistarratten		Männchen	NL	$2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	5	8
Gesamtzahl						n=73

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere der Serie III und IV aufgetrennt nach Genotyp, Geschlecht, Nestgröße (SL = kleines Nest; NL = normales Nest) und Dosis der Leptinbehandlung.

Zusätzlich sollte eine genauere Charakterisierung der Liganden-Bindungskinetik untersucht werden. Es wurde deshalb in vier Assays Leptin-Rezeptor Bindungsstudien an Hypothalamushomogenaten 21-Tage alter Tiere durchgeführt. Die Anzahl der Tiere aus den vier Assays sind in Tabelle 3 dargestellt:

Rattenstamm	Genotyp	Behandlung = Nestgröße	Leptin-Dosis	Leptin-behandelt n	PBS-behandelt n	n
Assay 1:						
Zuckerratten	+/+	NL	-			12
	+/ <i>fa</i>	NL	-			19
	<i>fa/fa</i>	NL	-			12
Assay 2:						
Zuckerratten	+/+	SL	-			10
	+/ <i>fa</i>	SL	-			10
Assay 3:						
Zuckerratten	+/+	SL	2 x 0,9 µg*g ⁻¹ *d ⁻¹	8	8	
	+/ <i>fa</i>	SL	2 x 0,9 µg*g ⁻¹ *d ⁻¹	8	8	
Assay 4:						
Zuckerratten	+/+	NL	-			14
	+/ <i>fa</i>	NL	-			13
	+/+	SL	-			13
	+/ <i>fa</i>	SL	-			13
Gesamtzahl						148

Tabelle 3: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere der Bindungsassays 1-4 aufgetrennt nach Genotyp, Nestgröße (SL = kleines Nest; NL = normales Nest) und bei Assay 3 zusätzlich die Dosis der Leptinbehandlung.

2.2.2. Adipositas-Modell II: Läsionierung des zentralen Leptintargets

Das zweite Adipositas-Modell „Läsionierung des zentralen Leptintargets durch Monosodiumglutamat“ beinhaltete sowohl physiologische als auch histologische Versuchsansätze. Die physiologischen Untersuchungen beschäftigten sich mit der Wirkung einer Monosodiumglutamatbehandlung bis zum Alter von zehn Tagen auf den Energiehaushalt und die Körperzusammensetzung. Dazu wurden die Tiere von Tag eins bis Tag neun mit Monosodiumglutamat (MSG) (Sigma-Aldrich) behandelt, das den Tieren einmal täglich während der Lichtphase in einer Konzentration von 3 mg/g Körpergewicht,

gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung (NaCl-Lösung), subcutan gespritzt wurde. Kontrolltiere wurden nur mit NaCl-Lösung injiziert. Ein Wurf wurde jedoch zu Vergleichszwecken nur alle zwei Tage mit MSG behandelt. Am Tag zehn wurden die Tiere für die Bestimmung der Körperzusammensetzung getötet. Diese Serie V umfaßte n = 32 Tiere (vier Würfe).

Um weitere Stoffwechselfparameter erfassen zu können, wurden in der Versuchsserie VI Rattenwelpen mit MSG-Behandlung und Kontrolltiere künstlich aufgezogen (s. u.), wobei diese Aufzucht bei zehn Tieren aus einem Wurf von Tag vier bis Tag zehn (VI b) und bei 19 weiteren Tieren aus zwei verschiedenen Würfen von Tag zehn bis dreizehn (VI a) in einer Klimakammer erfolgte². Danach wurden die Tiere ebenfalls für die Bestimmung der Körperzusammensetzung getötet.

Die Versuchsserie VII diente der histologischen Charakterisierung der durch MSG hervorgerufenen Läsionen in Kerngebieten des Hypothalamus. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand hierbei der Nucleus arcuatus. Die Tiere wurden wie für Serie V beschrieben im Wurfverband mit MSG behandelt und am Tag zehn transkardial perfundiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte hergestellt und diese mit Kresylviolett gefärbt. (n=31, aus 4 verschiedenen Würfen).

Die Anzahl der Tiere aus der Serie V – VII sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

² Die Untersuchung der 10-13 Tage alten Tiere wurde von B. Nüßlein-Hildesheim durchgeführt.

Versuchsserie	Genotyp	Geschlecht	Behandlung	Aufzucht	n
Serie V	+/+	Weibchen	MSG	bei der Mutter	9
	+/+	Männchen	MSG	bei der Mutter	6
	+/+	Weibchen	NaCL	bei der Mutter	10
	+/+	Männchen	NaCL	bei der Mutter	7
Serie VI a	+/+	Weibchen	MSG	künstlich	5
	+/+	Männchen	MSG	künstlich	5
	+/+	Weibchen	NaCL	künstlich	7
	+/+	Männchen	NaCL	künstlich	3
Serie VI b	+/+	Weibchen	MSG	künstlich	3
	+/+	Männchen	MSG	künstlich	3
	+/+	Weibchen	NaCL	künstlich	2
	+/+	Männchen	NaCL	künstlich	2
Serie VII	+/+	Weibchen	MSG	bei der Mutter	8
	+/+	Männchen	MSG	bei der Mutter	8
	+/+	Weibchen	NaCL	bei der Mutter	8
	+/+	Männchen	NaCL	bei der Mutter	7
Gesamtzahl					n=93

Tabelle 4: Übersicht über die Anzahl der Versuchstiere der Serie V bis VII aufgetrennt nach Genotyp, Geschlecht, Behandlung und Aufzucht. In den Serien V – VII wurden ausschließlich Wildtyp (+/+)- Zuckerraten untersucht.

2.2.3. Ergänzende immunhistochemische Analysen

Das Ziel der Versuchsserie VIII war es, immunhistologisch diejenigen hypothalamischen Kerngebiete genauer zu erfassen, die durch Leptin stimuliert wurden. Zu diesem Zweck wurden 26 Tiere am Tag zehn zu Beginn der Dunkelperiode von ihrer Mutter getrennt. Unter Rotlicht, um exogene Lichtreize auszuschließen, wurde ihnen eine einmalige Dosis 5,4 µg*^g KG murinen Leptins subcutan injiziert. Nach 90 beziehungsweise 120 Minuten wurden sie transkardial perfundiert und die Gehirne für den weiteren immunhistochemischen Prozeß entnommen. Als spezifischer Indikator für neuronale Aktivität auf der Ebene des Zentralnervensystems wurde das c-Fos Genprodukt immunhistologisch nachgewiesen.

Um herauszufinden, ob die für die Energiehomöostase wichtigen Konnektivitäten zwischen dem ARC und dem Nucleus paraventricularis (PVN) auch bei der zehn Tage alten Ratte schon ausgebildet sind, wurde das Neuropeptid Y immunhistochemisch untersucht. Diesem 36 Aminosäuren umfassenden Peptid wird eine wichtige Rolle bei der hypothalamischen

Regulation der Energiebilanz bei Nagetieren zugesprochen (Frankish et al. 1995). NPY wird von Neuronen des ARC gebildet, die unter anderem Projektionen zum PVN haben, die bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase eine zentrale Rolle spielen (Bai et al. 1985). Unbehandelte zehn Tage alte Rattenwelpen (Serie IX, n=4) wurden zu diesem Zweck transkardial perfundiert und das Gehirn zur weiteren immunhistochemischen Verarbeitung entnommen. In den Serien VIII – IX wurden ausschließlich Wildtyp (+/+)- Zuckerratten verwendet.

Die Anzahl der Tiere aus der Serie VIII – IX sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Versuchsserie	Genotyp	Geschlecht	Behandlung	Aufzucht	n
Serie VIII	+/+	Männchen	Leptin	bei der Mutter	8
	+/+	Weibchen	Leptin	bei der Mutter	8
	+/+	Männchen	PBS	bei der Mutter	8
	+/+	Weibchen	PBS	bei der Mutter	7
Serie IX	+/+	Weibchen	keine	bei der Mutter	2
	+/+	Männchen	keine	bei der Mutter	2
Gesamtzahl					n=35

Tabelle 5: Übersicht über die Anzahl der Wildtyp (+/+)-Zuckerratten der Serie VIII bis IX aufgetrennt nach Geschlecht, Behandlung und Aufzucht.

2.3. Physiologische Analysen

2.3.1. Plasmagewinnung

Die Tiere der Versuchsserien I, II, V und VI, die für eine Bestimmung der Körperzusammensetzung und Untersuchung ihrer Blutproben vorgesehen waren, wurden entweder am Ende der Leptinbehandlung am Tag 21 oder nach Abschluß der MSG-Behandlung am Tag zehn dekapitiert. In einem Nebenraum wurden die Welpen durch Verbringen in eine gesättigte CO₂ –Atmosphäre für 30 Sekunden narkotisiert, gewogen und dann dekapitiert. Der Tötungsvorgang wurde für die Tiere so streßfrei wie möglich gestaltet. Das nach der Dekapitierung aus dem Torso austretende Blut wurde in einer Verdünnung von 1:10 in Heparin-Natrium (Liquemin 5000, Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen) aufgefangen und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde das Blut bei 3500 U/min und 4° C für zehn Minuten zentrifugiert, um das Blutplasma von den korpuskulären Bestandteilen

zu trennen. Danach wurde das Plasma von den Blutzellen abgetrennt und beide Anteile gewogen. Aus den Wägungen wurden die Plasmamenge und die Verdünnung des Plasmas durch das Heparin bestimmt. Der daraus resultierende Verdünnungsfaktor diente zur Korrektur der Meßwerte bei der späteren Bestimmung des Plasmaleptinspiegels. Das gewonnene Plasma wurde aliquotiert und in 100 µl und 50 µl Aliquots bis zur Messung bei – 80 °C gelagert. Um einen möglichen Tagesgang im Plasmaleptinspiegel zu berücksichtigen, wurden die Tiere alle zu Beginn der Dunkelphase getötet.

2.3.2. Eviszeration zur Bestimmung der Körperzusammensetzung

Zur Bestimmung der Körperzusammensetzung wurden die Tiere der oben genannten Versuchsserien getötet und der Magen-Darm-Trakt entnommen. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß der Energiegehalt des Kotes oder Futterreste nicht in die Bestimmung der Körperzusammensetzung mit einfließen. Der Tierkörper wurde ventral entlang der Linea alba mit einem Skalpell aufgetrennt. Die Milz wurde stumpf von der großen Kuvatur des Magens abpräpariert und danach der Ösophagus an seiner Einmündung in den Magen abgetrennt. Nach Durchtrennung des Ligamentum hepatogastricum konnte der Magen und nach vorsichtiger Entfernung des Pankreas und des Ligamentum hepatoduodenale auch der craniale Anteil des Duodenums entfernt werden. Auch das Omentum majus wurde an der großen Kurvatur des Magens abgetrennt und verblieb im Tierkörper. Danach wurden die restlichen Darmanteile (Jejunum, Ileum, Colon, Zäkum, Rektum) freipräpariert und entfernt. Das fetthaltige Gekröse wurde stumpf vom Darm abpräpariert und verblieb im Tierkörper. Um zu Verhindern, daß Urin mit in die Bestimmung des Körperwassergehaltes einging, wurde zum Schluß die Harnblase eröffnet und der Urin nach außen entleert.

2.3.3. Bestimmung von Feuchtmasse, Trockenmasse, fettfreier Trockenmasse und Fettmasse

Nach der Eviszeration wurden die Tiere gewogen und so die Feuchtmasse bestimmt. Die Menge des zuvor entnommenen Blutes wurde ebenfalls durch Wiegen bestimmt und mitberücksichtigt. Die Feuchtmasse stellt, da Variationen im Füllungszustand von Magen und Darm wegfallen, eine besonders genaue Bezugsgröße für die Bestimmung der weiteren Parameter der Körperzusammensetzung dar. Deren Bestimmung erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Standardverfahren (Markewicz et al. 1993; Olbort 1998). Die

Tierkörper wurden als Ganzes in einem Trockenschrank bei 75° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wodurch die Trockenmasse und damit auch der Wassergehalt der Tiere bestimmt werden konnten. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz wurden die mumifizierten Tierkörper sorgfältig in stabiles, fettfreies Filterpapier verpackt, welches durch Heftklammern verschlossen wurde, um Verluste von Körpertrockenmasse während des nachfolgenden Extraktionsvorganges zu verhindern. Durch stumpfen Druck wurden die Tierkörper in der Papierhülle zerkleinert und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur (Merck, Eurolab, Frankfurt) einer ca. 24-stündigen Chloroform-Extraktion (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unterzogen. Der Soxhlet-Extraktionsapparat, dessen 1000 ml Rundkolben von einem auf 82°C eingestellten Rundpilz erhitzt wurde, enthielt insgesamt ca. 700 ml Chloroform. In dem aufgesetzten Rückflußkühler kondensierte das Chloroform und tropfte in den Extraktionsapparat zurück. Sobald dieser gefüllt war, lief das Chloroform zusammen mit dem gelösten Fett in den Rundkolben zurück. Die Extraktion war dann abgeschlossen, wenn das Chloroform im Rückflußkühler klar blieb. Die vollständig entfetteten Körperfragmente wurden von dem Filterpapier befreit, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß es nicht zu einem Substanzverlust kam, und in Aluminiumschalen im Trockenschrank (bei ca. 75 °C) getrocknet. Das Endgewicht stellt die fettfreie Trockenmasse (FFDM: fat-free dry mass) dar. Körperfettgehalt, Wassergehalt und FFDM wurden sowohl als Absolutwerte als auch in Prozent der Feuchtmasse errechnet. Als kalorisches Äquivalent wurde bei der Berechnung des Energiegehaltes der Fettmasse 38 kJ pro Gramm angenommen, die Umrechnung der FFDM basiert auf einem Wert von 20 kJ pro Gramm (Grodzinski et al. 1975).

2.3.4. Künstliche Aufzucht

Die Tiere der Serie VI des zweiten Adipositas-Modells wurden künstlich aufgezogen; dabei wurden sie entweder mit MSG oder mit NaCl (Kontrolltiere) behandelt.

Die Methode der künstlichen Aufzucht von Rattenwelpen unter definierten, standardisierten Umweltbedingungen und der Zuführung sowohl qualitativ als auch quantitativ identischer Nahrung ist ein bereits in mehreren Arbeiten und Veröffentlichungen (Mumm et al. 1989; Kaul et al. 1990; Nüßlein und Schmidt 1990) exakt beschriebenes Verfahren, so daß hier nur noch eine Zusammenfassung erfolgt.

2.3.4.1. Versuchsaufbau

Die Versuchstiere befanden sich einzeln in durchsichtigen Kunststoffbehältern, die mit saugfähigem Material ausgelegt waren und, mit angeschraubten Bleiplatten beschwert, in einem temperierten Wasserbad innerhalb einer Klimakammer (Weiss Technik, Lindenstruth) flottierten. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die Tierbehälter waren bis auf ein zentrales Loch ($\varnothing = \text{ca. } 0,5 \text{ cm}$) im Deckel luftdicht verschlossen. Durch diese Öffnung reichte ein an einem Gestell über dem Wasserbad befestigtes Metall-Rohr fast bis zum Boden der Behälter, über welches die Luft zur Messung des Sauerstoffverbrauches der Tiere abgesaugt wurde. Der verbleibende Spalt zwischen Rohr und Deckelöffnung war so groß, daß das Nachströmen von Frischluft gewährleistet und auch die Zuführung von Milchkatheter und Thermoelement ermöglicht wurde, ohne daß die freie Rotation der Behälter behindert wurde.

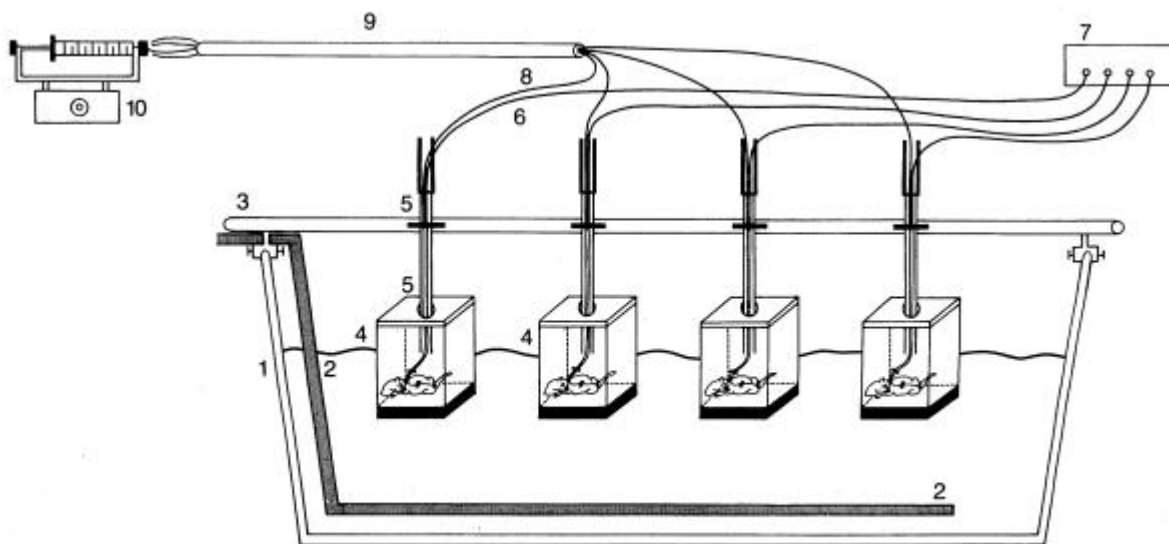


Abb. 2: Versuchsaufbau für die künstliche Aufzucht

1) Wasserbad, 2) Heizspirale, 3) Metallgitter zur Fixation der Tierbehälter, 4) Tierbehälter mit Rattenwelpen, 5) Luftabsaugrohr, 6) Thermoelement, 7) Temperaturverstärker, 8) Milchleitungen, 9) Kühlmantel für die Milchleitungen, 10) Milchpumpen mit Spritzen.

Aus: Mumm et al. 1989

2.3.4.2. Ernährung

Ein Muttermilchersatz (Kunstmilch) wurde aus Kondensmilch (Bärenmarke 10 %; Allgäuer Alpenmilch GmbH, München), Maiskeimöl (Mazola, Heilbronn), Leitungswasser, Aminosäuren, Mineralien (Sigma-Aldrich) und Vitaminen (Polybion N-Tropfen, Merck, Darmstadt) hergestellt (für die Mengenangaben siehe Messer 1969). Der Fettgehalt dieser Milch betrug ca. 13 % bei einem Kaloriengehalt von 7 –8 kJ/ml. Dieses Gemisch wurde homogenisiert und mit einer Vakuumpumpe entgast, portioniert, bei –20° C eingefroren und bei Bedarf im Kühlschrank bei 7° C aufgetaut.

Durch Perfusionspumpen (Braun AG, Melsungen), die sich im Kühlschrank befanden, wurde die Milch kontinuierlich über gekühlte Polyethylen-Schläuche zu den Behältern geführt. Das in der Klimakammer befindliche Schlauchstück wurde der Klimakammer-Temperatur unmittelbar ausgesetzt, um die Milch zu erwärmen, bevor sie den Welpen über intraösophageale Katheter zugeführt wurde. Die Katheter bestanden aus einem 3,5 cm langen weichen Silastikschlauch (602-105, Dow Corning, Midland/USA), der über das gebogene Ende eines 20 cm langen PP 10 Tubus (Dow Corning) gezogen wurde. Der gebogene Bereich lag dabei im Mundwinkel der Welpen, der weiche kurze Schenkel endete tief im Ösophagus. Die Katheter wurden durch Heftpflaster und Sekundenkleber an der Backe und im Nacken der Tiere befestigt und dann mit den Schläuchen, die zu den Perfusionspumpen führten, verbunden. Die Futterzufuhr wurde der Körpergröße und dem Magenfüllungszustand angepaßt und täglich entsprechend erhöht (Mumm et al. 1989; Kaul et al. 1990; Nüßlein und Schmidt 1990); dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die gewählte Milchrate nicht zu einer Magenüberfüllung führte. Begonnen wurde am Tag vier mit 2,0 ml Milch/Tag. Diese Menge wurde kontinuierlich und schrittweise gesteigert, bis die Tiere schließlich am Tag zehn 4,2 ml Milch/ Tag erhielten. Bei den älteren Tieren, die ab Tag zehn künstlich aufgezogen wurden, wurde zu Beginn eine Milchrate von 3,9 ml/Tag gewählt, die am Versuchsende (Tag dreizehn) bis auf 4,5 ml/ Milch pro Tag gesteigert wurde. Alle Tiere eines Wurfes erhielten stets Milch gleicher Zusammensetzung und Menge.

Zweimal pro Tag (8.00 Uhr / 20.00 Uhr) wurde der Gesamtzustand der Jungen begutachtet, die Zellstoffeinlagen der Tierboxen gewechselt und, falls notwendig, die Wangenpflaster erneuert. Zu diesem Zweck wurden die Tiere einzeln für ca. zehn Minuten aus der Tierbox entnommen, ihr jeweiliger Gesundheitszustand kontrolliert und die Magenfüllung begutachtet. Durch vorsichtiges Reiben des Bauches wurden die Defäkation und die Miktion

der Tiere angeregt. Zusätzlich wurden jeweils um 20.00 Uhr die Thermoelemente aus dem Darm genommen, um die Jungen zu wiegen.

2.3.4.3. Kontinuierliche Messung der Körpertemperatur

Die Körpertemperatur (T_c) der Welpen und die Umgebungstemperatur (T_a) wurden kontinuierlich mit 0,06 mm dicken Kupfer-Konstantan-Thermodrähten (California Finewire, Grover City, CA) gemessen. Um das empfindliche Rektum der jungen Tiere zu schützen, war der Draht von einem PP10-Schlauch überzogen, dessen Ende von einem 5 mm langen, am Ende mit Silikon-Kautschuk (E41, Wacker, München) verschlossenen Silastik-Schlauch (602-105, Außendurchmesser 0,6 mm) ummantelt war. Am Tag vier wurden diese Thermoelemente 1,8 cm tief in das Rektum der Tiere eingeführt. Um dem schnellen Wachstum der Tiere gerecht zu werden, wurden die Thermoelemente jeden Tag 0,5 cm tiefer eingeführt. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung der Thermoelemente im Bereich zwischen 20° und 40° C. Die Thermospannung wurde nach Verstärkung durch einen Temperaturmessverstärker (Elektronik-Werkstatt des Kerckhoff-Instituts) über einen 30-Kanal-Punktplotter (Yokogawa 3081 Hybrid Recorder, NBN Elektronik GmbH, Herrsching) aufgezeichnet und durch einen Computer (Tandon Plus, Tandon Corporation, Chatsworth, CA) gespeichert.

2.3.4.4. Einstellen der Umgebungstemperatur auf die Bedingungen einer moderaten Kältebelastung

Um die thermoregulatorische Belastung in etwa der im Nest anzupassen, wurde die T_a während der Aufzuchten ab Tag zehn aufgrund der Erfahrungen bei früheren Untersuchungen so eingestellt, daß die metabolische Rate (MR) ca. 100 % über dem Ruheumsatz unter thermoneutralen Bedingungen lag. Dazu wurde zweimal täglich die durchschnittliche MR bestimmt und die T_a während des Versuches entsprechend der angestrebten MR schrittweise bis auf 27°C zum Versuchsende erniedrigt, um die verbesserte thermische Isolation der wachsenden Tiere auszugleichen. Bei einem Einsetzen der Tiere im Alter von vier Tagen mußten während den ersten Versuchstagen Umgebungstemperaturen von 33-31 ° C eingestellt werden, um eine gesunde Entwicklung während der weiteren künstlichen Aufzucht zu gewährleisten. Diese Temperatur wurde dann schrittweise verringert und betrug bei Versuchsende schließlich 29° C.

2.3.4.5. Sauerstoffmessung

Bei den künstlich aufgezogenen Tieren erfolgte mittels indirekter Kalorimetrie die Bestimmung der Stoffwechselrate von Tag zehn bis Tag dreizehn und bei einem Wurf von Tag vier bis zehn bei jeweils sieben Tieren pro Wurf. Die Analyse der aus den Tierbehältern und der Umgebung abgesaugten Luft erfolgte mittels eines elektrochemisch arbeitenden Zwei-Kanal Sauerstoff-Analysators (S-3A111, Ametek, Pittsburgh, USA) in einem offenen Flußsystem. Dieses Meßsystem wurde jeweils vor Versuchsbeginn mit Eichgasen entsprechend dem Meßbereich kalibriert. Zur Absaugung der Kammerluft in der beschriebenen Weise wurden Membranpumpen eingesetzt. Diese Meßluft wurde zunächst zur Trocknung durch mit Drierite[®] (CaSO₄, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen) gefüllte Trockenröhren geleitet. Nach Durchströmen von Aktivkohlefiltern, die zur Absorption organischer Moleküle dienten, wurden Staubpartikel mit Hilfe von Membranfiltern abgefangen. Die Luft in jedem der acht Messkanäle wurde anschließend durch leere 500 ml Flaschen abgesaugt. Wegen des großen Volumens der Flaschen traten die unmittelbar am Absaugrohr herrschenden starken Schwankungen des Sauerstoffgehaltes der Tierluft am Messgerät nicht mehr auf. Ein Teilstrom der so getrockneten und gereinigten Luft wurde zur Bestimmung des Sauerstoffgehaltes zu dem elektrochemischen Sauerstoffanalysator geleitet. Gleichzeitig wurde die Umgebungsluft in gleicher Weise abgesaugt und auf ihren Sauerstoffgehalt analysiert; er diente als Referenzwert für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches der Tiere. Durch Magnetventile, die mit einem Zeitgeber verbunden waren, wurde die angesaugte Luft entweder zu einem Massenflußmesser (FM 360, Tylan General, Eching bei München) und von dort zum Sauerstoffanalysator geleitet, oder durch Bypasspumpen in den Raum entlassen. Die Luft aus den Tierbehältern, die gerade nicht in Meßposition waren, wurde über Membranpumpen kontinuierlich abgesaugt, um auch zwischen den Meßperioden einen gleichmäßigen Luftaustausch in den Behältern zu gewährleisten. Um dabei die Flußrate auf demselben Wert halten zu können wie in Meßposition, war zwischen den beiden Ventilen ein Wassermanometer zur Kontrolle eingebaut. Die Flußrate, mit der die Luft abgesaugt wurde, wurde bei der Aufzucht von Tag vier bis zehn mit zunehmendem Alter der Tiere allmählich von 120 auf 180 ml/min erhöht. Bei den kurzen Aufzuchten mit den älteren Tieren wurden Werte von 300 bis 340 ml/min eingestellt. Dadurch wurde der Sauerstoffverbrauch unterschiedlich großer Welpen berücksichtigt und die Sauerstoffextraktion aus der Tierboxenluft bei unter 0,5 % gehalten. Die abgesaugte Luft aus sieben Tierboxen sowie die Umgebungsluft zur Kontrolle des

Referenzwertes wurden im zyklischen Durchlauf von je fünf Minuten gemessen. So wurde von jedem der sieben Tiere im zeitlichen Abstand von 40 Minuten ein gemittelter Meßwert für den Sauerstoffverbrauch bestimmt.

Neben der Sauerstoffextraktion wurde die Flußrate ermittelt und beides zusammen mit der Meßkanal-Position von einem Computer aufgezeichnet. Zur optischen Überwachung wurden alle angefallenen Daten parallel von einem Mehrkanal-Hybrid-Drucker (Yokowaga 3081, NBN Elektronik GmbH, Herrsching) aufgezeichnet.

Die Kalibrierung des Sauerstoffanalysators im gewünschten Meßbereich erfolgte durch Gasgemische mit Sauerstoffkonzentrationen zwischen 20 und 21 %. Die Abweichung vom Sollwert lag in diesem Bereich unter 0,01%. Zur Kalibrierung des Massenflußmessers wurde nach Einstellung eines konstanten Luftflusses die Zeit gestoppt, in der ein Seifenfilm eine markierte Strecke in einem Plexiglasrohr zurücklegte. Die im Raum herrschende Temperatur und Luftfeuchte sowie der Luftdruck wurden ermittelt. Des weiteren wurden das Luftvolumen des markierten Bereiches der Plexiglassäule auf Standardbedingungen umgerechnet. Der errechnete Luftfluß wurde gegen die am Massenflußmesser eingestellten Spannungen aufgetragen.

2.4. Weitere analytische Methoden

2.4.1. Genotypisierung durch Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1.1. Isolierung von DNA aus Gewebe

Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden). Verwendet wurden ca. 10 mg frisches oder bei -20° C eingefrorenes Gewebe aus der Schwanzspitze, die Welpen einen Tag nach der Geburt abgenommen wurde.

Zuerst wurde das Gewebe mit 180 μ l Lyse Puffer (QIAmp Tissue Kit) und 20 μ l Proteinase K (Böhringer, Mannheim) in einer Konzentration von 10 mg/ml, gelöst in Aqua dest., über Nacht bei 55° C in einem Schüttelwasserbad verdaut. Dieser Ansatz wurde dann laut Protokoll umgepuffert. Anschließend wurde die DNA durch Ethanolzugabe (96 -100 %) gefällt. Dieser Ansatz wurde dann auf Minisäulen pipettiert, an deren Membran die DNA gebunden wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit dem entsprechenden Puffer wurde sie mit 50 μ l 70° C warmem Wasser eluiert. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt.

2.4.1.2. Grundlagen der PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, *in vitro* vervielfältigt. Hierbei wird zunächst die Ziel-DNA bei einer Temperatur von 90 bis 95° C in die komplementären Einzelstränge zerlegt (melting). Die beiden Oligonucleotid-Primer werden an die getrennten Stränge der DNA, die für die Zielsequenz codieren, hybridisiert (anealing). Sie grenzen die zu amplifizierende Zielsequenz ein und befinden sich im Vergleich zur Zielsequenz im Überschuß in der Reaktionslösung. Der Hybridisierungsschritt erfordert abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Primer unterschiedliche Temperaturen. Das 3'-OH-Ende der hybridisierten Oligodesoxynucleotid Primer wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) als Startpunkt für eine *in vitro* DNA-Synthese verwendet (synthesis). Die Primer werden unter Bildung einer Doppelstrang-DNA im ersten Zyklus über die Zielsequenz hinaus verlängert, mit weiteren Zyklen wird aber nur die von den beiden Primern eingegrenzte DNA-Sequenz vervielfältigt.

Zu Beginn der Reaktion werden alle notwendigen Komponenten zusammengegeben. Die Abfolge der Reaktionsschritte: Strangtrennung, Hybridisierung und DNA-Synthese wird allein durch zyklische Temperaturänderungen in einem Thermocycler gesteuert. Je nach Ausgangsmenge der Ziel-DNA werden 20 bis 60 Zyklen durchlaufen.

Chua et al. konnten 1996 nachweisen, daß bei Trägern des *fa*-Allels eine Punktmutation, nämlich ein Aminosäureaustausch von Glutamin (+) zu Prolin, im Leptinrezeptor-Gen vorliegt. Mit Hilfe der beiden eingesetzten Primer wird ein 112 Basenpaare langes DNA Fragment synthetisiert, das die Punktmutation flankiert. Das in der PCR amplifizierte DNA-Fragment beinhaltet entweder die Punktmutation in einem oder beiden Allelen (*+/fa* und *fa/fa*) oder die unveränderte Basensequenz des Genes (*+/+*). Der Aminosäureaustausch führt zu der veränderten Nucleotidfolge -CCGG-, die wiederum durch die Restriktionsendonuclease MSP 1 erkannt wird (Chua et al. 1996). Dieses Enzym ist in der Lage, die DNA eines mutierten *fa*-Alleles in zwei Fragmente (78 bp und 34 bp) zu zerschneiden, während die DNA von Wildtyp-Tieren von dem Enzym unbeeinflusst bleibt.

2.4.1.3. PCR-Protokoll und Auftrennung der Produkte

Für jeden Ansatz wurde ein Master Mix angesetzt. Im folgenden sind die Mengenangaben pro Probe angegeben:

- 37,5 µl H₂O
- 5 µl 10 x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), (Perkin Elmer)
- 1 µl dNTP-Mix (200 µM) (Böhlinger, Mannheim)
- 2 µl Primer MoBr 8 (20 pmol) (MWG Biotech GmbH, Ebersberg)
- 2 µl Primer MoBr 11 (20 pmol) (MWG Biotech GmbH, Ebersberg)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 u) (Ampli Taq Gold, Perkin Elmer)

Zu diesem Ansatz wurden jeweils 2 µl aufgereinigte DNA hinzugefügt.

Die Primer hatten folgende Sequenz:

Sense Primer MoBr 8: 5`-TAT GGA AGT CAC AGA TGA TGG-3`

Antisense Primer MoBr 11: 5`-TCT TAC AAT TGT AGA ATT CTC-3`.

Die folgenden PCR-Bedingungen wurden eingestellt:

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1) Denaturierung: | 5 min 94 °C (melting) |
| 2) 60 Zyklen: | 30 sec. 94 °C (melting) |
| | 30 sec. 55 °C (anealing) |
| | 30 sec. 72 °C (synthesis) |
| 3) Extension: | 7 min 72°C (synthesis) |

Die PCR-Reaktion fand in einem Thermocycler (Gene Amp® PCR System, Perkin Elmer, Weiterstadt) statt.

2.4.1.4. Restriktionsverdau

Im Anschluss an die PCR wurden 15 µl Amplifikat in einen Restriktionsverdau eingesetzt. Dazu wurde das Amplifikat mit 0,5 µl des Restriktionsenzymes MSP 1 (5 u) (Boehringer, Mannheim) für vier Stunden bei 37° C inkubiert.

2.4.1.5. Elektrophorese

Um die kleinen DNA-Fragmente auftrennen zu können, wurden 10 % ige Polyacrylamid Gele verwendet (Mini Protean II-Kammern, Bio Rad, München). 10 µl der Probe wurden mit 0,9 µl Ladepuffer (6x) (MBI Fermentas, St. Leon Rot) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Kontrollen wurden eine Leerprobe, Kontrollproben und ein Marker (MBI Fermentas) mit aufgetragen. Die Amplifikate wurden bei 200 Volt aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele für 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (5 µl Ethidiumbromid (10 %) auf 120 ml TBE 0,5-fach) gefärbt und für fünf Minuten in TBE (0,5 fach) gewaschen. Die Auswertung wurde dann unter UV-Licht bei 366 nm auf einem Transilluminator vorgenommen. Die Identifizierung der einzelnen Genotypen erfolgte über die Länge der unterschiedlichen DNA Fragmente. Bei den Wildtyptieren (+/+) hatte das MSP I keinen Ansatzpunkt zum Schneiden des amplifizierten DNA-Fragmentes, auf dem Gel stellten sich deshalb diese Tiere mit einer Bande von 112 Basenpaaren dar. Die heterozygoten Tiere besitzen ein defektes Allel des Genes, das von dem Enzym geschnitten wurde. Auf dem Gel waren drei Banden sichtbar: 112 bp, 78 bp und 34 bp. Bei den *fa/fa*-Tieren wiederum waren beide Allele defekt und somit beide amplifizierten Sequenzen, die daraufhin enzymatisch geschnitten wurden. Auf dem Gel waren diese zwei Banden (78 bp und 34 bp) sichtbar. Das Ergebnis wurde mit einer Polaroid Gel Cam (Roth, Karlsruhe) fotografiert. In Abb. 3 ist beispielhaft das Ergebnis einer solchen Elektrophorese dargestellt.

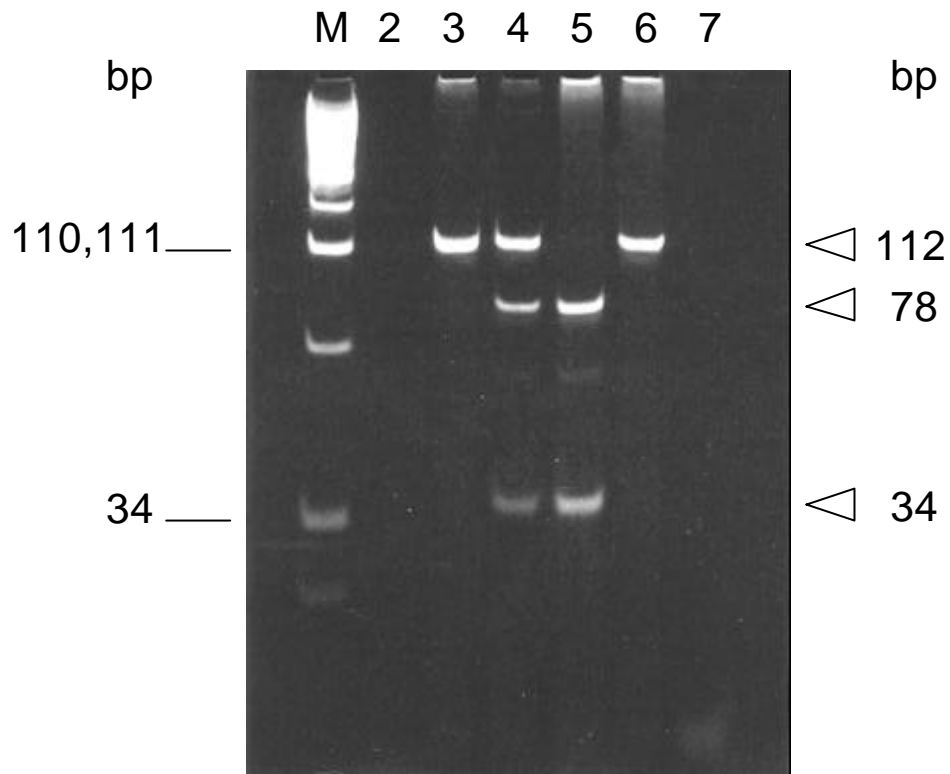


Abbildung 3: Bestimmung des Genotyps von Rattenwelpen mittels PCR.

Dargestellt sind die Amplifikate nach Restriktionsverdau mit MSP I.

Spur M: Längenstandard pUC 19 (MBI Fermentas); Spur 2: leer, Spur 3: +/+ - Tier; Spur 4: +/fa - Tier; Spur 5: fa/fa - Tier; Spur 6: Negative Kontrolle des Restriktionsverdaus (fa/fa - Tier von Spur 5); Spur 7: Negative Kontrolle der PCR.

2.4.2. Biochemische Methoden

2.4.2.1. Grundlagen zur Plasmaleptinbestimmung mittels Radioimmunoassay

Radioimmunoassays (RIA) ermöglichen die quantitative Bestimmung von Hormonen in biologischen Flüssigkeiten wie etwa dem Blutplasma. Das Hormon aus einer extrahierten Plasmaprobe, welches das zu bestimmende Antigen bei dieser Reaktion darstellt, tritt in eine komplexe Wechselwirkung mit gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten, spezifischen Antikörpermolekülen (γ -Immunglobuline). Diese hochaffine Antigen-Antikörperreaktion stellt die Grundlage des RIAs als immunologisches Testverfahren dar. Zur Erhöhung der Sensitivität eines RIAs erfolgt durch die sogenannte „non-equilibrium“-Methode (Chard 1982) die zeitversetzte Inkubation der zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe

zusätzlich mit identischem, jedoch radioaktiv markiertem Hormon („Tracer“) bekannter Konzentration. Die Konzentrationen an Radioligand und hormonspezifischem Antikörper wurden unter Berücksichtigung der höchstmöglichen Empfindlichkeit des RIAs gewählt. Während dieser zweiten Inkubationsphase kommt es zu einer kompetitiven Austauschreaktion, wobei radioaktiv markiertes und unmarkiertes Hormon um die Bindungsstellen an den Antikörpermolekülen konkurrieren. Steigende Mengen an unmarkiertem Antigen führen zu verminderter Radioligandbindung. Bei der Bewertung der zu messenden Radioaktivität des eingesetzten Tracers wird zwischen der gesamten Aktivität (TO), der nicht-spezifisch gebundenen Aktivität (NSB) und der unter Berücksichtigung der Differenz $TO - NSB$ sich ergebenden spezifischen Bindung des jeweils zu bestimmenden Hormons an den eingesetzten Antikörper unterschieden. Die NSB umfaßt alle Bindungen des radioaktiv markierten bzw. unmarkierten Hormons an z.B. Plasmaproteinen der Proben, zugesetzten Reagenzien oder Arbeitsmaterialien.

Die Erstellung einer Standardkurve ist die Voraussetzung zur Quantifizierung der jeweiligen Hormonkonzentrationen in den zu untersuchenden Plasmaextrakten. Dabei wird eine konstante Menge an Antikörpermolekülen mit einer konstanten Menge an „Tracer“, das heißt mit dem radioaktiv markierten Antigen, zusammengebracht. Beide sind so gewählt, daß etwa 50 % der radioaktiven Hormonmoleküle an die Antikörper binden, wenn kein unmarkiertes Hormon zugegen ist (B_0 -Wert). Steigende Konzentrationen an zunächst zugesetztem unmarkiertem Hormon, unter identischen Inkubationsbedingungen, führen zu einer dosisabhängigen Abnahme des Radioliganden an den spezifischen Antikörperbindungsstellen. Anhand der folgerichtig erstellten, semilogarithmischen Eichkurve kann dann die unbekannte Hormonkonzentration in einer extrahierten Plasmaprobe bestimmt werden.

2.4.2.2. Durchführung der Plasmaleptinbestimmung

Für die Bestimmung der Plasmaleptinkonzentration im Blutplasma der Versuchstiere wurde ein kommerzieller Kit (Maus-Leptin RIA-Kit, Biotrend Chemikalien GmbH, Köln) verwendet. Für jeden einzelnen Assay wurde eine Eichkurve errechnet, die auf Doppelbestimmungen sieben verschiedener Leptinstandards (Bestandteil des Kits) basierte. Bei jedem RIA mußten zusätzlich drei verschiedene Kontrollansätze erstellt werden, zum einen eine Probe (TO), die nur den Tracer enthielt, um so die absolut eingesetzte Radioaktivität ermitteln zu können. Der zweite Kontrollansatz (NSB) enthielt neben dem Tracer auch noch Puffer und wurde dem nachfolgend beschriebenen Trennverfahren

unterworfen. Die Relation NSB/TO lag in allen durchgeführten RIAs unter den geforderten 5 %. Für die Bestimmung der für den Assay maximalen Bindung zwischen Antikörper und Radioligand (B_0) wurden statt synthetischem Peptid gleiche Volumina RIA-Puffer zugegeben.

