

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Veränderungen des Insulinmetabolismus und der synaptischen  
Plastizität des Hippocampus durch Diäten verschiedener Fett- und Zuckergehalte

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Rebecca Alice Koch

aus Wuppertal

promoviert am 15. Februar 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. rer. nat. T. Mikailovna

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch, Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek, Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother, Frau Dr. med Lisa Schmitz und Frau Christina Vohlen.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Aufzucht, Pflege und Fütterung sowie die anschließende Tötung und Präparation der Mäuse, deren Gehirne und Hippocampi in dieser Arbeit zur Verfügung standen, erfolgte ohne meine Mitarbeit, insbesondere durch Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek, Dr. rer. nat. Sarah Appel und Marion Handwerk in der Arbeitsgruppe „Metabolismus und perinatale Programmierung“ der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln.

Dargestellte Daten vor Tötung, MicroCTs und ELISA sind nicht von mir erhoben und als solche gekennzeichnet.

Die experimentelle Arbeit (Western Blots und Immunhistochemie) an den Hippocampi sowie an den kompletten Hirnen wurde von mir selbstständig unter Anleitung von Frau Christina Vohlen, Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek und Frau Dr. med Lisa Schmitz durchgeführt.

Die Auswertung aller Daten mittels GraphPad wurde von mir selbstständig unter Anleitung von Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek durchgeführt und mit Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch, Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek, Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother und Frau Dr. med. Lisa Schmitz diskutiert.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Hergiswil, den 06.03.2023

Unterschrift:.....  
*Rebecca Alice Koch*

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Einarbeitungen, Rückmeldungen und Kritiken nachstehender Personen bedanken, ohne deren Unterstützung die Realisation dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Ich danke meinem Doktorvater Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch für die Betreuung und seine konstruktive Rückmeldung und Förderung des Fortschrittes des Projektes.

Frau Dr. rer. nat. Ruth Janoschek stand mir während des gesamten Promotionsprojektes sowohl bei der experimentellen Arbeit als auch bei der Auswertung bei Fragen und Unsicherheiten stets zur Seite. Ich danke ihr für ihr zuverlässiges Beiseitestehen, für den konstruktiven Austausch und für die kritische Betrachtung meiner Ergebnisse und die Anregung zu neuer Ideengebung.

Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother und Frau Dr. med. Lisa Schmitz danke ich ebenfalls dafür, dass sie mir unterstützend beiseite standen. Die mit ihnen geführten Diskussionen meiner Ergebnisse führten stets zu neuen Erkenntnissen und ihre Rückmeldungen waren für mich unerlässlich für den Fortschritt und die Fertigstellung des Projektes.

Frau Christina Vohlen möchte ich für die Einarbeitung in die laboratorischen Tätigkeiten danken. Ohne sie wäre es mir als Neuling in der Laboratoriumsmedizin nicht möglich gewesen, die Experimente adäquat durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern, die zeitgleich mit mir im Forschungspavillon der Klinik der Kinder- und Jugendmedizin an ihren Projekten gearbeitet haben, für ein allzeit positives, bestärkendes und angenehmes Arbeitsklima bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7-8
2. Einleitung	9-10
○ 2.1 Ernährung und Übergewicht	11
○ 2.2 Ernährungsbestandteile	11-12
○ 2.3 Folgeerkrankungen	12-13
○ 2.4 Hippocampus	13-14
○ 2.4.1 Hippocampus und Nahrungsaufnahme	15
○ 2.4.2 Veränderungen des Hippocampus bei Übergewicht	15-16
○ 2.5 Insulin- und Leptinmetabolismus	17-18
○ 2.6 Neuronaler Kreislauf und synaptische Plastizität	18
○ 2.6.1 Entwicklung von Neuronen	18-19
○ 2.6.2 Präsynaptische Mechanismen	19
○ 2.6.3 Postsynaptische Mechanismen einer exzitatorischen Synapse	19
○ 2.6.4 Postsynaptische Mechanismen einer inhibitorischen Synapse	20
○ 2.7 Arbeitsgrundlage	20-21
3. Material und Methoden	
○ 3.1 Übersicht Versuchsaufbau	22-23
○ 3.2 Bestimmung des Phänotyps und Quantifizierung von totalem und viszeralem Fett	23
○ 3.3 ELISA	24
○ 3.4 Proteinisolation, SDS-PAGE und Western Blot	24-26
○ 3.5 Kryoschnitte, HE-Färbung und Immunfluoreszenz	26-28
○ 3.6 Statistik	28
○ 3.7 Verwendete Geräte und Software	28-29
○ 3.8 Chemikalien, Puffer und Stammlösungen	30-32
○ 3.9 Antikörper	32-34
4. Ergebnisse	
○ 4.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	35

○ 4.1.1 Nährstoff- und Kalorienzufuhr	35-36
○ 4.1.2 Gewicht	36-37
○ 4.1.3 GTT	38-39
○ 4.1.4 MicroCT	39
○ 4.1.5 Insulin und Leptin ELISA	39-40
○ 4.2 Insulin- und Leptinmetabolismus	40-45
○ 4.3 Neurogenese	45-47
○ 4.4 Präsynapse	47-50
○ 4.5 Postsynapse	50-51
○ 4.5.1 Exzitatorische Impuls	51-55
○ 4.5.2 Inhibitorische Impuls	55-59
5. Diskussion	
○ 5.1 Phänotyp und Fettdepot	60-61
○ 5.2 Glukose- und Leptinmetabolismus	61-62
○ 5.2.1 Hippocampaler Insulinmetabolismus	62-65
○ 5.3 Neurogenese	65
○ 5.4 Präsynapse	66-67
○ 5.5 Postsynapse	67-68
○ 5.5.1 Exzitatorischer Impuls	68-69
○ 5.5.2 Inhibitorischer Impuls	69-71
○ 5.6 Limitationen und Ausblick	71-72
6. Literaturverzeichnis	73-84
7. Anhang	
○ 8.1 Tabellenverzeichnis	85
○ 8.2 Abbildungsverzeichnis	85-87

## Abkürzungsverzeichnis

70S6K	Ribosomale S6 Kinase
Ak.	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-Säure
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Cornu ammonis
CECAD	Cluster of Excellence: Cellular Stress Responses in Aging-Associated
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
DIO	Diet induced obesity
ECL	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E/I	Exzitatorisch/ Inhibitorisch
ERK	Extrazellular-signal regulierte Kinase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP 43	Growth associated protein (Wachstum assoziiertes Protein)
Gd	Gyrus dentatus
GluR1(-4)	Glutamat-Rezeptor 1(-4)
GSK 3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	High Fat Diet
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
JAK	Janus-Kinase
kcal	Kilokalorie
Ki-67	Kiel 67
MAPK	Mitogen-aktiviertes-protein-Kinase
MicroCT	Röntgen Microtomographie



mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NCD	Noncommunicable diseases (Nicht übertragbare Krankheiten)
NLGN	Neurologin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Ns	Nicht signifikant
NaVo4	Sodium orthovanadate Lösung
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PI3	Phosphoinositid-3
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD-95	Postsynaptic density protein 95 (Postsynaptisches Dichteprotein 95)
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
SD	Standard diet
SDS(-PAGE)	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophorese
SNAP-25	Synaptosomal assoziiertes protein 25
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
Stat3	Signal Transduktor und Aktivator von Transkription 3
TBST	Tris buffered saline with Tween (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VAMP	Synaptic vesicle protein synaptobrevin
vGAT	Vesikulärer Gamma-Aminobuttersäure Transporter
vGLUT2	Vesikulärer Glutamat-Transporter 2
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

Anmerkungen: Die gezeigten Abkürzungen entsprechen den englischsprachigen Begriffen, werden aber sofern möglich ins Deutsche übersetzt

## 1. Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund der steigenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas soll im Rahmen dieses Promotionsprojektes eine quantitative und qualitative Analyse die unterschiedlichen Effekte zwei verschiedener adipogener Diäten im Mausmodell auf die hippocampale Insulinsensitivität und synaptische Plastizität beleuchten und insbesondere auf die unterschiedliche Beeinflussung zwischen den beiden adipogenen Diäten eingegangen werden.

Nach Aufzucht und Fütterung von drei Kohorten von Versuchstieren mit je einer Standarddiät (SD), einer fetthaltigen Diät (HFD) und einer zuckerreichen Diät (DIO) erfolgte an den Lebenstagen 96-103 die Blut- und Organentnahme. Untersucht wurden neben phänotypischen Daten der Tiere die Blutseren mittels ELISA auf Insulin und Leptingehalt. In den Hippocampi der Tiere wurden mittels Western Blot und mittels Immunhistochemie mit dem Insulinstoffwechsel in Zusammenhang stehende Proteine quantifiziert und Marker der synaptischen Proliferation und Plastizität untersucht. Die Induktion eines adipogenen Phänotyps ist sowohl mit Fütterung der HFD als auch mit der DIO gelungen. HFD und DIO- Tiere präsentierten beide Hyperinsulinämie, Hyperleptinämie sowie einen gestörten Glukosemetabolismus in vivo, wobei der Effekt bei den DIO-Tieren stärker ausgeprägt war. Sowohl in der HFD als auch in der DIO-Gruppe ergaben sich Hinweise, die auf eine hippocampale Insulinresistenz hindeuteten. Hier war allerdings die Abgrenzung zum Effekt einer möglicherweise vorliegenden Leptinresistenz schwierig. Es ergaben sich insbesondere keine abgrenzbaren unterschiedlichen Effekte unter den beiden adipogenen Diäten, obwohl die Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie durch die DIO stärker ausgeprägt war. Leider blieb die Untersuchung hinsichtlich weitere im Zusammenhang mit dem Leptinmetabolismus stehender Proteine ohne Erfolg, dieser hätte noch eine weitere Differenzierung zwischen Effekten der Hyperinsulinämie und Hyperleptinämie erlaubt.

Eine Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese wurde durch die Fütterung mit beiden adipogenen Diäten nicht nachgewiesen.

Bei der Evaluation des Effektes der HFD und DIO auf synaptische Plastizität ergaben sich Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Beeinflussung. Die zucker- und fettreiche DIO induzierte eine Verringerung von Synaptophysin präsynaptisch sowie eine Verminderung von Neuroligin 1 und 3 postsynaptisch an exzitatorischen Synapsen, welche ihrerseits wahrscheinlich die verminderte Konzentration des NMDA1-Rezeptors verursachte. Die HFD induzierte dagegen eine Reduktion von SNAP25 präsynaptisch sowie eine Verringerung von Neuroligin 2 postsynaptisch, welche mit einer verminderten Menge des GABA A-Rezeptors einherging. Beide adipogenen Diäten führten durch unterschiedliche Beeinflussung prä- und postsynaptischer Marker zu einer Imbalance des sensibel aufeinander abgestimmten Verbundes exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen. Die Literatur zeigt, dass dies mit der E/I Imbalance assoziierten Erkrankungen wie Schizophrenie oder Autismusspektrumstörungen

einhergehen könnte. Die HFD wirkt über die Veränderung der gabaergen Achse, während die DIO über die Beeinflussung der glutamatergen Achse wirkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine zentrale Insulinresistenz oder Beeinflussung der Neurogenese nicht gezeigt werden konnte, wohingegen sich bei beiden adipogenen Diäten eine Beeinflussung prä- und postsynaptischer Synapsen fanden. Eine zuckerreiche Diät hat dabei Einfluss auf andere Mechanismen wie eine fettreiche Diät, wobei die Kalorienzufuhr hier nachrangig war, da diese bei den Tieren der SD-Diät am höchsten war und nicht wie zu erwarten bei den Tieren, welche die HFD oder DIO gefüttert bekamen.

Um eine optimale Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zu gewährleisten, sollte bei einer Literaturrecherche darauf geachtet werden, welche Zusammensetzung die jeweiligen verwendeten adipogenen Diäten hatten. Vor der Durchführung einer experimentellen Nahrungsinterventionsstudie sollte überlegt werden, welche Diät verwendet wird, und bei Aufweisung von signifikanten Ergebnissen sollte bedacht werden, dass die Ergebnisse nicht generell bei adipogenen Diäten zu beobachten sind, sondern nur bei der verwendeten Diät. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass die Beeinflussung des hippocampalen Insulinstoffwechsels und der synaptischen Plastizität unabhängig von der Kalorienzufuhr und abhängig von der Zusammensetzung der Diät erfolgt.

## 2. Einleitung

### 2.1 Ernährung und Übergewicht

Eine unausgewogene Bilanz von Energieverbrauch und Energiezufuhr hat in den vergangenen Jahrzehnten zu einem massiven Anstieg der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas geführt. Während 1975 weltweit noch Untergewicht bei Frauen und Männern doppelt bzw. vierfach so verbreitet war wie Adipositas, überstieg die Prävalenz Adipöser 2004 bzw. 2011 die Prävalenz Untergewichtiger. Eine Metaanalyse der NCD Risk Factor Collaboration zeigte, dass 2014 schätzungsweise 14,9% bzw. 10,8% aller Frauen bzw. Männer weltweit Adipositas aufwiesen (NCD Risk Factor Collaboration 2016).

Ein großer Anteil dieser epidemiologischen Veränderungen basiert auf der Entwicklung von Adipositas in Industrienationen wie z.B. Deutschland. Insgesamt 53.5% aller Erwachsene gelten in Deutschland als übergewichtig. Die Prävalenz von Adipositas ist auf 19% gestiegen, was insbesondere auf der Zunahme von Adipositas in der Altersgruppe von 45 bis 64 gründet (Schienkiewitz et al. 2022). Als quantitative Maßeinheit wird für Unter- und Übergewicht der sogenannte Body-Mass-Index (BMI) verwendet. Gemäß der Klassifikation der WHO ist ein BMI von unter 18,5 kg/m<sup>2</sup> als Untergewicht definiert, ein BMI von 25-30 kg/m<sup>2</sup> ist als Präadipositas einzuordnen und bei über 30kg/m<sup>2</sup> spricht man von Adipositas. Letztere ist in drei verschiedene Grade zu unterteilen (siehe Tabelle 1) (WHO 2005).

Bezeichnung	BMI in kg/m <sup>2</sup>
Untergewicht	unter 18,5
Präadipositas	25-30
Adipositas Grad 1	30-35
Adipositas Grad 2	35-40
Adipositas Grad 3	über 40

Tabelle 1: Adipositas und BMI

### 2.2 Ernährungsbestandteile

Kohlenhydrate, Fette und Proteine sind als Hauptbestandteile der Ernährung die drei Säulen der Energiezufuhr. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt, der optimale tägliche Energiebedarf solle zur Hälfte aus Kohlenhydraten, zu 30% aus Fetten und der restliche Anteil aus Proteinen gedeckt

werden. Für Männer gilt ein Kalorienrichtwert von 2300 kcal und für Frauen von 1800 kcal. Ziel dieser Empfehlung ist eine Prävention von Übergewicht und Adipositas. (Hauner et al. 2012; Wolfram et al. 2015).

In der Realität zeigt sich allerdings, dass etwa 75% der Bevölkerung zu viel Fett mit einem Ungleichgewicht seitens gesättigter Fettsäuren verzehren. Der empfohlene Anteil an Kohlenhydraten wird von weniger als der Hälfte der Bevölkerung täglich verzehrt (Mensink et al. 2002). Dies bestätigt auch die nationale Verzehrstudie II, in der die durchschnittliche Nährstoffzufuhr von Männern und Frauen in Deutschland in verschiedenen Altersgruppen evaluiert wurde. Im Rahmen dieser Studie zeigte sich, dass die Fettzufuhr mit 32-36% zu hoch war und zu Lasten einer Kohlenhydratzufuhr von 43-52% und einer Proteinzufuhr von 13-15% ging. Ursache ist der bevorzugte Verzehr von tierischen Produkten zu Lasten einer zu geringen Zufuhr pflanzlicher Lebensmittel. Der Medianwert der Kalorienzufuhr lag interessanterweise bei beiden Geschlechtern unterhalb der empfohlenen Kalorienzufuhr pro Tag (Krems et al. 2013). Bei der Betrachtung der Entstehung von Übergewicht sollte folglich nicht nur die tägliche Kalorienzufuhr, sondern auch die Zusammensetzung der Nahrung von Interesse sein.

### **2.3 Folgeerkrankungen**

Übergewicht ist ein Risikofaktor für eine Reihe somatischer Folgeerkrankungen. Erhöhtes Körpergewicht steigert das Risiko für einen Schlaganfall (Rexrode et al. 1997) und ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen von milder Beschwerdesymptomatik bei Angina pectoris bis zum Tod in Folge kardiovaskulärer Erkrankungen (Hubert et al. 1983). Vor allem länger bestehendes Übergewicht begünstigt die Entstehung von Hyperinsulinämie und führt konsekutiv zu einer Insulinresistenz des Gewebes, welche die Aufnahme von Glukose in die Zellen vermindert. Aus dieser Hyperinsulinämie kann sich der Diabetes Typ 2 entwickeln, dessen Schweregrad der Ausprägung durch Übergewicht und Ernährung beeinflusst wird (Wannamethee und Shaper 1999). Auch arterielle Hypertonie ist positiv mit einem erhöhten BMI korreliert (Cohen 2017). Diese als metabolisches Syndrom bekannte Konstellation von Adipositas und Folgeerkrankungen erhöht das Risiko zu versterben im Vergleich zu alleinigem Vorhandensein von kardiovaskulären Folgeerkrankungen und ist eine der führenden Todesursachen (DECODE Study Group 2007).

Neuere Studien zeigen darüber hinaus eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Übergewicht und psychischen Erkrankungen. Das Auftreten und Ausmaß von Übergewicht in der Adoleszenz führt bedingt durch negative Gedankenmuster und negativen Selbstwert häufiger zur Diagnose einer Depression oder Angststörung (Rankin et al. 2016). Das Ausmaß an Insulinresistenz korreliert mit dem Schweregrad der Ausprägung der Depression (Singh et al. 2019).

Des Weiteren tritt Übergewicht bei Patienten mit Bipolarer Störung, oder Schizophrenie fast doppelt so häufig auf, wie in der Allgemeinbevölkerung. Bedingt wird dies zum Einen durch eine Kombination von Faktoren, welche die Krankheit verursachen, zum Anderen durch Verhaltensmuster, die durch die Krankheit entstehen sowie durch die Einnahme von Antidepressiva, deren unerwünschte Nebenwirkung auch eine Gewichtszunahme zur Folge hat (Fiedorowicz et al. 2008).

Auch der Verlust kognitiver Fähigkeiten wie die Entwicklung einer Demenz wird durch das Vorliegen von Übergewicht und Begleiterkrankungen, wie Diabetes Typ 2, verstärkt (Verdile et al. 2015). Dieser Zusammenhang wurde bereits erstmalig durch die Rotterdam Studie 1996 impliziert (Ott et al. 1996). Bei Patienten mit Diabetes Typ 1 sind diese Folgeerscheinungen nicht zu beobachten (Lobnig et al. 2006).

Die Erforschung der Pathogenese von Übergewicht ist ein wichtiger Angriffspunkt präventiver und therapeutischer Maßnahmen. Zum Verständnis der Pathogenese liegt der Fokus aktueller Forschung auf dem Zusammenhang von Übergewicht und einem z.T. auch strukturell verändertem Hirnstoffwechsel. In diesem Zusammenhang liegt ein besonderes wissenschaftliches Interesse beispielsweise auf dem Hippocampus (Tan et al. 2017), der auf Grund von hoher Expression des Insulinrezeptors zu einem Angriffspunkt für pathologische Veränderungen des im Zusammenhang mit Adipositas veränderten Metabolismus prädisponiert ist (Doré et al. 1997).

## **2.4 Hippocampus**

Der Hippocampus liegt als einem entwicklungszeitlich gesehen, früh entstandenem Teil des Kortex, der als Archikortex bezeichnet wird, tief in der weißen Substanz beidseits im Bereich der Temporallappen. Zusammen mit Indusium griseum und Fornix bildet er das limbische System. Der Hippocampus selbst kann in Subiculum, Gyrus dentatus und Cornu ammonis (CA) unterteilt werden. Das Cornu ammonis wird auch als Hippocampus im engeren Sinne bezeichnet und wird anhand seiner Morphologie, Verschaltung und Funktion in vier Unterregionen (CA 1-4) unterteilt (Schünke et al. 2015). Der Gyrus dentatus kann von innen nach außen in das Stratum granulare, in dem sich hauptsächlich glutamaterge Körnerzellen befinden, und in das Stratum moleculare internum und externum unterteilt werden. Im Cornu ammonis bildet das Stratum oriens bestehend aus hemmenden Korbzellen die innere Schicht, woran sich nach außen hin das Stratum pyramidale, hauptsächlich bestehend aus glutamatergen Pyramidenzellen, das Stratum radiatum und das Stratum lacunosum-moleculare anschließen. Gabaerge Interneurone üben in beiden Regionen einen informationsmodulierenden Einfluss aus (Stephan H. 1975).