Je nach zu erwartetem Leptingehalt wurden entweder 50 oder 100 μ l Plasma als Ansatz für den RIA verwendet. Das Einsetzen unterschiedlicher Mengen an Plasma ist erforderlich, da die Eichkurve einen sigmoiden Verlauf aufweist, der nur im mittleren Bereich annähernd linear verläuft.

Pipettierschema:

a) TO		100 μ l Tracer
b) B_0	200 μ l RIA-Puffer	+ 100 μ l Antikörper + 100 μ l Tracer
c) NSB	300 μ l RIA-Puffer	+ 100 μ l Tracer
d) STD	100 μ l RIA-Puffer + 100 μ l jew. Standard	+ 100 μ l Antikörper + 100 μ l Tracer
e) Probe	100 μ l RIA-Puffer + 100 μ l jew. Probe	+ 100 μ l Antikörper + 100 μ l Tracer
b – e	Messung nach Durchführung des Trennverfahrens	

Zu den eingesetzten Proben wurde zunächst 100 μ l RIA-Puffer zugegeben. Außer bei den NSB-Proben wurde die polyklonale Antikörper-Lösung zugegeben und gemischt. Nach einer Vorinkubation des Antikörper-Peptid Gemisches für 24 Stunden bei 4° C erfolgte die Inkubation in Anwesenheit des Radioliganden (Tracer: [125 I] Maus-Leptin) ebenfalls für 24 Stunden bei 4° C, um eine höhere Sensitivität des Nachweissystems zu erhalten („non-equilibrium“ Methode). Der Antigen-Antikörper Komplex wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Polyethylenglykol (Precipitating Reagent) gefällt. Die Trennung von gebundenem und ungebundenem Hormon bzw. Radioliganden wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 3000 x g und 4° C durchgeführt. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die im Pellet an Antikörper gebundene Radioaktivität wurde in einem Gamma Counter (Wallac, Freiburg) quantitativ erfaßt.

Für alle Tiere wurden mindestens zwei Messungen durchgeführt, die nicht alle im gleichen RIA erfolgen konnten. Aus den beiden Meßwerten wurden Mittelwerte gebildet, wobei unnatürlich hohe oder niedrige Werte als Artefakte interpretiert wurden und nicht in die

Mittelwertbildung mit einfließen. Sollen Messergebnisse aus unterschiedlichen RIAs miteinander verglichen werden, so muß beachtet werden, daß zum einen Unterschiede in der Antikörper- und Tracerqualität verschiedener Kits bestehen und zum anderen das Alter des Testkits, da die meßbare Radioaktivität abnimmt, für die gemessene Radioaktivität der einzelnen Proben eine Rolle spielen und sich damit auf die Höhe der sich ergebenden Leptinwerte auswirken. Durch die Messung eines bekannten Plasma-Pools in jedem der durchgeführten RIAs war es möglich, bei der Errechnung der endgültigen Leptinkonzentrationen der Interassay-Variabilität Rechnung zu tragen. In jedem RIA wurde deshalb eine Dreifachbestimmung des Leptingehaltes des gleichen Plasmapools durchgeführt, die Aufschluß über die Variabilität innerhalb eines RIAs (Intra-Assay Variabilität) sowie zwischen den verschiedenen RIAs geben sollte (Inter-Assay Variabilität). So wurde im Anschluß an eine Mittelwertbildung aus den drei Pool-Einzelwerten innerhalb der einzelnen RIAs auf der Basis dieser Werte ein Mittelwert für die Pool-Leptinkonzentration über die gesamten RIAs errechnet. Für jeden einzelnen RIA wurde nun ein Faktor berechnet, mit welchem die von ihm angegebene Leptinkonzentration multipliziert werden mußte, um eben diesen Mittelwert zu ergeben. Die Anwendung dieses Faktors auf alle in dem jeweiligen RIA ermittelten Leptinkonzentrationen ermöglichte einen Vergleich von Plasmaproben, die in verschiedenen RIAs auf ihren Gehalt an Leptin untersucht wurden.

Diese zusätzlichen Proben sowie die 7 verschiedenen Leptinstandards für die Erstellung der Eichkurve wurden auf die gleiche Weise behandelt wie die zu untersuchenden Proben. Die Inter- und Intra-Assay Koeffizienten betrugen 11 % beziehungsweise 6 %.

2.4.2.3. Ermittlung des Plasmaleptingehaltes anhand der RIA-Werte

Um die Koagulation des Blutes zu verhindern, wurde dieses in einer definierten Menge einer Heparinlösung aufgefangen. Diese Verdünnung wurde bei der Berechnung der endgültigen Leptinkonzentration mitberücksichtigt. Die Multiplikation des RIA-Meßwertes mit einem entsprechenden Verdünnungsfaktor ergab die Leptinkonzentration bezogen auf 100 µl Plasma des jeweiligen Tieres. Wenn der zu erwartende Leptingehalt in der Plasmaprobe sehr hoch war, wurden nur 50 µl Probe eingesetzt, um den mittleren, annähernd linearen Bereich der Eichkurve nicht zu verlassen. Dieser zweite Verdünnungsschritt wurde ebenfalls mit einem entsprechenden Faktor in der Auswertung der RIA-Daten mit berücksichtigt. Allein eine Multiplikation des RIA-Wertes mit dem errechneten Verdünnungsfaktor führte aber in beiden Fällen nicht zu einem korrekten Endwert. Auf der Basis einer dem RIA-Kit beiliegenden

Tabelle, sowie eigener Verdünnungstests, die hier nicht gezeigt werden, wurden die RIA-Werte für Proben, die vor der Messung verdünnt worden waren, zunächst mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert; der Endwert ergab sich anschließend durch eine Reduktion dieses Wertes um 5 – 15 %, abhängig vom Absolutwert und von der Stärke der Verdünnung.

Rattenleptin bindet sowohl an die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen murines Leptin wie gegen Rattenleptin relativ schlecht. In der Arbeitsgruppe hat sich die Anwendung eines Maus-Leptin RIA-Kits bewährt. Zur Erstellung der Eichkurve wurden dabei Standards mit einer definierten Konzentration an murinem Leptin verwendet, da hierbei - im Gegensatz zu der Verwendung von Rattenleptin-Standards - die Linearität und damit eine genauere Messung über einen relativ breiten Konzentrationsbereich gegeben ist. Durch die Messung von Proben mit einer bekannten Konzentration an Rattenleptin innerhalb des relativ schmalen Bereichs (1-4 ng/ml), in dem die Meßwerte liegen, wurde im Nachhinein ein Faktor ermittelt, mit dessen Hilfe die RIA-Werte den tatsächlichen Konzentrationen an Rattenleptin angenähert werden konnten. Die Berechnung einer Regressionsgeraden anhand der Meßwerte ergibt einen Faktor (1,29), mit dem die RIA-Werte multipliziert werden müssen, um in guter Näherung die tatsächliche Rattenleptinkonzentration in der Probe widerzuspiegeln.

2.4.3. Leptin-Rezeptor-Bindungsstudien an Hypothalamushomogenaten

2.4.3.1. Grundprinzip der Bindungsstudien

Für eine genauere Charakterisierung der Liganden-Bindungskinetik des Leptinrezeptors wurden Bindungsstudien an hypothalamischem Gewebe durchgeführt³. Grundlage dieser Methode sind die Wechselwirkungen zwischen drei Komponenten einer Gleichgewichtsreaktion, nämlich Rezeptor (R), Radioligand (L) und unmarkierter Ligand (I), der mit dem Radioligand um den Rezeptor konkurriert. Es ergibt sich die Gleichung: $R + L + I \Leftrightarrow RL + RI$, wobei es sich bei RL und RI um die entsprechenden Bindungskomplexe handelt. Die im Bindungsexperiment gemessene Variable ist der rezeptorgebundene Radioligand (RL). Die totale Radioligandenkonzentration (L_T) entspricht : $L_T = L + RL$.

Durchgeführt wurden Verdrängungsexperimente (displacement-Experimente), bei denen die totale Konzentration an Radioliganden (L_T) konstant blieb, während die RL in Abhängigkeit

³ Diese Untersuchungen wurden von T. Ziska im Labor von A. Plagemann, Charité Berlin, durchgeführt, deshalb erfolgt hier nur eine kurze Zusammenfassung der Methode.

von der steigenden Konzentration eines kompetitiv wirkenden, unmarkierten Liganden (I) gemessen wurde.

2.4.3.2. Gewebe-Präparation

Die Hypothalami wurden in einem Kryostaten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präpariert. Jeder Hypothalamus wurde einzeln in 6 ml 1 mmol/l HEPES Puffer, der mit 320 ml Sucrose (pH=7,2) versetzt war, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert, um die Zellen und Zellmembranen aufzubrechen. Diese Homogenate wurden anschließend für 25 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit $26.000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Assay Puffer (25 mmol/l HEPES, 5 mmol/l MgCl_2 , 1 mmol/l EGTA, 0,025 % Bacitracin, pH 7,4) resuspendiert und erneut für 25 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $26.000 \times g$ zentrifugiert, um lösliche Substanzen, wie zum Beispiel endogene Neurotransmitter und Guanin-Nukleotide, die mit der Radioligandenbindung interferieren können, zu entfernen. Das entstandene Pellet wurde mit 0,5 ml Assay Puffer resuspendiert.

Die Proteinkonzentration der Membransuspension wurde mit BSA als Standard nach der Methode von Bradford, modifiziert durch Peterson (Peterson 1983), bestimmt.

2.4.3.3. Assay-Bedingungen

Als Probe wurden 300 μg Membran-Protein in 300 μl Assay-Puffer, der 1 % BSA enthielt, in Doppelproben mit 100 pmol/l [^{125}I]-Leptin (murines Leptin, NEN Boston USA) in einem Schüttelwasserbad bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 75 Minuten inkubiert. Die unspezifische Bindung (NSB) des Tracers wurde in Anwesenheit von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ unmarkiertem Leptin (murines Leptin, R & D Systeme, Wiesbaden) einer hypothalamischen Membransuspension festgelegt. Am Ende der Inkubation wurden zu der Probe 3 ml eiskalter Waschpuffer (25 mmol/l HEPES, 5 mmol/l MgCl_2 , 0,1 % BSA, 0,01 % Triton-X) zugegeben und anschließend sofort durch einen GF/B Watham-Filter in einem Brandel-Harvester (Adi Hassel, München) gefiltert. Die Filter wurden zuvor in Assay Puffer mit 2 % BSA eingeweicht, ebenso wurden die Inkubations-Röhrchen und -Filter vorher mit 3 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen, um die unspezifische Bindung von Radioliganden an die Wände der Röhrchen zu minimieren.

Die Radioaktivität der Filter wurde in einem Gamma Counter (Wallace 1277) gemessen.

Die spezifische Bindung (fmol/mg Membranprotein) wurde aus der Differenz zwischen der totalen Bindungskapazität des Tracers und der unspezifischen Bindung für jeden Hypothalamus errechnet.

2.4.3.4. Durchführung der Bindungsassays

Es wurden mehrere Assays mit unterschiedlich behandelten Tieren durchgeführt.

Assay 1 beinhaltete Tiere aller drei Genotypen (+/+ N=12, +/fa N=19 und fa/fa N=12), die in Nestern normaler Größe (zehn bis zwölf Welpen) aufgezogen wurden.

Die Hypothalami von +/+ (N=10) und +/fa (N=10) Tieren, die in kleinen Nestern (vier Welpen) aufgezogen wurden und die auch der Bestimmung der Körperzusammensetzung dienten, wurden für den Assay 2 verwendet.

Assay 3 bestand aus +/+ (N=16) und +/fa (N=16) Tieren, die ebenfalls in einem kleinen Nest aufgezogen worden waren und die zusätzlich entweder mit Leptin oder als Kontrolle mit PBS behandelt worden waren.

Um die große Inter-Assay Variabilität herabzusetzen, wurden in Assay 4 Gehirne von (+/+ N=27 und +/fa N=26) Tieren, die im kleinen und normalen Nest aufgezogen worden waren, zusammen für die Analyse herangezogen.

Die Inter- und Intra-Assay Koeffizienten betragen 14 % beziehungsweise 8 %.

2.5. Histologie

Zu einer genaueren histologischen Charakterisierung der durch das MSG im Hypothalamus verursachten Läsionen wurden Präparate nach Nissl gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet (Serie VII). Im Mittelpunkt der Untersuchung stand hierbei der Nucleus Arcuatus (ARC), der nachweislich ein Haupttarget der MSG-Behandlung ist (Meister et al. 1991). Desweiteren wurde, um die Kerngebiete, die Target für Leptin im Hypothalamus von juvenilen Ratten sind, näher bestimmen zu können, die Wirkung von peripher verabreichtem Leptin immunhistochemisch auf die Expressierung des Fos Proteins im Hypothalamus untersucht. Um zu überprüfen, ob die für die Energiehomöostase wichtigen Konnektivitäten zwischen dem ARC und dem Nucleus Paraventricularis (PVN) bei einer zehn Tage alten Ratte schon ausgebildet sind, wurde das Neuropeptid Y immunhistochemisch untersucht.

2.5.1. Gewebefixation durch transkardiale Perfusion

Sowohl die Nissl-Färbung für die lichtmikroskopische histologische Untersuchung, als auch der immunzytochemische Nachweis des Fos-Proteins in Zellkernen neuronaler Strukturen und der Nachweis von NPY im Hypothalamus erfolgten in perfusionsfixiertem Gehirngewebe.

Die Narkotisierung der Tiere wurde mit einer Inhalationsnarkose mit Fluothan (Zeneca, Plankstadt) durchgeführt. Das erforderliche Toleranzstadium wurde durch einen Ausfall des Rückziehreflexes der Hinterbeine nach Stimulation der Interdigitalhaut überprüft. Es folgte eine Eröffnung der Bauchdecke in der Linea alba ventral des Sternums. Lateral wurden zwei Entlastungsschnitte angelegt, um einen freien Zugang zum Diaphragma zu haben. Dieses wurde vom Rippenbogen abpräpariert und dadurch der Thorax eröffnet. Als nächstes wurden zwei Schnitte lateral des Sternums unter Durchtrennung der Rippen durchgeführt, dieser Abschnitt mit einer Klemme befestigt und nach hinten geschlagen, um einen freien Zugang zum Herzen zu haben, das anschließend vom Perikard befreit wurde. Die transkardiale Perfusion wurde durch Platzierung einer Kanüle in den linken Herzventrikel bei gleichzeitiger Eröffnung des rechten Herzvorhofes eingeleitet, was ein Abfließen des Blutes und Perfusates gewährleistete. Mit Hilfe einer Perfusionsmaschine (Werkstatt des Kerckhoff-Institutes) wurde mit einem konstanten Druck von konstant 150 mm Hg in weniger als einer Minute das gesamte Blutgefäßsystem mit 0,1 M eisgekühltem Phosphatpuffer (pH 7,2) durchspült. Das vollständige Entbluten des Tieres wurde über die Entfärbung der Leber kontrolliert. Unmittelbar nachfolgend wurde zur Fixierung des Gehirngewebes mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M eisgekühlten Phosphatpuffer (pH 7,2) perfundiert. Pro Ratte wurde ca. je 150 ml Phosphatpuffer und Fixativ verwendet. Nach der Fixation wurden die Knochenplatten der Schädelkalotte entfernt, Cerebellum und Medulla oblongata freigelegt, das Rückenmark durchtrennt und das freipräparierte Gehirn mit stumpfem Präparierbesteck aus dem Schädel entnommen. Nach einer 60 minütigen Nachfixierung in Fixativ wurde das Gewebe zur Auswaschung des Paraformaldehyds sowie zur Kryoprotektion über Nacht in 20 % Saccharose in 0,1 M PO₄-Puffer überführt. Anschließend wurden die Gehirne entweder mit CO₂ am Gefriermikrotomoder auf pulverisiertem Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung, jedoch nicht länger als 24 Stunden, bei -40° C aufbewahrt. Für die weitere Verarbeitung des Gewebes wurden an einem Kryostaten (Microm HM 500-O) serielle coronale Gefrierschnitte von 20 µm Dicke des zuvor mit Tissue Freezing Medium (Leica-Instruments GmbH, Nussloch) aufgefrorenen Gewebeblocks bei einer Kammertemperatur von -20° C und einer Gewebeblocktemperatur von -15 bis -18° C angefertigt. Die fixierten

Gefrierschnitte wurden alternierend auf vorgekühlte, zur besseren Haftung mit 10 % Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgenommen, in eisgekühlten Plastikboxen gesammelt, luftdicht verschlossen und bis zur Färbung oder zum Einsatz im immunzytochemischen Nachweisverfahren nicht länger als 24 Stunden bei 4° C aufbewahrt.

2.5.2. Nisslfärbung mit Kresylviolett

Grundlage dieser Färbemethode ist, daß Nervenzellen gegenüber anderen Zellen die Besonderheit aufweisen, daß sie große Mengen sogenannter Nisslschollen (Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums) besitzen. Die Nisslschollen können angefärbt werden, so daß selektiv Zellen mit Nisslschollen sichtbar gemacht werden. Die Nisslfärbung beruht auf einer Überfärbung eines in Alkohol fixierten Schnittes mit einem Farbstoff der Thiazinfamilie (hier Kresylviolett) und dem nachfolgenden Auswaschen des Farbstoffüberschusses, wobei sich die Fasern schneller als die Zellbestandteile entfärben. So wird erreicht, daß das Zellmaterial intensiv gegenüber dem farblosen Hintergrund gefärbt wird. Bei dieser Methode wird vor allem das Soma der Zellen dargestellt, wohingegen die Fasern nicht gefärbt werden.

Für die Herstellung der Färbelösung wurden 0,5 g Kresylviolett in 100 ml Natriumacetatpuffer (pH 3,8-4,0) gelöst. Für den Acetatpuffer wiederum wurden 16,4 g/l Natriumacetat in Aqua dest. angesetzt und mit 99%iger Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt.

Die Färbung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe aus 100, 90, 70, 50 % Ethanol für ein bis zwei Minuten inkubiert,
2. kurz in Aqua dest. gewässert und
3. 20 Sekunden in gepufferter Kresylviolettlösung gefärbt;
4. danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: 50, 90, 95, 100 % Äthanol (in jeder Lösung ca. ein bis zwei Minuten)
5. anschließend wurden die Schnitte für zwei bis drei Stunden in HistoClear (Plano, Wetzlar) inkubiert
6. danach verblieben sie ein bis fünf Minuten in Xylol (Merck, Darmstadt)
7. und wurden dann mit Entellan (Merck, Darmstadt) gedeckelt.

2.5.3. Immunzytochemie

2.5.3.1. Prinzip der Immunzytochemie

Immunzytochemische Methoden ermöglichen sowohl den qualitativen als auch den quantitativen Nachweis eines bestimmten Antigens direkt im Gewebe bei zellulärer und selbst subzellulärer, elektronenmikroskopischer Auflösung. Die Immunhistochemie beruht auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der Antikörper (meist Immunglobuline des γ -Typs) sein spezifisches Antigen im Zellkern (wie etwa das Fos-Protein) bzw. im Cytosol oder auch in der Zellmembran erkennt. Die Sichtbarmachung des zellulären Antigens durch eine Antigen-Antikörper Reaktion wird durch nachgeschaltete immunbiologische Reaktionen ermöglicht, bei welchen ein sekundärer Antikörper eingesetzt wird, der gegen das konservierte tierspezifische, konstante kristallisierbare Fragment (FC) des ersten Antikörpers als Antigen gerichtet ist. Neben der dadurch erreichten kaskadenartigen Verstärkung des Primärsignals wird durch eine nachfolgende Enzymreaktion oder Markierung mit fluoreszierenden Molekülen der Antigen IgG I – IgG II-Komplex im Gewebe mikroskopisch nachweisbar (Harlow und Lane 1988).

Durch die ABC-Technik (Hsu et al. 1981) kann bei hoher Signalverstärkung und niedriger Hintergrundfärbung ein lichtmikroskopisch gut detektierbares, dauerhaftes immunreaktives Signal bei hoher Spezifität erzeugt werden. Dieses Detektionssystem basiert auf der Fähigkeit des Glycoproteins Streptavidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Ein biotinylierter sekundärer Antikörper, der die tierspezifische IgG-Kette (FC-Komponente) des spezifischen Primärantikörpers erkennt, stellt das Bindeglied zwischen Primärantikörper und einem Komplex aus biotinylierter Meerrettich-Peroxidase dar (Avidin-Biotin-Komplex=ABC). Zur Nachweisreaktion der somit Antigen-IgG gekoppelten Enzymaktivität der Peroxidase wird Diaminobenzidin (DAB) als Substrat verwendet, welches durch die Meerrettich-Peroxidase unter Verwendung von Wasserstoffperoxid als Protonendonator reduziert wird, wodurch am Locus des jeweiligen Antigens im Gewebe ein brauner Niederschlag entsteht (Abb. 4).

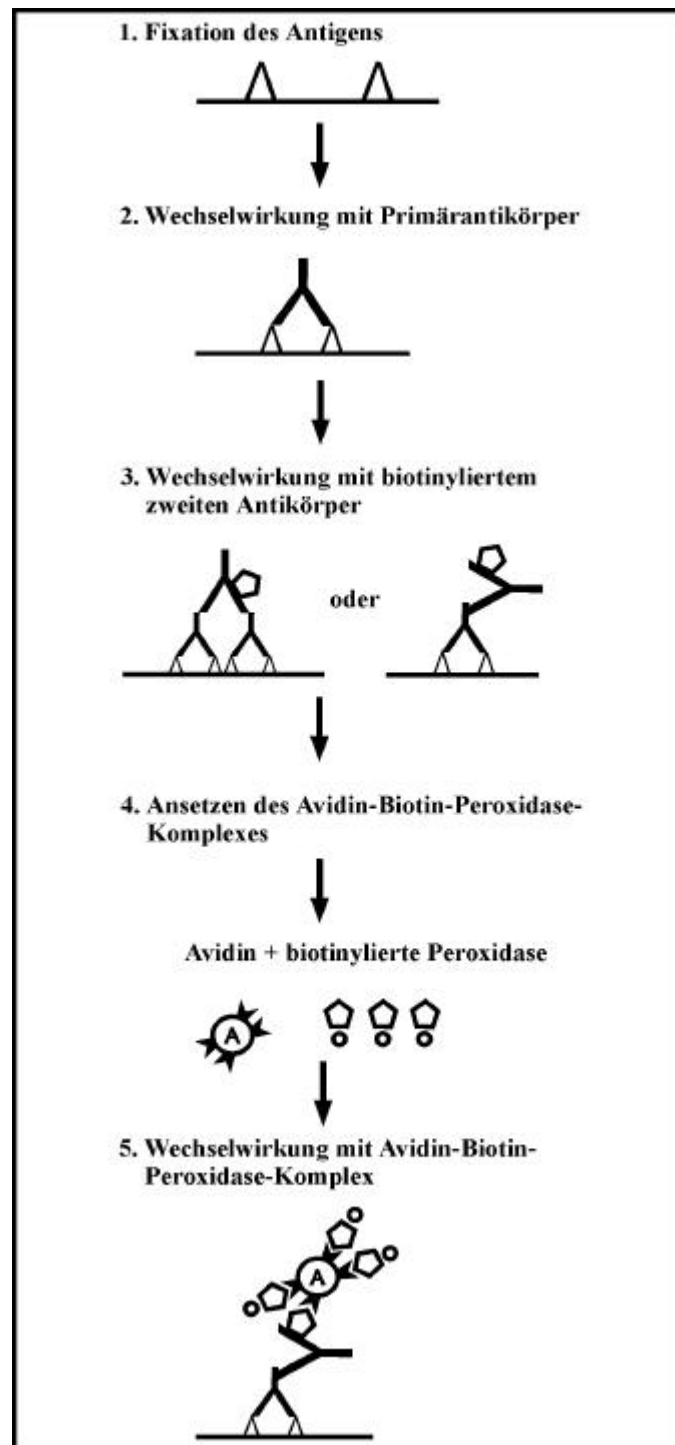


Abb 4: Schematische Darstellung der immunzytochemischen Markierung eines Antigens in einem Gewebsschnitt durch sequenzielle Bildung differenzierter Antigen-Antikörper Komplexe gemäß der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex).

Das fixierte Antigen (1) wird von dem spezifischen Primärantikörper Y (IgG-Moleküle) erkannt und bildet den Antigen-Antikörper Komplex (2). Ein gegen die spezie-spezifische, konstante FC-Region des Primärantikörpers gerichteter, biotinylierter Sekundärantikörper aus einer anderen Spezie erkennt den Primärantikörper und bildet somit den Antigen-Antikörper-Antikörper Komplex (3). Nach Inkubation und Wechselwirkung des Antigen-Antikörper Komplexes mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (4,5) kann nach Reduktion des Peroxidase-Substrates der Nachweis des Antigens im Gewebeschnitt geführt werden.

2.5.3.2. Immunzytochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors Fos und des Neuropeptid Y im Hypothalamus des Rattengehirnes

Zur immunzytochemischen Detektion des Fos-Proteins und des NPY in den fixierten Gehirnschnitten wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase Methode (Hsu et al. 1981) unter Zuhilfenahme eines kommerziell verfügbaren ABC-Kits (Elite, VectaStain) angewandt. Zur Rehydrierung der Gewebsschnitte wurden diese für 4 x 15 Minuten bei 4° C in Färbeküvetten mit 0,1 M PBS, pH 7,4, 0,3% Triton X-100 inkubiert, wodurch die Plasmamembranen der Zellen für den Antikörper permeabel gemacht wurde und dadurch der Zugang des Antikörpers zu seinem Antigen erleichtert wurde. Zur Durchführung des immunhistochemischen Nachweisverfahrens wurden die Objektträger mit den adherierten Gehirnschnitten seitenverkehrt so auf eigens dafür angefertigte Plexiglasplatten gelegt, daß zwischen der Platte und den ihr zugewandten Gewebsschnitten aufgrund der Beschaffenheit der Platten ein Spalthohlraum von 125 µm Dicke und 180-200 µl Volumen entstand. In diesen Hohlraum einpipettierte Lösungen konnten sich aufgrund der Kapillarwirkung gleichmäßig und luftblasenfrei unter den gesamten Objektträger und damit auf alle aufgebrauchten Gewebsschnitte verteilen.

Basierend auf dieser Technik folgte eine einstündige Primärinkubation bei Zimmertemperatur (RT) in 0,1 M PBS mit 0,3 % Triton X- 100 (Sigma-Aldrich) und 10 % Normal Horse Serum (NHS) oder fötalem Kälberserum (FCS) (Sigma-Aldrich), um unspezifische Bindungsstellen im Gewebe abzusättigen. Die Schnitte wurden dann für 48 Stunden bei 4° C mit einem polyklonalen, im Kaninchen erzeugten primären Antikörper, der entweder spezifisch gegen das N-terminale Epitop FOS des menschlichen Fos-Proteins (AB-5, polyklonal, CAT#PC 38, Oncogene Science, USA) oder gegen das Neuropeptid Y (N9528, polyklonal, Sigma, Deisenhofen) gerichtet war, in einer Konzentration von 1:1000 (FOS) und 1:10 (NPY) eingesetzt. Beide Antikörper wurden in 0,1 M PBS mit 2% NHS und 0,1 % Triton-X gelöst und im Dunkeln in einer Edelstahlschale inkubiert. Die hohe Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem FOS-Protein der Ratte wurde bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen (McKinley et al. 1992). Um ein Austrocknen der Schnitte während der Inkubation zu vermeiden, wurde die Schale mit Zellstoff-Mullkompressen, getränkt in Aqua bidest., ausgelegt, was zur Entstehung einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre führte. Die oben beschriebene Technik zur Durchführung der Immunzytochemie („sandwich“) minimierte darüber hinaus ein Austrocknen der Gewebsschnitte. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die OT wiederum von den Plexiglasplatten abgenommen, in Färbeküvetten gestellt und wie

beschrieben für 3 x 10 Minuten in Waschpuffer von ungebundenem, überschüssigem Primärantikörper befreit.

Die Gehirnschnitte wurden dann mit einem in der Ziege erzeugten, gegen die IgG-Moleküle des Primärantiserums gerichteten sekundären biotinylierten Antikörper (Vector Laboratories, BA-5000), der wiederum in 0,1 M PBS mit 0,1% Triton-X und 10 % NHS gelöst wurde, in einer Konzentration von 1:500 für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuten 3 x 10 minütigen Waschgängen erfolgte die Inkubation der Gewebsschnitte mit dem aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase bestehenden ABC-Komplex für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Der ABC-Komplex (Elite-Kit, VectaStain) war parallel zu den vorausgegangenen Waschschrritten zur Konjugation gebracht worden. Es folgten drei weitere Waschgänge für jeweils 10 Minuten mit Waschpuffer. Danach verblieben die Gewebsschnitte für 15 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur in einer 0,03%-igen DAB-Lösung, frisch gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer. Die enzymatische Reaktion wurde mit 0,05 % H₂O₂ gestartet und nach sechs Minuten durch ein Überführen der Schnitte in Aqua bidest gestoppt. Erneut wurden die Schnitte 3 x für 5 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Die Schnitte verblieben dann für 2-3 Stunden in Histoclear, um deren Anfärbbarkeit für die folgende Kresylviolett färbung durch weitere Entfettung zu verbessern. Zur neuroanatomischen Orientierung (Paxinos und Watson 1998) wurden die Schnitte im Anschluß an das immunhistochemische Verfahren mit Kresylviolett (siehe oben) gegengefärbt. Danach verblieben die Schnitte erneut für eine Stunde in Histoclear, wurden dann für 10 Minuten in Xylol getaucht und mit Entellan gedeckelt.

Kontrollversuche zum Nachweis der Spezifität der immunzytochemischen Reaktion beinhaltete die Durchführung der Fos-immunpositiven Markierung in Abwesenheit des primären Antikörpers.

Die zu untersuchenden Hirnregionen wurden mikroskopisch (Olympus BX 50, Hamburg) identifiziert und bei unterschiedlichen Vergrößerungen photographiert (Olympus PM 20/ Automatic Photomicrographic System, Hamburg). Bei der morphologisch-funktionellen Analyse wurde den folgenden Hirnstrukturen aufgrund ihrer bereits bekannten Bedeutung für die Regulation der Energiehomöostase besondere Aufmerksamkeit gewidmet:

Als paarige periventriculäre Strukturen des Hypothalamus mit Anteilen auf der Blutseite der Blut-Hirn-Schranke (BHS), wurde der ARC analysiert. Auf der Hirnseite der BHS wurden der PVN mit seinen magnozellulareren und parvozellulären Anteilen, der VMH und der LH untersucht.

Zur topographischen Orientierung wurde parallel an konsekutiven Gehirnschnitten eine Kresylviolett-Färbung vorgenommen.

2.6. Auswertung

2.6.1. Auswertung der Sauerstoffverbrauchswerte von künstlich aufgezogenen Tieren

2.6.1.1. Berechnung der Rohwerte

Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst mittels Fortran-Programmen, die speziell für das Aufzeichnungsprogramm entwickelt wurden (Schubert 1991). Die Ermittlung der metabolischen Rate basierte, wie oben beschrieben, auf etwa 35 einzelnen Messwerten des Sauerstoffanalysators pro Tier und Tag. Dabei wurden von den 5-minütigen Messperioden jeweils nur die letzten 2,5 Minuten ausgewertet, um Fehler auszuschließen, die durch noch im Meßsystem befindliche Restluft von der Messung des vorherigen Kanales entstehen konnten. Die Spannungsdifferenz, die auftrat, wenn beide Kanäle des Zweikanalmeßsystems getrocknete Umgebungsluft maßen, wurde vom Computer gleich Null gesetzt. Für den Zeitraum zwischen zwei solchen Messungen, in denen der Sauerstoffgehalt der einzelnen Tierbehälter analysiert wurde, wurde eine Regression zwischen den aufeinanderfolgenden Nullwerten gebildet. Die Sauerstoffkonzentration in dem jeweiligen Tierbehälter entsprach damit der Spannungsdifferenz zwischen dem Meßkanal, der die getrocknete Tierluft maß, und der vom Computer ermittelten Nulllinie. Aus der Flußrate und dieser Differenz wurde nach der Gleichung für das offene System von Withers (1977) der Sauerstoffverbrauch unter STPD-Bedingungen (Standardbedingungen: $T=273K$, $p=760$ Torr, Luftfeuchte: 0%) errechnet.

2.6.1.2. Berechnung der metabolischen Rate

Zur Berechnung des Sauerstoffverbrauches der Tiere wurde zunächst der Unterschied im prozentualen Sauerstoffgehalt zwischen Tierluft und Referenzluft ermittelt (ΔO_2 in %). Aus dieser Differenz sowie der auf Standardbedingungen (STPD) normierten Flußrate wurde der Sauerstoffverbrauch pro Minute (VO_2) errechnet. Zur Berechnung der metabolischen Rate (MR) nach der Formel für das offene System (Withers 1977) wurde für alle Tiere auf Grund der fettreichen Zusammensetzung der synthetischen Milch ein respiratorischer Quotient (RQ)

von 0,8 zugrunde gelegt (Markewicz et al. 1993; Planche et al. 1983). Mittels der diesem RQ entsprechenden Umrechnungsfaktoren von 0,34 W pro ml O₂/min bzw. 20,4 kJ pro Liter O₂ 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.

2.6.1.3. Bestimmung der circadianen Minima und Maxima im massenspezifischen Sauerstoffverbrauch und der Kerntemperaturen

Zur Bestimmung der circadianen Minima und Maxima im massenspezifischen Sauerstoffverbrauch wurden über Zeiträume von je 24 h für jedes Tier jeweils fünf aufeinanderfolgende gerundete Meßwerte gleitend gemittelt, wobei für die Mittelwertbildung die Intervalle fortlaufend um jeweils einen Meßwert verschoben wurden (Nüßlein 1992). Voraussetzung für die Bildung eines Mittelwertes war dabei, daß diese fünf Meßwerte – entsprechend einem 40 min-Abstand zwischen jeder Meßwerterhebung je Tier (s.o.) - innerhalb eines 4 h-Meßintervalles lagen. War dies nicht der Fall, so wurde dieser Mittelwert aufgrund fehlender Werte für die Minima bzw. Maxima-Bestimmung verworfen. Die so ermittelten niedrigsten bzw. höchsten Mittelwerte wurden als Tages-Minimum bzw. -Maximum definiert.

Für die Bestimmung der Kerntemperatur-Minima und -Maxima aus der fortlaufend registrierten Rektaltemperatur wurde analog vorgegangen.

2.6.2. Statistik

Statistisch untersucht wurden bei allen Tieren, mit Ausnahme perfundierter Tiere für die Immunhistologie, folgende Parameter der Körperzusammensetzung als Absolut- oder Relativwerte: Lebendgewicht, Gesamtkörperwasser, fettfreie Trockenmasse (FFDM), Körperfettmasse sowie die Plasmaleptinspiegel. Daneben wurden teilweise auch die prozentualen Abweichungen dieser Parameter vom Mittelwert der Kontrollgeschwister ($\Delta\%$) ermittelt und statistisch ausgewertet. Für die gemessenen Parameter wurden gewichtete oder arithmetische Mittelwerte mit Hilfe von Varianzanalysen berechnet. Die jeweils berücksichtigten Faktoren sind bei den spezifischen Berechnungen angegeben. Für die Auswertung der gezählten Zellen im Nucleus arcuatus wurden arithmetische Mittelwerte berechnet. Diese Mittelwerte sind im Text oder in Graphiken immer zusammen mit dem

Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Statistische Tests wurden auf einem Computer mit Hilfe des Programmes SigmaStat (Jandel Scientific, Erkrath) durchgeführt, Dreifaktorielle Varianzanalysen mit dem Windowsprogramm SPSS (beide: SPSS Corporation, Chicago, USA) und die Regressionsgeradenvergleiche mit einem hauseigenen Statistikprogramm errechnet. Die Daten wurden zunächst nach Shapiro-Wilks und Kolmogoroff-Smirnoff (Variante von Liliefors) auf Normalverteilung und auf Varianzhomogenität geprüft. Zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwertsunterschieden nicht verbundenen Datenmaterials wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewendet bzw. der Mann-Whitney-Rangsummentest, falls die Daten nicht normalverteilt waren oder keine Varianzhomogenität aufwiesen. Als minimales Signifikanzniveau wurde generell eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. In Abbildungen wurden signifikante Unterschiede wie folgt kenntlich gemacht: * für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

2.6.2.1. Regressionsanalysen

Wie schon bei Kraeft et al. (1999) im Detail gezeigt wurde, stellt ein Regressionsgeradenvergleich eine subtile Methode dar, um unabhängig von der Wurfzugehörigkeit bei der Analyse von Unterschieden der Körperzusammensetzung, wie zum Beispiel dem Fettgehalt, Unterschiede im Wachstum der Tiere zu berücksichtigen. Vor der Berechnung von Mittelwerten wurden deshalb zuerst Regressionsgeradenvergleiche durchgeführt.

Zur Ermittlung von Regressionskoeffizienten wurden gängige Standardverfahren zur Bestimmung von Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Quadrate verwendet. Die verglichenen Geraden wurden zuerst auf Parallelität und gegebenenfalls anschließend hinsichtlich ihrer Unterscheidung im Y-Achsenabschnitt untersucht (Brownlee 1965).

2.6.2.2. Varianzanalyse

Die oben angeführten Parameter wurden mit Hilfe Ein- oder Zweifaktorieller Varianzanalysen untersucht. Für die Auswertung der Körpergewichte behandelter Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum hinweg muß berücksichtigt werden, daß das jeweilige Tagesgewicht des Tieres in unmittelbarem Zusammenhang zum Gewicht des Vortages steht. Deshalb wurden für die Auswertung dieses Parameters ipsative Werte gebildet, indem die Tageswerte zu dem Körpergewicht des ersten Lebensstages in Beziehung gesetzt wurden (Bortz 1989). Bei

Anwendung der Zweifaktoriellen Varianzanalyse wurden somit Meßwiederholungen (Repeated Measures Design) bei der Datengewinnung berücksichtigt.

2.6.2.3. Multifaktorielle Varianzanalyse

Für die Leptin-Rezeptor-Bindung wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse herangezogen. Visuell schienen die Daten eine starke Interassay-Variabilität aufzuweisen, weshalb die einzelnen Assays zunächst separat ausgewertet wurden. Für eine bessere graphische Darstellung und Interpretation wurden die Daten hinsichtlich der Interassay-Variabilität normalisiert. Dazu wurde ein Durchschnittswert aus allen gemessenen Werten eines Assays unbehandelter $+/+ -$ und $+/fa$ -Tiere (in Assay drei auch der PBS behandelten Tiere) errechnet und als Basis benützt, um für jedes Tier die prozentuale Abweichung von diesem Wert zu berechnen. Diese Durchschnittswerte waren $0,62 \pm 0,32 (N=31)$, $0,59 \pm 0,39 (N=20)$, $0,85 \pm 0,07 (N=16)$ und $1,13 \pm 0,05 (N=49)$ fmol/mg für die Assays 1,2,3 und 4.

2.6.3. Mikroskopische Auswertung der histologischen Untersuchung

Die quantitative Erfassung kresylviolett gefärbter Zellen des Nucleus arcuatus der Versuchsserie VII erfolgte mittels Zählung an einem Lichtmikroskop. Die neuroanatomische Zuordnung der hypothalamisch relevanten Strukturen erfolgte mit Hilfe des stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (1998) in Anlehnung an die anatomischen Strukturen des Adulttieres. Die Anzahl der gefärbten Zellen wurde für jeweils drei Kontroll- und MSG-behandelte Tiere der Serie VII bestimmt. Zellen wurden dann gezählt, wenn eine eindeutige Identifizierung ihres Zellsomas und Kernes möglich war. Zur Erleichterung der Auszählung der Zellen innerhalb der zu untersuchenden Strukturen und zur Vermeidung möglicher Doppelzählungen wurde über jeden Schnitt ein Raster mit festgelegter Größe (100 Quadrate, 1 Quadrat: $25 \times 25 \mu\text{m}$) und Position in das Gesichtsfeld eingelegt, und die Zellen bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt.

Auf Grund der großen Ausdehnung des ARC wurden jeweils 8 serielle Gewebeschnitte in rostro-caudaler Richtung ausgezählt. Dabei wurde für jedes Tier von denselben stereotaktisch definierten Ausgangspunkten begonnen, die vergleichbar zu Paxinos und Watson (1998) im Adulttier vor der Auswertung für die zehn Tage alte Ratten festgelegt wurden. Im nachfolgenden sind für die ausgewerteten Strukturen die stereotaktischen Angaben mit

Bezugnahme auf die Abweichung vom Bregma (mm) und die dazugehörige Tafel (Nr.) nach Paxinos und Watson (1998) gemacht:

Ebene I: Rostraler N.Arc: -2.12; 26.

Ebene II: Medialer N.Arc: -2.56; 28.

Ebene III: Medialer N. Arc: -3.30; 31.

Ebene IV: Caudaler N.Arc: -4.16; 34.