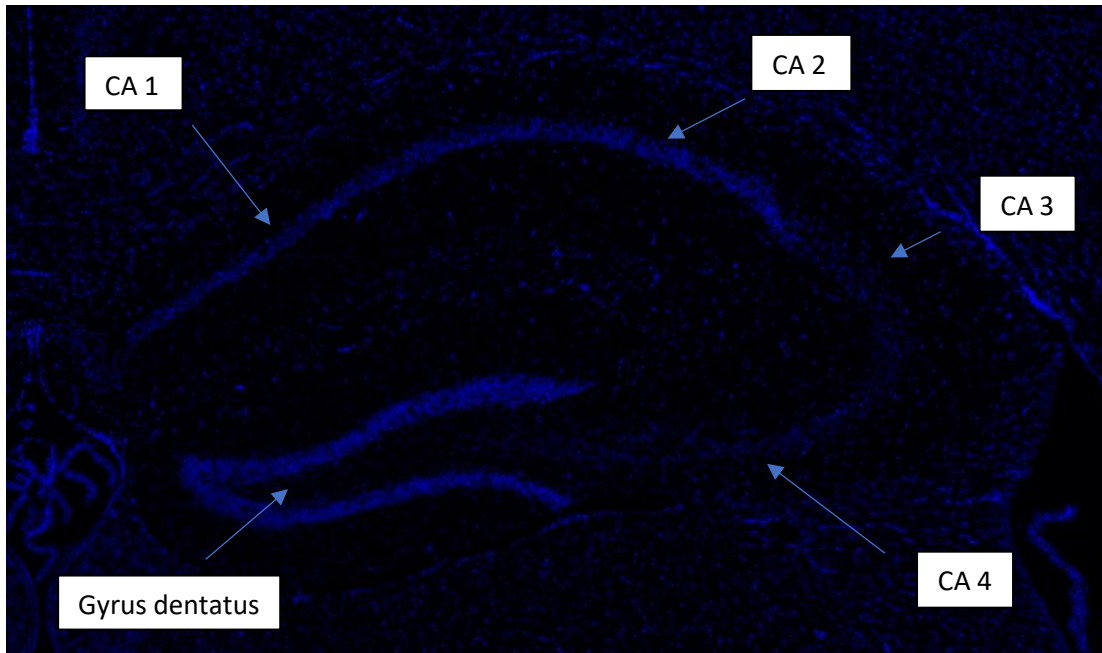


Abbildung 1:  
 Horizontalschnitt des Hippocampus der Maus angefärbt mit Zellkernfärbung Dapi

Informationsinput erhält der Hippocampus hauptsächlich über den entorhinalen Kortex in das Stratum moleculare des Gyrus dentatus (Suzuki und Amaral 1994). Von hier erfolgt die Verschaltung über das Stratum granulare des Gyrus dentatus über Moosfasern in das Stratum radiatum der CA3 Region (Rolls 2018). Die CA3 Regionen beider Hemisphären tauschen Informationen aus, was mit der Bildung des Gedächtnisses assoziiert wird (Rolls 2018; Kondo et al. 2009). Bei Funktionsausfall der hippocampalen Funktion besteht ein Unvermögen der Bildung neuer Gedächtnisinhalte (Scoville und Milner 1957). CA3 Neurone projizieren u.a. zur Fornix, welche zum Hirnstamm projiziert, und bilden darüber hinaus sogenannte Schaffer-Kollaterale zum Stratum pyramidale von CA1, welche an der Bildung neuer Gedächtnisinhalte beteiligt sind (Kondo et al. 2009). Das Stratum lacunosum moleculare von CA1 erhält Afferenzen auch direkt aus der enthorinalen Rinde. CA1 Neurone verschalten in die Fornix und in das Subiculum, welches in die Großhirnhemisphären projiziert (Rolls 2018). CA1 Neurone sind bei Nagern mit der Orientierung assoziiert (O'Keefe und Dostrovsky 1971).

Über die Projektion zur Fornix, welche in die Corpora mamillaria verschaltet, ist der Hippocampus Teil des 1937 von Papez postulierten Papez-Neuronen Kreises, welcher die neuronale Grundlage von Emotionen bildet (Papez 1995). So ist bei Menschen nach schweren emotionalen Traumata eine Reduktion des hippocampalen Volumens zu beobachten (Woodward et al. 2006; Herzog et al. 2020). Durch den Hippocampus erlernte Gedächtnisinhalte werden dem deklarativen Gedächtnis, einem Teil des Langzeitgedächtnisses, zugeschrieben. Hierunter fallen das semantische Gedächtnis zur Abspeicherung von Faktenwissen sowie das episodische Gedächtnis, welches autobiographische Inhalte enthält (Eichenbaum und Cohen 2014).

### **2.4.1 Hippocampus und Nahrungsaufnahme**

Schon in den fünfziger Jahren begann die Erforschung der Ursachen zur Stimulation von Nahrungsaufnahme. Hier stand besonders der Hypothalamus im Vordergrund der Forschung (Strominger 1947). Dessen Rolle in der Integration von Informationen über den Sättigungszustand des Magen-Darm-Traktes, peripherer Signale insbesondere aus dem Fettgewebe sowie emotionaler Akzentuierung von Nahrungsaufnahme wird in vielen Studien und Reviews beschrieben und diskutiert (Abdalla 2017). In dieser Arbeit soll der Fokus auf den Hippocampus gelegt werden, der ebenfalls eine Schlüsselfunktion in der zentralen Steuerung von Nahrungsaufnahme einnimmt.

Der Hippocampus beeinflusst die Aufnahme von Nahrung durch Integration und Verknüpfung von extrinsischen und intrinsischen Informationen. Externe Stimuli wie Geruch, Geschmack und visuelle Wahrnehmung werden kortikal verschaltet und gelangen u.a. zur entorhinalen Rinde. Von hier erfolgt die oben beschriebene Innervation weiterer hippocampaler Anteile. Informationen über den Füllungszustand des Magen-Darm-Trakts sowie endokrine Signale, wie z.B. Leptin oder Ghrelin, liefern Informationen über den Energiebedarf des Körpers und gelangen über die ventral gelegenen CA-Regionen direkt in den Hippocampus. Hier erfolgt die Akzentuierung der Informationen mit Inhalten des Gedächtnisses (Kanoski und Grill 2017). So wird die Menge und Häufigkeit von Nahrungsaufnahme beeinflusst. Bei Patienten mit einer Schädigung des Hippocampus, wie es bei dem Vorliegen einer Amnesie der Fall ist, konnte gezeigt werden, dass diese nach einer ausreichend sättigenden Nahrungsaufnahme bei Präsentation weiterer Nahrung diese weiterhin konsumierten. Dies zeigt, dass die Erinnerung an die letzte Mahlzeit maßgeblich an der Entscheidung zu weiterer Nahrungsaufnahme beteiligt ist (Rozin et al. 1998).

### **2.4.2 Veränderungen des Hippocampus bei Übergewicht**

Durch Nachweis des Zusammenhangs reduzierter physischer Aktivität und erhöhtem Risiko für Degeneration hippocampal assoziierter, kognitiver Fähigkeiten wie der Gedächtnisleistung in klinischen Studien, ist in den letzten Jahren die Erforschung von zu Grunde liegenden neuropathologischen Veränderungen von großem Interesse (Tan et al. 2017; Mueller et al. 2012; Migueles et al. 2020).

Proliferation und Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia führen zu einem erhöhten Entzündungszustand im Hippocampus (Tsai et al. 2018), welche z.B. das Vorliegen von degenerativen  $\beta$ -amyloid- und tau-Pathologien bei Alzheimer-Demenz verstärken. Schon eine kurze Intervention mit einer hochkalorischen Diät führt zu nachweisbaren, ungünstigen Veränderungen (Nakandakari et al. 2019). Mikroglia spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle synaptischer Plastizität, indem sie durch Phagozytose Einfluss auf den Kreislauf neuronaler Aktivität ausüben. Bei Entzündung ist dieser Vorgang erhöht, sodass es zu vermehrtem Umbau des neuronalen Netzwerkes kommt (Miller und Spencer



2014; Bondan et al. 2019). Durch Übergewicht induzierte Veränderungen im Hippocampus können auch ohne Induktion zu einer für Alzheimer typischen  $\beta$ -amyloid Pathologie zu demenzieller Entwicklung führen (Petrov et al. 2015).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Übergewicht zur Rarefizierung des zerebralen Gefäßnetzes und endothelialer Dysfunktion führt, was in Folge eine geringere Sauerstoffversorgung und einen verminderten Abtransport von toxischen Substanzen aus dem Gehirn verursacht.

Der chronisch erhöhte Entzündungszustand in Verbindung mit reduzierter synaptischer Plastizität und Akkumulation toxischer Substanzen führt zur Reduktion kognitiver Fähigkeiten. In Bezug auf den Hippocampus bedeutet dies eine Reduktion von Bildung neuer Gedächtnisinhalte und Gelerntem (Valcarcel-Ares et al. 2019).

Um zu verstehen, wie es zu diesen Pathologien kommt, ist die Erforschung zu Grunde liegender molekularer Mechanismen notwendig, welche im Folgenden genauer beleuchtet werden.

Auf Grund der bereits erwähnten hohen Expression des Insulinrezeptors im Hippocampus (Doré et al. 1997), ist insbesondere der hippocampale Glukosemetabolismus von Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin über intrazelluläre Mechanismen einen Einfluss auf die synaptische Plastizität hat (van der Heide et al. 2005). Bei Übergewicht entsteht durch vermehrte Ausschüttung von Insulin auch eine zentrale Insulinresistenz, welche in vielen Mausmodellen im Hippocampus nachgewiesen werden kann (Schmitz et al. 2018; Petrov et al. 2015; Cheke et al. 2017; Stranahan et al. 2008). Zusammen mit dem beeinträchtigten Glukosemetabolismus kann eine Verminderung des Ausbaus des neuronalen Netzwerkes beobachtet werden (Calvo-Ochoa et al. 2014), was auf verminderter Neurogenese (Ramos-Rodriguez et al. 2014) und verminderter Formation von Synapsen beruht (Stranahan et al. 2008). Auch die Neurotransmission wird von hochkalorischen Diäten beeinflusst und führt zu einer Veränderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und zu einer Veränderung des postsynaptischen Signalverarbeitungsprozesses (Valladolid-Acebes et al. 2012).

Auch Leptinrezeptoren werden im adulten Hippocampus exprimiert (Guo et al. 2008). Leptin verbessert via Beeinflussung von glutamaterger Neurotransmission die synaptische Plastizität (Shanley et al. 2001) und bewirkt eine verbesserte Neurogenese (Garza et al. 2008). Analog zur Insulinresistenz kann es bei Übergewicht auch zu einer Leptinresistenz kommen, welche mit Neurodegeneration im Sinne einer Verschlechterung bei Vorliegen einer Alzheimer Pathologie assoziiert ist (Platt et al. 2016). Die Degeneration scheint reversibel zu sein und durch eine Reduktion von Übergewicht besteht die Möglichkeit einer Verbesserung der Gedächtnisleistung (Boraxbekk et al. 2015; Petrov et al. 2015). Auch im Tiermodell sind durch Übergewicht induzierte Defizite im Hippocampus reversibel (Grillo; Piroli und Evans et al. 2011), unter anderem durch Verbesserung der Insulinsensitivität (Park et al. 2019).

## 2.5 Insulin- und Leptinmetabolismus

Das in den beta-Zellen des Pankreas synthetisierte Hormon Insulin führt zur Senkung des Blut-Glukose-Spiegels über Aufnahme der Glukose in z.B. Muskel- oder Fettzellen. Insulin gelangt rezeptorvermittelt über die Blut-Hirn-Schranke (Abbott et al. 2006) und bindet auch zentral an den Insulinrezeptor und initiiert via Insulinrezeptor-Substrat u.a. den PI3K–AKT Signalweg (Thon et al. 2016). AKT wird von Insulin erst an Threonin 308, dann an Serin 473 phosphoryliert. Threonin 308 hat einen Einfluss auf das Zellüberleben, während Serin 473 einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des Insulinrezeptors ausübt (Copps und White 2012).

Ein Ziel von aktiviertem AKT, auch Proteinkinase B genannt, ist u.a. die Aktivierung des „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR), welches wiederum seinerseits einen negativen Feedback-Mechanismus auf den PI3-AKT Signalweg ausübt. Eine Überaktivierung von mTOR und die Herunterregulation des PI3-AKT-Weges steht im Zusammenhang mit Übergewicht (Tzatsos und Kandror 2006). Ein Substrat von mTOR ist die 70S6Kinase (Jenö et al. 1988), welche ihrerseits ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf den Signalweg ausübt (Manning und Cantley 2007). Ein weiteres Substrat von AKT ist GSK3 $\beta$ , auf das mTOR und 70S6Kinase ebenfalls Einfluss nehmen (Zhang et al. 2006). Der gesamte zelluläre Mechanismus dient dem Wachstum und Überleben der Zellen und steuert einer Apoptose entgegen (Manning und Cantley 2007).

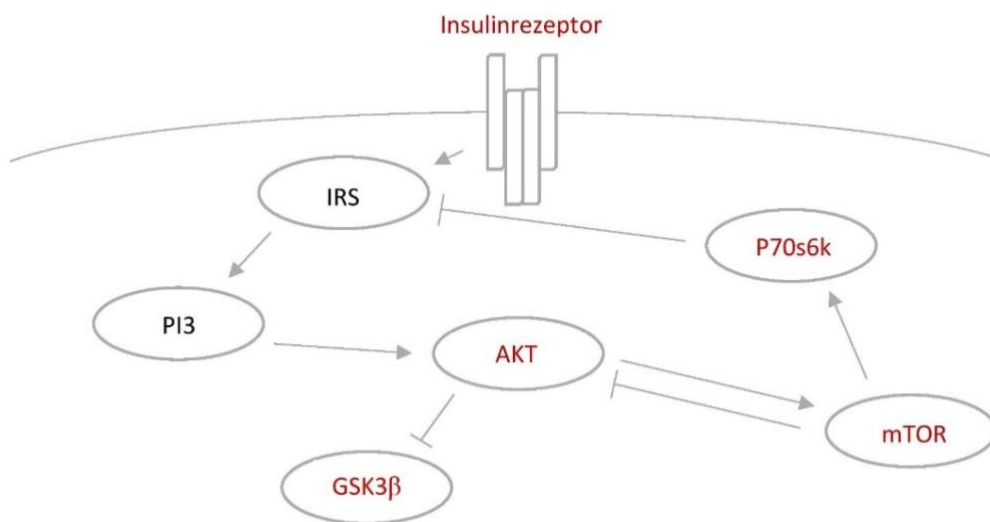


Abbildung 2

Schema der intrazellulären Insulin-Kaskade; untersuchte Proteine in rot

Leptin, hauptsächlich von Adipozyten exprimiert, reguliert das Hungergefühl nach Mahlzeiten herunter. Im Hypothalamus, welcher wie oben erwähnt die Hauptfunktion in der Integration von Informationen über den Energiehaushalt der Peripherie einnimmt, wird durch Leptin die Ausschüttung

von appetitförderndem Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-Related Peptid (AgRP) gehemmt (Baver et al. 2014). Auch im Hippocampus werden Leptinrezeptoren exprimiert (Guo et al. 2008). Leptin initiiert bei Bindung an seinen Rezeptor den JAK/ STAT Signalweg sowie analog zu Insulin PI3-Akt Signalweg über IRS/das Insulinrezeptor-Substrat (Grillo; Piroli und Junor et al. 2011; Guo et al. 2008; Garza et al. 2008). Auch der MAPK und ERK Signalweg wird von Leptin beeinflusst (Rexrode et al. 1997; Kang et al. 2020). Übergewicht führt auf Grund von vermehrtem Fettgewebe zu einer gesteigerten Expression von Leptin. Es resultiert eine Resistenz gegenüber Leptin sowie vermindertem Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke und in der Folge zu einer verminderten Unterdrückung des Hungergefühls (Baver et al. 2014).

## **2.6 Neuronaler Kreislauf und synaptische Plastizität**

Nervenzellen variieren stark in ihrer Größe, und ihre Form erlaubt ihnen die Bildung eines komplexen Netzwerks, dessen physiologische Funktion auf der Feinabstimmung vieler verschiedener molekularer Bestandteile beruht. Das Perikaryon umfasst den Zellkern und wichtige Zellorganellen. Von hier gehen die Dendriten aus, an denen andere Nervenzellen Synapsen bilden. Über das Axon wird die Information weitergegeben und auf weitere Neuronen verschaltet (Luse 1956). Der folgende Abschnitt soll die Entwicklung und Funktionsweise eines Neurons näher beleuchten, ohne dabei in die Tiefe zu gehen.

### **2.6.1 Entwicklung von Neuronen**

In den kommenden Abschnitten geht es um die Entwicklung und Funktion der Synapse. Dieser hochkomplexe Vorgang wird an dieser Stelle zur Veranschaulichung vereinfacht dargestellt.

In der Entwicklung und Ausreifung von Neuronen spielt u.a. das GAP43 eine wichtige Rolle. Als Substrat der Proteinkinase C reguliert es die Formierung der Präsynapse und die Ausreifung des Axons und ist so ein wichtiger Marker für neuronale Plastizität (Nguyen et al. 2009). Im adulten Gehirn ist GAP-43 vereinzelt in Kolokalisation mit synaptischen Vesikeln an der Präsynapse zu finden und fördert deren Mobilisation zur Plasmamembran während eines Aktionspotentials (Merino et al. 2020).

Während der Neurogenese wird der Tubulus-Apparat des Zytoskeletts von Doublecortin verstärkt. So übt Doublecortin einen modulieren Einfluss auf die Migration und die Formierung des neuronalen Netzwerkes aus. Auch im adulten Gehirn können so junge Neurone sichtbar gemacht werden und eine Aussage über das Ausmaß der stattfindenden Neurogenese getroffen werden (Francis et al. 1999; Mizuguchi et al. 1999).

Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der insbesondere während der Mitose exprimiert wird, und so eine Aussage über die Teilung und Entstehung von neuen Neuronen ermöglicht (Verheijen et al. 1989).

Zur Formierung von Synapsen binden postsynaptische Neuroligine an präsynaptische Neurexine und verursachen die Bildung einer neuen Synapse (Dean et al. 2003).

### **2.6.2 Präsynaptische Mechanismen**

Zur Kommunikation zwischen Nervenzellen erfolgt die Ausschüttung von Neurotransmittern an der Präsynapse und die Aufnahme ebendieser an der Postsynapse. Die Freisetzung der in der Präsynapse in Vesikeln gespeicherten Neurotransmitter erfolgt per Calcium-Ionen Einstrom (Lim et al. 1990). Im inaktiven Zustand reguliert Synapsin die Anzahl der vorhandenen synaptischen Vesikel und verankert diese am Zytoskelett (Schiebler et al. 1986). In Anwesenheit von Calcium-Ionen wird Synapsin phosphoryliert, und die Bindung zwischen Vesikeln und Zytoskelett wird aufgehoben (Sihra et al. 1989). Durch den Calcium-Einstrom erfolgt des Weiteren eine Aktivierung des sogenannten SNARE-Komplexes, welcher das Vesikel zur präsynaptischen Membran bewegt. Bestandteile des SNARE-Komplexes sind u.a. SNAP-25, VAMP und Syntaxin (Chen et al. 1999). Synaptophysin interagiert mit dem SNARE-Komplex via Bindung an VAMP und übt so ebenfalls einen modulierenden Einfluss auf die Freisetzung des Vesikels aus (Edelmann et al. 1995). Durch ubiquitäres Vorkommen an Synapsen wird Synaptophysin auch als quantitativer Marker für Synapsen genutzt (Calhoun et al. 1996).

Nachdem das Vesikel an die präsynaptische Membran gebunden hat, kommt es zur Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt (Yarom et al. 1985). Man unterscheidet in exzitatorische und inhibitorische Synapsen.

### **2.6.3 Postsynaptische Mechanismen einer exzitatorischen Synapse**

AMPA-Rezeptoren stellen neben NMDA-Rezeptoren den Hauptteil der postsynaptischen Glutamat-Rezeptoren einer exzitatorischen Synapse dar. Die Glutamat-Rezeptoren 1-4 (GluR1-4) sind Untereinheiten dieses Rezeptors (Matsubara et al. 1996). NMDA-Rezeptoren können ebenfalls in Untereinheiten untergliedert werden (Chanda et al. 2017; Prybylowski et al. 2002). Ihre Aktivierung führt zu Leitfähigkeitsänderungen der postsynaptischen Membran für einige Millisekunden (Mosbacher et al. 1994). Ein Teil der in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Neurotransmitter wird mittels vesikulärem Glutamat Transporter (vGLUT) wieder in die Präsynapse aufgenommen und recycelt (Henny und Jones 2006). Die Adhäsion der Prä- und Postsynapse wird u.a. über das Verankerungsprotein Neuroligin 3 gewährleistet, welches an das präsynaptische Neurexin bindet (Budreck und Scheiffele 2007). Neben Neuroligin 3 gewährleistet auch Neuroligin 1 die Adhäsion und ist im Gegensatz zu Neuroligin 3 spezifisch an der exzitatorischen Postsynapse zu finden (Song et al. 1999).

## 2.6.4 Postsynaptische Mechanismen einer inhibitorischen Synapse

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glycin-Rezeptoren stehen an inhibitorischen Synapsen für die Bindung von GABA bereit, wodurch ein inhibitorischer Impuls gesetzt wird (Macdonald und Young 1981). Es gibt sowohl GABA-A als auch GABA-B Rezeptoren, welche je nach Hirnregion unterschiedlich dicht auftreten (Albin et al. 1991). Die Verankerung der Rezeptoren wird hier über Gephyrin stabilisiert (Kneussel und Betz 2000). Ein Reuptake und Recycling der ausgeschütteten Transmitter wird mittels vesikulärem Gamma-Aminobuttersäure Transporter (vGAT) gewährleistet. Dieser ist insbesondere an Synapsen mit GABA- Rezeptoren zu finden (Chaudhry et al. 1998). Die Adhäsion der Prä- und Postsynapse wird ebenso wie bei den glutamatergen Neuronen u.a. über Bindung von Neuroligin 3 gewährleistet (Budreck und Scheiffele 2007). Daneben sichert Neuroligin 2 ebenfalls die Adhäsion der Prä- und Postsynapse und ist spezifisch für die inhibitorische Synapse (Kang et al. 2014).

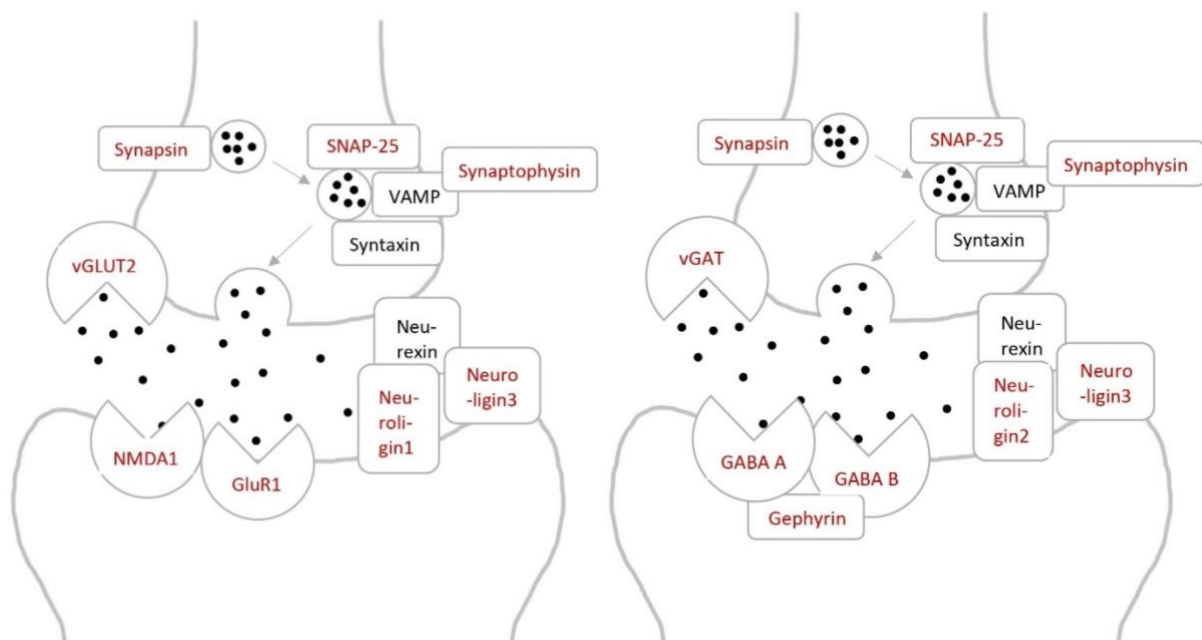


Abbildung 3  
Exzitatorische (links) und inhibitorische (rechts) Synapse; untersuchte Proteine in rot

## 2.7 Arbeitsgrundlage

Die Untersuchung von Auswirkungen einer Adipositas auf den Hippocampus ist in verschiedensten Tiermodellen bereits regelmäßiger Bestandteil wissenschaftlicher Arbeiten. Dabei wurden unterschiedlichste Methoden zur Induktion einer Adipositas verwendet. Neben der Verwendung von Pharmakologika wie Streptozocin (Zhang et al. 2008; Biessels et al. 1998), einem Toxin der pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Rakieten et al. 1963), dem Einsatz von genetisch insulinresistenten Ratten mit nicht adipösem Phänotyp (Goto et al. 1976; Lang et al. 2009), oder sogenannter Zuckerratten mit

genetischer Variation im Leptinrezeptor (Li et al. 2002; Bélanger et al. 2004), der Induktion von Adipositas via der Runterregulation des Insulinrezeptors im Hypothalamus (Grillo et al. 2007; Grillo; Piroli und Junor et al. 2011) und weiterer Methoden kamen verschiedene Diäten zum Einsatz (Robison et al. 2020; McNay et al. 2010; Stranahan et al. 2008). Meist fand lediglich die Erforschung von Unterschieden zwischen einer Methode und einer nicht adipogenen Diät statt, ein direkter Vergleich verschiedener Techniken bzw. Diäten hingegen ist bisher nur selten erfolgt, dabei bietet dies einen relevanten Mehrwert auch für die Planung folgender Forschungsarbeiten. Es fanden sich bei der Literaturrecherche nur drei Artikel, in der die Auswirkung von drei verschiedenen Diäten auf ähnliche Parameter wie in meiner Dissertation erfolgte (Greenwood und Winocur 1990; Arnold et al. 2014; Lizarbe et al. 2018).

Der Anteil von Fett, Kohlenhydraten und Protein variierte sowohl in der verwendeten HFD als auch in der SD-Gruppe unter den Studien (Stranahan 2015). Hieraus resultieren unterschiedliche Ergebnisse, und die Vergleichbarkeit der Studien wird eingeschränkt.

Vor diesem Hintergrund wird im Rahmen dieser Dissertation die Evaluation zweier verschiedener adipogener Diäten im Vergleich zu einer Standard-Diät erfolgen und insbesondere die Unterschiede zwischen den beiden adipogenen Diäten beleuchtet werden und kritisch diskutiert werden.

Basierend auf der aktuellen Literatur ergeben sich folgende Hypothesen:

- Eine adipogene Diät induziert im Tiermodell einen metabolischen Phänotyp der mit einer peripheren Insulinresistenz, Hyperinsulinämie sowie Hyperleptinämie im Sinne eines metabolischen Syndroms einhergeht.
- Eine adipogene Diät führt neben metabolischen Veränderungen auch zu zentraler Veränderung im neuronalen Stoffwechsel und der Signaltransduktion des Hippocampus.
- Eine diätinduzierte Adipositas hat einen ungünstigen Einfluss auf die synaptische Transmission und Plastizität im Hippocampus, dabei hat eine zuckerreiche Diät auf andere Mechanismen an einer Synapse Einfluss als eine fettreiche Diät.
- Die Zusammensetzung der hochkalorischen Diät hat unabhängig vom Kalorienanteil einen Einfluss auf die hippocampale Funktion.
- Veränderungen der Signaltransduktion im Hippocampus könnten klinisch apparent werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Übersicht Versuchsaufbau

Alle Tierversuche wurden von der AG Hucklenbruch-Rother unter Einhaltung der Protokollvorschriften des Landes NRW und nach den Richtlinien der Bezirksregierung Köln durchgeführt.

Im Versuchsaufbau wurden drei ausschließlich männliche Wildtyp-Mäusegruppen (C57BL/6) von je 18 Tieren zwischen Woche 3 und 14 ihres Lebens in dafür vorgesehenen Tierlaboren des Universitätsklinikums Köln unter standardisierten Bedingungen bei 22° mit den jeweils verschiedenen Diäten gefüttert. Der Wechsel des Tag- und Nacht-Rhythmus erfolgte im 12 Stunden Takt. Es wurden drei verschiedene Diäten gefüttert: die Standard-Diät (SD) des Labors, die bisher verwendete High Fat Diät (HFD) des Labors, welche den höchsten Anteil an Fett enthält, sowie eine Diet-induced-obesity Diät (DIO) gefüttert, welche laut Hersteller ein metabolisches Syndrom bei den Mäusen induzieren wird und sowohl einen hohen Fettanteil als auch hohen Zuckeranteil enthält.

Futter und Wasser erhielten die Tiere ad libitum. Die Kalorien-, Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinanteile können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Name		SD - complete feed for rats & mice	HFD - 10005791	DIO - 45 kJ% fat (Lard)
Firma		Ssniff	Altromin	Ssniff
Bestellnummer		V1534 - R/M-Maintenance	10005791	E15744-344
Metab. Energie	kcal/kg	3225	5237	4615
Metab. Energie	MJ/kg	13.5	21.9	19.3
Fett	kJ%	9	60	45
Protein	kJ%	33	16	20
Kohlenhydrate	kJ%	58	24	35
Stärke	kJ%	36.5	n/a	6.8
Zucker (Sucrose)	kJ%	4.7	12.1	21.1
Rohfett	g/kg	33	351	236
Rohprotein	g/kg	190	208	220
Rohfaser	g/kg	49	4	57
Rohasche	g/kg	64	31	53
N freie Extrakte	g/kg	541	n/a	400

Tabelle 2: Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinanteile der drei verwendeten Diäten

Die HFD besteht zu 60% aus Fett und 12.1% aus Zucker und ist in zahlreichen wegweisenden Arbeiten der Arbeitsgruppe zum Einsatz gekommen (Bae-Gartz et al. 2019; Janoschek et al, 2016; Könner et al. 2007; Schmitz et al. 2018). Die DIO besteht nur zu 45% aus Fett und weist mit 21,1% einen deutlich höheren Zuckeranteil auf, und entspricht einer häufig verwendeten Diät D12451 (Research Diets inc.), welche ein metabolisches Syndrom in den Versuchstieren erzeugen soll (Qiu et al. 2001). An den Tagen 96-103 wurden die Tiere per CO<sub>2</sub>-Narkose getötet und die Organe wurden entnommen. Fettgewebe, Pankreas, Nieren, Leber, Herz, komplette Gehirne oder Hirnregionen, welche für das Projekt von Interesse sind, sowie die Blutseren wurden schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Von Interesse für meine Arbeit sind die folgenden Gewebeproben:

1. Von je sechs der insgesamt 18 Mäuse pro Diät wurden von der Arbeitsgruppe MicroCTs angefertigt, welche Rückschlüsse auf die Körperfettzusammensetzung der Mäuse erlauben.
2. Von weiteren sechs Mäusen pro Gruppe standen zur Durchführung der Proteinanalysen und anschließenden Verwendung im Western Blot jeweils Hypothalamus und Hippocampus zur Verfügung. In dieser Dissertation liegt der Fokus auf den Ergebnissen des Hippocampus.
3. Bei den restlichen sechs Mäusen pro Gruppe wurden die Gehirne in toto reseziert, mittels Paraformaldehyd und Sucrose kryokonserviert und für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet.

### **3.2 Bestimmung des Phänotyps und Quantifizierung von totalem und viszeralem Fett**

Die Zunahme des Körpergewichts wurde während der Aufzucht der Tiere wöchentlich durch die Arbeitsgruppe erfasst. In Woche 10 erfolgte ein Glukose-Toleranz-Tests. Nach 6 Stunden Fasten und Messen der Nüchternblutglukose erfolgte, wie routinemäßig in der Arbeitsgruppe praktiziert, die intraperitoneale Injektion von 20% Glukose 10ml/kg Körpergewicht und die Messung der Blutglukose nach 15, 30, 60 und 120 Minuten (Bae-Gartz et al. 2019).

Das  $\mu$ CT wurde erstmals 1982 von Elliot und Dover angewendet und ermöglicht durch Scannen eines Versuchstieres in vivo die Erstellung eines 3D-Modells und die Ausmessung eines Organes von Interesse (Elliott und Dover 1982). Hier erfolgte die Evaluation des viszeralen und totalen Fettdepots der Mäuse. Die Durchführung der  $\mu$ CTs erfolgte durch die „Phenotyping Core Facility“ des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns in Köln unter der Leitung von Andrea Mesaros.



### **3.3 ELISA**

Alle vorhandenen Seren der Versuchstiere wurden mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) hinsichtlich der Leptin- und Insulinkonzentration analysiert (mouse leptin ELISA (EZML-82K); mouse insulin ELISA (EZRMI-13K), beide Millipore Corp., Billerica, MA). Die Analysen wurden von von Dr. rer. nat. Ruth Janoschek nach Herstellerangaben durchgeführt und zählen zu den Standard-Methoden des Labors (Janoschek et al. 2016; Bae-Gartz et al. 2019). In diesem sogenannten Sandwich ELISA bindet das Insulin bzw. Leptin aus der Serumprobe an einen auf der Reaktionsplatte immobilisierten Antikörper. An diesen Komplex aus Antiserum und Insulin bzw. Leptin bindet dann ein zweiter Detektions-Antikörper. Durch eine anschließend eingeleitete, enzymatische Reaktion erfolgt ein Farbumschlag, der die Quantifizierung der Insulin- bzw. Leptinmenge im Serum ermöglicht.

Die Daten zu Phänotyp, Fettgewebe und ELISA wurden bereits von der Arbeitsgruppe publiziert im Zusammenhang mit der Erforschung hepatischer Pathologien (Janoschek et al. 2023). Die Präsentation erfolgt in dieser Dissertation ebenfalls, auch wenn nicht im Rahmen des Forschungsprojekts durchgeführt, auf Grund hoher Relevanz für die Schlussfolgerung.

### **3.4 Proteinisolation, SDS-PAGE und Western Blot**

Die vorhandenen Hippocampus-Präparate der Mäuse wurden hinsichtlich ihrer Proteinmenge untersucht. Zunächst erfolgte die Proteinisolation der schockgefrorenen Proben. Nach Ansetzen eines Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffers wurden die einzelnen Proben mit diesem versetzt und nach grober mechanischer Homogenisierung mit Hilfe eines Pistills mit einem Ultraschallgerät sonifiziert. Nach einer Stunde Inkubationszeit auf Eis und anschließender Zentrifugation wurden die Proteinlysate in frische Röhrchen überführt. Anschließend wurde mit einem Bicinchoninsäure (BCA) Assay Kit, welches mittels farbmessiger Messung die quantitative Bestimmung von Proteinen erlaubt, die entsprechende Konzentration der Proteine mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Die Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen, um für die spätere Verwendung größere Schwankungen auszuschließen. Bei nicht allzu grober Abweichung der zwei pro Proben gemessenen Werte wurden diese gemittelt und aus der Standardreihe eine Standardkurve erstellt, anhand dieser die Konzentration der Proben des Hippocampus mittels Excel berechnet wurde.

Das im Folgenden beschriebene Verfahren der Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophorese (SDS-Gelelektrophorese) zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse wurde 1970 von Ulrich K. Laemmli entwickelt (Laemmli 1970), und ist vielfach von der Arbeitsgruppe bereits verwendet worden (Schmitz et al. 2018; Janoschek et al. 2016; Bae-Gartz et al. 2020). Der Western Blot wurde in Anlehnung an das 1979 von Renart, Reiser und Stark an der Universität

Standford erstmalig präsentierte Verfahren der Übertragung von Proteinen von einem Polyacrylamid Gel auf eine Trägermembran durchgeführt (Renart et al. 1979).

Bei der SDS-Gelelektrophorese wird die zu analysierende Probe mit SDS angereichert, wodurch alle Proteine gleich negativ geladen sind und die Eigenladung vernachlässigt werden kann. Es wurde zunächst der Gelstand mit einem 6% und 10% Trenngel und anschließend mit einem 4% Sammelgel befüllt, welches die Sammlung der Probe am Trenngel bewirkt, um den gleichzeitigen Start aller Proben durch das Trenngel zu gewährleisten.

Am nächsten Tag wurden die Hippocampus-Proben mit Wasser und SDS enthaltendem Probenpuffer versetzt. Die Menge der Probe bemaß sich an den Ergebnissen der Proteinbestimmung mit dem Ziel, in jeder Probe die gleiche Konzentration von Proteinen zu erhalten. Das Erhitzen des Gemischs führt zu einer Denaturierung, welche zusammen mit der negativen Ladung zu einer Linearisierung der Proteine führt. Nun wurde der Gelstand mit Lämmli-Puffer aufgefüllt, und es erfolgte die Beladung mit den Proben sowie mit einem Größenmarker in dafür durch einen Kamm vorgeformte Taschen im Sammelgel. Unter Anlegung einer Spannung von erst 80V und dann 120V wurden die Proteine nun ihrer Länge nach, die proportional zur Molekülmasse ist, aufgeteilt. So wandern kleine Proteine schneller durch das Trenngel zu Anode und sammeln sich weiter unten im Gel als Größere.

Anschließend erfolgte der Western Blot. Dieser erfolgte im Semi-Dry-Blotter unter Anlegung einer definierten Stromstärke für zwei Stunden und bewirkt den Transfer der Proteine mit Hilfe eines Transferpuffers auf eine Membran. Diese wurde nach dem Blotten in Ponceau S Lösung geschwenkt, welcher an die Aminogruppen des Proteins bindet und so mittels Imager überprüft werden kann, ob eine gleichmäßige Übertragung der Proteine auf die Membran stattgefunden hat.

Mit Blocking Solution erfolgte nun die Blockierung noch freier Bindungsstellen. Im Folgenden wurde die Membran über Nacht mit dem zu untersuchenden Antikörper in Milch oder BSA versetzt und am nächsten Tag mit TBST ausgewaschen und für eine Stunde mit dem Zweitantikörper inkubiert (siehe Tabelle 7). Der Antikörper- Komplex, bestehend aus Primärantikörper und Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase, kurz HRP) konjugiertem Sekundärantikörper katalysiert eine Reaktion mit dem zugefügten Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECL) Gemisch und ermöglicht so den Nachweis der Proteine auf der Membran.

Die Aufnahme der so entstandenen Banden auf den Membranen erfolgte mit Hilfe eines Imagers. Durch die Kenntnis der Größe der Proteine (in Kilodalton) werden die Proteine identifiziert und ihre Intensität kann mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageLab gemessen werden. Unter Bezugnahme auf eine Ladungskontrolle (HPRT) der jeweiligen Probe, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, erfolgte die Intensitätsmessung. Die ermittelten Konzentrationen der Proteine wurden nun mittels GraphPad (Version 8.1.1) auf statistisch signifikante Abweichungen innerhalb der Gruppen evaluiert.

Die einmal geblottete Membran kann bis zu zweimal wiederverwendet werden. Hierzu erfolgt die Auswaschung des Antikörperkomplexes mittels Stripping-Buffer und  $\beta$ -Mercaptoethanol, welche die Disulfidbrücken zwischen Antikörper und Protein brechen und so den Antikörperkomplex ablösen. Nach Waschung in Tris buffered saline with Tween (Tris gepufferte Salzlösung mit Tween, kurz TBST) einem Waschpuffer und erneuter Blockierung mit Blocking Solution kann eine erneute Versetzung mit Primärantikörper stattfinden.

### **3.5 Kryotomschnitte, H&E-Färbung und Immunfluoreszenz**

Von den je sechs pro Gruppe vorhandenen kompletten, kryokonservierten Gehirnen wurden Kryotomschnitte in Koronarebene in der Core-Facility des ZMMK an einem Research Cryostat Leica CM3050 S zu einer Dicke von je 20 $\mu$ m angefertigt. Je zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger transferiert und bei -80° gelagert. Anschließend wurden metabolisch relevante Proteine durch Immunfluoreszenz-Färbungen im Hypothalamus und Hippocampus wie folgt sichtbar gemacht und ausgewertet:

Zunächst erfolgte zur genauen Einordnung der Schnittebene von je 1-2 Objektträgern pro Gehirn eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Nach Waschen in PBS und H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte drei Minuten mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer inkubiert und dann mit Leitungswasser gebläut. Nach Inkubation mit Eosin erfolgte das Eintauchen der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe zur Entwässerung. Zuletzt wurden sie für je fünf Minuten zweimal in Neoclear belassen und anschließend mit Neomount eingedeckelt. Hämatoxylin färbt basophile und Eosin acidophile Strukturen an. Die Ergebnisse wurden mit dem Mikroskop dokumentiert (Olympus BX43F, DP80 dual CCD Camera, motorised table M-MS-BX-4-2, CellSens Dimension Software V1.8), mit dem Mouse Atlas (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact: The Coronal Plates and Diagrams, Franklin MA PhD, Keith B.J.; Paxinos AO (BA MA PhD DSc) NHMRC Dr., George; ISBN 13: 9780123742445) verglichen und mit Hilfe einer Excel Tabelle so konfiguriert, dass die im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen Färbungen möglichst in derselben Koronarebene stattfanden, um eine optimale Vergleichbarkeit der Schnitte zu gewährleisten:

Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte in Anlehnung an das erstmalig 1941 von Albert Coons entwickelte Verfahren (Coons et al. 1941), und wurde ebenfalls bereits in Studien der Arbeitsgruppe genutzt (Schmitz et al. 2018). Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend dreimal je fünf Minuten in PBS gewaschen. Nach 30-minütiger Permeabilisierung mit PBS-0,3% Triton erfolgte die Umrandung jedes einzelnen Gehirns mittel Liquid-Blocker-Stift, um im Folgenden eine Vermischung der Antikörper zwischen den zwei Schnitten pro Objektträger zu vermeiden. Auf jedes Gehirn wurden je 100 $\mu$ l Blocking-Solution (SeaBlock) pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen, um alle Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte

die Verdünnung des Primärantikörpers in Antikörper Diluent und jedes Gehirn wurde mit 100µl Antikörpermischung versetzt und über Nacht bei 4° Grad belassen. Pro Gehirn wurden für simultane Färbungen jeweils ein aus Kaninchen und ein aus Maus gewonnener Antikörper eingesetzt, der Maus-Antikörper, zumeist für die Markierung von NeuN, einem spezifischen Marker für Neurone, um die gemessene Intensität des Kaninchen-Antikörpers auf diesen zu beziehen und so eine optimale Vergleichbarkeit der Schnitte zu gewährleisten (Mullen et al. 1992).

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst erneut dreimal zu je fünf Minuten in PBS gewaschen. Für zwei Stunden erfolgte die Inkubation mit Zweitantikörpern spezifisch zu den jeweiligen Erstantikörpern (bsp. Goat-anti-rabbit, wenn der Erstantikörper aus Kaninchen extrahiert war) in Antikörper Diluent. Die Schnitte wurden dreimal je 10 Minuten gewaschen und anschließend mit einem 4,6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi) enthaltenden Eindeckmedium eingedeckelt. Dapi bindet an DNA und ermöglicht so die Identifikation von Zellkernen (Kapuściński und Yanagi 1979). Zusammen mit der NeuN Färbung kann so eine Beurteilung darüber vorgenommen werden, ob das untersuchte Antigen von Neuronen exprimiert wird oder von Gliazellen.