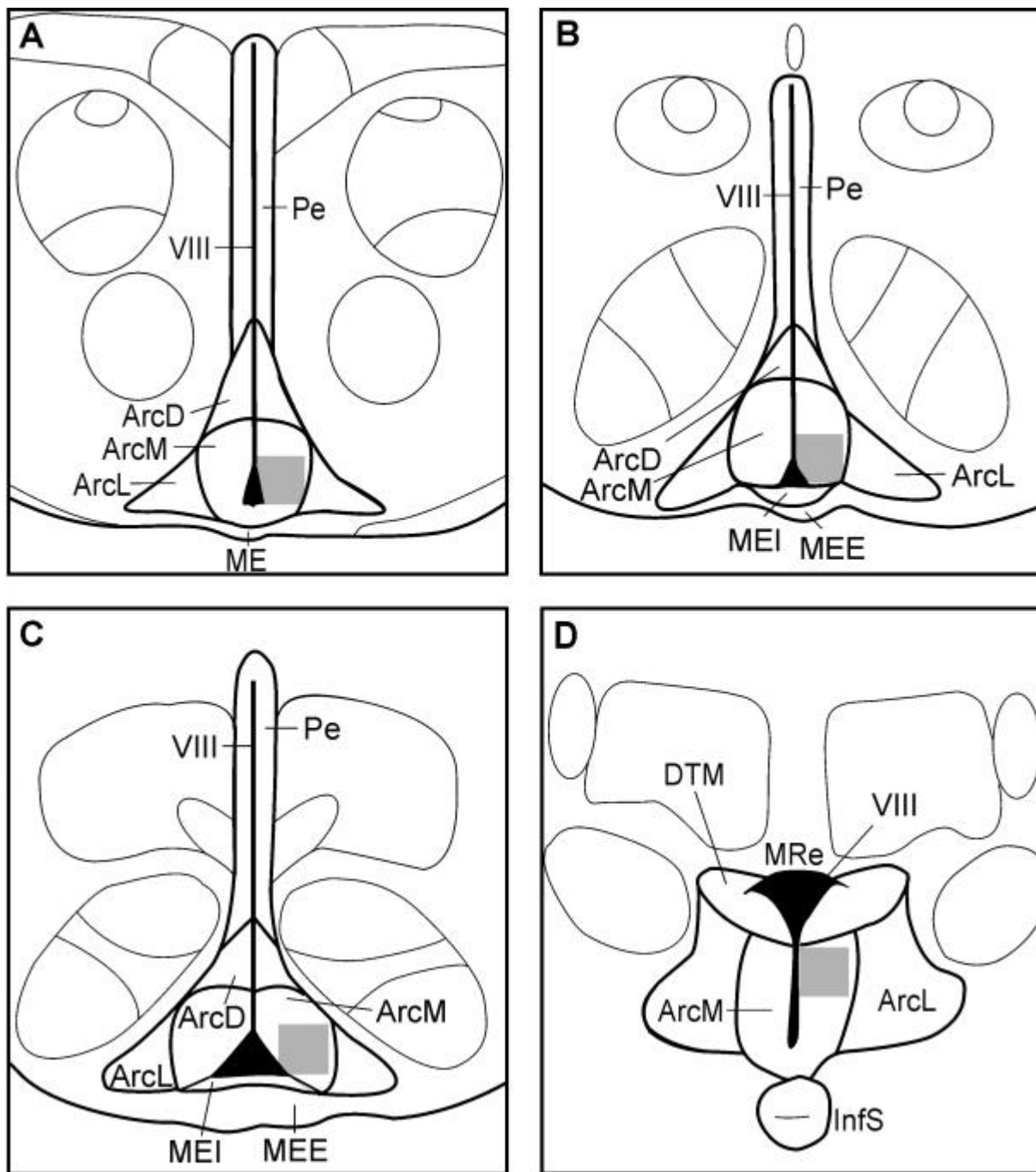


Abb 5: Schematische Darstellung coronaler Gehirnschnitte der Ratte auf der Höhe des Hypothalamus von rostral (oben links) nach caudal (unten rechts) (nach Paxinos und Watson, 1998).

Gezeigt werden die Ebenen, die für die quantitative Erfassung kresylviolettgefärbter Zellen im Nucleus arcuatus (ARC) herangezogen wurden. A: rostraler ARC, B: medialer ARC, C: medialer ARC, D: caudaler ARC. Grau ist das Zählfeld, schwarz das Ventrikellumen dargestellt.

Abkürzungen: VIII= dritter Ventrikel, ArcD= dorsaler ARC, ArcM= medialer ARC, ArcL= lateraler ARC, ME= Eminentia mediana, MEE= ME externa, MEI= ME interna, Pe= Nucleus periventricularis, DTM= Nucleus tuberomammillaris dorsalis, InfS= Hypophysenstiel, MRe= Recessus mammillaris.

3. ERGEBNISSE

3.1. Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung

3.1.1. Einfluß postnataler Überernährung auf die Körperzusammensetzung von Zuckerratten (+/+ und +/fa) und Wistarratten

3.1.1.1. Veränderungen von Feuchtmasse und Körperfettgehalt bei Zuckerratten

Untersucht wurden die Folgen veränderter Umweltbedingungen in einer sehr frühen Entwicklungsphase auf die Körperzusammensetzung von Rattenwelpen am Tag 21. Dazu wurden die Tiere abweichend von der Aufzucht mit normaler Nestgröße (zehn bis zwölf Tiere) ab Tag drei in einem Nest mit nur vier Wurfgeschwistern bei der Mutter bis zum Tag 21 aufgezogen. Von besonderem Interesse war, wie sich eine solche Behandlung auf heterozygote Zuckerratten mit einem defekten, für den Leptinrezeptor codierenden *fa*-Allel auswirken würde.

Schon im Lebendgewicht zeigte sich, daß eine Reduzierung der Welpenzahl im Nest am Tag 21 die Körpermasse sowohl bei Wildtyp (+/+)-Zuckerratten und als auch bei heterozygoten Trägern des Leptinrezeptordefektes (+/fa-Zuckerratten) signifikant erhöhte. So lag bei den männlichen Wildtyp (+/+)-Tieren das mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (mit den Faktoren Genotyp und Nestgröße) ermittelte gewichtete Mittel des Körpergewichtes im normalen Nest bei $41,4 \pm 1,1$ g im Vergleich zu den Tieren aus dem kleinen Nest bei $49,1 \pm 1,3$ g ($p < 0,001$). Weibliche Wildtyp (+/+)-Tiere wiesen am Versuchsende im normalen Nest ein Gewicht von $38,8 \pm 0,8$ g gegenüber $45,9 \pm 1,0$ g im kleinen Nest auf ($p < 0,001$). Bei den heterozygoten (+/fa)-Männchen lagen die gewichteten Mittelwerte bei $41,7 \pm 1,8$ g im normalen Nest und bei $51,1 \pm 1,0$ g im kleinen Nest ($p < 0,001$). Auch die heterozygoten (+/fa) Weibchen zeigten gegenüber einer Aufzucht im normalen Nest mit $40,2 \pm 0,8$ g im kleinen Nest ein größeres Körpergewicht mit $48,9 \pm 0,8$ g ($p < 0,001$). Eine genauere Analyse der Körperzusammensetzung machte darüber hinaus deutlich, daß der Einfluß einer Aufzucht in Nestern mit unterschiedlicher Welpenzahl nicht allein eine Zunahme des Körpergewichtes verursacht, sondern sich auf die quantitative Beziehung zwischen den Komponenten der Körpermasse auswirkt.

In der Abbildung 6 ist speziell zur Verdeutlichung der Interaktion zwischen den Aufzuchtbedingungen und dem normalerweise rezessiven Gendefekt bei heterozygoten Zuckerratten die Körperfettmasse gegen die Feuchtmasse im normalen und im kleinen Nest aufgezogener $+/+$ - und $+/fa$ -Tiere aufgetragen. Die Abbildung macht deutlich, daß die unterschiedliche Anzahl im Nest gesäugten Jungtiere zu einer erheblichen aber vergleichbaren Zunahme sowohl der Körperfettmasse als auch der Feuchtmasse bei den Wildtyp ($+/+$)- wie auch bei den heterozygoten ($+/fa$) Tieren führte, der Gendefekt jedoch erst an der Zunahme der Menge des Körperfettes erkennbar wird.

Mit Hilfe von Regressionsgeradenvergleichen konnte ermittelt werden, daß schon bei einer Aufzucht im normalen Nest heterozygote Tiere gegenüber Wildtyp-Tieren bei gleicher Feuchtmasse am Tag 21 einen geringfügig höheren Körperfettgehalt aufweisen. Der Geradenvergleich zeigte eine parallele Verschiebung der Regressionsgeraden der heterozygoten, im normalen Nest aufgezogenen Tiere zu höheren Werten mit signifikant verschiedenen y-Achsenabschnitten ($p < 0,05$). Wenngleich Tiere beider Genotypen nach einer Aufzucht im kleinen Nest zur Zeit des Absetzens sowohl eine größere Feuchtmasse als auch eine höhere Fettmasse aufweisen, wird die schon im normalen Nest beobachtete, geringe Verschiebung zu höheren Fettwerten bei heterozygoten Tieren durch eine Reduzierung der Anzahl der Welpen im kleinen Nest erheblich verstärkt. Dies ist an dem deutlich stärkeren Anstieg der Regressionsgeradensteigung bei den $+/fa$ -Tieren von 0,07 auf 0,24 ($p < 0,001$) gegenüber den $+/+$ -Tieren von 0,07 auf 0,14 ($p < 0,05$) zu erkennen, wenn die Tiere im kleinen statt im normalen Nest aufgezogen wurden.

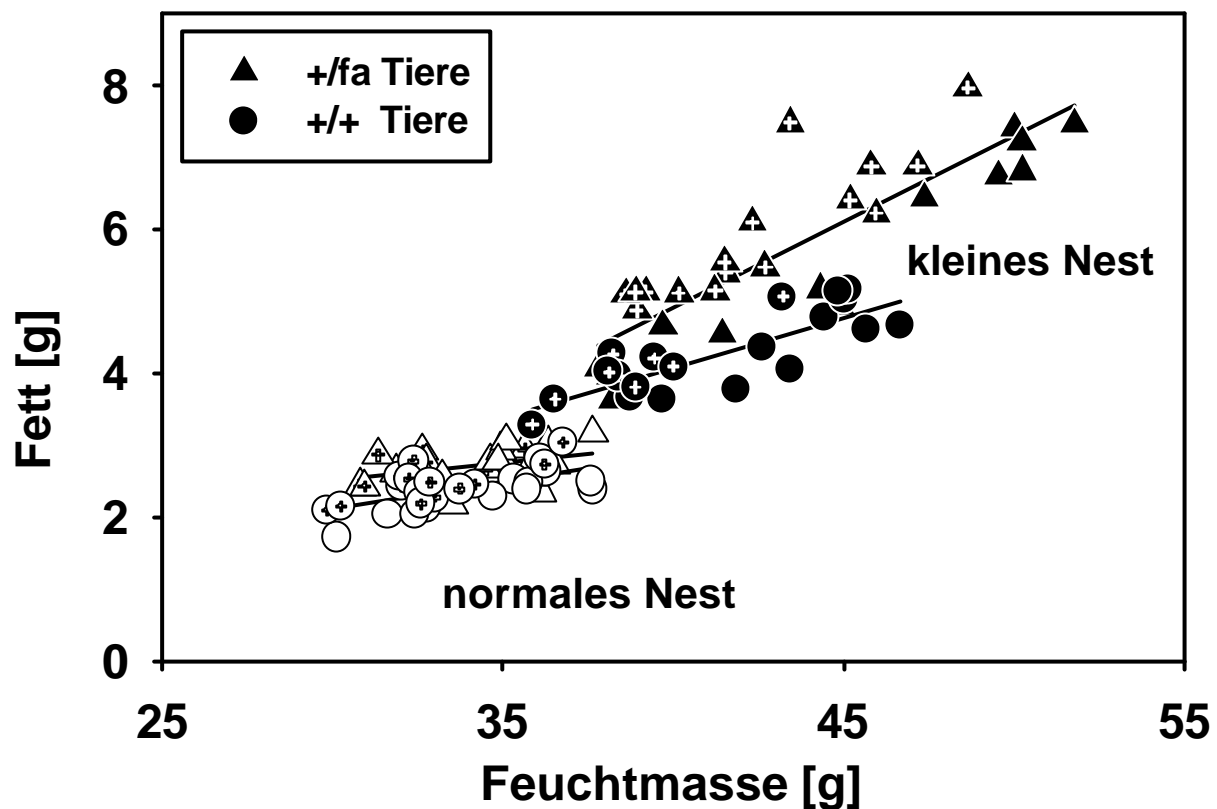


Abb. 6: Wirkungen der postnatalen Überernährung auf den Körperfettgehalt und die Feuchtmasse heterozygoter und Wildtyp-Zuckerratten.

Körperfettmasse als Funktion der Feuchtmasse 21 Tage alter Rattenwelpen, die entweder in einem normalen Nest mit zehn bis zwölf Tieren (weiße Symbole) oder in einem kleinen Nest mit vier Tieren (schwarze Symbole) aufgezogen wurden. Die Regressionsgeraden wurden für die +/+ (Kreise) und +/fa-Tiere (Dreiecke) ohne Berücksichtigung des Geschlechtes berechnet. Weibliche Tiere sind mit einem Kreuz gekennzeichnet. Der Korrelationskoeffizient (r) für die im normalen Nest aufgezogenen +/+ und +/fa-Tiere beträgt 0,63 und 0,40; $p < 0,05$ für unterschiedliche y-Achsenabschnitte. Für die +/+ und +/fa-Tiere, die im kleinen Nest aufgezogen wurden ist, $r = 0,82$ und $0,87$; $p < 0,05$ für unterschiedliche Steigungen.

3.1.1.2. Entwicklung genotypspezifischer Unterschiede in der Körperzusammensetzung bei Aufzucht in normalen und kleinen Nestern

Da schon früh ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der Lebendmasse besteht (Truett et al. 1995) und Einflüsse des Geschlechtes auf die Wirkung der Behandlung nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Männchen und Weibchen im folgenden getrennt betrachtet. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten wurden mit Hilfe der zweifaktoriellen

Varianzanalyse (mit den Faktoren Genotyp und Nestgröße) gewichtete Mittelwerte der untersuchten Parameter der Körperzusammensetzung ermittelt.

Die Aufzucht im kleinen Nest führte sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den heterozygoten Tieren und gleichermaßen bei Männchen und Weibchen zu einer signifikanten Zunahme aller untersuchten Parameter - Körpermasse, Feuchtmasse, Gesamtkörperwasser, Fettmasse, prozentualer Fettgehalt und FFDM - gegenüber im normalen Nest (n= 10-12) aufgezogenen Tieren (Abb. 7). Die Unterschiede in der Körperzusammensetzung waren zwar für alle Parameter signifikant ($p < 0,001$), durch die Behandlung wurde jedoch vor allem die Fettmasse und der prozentuale Fettgehalt beeinflusst. So führte die Aufzucht im kleinen Nest bei den Wildtyp-, ebenso wie bei den heterozygoten Männchen, zu einer doppelt so hohen Fettmasse ($4,3 \pm 0,3$ g bzw. $5,5 \pm 0,2$ g) verglichen mit im normalen Nest aufgezogenen Tieren ($2,4 \pm 0,2$ g bzw. $2,7 \pm 0,2$ g). Eine noch stärkere Erhöhung der Fetteinlagerung bei Aufzucht im kleinen Nest konnte bei heterozygoten Weibchen beobachtet werden ($5,9 \pm 0,2$ g vs. $2,9 \pm 0,2$ g), wohingegen bei Wildtyp-Weibchen eine nur annähernd doppelt so hohe Fettakkumulation beobachtet werden konnte ($4,1 \pm 0,2$ g vs. $2,5 \pm 0,2$ g). Dieser starken Veränderung der Körperfettmasse standen Steigerungen der FFDM und der Feuchtmasse nur im Bereich von 20-30 % gegenüber. Um auch die Zunahme der Feuchtmasse der Tiere durch postnatale Überernährung zu berücksichtigen, wurde auch der jeweilige prozentuale Körperfettgehalt errechnet. Diese Berechnung zeigte, daß im kleinen Nest aufgezogene Tiere einen deutlich höheren relativen Fettanteil aufweisen als im normalen Nest aufgezogene, wobei die Erhöhung bei den heterozygoten Männchen von $7,7 \pm 0,3$ % auf $12,2 \pm 0,3$ % und bei den heterozygoten Weibchen von $8,6 \pm 0,3$ % auf $13,9 \pm 0,2$ % am stärksten war (+/+-Männchen von $7,0 \pm 0,3$ % auf $9,9 \pm 0,3$ %; +/+-Weibchen von $7,5 \pm 0,3$ % auf $10,5 \pm 0,3$ %). Die behandlungsbedingt verstärkte Ausprägung des heterozygot vorliegenden Gendefektes auf die Gesamtkörperfettmasse und den prozentualen Körperfettgehalt der Welpen wurde durch signifikante Interaktionen zwischen den untersuchten Parametern Nestgröße und Genotyp bestätigt.

Zuckerratten

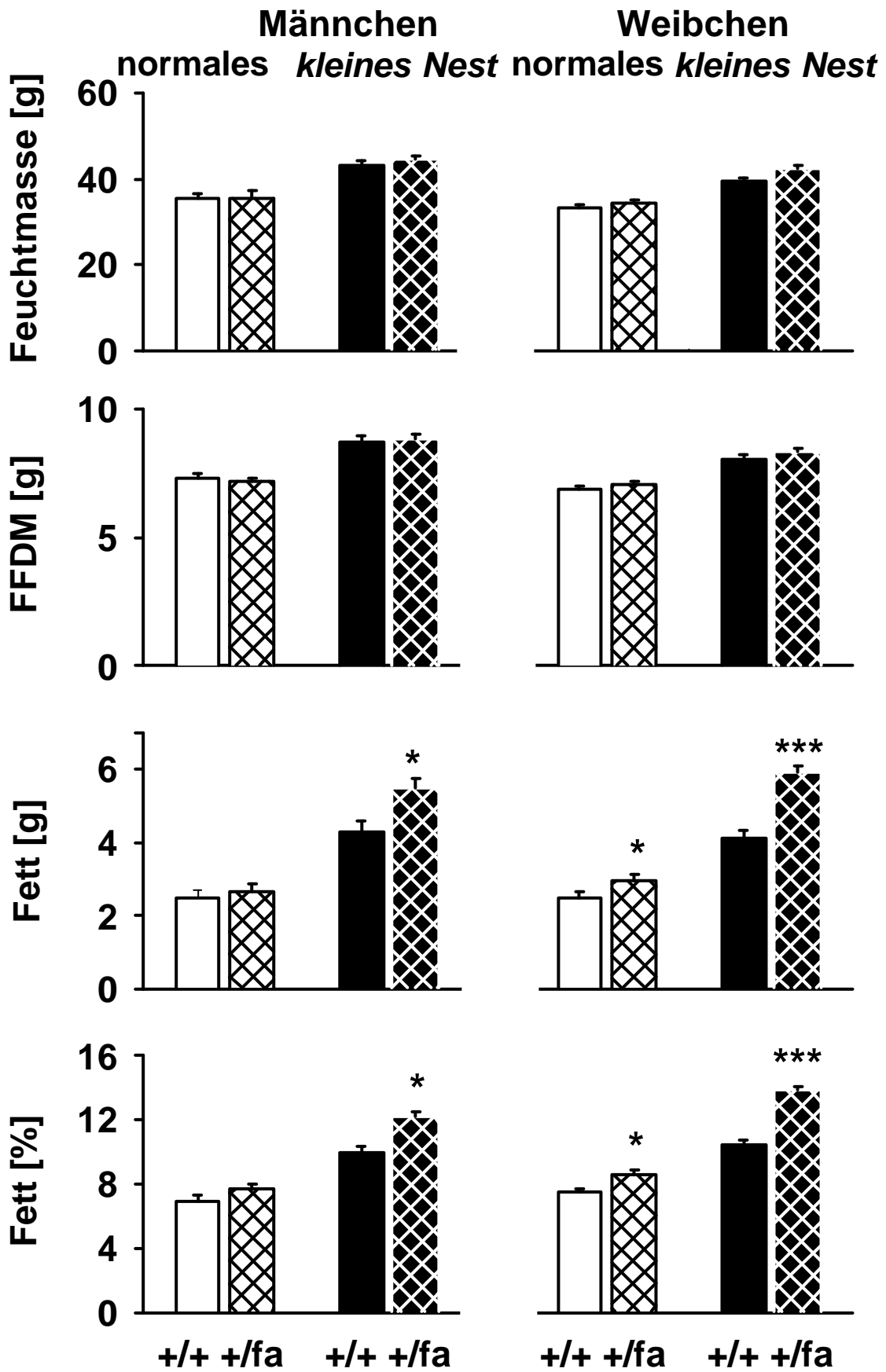


Abb. 7: Entwicklung genotypspezifischer Unterschiede in der Körperzusammensetzung bei Aufzucht in kleinen und normalen Nestern.

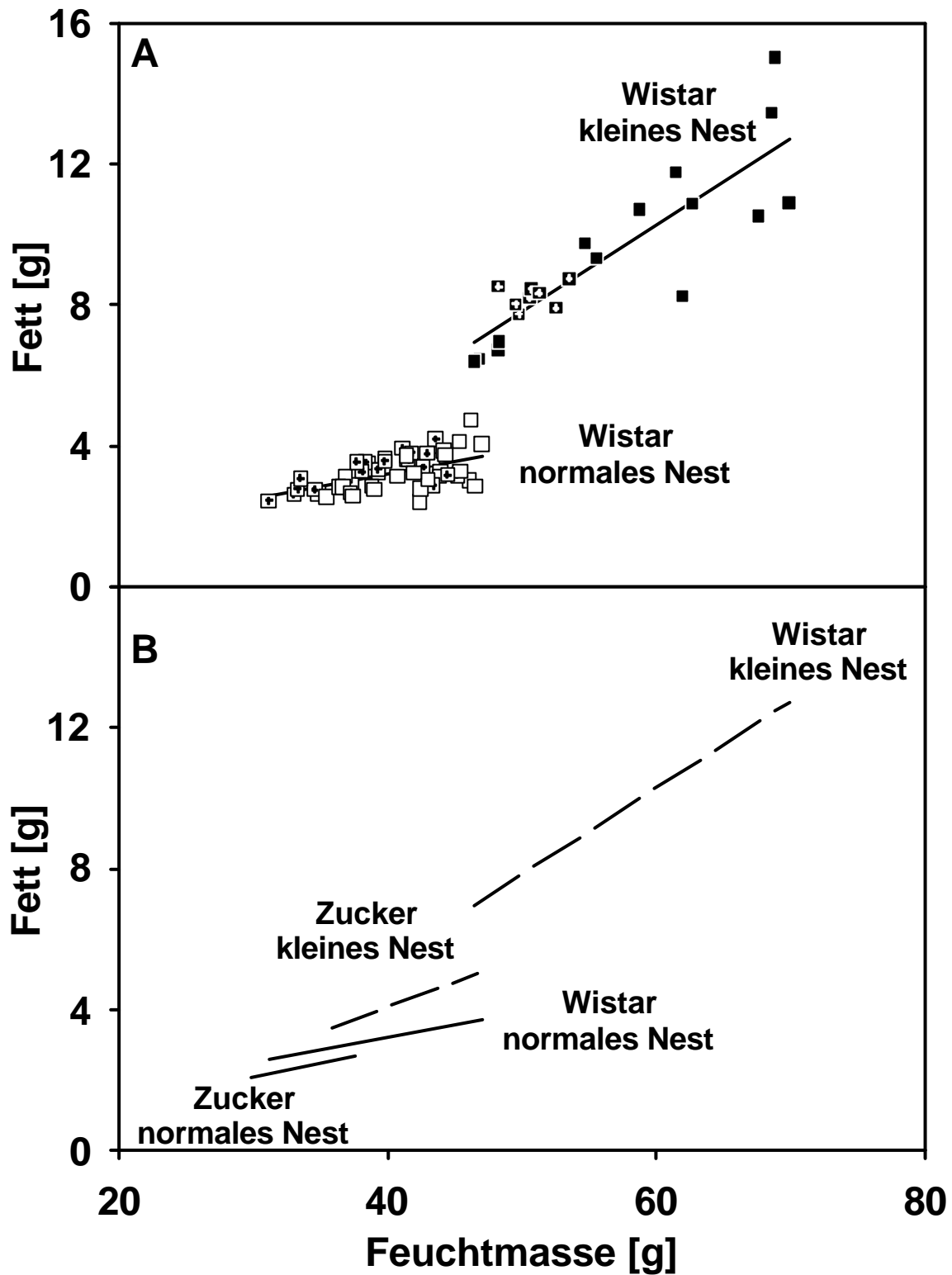
Mittels zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Genotyp und Nestgröße) ermittelte gewichtete Mittelwerte (\pm SEM) der Feuchtmasse, der FFDM, der Körperfettmasse und des prozentualen Körperfettgehaltes von männlichen und weiblichen Zuckerratten, die entweder in einem normalen Nest (weiße Balken) oder in einem kleinen Nest (schwarze Balken) aufgezogen worden waren. Nicht markierte Balken symbolisieren Wildtyp-Tiere, schraffierte Balken heterozygote Tiere. Die Unterschiede zwischen den normalen und kleinen Nestern waren für alle untersuchten Parameter sowohl bei den +/- als auch bei den +/fa-Tieren signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich und sind in der Abbildung nicht dargestellt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.1.1.3. Auswirkungen postnataler Überernährung bei einem anderen Rattenstamm

Um die Einflüsse der Aufzucht im kleinen Nest auch bei einem anderen Rattenstamm zu untersuchen, wurden Wistarratten, übereinstimmend mit der Behandlung der Zuckerratten, von Tag drei bis Tag 21 mit nur vier Wurfgeschwistern über den gleichen Zeitraum hinweg aufgezogen (Kontrolltiere in normalen Würfen mit durchschnittlich zehn bis zwölf Tieren). Auch hier wurden Männchen und Weibchen zunächst zusammen mit Hilfe der Regressionsanalysen betrachtet, durch die Unterschiede in der Größe berücksichtigt werden. Im normalen Nest aufgezogene Wistarratten weisen bei gleichem Alter gegenüber Wildtyp- oder heterozygoten Zuckerratten aus normalen Nestern bereits eine größere Feuchtmasse und eine höhere Körperfettmasse auf (Abb. 8 B).

Der Einfluß der Nestgröße auf das Körperwachstum entsprach bei den Wistarratten weitgehend dem bei den Zuckerratten. Eine Reduzierung der Anzahl im Nest gesäugter Welpen erhöhte auch bei Wistarratten Männchen das Lebendgewicht am Tag 21 in erheblichem Maße. Im normalen Nest aufgezogenen Tiere waren am Tag 21 im Mittel $48 \pm 0,8$ g schwer, eine Aufzucht im kleinen Nest führte zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichts auf $67 \pm 2,8$ g ($p < 0,001$). Auch die Wistarratten-Weibchen zeigten eine signifikante Zunahme des Körpergewichts von $47,7 \pm 0,7$ g im normalen Nest im Vergleich zu $56,4 \pm 0,5$ g im kleinen Nest ($p < 0,001$). Die Mittelwerte wurden mit einfaktoriellen Varianzanalysen mit dem Faktor Nestgröße ermittelt. Ebenso nahmen die Fett- und die Feuchtmasse gegenüber den Kontrolltieren erheblich zu (Abb. 8 A). Eine signifikante Änderung der Steigung der Regressionsgeraden für die Fettmasse der im normalen gegenüber im kleinen Nest aufgezogenen Wistarratten von 0,07 auf 0,19 ($p < 0,01$), die mit einem

Regressionsgeradenvergleich ermittelt werden konnte, zeigte, daß Feucht- und Fettmasse nicht gleichermaßen linear anstiegen, sondern daß der Fettgehalt der im kleinen Nest aufgezogenen Tiere überproportional zunahm. Eine enge Korrelation der beiden Parameter Körperfett- und Feuchtmasse bleibt aber auch bei diesem Stamm innerhalb des kleinen Nestes ($r = 0,76$) bestehen.



vorhergehende Seite:

Abb. 8: Vergleich der Körperfett- und der Feuchtmasse von Zuckerratten (+/+) mit Wistarratten bei Aufzucht in kleinen und normalen Nestern.

Körperfettmasse als Funktion der Feuchtmasse 21 Tage alter Wildtyp-Zuckerratten und Wistarratten, die entweder im normalen Nest mit zehn bis zwölf Tieren (weiße Symbole) oder im kleinen Nest mit vier Tieren (schwarze Symbole) aufgezogen wurden (A). Weibliche Tiere sind in der Abbildung durch ein Kreuz gekennzeichnet.

Um die Übersichtlichkeit zu erhalten, sind im zweiten Teil der Abbildung lediglich die Regressionsgeraden 21 Tage alter Wildtyp-Zuckerratten und Wistarratten, die entweder im normalen Nest mit 10-12 Tieren (durchgezogene Linien) oder in einem kleinem Nest mit vier Tieren (gestrichelte Linien) aufgezogen wurden, dargestellt (B). Die Regressionsgeraden wurden für die Wildtyp-Zuckerratten (Kreise) und die Wistarratten (Quadrate) separat berechnet, ohne das Geschlecht zu berücksichtigen. Der Korrelationskoeffizient (r) für die Wildtyp-Zuckerratten und die Wistarratten des normalen Nestes betragen 0,63 und 0,56. Für die Wildtyp-Zuckerratten und die Wistarratten, die im kleinen Nest aufgezogen wurden, beträgt $r = 0,82$ und $0,76$.

Eine getrennte Analyse der Körperzusammensetzung für Männchen und Weibchen ergab für die Wistarratten, daß die Aufzucht im kleinen Nest bei beiden Geschlechtern gleichermaßen zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,001$) aller untersuchten Parameter führte (Tab. 1). Übereinstimmend mit den Befunden bei Zuckerratten zeigten sich die größten Zunahmen in der Fettmasse und im prozentualen Fettgehalt der Tiere. Gegenüber im normalen Nest aufgezogenen Tieren wiesen die männlichen Wistarratten aus kleinen Nestern im Mittel eine dreimal so hohe Fettmenge von $9,6 \pm 0,3$ g gegenüber $3,2 \pm 0,3$ g auf, die weiblichen Tiere eine mehr als doppelt so hohe mit $8,2 \pm 0,5$ g gegenüber $3,4 \pm 0,4$ g. Dies steht einer Zunahme der FFDM und des Körperwassers um etwa ein Viertel bei den männlichen und 13 % bei den weiblichen Rattenwelpen gegenüber (Tab. 1). Die scheinbar größere Fettdeposition der Männchen gegenüber den Weibchen erklärt sich durch ihre größere Körpermasse. Beim Vergleich des prozentualen Körperfettgehaltes im kleinen Nest aufzogener Tiere wiesen sowohl Männchen als auch Weibchen im Mittel die gleichen Werte (16,3%) auf.

Wistarratten						
	Männchen			Weibchen		
	normales Nest	kleines Nest	p	normales Nest	kleines Nest	p
Lebendgewicht [g]	48,7 ± 1,5	66,7 ± 1,6	<0.001	47,7 ± 1,7	56,4 ± 2,1	<0.001
Feuchtmasse [g]	42,5 ± 1,2	58,5 ± 1,4	<0.001	41,0 ± 1,4	50,8 ± 1,8	<0.001
Wasser [g]	30,6 ± 0,9	37,7 ± 1,0	<0.001	29,1 ± 1,0	32,8 ± 1,3	<0.001
Wasser [%]	71,8 ± 0,5	64,4 ± 0,5	<0.001	71,0 ± 0,6	64,7 ± 0,7	<0.001
Fett [g]	3,2 ± 0,3	9,6 ± 0,3	<0.001	3,4 ± 0,4	8,2 ± 0,5	<0.001
Fett [%]	7,5 ± 0,4	16,3 ± 0,5	<0.001	8,2 ± 0,5	16,3 ± 0,6	<0.001
FFDM [g]	8,8 ± 0,2	11,2 ± 0,2	<0.001	8,6 ± 0,2	9,7 ± 0,3	<0.001

Tab.1: Einfluß der postnatalen Überernährung auf die Körperzusammensetzung männlicher und weiblicher Wistarratten.

Körperzusammensetzung männlicher und weiblicher Wistarratten bei Aufzucht im normalen (10-12 Tiere) oder kleinen Nest (4 Tiere) am Tag 21. Die Unterschiede in der Körperzusammensetzung waren bei allen miteinander verglichenen Gruppen signifikant ($p < 0,001$). Einfaktorielle Varianzanalysen mit dem Faktor Nestgröße.

3.1.2. Einfluß postnataler Überernährung auf die Plasmaleptinspiegel von Wildtyp- und heterozygoten Zuckerratten sowie von Wistarratten

3.1.2.1. Korrelation von Plasmaleptinspiegel und Körperfettmasse

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß die Plasmaleptinspiegel sowohl juveniler als auch adulter Ratten eng mit dem Körperfettgehalt korreliert sind (Zhang et al. 1997; Olbort 1998; Maffei et al. 1995). Dies bestätigte sich in der vorliegenden Studie bei 21 Tage alten heterozygoten Tieren dieser Versuchsserie, sowohl in normalen ($r = 0,66$) als auch in kleinen Nestern ($r = 0,70$). Durch die im Experiment verwendete Beschränkung der Nestgröße auf zehn bis zwölf Tiere wurde die Variabilität des Körperfettgehaltes von +/-Tieren im normalen Nest so stark eingeschränkt, daß nur eine lose Korrelation entstand ($r = 0,13$). Die Korrelation war aber auch im kleinen Nest bei den +/-Tieren nur schwach ($r = 0,31$) (Abb. 9).

Eine Aufzucht im kleinen Nest führte sowohl bei Wildtyp- als auch bei heterozygoten Zuckerratten zu deutlich höheren Plasmaleptinkonzentrationen verglichen mit Tieren des gleichen Genotyps aus normalen Nestern. Der Vergleich der Regressionsgeraden der gegen die Körperfettmasse aufgetragenen Plasmaleptinwerte von im normalen gegenüber im kleinen Nest aufgezogenen Wildtyp-Zuckerratten zeigte, daß es sich hierbei um eine Verschiebung hin zu höheren Werten auf nahezu derselben Geraden handelt. Daraus läßt sich ableiten, daß der Anstieg der Plasmaleptinkonzentrationen mit dem erhöhten Körperfettgehalt korrelierte und die relative Hyperleptinämie der Wildtyp-Tiere lediglich Ausdruck einer gesteigerten Körperfettmasse war (Abb. 9). Bei den heterozygoten Tieren konnte ein starker Anstieg der Plasmaleptinwerte im kleinen Nest gegenüber im normalen Nest aufgezogenen Tieren beobachtet werden. Bei diesen Tieren lagen die erhöhten Werte allerdings nicht auf einer Verlängerung der Geraden der im normalen Nest aufgezogenen Tiere, sondern die Steigung der Geraden war signifikant kleiner ($p < 0,001$). Im Vergleich zu den Wildtyptieren im kleinen Nest ergibt sich bei den Heterozygoten im kleinen Nest der Eindruck einer Parallelverschiebung zu höheren Konzentrationen. Bei heterozygoten Zuckerratten im normalen Nest dagegen steigt die Plasmaleptinkonzentration der heterozygoten- im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit der Körperfettmasse steiler an ($p < 0,001$, für den Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden) (Abb. 9).

Bei den Wistarratten konnte bei Aufzucht im kleinen Nest ebenfalls ein starker Anstieg des Plasmaleptins beobachtet werden. Allerdings war bei den Wistarratten, die im kleinen Nest

aufgezogen worden waren, die Streuung der Einzelwerte größer und somit die Korrelation zwischen Körperfettgehalt und Plasmaleptinspiegel niedriger (nicht gezeigt).

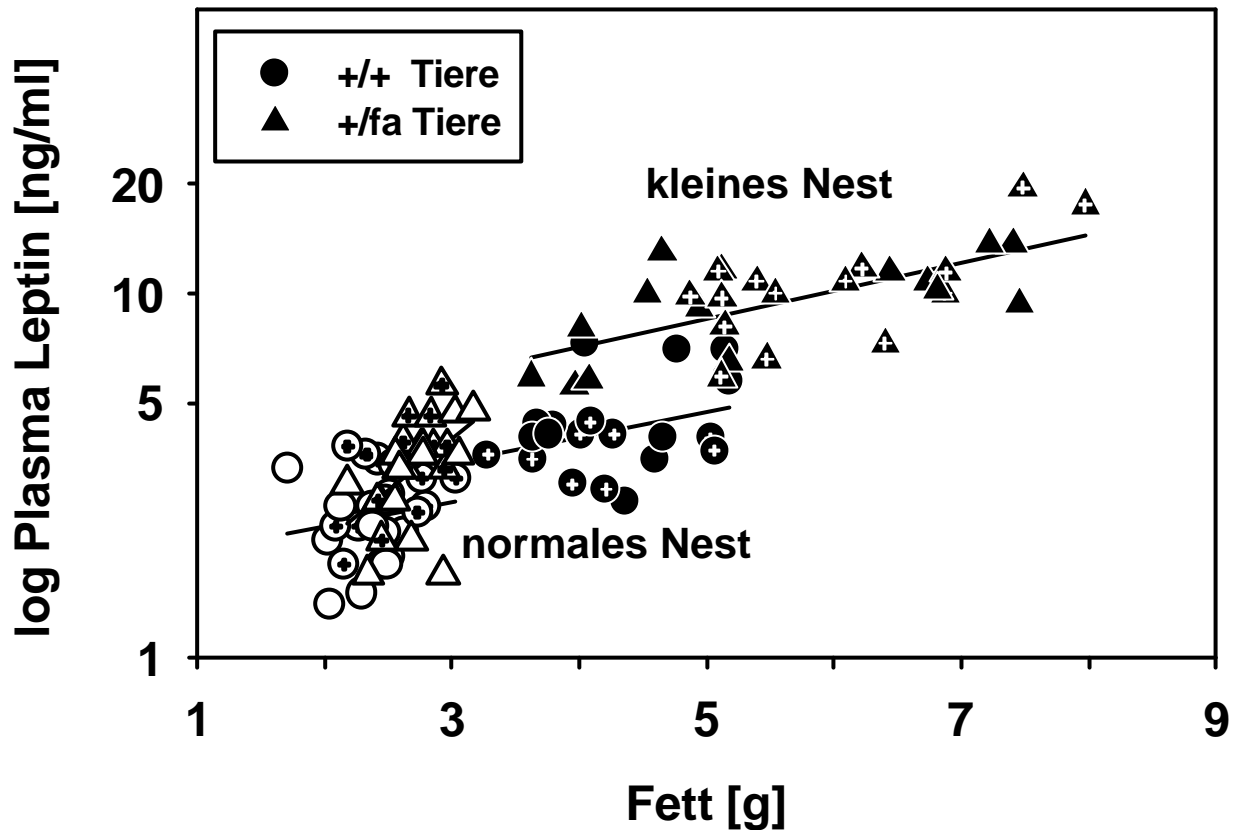


Abb. 9: Einfluß postnataler Überernährung auf die Plasmaleptinspiegel von Wildtyp- und heterozygoten Zuckerratten.

Semilogarithmische Darstellung der Plasmaleptinspiegel als Funktion des Körperfettgehaltes 21 Tage alter Wildtyp- (Kreise) oder heterozygoter (Dreiecke) Rattenwelpen, die entweder in einem normalen Nest mit zehn bis zwölf Tieren (weiße Symbole) oder in kleinen Nestern mit vier Tieren (schwarze Symbole) aufgezogen wurden. Die Regressionsgeraden wurden für die Wildtyp- und heterozygoten Tiere separat berechnet, ohne das Geschlecht zu berücksichtigen. Weibliche Tiere sind durch ein Kreuz gekennzeichnet. Der Korrelationskoeffizient r beträgt 0,13 und 0,70 für die Wildtyp- und heterozygoten Zuckerratten im normalen Nest und 0,31 und 0,66 im kleinen Nest.

3.1.2.2. Geschlechts- und genotypspezifische Unterschiede in den Plasmaleptinspiegeln von Zuckerratten bei Aufzucht im normalen oder kleinen Nest

Um eventuelle geschlechtsspezifische Unterschiede auch in den Plasmaleptinspiegeln zu berücksichtigen, wurden mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse gewichtete Mittelwerte (mit den Faktoren Genotyp und Nestgröße) für Männchen und Weibchen getrennt errechnet. Auf Grund der starken Streuung der Plasmaleptinwerte bei den Wistarratten wurde bei diesem Rattenstamm auf die Bildung von Mittelwerten verzichtet.

Die gewichteten Mittelwerte der Plasmaleptinspiegel im normalen Nest aufzogener heterozygoter männlicher Zuckerratten waren mit $3,5 \pm 1,0$ ng/ml gegenüber denen der Wildtyp Männchen mit $2,2 \pm 0,5$ ng/ml erhöht. Bei den weiblichen Tieren, die im normalen Nest aufgezogen worden waren, waren im Mittel die Leptinspiegel etwas höher als bei den männlichen. Übereinstimmend mit den Befunden bei den Männchen wiesen aber auch die weiblichen heterozygoten Zuckerratten mit $3,7 \pm 1,0$ ng/ml gegenüber den Wildtyp Weibchen mit $2,7 \pm 0,6$ ng/ml höhere Plasmaleptinspiegel auf. Die im Mittel höheren absoluten Plasmaleptinwerte weiblicher gegenüber männlicher Tiere entsprechen dem höheren Fettgehalt der Weibchen.

Eine Aufzucht im kleinen Nest führte bei Männchen und Weibchen gleichermaßen zu einer dramatischen Erhöhung der Plasmaleptinwerte. Das Ansteigen der Plasmaleptinspiegel war bei allen miteinander verglichenen Gruppen signifikant ($p < 0,001$). Die Wildtyp-Zuckerratten-Männchen, die im kleinen Nest aufgezogen worden waren, wiesen einen gewichteten Mittelwert des Plasmaleptinspiegels von $5,2 \pm 1,5$ ng/ml auf, während die heterozygoten Zuckerratten-Männchen, verglichen mit den Plasmaleptinspiegeln im normalen Nest aufzogener heterozygoter Tiere, beinahe eine Verdreifachung ihrer Plasmaleptinspiegel auf $9,3 \pm 2,8$ ng/ml zeigten.

Auch bei den weiblichen Tieren ging mit einer Aufzucht im kleinen Nest eine Zunahme der Plasmaleptinspiegel einher. Die Wildtyp-Weibchen wiesen Plasmaleptinspiegel von $4,0 \pm 0,8$ ng/ml auf. In Übereinstimmung mit den Befunden bei den männlichen im kleinen Nest aufgezogenen Tieren wiesen heterozygote Zuckerratten-Weibchen mit $10,2 \pm 3,8$ ng/ml im Mittel gegenüber den Wildtyp-Zuckerratten höhere Plasmaleptinwerte auf.

3.1.3. Einfluß der Leptinbehandlung auf die Körperzusammensetzung von im kleinen Nest aufgezogenen juvenilen Zucker- und Wistarratten

Um herauszufinden inwieweit die beobachtete Hyperleptinämie im kleinen Nest aufgezogener Tiere mit Veränderungen der Wirkung von Leptin einher ging, wurden im kleinen und normalen Nest aufgezogene Würfe mit Leptin behandelt.

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, daß exogene Gaben rekombinanten Leptins zu einer Reduzierung der Fettdeposition unter anderem bei adulten Mäusen sowie bei Ratten bereits im Säuglingsalter führten, ohne dadurch das Wachstum der FFDM zu beeinträchtigen (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Pelleymounter et al. 1995; Stehling et al. 1996; Kraeft et al. 1999). Da die Leptindosierungen, die zu einem biologisch signifikanten Effekt auf den Körperfettgehalt führen, bekannt sind (Eiden 1999), erhielten Rattenwelpen in kleinen und normalen Nestern von ihrem ersten Lebenstag an über einen Zeitraum von 21 Tagen subcutane Injektionen von $2 \times 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Leptin oder PBS als Kontrolle. Auch in diese Versuchsreihe wurden Wistarratten mit einbezogen und derselben Behandlung wie die Zuckerratten unterzogen.

3.1.3.1. Veränderungen im Körperfettgehalt

Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, stellen sowohl Körper- als auch Feuchtmasse vergleichsweise ungenaue Parameter dar, um die Wirkungen von Leptin auf die Körperzusammensetzung zu beschreiben (Stehling et al. 1997 a; Eiden 1999), denn die Wirkung des Hormons beschränkt sich weitgehend auf den Körperfettgehalt. Um diesen Haupteffekt von der oben dargestellten Vergrößerung der Feuchtmasse bei Aufzucht im kleinen Nest abzugrenzen, wurde der prozentuale Körperfettgehalt gewählt, um die Wirkungen von Leptin zu beschreiben. Mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen wurden mit den Faktoren Wurfzugehörigkeit und Behandlung (Leptin gegenüber PBS) gewichtete Mittelwerte errechnet.

Bei einer Behandlung mit Leptin war bei Wildtyp-Zuckerratten-Männchen, die im kleinen Nest aufgezogen worden waren, mit im Mittel $7,2 \pm 0,7 \%$ ein niedrigerer relativer Körperfettgehalt, gegenüber $10,2 \pm 0,6 \%$ bei den PBS-behandelten Kontroll-Tieren zu beobachten. Die weiblichen mit Leptin behandelten +/+ Tiere wiesen am Versuchsende mit $7,8 \pm 0,4 \%$ ebenfalls einen deutlich geringeren Körperfettgehalt gegenüber den Kontrolltieren

mit $10,8 \pm 0,4$ % auf. Da die Abnahmen im relativen Körperfettgehalt damit bei den Männchen und bei den Weibchen fast gleich waren, wurden in der Abb. 10 die Wildtyp-Tiere nicht nach Geschlechtern getrennt dargestellt. Im kleinen Nest aufgezogene, heterozygote Männchen wiesen nach der Behandlung mit rekombinantem Leptin im Mittel einen prozentualen Körperfettgehalt von $8,5 \pm 0,2$ % gegenüber den Kontrolltieren mit $10,6 \pm 0,2$ % auf. Bei den mit Leptin behandelten weiblichen heterozygoten Tieren ergab sich zu Versuchsende lediglich eine Differenz im relativen Körperfettgehalt von $13,3 \pm 0,1$ % gegenüber $14,1 \pm 0,1$ % PBS-behandelter Tiere, die aber noch signifikant war.

Im kleinen Nest aufgezogene und mit Leptin behandelte, männliche Wistarratten dagegen zeigten die geringste Sensitivität gegenüber peripher verabreichtem Leptin. Die Behandlung führte lediglich zu einer nicht signifikanten Abnahme des prozentualen Körperfettgehaltes mit $18,1 \pm 0,3$ % bei den Leptin-behandelten Tieren im Vergleich zu $18,9 \pm 0,3$ % bei den Kontrolltieren. Da bereits bei den Männchen eine fehlende Reaktion auf die Leptinbehandlung festgestellt werden konnte, wurde auf die zusätzliche Untersuchung von weiblichen Wistar-Ratten verzichtet.

Bei in normalen Nestern aufgezogenen Tieren war eine sehr viel größere Sensitivität gegenüber peripher verabreichtem Leptin zu beobachten. So weisen sowohl Wildtyp- als auch heterozygoten Zuckerratten nach einer Leptinbehandlung größere Unterschiede im Körperfettgehalt auf (Andrea Fritz, unveröffentlichte Ergebnisse), als dies bei einer Behandlung im kleinen Nest in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte. Auch in normalen Nestern aufgezogene und mit Leptin behandelte Wistarratten Männchen wiesen, entgegen der im kleinen Nest gezeigten Unwirksamkeit des Leptins auf den Körperfettgehalt, am Versuchsende einen deutlich niedrigeren Körperfettgehalt von $5,7 \pm 0,2$ % gegenüber den PBS-behandelten Tieren mit $8,4 \pm 0,1$ % auf.

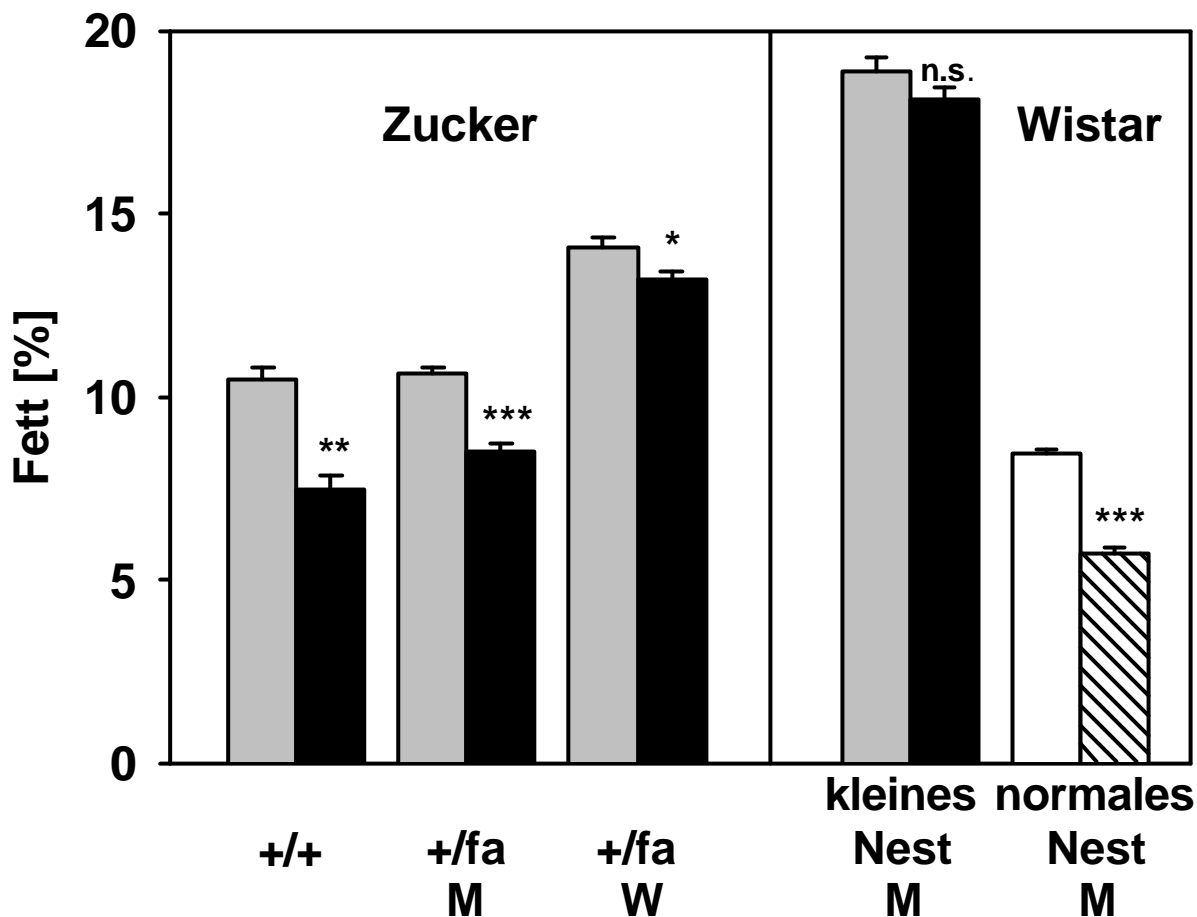


Abb 10: Einfluß einer Leptinbehandlung auf den prozentualen Körperfettgehalt von Zucker- und Wistarratten, die bis zu einem Alter von 21 Tagen in kleinen oder normalen Nestern aufgezogen wurden.

Leptin-(schwarz) oder PBS-behandelte (Kontrolle, grau) Wildtyp-, heterozygote Zuckerratten und Wistarratten. Quergestreift sind in normalen Nestern aufgezogene, Leptin-behandelte Wistarratten, weiß ihre mit PBS-behandelten Wurfgeschwister dargestellt. M= Männchen; W= Weibchen. Die dargestellten gewichteten Mittelwerte wurden mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen mit den Faktoren Wurfzugehörigkeit und Behandlung (Leptin gegenüber PBS) ermittelt.

Zur besseren Veranschaulichung der Daten wurden in Abbildung 11 der Körperfettgehalt der im kleinen Nest aufgezogenen, mit Leptin- oder PBS-behandelten Wurfgeschwister als prozentuale Differenz von den Mittelwerten im normalen Nest aufzogener, unbehandelter Tiere dargestellt. Diese Darstellung verdeutlicht einerseits, daß auch bei mit Leptin behandelten Würfen eine postnatale Überernährung prinzipiell zu einer vermehrten Fettakkumulation gegenüber normal aufgezogenen Tieren führte. Andererseits zeigt sich, daß mit steigendem Körperfettgehalt die Wirksamkeit des verabreichten Leptins nachließ. Dabei wird der Einfluß des *fa*-Alleles bei einer Leptinbehandlung deutlich. Die Wildtyp-

Zuckerratten beiderlei Geschlechts waren noch in der Lage ihren relativen Körperfettgehalt um ein Drittel zu reduzieren, so daß die behandelten Tiere beinahe wieder den Körperfettgehalt von normal aufgezogenen Tieren erreichten. Bei den *+fa*-Männchen zeigte sich schon eine leichte Tendenz nachlassender Ansprechbarkeit auf peripher verabreichtes Leptin. Bei den *+fa*-Weibchen schließlich wurden durch eine Leptinbehandlung im kleinen Nest nur noch sehr geringe Abnahmen des Körperfettgehaltes beobachtet. Aber auch die im einzelnen nicht bekannte Genkonstellation der Wistarratten hatte einen gleichgerichteten Effekt, denn die geringsten Abnahmen im kleinen Nest durch eine Leptinbehandlung im Sinne einer faktischen Unwirksamkeit des Hormons waren bei den Wistarratten-Männchen zu beobachten, die die höchsten Zunahmen im Körperfettgehalt aufwiesen.

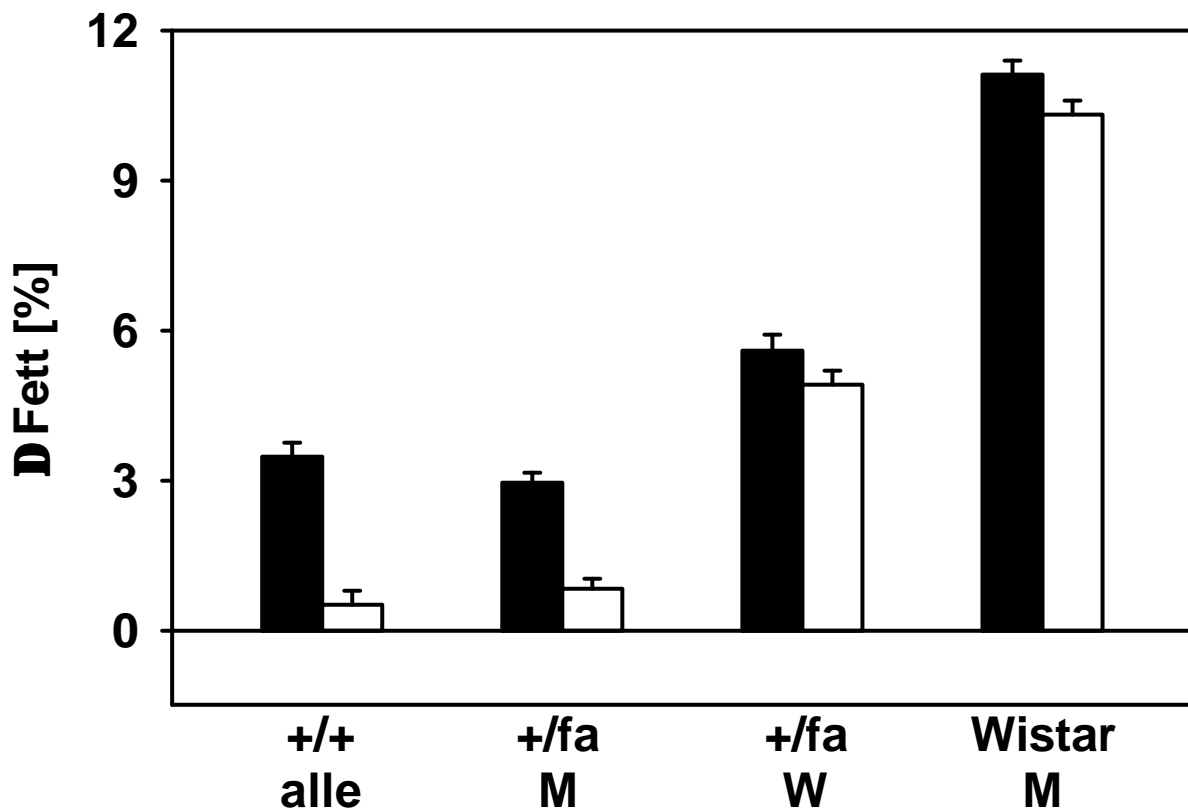


Abb 11: Einfluß einer Leptinbehandlung auf die Differenzen im prozentualen Körperfettgehalt von Zucker- und Wistarratten bei Aufzucht im kleinen Nest.

Dargestellt sind die Unterschiede im prozentualen Körperfettgehalt zwischen im kleinen Nest aufgezogenen mit Leptin- (weiße Balken) oder mit PBS-behandelten (schwarze Balken) Wildtyp-, heterozygoter Zuckerratten und Wistarratten und entsprechenden im normalen Nest aufgezogenen, unbehandelten Tieren. Die Nulllinie stellt den prozentualen Körperfettgehalt der jeweiligen Vergleichsgruppe dar.

3.1.3.2. Weitere durch die Leptinbehandlung hervorgerufene Veränderungen in der Körperzusammensetzung

In der Tabelle 2 sind die gewichteten Mittelwerte \pm SEM von Lebendmasse, Feuchtmasse, Fettmasse, FFDM und Gesamtkörperwasser im kleinen Nest aufgezogener und mit Leptin behandelte Tiere dargestellt. Neben dem prozentualen Fettgehalt (vgl. Kap 3.1.3.1.) war bei den Wildtyp-Männchen am Tag 21 unter der Behandlung im kleinen Nest auch eine signifikante Abnahme der Lebendmasse zu beobachten. In Übereinstimmung damit war auch die Feuchtmasse um 5% und die Körperfettmasse um 30 % bei den Leptin-behandelten gegenüber den PBS-behandelten Tieren signifikant erniedrigt (Tab. 2). Bei den Wildtyp-Zuckerratten Weibchen führte die Leptinbehandlung ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Körpermasse. Neben einer Abnahme der Feuchtmasse um 10 % und des absoluten Körperfettgehalts um fast 40 % wurde bei den +/-Weibchen auch bei der FFDM durch die Leptinbehandlung eine signifikante Abnahme um 8 % beobachtet (Tab. 2).

Die verringerte Wirksamkeit des exogen applizierten Leptins auf den Körperfettgehalt von Trägern eines defekten *fa*-Alleles im kleinen Nest zeigte sich darin, daß entsprechend dem prozentualen Körperfettgehalt bei den männlichen heterozygoten Zuckerratten zwar der Effekt der peripheren Leptingabe auf die Fettmasse signifikant war, jedoch keine Veränderungen der anderen Parameter der Körperzusammensetzung nachweisbar waren. Bei den heterozygoten Zuckerratten-Weibchen und bei den männlichen Wistarratten, die eine geringere Sensitivität gegenüber der Leptinbehandlung aufwiesen, wie sich an Hand geringerer Unterschiede im prozentualen Körperfettgehalt zeigte, wurde ebenfalls keiner der übrigen Parameter durch die Behandlung signifikant beeinflusst.

	Leptin	SEM	PBS	SEM	P	behandelte Tiere	Leptin-behandelt n	PBS-behandelt n
Lebendmasse [g]	49.1	0.4	51.9	0.4	<0,01	Zuckerratten +/+ Männchen	5	6
Feuchtmasse [g]	43.3	0.4	45.6	0.4	<0,05			
Fettmasse [g]	3.4	0.2	4.9	0.2	<0,01			
FFDM [g]	9.0	0.1	9.3	0.1	n.s.			
Wasser [g]	30.9	0.2	31.4	0.2	n.s.			
Lebendmasse [g]	38.7	0.8	43.0	0.7	<0,05	Zuckerratten +/+ Weibchen	4	4
Feuchtmasse [g]	33.5	0.7	37.2	0.6	<0,05			
Fettmasse [g]	2.4	0.3	3.8	0.2	<0,05			
FFDM [g]	6.9	0.1	7.5	0.1	<0,05			
Wasser [g]	24.2	0.4	25.9	0.4	n.s.			
Lebendmasse [g]	45.8	0.4	46.1	0.4	n.s.	Zuckerratten +/fa Männchen	8	8
Feuchtmasse [g]	38.4	0.2	38.9	0.2	n.s.			
Fettmasse [g]	3.3	0.1	4.1	0.1	<0,001			
FFDM [g]	8.0	0.1	8.0	0.1	n.s.			
Wasser [g]	27.1	0.2	26.8	0.2	n.s.			
Lebendmasse [g]	46.4	1.0	48.4	1.0	n.s.	Zuckerratten +/fa Weibchen	8	8
Feuchtmasse [g]	39.8	1.0	41.6	1.0	n.s.			
Fettmasse [g]	5.3	0.2	5.9	0.2	n.s.			
FFDM [g]	7.9	0.2	8.2	0.2	n.s.			
Wasser [g]	26.6	0.6	27.4	0.6	n.s.			
Lebendmasse [g]	69.3	1.0	70.3	1.0	n.s.	Wistarratten Männchen	6	6
Feuchtmasse [g]	61.3	0.7	61.3	0.7	n.s.			
Fettmasse [g]	11.6	0.2	11.3	0.2	n.s.			
FFDM [g]	11.4	0.1	11.4	0.1	n.s.			
Wasser [g]	38.3	0.7	38.6	0.7	n.s.			

Tabelle 2: Einfluß einer Leptinbehandlung auf die Körperzusammensetzung im kleinen Nest aufgezogener Wildtyp- und heterozygoter Zuckerratten sowie Wistarratten. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (mit den Faktoren Wurffaktor und Behandlung) ermittelte gewichtete Mittelwerte (\pm SEM) für Lebendgewicht und Körperzusammensetzung (Absolutwerte) am Versuchsende (d 21). Dargestellt sind die Unterschiede in der Körperzusammensetzung von im kleinen Nest aufgezogenen, Leptin-behandelten gegenüber den PBS-behandelten Kontrolltieren.

3.1.4. Genotypspezifische Unterschiede der Leptinrezeptorbindung im Hypothalamus von Zuckerratten

Wie zuvor beschrieben, zeigten *+fa*-Weibchen eine Hyperleptinämie und eine herabgesetzte Sensitivität gegenüber exogen verabreichtem Leptin. In mehreren Assays wurden daher Zuckerratten hinsichtlich eventuell vorliegender Veränderungen in der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung am Tag 21 post natum untersucht, indem Leptinrezeptor-Bindungsexperimente an hypothalamischen Membranhomogenaten von unseren Kooperationspartnern in Berlin (T. Ziska, AG A. Plagemann) durchgeführt wurden.

Assay 1 beinhaltete Zuckerratten aller drei Genotypen (*+/+*, *+fa* und *fa/fa*), die in einem normalen Nest von zehn bis zwölf Wurfgeschwistern aufgewachsen waren. Durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Genotyp und Geschlecht konnte ein klarer genotypspezifischer Unterschied in der Leptinrezeptorbindung im Hypothalamus zwischen den einzelnen Genotypen ermittelt werden ($p < 0,001$). Die gewichteten Mittelwerte \pm SEM betragen für die *fa/fa*-Tiere $0,36 \pm 0,03$ fmol/mg, für die *+fa*-Tiere $0,56 \pm 0,03$ fmol/mg und für die *+/+*-Tiere $0,76 \pm 0,04$ fmol/mg. Ein posthoc Student-Newman-Keuls t-Test ergab signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) sowohl zwischen den *fa/fa*- und *+fa*-, als auch zwischen den *+/+*- und *+fa*-Tieren. Eine Unterscheidung zwischen den Geschlechtern innerhalb der einzelnen Genotypen zeigte, daß die *fa/fa*- und die *+/+*-Weibchen eine signifikant niedrigere ($p < 0,05$) Leptinrezeptorbindung aufwiesen als die jeweiligen Männchen. Bei den *+fa*-Tieren war dieser Unterschied nur tendenziell vorhanden, allerdings ohne statistisch signifikant zu werden.

Da in den physiologischen Versuchen nur Wildtyp- und heterozygote Zuckerratten aber keine *fa/fa*-Tiere untersucht worden waren, beschränkten sich weitergehende Analysen auf diese beiden Tiergruppen. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Genotyp, Geschlecht und Behandlung (Leptin gegenüber PBS) ergab, daß eine Leptinbehandlung von Tieren, die im kleinen Nest aufgezogen worden waren (Assay 3), keinen Effekt auf die Leptinrezeptorbindung hatte ($p = 0,49$). Zudem zeigte sich keine signifikante Interaktion einerseits zwischen der Behandlung (Leptin gegenüber PBS) und dem Genotyp oder andererseits zwischen der Behandlung und dem Geschlecht. Jedoch bestätigte sich die in Assay 1 festgestellte unterschiedliche Bindungskapazität innerhalb der verschiedenen Genotypen auch in diesem Assay ($p < 0,01$) für eine geringere Leptinrezeptorbindung der heterozygoten gegenüber Wildtyp-Zuckerratten.

In Assay 2 und 4 wurde untersucht, ob die Aufzucht in unterschiedlichen Nestgrößen zu einer veränderten Leptinrezeptorbindung führte. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Genotyp, Geschlecht und Wurfgröße zeigte, daß die Leptinrezeptorbindung von einer Aufzucht in unterschiedlich großen Nestern unbeeinflusst blieb ($p = 0,24$), aber die Genotypunterschiede zwischen $+/+$ und $+/fa$ -Welpen bestehen blieben ($p < 0,001$), ohne daß sich Interaktionen zwischen Genotyp und Wurfgröße ergaben ($p = 0,43$).

Um der methodisch bedingten Variabilität der einzelnen Assays Rechnung zu tragen, wurden die Daten normalisiert, indem sie auf die durchschnittliche Bindungskapazität als Basis bezogen wurden. Unberücksichtigt blieben dabei die Messungen unter Leptinbehandlung, da für sie kein Einfluß auf die Rezeptorbindung erkennbar gewesen war. Diese Evaluierung der Daten ermöglichte die direkte graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse (Abb. 12). Eine dreifaktorielle Varianzanalyse dieser normalisierten Werte bestätigte die oben erläuterten Befunde. So ergaben sich signifikante Unterschiede in der Leptinrezeptorbindung mit $p < 0,001$ für den Genotyp und $p = 0,046$ für das Geschlecht. Die Aufzucht in unterschiedlich großen Nestern ergab jedoch auch bei den normalisierten Daten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,39$). Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Interaktionen zwischen den einzelnen Parametern ($p > 0,05$ für alle Interaktionen).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß keine Veränderung der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung nach postnataler Überernährung und Leptinbehandlung erfolgt. Es bestehen jedoch starke Unterschiede der Leptinrezeptorbindung zwischen den verschiedenen Genotypen. Die Abbildung veranschaulicht des weiteren, daß ungeachtet einer erheblichen Variabilität innerhalb den unterschiedlichen Assays die Leptinrezeptorbindung der weiblichen gegenüber den männlichen Tieren geringer und daß gleichzeitig der Genotypunterschied bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen kleiner war.

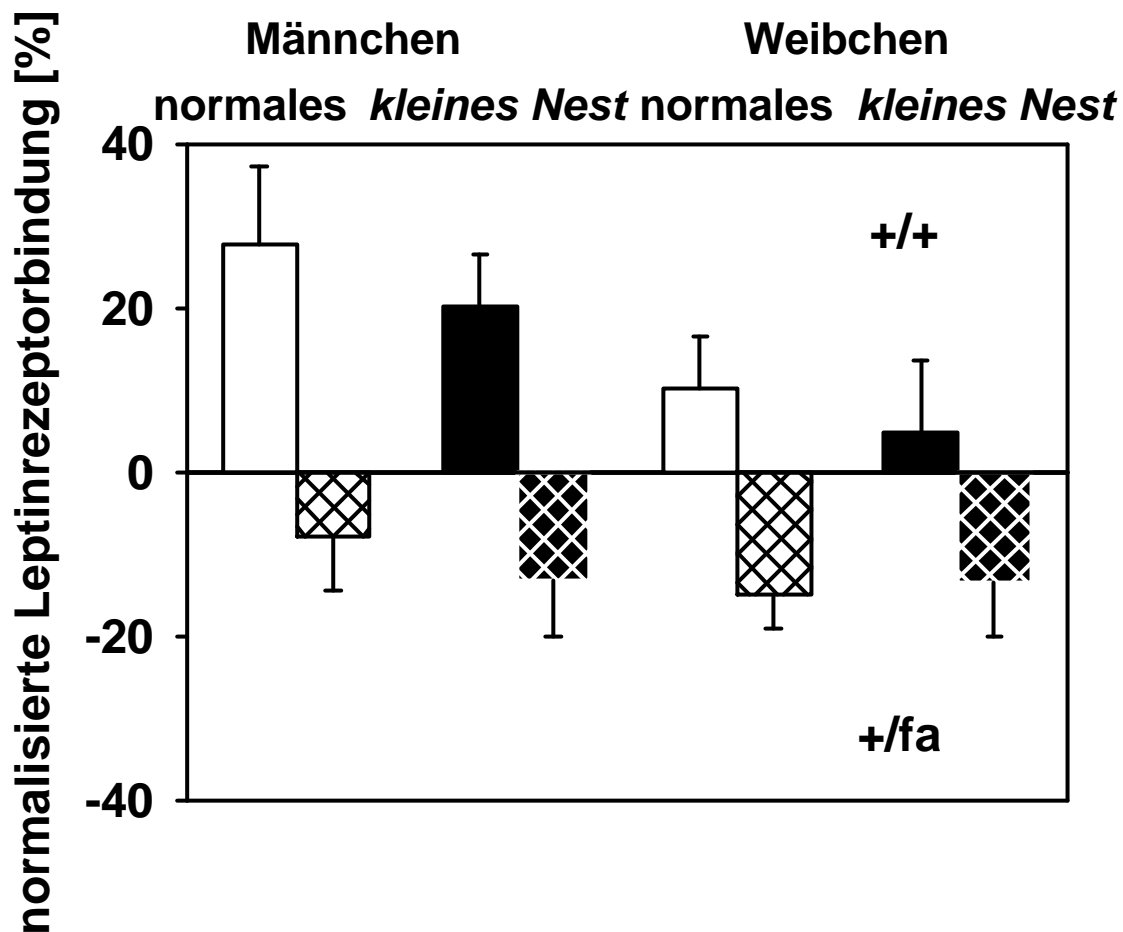


Abb. 12: Genotypspezifische Unterschiede der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung bei Aufzucht im normalen oder kleinen Nest.

Normalisierte Daten der Leptinrezeptorbindung (\pm SEM) im Hypothalamus von Rattenwelpen, die entweder in einem kleinen oder normalen Nest aufgezogen worden waren ($N = 12-17$ für jede Gruppe). Weiße Balken: Wildtyp-Tiere normales Nest; schwarze Balken: Wildtyp-Tiere kleines Nest; weiße schraffierte Balken: heterozygote Tiere normales Nest; schwarze schraffierte Balken: heterozygote Tiere kleines Nest.

3.2. Adipositas-Modell II: Chemische Läsionierung des zentralen Leptin-Targets durch Monosodiumglutamat

3.2.1. Physiologische Parameter

Eine Behandlung von Rattenwelpen mit Monosodiumglutamat in hohen Dosen führt zu einer spezifischen chemischen Läsionierung hypothalamischer Gebiete mit fehlender oder nicht vollständig ausgebildeter Blut-Hirnschranke. Die sich daraus ergebenden Störungen im Energiehaushalt der Tiere führen beim adulten Tier unter anderem zu einer ausgeprägten

Adipositas. Vor diesem Hintergrund wurden die Folgen einer Monosodiumglutamatbehandlung auf den Stoffwechsel und die Körperzusammensetzung der juvenilen Ratte bis zum Alter von zehn Tagen untersucht. Die Tiere erhielten dazu von Tag eins bis Tag neun post natum einmal täglich während der Dunkelphase eine subcutane Injektionen von 3 mg/g Körpergewicht Monosodiumglutamat.

3.2.1.1. Wirkungen der MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung natürlich aufgezogener Wildtyp-Zuckerratten

3.2.1.1.1. Einfluß der MSG-Behandlung auf das Lebendgewicht

Untersucht wurden die Tiere von sechs Würfen (Serie V und VI), die von der Mutter bis zum Alter von zehn Tagen im Wurfverband aufgezogen wurden, wobei der Tag der Geburt der Welpen als Tag null gezählt wurde. Fünf dieser Würfe erhielten täglich Injektionen von MSG oder isotoner Kochsalzlösung; ein Wurf wurde nur alle zwei Tage injiziert. Mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen (mit den Faktoren Wurfzugehörigkeit und Behandlung mit MSG oder NaCl) konnte kein signifikanter Einfluß der unterschiedlichen Injektionshäufigkeiten auf die untersuchten Parameter der Körperzusammensetzung nachgewiesen werden, deshalb werden die Würfe im folgenden zusammen betrachtet.

Die Körpermasse MSG-behandelter, natürlich aufgezogener Tiere nahm von Tag eins bis zum Tag zehn langsamer zu als die ihrer mit NaCl behandelten Kontrollgeschwister (Abb. 13). So wiesen die MSG-behandelten Tiere schon am Tag drei ein um 4 % und signifikant niedrigeres Körpergewicht gegenüber den Kontrolltieren auf. Diese Entwicklung verstärkte sich innerhalb des Behandlungszeitraumes bis am Tag zehn schließlich die MSG-behandelten Tiere ein signifikant niedrigeres Körpergewicht von $18,1 \pm 0,3$ g gegenüber den Kontrollgeschwistern mit $21,1 \pm 0,3$ g ($p < 0,001$) aufwiesen. Da das Körpergewicht in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Gewicht vom Vortag steht, wurden ipsative Werte gebildet und diese mittels einer zweifaktorielle Varianzanalyse ausgewertet (s. Kap. 2.6.2.2.) (Abb.14).

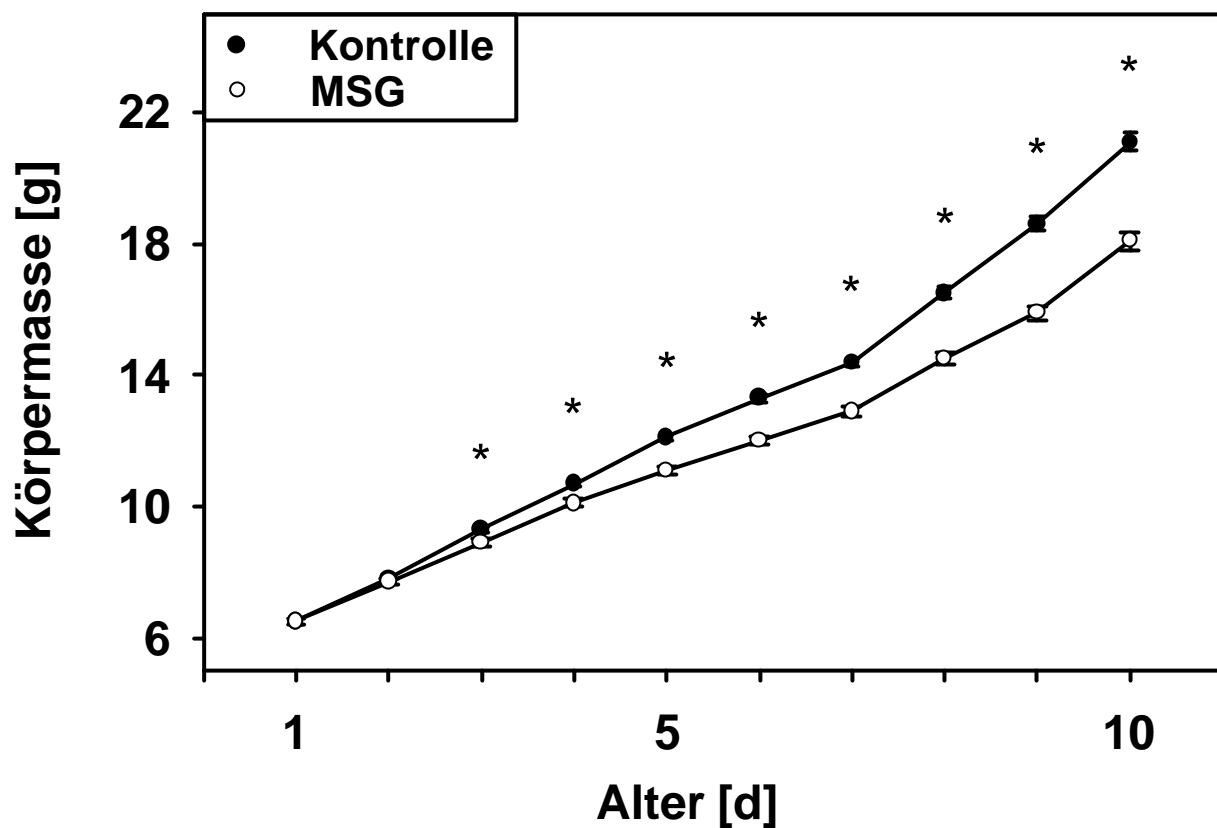


Abb. 13: Einfluß einer MSG-Behandlung auf die Körpergewichtsentwicklung von natürlich aufgezogenen Rattenwelpen.

Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit wiederholten Messungen an Objekten ermittelte Zunahme der Körpermasse mit MSG-behandelter (weiße Symbole) gegenüber ihren mit NaCl behandelten Kontrollgeschwistern (schwarze Symbole). $d_3 < 0,05$, $d_4 p < 0,01$, $d_5-d_{10} p < 0,001$.

3.2.1.1.2. Wirkungen der MSG-Behandlung auf den Wassergehalt, den Körperfettgehalt und die FFDM

In Übereinstimmung mit der Auswertung der Körperzusammensetzung für das erste Adipositas-Modell wurde auch bei diesen Tieren zunächst der Körperfettgehalt zu der Feuchtmasse in Beziehung gesetzt (nicht gezeigt). Erneut bestätigte sich die enge Beziehung beider Parameter ($r = 0,79$ für die behandelten Tiere und $r = 0,61$ für die Kontrolltiere). Ein Regressionsgeradenvergleich zeigte, daß die Regressionsgerade MSG-behandelter Tiere parallel zu niedrigeren Werten verschoben war ($p < 0,001$).

Eine genauere Analyse der Körperzusammensetzung zeigte detaillierter die Veränderungen auf, die durch eine Behandlung mit MSG hervorgerufen worden waren. Die mit MSG-behandelten Tiere von vier natürlich aufgezogenen Würfen (Serie V) hatten nicht nur eine

signifikant verminderte Körpermasse ($p < 0,001$), sondern auch die Feuchtmasse, der Wassergehalt, sowie Fettmenge und prozentualer Fettgehalt und die fettfreie Trockenmasse waren gegenüber ihren nur mit NaCl-behandelten Wurfgeschwistern signifikant erniedrigt ($p < 0,01$) (Abb. 14).

Die größten Veränderungen der Behandlung waren in der Körperfettmasse zu beobachten. Die MSG-behandelten Tiere wiesen mit $0,9 \pm 0,1$ g einen um 25 % signifikant niedrigere Körperfettmasse gegenüber den Kontrolltieren mit $1,2 \pm 0,1$ g auf ($p < 0,01$). Dies stand Veränderungen in der Feuchtmasse, im Wassergehalt, im relativen Fettgehalt und der FFDM um lediglich annähernd 15% gegenüber.

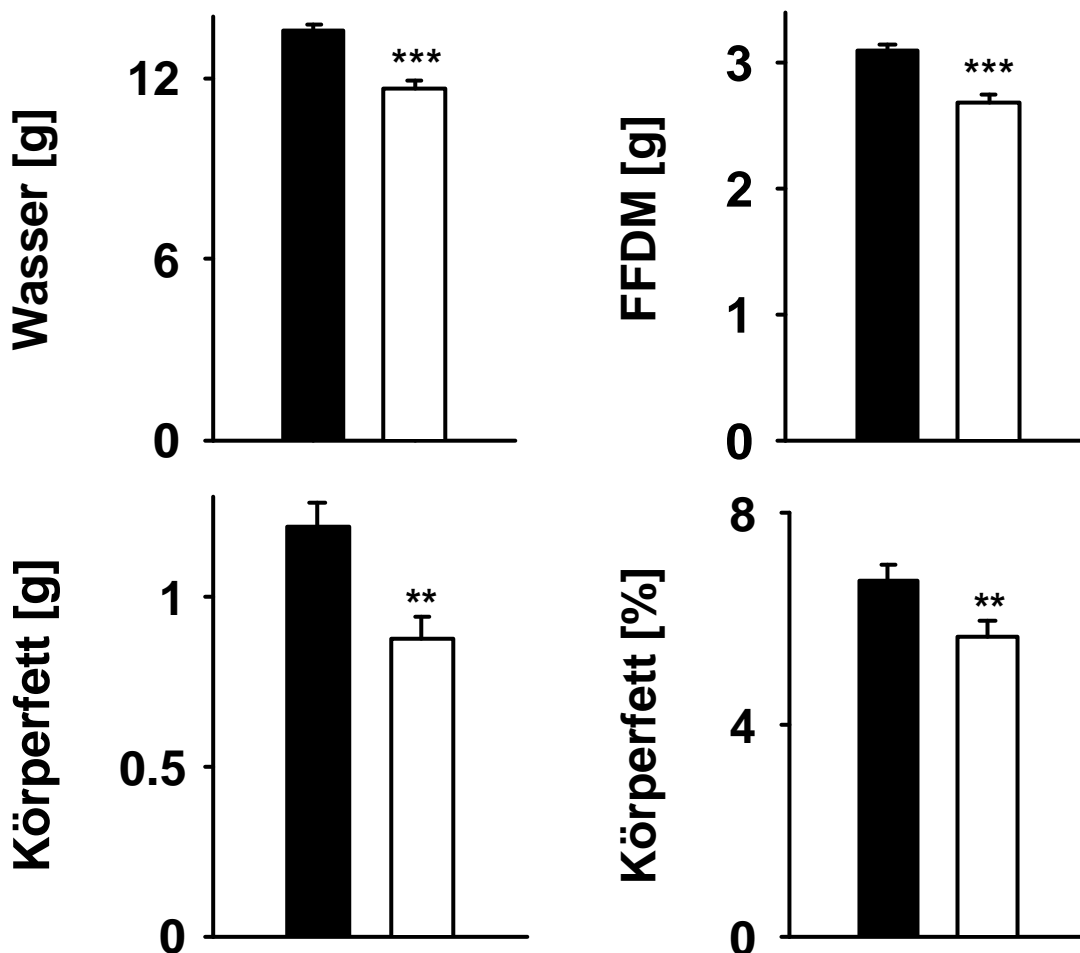


Abb 14: Einfluß einer MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung natürlich aufzogener Rattenwelpen.

Gesamtkörperwasser, fettfreie Trockenmasse (FFDM), Körperfettmasse und prozentualer Körperfettgehalt MSG behandelter (weiße Balken) Wildtyp-Zuckerrattenwelpen im Vergleich zu ihren mit NaCl-behandelten Wurfgeschwistern (schwarze Balken) im Alter von zehn Tagen post natum. Die Werte wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit den Faktoren Wurfaktor und Behandlung ermittelt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.2.1.2. Wirkungen einer MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung künstlich aufzogener Rattenwelpen

Natürlich aufgezogene Welpen sind im Wurfverband unter anderem Nahrungskonkurrenz und individuell wechselnden thermischen Bedingungen ausgesetzt. Um zu klären, ob eine MSG-Behandlung auch bei experimentellem Ausschluß einer gegebenenfalls verminderten Milchaufnahme und unter identischen thermischen Bedingungen den Gesamtkörperfettgehalt von Rattenwelpen im Säuglingsalter reduziert, wurde ein Wurf (Serie VI b) von Tag vier bis zum Tag zehn post natum unter moderater Kältebelastung, der die Tiere auch im Nest ausgesetzt sind, künstlich aufgezogen. Diesen Tieren wurde ebenfalls einmal täglich MSG in einer Konzentration von 3 mg/g Körpergewicht injiziert, Kontrolltiere erhielten Injektionen von NaCl.

Bei der Analyse der Körperzusammensetzung zeigte sich, daß auch bei künstlich aufgezogenen Tieren eine Behandlung mit MSG zu deutlichen Veränderungen in der Körperfettmasse führte. MSG-behandelte Rattenwelpen wiesen gegenüber ihren Kontrollgeschwistern eine signifikante Reduzierung der Fettmasse um 30 % auf ($0,30 \pm 0,05$ g MSG-Behandlung gegenüber $0,44 \pm 0,05$ g NaCl-Behandlung). Die darüber hinaus untersuchten Parameter der Körperzusammensetzung künstlich aufzogener, MSG-behandelter Tiere wiesen nur geringe statistisch nicht signifikante Veränderungen auf. So wurde die Feuchtmasse um 6 % von $11,7 \pm 0,3$ g bei den Kontrolltieren auf $11,0 \pm 0,3$ g bei den MSG-Tieren reduziert. Beim Gesamtkörperwasser waren mit $8,8 \pm 0,1$ g bei den MSG-behandelten gegenüber $9,3 \pm 0,2$ bei den Kontrolltieren lediglich um 5 % niedrigere Werte zu beobachten. Hinsichtlich der FFDM ließen sich keine Veränderungen durch die MSG-Behandlung feststellen ($2,0 \pm 0,03$ g MSG-behandelter Tiere gegenüber $2,0 \pm 0,03$ g Kontrolltiere).

Die Abb. 15 verdeutlicht die Unterschiede zwischen MSG behandelten und Kontrolltieren anhand der prozentualen Abweichungen des Gesamtkörperwassers, der Körperfett- und der fettfreien Trockenmasse der behandelten Tiere vom Mittelwert der Kontrollgeschwister. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Daten sind auch die natürlich aufgezogenen Würfe in diese Abbildung miteinbezogen worden. Diese Darstellung der Daten veranschaulicht, daß die MSG-Behandlung sowohl bei den künstlich als auch bei den natürlich aufgezogenen Welpen die größten Veränderungen in der Körperfettmasse hervorruft.