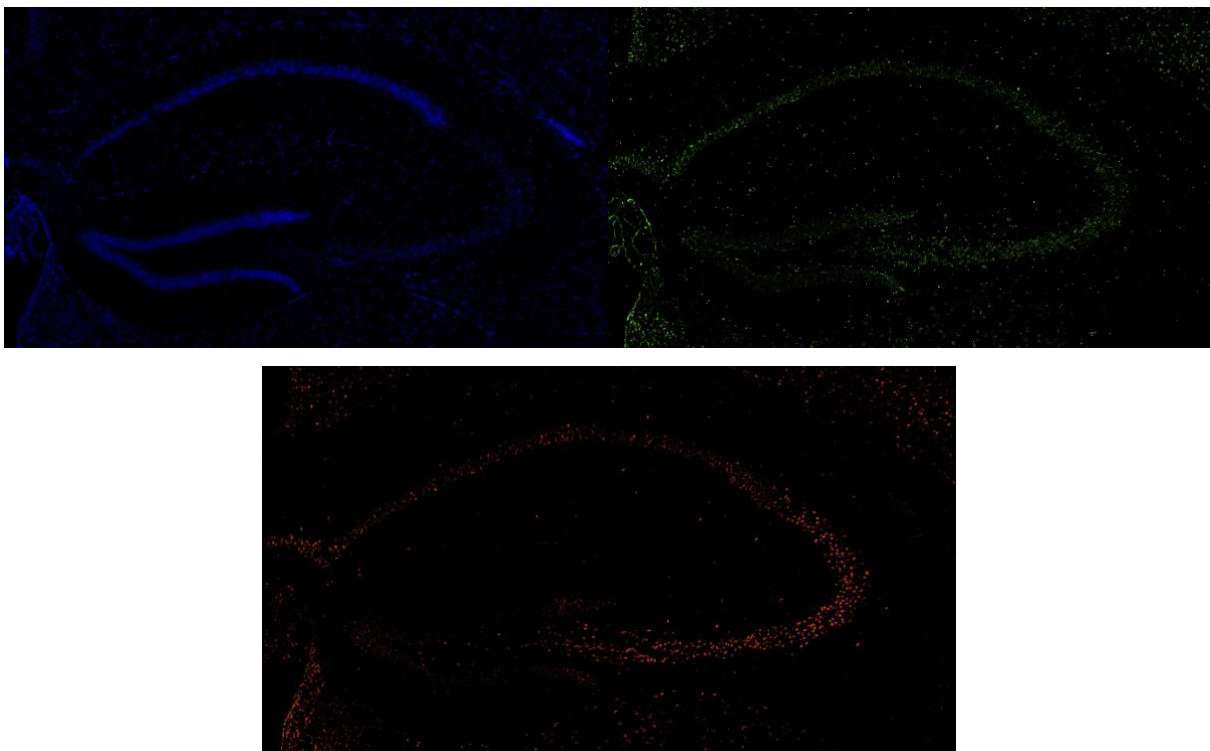


Abbildung 4

Beispielbilder: Dapi, NeuN und Doublecortin Färbung eines Schnittes nach Anpassung der Helligkeit und Abzug des Hintergrundrauschens

Die Schnitte wurden im Dunklen gelagert und es wurden zeitgleich alle Schnitte derselben immunfluoreszenz Färbung mit dem Mikroskop (Olympus BX43F, DP80 dual CCD Kamera,

motorisierter Tisch M-MS-BX-4-2) mit derselben Belichtungszeit aufgenommen. Mittels des Programms ImageJ/Fiji erfolgte nach einer Verblindung der Gruppenzugehörigkeit die Messung der Intensität der jeweils angefärbten Proteine in Relation zu NeuN der jeweiligen Probe. Dazu wurden die Bilder auf eine einheitliche Helligkeit gesetzt und Hintergrundrauschen unterdrückt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten ohne den Verlust relevanter Informationen. Nach Markierung des Bereichs von Interesse, wie z.B. des gesamten Hippocampus oder Gyrus dentatus, wurde ein Schwellenwert definiert, der in dem markierten Bereich gemessen wurde. Während Hippocampus und Gyrus dentatus komplett umrundet wurden, wurde in CA1 und CA3 jeweils fünf Kreise als Bereich markiert, da eine genaue Abgrenzung zu CA2 nicht vorgenommen werden kann. Mittels Excel wurde der gemessene Schwellenwert der Antikörperfärbung auf NeuN bezogen und nach Aufhebung der Verblindung wurden die Ergebnisse mittels Graph Pad (Version 8.1.1) auf signifikante Abweichungen zwischen den Gruppen untersucht. Test und Signifikanzniveau waren hierbei identisch zum Western Blot.

### 3.6 Statistik

Alle erhobenen Daten wurden mittels GraphPad (Version 6 und 8.1.1) analysiert. Zunächst erfolgte ein Grubbs Test auf signifikante Ausreißer mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$ . Lag der Signifikanzwert eines Tests unter  $0,05$  wurde der Test als signifikant eingestuft. Dann erfolgte eine One-way ANOVA (Kruskal-Wallis) der nicht-parametrischen Werte, bei der der Mittelwert jeder Gruppe mit den anderen verglichen wurde. Bei Aufweisen einer Signifikanz wurde im t-test jede Gruppe einzeln gegeneinandergestellt. Da es sich um eine nicht parametrische Messung mit weniger als sieben Tieren pro Gruppe handelt, wurde der Mann-Whitney t-test durchgeführt. Ein Signifikanzniveau  $< p=0,05$  wurde mit \*,  $< p=0,01$  mit \*\*,  $< p=0,001$  mit \*\*\* und  $< p\leq 0,0001$  mit \*\*\*\* gekennzeichnet.

### 3.7 Verwendete Geräte und Software

Proteinbestimmung und Western Blot (in aufsteigender Reihenfolge der erstmaligen Verwendung):

Pipettieren	Easypet Pipettierhilfe von Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexen	Vortex K1 plus von Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Ultraschallsonde	Sonopuls Ultraschall-Homogenisator von Bandelin electronic (Berlin, Deutschland)

Zentrifugieren	Rotina 420R Micro centrifuge Model SD von Hettich (Tuttingen, Deutschland)
Inkubieren	Memmert WNB14 Wasserbad (Schwabach, Deutschland)
Konzentrationsbestimmung	LTF Labortechnik Type DTS-4 (Wasserburg, Deutschland) und Tecan Infinite M200 Pro (Männedorf, Schweiz)
Konzentrationen errechnen	Excel 2016 von Microsoft
Gele	Doppelgel-Elektrophorese-System Perfect Blue Twin M von PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Blotten	Semi-Dry-Elektroblotter Perfekt Blue von PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Folien schweißen	Schweißgerät Severin Folio von Severin (Sundern, Deutschland)
Schütteln	Taumel-Schüttler Duomax 1030 von Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Bildaufnahme	Molecular Imager ChemiDoc XRS von Biorad (Hercules, Kalifornien, USA)
Auswertung	Image Lab Software von Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Software; Proteinbestimmung und Western Blot

Kryotomschnitte und Immunfluoreszenz: (in aufsteigender Reihenfolge der erstmaligen Verwendung)

Anfertigung der Schnitte	Research Cryostat Leica CM3050 S (CECAD, Köln)
Pipettieren	Easypet Pipettierhilfe von Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Umranden	Liquid Blocker Super Pan Pen von Daido Sangyo Co (Japan)
Aufnahme der Färbungen	Olympus BX43F, DP80 dual CCD Kamera, motorisierter Tisch M-MS-BX-4-2
Auswertung der Färbungen	Fiji/ ImageJ Version 1.52e
Statistik	GraphPad Prism Version 6 und 8.1.1

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Software; Kryotomschnitte und Immunhistochemie

### 3.8 Chemikalien, Puffer und Stammlösungen

Proteinbestimmung und Western Blot (in aufsteigender Reihenfolge der erstmaligen Verwendung)

Chemikalien, Puffer und Stammlösung	Firma oder Zusammensetzung
RIPA Puffer	ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA)
Modifizierter RIPA Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 mM Tris-HCL</li> <li>- 150 mM NaCl</li> <li>- 1% Igepal</li> <li>- 2mM EDTA</li> <li>- 1µg/ml Aprotinin</li> <li>- 1µg/ml Pepstatin A</li> <li>- 1µg/ml Leuropeptin</li> <li>- 1 mM PMSF</li> <li>- 1 mM NaF</li> <li>- 1 mM NaVo4</li> </ul>
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA (Pasching, Österreich)
BCA/ Blauer Puffer	ThermoFisher (Waltham, Massachusetts, USA)
Acrylamid Mix Gel 30	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
APS	Sigma Aldrich (St.Louis/Missouri, USA)
TEMED	Sigma Aldrich (St.Louis/Missouri, USA)
Trenngel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6%/10% Acrylamid</li> <li>- 0,26M Tris/HCL</li> <li>- 0,1% SDS</li> <li>- 0,1% APS</li> <li>- 0,004% TEMED</li> </ul>
Sammelgel	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4% Acrylamid</li> <li>- 0,16M Tris/HCL</li> <li>- 0,1% SDS</li> <li>- 0,1% APS</li> <li>- 0,004% TEMED</li> </ul>

Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Laufpuffer (Lämmli-Puffer)	- 0,25M Tris - 2M Glycin - 1% SDS
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Transferpuffer (Towbinpuffer)	- 0,25M Tris - 2M Glycin - 20% Methanol
TBST	1x TBS + 0,01% Tween 20
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Milch	5% Milch in TBST
BSA-Lösung	5% BSA in TBST
Blocking Solution	- 5% Milch - 2% BSA - TBST
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stripping Puffer	- 0,005M Tris - 2% SDS - 0,7% $\beta$ -Mercaptoethanol

Tabelle 5: Chemikalien, Puffer und Stammlösungen; Proteinbestimmung und Western Blot

Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Immunfluoreszenz: (in aufsteigender Reihenfolge der erstmaligen Verwendung)

<b>Chemikalien, Puffer und Stammlösung</b>	<b>Zusammensetzung oder Firma und Sitz, ggf. Bestellnummer</b>
PBS buffer	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Flüssiges PBS	9,55g PBS auf 1l Wasser
Hämalaun sauer nach Mayer	Roth (Karlsruhe Deutschland)
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Neoclear	Sigma Aldrich (St.Louis/Missouri, USA)



Neomount	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PBS Triton	0,3% Triton X 100 in PBS
Seablock	Thermofisher (Waltham/Massachusetts USA, 37527)
Antikörper Diluent	Agilent Technologies (Santa Clara/Kalifornien, USA, S0809)
Fluoroshield+Dapi	Sigma Aldrich (St.Louis/Missouri, USA, F6057)

Tabelle 6: Chemikalien, Puffer und Stammlösungen; H&E und Immunfluoreszenz

### 3.9 Antikörper

Western Blot:

Antikörper	Mouse/ Rabbit	Größe	Verdünnung in	2. Antikörper verdünnt in	Firma und Bestellnummer
70S6Kinase	Rabbit	85 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 2217
AKT	Rabbit	60 kDa	1:2000 in BSA	1:2000 in Milch	Cell Signaling 9272
Doublecortin	Rabbit	45 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 4604
GAP 43	Rabbit	43 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 8954
GSK3 $\beta$	Rabbit	46 kDa	1:2000 in BSA	1:2000 in Milch	Cell Signaling 9315
HPRT	Rabbit	24 kDa	1:4000 in BSA	1:4000 in Milch	Abcam ab10479
Insulinrezeptor $\beta$	Rabbit	95 kDa	1: 2000 in BSA	1:2000 in Milch	Cell Signaling 3025
mTOR	Rabbit	289 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 2983
p70S6Kinase (Ser 235/236)	Rabbit	85 kDa	1:666 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 2211
pAKT (Ser 473)	Rabbit	60 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 4058

pGSK3 $\beta$ (Ser 9)	Rabbit	46 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 9336
pmTOR (Ser 2448)	Rabbit	289 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 5536
pSynapsin (Ser 9)	Rabbit	77 kDa	1:500 in BSA	1:500 in Milch	Cell Signaling 2311
Synapsin	Rabbit	77 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Cell Signaling 6710
Synaptophysin	Rabbit	37 kDa	1:2000 in BSA	1:2000 in Milch	Thermofisher, MA5- 14532
vGAT	Rabbit	80 kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Synaptic Systems 131003
vGLUT2	Rabbit	64kDa	1:1000 in BSA	1:1000 in Milch	Synaptic Systems 135402

Tabelle 7: Antikörper; Western Blot

Immunfluoreszenz:

<b>1. Antikörper</b>	<b>Mouse/Rabbit</b>	<b>Verdünnt</b>	<b>2. Antikörper</b>	<b>2. Ak verdünnt</b>	<b>Firma und Bestellnummer</b>
Doublecortin	Rabbit	1:200	Anti Rabbit Cy3	1:500	Cell Signaling 4604
GABA A	Rabbit	1:200	Anti Rabbit	1:500	Synaptic Systems 224003
GABA B	Rabbit	1:300	Anti Rabbit Cy3	1:500	Cell Signaling 3838
Gephyrin	Mouse	1:200	Anti Mouse 488	1:500	Synaptic Systems, 147011
GluR1	Rabbit	1:200	Anti Rabbit Cy3	1:500	Thermofisher, PA1-46151
Ki-67	Rabbit	1:1000	Anti Rabbit Cy3	1:500	Abcam, ab15580
NeuN	Mouse	1:300	Anti Mouse 488	1:500	Abcam, ab104224

Neurologin 1	Mouse	1:200	Anti Mouse	1:500	Invitrogen, MA5-27635
Neurologin 2	Rabbit	1:200	Anti Rabbit Cy3	1:500	Synaptic Systems, 129203
Neurologin 3	Rabbit	1:300	Anti Rabbit Cy3	1:500	Thermofisher, PA5-78508
NMDA1	Mouse	1:200	Anti Mouse	1:500	Invitrogen, 32-0500
pGluR1	Rabbit	1:200	Anti Rabbit Cy3	1:500	Thermofisher, OPA1-04118
SNAP-25	Rabbit	1:1000	Anti Rabbit Cy3	1:500	Thermofisher, 701991
Synaptophysin	Rabbit	1:300	Anti Rabbit Cy3	1:500	Thermofisher, MA5-14532
vGAT	Rabbit	1:200	Anti Rabbit Cy3	1:500	Synaptic Systems, 131003
vGLUT2	Rabbit	1:300	Anti Rabbit Cy3	1:500	Synaptic Systems, 135402

Tabelle 8: Antikörper; Immunfluoreszenz

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe:

Die im Folgenden dargestellten Rohdaten wurden im Vorfeld erhoben und freundlicherweise zur Auswertung zur Verfügung gestellt:

#### 4.1.1 Nährstoff- und Kalorienzufuhr

Da in dieser Arbeit der Unterschied zwischen der Anwendung zweier adipogener Diäten im Vergleich zu einer Standard-Diät beleuchtet wird, ist von Interesse, wie viel Protein, Fett und Zucker von den Versuchstieren täglich verzehrt wurde. Die Ergebnisse können Abbildung 5 entnommen werden. Die Tiergruppe, welche die Standarddiät erhielt, bezog ca. zwei Drittel ihrer Energiezufuhr über Proteine. Die Tiere, welche die fettreiche Diät bekamen, erhielten ca. die Hälfte ihres täglichen Energiebedarfs aus Fett, während die Tiere, die die zuckerreiche Diät bekamen, ihre tägliche Nahrungsaufnahme je ca. aus einem Drittel aus Protein, Fett und Zucker bezogen.

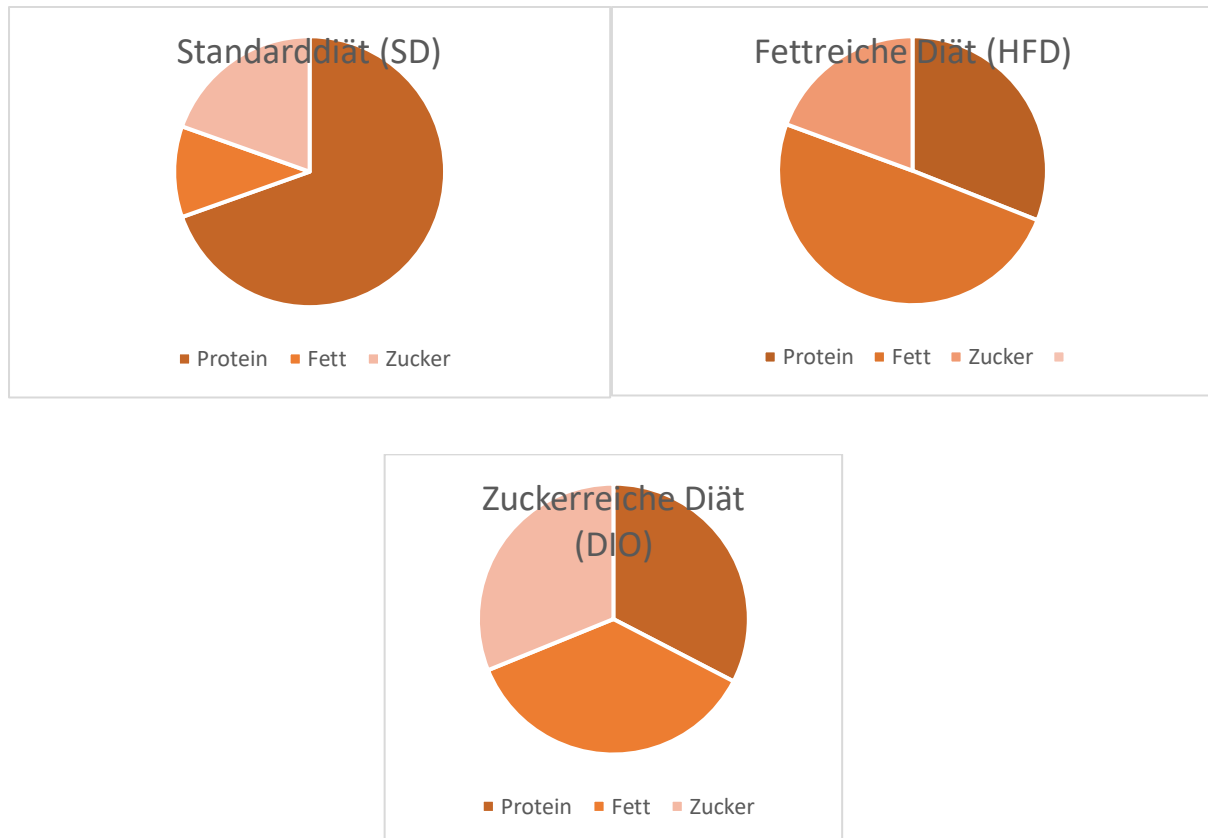


Abbildung 5:  
Protein, Fett und Zuckerzufuhr pro Tag je Diät

Schaut man sich die tägliche Protein-, Fett- und Zuckerzufuhr der Tiere im Vergleich an so zeigt sich, dass der Verzehr von Protein in der Tiergruppe, welche die Standarddiät erhielten am grössten war. (Abbildung 6 (A)). Fett wurde in der HFD-Gruppe etwa sechsmal so viel wie in der SD-Gruppe und in der DIO-Gruppe nur etwa viermal so viel wie in der SD-Gruppe verzehrt (Abbildung 6 (B)). Zucker wurde am meisten, wie zu erwarten, in der zuckerreichen DIO-Gruppe verzehrt, gefolgt von der HFD-Gruppe (Abbildung 6 (C)). Insgesamt verzehrten die Tiere der SD-Gruppe mehr Kalorien pro Tag, als die Tiere der beiden adipogenen Diäten (Abbildung 6 (D)).

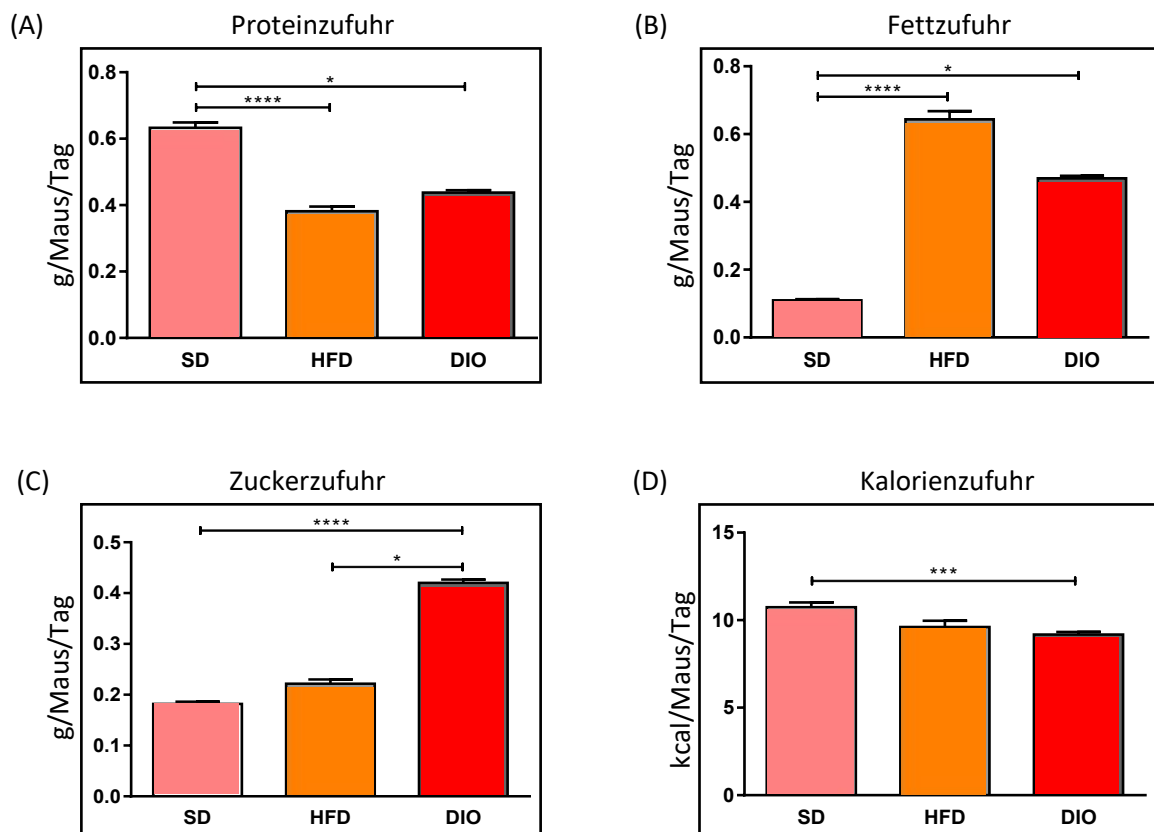
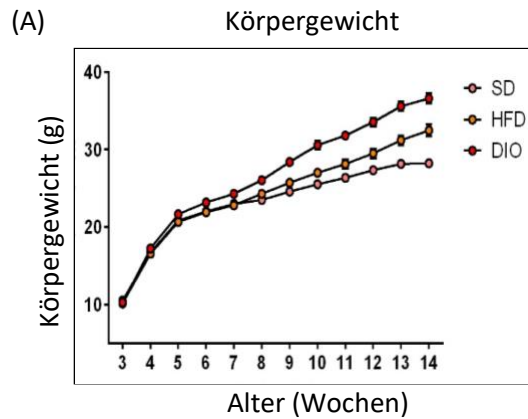


Abbildung 6:  
 (A): Protein Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag  
 (B): Fett Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag  
 (C): Zucker Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag  
 (D) Kalorienzufuhr in kcal pro Maus pro Tag

#### 4.1.2 Gewicht

Die Versuchstiere wurden ab Woche drei während der Aufzucht wöchentlich gewogen. Ab Woche sieben bzw. acht zeigte sich eine signifikante Zunahme an Körpergewicht in der DIO-Gruppe gegenüber der HFD- bzw. SD-Gruppe, welche weniger schnell zunahmen. Ab Woche zehn zeigte sich eine signifikant höhere Gewichtszunahme gegenüber der SD auch bei den HFD-Tieren (Abbildung 7 (A)). Bei Tötung der Tiere zeichnete sich dieser Trend ebenfalls ab. Die Tiere der DIO-Gruppe waren vierfach

signifikant schwerer als die Tiere der SD-Gruppe und signifikant schwerer als die Tiere der HFD-Gruppe. Die Tiere, welche die HFD erhielten, waren zweifach signifikant schwerer bei Tötung als die Tiere, welche die SD erhielten (Abbildung 7 (B)). Diese Ergebnisse spiegelten sich ebenfalls im BMI der Versuchstiere wider. Die Tiere der DIO-Gruppe hatten einen vierfach signifikant höheren BMI bei Tötung als die Tiere der SD-Gruppe und die Tiere der HFD-Gruppe hatten einen zweifach signifikant höheren BMI nach Tötung als die SD-Gruppe (Abbildung 7 (C)).



Alter (Wochen)    3    4    5    6    7    8    9    10    11    12    13    14

SD vs. HFD Körpergewicht	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	*	**	***	****	****
SD vs. DIO Körpergewicht	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	***	****	****	****	****	****	****
HFD vs. DIO Körpergewicht	Ns	Ns	Ns	Ns	*	*	****	****	****	****	****	****

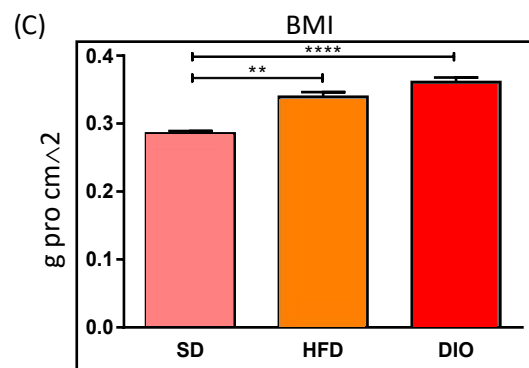
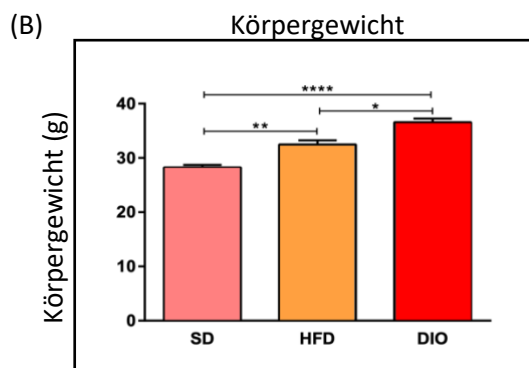


Abbildung 7:

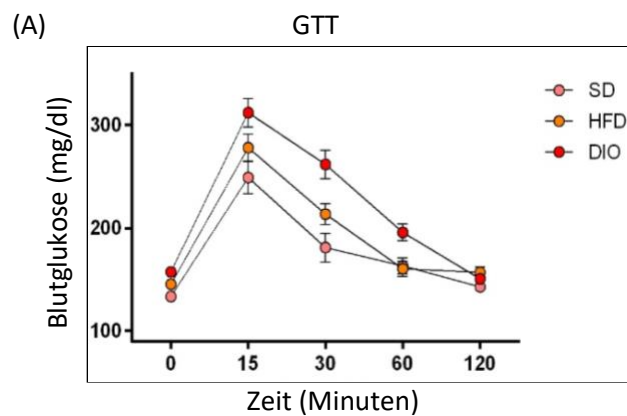
(A): Gewicht der Mäuse in Gramm von Woche drei bis 14 wöchentlich gemessen

(B): Gewicht der Mäuse in Gramm nach Tötung

(C): BMI in Gramm pro Quadratzentimeter nach Tötung

### 4.1.3 GTT

Der Glukose-Toleranz-Test ist ein Verfahren welches die Beurteilung der Verwertung und Aufnahme von Glukose aus dem Blut erlaubt. Er wird in der Klinik zur Detektion eines Diabetes mellitus verwendet (Kerner and Brückel 2007). Im GTT in diesem Versuchsaufbau, welcher in Woche 10 durchgeführt wurde, zeigten sich zum Zeitpunkt 0 keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Bereits nach 15 Minuten zeigte sich in der Gruppe der DIO-Mäuse gegenüber der SD und HFD eine hochsignifikante Erhöhung der Blutglukosewerte. Nach 30 Minuten zeigte sich neben der DIO-Gruppe auch in den HFD-Mäusen eine signifikante Steigerung des Blutglukoselevels verglichen mit der SD-Gruppe. Nach zwei Stunden normalisierten sich die Werte aller drei Diäten wieder auf den Bereich des Ausgangsniveaus (Abbildung 8 (A)). Ebenfalls in Woche 10 gemessen zeigten sich nach einer 6-stündigen Fastenperiode in der DIO dreifach signifikant erhöhte Nüchternblutglukose-Werte (Abbildung 8 (B)). Beide hochkalorischen Diäten führten somit verglichen mit der SD zu signifikant gesteigerten Blutzuckwerten im GTT, der Effekt war allerdings in der Gruppe der zuckerreicheren DIO früher und ausgeprägter nachweisbar.



	0 Minuten	15 Minuten	30 Minuten	60 Minuten	120 Minuten
SD vs. HFD	Ns	Ns	*	Ns	Ns
SD vs. DIO	Ns	****	****	Ns	Ns
HFD vs. DIO	Ns	*	**	*	Ns

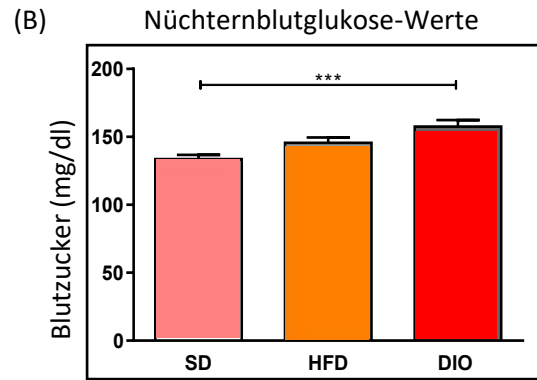


Abbildung 8:

(A): Oraler Glukose-Toleranz-Test durchgeführt in Woche 10, Glukose-Messung in Milligramm pro Deziliter nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten

(B): Nüchternblutzuckerwert nach 6 Stunden Fasten gemessen in Milligramm pro Deziliter in Woche 10

#### 4.1.4 MicroCT

Zur Quantifizierung des totalen und viszeralen Fetts wurden MicroCTs durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung sowohl des totalen als auch des viszeralen Fettanteils in der HFD und DIO gegenüber der SD (Abbildung 9 (A) und (B)). Der Effekt war in der DIO minimal stärker ausgeprägt.

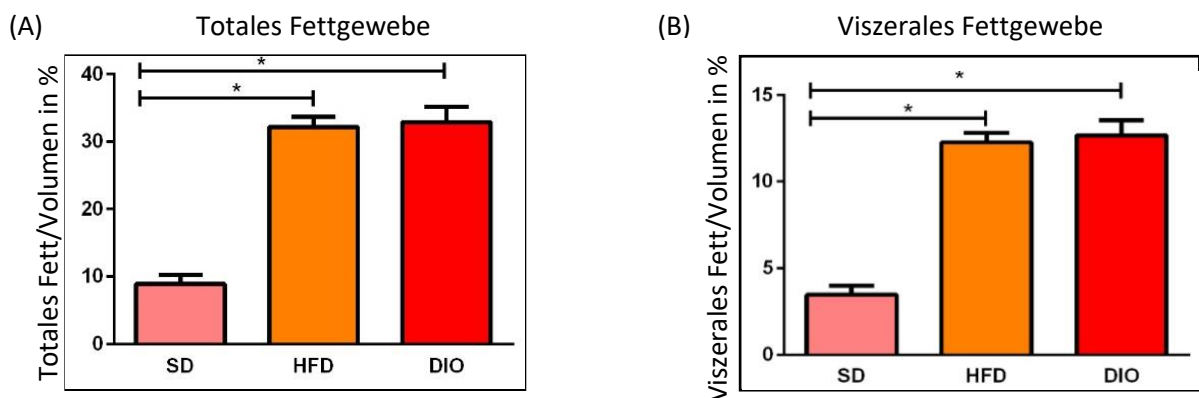


Abbildung 9:

(A): Auswertung des totalen Fetts

(B): Auswertung des viszeralen Fetts

#### 4.1.5 Insulin und Leptin ELISA

In diesem Versuch zeigten sich in der HFD und DIO gegenüber der SD erhöhte Insulin-Serum Werte, welche nur in der HFD eine Signifikanz aufwiesen (Abbildung 10 (A)).

Die Ergebnisse des Leptin-ELISA zeigten, dass Leptin im Serum der HFD-Tiere signifikant erhöht war im Vergleich zu dem Leptinspiegel im Serum der SD-Tieren. Der Leptinspiegel im Serum der DIO-Tiere war zweifach signifikant höher als der Leptinspiegel im Serum der SD-Tiere (Abbildung 10 (B)).



Das Leptin im Serum war in der DIO-Gruppe im Vergleich zur Expression in der SD-Gruppe signifikant erhöht, in der HFD-Gruppe zeigte sich die Expression sowohl des Leptins als auch des Insulins im Serum signifikant erhöht im Vergleich zur Expression des Leptins in der SD-Gruppe.

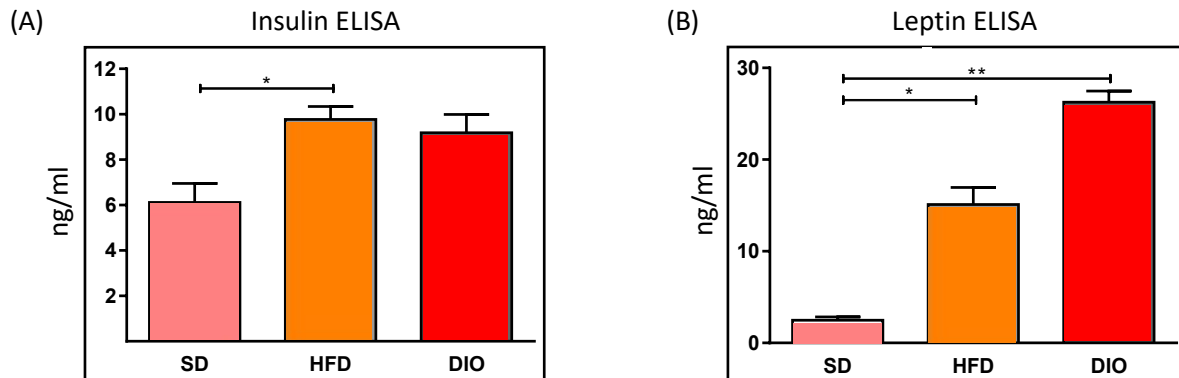


Abbildung 10  
 (A): Insulin ELISA gemessen in ng/ml  
 (B): Leptin ELISA gemessen in ng/ml

#### 4.2 Insulin- und Leptinmetabolismus

Die folgenden Ergebnisse der Western Blots und der Immunfluoreszenzfärbungen wurden im Rahmen des Forschungsprozesses durchgeführt und ausgewertet:

##### Insulinrezeptor $\beta$ :

Der Insulinrezeptor besteht aus einer extrazellulär gelegenen  $\alpha$ -Einheit und aus einer transmembranären  $\beta$ -Einheit, welche in den drei Diät-Gruppen untersucht wurde. Die Ergebnisse des Western Blots des Hippocampus zeigten eine Tendenz zur Reduktion der Quantität des Insulinrezeptor  $\beta$  in den adipogenen Diäten, ohne dabei statistisch signifikant zu sein (Abbildung 11).

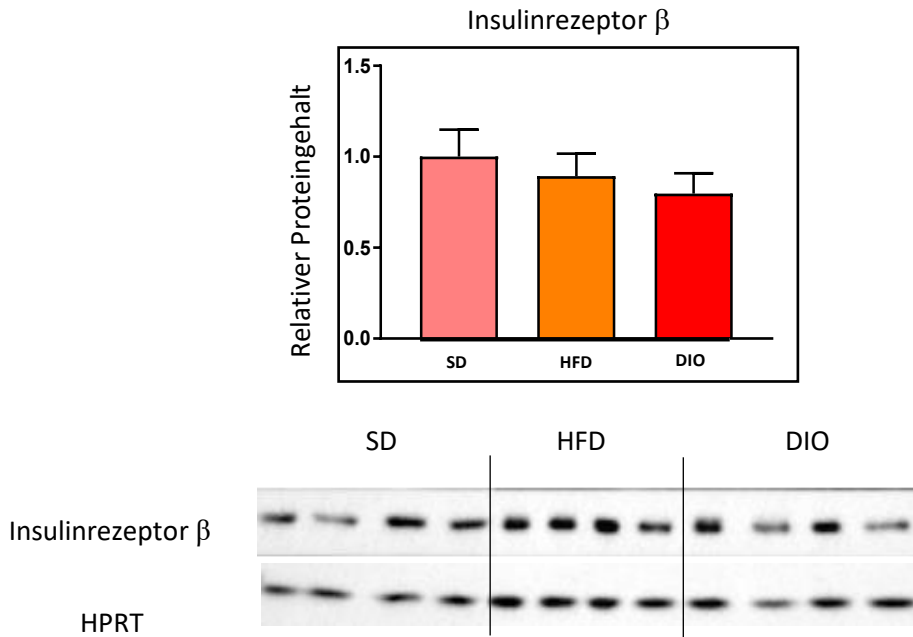
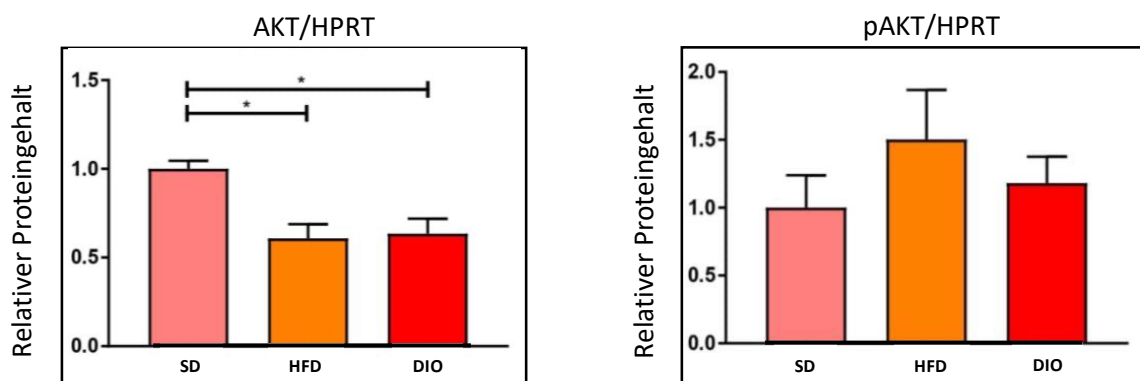


Abbildung 11  
Ergebnisse Western Blot Insulinrezeptor  $\beta$  bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

**pAKT und AKT:**

Ist der Insulinrezeptor weniger vorhanden, beeinflusst dies auch den PI3-AKT-Signalweg. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von AKT in beiden adipogenen Diäten, wohingegen die Konzentration des aktivierten AKT erhöht war. Daraus resultierend ergibt sich eine Erhöhung des pAKT/AKT Quotienten, der im Kruskal-Wallis-Test- mit  $p=0,0234$  zwar signifikant war, im Mann-Whitney T-test allerdings sowohl beim Vergleich von HFD gegen SD als auch DIO gegen SD mit  $p=0,0571$  knapp keine Signifikanzen mehr aufwies (Abbildung 12).



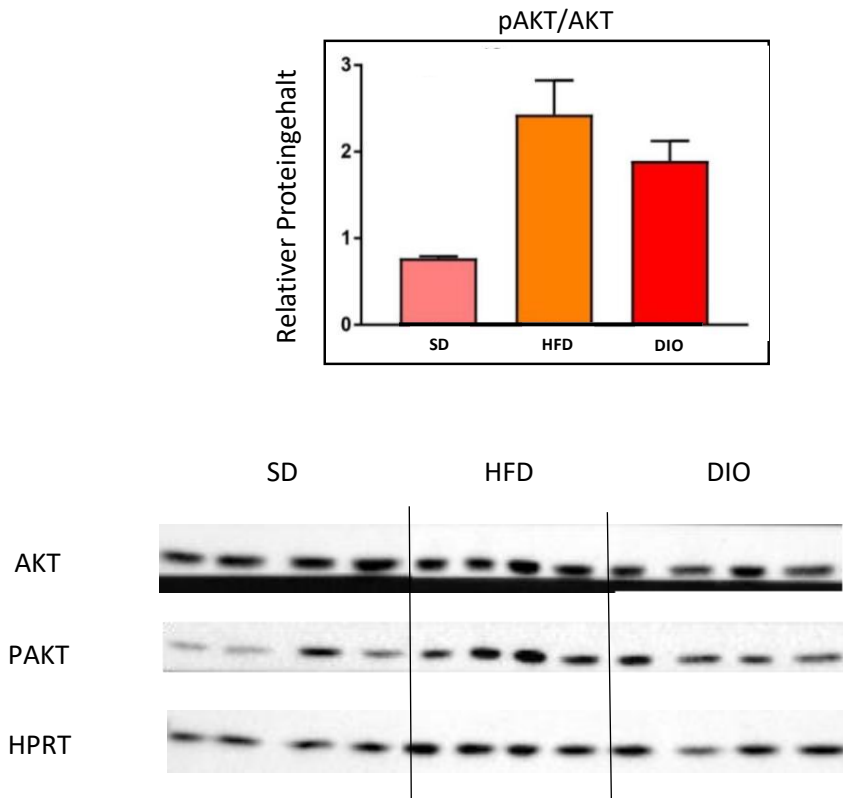
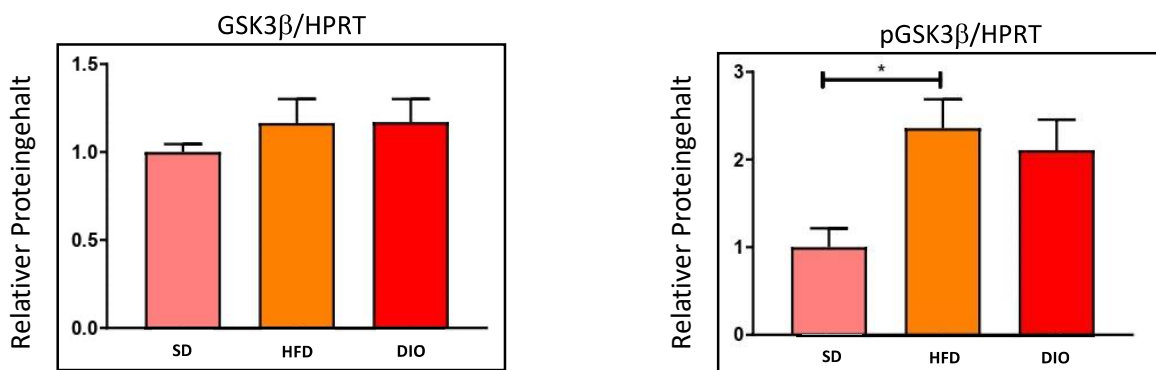


Abbildung 12  
Ergebnisse des Western Blots mit AKT und PAKT bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

**pGSK3β und GSK3β:**

GSK3β wird von AKT inhibiert und ist somit eher bei nicht Insulin-stimuliertem Zustand der Zelle aktiv. Die Ergebnisse zeigten eine Tendenz zu erhöhtem GSK3β und pGSK3β, eine Signifikanz ließ sich nur für pGSK3β in der HFD gegenüber der SD nachweisen. Auch das Verhältnis von aktiviertem GSK3β zu nicht aktiviertem zeigte eine tendenzielle Erhöhung bei den adipogenen Diäten, welche im Kruskal-Wallis Test knapp keine Signifikanz aufwies ( $p=0,0539$ ) (Abbildung 13).