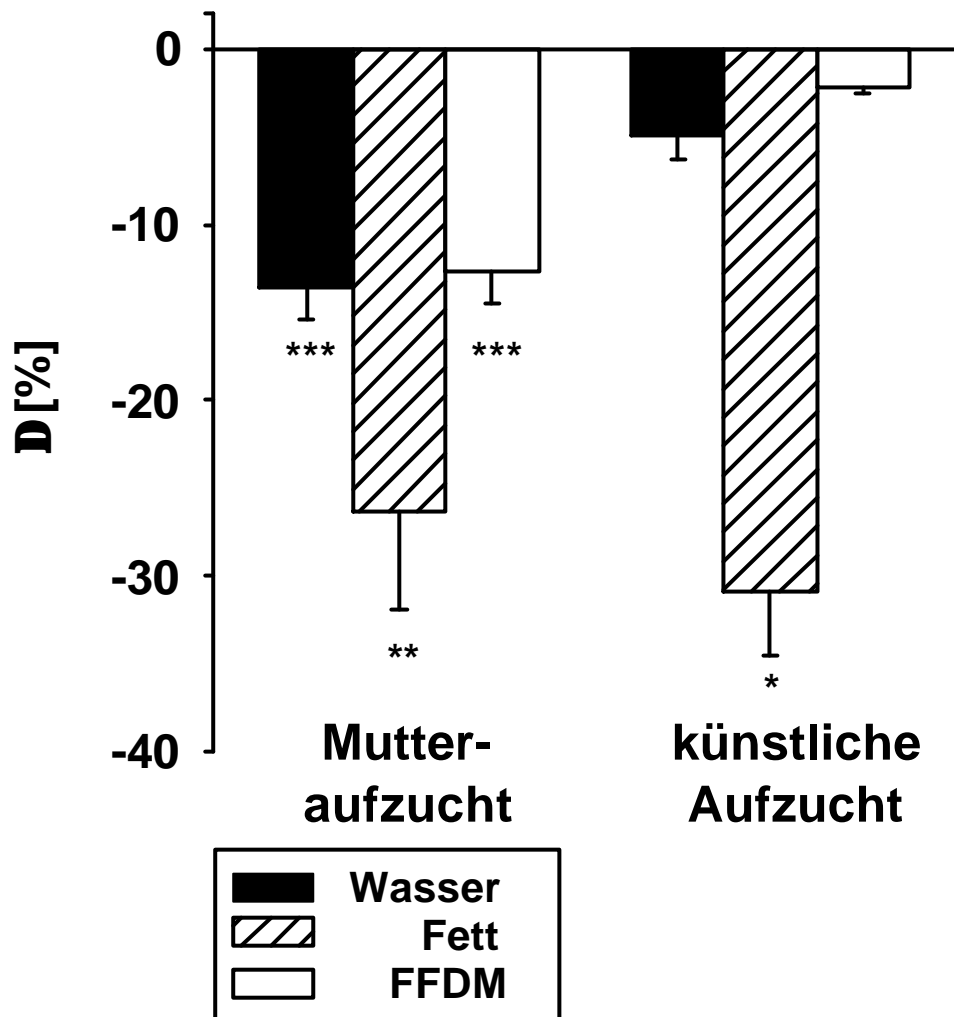


Abb. 15: Einfluß einer MSG-Behandlung auf die Körperzusammensetzung natürlich oder künstlich aufgezogener Zuckerratten.

Unterschiede (gewichtete Mittelwerte \pm SEM ermittelt mit Hilfe zweifaktorieller Varianzanalysen mit den Faktoren Wurffaktor und Behandlung) im Gesamtkörperwasser, Körperfettmasse und FFDM MSG-behandelter gegenüber ihren mit NaCl-behandelten Wurfgeschwistern. Dargestellt sind die prozentualen Abweichungen der behandelten Tiere vom Mittelwert der Kontrolltiere. * $p < 0,05$, ** $p > 0,01$.

3.2.1.3. Einfluß einer MSG-Behandlung auf den Metabolismus zehn Tage alter Zuckerratten

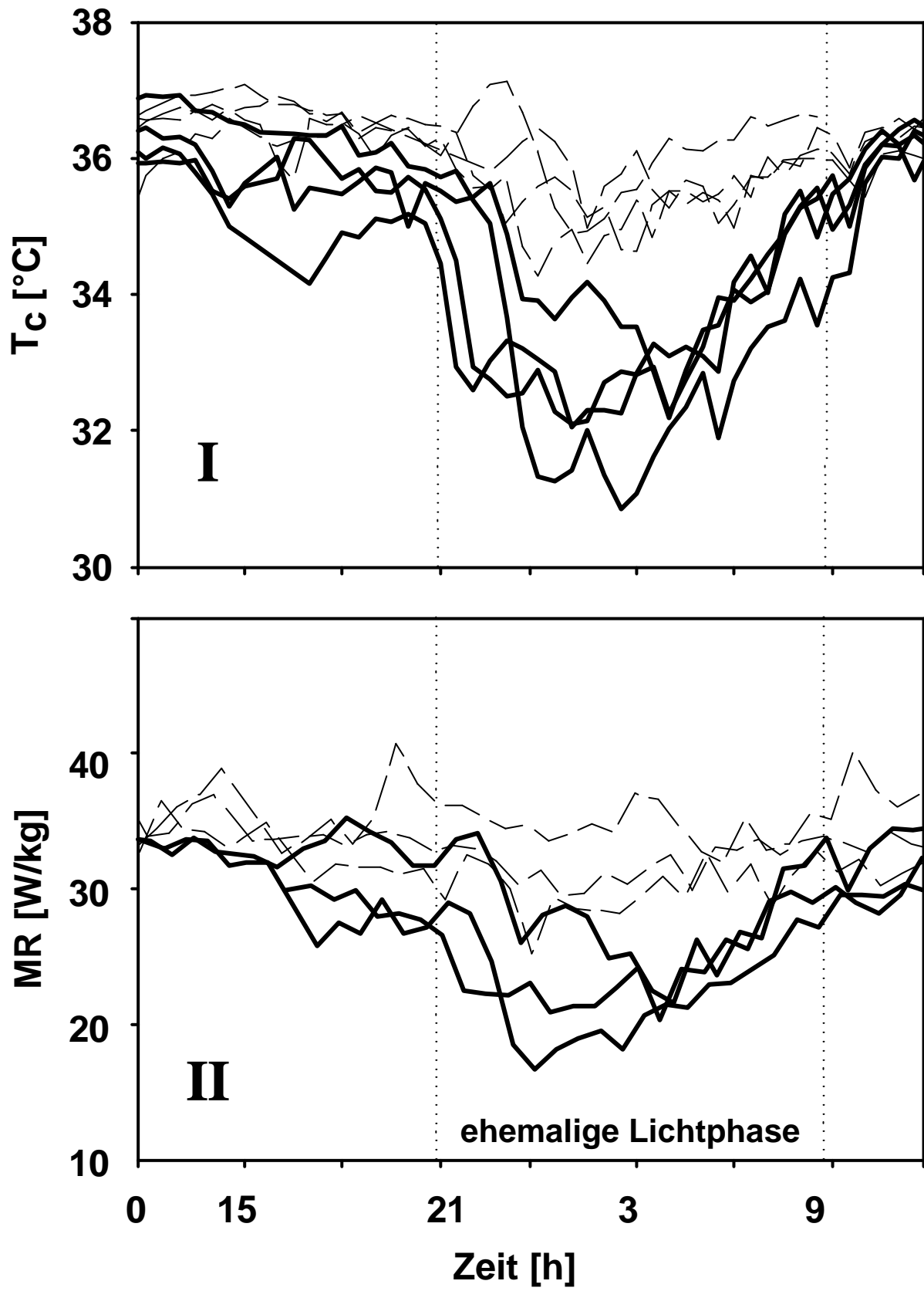
Wie die künstliche Aufzucht zeigte, traten die Veränderungen in der Körperfettmasse auch bei gleicher Nahrungszufuhr von MSG behandelten und Kontrolltieren auf. Die folgenden Untersuchungen beschäftigten sich deshalb mit der Frage, inwieweit durch eine MSG-Behandlung hervorgerufene Änderungen im Stoffwechsel zehn Tage alter Ratten diese Unterschiede in der Körperzusammensetzung erklären können.

Es wurden zwei Würfe (Serie VI a) von Tag zehn bis Tag dreizehn unter moderater Kältebelastung (28° C), das entspricht den Bedingungen wie sie die Tiere normalerweise auch im Nest erfahren, künstlich bei Dauerlicht aufgezogen und ihre metabolische Rate (MR) und Körperkerntemperatur (Tc) kontinuierlich aufgezeichnet. In Abbildung 16 sind diese beiden Parameter für einen Wurf und einen Tag beispielhaft dargestellt. Die Kontrolltiere zeigen bei einer Umgebungstemperatur von 28° C den typischen Tagesgang sowohl in ihrer Kerntemperatur als auch in ihrer metabolischen Rate. Die Körperkerntemperatur fiel zu Beginn der ehemaligen Lichtphase steil ab (Abb. 16). Dieses Absinken hielt über einen Zeitraum von 5 – 6 Stunden an. Danach war der Wiederanstieg der Kerntemperatur zu beobachten, der sich über ca. zwölf Stunden hinzog, wobei die Anstiegsgeschwindigkeit in den ersten Stunden etwas höher war als im folgenden Abschnitt. Eine annähernd stabile Tc wurde erst nach Beginn der ehemaligen Dunkelphase erreicht. Mit dem Tagesgang der Kerntemperatur übereinstimmend, sank der Sauerstoffverbrauch der Tiere zu Beginn der ehemaligen Lichtphase ab, es trat ein mehr oder weniger ausgeprägtes circadianes Minimum ein (Abb. 16, unten). Der folgende Wiederanstieg der MR zog sich über mehrere Stunden hin, bis zu Beginn der ehemaligen Dunkelphase die Plateauphase des circadianen Maximums erreicht wurde. Die statistische Auswertung der Daten der beiden künstlich über vier Tage aufgezogenen Würfe zeigte, daß sich im Behandlungszeitraum sowohl die circadianen Minima als auch die circadianen Maxima der Tc und der MR wie auch die Amplituden der beiden Rhythmen zwischen MSG- und NaCl-behandelten Rattenwelpen signifikant unterschieden. Wie aus der Abb. 16 ersichtlich wird, zeigten MSG-behandelte Tiere ein beinahe vollständiges Verschwinden der circadianen Absenkung sowohl der Tc als auch der MR zum Zeitpunkt des Tagesminimums. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren sowohl die Tc als auch die MR MSG-behandelter Welpen vor allem zur Zeit des circadianen Minimums gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Im circadianen Minimum erreichten die Kontrolltiere Körperkerntemperaturen von $32,2 \pm 0,30^\circ \text{C}$, die MSG-behandelten Tiere $34,5 \pm$

0,28° C ($p < 0,001$). Die Unterschiede waren während des circadianen Maximums mit einer durchschnittlichen Körperkerntemperatur der MSG-behandelten Tiere von $37,0 \pm 0,1$ °C gegenüber den Kontrolltieren mit $36,7 \pm 0,1$ °C geringer aber dennoch signifikant. Bei der Betrachtung der gewichteten Mittelwerte des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches von Tag zehn bis dreizehn erreichten die MSG-behandelten Tiere im circadianen Minimum $17,1 \pm 1,0$ W/kg, während die MR der Kontrollgeschwister um 6 W/kg niedriger bei $11,0 \pm 1,0$ W/kg lag ($p < 0,01$). Im circadianen Maximum war der Unterschied des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches mit $25,6 \pm 0,9$ W/kg bei den MSG-behandelten gegenüber $23,4 \pm 1,0$ W/kg bei den Kontrolltieren nicht signifikant verschieden. Die ungleiche Zunahme während des circadianen Maximums und der unterschiedliche Abfall während des circadianen Minimums führte zu einer Verringerung der Amplituden sowohl der Tc als auch der MR. Während der Tage zehn bis dreizehn post natum erreichten die durchschnittlichen Amplituden des circadianen Tagesrhythmus des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches Werte von $13,1 \pm 1,0$ W/kg für die Kontrolltiere, aber nur $8,3 \pm 0,07$ W/kg für die MSG-behandelten Tiere ($p < 0,03$). Die Amplituden der Körperkerntemperatur der Kontrolltiere von $4,5 \pm 0,29$ ° C waren nahezu doppelt so groß wie die der MSG behandelten Tiere von nur $2,6 \pm 0,22$ ° C ($p < 0,001$).

nächste Seite:

Abb. 16: Einfluß einer MSG-Behandlung auf die metabolische Rate und die Körperkerntemperatur künstlich aufgezogener Zuckerratten. Individuelle Tagesgänge der Körperkerntemperatur (Tc, I) und der metabolischen Rate (MR, II) eines Wurfs, der von Tag zehn bis dreizehn künstlich aufgezogen wurde am ersten Versuchstag. Die Tiere waren zuvor einmal täglich subcutan mit 3 mg/g KG MSG (gestrichelte, dünne Linien) oder mit physiologischer Kochsalzlösung (schwarze Linien) behandelt worden.



Auch bei der schon am Tag vier begonnen künstlichen Langzeitaufzucht (Serie VI b) führte die MSG-Behandlung zu einem Anstieg der Tc und der MR im circadianen Minimum. Bei der Betrachtung der gewichteten Mittelwerte der Körperkerntemperaturen waren auch hier mit $34,9 \pm 0,2$ °C bei den MSG-Tieren gegenüber $33,8 \pm 0,2$ °C bei den Kontrolltieren die größten Unterschiede im Minimum der Tiere zu beobachten ($p < 0,01$), während die Differenzen im Maximum der Tiere nicht signifikant war ($36,2 \pm 0,1$ °C MSG-Tiere vs. $36,1 \pm 0,1$ bei den Kontrolltieren). Bei der Betrachtung des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs von Tag vier bis Tag zehn erreichten die MSG-behandelten Tiere im circadianen Minimum im Mittel $13,6 \pm 0,3$ W/kg, während die MR der Kontrollgeschwister bei $10,0 \pm 0,4$ W/kg lag ($p < 0,001$). Im Maximum der Tiere wiesen die MSG-Tiere mit $18,1 \pm 0,3$ W/kg gegenüber den Kontrolltieren mit $16,4 \pm 0,4$ W/kg eine geringere Differenz auf ($p < 0,05$). Die ungleiche Zunahme während der circadianen Maxima und Minima führte auch bei der längeren künstlichen Aufzucht zu einer Verringerung der Amplituden sowohl der Tc als auch der MR. Während der Tage vier bis zehn post natum erreichten die durchschnittlichen Amplituden des circadianen Tagesrhythmus des massenspezifischen Sauerstoffverbrauches Werte von $6,4 \pm 0,3$ W/kg für die Kontrolltiere, aber nur $4,6 \pm 0,3$ W/kg für die MSG-behandelten Tiere ($p < 0,01$). Die Unterschiede zwischen den Amplituden der beiden Gruppen war auch hinsichtlich der Körpertemperatur mit $2,3 \pm 0,2$ °C für die Kontrolltiere und nur $1,4 \pm 0,2$ °C für die MSG-behandelten Tiere stark ausgeprägt ($p < 0,05$).

3.2.1.4. Energiebilanz

Um zu klären, inwieweit die oben beschriebenen Änderungen der thermoregulatorischen Aktivität bzw. der MR bei MSG-behandelten Tieren die Unterschiede im Gesamtkörperfettgehalt erklären können, wurde in der Serie VI b der Gesamtsauerstoffverbrauch der Welpen der für den Zeitraum der Behandlung mit MSG bzw. physiologischer Kochsalzlösung bestimmt.

Da sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch das Gewicht der Tiere in unmittelbarer Beziehung zu dem jeweiligen Behandlungstag stehen, wurden die Mittelwerte mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit wiederholten Messungen an Objekten berechnet. Es ergab sich daraus für die mit MSG behandelten Tiere ein um 8 % höherer Gesamtenergieumsatz als für die Kontrolltiere. Auf Grund der geringen Anzahl untersuchter Tiere ($N = 7$) lag dieser Unterschied knapp über dem Signifikanzniveau ($p = 0,058$). Mit

einem Vorzeichentest wurden daraufhin die Sauerstoffverbrauchswerte jeden einzelnen Tages der MSG-behandelten und der Kontrolltiere miteinander verglichen. Es ergab sich eine überzufällige Häufigkeit positiver Werte für die MSG-behandelten Tiere mit einer Signifikanz von $p = 0,02$ für 23 verglichene Werte.

Während die Unterschiede im Energiegehalt der FFDM zwischen MSG-behandelten und Kontrolltieren sehr gering waren und daher vernachlässigt werden konnten, betrug die Differenz im Energiegehalt der Fettmasse 5,3 kJ. Diese war dem Unterschied im Gesamtenergieumsatz zwischen beiden Gruppen mit 7,4 kJ vergleichbar, so daß sich die Veränderungen in der Körperzusammensetzung durch den gesteigerten Gesamtenergieumsatz der MSG-behandelten Tiere erklären lassen können.

3.2.1.5. Auswirkungen einer MSG Behandlung auf die Plasmaleptinspiegel zehn Tage alter Zuckerratten

Bei der Betrachtung der Plasmaleptinwerte ergab sich bei den natürlich aufgezogenen Tieren kein Unterschied zwischen den MSG-behandelten Tieren mit $4,3 \pm 0,4$ ng/ml und ihren Kontrollgeschwistern, deren gewichtete Mittelwerte bei $4,6 \pm 0,4$ ng/ml lagen. Bei den Tieren, die eine Woche künstlich aufgezogen worden waren, ergaben sich ebenfalls bei den absoluten Plasmaleptinspiegeln mit $2,1 \pm 0,2$ ng/ml bei den MSG-behandelten Tieren gegenüber $1,9 \pm 0,7$ ng/ml bei den Kontrolltieren keine signifikante Unterschiede, sondern lediglich eine tendenzielle Erhöhung der Plasmaleptinspiegel der MSG-behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten.

3.3. Histologische Ergebnisse

In Ergänzung der Stoffwechselanalysen unter dem Einfluß von Leptin und Monosodiumglutamat wurden orientierende histologische Studien am Hypothalamus durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es, topografische Zusammenhänge zwischen dem vermuteten Ort der primären zentralen Leptinwirkung, dem ARC, und anderen an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligten Strukturen zu erkennen, sowie die Beziehung zwischen dem Ort der Monosodiumglutamat-Wirkung und dem Nucleus arcuatus als primärer Zielstruktur des Leptins aufzuklären.

3.3.1. Immunhistochemische Befunde zur Transmission des Leptinsignals

Um die physiologischen Befunde besser interpretieren zu können, wurde untersucht, welche hypothalamischen Kerne bei der zehn Tage alten Ratte durch exogene Gabe von Leptin aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde das Protoonkogen Fos als Marker neuronaler Aktivität immunhistochemisch an coronalen Gehirnschnitten nachgewiesen. Dabei erfolgte eine Untersuchung hypothalamischer Strukturen, die eine zentrale Funktion als sensorische bzw. integrative Einheiten im Rahmen der Regulation des Energiehaushaltes haben. Außerhalb der BHS war der ARC als wichtigstes sensorisches und integratives Zentrum der Energiehomöostase Gegenstand der Fos-Experimente. Innerhalb der BHS kam neben dem PVN als Integrationszentrum für die Signalverarbeitung des Energiehaushaltes auch dem lateralen Hypothalamus und dem VMH die größte Bedeutung zu.

Da NPY-erge Zellen des ARC Projektionen zu parvozellulären Anteilen des PVN ausbilden, die wiederum zu sympathisch präganglionären Neuronen projizieren, die die sympathische Innervierung des BAT darstellen und für die Modulierung der thermoregulatorischen Thermogenese von Bedeutung sind, wurde immunhistochemisch untersucht, ob die NPY-ergen Konnektivitäten zwischen für die Energiehomöostase wichtigen Kerngebieten schon am Tag zehn bei der juvenilen Ratte ausgebildet sind.

3.3.1.1. Leptin-induzierte Expression des Transkriptionsfaktors Fos in hypothalamischen Kerngebieten der zehn Tage alten Zuckerratte

Die immunzytochemischen Untersuchungen zum Nachweis Leptin-induzierter Fos-Expression wurden 90 und 120 Minuten nach einmaliger s.c. Injektion von rekombinantem, murinem Leptin in einer Konzentration von 5,4 µg/kg KG an den Tieren der Versuchsserie VIII durchgeführt. Kontrolltieren wurde PBS injiziert.

Querschnitte des caudalen (Abb. 17 A) und medialen Hypothalamus (Abb. 17 C) zeigten vereinzelte Fos-immunreaktive Zellkerne im ARC und VMH (Abb. 17 A). Weiter lateral konnte im Hypothalamus im Bereich der sogenannten lateralen hypothalamischen Region (LHA) eine große Anzahl an gefärbten Zellkernen nachgewiesen werden. Bei PBS-behandelten Tieren konnten in diesen Kerngebieten keine Fos-positiven Zellkerne nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Eine konzentrierte Anzahl gefärbter Zellkerne konnte des weiteren sowohl in den magno- (Abb. 17 C) als auch in den parvozellulären Unterkernen des PVN Leptin-behandelter Tiere (Abb. 17 C), nicht aber in den Kontrolltieren detektiert werden (Abb. 17 B).

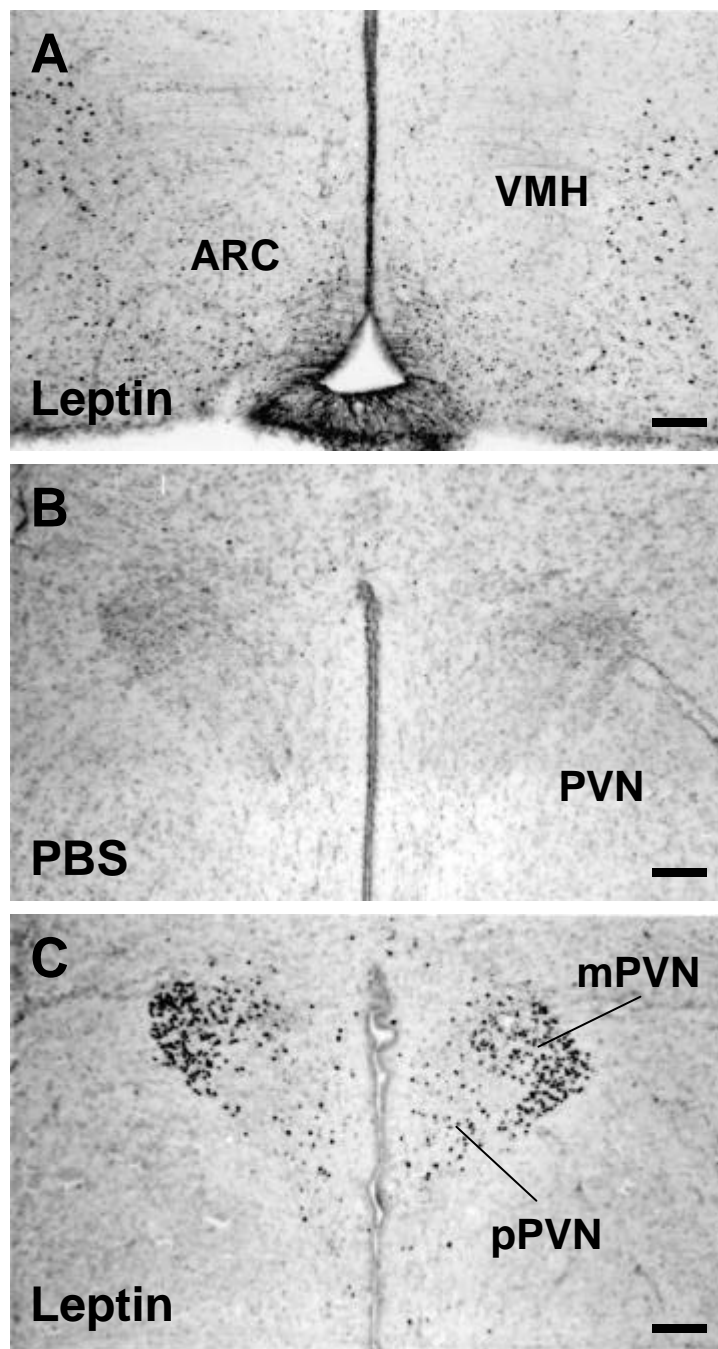


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von Leptin-induziertem Fos-Protein im Hypothalamus zehn Tage alter Zuckerratten.

Immunhistochemischer Nachweis von Fos in coronalen Schnitten des Hypothalamus zehn Tage alter Zuckerratten im Bereich des ARC (A) und des PVN (C), 90 Minuten nach einer subcutanen Injektion von 5,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Leptin. Bild B zeigt den PVN eines Kontrolltieres. Die Leptin-Behandlung führte zu einer Induktion einzelner immunreaktiver Zellkerne im ARC und VMH (A) und zu einer großen Anzahl gefärbter Zellen im PVN (C), sowohl in seinen magno- (mPVN) als auch parvozellulären Unterkernen, und in der lateralen hypothalamischen Region (LHA) (A) im Gegensatz zum Kontrolltier (B).

Die Balken entsprechen einer Länge von 100 μm .

3.3.1.2. Nachweis NPY-erger Projektionen des ARC zum PVN

Der immunhistochemische Nachweis NPY-erger Fasern wurde an unbehandelten Tieren der Serie IX durchgeführt. Querschnitte des medialen Hypothalamus zeigen NPY-positive Fasern, die vom ARC zum PVN ziehen. Somit ist diese für die Energiehomöostase wichtige Konnektivität bereits zehn Tage nach der Geburt deutlich entwickelt.

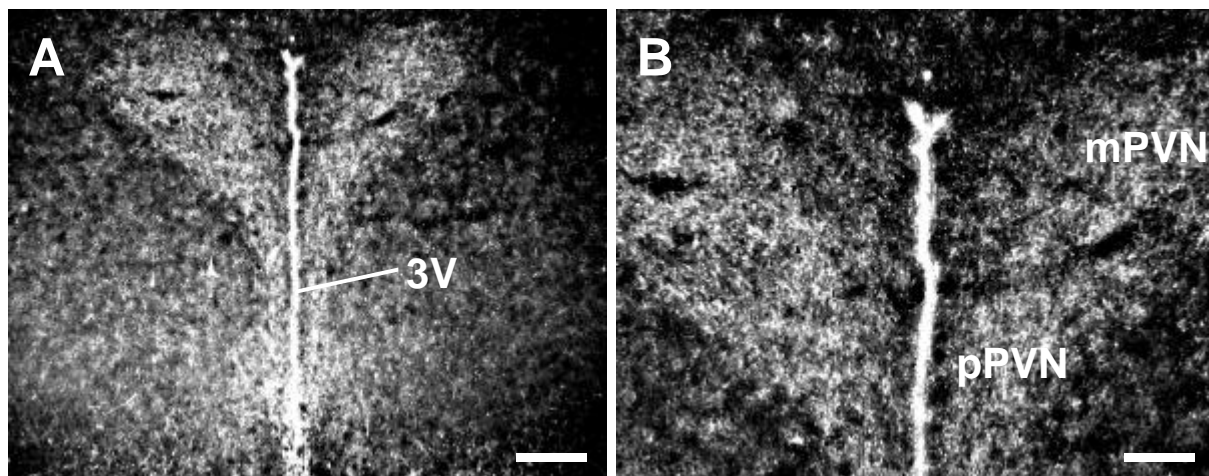


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis NPY-erger Fasern im Hypothalamus zehn Tage alter Zuckerratten.

Dunkelfeldaufnahmen coronaler Schnitte des Hypothalamus zehn Tage alter Zuckerratten im Bereich des PVN. Hell zeichnen sich die NPY-positiven Fasern ab, die vom ARC zum PVN ziehen. Die Balken entsprechen einer Länge von 200 μ m (A) bzw. 100 μ m (B).

3.3.2. Nachweis von MSG-induzierten Läsionen mit Kresylviolett-Färbung

Um die Auswirkungen der MSG-Behandlung auf die für die Energiehomöostase wichtigen hypothalamischen Kerngebiete, insbesondere des ARC, zu untersuchen, welche dann auch im Zusammenhang mit den physiologischen Befunden stehen könnten, wurden kresylviolett-gefärbte, coronale Gehirnschnitte mikroskopisch untersucht.

Die lichtmikroskopische Untersuchung kresylviolett-gefärbter Schnitte erfolgte über die gesamte rostro-kaudale Ausdehnung des Kerns in den Ebenen 28 – 32 (Paxinos und Watson 1998) in Anlehnung an das Adulttier. Die Untersuchung der Präparate zeigte eine vorangeschrittene Koagulationsnekrose der Neurone des ARC. Am augenfälligsten war die schon bei geringer Vergrößerung feststellbare, sehr starke Reduzierung der Anzahl an Neuronen in diesem Kerngebiet bei MSG-behandelten im Vergleich zu den Kontrolltieren

(Abb. 19 A-B). Noch deutlicher wurde der massive neuronale Zellverlust bei der Betrachtung des ARC mit einer größeren Vergrößerung (Abb. 19 C-D, E-F). Andere für die Energiehomöostase wichtigen Kerngebiete wie der VMH, der DMH und der laterale Hypothalamus, wiesen keine Läsionen auf. Eine quantitative Auswertung durch Zählung der Zellen des ARC erfolgte aufgrund der großen Ausdehnung dieses Kerngebietes von rostral nach caudal an definierten, vorher festgelegten Strukturen, die für jedes Tier auf derselben coronalen Ebene ausgewertet wurden. Im rostralen ARC (I. coronale Ebene) ergab die statistische Analyse der ausgezählten Zellen eine 50%-ige Reduzierung der Neurone mit 151 ± 15 Zellen bei MSG-behandelter Rattenwelpen gegenüber 318 ± 11 Zellen bei den Kontrollwelpen ($p < 0,001$). Die größte Abnahme an Neuronen im ARC um beinahe 60 % konnte im medialen Anteil (II. coronale Ebene) von 317 ± 12 Zellen (Kontrolle) auf 125 ± 8 (MSG) Zellen festgestellt werden ($p < 0,001$). Dieser starke Zellverlust und die damit verbundene Bildung glialen Narbengewebes führte zu einer Retraktion des Gewebes und dadurch bedingt zu einer Verlagerung des eng benachbarten Kerngebietes VMH weiter ventral, näher an den III. Ventrikel heran (Abb. 19). Auf Höhe der III. untersuchten Ebene kam es zu einer Reduzierung der Neurone um 40 % von 322 ± 11 Zellen (Kontrolle) auf 161 ± 20 Zellen (MSG) ($p < 0,001$). Im caudalen Anteil (IV. Ebene) des ARC wiesen die Tiere eine nicht mehr signifikante Reduzierung der Neurone um nur 20 % von 412 ± 22 Zellen bei den Kontrolltieren auf 323 ± 40 Zellen bei den MSG-Tieren auf.

Neben der offensichtlichen Zerstörung hypothalamischer Neurone im ARC führte die MSG-Behandlung bei der juvenilen Ratte zu einer Erweiterung des III. Ventrikels und einer Verschmälerung der Eminentia mediana.

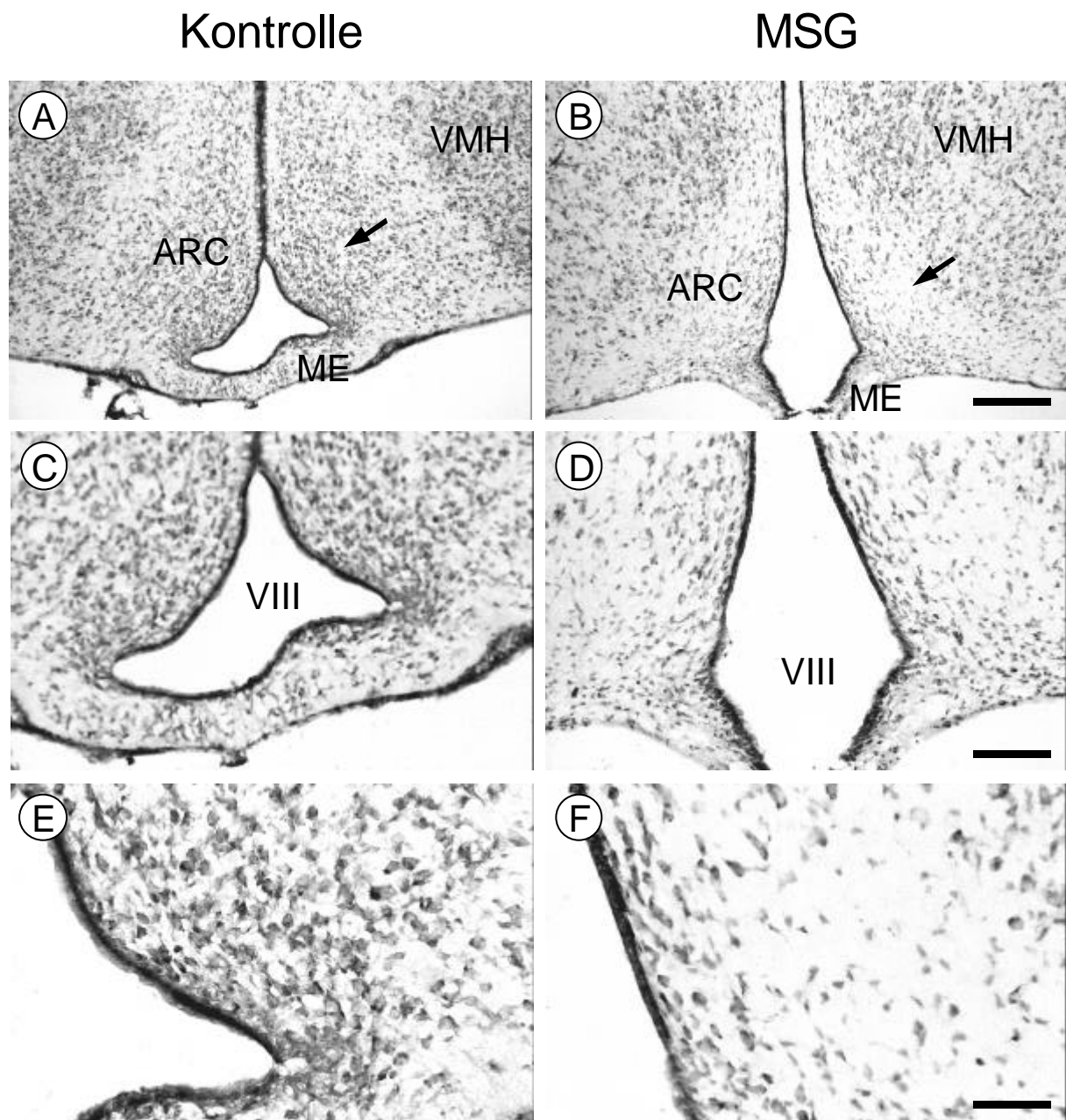


Abb. 19: Läsionierung des Nucleus arcuatus (ARC) durch Monosodiumglutamat.

Kresylviolettgefärbte koronale Schnitte des caudalen Hypothalamus mit MSG oder mit isotoner Kochsalzlösung behandelter Tiere. Die MSG-Behandlung führte zu einem massiven Verlust an Neuronen im ARC (Pfeil), zu einer ventralen Dislokation des VMH, Verschmälerung der Eminentia mediana (ME) und zu einer Vergrößerung des dritten Ventrikels (VIII).

Die Balken entsprechen einer Länge von 200 μ m (A,B), 100 μ m (C,D) bzw. 50 μ m (E,F).

4. DISKUSSION

4.1. Die Säugephase – kritische Entwicklungsperiode für Rattenwelpen

Hormone und Neurotransmitter kodeterminieren, in Interaktion mit der genetischen Matrix, während kritischer Entwicklungsphasen des Organismus konzentrationsabhängig die Differenzierung und Reifung ihrer eigenen zentralen Regler (Dörner 1978). Sie können daher in sehr hohen Konzentrationen auch als endogene, funktionelle Teratogene zur lebenslangen Fehlorganisation und Fehlprogrammierung ihrer eigenen neuroendokrinen Regulationssysteme führen, was wiederum mit permanenten Fehlfunktionen der zu regelnden Lebensprozesse einhergehen kann. Eine solche hormonabhängige „funktionelle Teratogenese“ kann durch Alterationen der fetalen (intrauterinen) und/oder frühpostnatalen Umweltbedingungen induziert werden, da Hormone als endogene Effektoren Mediatorfunktionen zwischen der Umwelt und dem genetischen Material wahrnehmen (Dörner 1978). Neben diesen endogenen Teratogenen können insbesondere auch chemische Noxen, wie zum Beispiel Monosodiumglutamat, in kritischen Entwicklungsperioden ebenfalls zu Zerstörung zentraler Regler und damit zu lebenslang anhaltenden Fehlfunktionen endokriner Regulationsprozesse führen. Das Konzept der kritischen Entwicklungsphase wurde auch für die Körpergewichts- bzw. Adipositasentwicklung aufgegriffen (Ravelli et al. 1976; Dietz 1994), wonach ebenfalls die intrauterine sowie die peri- und frühpostnatale Periode als kritische Phasen für die Prägung einer anhaltend erhöhten Adipositasdisposition definiert wurden. Da Rattenwelpen in einem ausgesprochen unreifen Zustand geboren werden, so sind sie bei der Geburt taub (bis zum Tag 12 oder 13) (Nehlig 1999) und blind (bis zum Tag 15) (Rose und Ellingson 1970), stellt die Säugephase für die juvenilen Tiere eine kritische Periode dar, in der sie in ganz besonderem Maße sensibel für Veränderungen der Umweltbedingungen oder Noxen sind (Scott 1962; Colombo 1982). Im ersten Teil der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, daß eine Beeinflussung juveniler Ratten während der Säugephase, wobei die Veränderung der Umweltbedingung in der Bildung unterschiedlicher großer Würfe bestand, zu einer starken Gewichtszunahme und besonders einer stark erhöhten Fettdeposition der Rattenwelpen führte. Mit Monosodiumglutamat behandelte Tiere zeigten dagegen ein vermindertes Wachstum und eine kleinere Körperfettmasse. Unabhängig von der Art der Noxe kann Zu- oder Abnahme der Körpermasse entweder

1. durch Änderungen im Energieverbrauch und/oder
2. durch eine Änderung in der Energieaufnahme gegenüber den Kontrolltieren zustande kommen.

Die Unterscheidung zwischen diesen Möglichkeiten hilft, die potentiellen Mechanismen der Veränderung des Körperenergiegehaltes in beiden Adipositas-Modellen zu verstehen.

4.2. Adipositas-Modell I: Postnatale Überernährung

Die ersten Untersuchungen, die die Beziehungen zwischen Körperwachstum und Nestgröße untersuchten, gehen auf Parkes zurück (Parkes 1926). Er zeigte, daß das Absetzgewicht von Mäusen negativ mit der Nestgröße korreliert, d.h. mit steigender Anzahl der Welpen sinkt deren Absetzgewicht. Auf dieser Untersuchung basierend wurde die Aufzucht im kleinen Nest von vielen Autoren als ein Modell der postnatalen Überernährung zum Studium der Pathomechanismen der Adipositas gewählt (Aubert et al. 1980; Fiorotto et al. 1991; Voits et al. 1996; Heidel et al. 1999; Plagemann et al. 1999 a, b). Während die bei den Rattenwelpen in dieser Studie gefundenen Zunahmen der gesamten Körpermasse zum Zeitpunkt des Absetzens der Welpen (d 21) mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmen (Parkes 1926; Voits et al. 1996; Heidel et al. 1999; Plagemann et al. 1992; Plagemann et al. 1999 a, b; Davidowa und Plagemann 2000), zeigt die vorliegende Studie speziell, daß besonders der Körperfettgehalt der Rattenwelpen zunimmt. Die gleiche Beobachtung machten Fiorotto et al. (1991) allerdings zu einem früheren Entwicklungs-Zeitpunkt (d 15). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß eine postnatale Überernährung zumindest bei männlichen adulten Ratten auch zu einer Vermehrung der Anzahl an Adipozyten geführt hat (Basset et al. 1988), bei adulten Mäusen beiderlei Geschlechts konnte auch eine Hypertrophie der Fettzelle selbst nachgewiesen werden (Aubert et al. 1980). Die folgenden Überlegungen sollen helfen zu klären, ob diese exzessive Energiedisposition durch Änderungen im Energieverbrauch und/oder eine vermehrte Energieaufnahme verursacht werden.

4.2.1. Körpergewichtszunahme durch Änderungen in der thermoregulatorischen Aktivität

Eine Aufzucht im kleinen Nest verändert nicht nur die Verfügbarkeit von Futter sondern führt auch zu einer Änderung der thermischen Bedingungen, denen die Welpen während der

Säugeperiode im Nest ausgesetzt sind (Schmidt 2001). Die Interaktionen zwischen der Mutter und den Welpen und zwischen der Welpen selbst, bestimmen die thermischen Bedingungen, denen die säugenden Jungtiere ausgesetzt sind. Sie fluktuieren zwischen Thermoneutralität und Kältebelastung.