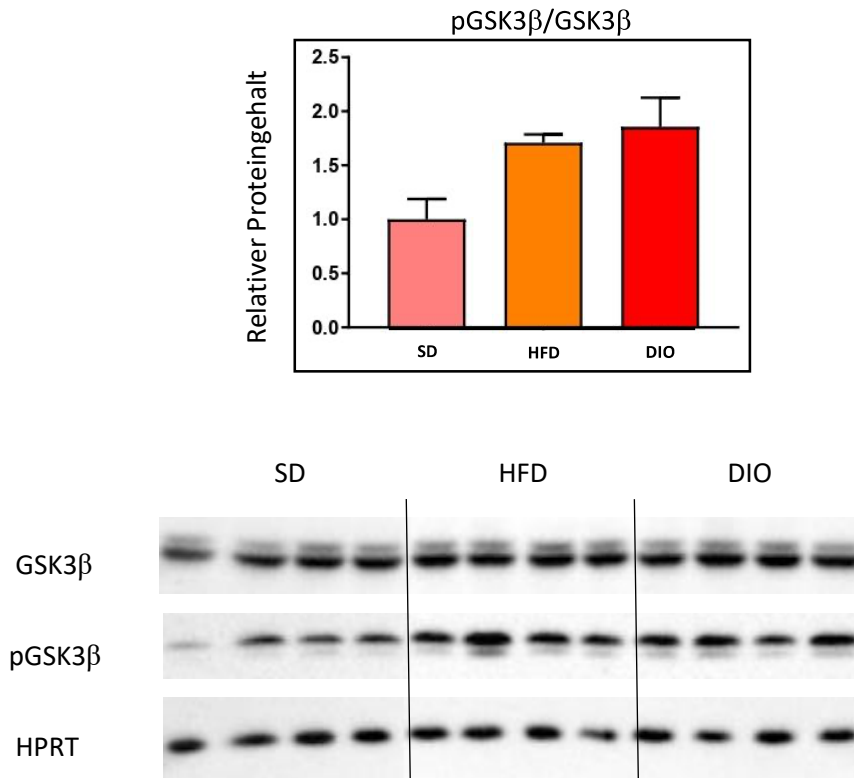
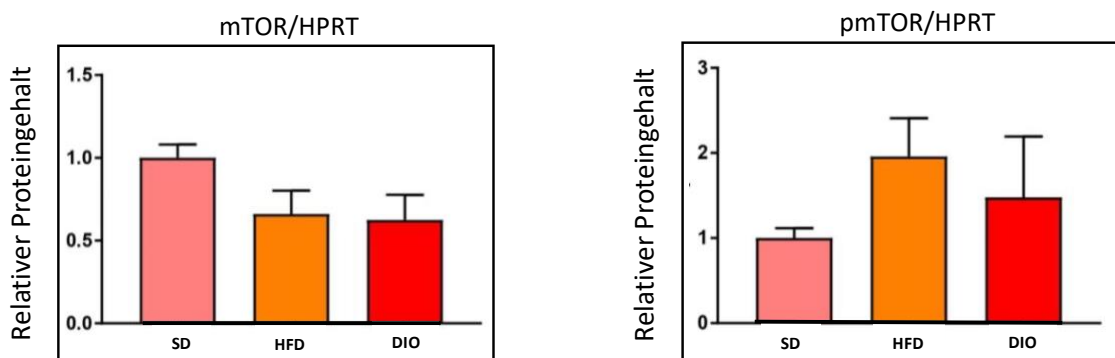


Abbildung 13  
Ergebnisse des Western Blots mit GSK3β und pGSK3β bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

### pmTOR und mTOR:

Via Insulin Rezeptor Substrat übt mTOR ein negatives Feedback über den mTORC2 Komplex auf AKT aus. Eine Erhöhung von mTOR führt folglich zu einer Verminderung von AKT und somit zu einer verminderten Stimulation des Insulinsignalwegs. Die Ergebnisse zeigten eine ähnliche Tendenz wie AKT und pAKT: mTOR war im Hippocampus der Mausgruppen der adipogenen Diäten vermindert, wohingegen pmTOR erhöht war und sich dementsprechend auch im Quotienten von pmTOR/mTOR eine Erhöhung abzeichnete (Abbildung 14).



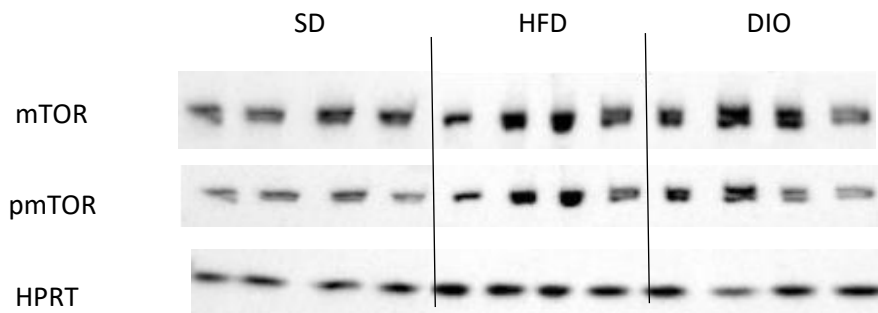
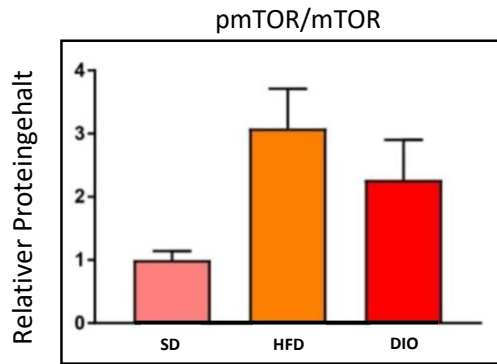
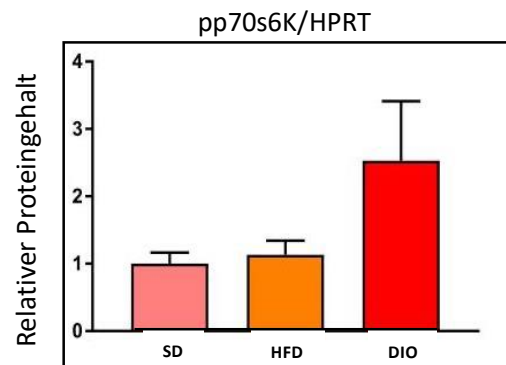
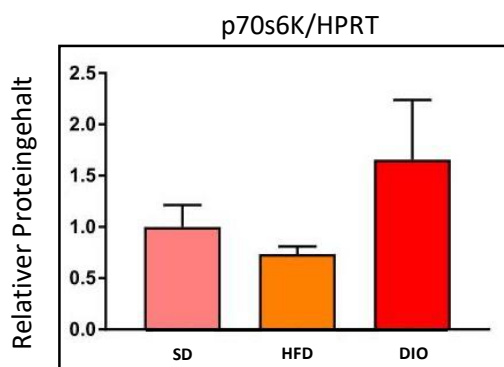


Abbildung 14  
Ergebnisse des Western Blots mit mTOR und pmTOR in Bezug auf HPRT als Ladungskontrolle

### pp70s6k und p70s6k:

Die Ribosomale S6Kinase ist ein Ziel von mTOR, genauer gesagt des mTORC1 Komplexes und reguliert die Autophagie einer Zelle über Proteinsynthese mit. Während sich in der DIO Tendenzen zur Erhöhung von p70s6k und pp70s6k zeigen, bleibt die Proteinmenge in der HFD ähnlich der Menge in der SD. Der pp70s6k/p70s6k Quotient ist in beiden adipogenen Diäten gegenüber der SD etwas erhöht. Es ergaben sich keine Signifikanzen (Abbildung 15).



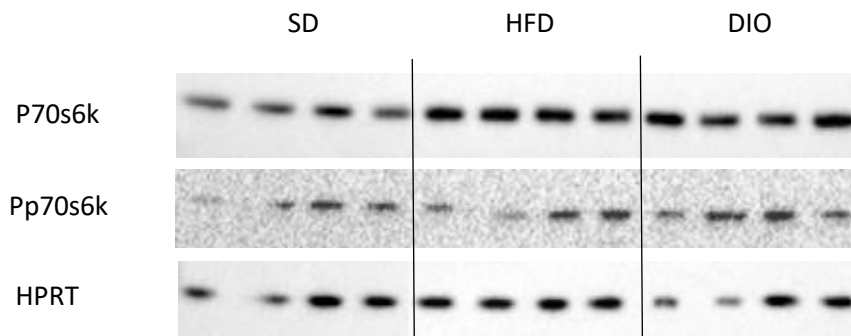
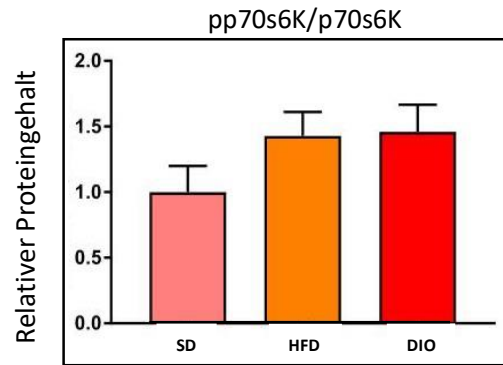
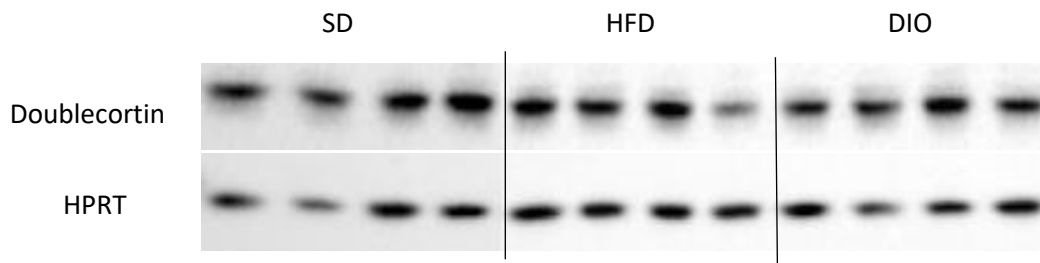
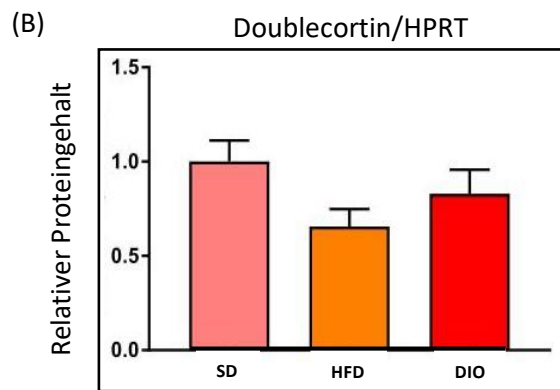
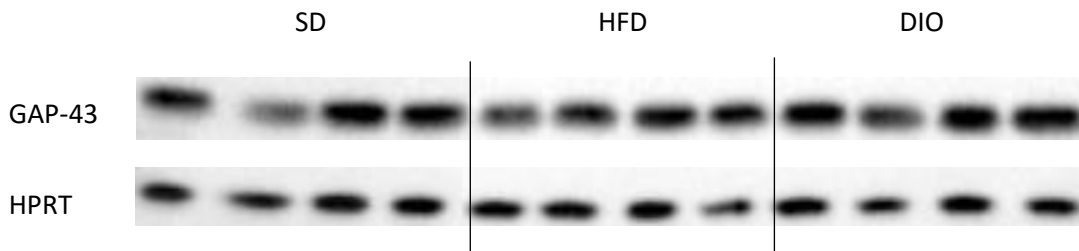
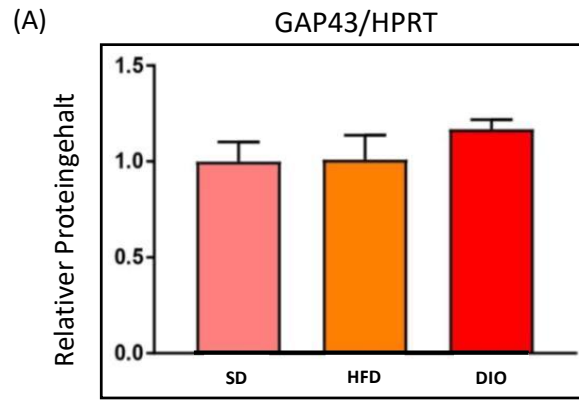


Abbildung 15  
Ergebnisse des Western Blot mit p70s6k und pp70s6k in Bezug auf HPRT als Ladungskontrolle

### 4.3 Neurogenese

Zur Untersuchung hinsichtlich eines möglichen Einflusses adipogener Diäten auf die hippocampale Neurogenese wurden in der Immunfluoreszenz der Proliferationsmarker Ki67 und das während der Neurogenese entstehende Doublecortin mittels spezifischer Antikörper untersucht. Auch im Western-Blot erfolgte die Untersuchung mit Doublecortin und darüber hinaus mit GAP-43, einem weiteren Marker für Zellteilung. Es zeigten sich in beiden angewendeten Methoden übereinstimmende Resultate von keiner signifikanten Abweichung der Expression von GAP-43, Doublecortin und Ki67 in der HFD oder DIO gegenüber der SD (Abbildung 16 (A)-(D)).



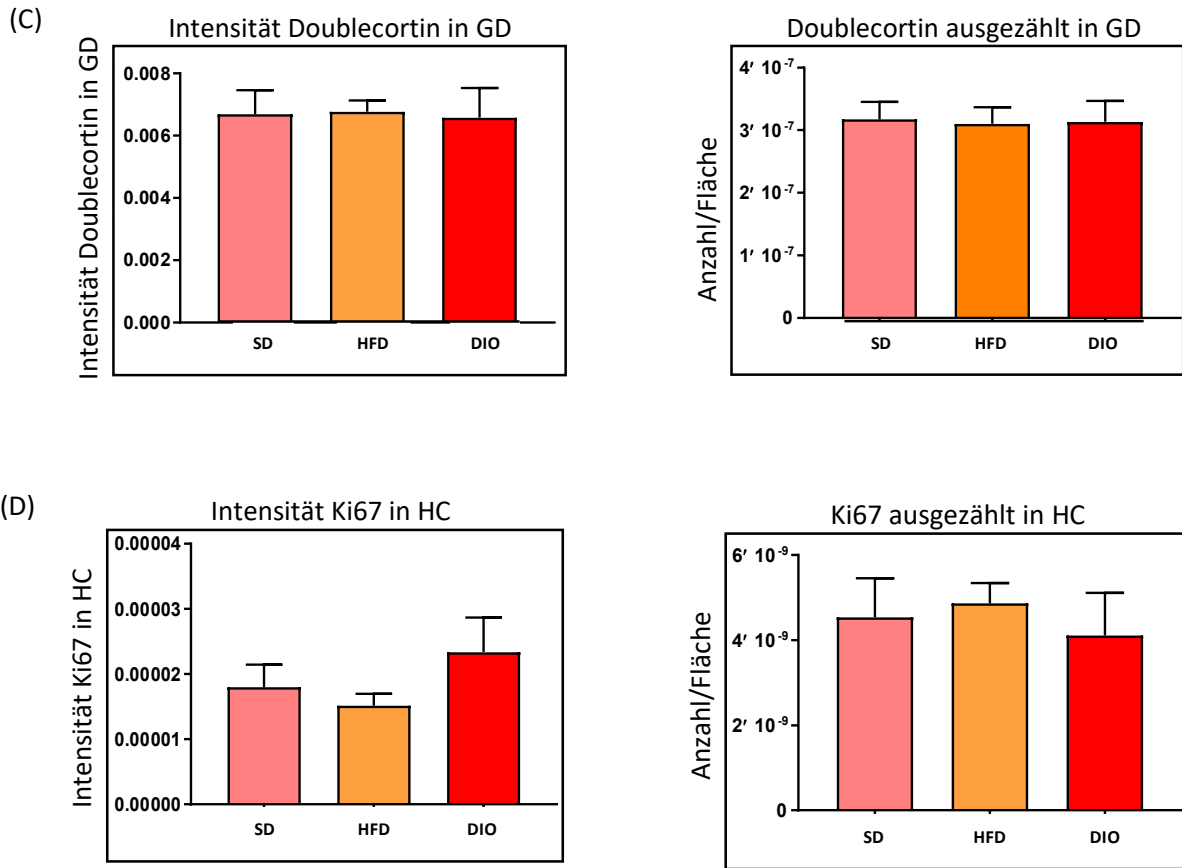


Abbildung 16

(A): Ergebnisse des Western Blot mit GAP-43 bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

(B): Ergebnisse des Western Blot mit Doublecortin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

(C): Ergebnisse der Quantifizierung von Doublecortin in der Immunfluoreszenz sowohl als Intensitätsmessung, als auch gezählt im GD

(D): Ergebnisse der Quantifizierung von Ki67 in der Immunfluoreszenz sowohl als Intensitätsmessung, als auch gezählt im HC

#### 4.4 Präsynapse

Zur Evaluation des Effekts adipogener Diäten auf die Funktion der Präsynapse wurden Synapsin, Synaptophysin und SNAP25 untersucht. Die Quantifizierung der Synapsen erfolgte mittels Synaptophysin. Im Western Blot, welcher die Quantifizierung von Synaptophysin im kompletten Hippocampus erlaubt, zeigten sich kaum Abweichungen in der Menge von Synaptophysin unter den drei Diäten (Abbildung 17 (A)). Analog hierzu zeigten sich auch in der Immunfluoreszenz im gesamten Hippocampus kaum messbare Unterschiede zwischen den Diäten (Abbildung 17 (B)). Erfolgte die Quantifizierung von Synaptophysin allerdings im CA1, CA3 und Gyrus dentatus, den Untereinheiten des Hippocampus, so zeigte sich in CA3 eine signifikante Reduktion der Menge von Synaptophysin in der DIO gegenüber der Menge in der SD und HFD. Im Gyrus dentatus war die Menge von Synaptophysin in der DIO-Gruppe nur gegenüber der HFD-Gruppe signifikant verringert (Abbildung 17 (B)).



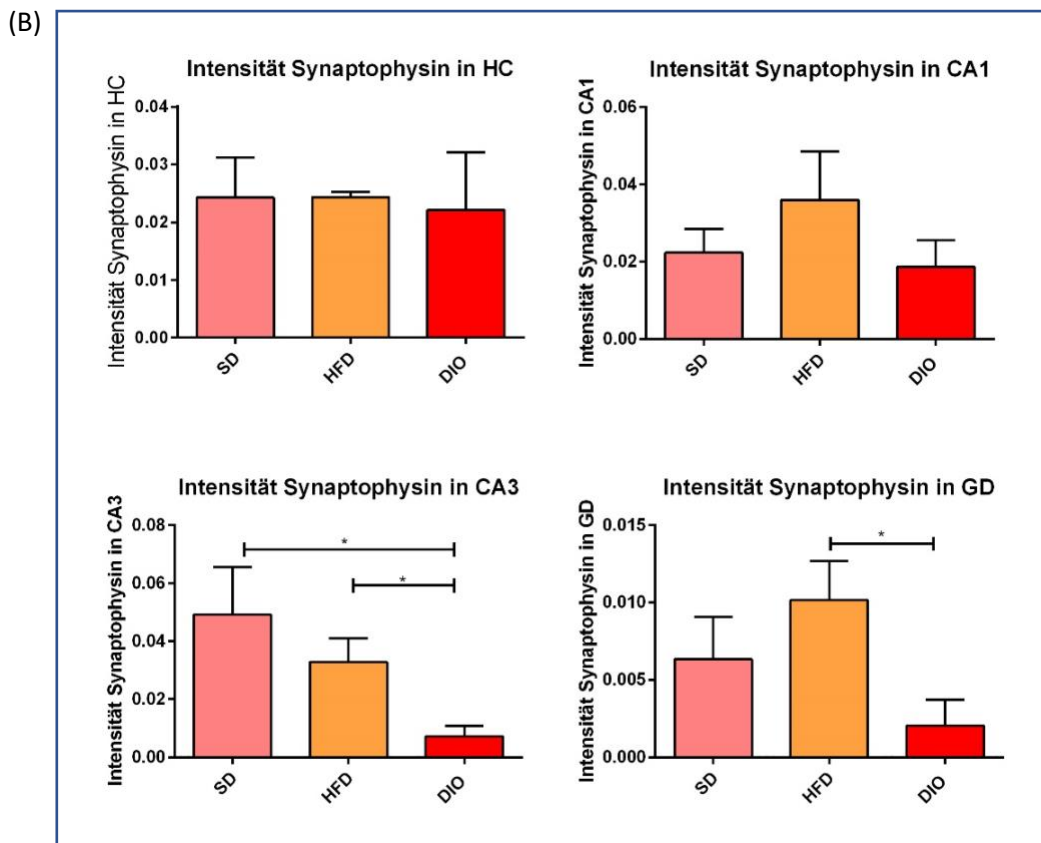
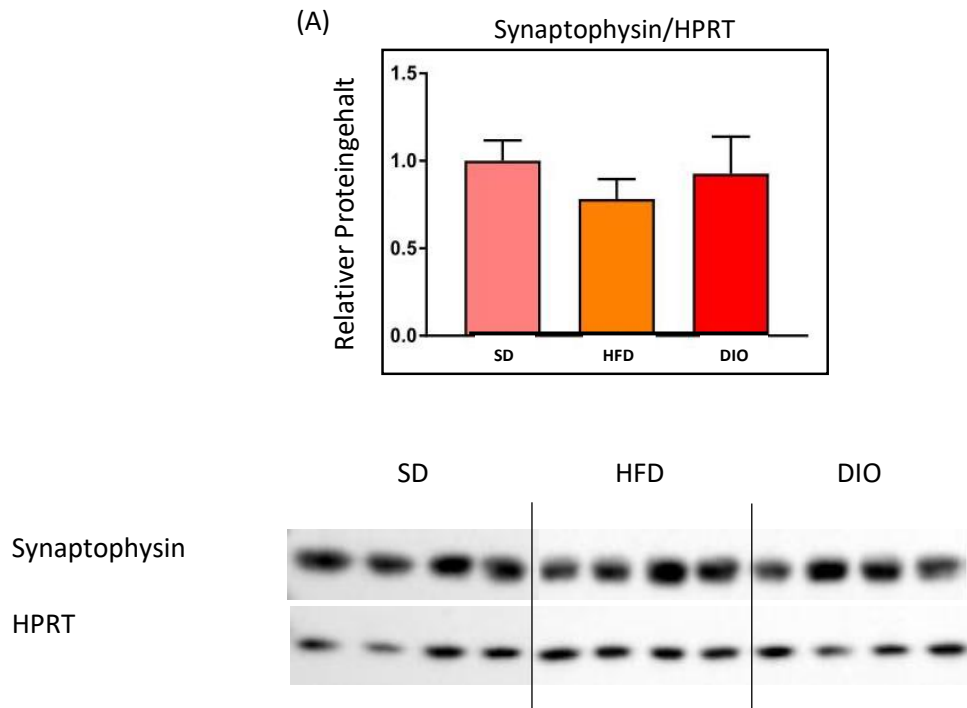


Abbildung 17

(A) Ergebnisse des Western Blot mit Synaptophysin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle  
 (B) Ergebnisse der Quantifizierung von Synaptophysin in der Immunfluoreszenz

Synapsin reguliert an der Präsynapse die Ausschüttung von Vesikeln. Die Konzentrationen von pSynapsin und Synapsin wurden mittels Western Blot ermittelt. Die Konzentrationen von Synapsin in der HFD und DIO waren im Gegensatz zur Expression in der SD signifikant verringert, pSynapsin zeigte eine ähnliche Tendenz, was dazu führte, dass der pSynapsin/Synapsin Quotient in allen drei Diäten einen ähnlichen Wert aufwies (Abbildung 18).

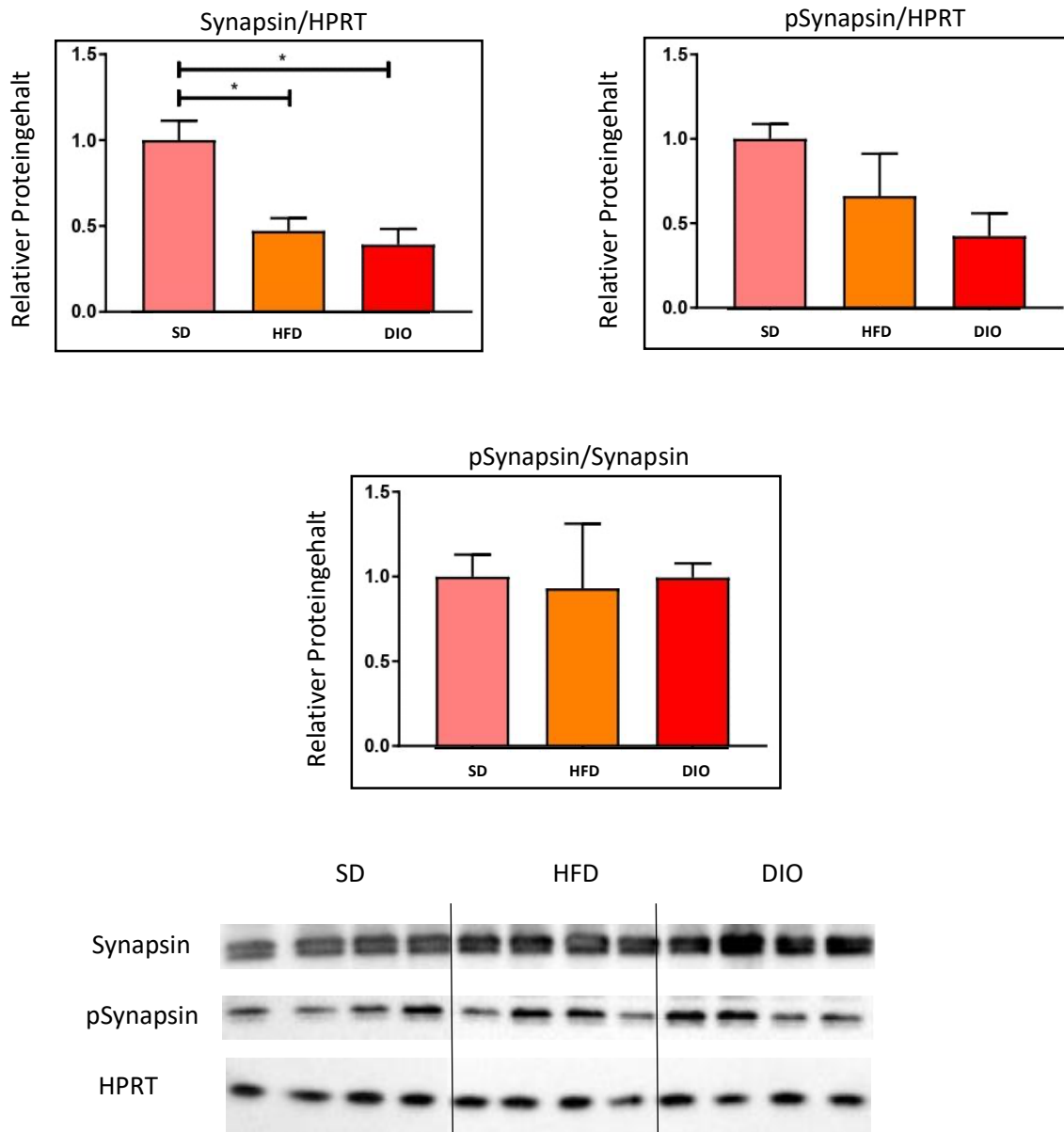


Abbildung 18  
Ergebnisse des Western Blot mit Synapsin und pSynapsin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle

Die Untersuchung hinsichtlich der Menge von SNAP25 fand mittels Immunfluoreszenz statt. Als Teil des SNARE-Komplexes ist dieses ebenso wie das Synapsin an der präsynaptischen Exostose von Vesikeln beteiligt. Sowohl im gesamten Hippocampus als auch in den verschiedenen Regionen, welche

einzel untersucht wurden, zeigte sich in der DIO-Gruppe eine Tendenz zur vermehrten Konzentration. Die Menge von SNAP25 in den Hippocampi der HFD-Tiere war hingegen tendenziell herunterreguliert. In CA1 schien SNAP25 in der HFD kaum vorhanden zu sein (Abbildung 19).

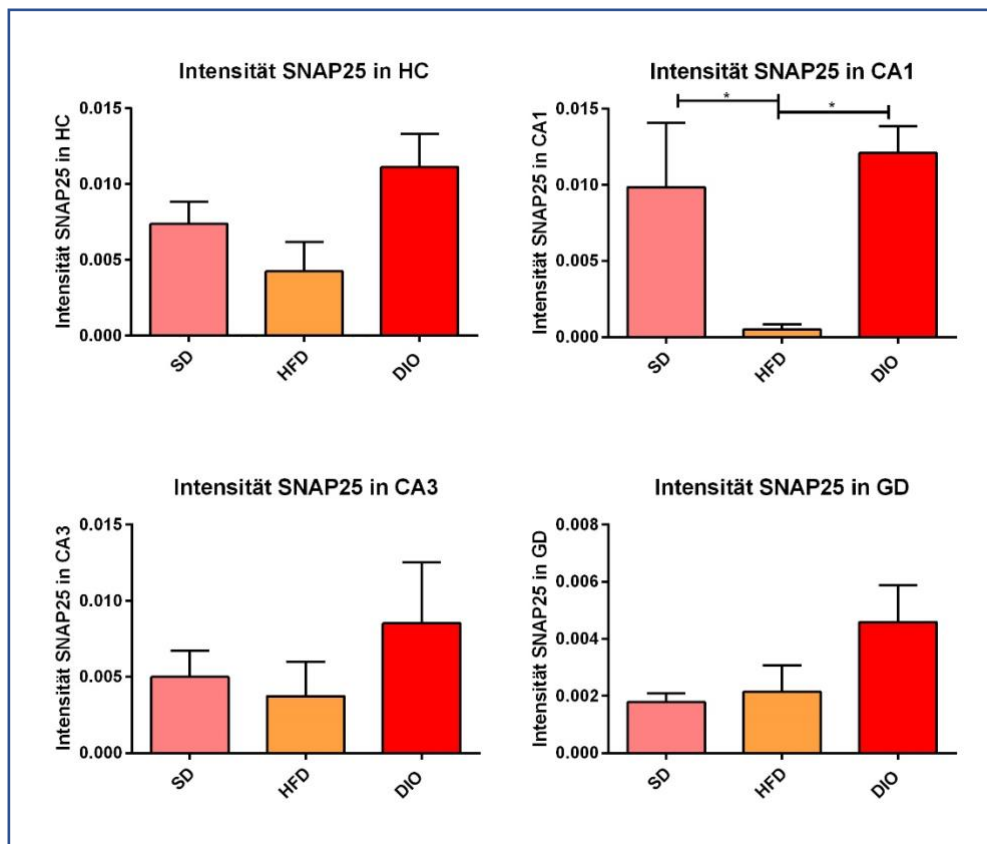


Abbildung 19  
Ergebnisse der Quantifizierung von SNAP 25 in der Immunfluoreszenz

#### 4.5 Postsynapse

Das sowohl an der exzitatorischen als auch an der inhibitorischen Synapse exprimierte Neuroligin 3 wurde mittels Immunfluoreszenz quantifiziert. Neuroligine sind Adhäsionsproteine, welche die Verbindung zwischen Prä- und Postsynapse gewährleisten. Sowohl im gesamten Hippocampus als auch in CA1 und dem Gyrus dentatus zeigte sich eine zweifach signifikante Reduktion in der Menge von Neuroligin 3 in den Hippocampi der DIO-Tieren. Die Tiere der HFD zeigten ähnliche Tendenzen, es konnten keine allerdings keine signifikanten Abweichungen festgestellt werden (Abbildung 20).

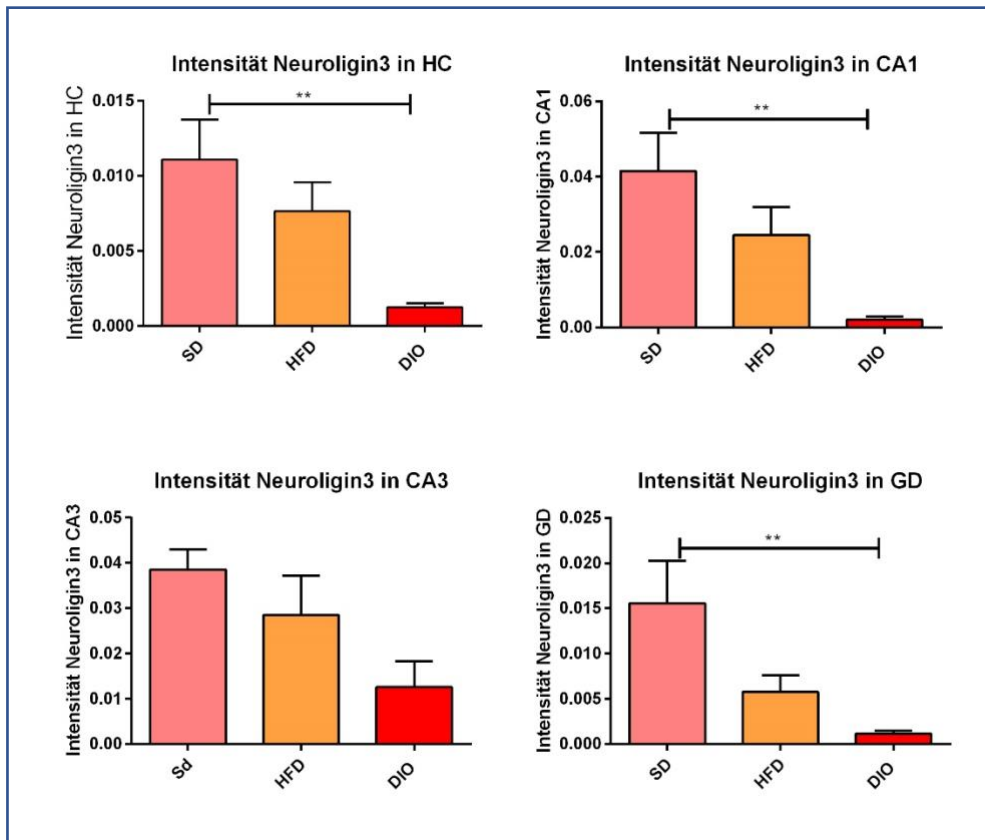


Abbildung 20  
Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 3 in der Immunfluoreszenz

Da Neuroligin 3 sowohl an der exzitatorischen als auch an der inhibitorischen Synapse gebildet wird, kann über dieses nicht differenziert werden, welche postsynaptische Achse hier durch die DIO beeinflusst worden ist. So erfolgte die Evaluation von postsynaptischen Markern, welche der exzitatorischen oder inhibitorischen Achse besser zugeordnet werden können.

#### 4.5.1 Exzitatorischer Impuls

Zur Evaluation hinsichtlich möglicher Effekte der HFD oder DIO auf exzitatorische Pyramidalzellen im Hippocampus wurde das Protein Neuroligin 1, welches an der exzitatorischen Synapse die Adhäsion vermittelt, evaluiert. Es zeigte sich eine Reduktion der Konzentration von Neuroligin 1 vor allem in der DIO-Gruppe gegenüber der Konzentration in den Hippocampi der SD-Tiere, welche unter Erreichen des Signifikanzniveaus blieb (Abbildung 21).

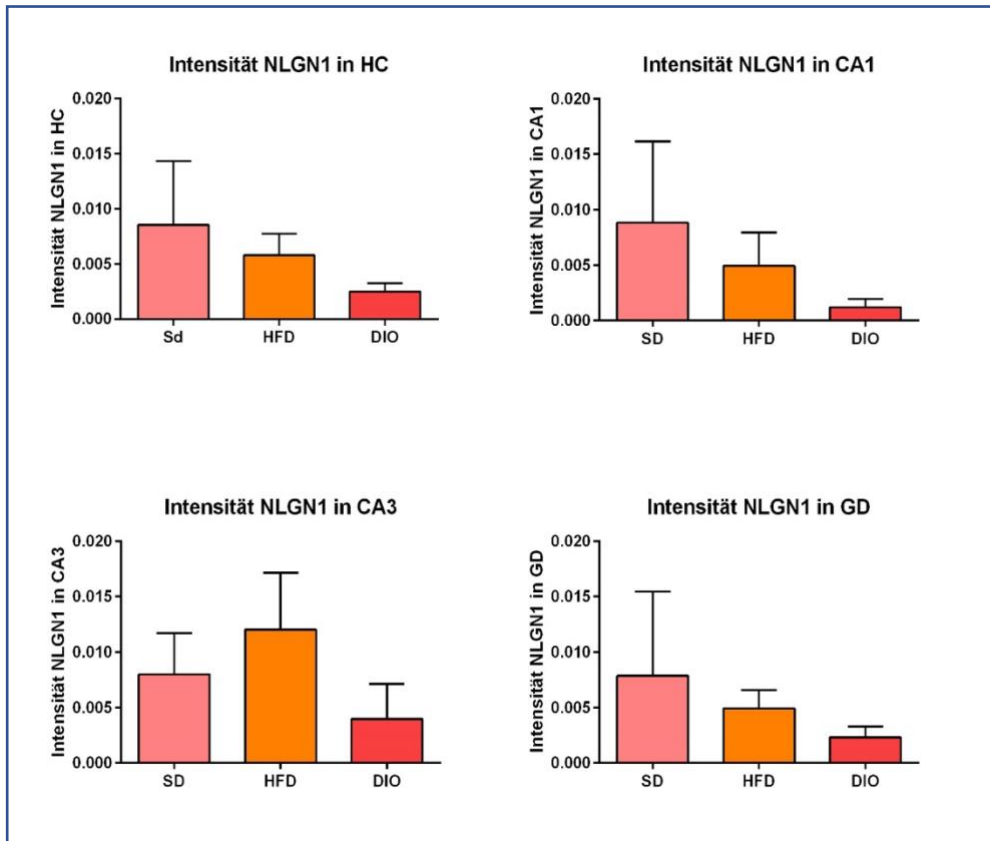


Abbildung 21  
Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 1 in der Immunfluoreszenz

Die postsynaptischen Rezeptoren der exzitatorischen Synapse GluR1 sowie dessen phosphorylierte Form und der NMDA1 Rezeptor wurden ebenfalls mittels Immunfluoreszenz untersucht. An der exzitatorischen Synapse findet die Weiterleitung von Impulsen vor allem durch Glutamat statt. Zur besseren Übersichtlichkeit wird hier nur das Ergebnis des Quotienten aus pGluR1/GluR1 gezeigt. Dabei fanden sich im gesamten Hippocampus, CA1 sowie dem Gyrus dentatus sowohl in der HFD-Gruppe als auch in der DIO-Gruppe eine erhöhte Menge von phosphorylierten Glutamatrezeptoren zu nicht phosphorylierten Rezeptoren, welche allerdings nur im CA1 eine Signifikanz aufwies (Abbildung 22).

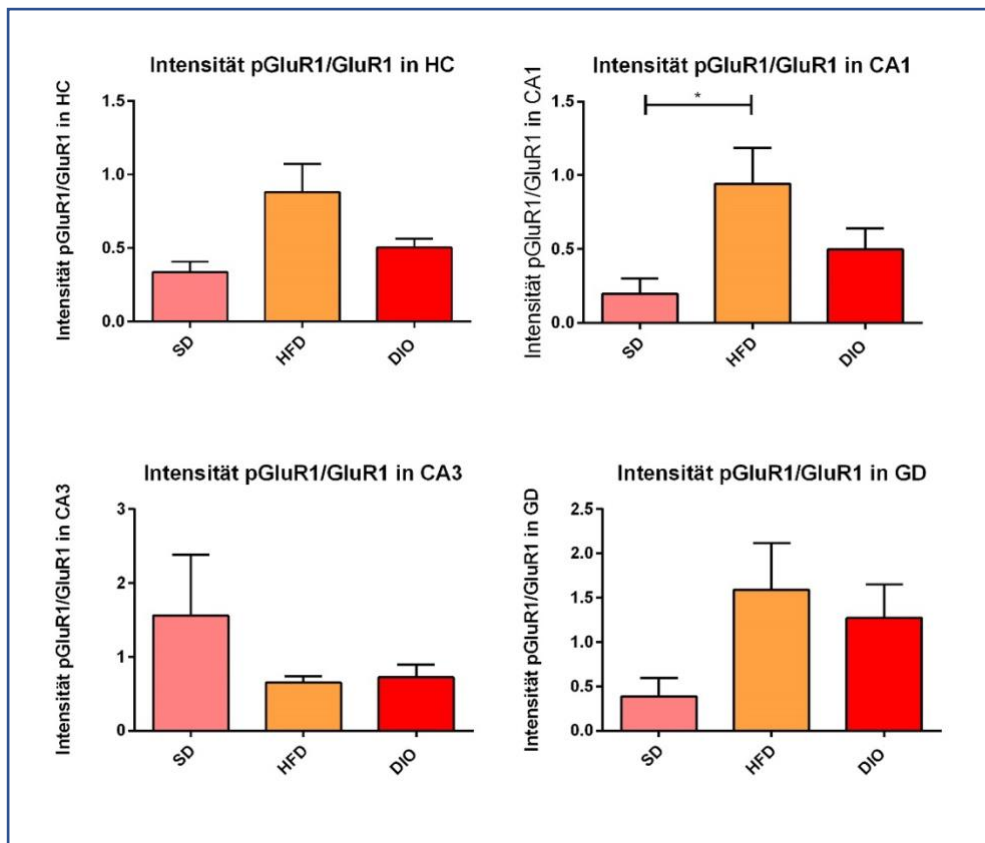


Abbildung 22  
Ergebnisse der Quantifizierung von pGluR1/GluR1 in der Immunfluoreszenz

Der NMDA1 Rezeptor wies hingegen eine signifikante Reduktion der Konzentration in den Hippocampi der DIO-Tiere gegenüber der SD-Tiere im gesamten Hippocampus auf. Diese Tendenz war auch in den Subregionen zu erkennen, vermag allerdings auf Grund zu hohen Abweichungen keine Signifikanz aufzuweisen (Abbildung 23).