Prinzipiell sind Ratten-Welpen von ihrem ersten Lebenstag an zur Kälteabwehr befähigt. Zunächst dominieren thermoregulatorisches Verhalten (huddling) und zitterfreie Thermogenese (NST) (Nicholls und Locke 1984; Cannon und Needergaard 1985). Auch Verhaltensweisen wie das Aufsuchen von Wärmequellen (Johanson 1979) treten direkt post natum auf. Andere physiologische Mechanismen der Kälteabwehr wie Kältezittern, Vasokonstriktion und Piloerektion entwickeln sich erst ab der 2. – 3. Lebenswoche (Fowler und Kellog 1975; Conklin und Heggeness 1971). Zuvor hat der Rattenwelp eine geringere Kontrolle über den Wärmeverlust, was ihn anfällig gegenüber Hypothermie während der Säugephase macht (Conklin und Heggeness 1971). Die teilweise vertretene Auffassung, daß neugeborene Ratten aufgrund ihrer geringen Körpergröße und neurologischen Unreife noch nicht zur selbständigen Kontrolle ihrer Kerntemperatur fähig wären, wurde erstmals von Taylor (1960) widerlegt. Er konnte nachweisen, daß isolierte Ratten im Säuglingsalter häufig durch die Wahl zu niedriger Umgebungstemperaturen thermoregulatorisch überfordert wurden, während sie auf eine moderate Kältebelastung durchaus mit einer regulatorischen Steigerung der Stoffwechselrate reagieren können. Darüber hinaus treten bei jungen Ratten im Wurfverband ausgeprägte verhaltensthermoregulatorische Reaktionen auf („Huddling“) (Alberts 1978). Am Rande des Nests liegende, kühlere Jungtiere streben mit großer Aktivität ins Zentrum und verdrängen so die innenliegenden, wärmeren und passiveren Wurfgeschwister. Auf diese Weise werden die thermoregulatorischen Anforderungen im Wurfverband ausgeglichen und mit geringerer individueller autonomer Wärmeproduktion eine wesentlich größere Stabilität der Kerntemperatur erreicht als bei isoliert gehaltenen Jungtieren. Der Betrag an Energie, der für die Kälteabwehr notwendig ist, ist sehr viel geringer, als von einem einzelnen Welpen aufgewendet werden müßte (Alberts 1978). Wenn die Mutter nach den ersten beiden Lebenstagen für zunehmend längere Zeiten, insbesondere in der Dunkelphase, das Nest verläßt, trägt dieses Zusammendrängen („Huddling“) der Jungtiere im isolierenden Nest dazu bei, den Wärmeverlust soweit zu reduzieren, daß die begrenzten Fähigkeiten zur autonomen Thermoregulation effizient eingesetzt werden (Schmidt et al. 1987). Obwohl das „Huddling“ der Welpen sogar in kleinen Gruppen die Notwendigkeit einer autonomen Kälteabwehr signifikant herabsetzt (Alberts 1978), führt eine Aufzucht im kleinen Nest dazu, daß die Tiere in den ersten Tagen während der Abwesenheit

des Muttertieres vom Nest sehr viel mehr Wärme gegenüber Tieren aus einem normalen Nest verlieren sollten, da durch eine herabgesetzte Anzahl an Welpen die Effektivität der Kälteabwehr der Tiere herabgesetzt ist. Kompensiert werden könnte dies durch die vermehrte Zeit, die das Muttertier auf dem Nest verbringt, da diese mit abnehmender Nestgröße ansteigt (Leon et al. 1978; Grotta 1973). Dies führt nicht nur zu einer höheren Milchverfügbarkeit für die Welpen, sondern verringert gleichzeitig ihre thermoregulatorische Belastung. Dies spielt besonders in den ersten Tagen post natum eine Rolle, in denen die Tiere auf Grund ihres schlechten Oberfläche-Volumen-Verhältnisses und der fehlenden Behaarung anfälliger gegenüber Schwankungen der Umgebungstemperatur sind (Schmidt 2000). Die Aufzucht im kleinen Nest führt zu einem schnelleren Körperwachstum der Tiere als bei einer Aufzucht im normalen Nest, wodurch sie bald zu einer erhöhten metabolischen Wärmeproduktion befähigt werden und einen herabgesetzten Wärmeverlust auf Grund eines besseren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses erfahren. Die thermische Stabilität der Jungtiere, die durch ein kleiner werdendes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, eine verbesserte Isolation und die Entwicklung einer größeren metabolischen Kapazität charakterisiert ist, wird also gegenüber Tieren aus normalen Nestern früher erreicht (Schmidt et al. 1987). Dies könnte erklären, weshalb zwei Wochen alte Welpen, die in kleinen Nestern aufgezogen wurden, eine herabgesetzte „Huddling“-Aktivität gegenüber Welpen aus normalen Nestern zeigen (Schmidt unveröffentlichte Ergebnisse), was als typisches Zeichen für herabgesetzte verhaltens-thermoregulatorische Bedürfnisse gilt (Schmidt et al. 1984).

Mittels schwerem Wasser wurden Messungen an 4 bis 16 Tage alten Rattenwelpen (Sprague–Dawley Ratten) durchgeführt, um unterschiedliche Milchaufnahmen bei Welpen aus kleinen oder normalen Nestern zu detektieren, mit deren Hilfe der tägliche Energiezuwachs zur Energieaufnahme in Beziehung gesetzt werden konnte (Fiorotto et al. 1991). Die daraus ermittelte notwendige Nahrungsenergieaufnahme, die für das Überleben der Tiere notwendig ist, aber nicht den Aufbau von Energiereserven erlaubt, scheint sich bei postnatal überernährten Tieren gegenüber Tieren aus Nestern normaler Größe während der Säugeperiode nicht zu ändern (Fiorotto et al. 1991). Daraus ergibt sich, daß die Unterschiede im Energieverbrauch für die autonome und verhaltensbedingte Thermoregulation und andere Aktivitäten sich wahrscheinlich gegenseitig aufrechnen und beide Aufzuchten den gleichen Energieverbrauch verursachen.

4.2.2. Fettsakkumulation durch vermehrte Energieaufnahme

Fiorotto et al. konnten zeigen, daß die gesamte Energiespeicherung von Rattenwelpen aus kleinen Nestern auf eine erhöhte Energieaufnahme zurückzuführen war (Fiorotto et al. 1991). Auch entsprechende Untersuchungen von Aubert et al. (1980) an Mäusen zeigten, daß eine Aufzucht in kleinen Nestern eine erhöhte Milch- und damit Energieaufnahme während der Säugeperiode bewirkte, was zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichtes und des Körperfettgehaltes führte. Die Möglichkeit zu einer erhöhten Milchaufnahme der Welpen hängt stark von der Laktationsleistung des Muttertiers ab. Die Milchproduktion wird über einen längeren Zeitraum durch die Anzahl an gesäugten Welpen bestimmt (Blaxter 1961). Entscheidend für die Laktation des Muttertieres ist bei Ratten allerdings die Größe eines Wurfes am ersten Tag post natum (Edwardson und Eayrs 1967). In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurde die Zahl der Tiere für die kleinen Nester erst am dritten Tag post natum auf vier Tiere reduziert. Da die Gesamtzahl der Zitzen, an denen gesäugt wird, und zusätzlich die Menge der sensorischen Information, die das Muttertier erhält, von entscheidender Bedeutung für die Laktationsmenge sind (Edwardson und Eayrs 1967), wird zu Beginn der Laktationsphase die Milchbildung stark stimuliert. Mit der Reduzierung der Anzahl der Welpen am Tag drei post natum bedeutete dies ein Überangebot an Milch, für die nun in Hypoparität vorliegenden Rattenwelpen. Zusätzlich steigt mit dem Betrag an Milch, den die Welpen konsumieren, die Milchbildung (Bateman 1957; Blaxter 1961). Edwardson und Eayrs (1967) zeigten, daß die Laktation mit der Anzahl der Zitzen, die stimuliert werden, zunimmt. Da Rattenwelpen nicht darauf fixiert sind, immer an derselben Zitze zu saugen, beginnt ab Tag zehn das Phänomen, daß die Tiere während des Nestaufenthaltes der Mutter, mehrmals an unterschiedlichen Zitzen saugen, was zu einer Maximierung der Milchmenge zu diesem Zeitpunkt führt (Cramer et al. 1980). Eine Studie hat gezeigt, daß zwei Rattenwelpen, die bei einem Muttertier saßen, bei dem alle bis auf zwei Zitzen denerviert waren, sich schlecht entwickelten (Edwardson und Eayrs 1967). Zwei Welpen allerdings, die Zugang zu allen funktionsfähigen Gesäugekomplexen einer Mutter hatten, entwickelten sich sehr gut. Diese Experimente zeigen, daß das Saugen an unterschiedlichen Zitzen ausreicht, um eine andauernde, ausreichende Milchproduktion des Muttertieres hervorzurufen (Lorenz 1992). Darüber hinaus erhöhen sogar zwei Rattenwelpen das Milchvolumen pro Welpen gegenüber einer größeren Anzahl an Welpen, weil sie mehr Zitzen stimulieren, als Rattenwelpen tatsächlich vorhanden sind (Lorenz 1992). Dies bedeutet, daß ein kleiner Wurf, wenn er auch nicht die maximal mögliche Laktationsmenge des Muttertieres zu stimulieren vermag

(Edwardson und Eayrs 1967), pro Welpen einen höheren Milchertrag erzielen kann, und jedes einzelne Tier dadurch mehr Energie in Form von Milch aufnimmt. Ein weiterer Faktor ist, daß die Zeit, die ein Muttertier bei seinen Welpen verbringt, steigt, wenn die Anzahl der Welpen im Wurf sinkt (Grotta 1973; Leon et al. 1978). Dies führt auf der einen Seite zu einer Änderung der thermoregulatorischen Bedingungen (s. unten) auf der anderen Seite könnte das bedeuten, daß die Jung-Tiere häufigere bzw. längere Säugeperioden zur Futteraufnahme zur Verfügung hatten, da das Muttertier sich häufiger im Nest aufhielt als dies bei einem normal großen Wurf der Fall gewesen wäre.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Vielzahl an Faktoren dazu führen, daß es bei Aufzucht im kleinen Nest zu einer postnatalen Überernährung kommt, die zu einer vergrößerten Körpermasse und besonders einer erhöhten Fettakkumulation führt. Wahrscheinlich ist, daß nicht ein Faktor isoliert die Veränderung der Nahrungsaufnahme hervorruft, sondern ein Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen zu den Veränderungen führt, da erfolgreiches Wachstum während der initialen Phase der Entwicklung von symbiostatischen Interaktionen zwischen Muttertier und Welpen abhängt (Lorenz 1992). Darüber hinaus bleibt ungeklärt, ob die höhere mütterliche Aufmerksamkeit und herabgesetzte Futterkonkurrenz innerhalb des Wurfverbandes zu einer Vielzahl von Änderungen hinsichtlich des Verhaltens, des hormonellen Status und des Streßlevels für die Tiere führt. Ferner könnte auch der leichtere Zugang zu den Zitzen bei nur vier Welpen eine Rolle für die Aufnahme größerer Mengen an Milch spielen.

4.2.3. Mögliche Mechanismen der Verstärkung eines Genotypeffekts

Wie die vorliegende Studie gezeigt hat, wird der bei Aufzucht im normalen Nest beobachtete, allerdings geringfügige, Unterschied im Körperfettgehalt zwischen Wildtyp-Zuckerratten und Trägern nur eines *fa*-Allels zum Zeitpunkt des Absetzens (Olbort 1998) durch Überernährung im kleinen Nest deutlich verstärkt. Diese Beeinflussung der in der Säugeperiode gegenüber exogenen Einflüssen besonders anfälligen Tiere ging so weit, daß im kleinen Nest aufgezogene heterozygote weibliche Tiere zum Zeitpunkt des Absetzens einen ähnlich hohen Körperfettgehalt aufwiesen wie ihn homozygote Merkmalsträger des Gendefekts (*fa/fa*) in einer normalen Aufzucht entwickeln. Durch den Gendefekt wird hauptsächlich die Entwicklung des Körperfettgehaltes gefördert. Dies gilt schon für die normale Aufzucht, wird aber besonders deutlich bei der postnatalen Überernährung. Eine statistische Bestätigung

erfährt dies dadurch, daß sich signifikante Interaktionen zwischen Genotyp und Nestgröße lediglich hinsichtlich des angestiegenen Körperfettgehaltes nachweisen ließen.

Die Ursache für eine vermehrte Fettakkumulation der heterozygoten Tiere sowohl im normalen als auch verstärkt im kleinen Nest könnte in einer bei den Heterozygoten generell gesteigerten Nahrungsaufnahme liegen. In der normalen Aufzuchtssituation allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, daß *+/fa*- und *fa/fa*-Tiere im Säuglingsalter unterschiedlich viel Milch aufnehmen (Boulangé et al. 1979; Godbole et al. 1981; Buchberger und Schmidt 1996). Eine veränderte Milchaufnahme unter den speziellen Bedingungen im kleinen Nest, die eine verringerte Nahrungskonkurrenz für die Welpen bedeutet, kann allerdings dadurch nicht ausgeschlossen werden. Da in der vorliegenden Studie die Körperzusammensetzung ausschließlich am Tag 21 post natum untersucht wurde, könnte auch eine vermehrte Aufnahme von Festfutter zu der beobachteten erhöhten Fettakkumulation heterozygoter gegenüber Wildtyp-Tieren geführt haben. Untersuchungen an *fa/fa*-Tieren zumindest zeigten, daß deren Adipositas unter anderem durch eine vermehrte Aufnahme von Pelletfutter während der Absetzphase gefördert wird (Stern und Johnson 1977).

Nach dem Absetzen haben neuere Untersuchungen an genotypisch identifizierten Rattenwelpen gezeigt, daß sich bei fettreicher Ernährung von der 7. bis zur 13. Lebenswoche Unterschiede zwischen heterozygoten (*+/fa*) und Wildtyp-Männchen (*+/+*) entwickelten, die bei normaler kohlenhydratreicher Ernährung nicht auftraten (Maher et al. 1996). Da die Rattenmilch ebenfalls einen hohen Fettanteil besitzt (Lipidanteil 69% des Gesamtenergiegehaltes) (Ferré et al. 1986), könnte man deshalb vermuten, daß die hohe Fettzufuhr mit der Muttermilch eine Grundlage für die Ausprägung des Heterozygoten-Unterschiedes in der Fettdeposition im Säuglingsalter ist. Inwieweit Änderungen in der Lipo-Protein-Lipase, die die Aufnahme zirkulierender Fettsäuren durch das extrahepatische Gewebe und besonders durch das Fettgewebe reguliert, daran beteiligt sind, können in der vorliegenden Studie nur vermutet werden, tatsächlich kommt es allerdings zu einer Steigerung der Aktivität dieses Enzyms bei der postnatal überernährten Ratte (Duff et al. 1982; Cryer und Jones 1980), wodurch zusätzlich die Kapazität, Fettsäuren aus dem Plasma aufzunehmen, bei diesen Tieren erhöht zu sein scheint (Cryer und Jones 1978), was alleine jedoch noch nicht die gesteigerte Fettakkumulation postnatal überernährter Tiere zu erklären vermag.

Geht man von einer nicht unterschiedlichen Milchaufnahme heterozygoter gegenüber Wildtyp-Tieren im normalen Nest aus, können als mögliche Ursache für die gesteigerte Fettdeposition zusätzlich Unterschiede in der Nahrungsresorption in Betracht gezogen werden. Für geänderte Nahrungsresorption sprechen Befunde, die sich bei Vergleichen von

künstlich aufgezogenen $+/fa$ - und fa/fa -Tieren ergaben, wenngleich die unter diesen Bedingungen beobachtete Differenz im Energiegehalt des Kotes quantitativ nur sehr gering war (Markewicz et al. 1993). Es ist aber zu bedenken, daß dies bei natürlicher Ernährung anders sein könnte. Die Annahme, daß der Nahrungsdurchsatz durch den Magen-Darm-Trakt durch den Leptinrezeptordefekt beeinflusst werden könnte, wird experimentell durch die Beobachtung gestützt, daß Leptingaben in den 4. Ventrikel bei erwachsenen Tieren hemmend auf die Magenentleerung wirken (Smedh et al. 1998). Jedoch ist die Vermutung zur Zeit noch rein spekulativ, daß es durch den auf Grund des Leptinrezeptordefekts vorgetäuschten Leptinmangel zu einer energetisch wesentlichen Verbesserung oder Beschleunigung der Nahrungsresorption kommen könnte.

Weitere Möglichkeiten wie eine eingeschränkte metabolische Wärmebildung bei Kältebelastung, wie dies bei künstlich aufgezogenen fa/fa -Tieren der Fall ist, deren erhöhte Fettdeposition gegenüber heterozygoten ($+/fa$) und Wildtyp-Tieren ($+/+$) zu 90 % durch ihre herabgesetzte Thermogenese erklärt werden kann (Kaul et al. 1990; Markewicz et al. 1993), lassen sich nach den bisherigen Kenntnissen nicht auf den Unterschied zwischen $+/+$ - und $+/fa$ -Tieren übertragen. Kurzzeitmessungen der metabolischen Rate unter Kältebelastung haben keinen Hinweis darauf erbracht, daß es in den ersten beiden Lebenswochen zu einer Reduktion des thermoregulatorischen Aufwandes der $+/fa$ - relativ zu den $+/+$ -Tieren kommen könnte. Am Ende der dritten Lebenswoche allerdings konnte ein erniedrigter Energieumsatz von $+/fa$ - gegenüber $+/+$ -Tieren nachgewiesen werden, der eine Fettdeposition energetisch ermöglicht (Olbort 1998). Ob allerdings diese späten energetischen Veränderungen ausreichen, um die großen, gefundenen Differenzen im Körperenergiegehalt zwischen im kleinen Nest aufgezogenen homo- und heterozygoten Tieren am Tag 21 zu erklären, bedarf weiterer Untersuchungen. Um die Energetik der exzessiven Fettdeposition von $+/fa$ -Tieren aus dem kleinen Nest aufzuklären, wären in Zukunft Untersuchungen der Körperzusammensetzung am Ende der ersten und zweiten Lebenswoche erforderlich.

4.2.4. Physiologische Hintergründe einer erworbenen Leptinresistenz

Rekombinantes Leptin führt schon in der Säuglingsphase selektiv zur Reduktion der Fettmasse und belegt damit, daß ein für das adulte Tier wichtiges System bereits in einem sehr frühen ontogenetischen Stadium funktionsfähig ist (Stehling et al. 1996; Kraeft et al. 1999). Als energetische Wirkungsmechanismen für Leptin sind bisher die Hemmung der Nahrungsaufnahme (Halaas et al. 1995; Campfield et al. 1995; Pelleymounter et al. 1995) und

ein disinhibitorischer Effekt auf eine aus energetischen Gründen gedrosselte thermoregulatorische Wärmebildung bekannt (Schmidt et al. 1997; Stehling et al. 1996 und 1997 b; Geiser et al. 1998; Döring et al. 1998). Die physiologische Antwort auf exogene Leptinzufuhr besteht folglich in einer Verringerung der Fettreserven.

In der vorliegenden Studie führte eine postnatale Überernährung zu der Entwicklung einer nachlassenden Sensitivität gegenüber peripher verabreichtem Leptin, d.h. zu einer funktionellen Leptinresistenz. Eine pharmakologische Unwirksamkeit der benützten Leptin-Charge scheidet als Ursache für die beobachtete Leptinresistenz aus, da alle parallel untersuchten und im normalen Nest aufgezogenen männlichen Wistarratten unter Leptinbehandlung eine signifikante Reduzierung des Körperfettgehalts aufwiesen. Schon im normalen Nest ist eine unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Genotypen bzw. Rattenstämme gegenüber exogen verabreichtem Leptin nachzuweisen (A. Fritz, unveröffentlichte Ergebnisse). Die verminderte Sensitivität heterozygoter Zuckerratten gegenüber einer Leptinbehandlung im normalen Nest ist schon von anderen Autoren dokumentiert worden. So zeigen *+/fa*-Tiere in der ersten Lebenswoche eine geringere Ansprechbarkeit auf periphere Leptingaben (Kraeft et al. 1999). Ob eine auf Grund des Gendefekts verminderte Leptinrezeptorbindung im Hypothalamus dafür verantwortlich ist, wie sie von Chua et al. (1996) für adulte Tiere und in der vorliegenden Untersuchung für juvenile Tiere ermittelt wurde, bedarf weiterer Klärung. Interessanterweise förderte die Aufzucht im kleinen Nest die Entstehung einer Leptinresistenz sowohl bei heterozygoten Zucker- als auch bei Wistarratten. Neben der beobachteten Leptinresistenz vor allem der weiblichen heterozygoten Tiere, die sich gegenüber einer Leptinbehandlung so resistent zeigten, wie dies normalerweise für *fa/fa*-Tiere bekannt ist (Kraeft et al. 1999; Stehling et al. 1997 a), reagierten die im kleinen Nest aufgezogenen Wistarratten, bei denen in der vorliegenden Studie nur Männchen untersucht wurden, ebenfalls nur sehr schwach auf die exogene Leptinzufuhr, obwohl für diesen Zuchtstamm keine Kenntnis über Fettsucht prädisponierende Gene besteht. Bei den postnatal überernährten Wildtyp-Tieren konnten durch eine dreiwöchige Leptinbehandlung die Veränderungen, die durch eine postnatale Überernährung verursacht worden waren, so weit gemildert werden, daß die Tiere am Schluß der Behandlung wieder einen Körperfettgehalt aufwiesen, der Tieren aus normaler Aufzucht gleichkam. Ob diese Normalisierung der Körperfettzunahmen unter Leptinbehandlung durch eine reduzierte Futteraufnahme und/oder durch Veränderungen im Energieverbrauch der Tiere verursacht worden ist, kann durch die vorliegende Untersuchung nicht beantwortet werden.

Die für die heterozygoten in kleinen Nestern aufgezogenen Zuckerratten gefundene veränderte Beziehung zwischen Körperfett und Plasmaleptin steht in Übereinstimmung mit einer Reihe früherer Beobachtungen, die sich auch auf normal ernährte Tiere beziehen. Schon bei der Geburt, das bedeutet lange bevor es zu unterschiedlichen Fettakkumulationen aufgrund unterschiedlicher Genotypen kommt, haben die heterozygoten Zuckerratten gegenüber den Wildtyp Zuckerratten erhöhte Plasmaleptinspiegel (Hufnagel et al. 1999). Auch bei zehn Tage alten Tieren lassen sich erhöhte Plasmaleptinspiegel der heterozygoten gegenüber den Wildtyp-Zuckerratten nachweisen, die mit einer erhöhten Expression von Leptin-mRNA im inguinalen Fettgewebe einhergehen (Zhang et al. 1997; Olbort 1998; Zhang et al. 2001). Diese Arbeiten zeigen, daß die Höhe des Plasmaleptins von Tieren mit einem Leptinrezeptordefekt nicht allein mit der Größe der Fettdepots erklärt werden kann. Darüberhinaus zeigt sich, daß die sonst sehr enge Korrelation zwischen Körperfettgehalt und Plasmaleptinspiegel (Frederich et al. 1995; Considine und Caro 1997), mit der Anzahl defekter *fa*-Allele beziehungsweise mit ansteigenden Plasmaleptinspiegeln geringer wurde (Zhang et al. 1997; Olbort 1998). Eine neue Arbeit zeigt, daß eine zentral vermittelte, sympathische Rückkopplung einen starken Einfluß auf die Leptin-Expression in den braunen aber nicht in den weißen Fettzellen zehn Tage alter Tiere hat. Aber auch Fettgehalt und/oder der zelluläre Energieumsatz in den Adipozyten waren weitere wichtige Einflußgrößen für die Regulation der Leptin-Expression (Zhang et al. 2001).

Generell wäre zu vermuten, daß nicht nur ein genetisch defekter Leptinrezeptor sondern auch eine funktionelle Störung des Leptinrezeptors zu erhöhten Plasmaleptinspiegeln führt. Daß eine Hyperleptinämie allein auf die Störung der diskutierten Autoregulationsmöglichkeiten, periphere Autoregulation an der Fettzelle selbst (Zhou et al. 1997) oder sympathisch vermittelte Autoregulation (Zhang et al. 2001) zurückgeführt werden kann, ist jedoch unwahrscheinlich.

Weitere Studien zeigen, daß einerseits erhöhte Plasmatriglyceridkonzentrationen (Rafael und Herling 2000), andererseits auch Insulin für die Regulation der Plasmaleptinspiegel von Bedeutung sind. So konnte nachgewiesen werden, daß Insulin einen direkten Effekt auf Adipozyten hat und zu einer lang anhaltenden Erhöhung der Leptinproduktion führt (Kolaczynski et al. 1996; Saladin et al. 1995). Da postnatal überernährte Ratten schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Hyperinsulinämie aufweisen (Plagemann et al. 1999 a; You et al. 1990), erscheint auch ein Einfluß von Insulin auf die Entstehung der Hyperleptinämie als möglich. Abgesehen von den Ursachen für die überproportional gesteigerte Leptinproduktion bei den *+fa*-Tieren gilt jedoch, daß die bei allen adipösen Tieren zu

beobachtende Erhöhung des Plasmaleptins über die beim normalen Tier bestehende Beziehung zwischen Leptinspiegel und Fettmasse hinaus Ausdruck einer relativen Unwirksamkeit des Leptins ist, die als Leptinresistenz bezeichnet wird (Pelleymounter et al. 1998). Sie drückt sich unter anderem in einer herabgesetzten Ansprechbarkeit selbst auf hohe Dosen exogen zugeführten Leptins aus.

Die eigenen Befunde haben als für die Genese der Leptinresistenz wesentliche Ergebnisse erbracht, daß die experimentelle Aufrechterhaltung hoher Leptinspiegel durch exogene Zufuhr bei normal ernährten Wistar-Welpen nicht zu einer Leptinresistenz führte. Dagegen entwickelten unter der gleichen Leptinbehandlung, also bei vergleichbar hohen Plasmaleptinspiegeln, die postnatal überernährten Wistar-Jungtiere eine Leptinresistenz. Dies führt zu dem Schluß, daß ein hoher Leptinspiegel nicht per se Leptinresistenz verursacht. Dies dürfte auch für andere Tiermodelle für Adipositas und den Menschen gelten, bei denen es endogen zu erhöhten Leptinspiegeln kommt.

Besser gesichert als mögliche periphere Mechanismen einer geänderten Leptinsensitivität sind zentrale Wirkungen, die über den Hypothalamus vermittelt werden, über den zirkulierendes Leptin regulierend in die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase eingreift (Elmquist et al. 1998; Cone et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Leptinresistenz könnte deshalb in einer Änderung der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung liegen. Tatsächlich ließ sich eine reduzierte Leptinrezeptorbindung im Hypothalamus bei den heterozygoten und besonders bei den *fa/fa*-Zuckerratten nachweisen. Die Analyse erwies sich auch als sensitiv genug, um eine Reduktion der Leptinbindung im Hypothalamus im Vergleich zum Wildtyp (+/+) bei heterozygoten (+/*fa*) Zuckerratten nachzuweisen. Dennoch führte in der vorliegenden Untersuchung weder die postnatale Überernährung noch die Leptinbehandlung zu einer Änderung der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung, weshalb sich das Zustandekommen einer Leptinresistenz im kleinen Nest so nicht erklären läßt. Es muß aber in Betracht gezogen werden, daß diese Untersuchung nur eine Aussage bezüglich der Leptinrezeptorbindung am postnatalen Tag 21 machen kann und deshalb nicht repräsentativ für den gesamten Behandlungszeitraum ist. Desweiteren muß bedacht werden, daß die gesamte hypothalamische Leptinbindung untersucht wurde, weshalb über eventuelle Veränderungen der Leptinrezeptorbindung innerhalb unterschiedlicher hypothalamischer Kerngebiete oder für unterschiedliche Leptinrezeptorsubtypen keine Aussage gemacht werden kann. Zu einer genaueren Klärung des Sachverhaltes wären weitere histologische Untersuchungen notwendig, um lokale Unterschiede im Bindungsverhalten nachzuweisen. So

ist eine spezifische Regulation der Leptinrezeptorbindung in Abhängigkeit von den Plasmaleptinspiegeln für den ARC beschrieben worden, während sich gleichzeitig die Bindung in anderen hypothalamischen Kernen nicht veränderte (Baskin et al. 1999 a). Zudem weisen neue Studien darauf hin, daß eine postnatale Überernährung zu einer direkten Beeinflussung hypothalamischer Neurone hinsichtlich der Konzentration von die Futteraufnahme stimulierenden Neuropeptiden führt (Plagemann et al. 1999 a; b), also zu einer potentiellen postrezeptorischen Beeinflussung der Leptinwirkung, die durch die Messung der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung nicht erfaßt würde.

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete Leptinresistenz könnte auch ein Unvermögen des Leptins sein, an seinen zentralen Wirkungsort im Hypothalamus zu gelangen (Banks et al. 1996; Wu-Peng et al. 1997). Da Leptin als Molekül zu groß ist, um die Blut-Hirn-Schranke durchdringen zu können, wird deshalb ein unidirektionales Transportsystem für Leptin vermutet (Banks et al. 1996), dessen Lokalisation das Endothel der Gefäße und das Epithel des Plexus chorioideus zu sein scheint (Golden et al. 1997). Banks et al. (1996) konnten ein Sättigungsverhalten dieses Transportsystems nachweisen. Für eine Sättigung dieses Transportsystems spricht auch, daß sowohl bei adipösen Menschen als auch bei adipösen Tiermodellen mit zunehmender Adipositas ein kleiner werdendes Verhältnis zwischen Plasmaleptinspiegeln und den Leptinspiegeln in der Zerebrospinalflüssigkeit beobachtet werden kann (Caro et al. 1996; Schwartz et al. 1996; Wu-Peng et al. 1997). Allerdings ist die Leptinkonzentration im Liquor 100-fach geringer als die Plasmakonzentration, weshalb eine Stimulation der zentralen Leptinrezeptoren durch Leptin im Liquor wenig wahrscheinlich ist (Ahima et al. 2000). Zudem ist die Zugänglichkeit der für die Vermittlung zentraler Leptinwirkungen wichtigen Neurone im Bereich des ARC auf Grund der in diesem Bereich teilweise permeablen Blut-Hirn-Schranke nur bedingt von transendothelialen Transportmechanismen abhängig. Insgesamt ist also eine Sättigung des Transportmechanismus für Leptin im Gehirn als Ursache für die Leptinresistenz sehr unwahrscheinlich.

Frühere Studien zeigen, daß die Applikation derselben Leptindosis, die in dieser Studie verwendet worden war, wenn auch über miniosmotische Pumpen verabreicht, bei zwei bis drei Wochen alten Rattenwelpen zu einer Hyperleptinämie im Blutplasma der Tiere führte (Eiden et al. 2000). Die in dieser Arbeit untersuchten mit Leptin behandelten Tiere aus Würfen mit normaler Welpenzahl zeigten trotz einer durch exogene Hormonapplikation offensichtlich hervorgerufenen Hyperleptinämie keine Leptinresistenz, was beweist, daß der

erhöhte Hormonspiegel allein nicht ausreicht, um eine Leptinresistenz zu verursachen. Zu einer genauen Abklärung, ob oszillierende Plasmaleptinspiegel auf Grund von Bolusinjektionen eine ständige permanente endogene Hormonproduktion nachahmen können, müßten auch bei postnatal überernährten Tieren weitergehende Studien mit einer Applikation von Leptin über miniosmotische Pumpen folgen, die sich auf Grund der geringen Körpergröße vor allem der sehr jungen Tiere momentan nicht realisieren lassen. Dennoch stützen diese Befunde die Schlußfolgerung aus den eigenen Befunden, daß die Hyperleptinämie allein nicht der Verursacher einer Leptinresistenz ist.

Eine entscheidende Rolle könnte der Hyperinsulinämie zukommen, die sich bei postnatal überernährten Tieren ebenfalls zu einem sehr frühen Zeitpunkt ausbildet (You et al. 1990; Plagemann et al. 1999 a). Da Insulin im Lipidstoffwechsel eine Schlüsselstellung einnimmt, kann bei hyperinsulinämischen Individuen eine Reihe metabolischer Störungen nachgewiesen werden (De Fronzo et al. 1991). Da zudem die Höhe der Insulinspiegel als Maß der Insulinsensitivität des Körpers angesehen werden kann, deuten hohe Insulinspiegel auf eine herabgesetzte Insulinsensitivität postnatal überernährter Ratten hin. Eine mögliche Erklärung für die in der Literatur dokumentierte Hyperinsulinämie bei postnatal überernährten Ratten könnte sein, daß bei adipösen Jungtieren die Aufnahme von freien Fettsäuren bzw. Triglyceriden mit der Muttermilch erhöht ist (Björntorp 1994). In der Leber könnte das erhöhte Angebot freier Fettsäuren zu einer verzögerten und verminderten Insulindegradierung und damit zu der dokumentierten peripheren Hyperinsulinämie führen. Erhöhte freie Fettsäuren interferieren aber auch direkt mit der Insulinwirkung und können beispielsweise die Glukose-Aufnahme in der Muskulatur stören, was wiederum die Ausbildung einer Insulinresistenz begünstigt.

Neben der peripheren ist auch eine zentralnervöse Hyperinsulinämie bei postnatal überernährten Rattenwelpen dokumentiert worden (Dörner und Plagemann 1994). Erhöhte hypothalamische Insulinspiegel in einer frühen ontogenetischen Entwicklungsphase, wie sie für Rattenwelpen zutrifft, stehen in Verdacht, sich schädigend auf die Entwicklung des ZNS auszuwirken (Dörner und Plagemann 1994). Übereinstimmend damit konnten auch bei der postnatal überernährten Ratte Veränderungen in der Konzentration hypothalamischer, für die Regulation der Energiehomöostase wichtige Neuropeptide NPY und Galanin nachgewiesen werden (Plagemann et al. 1999 a und b).

4.2.5. Ausblick

Mensch und Tier passen ihre Nahrungsaufnahme normalerweise rasch den wechselnden Bedürfnissen (z.B. Art und Umfang des körperlichen Bedarfs, Klima) und dem Nährwert (Energiegehalt) der Nahrung an. Diese Kurzzeitregulierung der Nahrungsaufnahme wird ergänzt und überlagert durch eine Langzeitregulierung, die Diätfehler ausgleicht und für die Wiederherstellung des normalen Körpergewichtes sorgt. Auf diese Weise können Ratten ihr Körpergewicht normalerweise auf einem annähernd gleichbleibenden Niveau halten (Novin 1975; Anand 1951; Morgane 1969). Die Vorstellungen über den Einfluß einer frühen Über- oder Unterernährung bzw. einer ausgeprägten juvenilen Adipositas auf das spätere Adipositasrisiko für Mensch und Tier stützten sich bislang auf widersprüchliche Beobachtungen. Die als Tiermodell dazu bisher verwandten Untersuchungen beziehen sich auf die Aufzucht von Ratten in großen und kleinen Nestern. Wenngleich für das juvenile Tier zum Zeitpunkt des Absetzens die vorliegende Studie die Ergebnisse anderer Autoren, nämlich einen erheblich gesteigerten Körperfettgehalt im kleinen Nest aufgezogener Tiere gegenüber Kontrolltieren aus normalen Nestern bestätigt, ist für die adulte Ratte bislang eindeutig nur ein größeres Körpergewicht postnatal überernährter Tiere publiziert (Voits et al. 1996; Plagemann et al. 1999 b; Davidowa und Plagemann 2000). Allein für Mäuse konnte auch noch nach 24 Wochen ein erhöhter Lipidgehalt postnatal überernährter Tiere relativ zu Tieren aus normalen Nestern nachgewiesen werden (Aubert et al. 1980). Ein Problem bisheriger Veröffentlichungen ist unter anderem der Vergleich postnatal überernährter Tiere gegenüber postnatal unterernährten Tieren (Widdowson und McCance 1960), die eine Interpretation auf Grund des Fehlens einer Kontrollgruppe mit Welpen aus Nestern normaler Größe schwierig machen. Wesentlich ist auch der Zeitpunkt, zu der die Einstellung der Wurfzahl erfolgt. Eine Reduktion der Nestgröße innerhalb von sechs Stunden nach der Geburt führt zu einem mit den Kontrolltieren vergleichbaren Körpergewicht auf Grund der nicht genügend stimulierten Laktation (Wurtmann und Miller 1976; s. auch Kap. 4.1.1.1.). Aus diesem Grund scheint eine Reduktion der Welpenzahl erst im Alter von zwei oder drei Tagen post natum wie in der vorliegenden Untersuchung erforderlich, um eine postnatale Überernährung zu induzieren. Bisher wurde bereits eine Vielzahl metabolischer Veränderungen nach einer frühen postnatalen Überernährung im Adulttier beobachtet. Nachgewiesen wurden unter anderem erhöhte Glukose- und Insulinspiegel, erhöhte Triglyceridspiegel, verschlechterte Glukosetoleranz und eine erhöhter systolischer Blutdruck (Plagemann et al. 1992; 1999 b), Hyperphagie (Voits et al. 1996), erhöhte Thyroxin und erniedrigte Trijodthyronin-Spiegel

(Aust et al. 1986). Außerdem wurden Veränderungen auf hypothalamischer Ebene festgestellt, wie z. B. eine veränderte Konzentration von Galanin (Plagemann et al. 1999 b), eine verstärkte Aktivierung von Neuronen durch NPY im VMH (Heidel et al. 1999) und neben der normalerweise beobachtbaren Inhibierung von Neuronen des ARC zusätzlich eine Aktivierung durch Leptin (Davidowa und Plagemann 2000). Es bedarf aber der experimentellen Bestätigung, daß eine postnatale Überernährung im Adulttier neben dem nachgewiesenen metabolischen Syndrom eine ausgeprägte Adipositas induziert, denn es könnten weitere Faktoren, wie Adipositas fördernde Gendefekte oder eventuell eine Veränderung der Nahrung nach dem Absetzen zum Beispiel in Form einer Cafeteria-Diät notwendig sein (Levin und Govek 1998), um lebenslang anhaltende massive Veränderungen des Körperfettgehaltes hervorzurufen.

4.3. Adipositas-Modell II

4.3.1. Histochemische Grundlage möglicher MSG-Wirkungen

In der vorliegenden Studie konnte die beim Adulttier beschriebene Läsionierung hypothalamischer Strukturen durch MSG (Olney 1969; 1971 und 1977) auch bereits bei der zehn Tage alten Ratte nachgewiesen werden. Besonders betroffen von der neuronalen Degeneration war der Nucleus arcuatus (ARC), der auf Grund seiner großen Anzahl an Leptinrezeptoren als zentrales Target plasmatischen Leptins angesehen wird (Satoh et al. 1997). Zusätzlich werden in diesem Kerngebiet mehrere Neuropeptide produziert, die eine Rolle bei der Modulierung der Körpergewichtsregulation spielen. Trotz der hohen Dosierung des MSG wurde keine vollständige Zerstörung des Kerngebietes verursacht. Dies zeigt sich auch darin, daß MSG-läsionierte Tiere, wenn auch deutlich schwächer als die Kontrolltiere, aber dennoch in der Lage sind, in Reaktion auf eine Leptinbehandlung ihr Körpergewicht zu reduzieren (Dawson et al. 1997). Die größte Läsionierung wurde in der rostromedialen Ausdehnung des Kerngebietes gefunden, dort waren die Hälfte aller Neuronen von den Nekrosen betroffen. In der caudalen Ausdehnung des Kerngebietes waren die Ausmaße der neuronalen Zerstörung weniger dramatisch. Nur 20 % der Neurone waren von der Läsionierung betroffen. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Untersuchung von Gross et al. (1992), die zeigte, daß die Blut-Hirn-Schranke des ARC besonders in seiner rostromedialen Ausdehnung permeabel ist, wohingegen die caudalen Anteile dieses Kerngebietes eine weniger permeable Blut-Hirn-Schranke aufweisen. In anderen für die

Körpergewichtsregulation wichtigen Kerngebieten innerhalb der Blut-Hirn-Schranke des Hypothalamus, wie dem VMH, dem DMH und dem lateralen Hypothalamus konnten keine Läsionen beobachtet werden.

Die Abnahme an Fasern in der Eminentia mediana läßt sich durch einen Wegfall in die Hypophyse ziehender Axone erklären, deren Ursprungsneurone im ARC von der chemischen Läsionierung mitbetroffen waren. Eine Erklärung für die ventrale Dislokation des VMH ist einerseits der neuronale Zelltod und damit der Wegfall von über 50 % der Neurone auf Höhe dieser Ausdehnung des ARC, zusätzlich ist auch eine Retraktion durch gliales Narbengewebe denkbar.

4.3.2. Histologisches Korrelat der Zielstrukturen der MSG-Wirkung

Um Aufschluß darüber zu erhalten, welche funktionellen Komponenten im Bereich des ARC als Angriffsorte der Noxe MSG in Frage kommen, wurden zwei histochemische Charakterisierungen bei zehn Tage alten, unbehandelten Rattenwelpen durchgeführt. Zur Beantwortung der Frage welche Kerngebiete durch eine Leptingabe aktiviert werden, wurde in immunhistochemischen Versuchen die Exprimierung des Fos-Proteines bei zehn Tage alten Rattenwelpen untersucht, wobei besonders die für die Energiehomöostase wichtigen hypothalamischen Kerngebiete von Interesse waren. Eine erhöhte Fos-Expression wird als spezifischer Marker für neuronale Aktivität auf der Ebene des Zentralnervensystems erachtet (Dragunow und Faull 1989; Hamamura et al. 1992).

Periphere Leptininjektion führte lediglich zu einer Fos-Expression weniger lateral gelegener Zellen des ARC. Dies wiederum stimmt mit Befunden anderer Autoren überein, die für das Adulttier eine Aktivierung lateraler Neurone des ARC, die die Neuropeptide POMC und CART enthalten, gezeigt haben (Elmqvist et al. 1997). Es wurde vermutet, daß die medialen NPY-ergen Zellen durch Leptin gehemmt werden, was die fehlende Exprimierung des Fos-Proteins erklären könnte (Elias et al. 1998). Tatsächlich bewiesen wurde die hemmende Wirkung von Leptin durch elektrophysiologische Versuche, die eine Inhibierung neuronaler Aktivität des ARC durch Leptin und eine exzitatorische Antwort auf Orexin-Gabe zeigten (Rauch et al. 2000). Der PVN zeigt eine starke Fos-Expression sowohl in seinen magno- als auch parvozellulären Unterkernen. Dies beweist auf der einen Seite, daß dem PVN eine Schlüsselrolle bei der Modulierung der Energiehomöostase zukommt; auf der anderen Seite verdeutlicht dies, daß peripheres Leptin in der Lage ist, trotz bestehender Blut-Hirn-Schranke, Neurone im PVN zu aktivieren. Dies ist deshalb von besonderem Interesse, da gerade der

PVN über Projektionen sowohl zu parasympathischen als auch zu sympathisch präganglionären Neuronen (s.o.) aber auch zur Hypophyse besitzt (Elmquist et al. 1998). Für das Adulttier konnte eine Fos-Expression bis jetzt nur für die parvozellulären Unterkerne nachgewiesen werden (Elmquist et al. 1997). Der Befund, daß beim juvenilen Tiere auch in sehr starkem Maße die magnozellularen Anteile des PVN aktiviert werden, wird durch die Exprimierung des Leptinrezeptors auf den magnozellularen Anteilen des PVN bei der Zuckerratte unterstützt (Yarnell et al. 1998). Die Aktivierung von Zellen des lateralen Hypothalamus, im DMH und weniger im VMH stimmt mit den Ergebnissen im Adulttier überein (Elmquist et al. 1997) und verdeutlicht erneut, daß diesen Kerngebieten eine Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase zukommt.

Diese Studie zeigt erstmalig, daß eine periphere Leptininjektion schon bei zehn Tage alten Rattenwelpen zu einer Aktivierung von Neuronen sowohl im lateralen ARC, aber auch in anderen Kerngebieten, die eine Rolle bei der Regulation der Futterraufnahme und der sympathisch vermittelten thermoregulatorischen Thermogenese spielen, führt. Dies ist in Anbetracht der neuronalen Unreife der Tiere in diesem ontogenetisch frühen Stadium beachtlich und untermauert die funktionellen Befunde anderer Autoren, daß trotz gegenteiliger Vermutungen auch schon das juvenile Tier in der Lage ist, seine Energiebilanz über ein aus der Peripherie kommendes Signal zu steuern.

Wenngleich auch juvenile Ratten eine ausgesprochene neuronale Unreife aufweisen (Sherwood und Timiras 1970), konnte dennoch in der vorliegenden Studie erstmals gezeigt werden, daß auch bei zehn Tage alten Ratten die Konnektivitäten NPY-erger Fasern, die im ARC entspringen und zum PVN ziehen, schon vorhanden sind. Die Ergebnisse mehrerer Studien zeigen, daß gerade die medial im ARC angesiedelten NPY-ergen Neurone, welche den Ursprung dieser Konnektivitäten darstellen, durch eine MSG-Behandlung läsiert werden (Meister et al. 1989; Ebling et al. 1998). In Übereinstimmung damit können bei adulten, durch eine MSG-Behandlung adipös gewordenen Tiere verringerte NPY-Spiegel festgestellt werden (Kerkerian 1986; Abe et al. 1990). Morris et al. fanden eine erniedrigte Anzahl NPY-immunreaktiver Zellen sowohl im ARC, als auch im PVN bei 30 und auch bei 90 Tage alten MSG-behandelten Tieren (Morris et al. 1998). Da hohe NPY-Spiegel eine herabgesetzte thermoregulatorische Thermogenese im BAT hervorrufen, niedrige NPY-Spiegel aber im Gegensatz die thermogene Wärmebildung im BAT erhöhen (Bray et al. 1990), könnten auf Grund der Zerstörung NPY-produzierender Neurone, erniedrigte NPY-Spiegel der MSG-behandelten Tiere die Enthemmung der gedrosselten Thermogenese

erklären. Auf der anderen Seite zeigen Versuche, daß Leptin hemmend auf die NPY-Produktion im ARC wirkt, dadurch die Futteraufnahme senkt und zu einer Enthemmung der thermoregulatorische Wärmebildung im BAT führt (Schwartz et al. 1996). Dies wiederum kann erklären, warum eine Leptinbehandlung, die hemmend auf die NPY-Expression in den medialen Neuronen des ARC wirkt, zu den gleichen Veränderungen der juvenilen endogenen circadianen Rhythmik führen kann wie eine chemische Läsionierung eben dieser Neurone. Um diese Hypothese vollständig zu untermauern, sind allerdings weitere Studien notwendig, unter anderem die Bestimmung der NPY-Spiegel auch bei der zehn Tage alten, MSG-behandelten Ratte.

Neben NPY sind sowohl α -MSH- als auch CART-immunreaktive Fasern im IML in sehr großer Anzahl vorhanden (Elias et al. 1998; Koylu et al. 1998). Des weiteren inhibieren MC4-Rezeptorantagonisten die durch Leptin induzierte Expression von UCP-1 im BAT (Satoh et al. 1998), was die Annahme stützt, daß hypothalamische POMC- und CART-Neurone, die durch Leptin aktiviert werden (Elias et al. 1998; Elias et al. 1999; Schwartz et al. 1997), notwendig sind, um eine Erhöhung des Sympathikotonus hervorzurufen. Da chemische Läsionierung mit MSG besonders mediale NPY-erge Neurone zerstört und die lateralen Neurone des ARC in nicht so starkem Maße von der Läsionierung betroffen sind (Meister et al. 1989), könnte es zu einem Überwiegen α -MSH- und CART-induzierter Wirkungen kommen. Bestätigt wird dies durch den Nachweis erhöhter POMC-mRNA Spiegel bei der zehn Tage alten, MSG-behandelten Ratte (Skultetyova et al. 1998). Da α -MSH nachgewiesenermaßen (Seeley et al. 1997; Satoh et al. 1998) und CART möglicherweise auf die thermoregulatorische Thermogenese einwirken, könnte ein verstärkter Effekt der in diesen Neuronen gebildeten Neuropeptide den Anstieg der Körperkerntemperatur und des Metabolismus der juvenilen Ratten im Minimum erklären. α -MSH und CART mögen aber nicht nur die Wirksamkeit des NPY als Modulator des Energieverbrauchs antagonisieren, sondern auch seine Wirkungen auf die Futteraufnahme, denn beide Neuropeptide haben eine starke anorexigene Wirkung (Kalra et al. 1999; Kristensen et al. 1998). Dies könnte zusätzlich eine mögliche Erklärung für die herabgesetzte Futteraufnahme der natürlich aufgezogenen MSG-behandelten Rattenwelpen sein, die neben einer Reduktion des Körperfettgehaltes auch eine signifikante Verkleinerung der FFDM gegenüber den Kontrolltieren verursacht haben könnte.

4.3.3. Herabgesetztes Körpergewicht durch reduzierte Energieaufnahme ?

Die vorliegende Studie zeigt, daß im Gegensatz zum Adulttier MSG-Behandlung beim juvenilen Tier zu einer Abnahme des Körpergewichtes führt, die ihre Ursache in einer Abnahme sowohl der fettfreien Substanz sowie des Körperfettgehaltes hat. Auch andere Autoren beobachteten in der postnatalen Periode ein geringeres Körpergewicht MSG-behandelter gegenüber Kontrolltieren (Morris et al. 1998; Olney et al. 1969; Yoshida et al. 1985). Morris et al. (1998) zeigten, daß die epididymalen Fettpolster 30 Tage alter Ratten, die mit 2 mg pro Gramm Körpergewicht MSG behandelt wurden, immer noch kleiner waren als die der Kontrolltiere. Zu welchem Zeitpunkt die im Adulttier beobachtete Adipositas beginnt, ist nicht genau bekannt. Für Ratten wird das Alter, in dem die MSG-behandelten Tiere erstmals einen größeren Körperfettgehalt als die Kontrolltiere aufweisen, mit drei Monaten angegeben (Morris et al. 1998).

Zur Feststellung, ob die verminderte Körpergewichtszunahme auf eine Reduktion der Futtermittelaufnahme zurückzuführen ist, wurden juvenile Ratten künstlich aufgezogen, um eine identische Milchzufuhr zu gewährleisten. Die Ergebnisse zeigen, daß die Tiere dennoch, bei gleicher Futtermittelaufnahme, einen reduzierten Körperfettgehalt aufwiesen, wenngleich hinsichtlich der fettfreien Trockenmasse und des Wassergehaltes keine signifikanten Unterschiede zwischen MSG-behandelten und Kontrolltieren auftraten. Dies verdeutlicht auf der einen Seite, daß MSG-Behandlung auch bei gleichbleibender Nahrungsaufnahme, selektiv zu einer Abnahme des Körperfettgehaltes führt, während die fettfreie Körpersubstanz in diesem Fall unter der Behandlung nicht signifikant verändert wurde. Auf der anderen Seite weist die sehr niedrige FFDM der Tiere auf eine mögliche behandlungsbedingte, gesundheitliche Beeinträchtigung der Welpen durch die Kombination von MSG-Behandlung und künstlicher Aufzucht hin. Es läßt sich auch bei der natürlichen Aufzucht nicht ausschließen, daß ein herabgesetztes Wohlbefinden der Tiere durch die MSG-Behandlung zu einer verminderten Nahrungsaufnahme geführt haben mag.

4.3.4. Reduktion des Körperfettgehaltes durch Änderungen in der Energiebilanz

Durch die künstliche Aufzucht konnte eine herabgesetzte Nahrungsaufnahme MSG-behandelter Tiere ausgeschlossen werden. Dennoch besaßen die behandelten Tiere einen deutlich geringeren Fettgehalt gegenüber den Kontrolltieren. Eine mögliche Erklärung für die

unterschiedliche Fettdeposition könnte in den Veränderungen des Stoffwechsels der MSG-behandelten Tiere liegen.

Von besonderer Bedeutung für den normalen Stoffwechsel juveniler Ratten ist das Auftreten eines ausgeprägten endogenen circadianen Rhythmus ihrer Körpertemperatur und ihrer metabolischen Rate bei moderater Kältebelastung (Nüßlein et al. 1989), wobei sich dieser Rhythmus der Jungtiere als ein vom Tc-Rhythmus adulter Ratten unabhängiges Phänomen erweist (Nüßlein und Schmidt 1990). Die Entstehung dieses endogenen Tagesganges der Körperkerntemperatur und der metabolischen Rate juveniler Ratten ist auf eine Verminderung des sympathischen Antriebs der thermoregulatorischen Thermogenese im braunen Fettgewebe zurückzuführen (Redlin et al. 1992; Nüßlein und Schmidt 1994 b). Die Zerstörung eines wesentlichen zentralen Leptintargets durch MSG führte zu einer permanenten Anhebung des Energieumsatzes MSG-behandelter Tiere in die Nähe der Maxima ihres circadianen Tc- und MR-Rhythmus. Dabei verursachte die chemische Läsionierung nicht eine allgemeine Stoffwechseleerhöhung, sondern nur eine Aufrechterhaltung des im Tagesminimum normalerweise herabgesetzten sympathischen Antriebes der thermoregulatorischen Thermogenese. Während der täglichen Maxima zeigten die behandelten Tiere geringere Abweichungen ihres Stoffwechsels gegenüber den Kontrolltieren. Diese Modifikation des metabolischen Tagesrhythmus der Tiere führte dazu, daß sie phasenweise Energie für die sympathisch vermittelte Thermogenese aufwenden mußten, die bei den Kontrolltieren in Form von Fett angelagert werden konnte. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß der juvenilen Tagesrhythmus der Energieeinsparung dient (Nüßlein-Hildesheim et al. 1990), die dann für eine vermehrte Fettakkumulation zur Verfügung steht.

Interessanterweise führt eine Behandlung juveniler Rattenwelpen mit rekombinantem Leptin ebenfalls zu einer Anhebung des Stoffwechsels während der täglichen Minima der Tiere (Stehling et al. 1996; Stehling et al. 1997 b). Genau wie bei der chemischen Läsionierung des zentralen Leptintargets führt damit auch Leptinbehandlung nicht zu einer allgemeinen Steigerung des Stoffwechsels über sein normales Niveau, sondern zu einer Enthemmung eines reduzierten sympathischen Antriebes zur Thermoregulation im braunen Fett (Stehling et al. 1996) und folglich zu verminderter Fettakkumulation.

Auf der einen Seite ist bereits aus Studien an *fa/fa*-Zuckerratten bekannt (Markewicz et al. 1993), daß trotz der neuronalen Unreife von Rattenwelpen (Sherwood und Timiras 1970) das Leptinsystem in frühen ontogenetischen Stadien über die Modulation des Energieumsatzes selektiv die Fettdeposition regulieren kann. Auf der anderen Seite wurde durch die Studien an juvenilen Ratten erstmals deutlich, daß das Hormon Leptin somit nicht nur über die

Regulation der Futtermittelaufnahme in die Erhaltung der Energiehomöostase eingreifen kann, sondern selektiv über die Modulierung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes Unterschiede im Körperfettgehalt verursachen kann (Stehling et al. 1996). Im Zusammenhang mit den zitierten Studien demonstriert die vorliegende Arbeit die große Bedeutung der durch die MSG-Läsionen betroffenen Zellgebiete für die Regulation der Energiebilanz der juvenilen Ratte.

4.3.5. Ursachen für die MSG-induzierte Adipositas im Adulttier

Postnatal mit neurotoxischen Konzentrationen von Monosodiumglutamat (MSG) behandelte Tiere zeigen im adulten Zustand einerseits als Folge reduzierten Körperwachstums einen veränderten Körperbau (verkürzter Rumpf) (Olney 1969), andererseits haben sie einen stark erhöhten Körperfettgehalt trotz normaler oder zum Teil sogar verminderter Futtermittelaufnahme im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Olney 1969; Tokuyama und Himms-Hagen 1986; Dawson et al. 1997). Dennoch weisen MSG-behandelte Tiere über einen langen Zeitraum in ihrer Entwicklung ein niedrigeres Körpergewicht gegenüber den Kontrolltieren auf (Morris et al. 1998). Wie die vorliegende Studie gezeigt hat, ist für das niedrigere Körpergewicht im juvenilen Stadium der ersten Tage post natum bei MSG-behandelten Tieren sehr wahrscheinlich ein im Minimum des juvenilen Tagesrhythmus erhöhter Energieverbrauch verantwortlich. Mit dem Erlöschen des juvenilen Tagesrhythmus in der dritten Lebenswoche fällt bei MSG-behandelten Ratten die Basis für die beobachtete Energieeinsparung weg.

Für Mäuse wird erstmals eine vermehrte Fettakkumulation im Alter von zwei Wochen festgestellt (Cameron et al. 1978). Bei Ratten wird ein größeres Körpergewicht MSG-behandelter Tiere gegenüber den Kontrolltieren in einem Alter von ca. fünf Wochen berichtet (Morris et al. 1998). Eine eindeutige vermehrte Fettakkumulation MSG-behandelter Ratten gegenüber den Kontrolltieren wird erstmals im Alter von drei Monaten beobachtet (Yoshida et al. 1984; Morris et al. 1998), wohingegen bei 30 Tage alten MSG-läsionierten Ratten das epididymale weiße Fettgewebe (WAT) kleiner war und sowohl das retroperitoneale WAT, als auch das interskapuläre BAT noch keinerlei Differenzen im Gewicht gegenüber den Kontrolltieren zeigten (Morris et al. 1998). Der eindeutige Zeitpunkt der beginnenden Fettdeposition MSG-behandelter Tiere liegt somit bei Ratten sehr wahrscheinlich nach dem Absetzen.

Auffallend ist, daß Glutamat-behandelte, adulte Tiere ein verändertes Fressverhalten zeigen, indem sie den größten Teil des Futters tagsüber aufnehmen (Dawson et al. 1981; Mistlberger

und Antle 1999). Dieses veränderte Verhalten führt dennoch weder bei 30 Tage alten Ratten (Morris et al. 1998) noch bei Mäusen (Olney 1969) zu Hyperphagie, vielmehr zeigen die Tiere eine Normo- bis Hypophagie. Desweiteren haben adulte MSG-behandelte, adipöse Mäuse gewöhnlich eine niedrigere Körpertemperatur gegenüber den Kontrolltieren (Dawson et al. 1981; Yoshida et al. 1984; Yoshida et al. 1985; Edelman et al. 1995; Tokoyama und Himms-Hagen 1986). Sie scheinen hypoaktiv zu sein (Dawson et al. 1981; Pizzi und Barnhat 1976; Poon und Cameron 1978) und werden bei einer akuten Kältebelastung hypotherm (Dawson et al. 1981; Moss et al. 1985). Schon vor der eigentlichen Entstehung der Adipositas können verringerte GDP-Bindungswerte festgestellt werden, die ein Beleg für eine verminderte Thermogeneseaktivität des braunen Fettgewebes bei Glutamat-behandelten Mäusen sind (Yoshida et al. 1985; Yoshioka et al. 1991). Dieser Befund korreliert sehr gut mit einem erniedrigten Noradrenalin-Turnover in diesem Gewebe (Yoshida et al. 1984). Bei Ratten konnte im Alter von 30 Tagen eine verminderte Expression des Glukose Transporters GLUT₄ nachgewiesen werden, der sekundär als Marker für eine herabgesetzte Aktivität des BAT herangezogen wird (Morris et al. 1998). Eine verminderte Thermogeneseaktivität führt zu einer Verringerung der Energieabgabe, was bei konstanter oder geringgradig verminderter Energieaufnahme zwangsläufig zu einer Erhöhung der Energiespeicherung führen muß. Damit scheint ein verursachender Faktor für die Adipositasentwicklung nach MSG-Behandlung gefunden (Yoshida et al. 1985; Yoshioka et al. 1991).

Es darf bei diesem Adipositas-Modell allerdings nicht außer Acht gelassen werden, daß der ARC in die neuroendokrine Kontrolle und Regulation vieler Regelkreise eingebunden ist und ihm eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Hormone des Hypophysenvorderlappens zukommt. Eine MSG-Behandlung führt zu massiver Zerstörung von Neuronen, die neben Energiebilanz regulierenden Neuropeptiden auch unterschiedliche „releasing“-Hormone produzieren. Dadurch entstehen im Adulttier zusätzlich hormonelle Störungen und Fehlfunktionen. Neben einer massive Hypothyreose (Dhindsa et al. 1981) und Hypogonadismus (Olney 1969) haben adulte MSG-behandelte Tiere erhöhte Kortison- und Prolaktin-Spiegel (Meister 1989; Gerstberger et al. 1987). Für den Corticotropin-Releasing-Factor (CRF), dessen exprimierende Neurone ebenfalls von der Läsionierung betroffen sind, sind anorexigene Wirkungen bekannt (Schwartz et al. 1996). Das verkümmerte Wachstum MSG-behandelter Tiere kann durch eine starke Schädigung Growth-Hormone-Releasing-Faktor (GRF) produzierender Neurone im ventrolateralen ARC und eine Abnahme GRF-immunreaktiver Fasern in der Eminentia mediana, die zu verminderten Plasmaspiegeln des Wachstumshormons führen, erklärt werden (Bloch et al. 1984; Maiter et al. 1991; Meister

1991). Eine mögliche Interaktion dieser massiven hormonellen Beeinträchtigung MSG-behandelter Tiere mit den gefundenen Störungen des Energiehaushaltes ist als wahrscheinlich anzusehen. Auch inwieweit mögliche Kompensationsmechanismen des Tieres Veränderungen hervorrufen ist nicht bekannt. So könnte beispielsweise eine NPY-Produktion in hypothalamischen Gebieten induziert werden, die normalerweise kein NPY exprimieren (Pu et al. 1998). Es bedarf deshalb weiterer Studien, um die genauen Mechanismen, die die beobachteten Änderungen der Energiebilanz und die Entstehung der Adipositas bedingen, zu klären. Auch sind weitere Studien nötig, um die komplexen Zusammenhänge von Futteraufnahme und Regulation der thermoregulatorischen Thermogenese aufzudecken.

4.3.6. Ausblick

Über den Nucleus arcuatus und damit das Leptinsystem hinaus ist es bisher noch nicht gelungen, weitere Gehirngebiete oder Neuropeptide zu charakterisieren, die möglicherweise für die Entstehung des juvenilen Tagesrhythmus von Bedeutung sind. Die naheliegende Vermutung, daß hierbei, wie dies für den adulten Rhythmus bekannt, der Nucleus Suprachiasmaticus (SCN) beteiligt ist (Rusak und Zucker 1979; Rosenwasser und Adler 1986), konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Das ontogenetisch frühe Auftreten eines endogenen Rhythmus in der Thermoregulation ist in Betracht der neuronalen Unreife der neugeborenen Ratte bemerkenswert (Nüßlein und Schmidt 1990). Es ist daher zu vermuten, daß der juvenilen Tagesrhythmik und ihrer Modulation durch Leptin eine wesentliche Aufgabe bei der Entwicklung der juvenilen Ratte zukommt. Der juvenile circadiane Tc-Rhythmus zeigt dabei wenig Übereinstimmung mit dem Tagesgang der Tc adulter Ratten (Nüßlein und Schmidt 1990), weist aber Charakteristika auf, die große Ähnlichkeiten mit dem täglich wiederkehrenden Torpor kleiner Nagetierarten haben (Geiser et al. 1988; Nüßlein 1992; Nüßlein-Hildesheim et al. 1998). Vom Torpor wird vermutet, daß er vor allem Bedeutung für den Energiehaushalt vieler Vogel- und Kleinsäugerarten hat, da er unter anderem einsetzt, wenn die Nahrungsvorräte zur Neige gehen. In adulten Mäusen kann ein durch Futterrestriktion hervorgerufener Torpor-ähnlicher Abfall der Körperkerntemperatur und der metabolischen Rate (Döring et al. 1998), genauso wie bei der juvenilen Ratte der Tagesrhythmus, durch eine Leptinbehandlung aufgehoben werden (Stehling et al. 1996). Allerdings scheinen nicht nur Leptin-abhängige, sondern auch Leptin-unabhängige Mechanismen Torpor zu induzieren (Gavrilova et al. 1999). Sollte es zutreffen, daß es sich bei Torpor und juvenilem Tagesrhythmus um verwandte Phänomene handelt, könnten die

Befunde der vorliegenden Arbeit und weiterführende Untersuchungen Licht in diese Zusammenhänge bringen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß zwei völlig unterschiedliche Einflüsse, nämlich eine chemische Noxe, genauso wie eine postnatale Überernährung in einer kritischen juvenilen Entwicklungsphase, obwohl sie zunächst zu einer gegenläufigen Veränderung der Fettdeposition führen, schließlich Adipositas und/oder deren assoziierten Begleitstörungen im adulten Tier hervorrufen können. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, daß der Ansatz von größeren Fettreserven sich im Laufe der Evolution nicht als pathogene Erscheinung, sondern als eine wichtige Überlebensstrategie entwickelt hat. Energiesparmechanismen, um den Abbau von Fettreserven bei Mangelzuständen zu verlangsamen, und die Ausnutzung von zeitweilig im Überfluß vorhandener Nahrung zur Anlage von neuen Fettreserven sind wichtige biologische Funktionen, weil Nahrungsknappheit und nicht Überfluß in der Natur die Regel sind. Die vorliegende Arbeit gibt damit neue Einblicke in die Pathologie der Entgleisungen von normalen Regelvorgängen im Energiehaushalt, die letztlich als Ursache einer permanenten Adipositas anzusehen sind. Zusätzlich konnte eine auffallende Interaktion zwischen einem definierten, normalerweise als rezessiv eingestuften Merkmal und frühen postnatalen Umwelteinflüssen gezeigt werden, die modellhaft für die Programmierung der phänotypischen Ausprägung genetischer Störungen sein könnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Endogene, funktionelle Teratogene wie auch chemische Noxen können in kritischen Entwicklungsperioden zur Zerstörung zentraler Regler und damit zu lebenslang anhaltenden Fehlfunktionen endokriner Regulationsprozesse führen. In der vorliegenden Studie wurden die akuten Änderungen in der Energiebilanz während der Säugephase an zwei unterschiedlichen Modellen untersucht, die durch Eingriffe in den ersten Lebenstagen Adipositas im adulten Tier bewirken.

Im ersten Adipositasmodell wurde eine postnatale Überernährung (PNO) 21 Tage alter Rattenwelpen durch die Aufzucht in einem Nest mit nur vier Tieren, gegenüber zwölf Tieren in normal großen Nestern, induziert, wobei neben Wistarratten entweder Zuckerratten, die heterozygot für einen Defekt des Leptinrezeptors sind ($+/fa$), oder deren Wildtyp-Wurfgeschwister ($+/+$) untersucht wurden. Bei allen PNO-Tieren ergab sich gegenüber den im normalen Nest aufgezogenen Kontrolltieren sowohl eine größere fettfreie Trockenmasse und Fettmasse, wobei die normalerweise phänotypisch kaum ausgeprägte genetische Prädisposition der $+/fa$ -Tiere zu vermehrter Fettakkumulation bei den PNO-Tieren erheblich verstärkt wurde. Neben Zunahmen der Körperfettmasse entwickelten die $+/fa$ -PNO-Tiere, aber auch die PNO-Wistarratten, eine relative Hyperleptinämie. Diese war mit einer Leptinresistenz assoziiert, wie sich in einer nahezu vollständigen Insensitivität insbesondere der PNO-Wistarratten und der $+/fa$ -PNO-Tiere gegenüber exogen appliziertem Leptin zeigte. Eine Bestimmung der hypothalamischen Leptinrezeptorbindung an Hypothalamus-Homogenaten verdeutlichte, dass diese weder bei den PNO-Tieren noch durch Leptinbehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren verändert wurde. Unabhängig davon wiesen zum einen $+/fa$ - und zum anderen weibliche Tiere eine verminderte Leptinrezeptorbindung auf.

Diese Befunde am Untersuchungsmodell I zeigen, dass eine erhöhte Energiezufuhr im Säuglingsalter nicht nur zu einem verstärktem Wachstum, sondern auch zu einer exzessiven Fettdeposition führt. Zusätzlich konnte eine auffallende Interaktion zwischen einem definierten, normalerweise rezessiv eingestuften Merkmal und frühen postnatalen Umwelteinflüssen gezeigt werden, die modellhaft für die Programmierung der phänotypischen Ausprägung genetischer Störungen sein könnte. Unabhängig vom genetischen Hintergrund tritt dabei eine Leptinresistenz als Leitsymptom auf, die jedoch nicht auf einer Änderung der Rezeptordichte beruht. Eine analoge Beziehung zwischen genetischem Hintergrund und

Überernährung wäre auch bei der Wistarratte zu vermuten, ist aber noch nicht identifiziert worden.

Grundlage des zweiten Adipositasmodelles ist die chemische Läsionierung von Nervenzellkörpern durch Verabreichung von Monosodiumglutamat (MSG), das in hypothalamischen Gebieten mit durchlässiger Blut-Hirnschranke wirksam wird. Die postnatale MSG-Behandlung führte bei den MSG-behandelten Tiere zu einer geringeren Fettdeposition gegenüber den NaCl-behandelten Kontrolltieren. Bei identischer Nahrungszufuhr künstlich über intraösophageale Katheter aufgezogener Tiere kam es zu einem nahezu vollständigen Verschwinden der Stoffwechselabsenkung im Minimum der Tiere und einer erhöhten Energiedissipation der MSG-behandelten Tiere. Auch die künstlich aufgezogenen Tiere zeigten eine starke Abnahme besonders des Körperfettgehaltes, was die Änderungen in der Energiebilanz der Tiere als Ursache bestätigt. Mit dem verminderten Körperfettgehalt ging auch eine Abnahme der Plasmaleptinspiegel einher.

Um die Auswirkungen der MSG-Behandlung auf die für die Energiehomöostase wichtigen hypothalamischen Kerngebiete insbesondere des Nucleus Arcuatus (ARC) zu untersuchen wurden kresylviolett-gefärbte coronale Gehirnschnitte mikroskopisch untersucht. Während andere Kerngebiete nicht von der chemischen Läsionierung durch MSG betroffen waren, trat eine weitgehende Zerstörung hypothalamischer Neurone im ARC ein. Zudem wurde zur Funktionskontrolle am zehn Tage alten Rattenhirn die Reagibilität auf Leptin anhand des Nachweises eines „immediate-early-gene“ Produkts, des Fos Proteins, als Marker für neuronale Aktivierung nachgewiesen und die Verteilung des durch das Neuropeptid Y (NPY) als Transmitter gekennzeichneten, hirn-intrinsischen Neuronensystems, dessen Beitrag zur Stimulation der Nahrungsaufnahme bekannt ist, trotz der neuronalen Unreife der juvenilen Tiere nachgewiesen.

Die Befunde des Adipositasmodells II zeigen, dass der MSG-induzierten Adipositas im Erwachsenenalter eine Phase erhöhten Energieumsatzes vorausgeht, die in ihrer Wirkung auf den circadianen Rhythmus der einer Leptinapplikation bei der juvenilen Ratte vergleichbar ist und vor allem zu einer Verringerung des Körperfettgehaltes führt. Bei der Deutung dieses Befundes sind die histochemischen Hinweise zu beachten, dass normalerweise bereits im Alter von zehn Tagen eine Fortleitung des Leptinsignals zum Nucleus paraventricularis als integrative Struktur für die Kontrolle der Energiebilanz existiert und dass insbesondere das an dieser Verbindung beteiligte NPY-System entwickelt ist. Der beobachtete Zelluntergang im ARC wirkt sich akut wie eine durch Leptin hervorgerufene Enthemmung der normalerweise wirksamen Maßnahmen der juvenilen Energieeinsparung im Tagesminimum aus.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass zwei völlig unterschiedliche Einflüsse, nämlich eine chemische Noxe, genauso wie eine postnatale Überernährung in einer kritischen juvenilen Entwicklungsphase, obwohl sie zunächst gegenläufige Veränderung der Fettdeposition auslösen, schließlich zu Adipositas und deren assoziierten Begleitstörungen im adulten Tier führen können.

6. SUMMARY

Endogenous as well as chemical functional teratogens, if administered in critical periods of neuronal development, may destroy central regulatory mechanisms and therefore lead to lifelong-lasting dysfunctions of endocrine regulatory loops. In this study acute changes in energy balance during suckling period has been examined in two rat obesity models, which are known to induce an obese phenotype in the adult animal.

In the first obesity model a postnatal overnutrition (PNO) has been induced by rearing pups in small litters of only 4 animals (small litter size) compared to pups reared under control conditions with 12 pups (normal litter size). Besides Wistar rats either Zucker rats, which are heterozygous for a leptin receptor defect „fatty“ (+/*fa*), or wildtyp Zucker rats have been used in this study. All PNO-animal showed an enhanced fat-free dry-mass (FFDM) as well as an increased body-fat mass compared to their control littermates, which had been reared in litters of normal size. The enlarged fat deposition of heterozygous animals which is normally hardly detectable by phenotype is massively enhanced by the postnatal overnutrition. Besides the increase in body fat mass the +/*fa*-PNO as well as the PNO-Wistar rats developed a relative hyperleptinaemia. This was associated with a leptin resistance, which was expressed in a nearly total insensitivity especially of the PNO-Wistar- and PNO-+/*fa*-Zucker rats against peripheral leptin treatment. The investigation of hypothalamic leptin receptor binding in Zucker rats revealed that neither PNO- nor leptin-treated animals had a different binding compared to the control animals. Independent of these findings, a diminished leptin receptor binding of heterozygous and female animals could be detected.

These results of the first obesity model show that a higher energy supply in postnatal life not only contributes to a higher body weight but especially supports an exaggerated fat deposition. Additionally, this study demonstrated an obvious interaction between an usually inconspicuous genetic trait and early postnatal environmental influences, which could be exemplary for the programming of phenotypical expression of genetic disorders. Independent of genetic background, a leptin resistance as a lead-symptom develops, which is not caused by an altered expression of the leptin receptor.

In the second obesity model monosodiumglutamate (MSG) in high doses has been used to lesion neuronal cell bodies in specific hypothalamic areas without a blood-brain-barrier. Postnatal MSG-treatment causes a diminished fat-deposition of the treated suckling-age animals compared to the control (NaCl-treated) animals. Artificial rearing which ensures a

supply with identical amounts of milk via intraoesophageal catheters revealed a nearly complete suppression of the circadian torpor-like decreases of Tc and MR in the daily minimum and therefore lead to a higher energy dissipation of the MSG-treated animals. The artificially reared animals showed also a diminished fat mass compared to the control animals in accordance with the observed changes in energy metabolism which thus were causal for the reduction of body weight. To study the effect of MSG treatment on hypothalamic nuclei, which are known to be involved in regulation of energy homeostasis, cresyl-violet stained brain sections have been examined. A marked loss of cells in the arcuate nucleus (ARC) could be detected while other brain regions were not affected by the treatment. Additionally, to test whether those brain regions are already functional at an age of ten days, the expression of the Fos protein, an immediate early-gene-product, which is known as a marker for neuronal activity, could be demonstrated. Despite the neuronal immaturity of ten day old rat pups the NPY-ergic projections, which have been shown to be essential for signal transmission in the control of food intake, already exist.

The results show that MSG-induced obesity, which develops in adulthood, is preceded by a period of expanded energy expenditure in juvenile life. With respect to their effects on energy metabolism leptin treatment and MSG lesioning of juvenile pups are comparable and lead mainly to a diminished fat deposition. For the interpretation of these findings one has to keep in mind the histological results, which revealed that even at this early age the transmission of the leptin signal to the nucleus paraventricularis is already possible, because the NPY-ergic connectivities are already existent. The neuronal cell death in the ARC leads to an leptin-like disinhibition of normal energy saving mechanisms in the minimum of the daily circadian rhythm in 10 day old pups.

Summarizing the results, this study shows that two totally different influences - postnatal overnutrition or a chemical teratogene - if administered in periods that are critical for developing organisms, can induce changes in energy metabolism and nutritional state of animals which may lead to a higher obesity susceptibility in adulthood.

7. ABKÜRZUNGEN

+/ <i>fa</i> -Ratte	heterozygoter Träger des <i>fa</i> -Gendefektes
+/+-Ratte	Wildtyp-Zuckerratten
AGRP	agouti-related protein
ARC	Nucleus Arcuatus des Hypothalamus
α -MSH	α -Melanozyten stimulierendes Hormon
BAT	braunes Fettgewebe (brown adipose tissue)
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Anzahl der Basenpaare eines DNA-Fragmentes
BSA	bovines Serum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CART	cocaine- and amphetamine-regulated transcript
CaSO ₄	Kalziumsulfat
CRH	Corticotropin-releasing hormon
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CVO	circumventrikuläres Organ
DAB	Diaminobenzidin
DMH	Nucleus Dorsomedialis des Hypothalamus
DNA	Desoxiribonucleinsäure
<i>fa</i> -Allel	Punktmutation des <i>fa</i> (<i>fatty</i>)-Gens, die zu einer erhöhten Fettdeposition führt
<i>fa/fa</i> -Ratten	Genetisch zum Übergewicht veranlagte, in Bezug auf den <i>fa</i> -Gendefekt homozygote Ratte
FFDM	Fettfreie Trockenmasse (fat-free dry mass)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazine-ethanesulfonic acid
IML	intermediolateral column
KD	Kilo-Dalton
LH	Lateraler Hypothalamus
log	Logarithmus, logarithmisch
MCH	melanin-concentrating hormon
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MR	Metabolische Rate [kJ], oder massenspezifische metabolische Rate [W/kg]
MSG	Monosodiumglutamat
NaCl	Natrium-Chlorid
NPY	Neuropeptid Y
NSB	Non-specific binding
NST	zitterfreie Thermogenese (non-shivering thermogenesis)
Ob-R	Leptin-Rezeptor
Ob-Rb	Variante des Leptinrezeptors mit langer intrazellulärer Domäne
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PNO	postnatale Überernährung (postnatal overnutrition)
PO ₄	Phosphat
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Nucleus Paraventricularis des Hypothalamus
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
RQ	Respiratorischer Quotient
SB	Spezifische Bindung (specific binding)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
STPD	standard temperature-pressure-dryness
Ta	Umgebungstemperatur [°C]
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tc	Körperkerntemperatur [°C]
UCP-1	uncoupling protein-1
VMH	Nucleus Ventromedialis des Hypothalamus
VO ₂	Sauerstoffverbrauch [ml/min]
V III	dritte Ventrikel
WAT	weißes Fettgewebe (white adipose tissue)

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, M., Saito, M. and Shimazu, T. (1990) Neuropeptide Y in the specific hypothalamic nuclei of rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Brain Res Bull*, 24, 289-291.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. and Flier, J.S. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-252.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D. and Flier, J.S. (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest*, 101, 1020-1027.
- Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Osei, S. and Flier, J.S. (1999) Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology*, 140, 2755-2762.
- Ahima, R.S. and Flier, J.S. (2000) Leptin (Review). *Annual Review of Physiology*, 62, 413-437.
- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S. and Elmquist J.K. (2000) Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 263-307.
- Ahren, B., Mansson, S., Gingerich, R.L. and Havel, P.J. (1997) Regulation of plasma leptin in mice - influence of age, high-fat diet and fasting. *Am J Physiol*, 42, R113-119.
- Alberts, J.R. (1978) Huddling by rat pups: group behavioral mechanisms of temperature regulation and energy conservation. *J Comp Physiol Psychol*, 92, 231-245.
- Alonso, G., Szafarczyk, A., Balmefrezol, M. and Assenmacher, I. (1986) Immunocytochemical evidence for stimulatory control by the ventral noradrenergic bundle of parvocellular neurons of the paraventricular nucleus secreting corticotropin releasing hormone and vasopressin in rats. *Brain Res*, 397, 297-307.
- Anand, B.K. & Brobeck, J.R. (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med*, 24, 123-140.
- Andersson, B. (1978) Regulation of water intake. *Physiol Rev*, 58, 582-603.
- Aschoff, J., Daan, S. and Groos, G.A. (1982) *Vertebrate circadian systems. Structure and Physiology*. Springer Verlag, Berlin.
- Aubert, R., Suquet, J.P. and Lemonnier, D. (1980) Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. *J Nutr*, 110, 649-661.
- Aust, L., Noack, R. and Proll, J. (1986) The influence of early postnatal overnutrition on postprandial energy expenditure in rats (short communication). *Nahrung*, 30, 451-452.

- Babicky, A., Ostadalova, I., Parizek, J., Kolar, J. and Bibr, B. (1973) Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. *Physiol Bohemoslov*, 22, 449-456.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y. and Lewin, M.J.M. (1998) The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394, 790-3.
- Bamshad, M., Song, C.K. and Bartness, T.J. (1999) CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol*, 276, R1569-R1578.
- Banks, W.A., DiPalma, C.R. and Farrell, C.L. (1999) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*, 20, 1341-1345.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B. and Maness, L.M. (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, 17, 305-311.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F., Bonigut, S. and Miller, M.A. (1999a) Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Res*, 828, 154-158.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F. and Schwartz, M.W. (1999b) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, 48, 828-833.
- Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Breininger, J.F., Jonak, Z., Schaefer, J., Krouse, M., Burghardt, C., Campfield, L.A., Burn, P. and Kochan, J.P. (1999c) Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem*, 47, 353-362.
- Bassett, D.R. and Craig, B.W. (1988) Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol*, 64, 1249-1256.
- Bateman, N. (1957) Some physiological aspects of lactation in mice. *J Agric Sci*, 49, 60-77.
- Bernardis, L.L. and Bellinger, L.L. (1998) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. *Experimental Biology & Medicine*, 218 (4), 284-306.
- Bi, S., Gavrilova, O., Gong, D.W., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M. and Reitman, M.L. (1999) Leptin and reproduction. *J Clin Ligand Assay*, 22, 236-238.
- Bie, P. (1980) Osmoreceptors, vasopressin, and control of renal water excretion. *Physiol Rev*, 60, 961-1048.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Harker, S., Grace, M. and Levine, A.S. (1994) Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol*, 266, R1765-R1770.

- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W. and Sawchenko, P.E. (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, 319, 218-245.
- Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J.S. (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 272, 32686-32695.
- Björntorp, P. (1994) Fatty acids, hyperinsulinemia, and insulin resistance: Which comes first? *Curr Opin Lipidol*, 5, 166-174.
- Blaxter, K.L. (1961) Lactation and the growth of the young. In: *Milk: The mammary gland and its secretion*. Kon, S.K. and Cowie, A.T. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 2, pp. 305-361.
- Bloch, B., Ling, N., Benoit, R., Wehrenberg, W.B. and Guillemin, R. (1984) Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. *Nature*, 307, 272-273.
- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M. and Ryan, I. (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3419-3423.
- Bortz (1989) *Statistik für Sozialwissenschaftler*, Springer, Berlin.
- Bouchard, C. (1996) The causes of obesity: advances in molecular biology but stagnation on the genetic front. *Diabetologia*, 39, 1532-1533.
- Boulange, A., Planche, E. and de Gasquet, P. (1979) Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (fa/fa). *J Lipid Res*, 20, 857-864.
- Bray, G.A. (1977) The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*, 36, 148-153.
- Bray, G.A. (1987) Overweight is risking fate. Definition, classification, prevalence, and risks. *Ann N Y Acad Sci*, 499, 14-28.
- Bray, G.A. (1990) Obesity-a state of reduced sympathetic activity and normal or high adrenal activity (the autonomic and adrenal hypothesis revisited). *Int J Obes*, 14, 77-92.
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G. and Hokfelt, T. (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, 402, 460-474.
- Brownlee, K.A. (1965) *Statistical theory and methodology*. John Wiley & sons Inc., New York, London, Sydney.
- Brück, K. (1978) Heat production and temperature regulation. In: *Perinatal Physiology*. Stave, U. (ed.), Plenum Publ Corp, New York, 455-498.

- Buchberger, P. and Schmidt, I. (1996) Is the onset of obesity in suckling fa/fa rats linked to a potentially larger milk intake? *Am J Physiol*, 271, R472-R476.
- Cameron D.P., L.C.a.F.O. (1978) Effects of Monosodium Glutamate-induced obesity in mice on carbohydrate metabolism in Insulin secretion. *Clin Exp Pharm Physiol*, 5, 41-51.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. and Burn, P. (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 546-9.
- Cannon, B. and Needergaard, J. (1985) Brown adipose tissue: Molecular mechanisms controlling activity and thermogenesis. In: *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development*. Cryer, A. and Van, R.L.R. (eds.), Butterworths, London, 223-270.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K. and Considine, R.V. (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, 348, 159-161.
- Cechetto, D.F. and Saper, C.B. (1988) Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*, 272, 579-604.
- Cernerud, L. (1993) Height and body mass index of seven-year-old Stockholm schoolchildren from 1940 to 1990. *Acta Paediatr*, 82, 304-305.
- Chagnon, Y.C., Perusse, L., Weisnagel, S.J., Rankinen, T. and Bouchard, C. (2000) The human obesity gene map: the 1999 update. *Obes Res*, 8, 89-117.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Wolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I. and Morgenstern, J.P. (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84, 491-495.
- Chen, X.M., Hosono, T., Yoda, T., Fukuda, Y., Kanosue, K. (1998) Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol*, 512, 883-892.
- Chua, S.C., Jr., White, D.W., Wu-Peng, X.S., Liu, S.M., Okada, N., Kershaw, E.E., Chung, W.K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Tartaglia, L.A. and Leibel, R.L. (1996) Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes*, 45, 1141-1143.
- Coleman, D.L. (1973) Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, 9, 294-298.
- Collins, S., Kuhn, C.M., Petro, A.E., Swick, A.G., Chrnyk, B.A. and Surwit, R.S. (1996) Role of leptin in fat regulation. *Nature*, 380, 677.

- Colombo, J. (1982) The critical period concept: research, methodology, and theoretical issues. *Psychol Bull*, 91, 260-275.
- Cone, R.D. (1999) The ups and downs of leptin action. *Endocrinology*, 140, 4921-4922.
- Conklin, P. and Heggeness, F.W. (1971) Maturation of temperature homeostasis in the rat. *Am J Physiol*, 220, 333-336.
- Considine, R.V. and Caro, J.F. (1997) Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 1255-1272.
- Considine, R.V., Considine, E.L., Williams, C.J., Hyde, T.M. and Caro, J.F. (1996) The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*, 19, 992-994.
- Coyle, J.T. and Schwarcz, R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263, 244-6.
- Coyle, J.T. and Schwarcz, R. (1983). *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam.
- Cramer, C.P., Blass, E.M. and Hall, W.G. (1980) The ontogeny of nipple-shifting behavior in albino rats: mechanisms of control and possible significance. *Dev Psychobiol*, 13, 165-180.
- Cryer, A. and Jones, H.M. (1978) Parallel changes between lipoprotein lipase activating capacity and lipid concentrations in the serum of rats and ferrets during development and dietary manipulation. *Clin Sci Mol Med*, 55, 121-123.
- Cryer, A. and Jones, H.M. (1980) The development of white adipose tissue. Effect of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue cellularity during the first year of life in male and female rats. *Biochem J*, 186, 805-815.
- Currie, P.J. and Coscina, D.V. (1997) Stimulation of 5-HT(2A/2C) receptors within specific hypothalamic nuclei differentially antagonizes NPY-induced feeding. *Neuroreport*, 8, 3759-3762.
- Davidowa, H. and Plagemann A. (2000) Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport*, 11 (12), 2795-2798.
- Dawson, R. and Lorden, J.F. (1981) Behavioral and neurochemical effects of neonatal administration of monosodium-L-glutamate in mice. *J Comp Physiol Psychol*, 95, 71-84.
- Dawson, R., Pelleymounter, M.A., Millard, W.J., Liu, S. and Eppler, B. (1997) Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol*, 273, E202-E206.

- DeFronzo, R.A. and Ferrannini, E. (1991) Insulin Resistance: A multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidämie, and Artherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*, 14, 173-194.
- Dhindsa, K.S., Omran, R.G. and Bhup, R. (1981) Histological changes in the thyroid gland induced by monosodium glutamate in mice. *Acta Anat*, 109, 97-102.
- Dietz, W.H. (1994) Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr*, 59, 955-959.
- Dörner, G. (1976) Environment-Dependent Brain Differentiation mediated by Hormones or Neurotransmitters and Fundamental Processes of Life. In: *Hormones and Brain Differentiation*. Dörner, G. (ed.), Elsevier Scientific Publishing Company, Berlin, 243-263.
- Dörner, G. (1989) Hormone-Dependent Brain Development and Neuroendocrine Prophylaxis. *Exp Clin Endocrinol*, 94, 4-22.
- Dörner, G. and Plagemann, A. (1994) Perinatal Hyperinsulinism as Possible Predisposing factor for Diabetes Mellitus, Obesity and Enhanced Cardiovascular Risk in Later Life. *Horm metab Res*, 26, 213-221.
- Döring, H., Schwarzer, K., Nuesslein-Hildesheim, B. and Schmidt, I. (1998) Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *Int J Obes*, 22, 83-88.
- Douglass, J., McKinzie, A.A. and Couceyro, P. (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*, 15, 2471-2481.
- Dragunow, M. and Faull, R. (1989) The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*, 29, 261-265.
- Drazen, D.L., Kriegsfeld, L.J., Schneider, J.E. and Nelson, R.J. (2000) Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod. *Am J Physiol*, 278, R1401-R1407.
- Duff, D.A. and Snell, K. (1982) Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *J Nutr*, 112, 1057-1066.
- Ebling, F.J., Arthurs, O.J., Turney, B.W. and Cronin, A.S. (1998) Seasonal neuroendocrine rhythms in the male Siberian hamster persist after monosodium glutamate-induced lesions of the arcuate nucleus in the neonatal period. *J Neuroendocrinol*, 10, 701-712.
- Eckert, R. (1986). *Wörterbuch der Tiermedizin*. Thieme, Stuttgart/New York.
- Edelstein, K., Pfaus, J.G., Rusak, B. and Amir, S. (1995) Neonatal monosodium glutamate treatment prevents effects of constant light on circadian temperature rhythms of adult rats. *Brain Res*, 675, 135-142.

- Edwardson, J.A. and Eayrs, J.T. (1967) Neural factors in the maintenance of lactation in the rat. *J Endocrinol*, 38, 51-59.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H. and Bray, G.A. (1991) Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol*, 260, R328-R334.
- Eiden, S., Preibisch, G. and Schmidt, I. (2001) Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range. *J Physiol-London*, 530, 131-139.
- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B. and Elmquist, J.K. (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, 23, 775-786.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B. and Elmquist, J.K. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21, 1375-1385.
- Elmquist, J.K. (1998) CNS regulation of energy balance and body weight: insights from rodent models. *Lab Anim Sci*, 48, 630-637.
- Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Maratos-Flier, E., Flier, J.S. and Saper, C.B. (1997) Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, 138, 839-842.
- Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A. and Davenport M. (1997) Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes*, 46, 313-316.
- Emond, M., Schwartz, G.J., Moran, T.H. (2001) Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol*, 280, R1315-1321.
- Fan, W., Boston, B.A., Keterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385, 165-168.
- Faust, I.M., Johnson, P.R. and Hirsch, J. (1980) Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *J Nutr*, 110, 2027-2034.
- Fehmman, H.C., Peiser, C., Bode, H.P., Stamm, M., Staats, P., Hedetoft, C., Lang, R.E. and Goke, B. (1997) Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides*, 18, 1267-1273.
- Ferré, P., Decaux, J.F., Issad, T. and Girard, J. (1986) Changes in energy metabolism during the suckling and weaning period in the newborn. *Reprod Nutr Dev*, 26, 619-631.
- Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Perez, M. and Reeds, P.J. (1991) Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol*, 260, R1104-R1113.

- Foster, D.O., Depocas, F. and Zuker, M. (1982) Heterogeneity of the sympathetic innervation of rat interscapular brown adipose tissue via intercostal nerves. *Can J Physiol Pharmacol*, 60, 747-754.
- Fowler, S.J. and Kellogg, C. (1975) Ontogeny of thermoregulatory mechanisms in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 89, 738-746.
- Frayn, K.N. (1993) Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 4, 197-204.
- Frederich, R.C., Löllmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B. and Flier, J.S. (1995) Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest*, 96, 1658-1663.
- Frühbeck, G., Aguado, M. and Martinez, J.A. (1997) In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem & Biophys Res Comm*, 240, 590-594.
- Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S. and Hilton, D.J. (1996) Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 14564-14568.
- Gavrilova, O., Leon, L.R., Marcus-Samuels, B., Mason, M.M., Castle, A.L., Refetoff, S., Vinson, C. and Reitman, M.L. (1999) Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 14623-14628.
- Geiser, F. (1988) Reduction of metabolism during hibernation and daily torpor in mammals and birds: temperature effect or physiological inhibition? *J Comp Physiol*, 158, 25-37.
- Geiser, F., Körtner, G. and Schmidt, I. (1998) Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *Am J Physiol*, 275, R 1627-R1632.
- Gerstberger, R. (1997) Hypothalamic control of osmoregulation. *J Endocrinol. Ltd.*, Bristol.
- Gerstberger, R., DiPaolo, T. and Barden, N. (1987) Impaired regulation of neurohypophyseal vasopressin secretion in rats treated neonatally with monosodium-L-glutamate. *Neurosci Lett*, 81, 193-198.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H. and Skoda, R.C. (1996) Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 6231-6235.
- Godbole, V.Y., Grundleger, M.L., Pasquine, T.A. and Thenen, S.W. (1981) Composition of rat milk from day 5 to 20 of lactation and milk intake of lean and preobese Zucker pups. *J Nutr*, 111, 480-487.
- Golden, P.L., Maccagnan, T.J. and Partridge, W.M. (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest*, 99, 14-18.

- Grill, H.J. and Smith, G.P. (1988) Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol*, 254, R853-R856.
- Grodzinski, W., Klekowiski, R.Z., Duncan, A., (1975) *Methods for Ecological Bioenergetics, IBP Handbook*. Backwell, Oxford, Vol. 24.
- Gross, P.M. (1992) Circumventricular organ capillaries. In: *Progress in Brain Research*. A. Ermisch, R.L.a.H.-J.R. (ed.), Elsevier Science Publishers, London, Vol. 91, pp. 219-233.
- Grota, L.J. (1973) Effects of litter size, age of young, and parity on foster mother behaviour in *Rattus Norvegicus*. *Anim Behav*, 21, 78-82.
- Guillaume, M. (1996) Obesity in children. Environmental and genetic aspects. *Horm Metab Res*, 28, 573-581.
- Hakansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C. and Meister, B. (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci*, 18, 559-572.
- Hakansson, M.L., Hulting, A.L. and Meister, B. (1996) Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus-- relationship with NPY neurones. *Neuroreport*, 7, 3087-3092.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. and Friedman, J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543-546.
- Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A: and Friedman, J.M. (1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Nat Acad Sci*, 94, 8878-8883.
- Haldeman, S. and McLennan, H. (1972) The antagonistic action of glutamic acid diethylester towards amino acid-induced and synaptic excitations of central neurones. *Brain Res*, 45, 393-400.
- Hales, C.N. and Barker, D.J.P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35, 595-601.
- Hamamura, M., Nunez, D.J.R., Leng, G., Emson, P.C. and Kiyama, H. (1992) c-fos may code for a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. *Brain Res*, 572, 42-51.
- Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y.M. and Deitel, M. (1995) Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med*, 1, 953-956.
- Harder, T., Plagemann, A., Rohde, W. and Dörner, G. (1998) Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal Insulin treatment. *Metabolism*, 47, 1-9.

- Harlan, W.R. (1993) Epidemiology of childhood obesity. A national perspective. *Ann N Y Acad Sci*, 699, 1-5.
- Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Lab.
- Harris, R.B. (1990) Role of set-point theory in regulation of body weight. *Faseb J*, 4, 3310-3318.
- Harris, R.B., Hervey, E., Hervey, G.R. and Tobin, G. (1987) Body composition of lean and obese Zucker rats in parabiosis. *Int J Obes*, 11, 275-283.
- Hausberger, F.X. (1959) Parabiosis and transplantation experiments in heritably obese mice. *Anat Rec*, 130, 313.
- Hausberger, F.X. and Volz, J.E. (1984) Feeding in infancy, adipose tissue cellularity and obesity. *Physiology & Behavior*, 33 (1), 81-87.
- Haynes, A.C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R.E., Wilson, S., Tadayyon, M. and Arch, J.R. (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides*, 20, 1099-1105.
- Hebebrand, J., Wulfange, H., Goerg, T., Ziegler, A., Hinney, A., Barth, N., Mayer, H. and Remschmidt, H. (2000) Epidemic obesity: are genetic factors involved via increased rates of assortative mating? *Int J Obes*, 24, 345-353.
- Heidel, E., Plagemann, A. and Davidowa, H. (1999) Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport*, 10, 1827-1831.
- Henning, S.J., Chang, S.S.P. and Gisel, E.G. (1979) Ontogeny of feeding controls in suckling and weanling rats. *Am J Physiol*, 237, R187-R191.
- Hervey, G.R. (1959) The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*, 145, 336-352.
- Heusner, A.A. (1972) Criteria for standard metabolism. *Proceedings of International Symposium on Environmental Physiology*, 15-21.
- Himms-Hagen, J., Hogan, S. and Zaror-Behrens, G. (1986) Increased brown adipose tissue thermogenesis in obese (ob/ob) mice fed a palatable diet. *Am J Physiol*, 250, E274-E281.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P. and Mercer, J.G. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 11073-11078.
- Horvath, T.L., Diano, S., Van den Pool, A.N: (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci*, 19 (3), 1072-1087.

- Houseknecht, K.L. and Portocarrero, C.P. (1998) Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol*, 15, 457-475.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29, 577-580.
- Hufnagel, C., Eiden, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Zhang, Y., Leibel, R.L. and Schmidt, I. (1999) Mutation in the leptin receptor (*Lep^{rfa}*) causes fat-storage-independent hyperleptinaemia in neonatal rats. *Pflugers Arch*, 438 (4), 570-572.
- Jeanrenaud, B. and Rohner-Jeanrenaud, F. (2000) CNS-periphery relationships and body weight homeostasis: influence of the glucocorticoid status. *Int J Obes Relat Metab Dis*, 2, 74-76.
- Johanson, I.B. (1979) Thermotaxis in neonatal rat pups. *Physiol Behav*, 23, 871-874.
- Kalra, S.P. and Crowley, W.R. (1992) Neuropeptide Y: a novel neuroendocrine peptide in the control of pituitary hormone secretion, and its relation to luteinizing hormone. *Front Neuroendocrinol*, 13, 1-46.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L. and Kalra, P.S. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 20, 68-100.
- Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M. and Charron, M.J. (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389, 374-377.
- Kaul, R., Heldmaier, G. and Schmidt, I. (1990) Defective thermoregulatory thermogenesis does not cause onset of obesity in Zucker rats. *Am J Physiol*, 259, E11-E18.
- Kennedy, G.C. (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond*, 140, 578-592.
- Kennedy, G.C. (1957) The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *J Endocrin*, 16, 9-17.
- Kerkerian, L. and Pelletier, G. (1986) Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y- containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res*, 369, 388-390.
- Kiss, J.Z., Cassell, M.D. and Palkovits, M. (1984) Analysis of the ACTH/beta-End/alpha-MSH-immunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Brain Res*, 324, 91-99.
- Klingenspor, M., Dickopp, A., Heldmaier, G. and Klaus, S. (1996) Short photoperiod reduces leptin gene expression in white and brown adipose tissue of Djungarian hamsters. *FEBS Letters*, 399, 290-294.

- Knowler, W.C., Narayan, K.M.V., Hanson, R.L., Nelson, R.G., Bennett, P.H., Tuomilehto, J., Schersten, B. and Pettitt, D.J. (1995) Preventing non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, 44, 483-488.
- Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Considine, R.V., Boden, G., Nolan, J.J., Henry, R., Mudaliar, S.R., Olefsky, J. and Caro, J.F. (1996) Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes*, 45, 699-701.
- Körtner, G., Petrova, O., Vogt, S. and Schmidt, I. (1994) Sympathetically and nonsympathetically mediated onset of excess fat deposition in Zucker rats. *Am J Physiol*, 267, E947-E953.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D. and Kuhar, M.J. (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol*, 391, 115-132.
- Kraeft, S., Schwarzer, K., Eiden, S., Nuesslein-Hildesheim, B., Preibisch, G. and Schmidt, I. (1999) Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (fa) in newborn rats. *Am J Physiol*, 276, E836-E842.
- Kramer, M.S., Barr, R.G., Leduc, D.G., Boisjoly, C. and Pless, J.B. (1985) Infant determinants of childhood weight and adiposity. *J Petr*, 107, 104-107.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J. and Hastrup, S. (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393, 72-76.
- Kyrkouli, S.E., Stanley, B.G., Seirafi, R.D. and Leibowitz, S.F. (1990) Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides*, 11, 995-1001.
- Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. and Friedman, J.M. (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379, 632-635.
- Leibel, R.L., and Hirsch, J. (1984) Diminished energy requirements in reduced-obese patients. *Metabolism*. 33, 164-170.
- Leibel, R.L., Rosenbaum, M., and Hirsch, J. (1995) Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*, 332, 621-628.
- Leibowitz, S.F. (1980) Control of drinking and feeding behaviour and water electrolyte excretion. In: *Neurochemical systems of the hypothalamus*. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Leibowitz, S.F. (1991) Brain neuropeptide Y: an integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull*, 27, 333-337.

- Leon, M., Croskerry, P.G. and Smith, G.K. (1978) Thermal control of mother-young contact in rats. *Physiol Behav*, 21, 790-811.
- Leonhardt, H. (1980) *Ependym und circumventrikuläre Organe*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Levin, N., Nelson, C., Gurney, A., Vandlen, R. and de Sauvage, F. (1996) Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 1726-1730.
- Levin, B.E. and Routh, V.H. (1996) Role of the brain in energy balance and obesity. *Am J Physiol*, 271, R491-500.
- Levin, B.E. and Govek, E. (1998) Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *Am J Physiol*, 275, R1374-R1379.
- Levin, B.E. (2000) The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obes Res*, 8 (4), 342-347.
- Lollmann, B., Gruninger, S., Stricker-Krongrad, A. and Chiesi, M. (1997) Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob- Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 648-652.
- Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R. and Lechler, R.I. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394, 897-901.
- Lorenz, D.N. (1992) Suckling physiology and behavior of rats: an integrated theory of ingestion and satiety. *Prog Psychobiol Physiol Psychol*, 15, 1-83.
- Lostao, M.P., Urdaneta, E., Martinezanso, E., Barber, A. and Martinez, J.A. (1998) Presence of leptin receptors in small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Letters*, 423, 302-306.
- Luiten, P.G. and Room, P. (1980) Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *Brain Res*, 190, 321-332.
- Maher, M.A., Banz, W.J., Truett, G.E. and Zemel, M.B. (1996) Dietary fat and sex modify heterozygote effects of the rat fatty (fa) allele. *J Nutr*, 126, 2487-2493.
- Maiter, D., Underwood, L.E., Martin, J.B. and Koenig, J.I. (1991) Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, 128, 1100-1106.
- Markewicz, B., Kuhmichel, G. and Schmidt, I. (1993) Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis. *Am J Physiol*, 265, E478-E486.
- Mason, M.M., He, Y., Chen, H., Quon, M.J. and Reitman, M. (1998) Regulation of leptin promoter function by Spl, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology*, 139, 1013-1022.

- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T., Nakao, K. (1995) Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes*, 44, 855-858.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T. and Nakao, K. (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 3, 1029-1033.
- Mayer, J. (1955) Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*, 63, 15-43.
- Mayor, F. and Cuezva, J.M. (1985) Hormonal and metabolic changes in the perinatal period. *Biol Neonate*, 48, 185-196.
- McCarthy, M.I., Froguel, P. and Hitman, G.A. (1994) The genetics of non-insulin-dependent diabetes mellitus: tools and aims. *Diabetologia*, 37, 959-968.
- McKinley, M.J., Badoer, E. and Oldfield, B.J. (1992) Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res*, 594, 295-300.
- McKinley, M.J., McAllen, R.M., Mendelsohn, F.A.O., Allen, A.M., Chai, S.Y. and Oldfield, B.J. (1990) Circumventricular organs: neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Front Neuroendocrinol*, 11, 91-127.
- Meister, B. (1991) Monosodium glutamate (MSG) lesions. In Conn, P.M. (ed.) *Methods in Neurosciences: Lesions and Transplantation*. Academic Press, San Diego, Vol. 7, pp. 70-89.
- Meister, B., Ceccatelli, S., Hokfelt, T., Anden, N.E., Anden, M. and Theodorsson, E. (1989) Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res*, 76, 343-368.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T. and Trayhurn, P. (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, 387, 113-116.
- Minokoshi, Y., Haque, M.S., Shimazu, T. (1999) Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes*, 48 (2), 287-291.
- Mistlberger, R.E. and Antle, M.C. (1999) Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory Activity and photic masking in the rat. *Brain Res*, 842, 73-83.

- Mogenson, G.J. (1975) *Neural mechanisms of hunger: current status and future prospects*. Raven Press, New York.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M. and Ur, E. (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, 140, 5995-5998.
- Morgane, P.J. and Jacobs, H.L. (1969) Hunger and satiety. *Nutrition & Dietetics*, 10, 100-213.
- Morris, M.J., Tortelli, C.F., Filippis, A. and Proietto, J. (1998) Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept*, 75-76, 441-447.
- Moss D., A.M., and D.P. Cameron. (1985) Defective Thermoregulatory Thermogenesis in Monosodium Glutamate-induced obesity in mice. *Metabolism*, 34, 626-630.
- Müller, G., Ertl, J., Gerl, M. and Preibisch, G. (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 272, 10585-10593.
- Mumm, B., Kaul, R., Heldmaier, G. and Schmidt, I. (1989) Endogenous 24-hour cycle of core temperature and oxygen consumption in week-old Zucker rat pups. *J Comp Physiol*, 159, 569-575.
- Nedergaard, J. and Cannon, B. (1998) Brown adipose tissue: development and function. In: *Fetal and neonatal physiology*. Polin, R.A. and Fox, W.F. (eds.), W.B. Saunders Company.
- Nehlig, A. (1999) Age-dependent pathways of brain energy metabolism: the suckling rat, a natural model of the ketogenic diet. *Epilepsy Res*, 37, 211-221.
- Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984): Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64, 1-64.
- Noack, S., Besch, W., Komolov, I. and Hahn, H.J. (1982) The effect of litter size on the development of the endocrine rat pancreas. *Acta biol med germ*, 42, 1179-1184.
- Novin, D. (1975) Visceral mechanisms in the control of food intake. In: *Hunger: Basic mechanisms and clinical implications*. Novin, D. (ed.), pp. 357-367, New York, Raven Press.
- Novin, D. (1983) The integration of visceral information in the control of feeding. *J Auton Nerv Syst*, 9, 233-246.
- Nüßlein, B., Kaul, R. and Schmidt, I. (1989) Absence of 24-hour core temperature cycle in rat pups artificially reared under thermoneutral conditions. In Mercer, J.G. (ed.) *Thermal Physiology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 315-320.
- Nüßlein, B. and Schmidt, I. (1990) Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats. *Am J Physiol*, 259, R270-R276.

- Nüßlein, B. (1992) Der juvenile circadiane Kerntemperatur-Rhythmus von Ratten: Physiologische Grundlagen und synchronisierende Faktoren. *Dissertation*, 1992.
- Nüßlein-Hildesheim, B. and Schmidt, I. (1994a) Is the circadian core temperature rhythm of juvenile rats due to a periodic blockade of thermoregulatory thermogenesis? *Pflügers Arch*, 427, 450-454.
- Nüßlein-Hildesheim, B. and Schmidt, I. (1994 b) Norepinephrine-induced phase shifts of the juvenile circadian core temperature rhythm in rat pups. In: *Thermal Balance in Health and Disease*. Zeisberger, E., Schönbaum, P. and Lomax, P. (eds.), Birkhäuser, Basel, pp. 175-180.
- O'Brien S, N., Welter, B.H. and Price, T.M. (1999) Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun*, 259, 695-698.
- Ohata, H., Suzuki, K., Oki, Y. and Shibasaki, T. (2000) Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res*, 861, 1-7.
- Olbort, M. (1998) Auswirkungen von einer oder zwei Kopien des Leptinrezeptordefektes fa (fatty) auf die Körperzusammensetzung und den Plasma-Leptinspiegel von Ratten im Säuglingsalter. *Dissertation*, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I. and Barsh, G.S. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, 278, 135-138.
- Olney, J.W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164 (880), 719-721.
- Olney, J.W. (1971) Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30, 75-90.
- Olney, J.W., Rhee, V. and Gubareff, T.D. (1977) Neurotoxic effects of glutamate on mouse area postrema. *Brain Res*, 120, 151-157.
- Parkes, A.S. (1926) The growth of young mice according to size of litter. *Ann Appl Biol*, 13, 374-394.
- Paxinos, G. (1995) *The Rat Nervous System*, Academic Press.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. and Collins, F. (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540-543.

- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Healy, D., Hecht, R., Winters, D. and McCaleb, M. (1998) Efficacy of exogenous recombinant murine leptin in lean and obese 10- to 12-month-old female CD-1 mice. *Am J Physiol*, 275, R950-959.
- Perusse, L., Chagnon, Y.C. and Bouchard, C. (1998) Etiology of massive obesity: role of genetic factors. *World J Surg*, 22, 907-912.
- Peterson, G.L. (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol*, 91, 95-119.
- Pighetti, G.M., Hitt, D.C. and Gimble, J.M. (1999) Leptin: Its role in hematopoiesis and bone formation. *J Clin Ligand Assay*, 22, 239-241.
- Pizzi, W.J. and Barnhart, J.E. (1976) Effects of monosodium glutamate on somatic development, obesity and activity in the mouse. *Pharmacol Biochem Behav*, 5, 551-557.
- Plagemann, A., Heidrich, I., Götz, F., Rohde, W., and Dörner, G. (1992) Lifelong Enhanced Diabetes Susceptibility and Obesity after temporary Intrahypothalamic Hyperinsulinism during Brain Organization. *Exp Clin Endocrinol*, 99, 91-95.
- Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R., Rohde, W. and Dörner, G. (1997) Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia*, 40, 1094-1100.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W. and Dörner, G. (1999a) Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain Res*, 818, 160-163.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Waas, T., Melchior, K., Ziska, T., Rohde, W. and Dörner, G. (1999b) Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol*, 11, 541-546.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Janert, U., Melchior, K., Rohde, W., and Dörner, G. (1998) Morphological Alterations of Hypothalamic Nuclei due to intrahypothalamic Hyperinsulinism in Newborn Rats. *Int J Devl Neuroscience*, 17 (1).
- Planche, E., Joliff, M., de Gasquet, P. and Lelievre, X. (1983) Evidence of a defect in energy expenditure in 7-day-old Zucker rat (fa/fa). *Am J Physiol*, 245, E107-E113.
- Poon, T.K.-Y. and Cameron, D.P. (1978) Measurement of oxygen consumption and locomotor activity in monosodium glutamate-induced obesity. *Am J Physiol*, 234, E532-E534.
- Pu, S., Dube, M.G., Xu, B., Kalra, P.S. and Kalra, S.P. (1998) Induction of Neuropeptide Y (NPY) gene expression in novel hypothalamic sites in association with transient hyperphagia and body weight gain. In Society, E. (ed.) *80 th Annual Meeting of the Endocrine Society*, Neworleans, pp. 435-436.

- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R. and Maratos-Flier, E. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380, 243-247.
- Rafael, J. and Herling, A.W. (2000) Leptin effect in ob/ob mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation. *Am J Physiol*, 278, R790-R795.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A. (1963) The glucose Fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of Diabetes Mellitus. *Lancet*, 1, 785-789.
- Rauch, M., Riediger, T., Schmid, H.A. and Simon, E. (2000) Orexin A activates leptin-responsive neurons in the arcuate nucleus. *Pflugers Arch*, 440, 699-703.
- Ravelli, G.P., Zena, M.S., Stein, A. and Susser, M.W. (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 295, 349-353.
- Rayner, D.V., Dalglish, G.D., Duncan, J.S., Hardie, L.J., Hoggard, N. and Trayhurn, P. (1997) Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. *Am J Physiol*, 273, R446-R450.
- Reaven, G.M.(1988) Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*, 37, 1595-1607.
- Redlin, U., Nuesslein, B. and Schmidt, I. (1992) Circadian changes of brown adipose tissue thermogenesis in juvenile rats. *Am J Physiol*, 262, R504-R508.
- Rolland-Cachera, M.F., Deheeger, M., Guillaond-Bataille, M., Avons, P., Patois, E. and Sempe M. (1987) Tracking the development of adiposity from one month of age to adulthood. *Ann Hum Biol*, 14 (3), 219-229.
- Rose, G.H. and Ellingson, R.J. (1970) *Ontogenesis of Evoked Potentials*. Charles C. Thomas, Springfield.
- Rosenbaum, M., Nicolson, M., Hirsch, J., Heymsfield, S.B., Gallagher, D., Chu, F. and Leibel, R.L. (1996) Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol and Metab*, 81, 3424-3427.
- Rosenbaum, M., Leibel, R.L. and Hirsch, J. (1997) Obesity. *N Engl J Med*, 337, 396-407.
- Rosenwasser, A.M. and Adler, N.T. (1986) Structure and function in circadian timing systems: evidence for multiple coupled circadian oscillators. *Neurosci & Biobehav Rev*, 10 (4), 431-448.
- Rusak, B. and Zucker, I. (1979) Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev*, 59 (3), 449-526.

- Sahu, A., Kalra, S.P., Crowley, W.R. and Kalra, P.S. (1988) Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res*, 457, 376-378.
- Sakurai, T. (1999) Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept*, 85, 25-30.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R.S., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. and Yanagisawa, M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573-585.
- Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B. and Auwerx, J. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 377, 527-529.
- Saper, C.B., Loewy, A.D., Swanson, L.W. and Cowan, W.M. (1976) Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res*, 117, 305-312.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K. and Nakao, K. (1997) The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett*, 224, 149-152.
- Sawchenko, P.E. (1998) Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol*, 402, 435-441.
- Sawchenko, P.E. and Swanson, L.W. (1983) The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Prog Brain Res*, 60, 19-29.
- Schioth, H.B., Muceniece, R. and Wikberg, J.E. (1997) Characterization of the binding of MSH-B, HB-228, GHRP-6 and 153N-6 to the human melanocortin receptor subtypes. *Neuropeptides*, 31, 565-571.
- Schmidt, I. (2000) The role of the juvenile thermoregulatory thermogenesis in the development of normal energy balance or obesity. In: *Thermotherapy: Principles and Practice-Applications in Neoplasia, Inflammation and Pain*. Kosaka, M., Sugahara, T., Schmidt, K.L., Simon E. (eds). Springer Verlag, Tokyo.
- Schmidt, I., Döring, H., Stehling, O., Nuesslein-Hildesheim, B., Steinlechner, S. and Schwarzer, K. (1998) Leptin disinhibits rather than stimulates sympathetically mediated energy expenditure. In: *Leptin: the Voice of Adipose Tissue*. Blum, W.F., Kiess, W., Rascher, W. (eds). J & J Bath Verlag, Heidelberg, Leipzig.
- Schmidt, I., Kaul, R. and Carlisle, H.J. (1984) Body temperature of huddling newborn Zucker rats. *Pflugers Arch*, 401, 418-420.

- Schmidt, I., Kaul, R. and Heldmaier, G. (1987) Thermoregulation and diurnal rhythms in 1-week-old rat pups. *Can J Physiol Pharmacol*, 65, 1355-1364.
- Schubert, M. (1991) Computergestützte Meßdatenerfassung an physiologischen Vorgängen. *Diplomarbeit*, FB Elektrotechnik II. Fachhochschule Gießen-Friedberg, Gießen-Friedberg.
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D., Jr., Woods, S.C., Seeley, R.J. and Weigle, D.S. (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, 45, 531-535.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P. and Baskin, D.G. (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46, 2119-2123.
- Schwarzer, K., Döring, H. and Schmidt, I. (1997) Different physiological traits underlying increased body fat of fatty (fa/fa) and heterozygous (+/fa) rats. *Am J Physiol*, 272, E100-106.
- Scott, J.P. (1962) Critical periods in behavioral development. *Science*, 138, 949-959.
- Seeley, R.J., Grill, H.J. and Kaplan, J.M. (1994) Neurological dissociation of gastrointestinal and metabolic contributions to meal size control. *Behav Neurosci*, 108, 347-352.
- Seeley, R.J., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Burn, P., Thiele, T.E., van Dijk, G., Baskin, D.G. and Schwartz, M.W. (1997) Melanocortin receptors in leptin effects [letter]. *Nature*, 390, 349.
- Seidell, J.C. (1997) Time trends in obesity: an epidemiological perspective. *Horm Metab Res*, 29, 155-158.
- Serdula, M.K., Ivery, D., Coates, R.J., Freedman, D.S., Williamson, D.F. and Byers, T. (1993) Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med*, 22, 167-177.
- Sherwood, N.M. and Timirias, P.S. (1970) *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. University of California Press, Berkeley.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E. (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*, 396, 670-674.
- Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O. and Nakai, Y. (1998) Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett*, 243, 41-44.
- Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. and Flores-Riveros, J.R. (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281, 1683-1686.

- Simon, E. (1997) *Wärmehaushalt und Temperaturregulation*. Springer Verlag, Berlin.
- Simon, E., Pierau, F.K. and Taylor, D.C. (1986) Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation. *Physiol Rev*, 66, 235-300.
- Skultetyova, I., Kiss, A. and Jezova, D. (1998) Neurotoxic lesions induced by monosodium glutamate result in increased adenopituitary proopiomelanocortin gene expression and decreased corticosterone clearance in rats. *Neuroendocrinology*, 67, 412-420.
- Slieker, L.J., Sloop, K.W., Surface, P.L., Kriauciunas, A., LaQuier, F., Manetta, J., Bue-Valleskey, J. and Stephens, T.W. (1996) Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, 271, 5301-5304.
- Smedh, U., Hakansson, M.L., Meister, B. and Uvnas-Moberg, K. (1998) Leptin injected into the fourth ventricle inhibits gastric emptying. *Neuroreport*, 9, 297-301.
- Spina, M., Merlo-Pich, E., Chan, R.K., Basso, A.M., Rivier, J., Vale, W. and Koob, G.F. (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*, 273, 1561-1564.
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S. and Leibowitz, S.F. (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides*, 7, 1189-1192.
- Stanley, B.G. and Leibowitz, S.F. (1984) Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci*, 35, 2635-2642.
- Stehling, O., Döring, H., Ertl, J., Preibisch, G. and Schmidt, I. (1996) Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *Am J Physiol*, 271, R1770-1774.
- Stehling, O., Döring, H., Nuesslein-Hildesheim, B., Olbort, M. and Schmidt, I. (1997 a) Leptin does halving the body fat of lean pups are not effective in genetically obese (fa/fa) rat pups. In: *Leptin - The Voice of Adipose Tissue*. Blum, W.F., Kiess, W. and Rascher, W. (eds.), Barth, Heidelberg.
- Stehling, O., Döring, H., Nuesslein-Hildesheim, B., Olbort, M. and Schmidt, I. (1997 b) Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Pflugers Arch*, 434 (6), 694-697.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A. and et al. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377, 530-532.
- Steppan, C.M. and Swick, A.G. (1999) A role for leptin in brain development. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 600-602.
- Stern, J.S. and Johnson, P.R. (1977) Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (fa/fa). *Metabolism*, 26, 371-380.

- Stock, M.J. and Rothwell, N.J. (1986) The role of brown fat in diet-induced thermogenesis. *Int J Vit & Nutr Res*, 56 (2), 205-210.
- Storlien, L.H. and Albert, D.J. (1972) The effect of VMH lesions, lateral cuts and anterior cuts of food intake, activity level, food motivation, and reactivity to taste. *Physiol Behav*, 9, 191-197.
- Stricker, E.M., Swerdloff, A.F. and Zigmond, M.J. (1978) Intrahypothalamic injections of kainic acid produce feeding and drinking deficits in rats. *Brain Res*, 158, 470-473.
- Suga, A., Hirano, T., Kageyama, H., Kashiba, M., Oka, J., Osaka, T., Namba, Y., Tsuji, M., Miura, M., Adachi, M., Inoue, S. (1999) Rapid increase in circulating leptin in ventromedial hypothalamus-lesioned rats: role of hyperinsulinemia and implication for upregulation mechanism. *Diabetes*, 48, 2034-2038.
- Takahashi, Y., Okimura, Y., Mizuno, I., Takahashi, T., Kaji, H., Uchiyama, T., Abe, H. and K., C. (1996) Leptin induces Tyrosine Phosphorylation of cellular Proteins including STAT-1 in human renal adenocarcinoma cells, ACHN. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 859-864.
- Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K. and Nakao, K. (1996) Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-- identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 225, 75-83.
- Tang-Christensen, M., Holst, J.J., Hartmann, B. and Vrang, N. (1999) The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. *Neuroreport*, 10, 1183-1187.
- Tartaglia, L.A. (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem*, 272, 6093-6096.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J. and et al. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263-1271.
- Taylor, P.M. (1960) Oxygen consumption in newborn rats. *J Physiol*, 154, 153-168.
- Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J.W. and Bray, G.A. (1986) Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol*, 251, R1221-1227.
- Tokuyama, K. and Himms-Hagen, J. (1986) Brown adipose tissue thermogenesis, torpor, and obesity of glutamate- treated mice. *Am J Physiol*, 251, E407-415.
- Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J.G. and Rayner, D.V. (1999) Leptin: fundamental aspects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 Suppl 1, 22-28.

- Troiano, R.P., Flegal, K.M., Kuczmarski, R.J., Campbell, S.M. and Johnson, C.L. (1995) Overweight prevalence and trends for children and adolescents. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1963 to 1991. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 149, 1085-1091.
- Truett, G.E., Tempelman, R.J. and Walker, J.A. (1995) Codominant effects of the fatty (fa) gene during early development of obesity. *Am J Physiol*, 268, E15-20.
- Tsukahara, F., Uchida, Y., Ohba, K., Ogawa, A., Yoshioka, T. and Muraki, T. (1998) The effect of acute cold exposure and norepinephrine on uncoupling protein gene expression in brown adipose tissue of monosodium glutamate-obese mice. *Jpn J Pharmacol*, 77, 247-249.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, J.E., Darnell, J.E. Jr., Stoffel, M. and Friedman, J.M. (1996) Leptin activation of STAT 3 in the hypothalamus of wildtype and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics*, 14, 95-97.
- Van Heek, M., Compton, D.S., France, C.F., Tedesco, R.P., Fawzi, A.B., Graziano, M.P., Sybertz, E.J., Strader, C.D. and Davis, H.R., Jr. (1997) Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest*, 99, 385-390.
- Voits, M., Förster, S., Rödel, S., Voigt, J.P., Plagemann, A. and Fink, H. (1996) Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. *Arch Pharmacol*, 354, 374-378.
- Wang, J., Liu, R., Liu, L., Chowdhury, R., Barzilai, N., Tan, J. and Rossetti, L. (1999) The effect of leptin on Lep expression is tissue-specific and nutritionally regulated. *Nature Medicine*, 5, 895-899.
- Watson, S.J. and Akil, H. (1979) The presence of two alpha-MSH positive cell groups in rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol*, 58, 101-103.
- Widdowson, E.M. and McCance, R.A. (1960) Some effects of accelerating growth I. General somatic development. *Proc Roy Soc*, 152, 188-206.
- Wiesner, E. and Ribbeck, R. (1983) *Wörterbuch der Veterinärmedizin*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Wilkinson, M., Morash, B. and Ur, E. (2000) The Brain is a source of leptin. In: *Neuroendocrinology of Leptin*. Ur, E., Grossmann, A.B. (eds.), Vol. 26, Karger, London.
- Wilson, B.D., Ollmann, M.M. and Barsh, G.S. (1999) The role of agouti-related protein in regulating body weight. *Mol Med Today*, 5, 250-256.
- Withers, P.C. (1977) Measurement of VO₂, VCO₂ and evaporative water loss with a flow-through mask. *J Appl Physiol*, 42, 120-123.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Jr. and Schwartz, M.W. (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280, 1378-1383.

- Wu-Peng, X.S., Chua, S.C., Jr., Okada, N., Liu, S.M., Nicolson, M. and Leibel, R.L. (1997) Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat. *Diabetes*, 46, 513-518.
- Wurtman, J.J. and Miller, S.A. (1976) Effect of litter size on weight gain in rats. *J Nutr*, 106, 697-701.
- Yarnell, D.O., Knight, D.S., Hamilton, K., Tulp, O. and Tso, P. (1998) Localization of leptin receptor immunoreactivity in the lean and obese Zucker rat brain. *Brain Res*, 785, 80-90.
- Yoshida, T., Nishioka, H., Nakamura, Y. and Kondo, M. (1984) Reduced norepinephrine turnover in mice with monosodium glutamate- induced obesity. *Metabolism*, 33, 1060-1063.
- Yoshida, T., Nishioka, H., Nakamura, Y., Kanatsuna, T. and Kondo, M. (1985) Reduced norepinephrine turnover in brown adipose tissue of pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. *Life Sci*, 36, 931-938.
- Yoshioka, K., Yoshida T. and Kondo, M. (1991) Reduced brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate in pre-obese mice treated with monosodium-L-glutamate. *Endocrinol Jpn*, 38 (1), 75-79.
- Yoshioka, K., Yoshida, T. and Kondo, M. (1989) Effect of acute cold-exposure on norepinephrine turnover and thermogenesis in brown adipose tissue and metabolic rate in MSG-induced obese mice. *Jpn J Physiol*, 39, 957-962.
- You, S., Gotz, F., Rohde, W. and Dorner, G. (1990) Early postnatal overfeeding and diabetes susceptibility. *Exp Clin Endocrinol*, 96, 301-306.
- Zamorano, P.L., Mahesh, V.B., De Sevilla, L.M., Chorich, L.P., Bhat, G.K. and Brann, D.W. (1997) Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*, 65, 223-228.
- Zhang, Y., Hufnagel, C., Eiden, S., Guo, K.Y., Diaz, P., Leibel, R.L. and Schmidt, I. (2001) Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups. *Physiol Genomics*, 4, 189-199.
- Zhang, Y., Olbort, M., Schwarzer, K., Nuesslein-Hildesheim, B., Nicolson, M., Murphy, E., Kowalski, T.J., Schmidt, I. and Leibel, R.L. (1997) The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 240, 492-495.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

Zhou, Y.T., Shimabukuro, M., Koyama, K., Lee, Y., Wang, M.Y., Trieu, F., Newgard, C.B. and Unger, R.H. (1997) Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 6386-6390.

Zucker, L.M. and Zucker, T.F. (1961) Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered*, 52, 275-278.

9. DANKSAGUNG

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

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. I. Schmidt für die Überlassung des Themas und die Betreuung sowie ihren Einsatz während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. E. Simon für die Genehmigung, die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, für die Betreuung und Hilfestellung hinsichtlich statistischer Problemlösungen und für die freundliche Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Diener bin ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen dankbar.

Mein Dank gilt ferner Herrn Dr. Thomas Hübschle, der die immunhistochemischen Versuche betreut, mich fortwährend bei der Abfassung der Dissertation unterstützt und sie korrigiert hat.

Weiterhin möchte ich auch Herrn Prof. W. Meyerhof danken, der mir einen Gastaufenthalt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam ermöglicht hat, außerdem Herrn Prof. Dr. R. Gerstberger, der immer ein offenes Ohr hatte und oft zur Problemlösung beitrug.

Mein weiterer Dank gilt den Kolleginnen und Kollegen, die einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben oder einfach nur für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten:

Frau Dr. Barbara Nüßlein-Hildesheim für die intensive Einarbeitung in die Methode der künstlichen Aufzucht, für Ihre Unterstützung und fruchtbare Zusammenarbeit sowie des weiteren: Roswitha Bender, Nicole Christ, Heiko Döring, Sandra Eiden, Diana Fuchs, Andrea Fritz, Kristiane Hudl, Carmen Hufnagel, Susanne Jursch, Irene Küchenmeister, Matthias Küth, Darius Schneider, Sandra Söhler, Alexandra Steinbrück und Frau Radermacher.

Ganz besonders herzlich sei meinem Freund, Dr. Ulrich Pehl gedankt, der mit sehr viel Geduld und Unterstützung die zahlreichen Abend-, Nacht- und Wochenendeinsätze ertrug sowie für seinen unermüdlichen Einsatz und seine Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur der Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für Ihre Unterstützung und die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit.