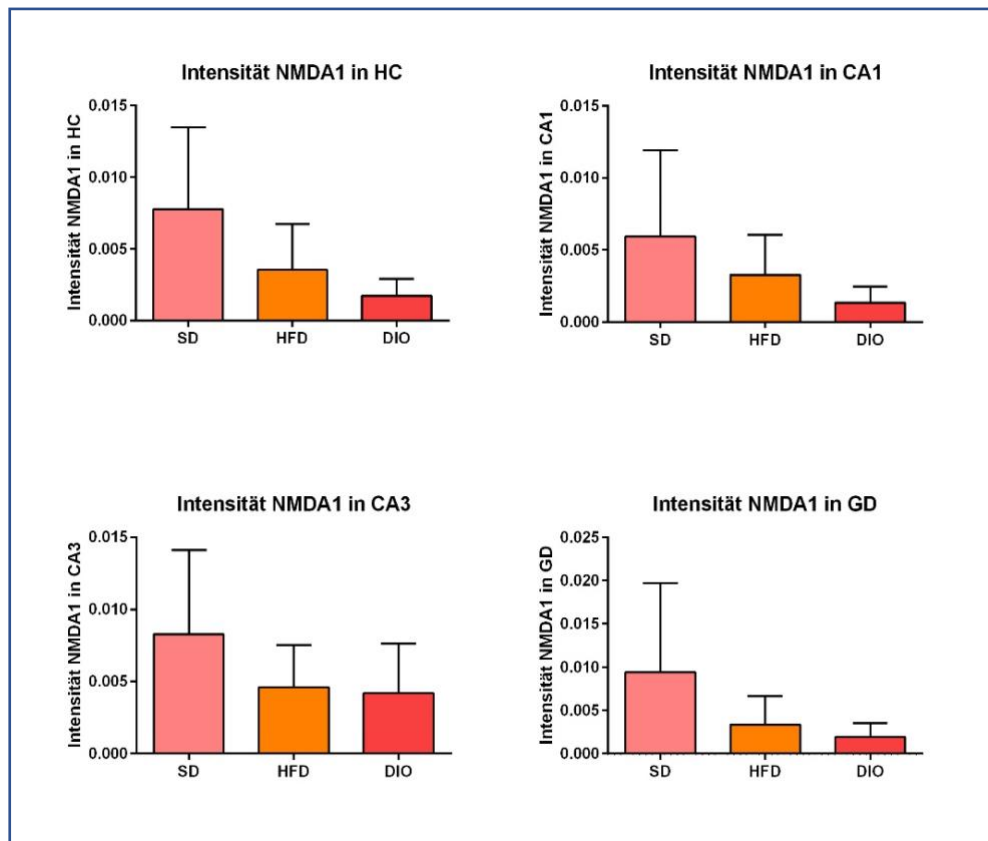
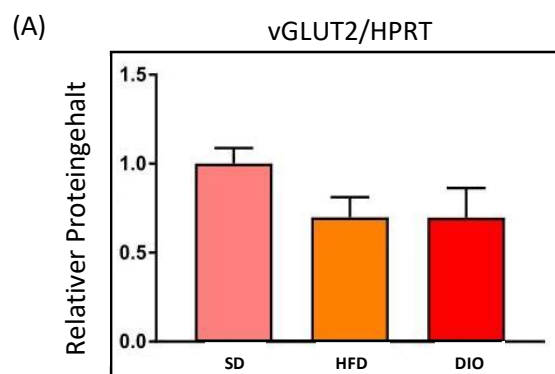
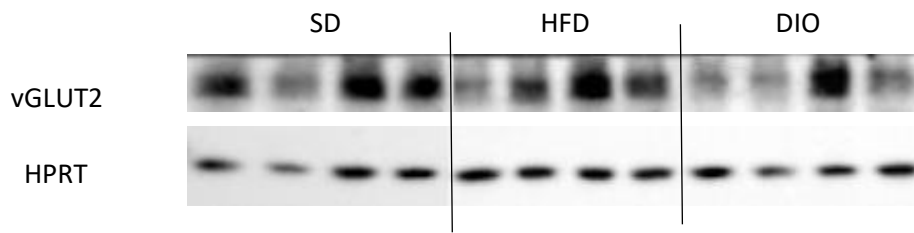


Abbildung 23  
Ergebnisse der Quantifizierung von NMDA1 in der Immunfluoreszenz

Der vesikuläre Glutamat-Transporter, welcher an der exzitatorischen Synapse ein Reuptake und Recycling von in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Vesikeln macht, wurde sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz quantifiziert. Es zeigten sich sowohl in der HFD- und DIO-Gruppe gegenüber dem Gehalt des vesikulären Glutamat-Transporters in der SD-Gruppe leichte Schwankungen, allerdings ohne Erreichen eines Signifikanzniveaus (Abbildung 24).





(B)

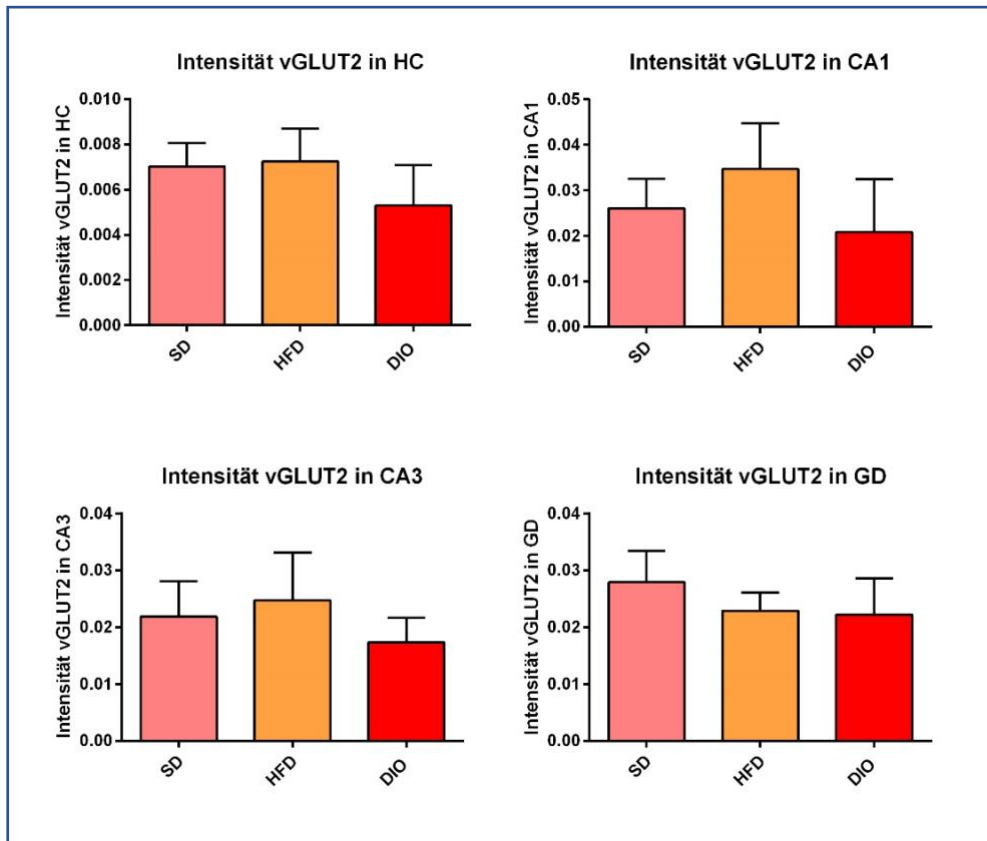


Abbildung 24

(A): Ergebnisse des Western Blot mit vGLUT2 bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle  
 (B): Ergebnisse der Quantifizierung von vGLUT2 in der Immunfluoreszenz

#### 4.5.2 Inhibitorischer Impuls

An der postsynaptischen Membran einer inhibitorischen Synapse ist das Adhäsionsprotein Neuroligin 2 zu finden. Im gesamten Hippocampus, sowie in CA3 und im Gyrus dentatus war eine Reduktion von Neuroligin 2 in der HFD gegenüber der SD zu finden, während die Konzentration in der DIO kaum verändert wurde (Abbildung 25).



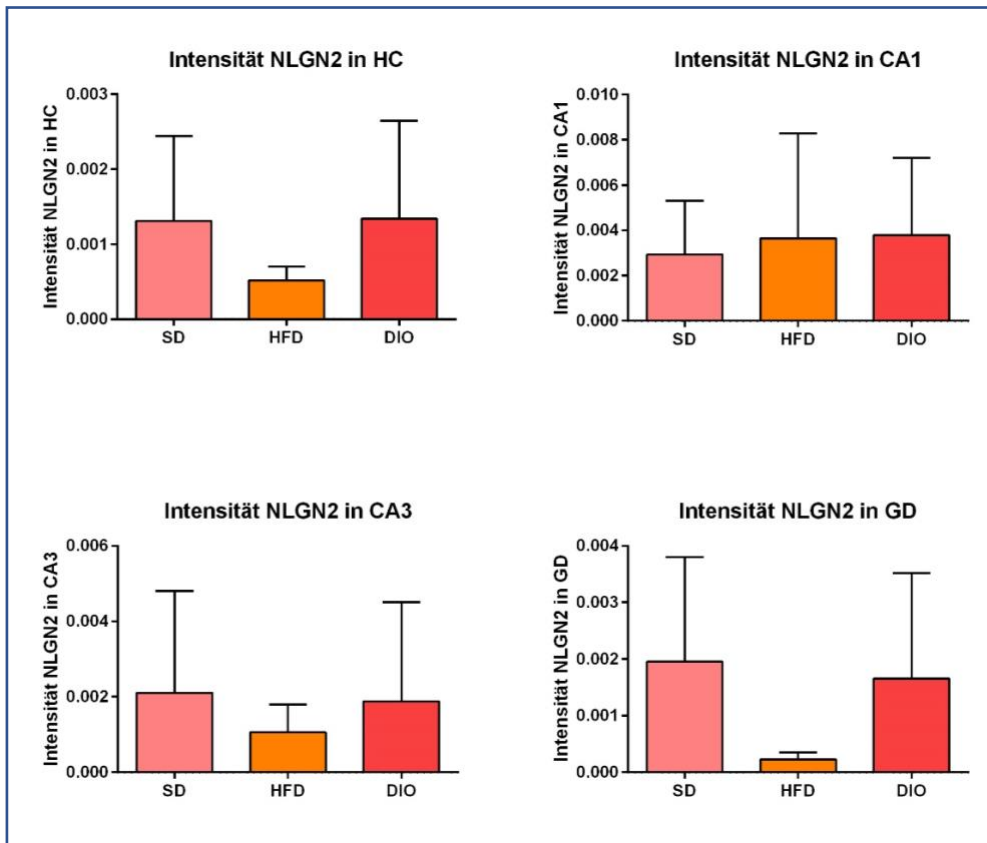


Abbildung 25  
Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 2 in der Immunfluoreszenz

Die Konzentration des postsynaptischen GABA A und B Rezeptors an den inhibitorischen Interneuronen des Hippocampus wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenz quantifiziert.

Die Menge des GABA A Rezeptors war in der HFD-Gruppe im gesamten Hippocampus, in CA3 und im Gyrus dentatus gegenüber der SD-Gruppe signifikant erniedrigt. Gegenüber der DIO-Gruppe zeigte sich im gesamten Hippocampus und in CA3 eine zweifach signifikante Reduktion der Menge von GABA A Rezeptoren. Der Gehalt des GABA A Rezeptors in der DIO wies hingegen kaum eine Veränderung im Vergleich zur Konzentration in der SD-Gruppe auf (Abbildung 26).

Hinsichtlich der Menge des GABA B Rezeptors zeigte sich sowohl im gesamten Hippocampus als auch in allen untersuchten Unterregionen eine tendenzielle Erhöhung in der HFD-Gruppe, während die Menge in den Hippocampi der DIO-Tiere kaum beeinflusst wurde (Abbildung 27).

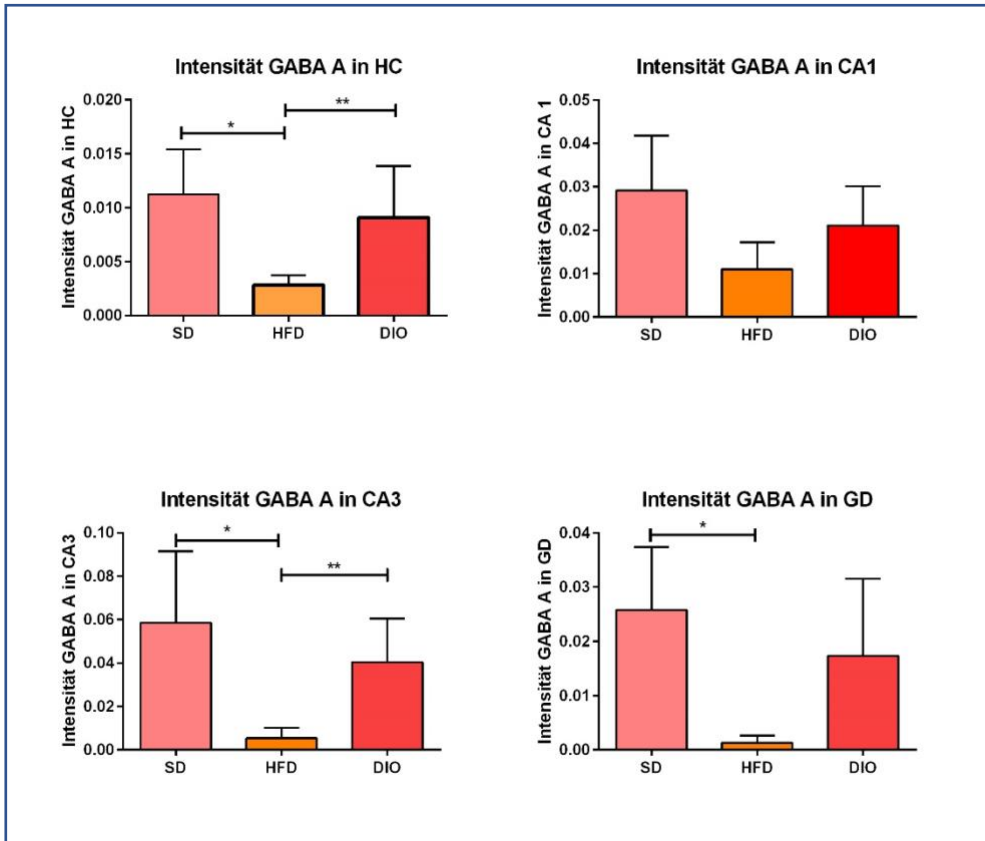


Abbildung 26  
Ergebnisse der Quantifizierung des GABA A Rezeptors in der Immunfluoreszenz

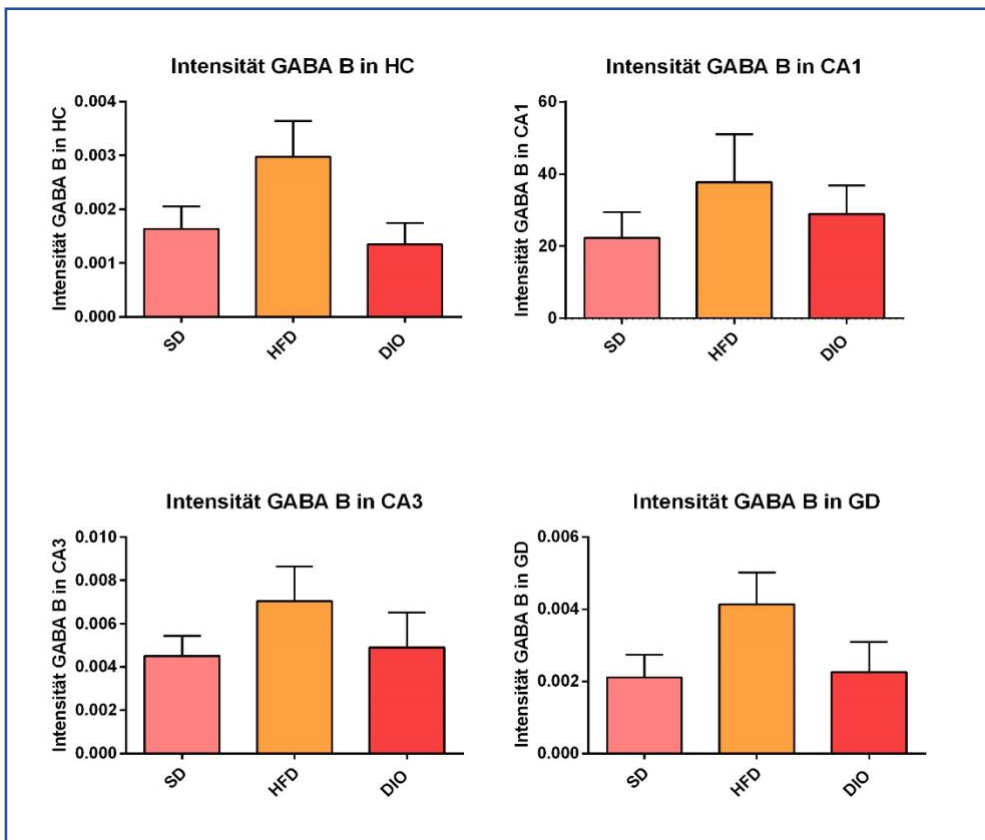


Abbildung 27  
Ergebnisse der Quantifizierung des GABA B Rezeptors in der Immunfluoreszenz

In verschiedenen Quellen konnte bereits eine Beeinflussung der Konzentration des Gerüstbauproteins Gephyrin durch adipogene Diäten nachgewiesen werden. Dies war in diesem Tierversuchsmodell nicht der Fall, sowohl in der HFD- als auch in der DIO-Gruppe zeigten sich kaum eine Abweichung der Menge von Gephyrin gegenüber der SD-Gruppe (Abbildung 28).

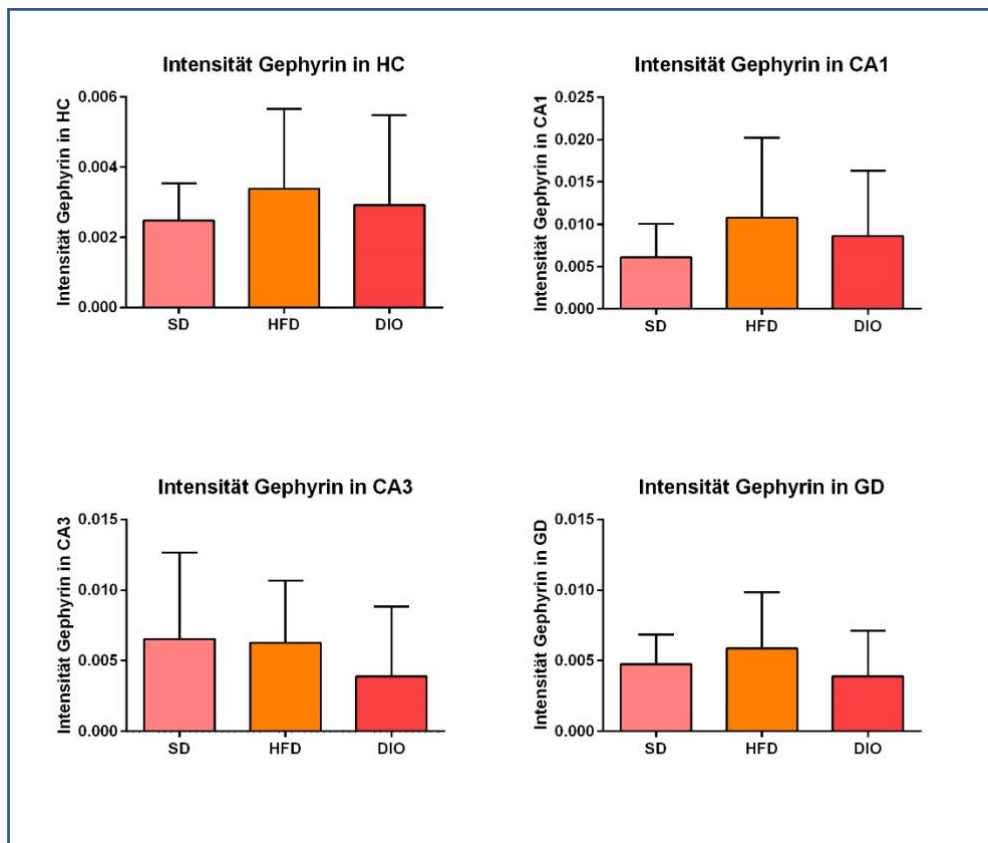
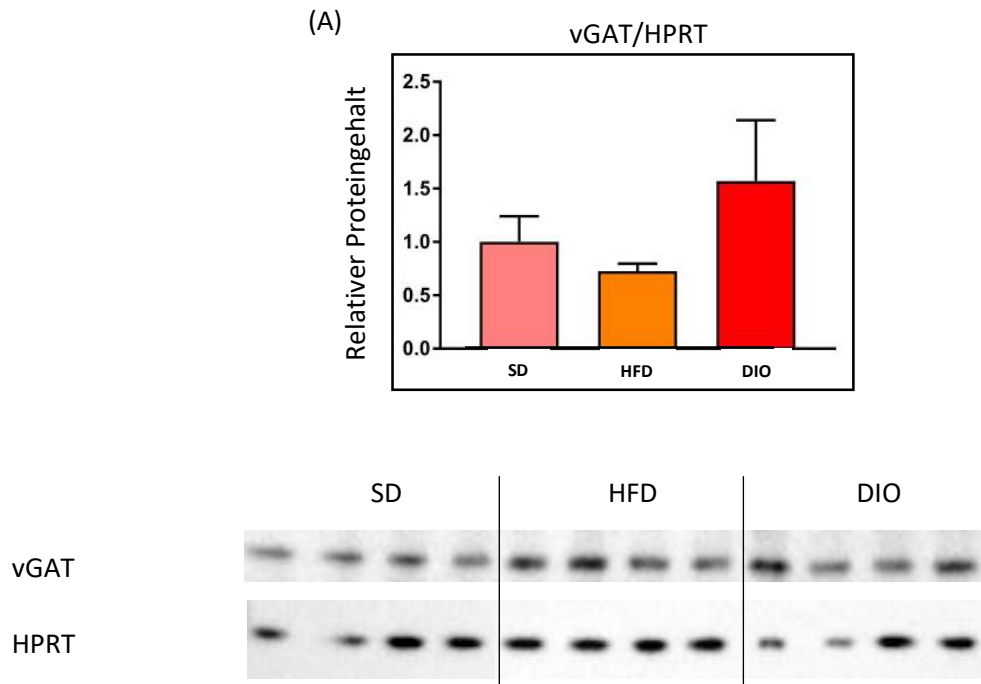


Abbildung 28  
Ergebnisse der Quantifizierung von Gephyrin in der Immunfluoreszenz

Die Menge des vesikulären GABA-Transporters wurde wie der vesikuläre Glutamat-Transporter mittels Western Blot und Immunfluoreszenz ermittelt. Dabei zeigten sich in der Immunfluoreszenz sowohl in der HFD als auch in der DIO eine Reduktion von vGAT gegenüber der Konzentration in den Hippocampi der SD-Tiere im kompletten Hippocampus und allen einzeln untersuchten Regionen (Abbildung 29 (B)). Im Western Blot zeigte sich eine Reduktion von vGAT in der HFD, in den Hippocampi der DIO-Tiere zeigte sich hingegen eine tendenzielle Erhöhung (Abbildung 29 (A)).



(B)

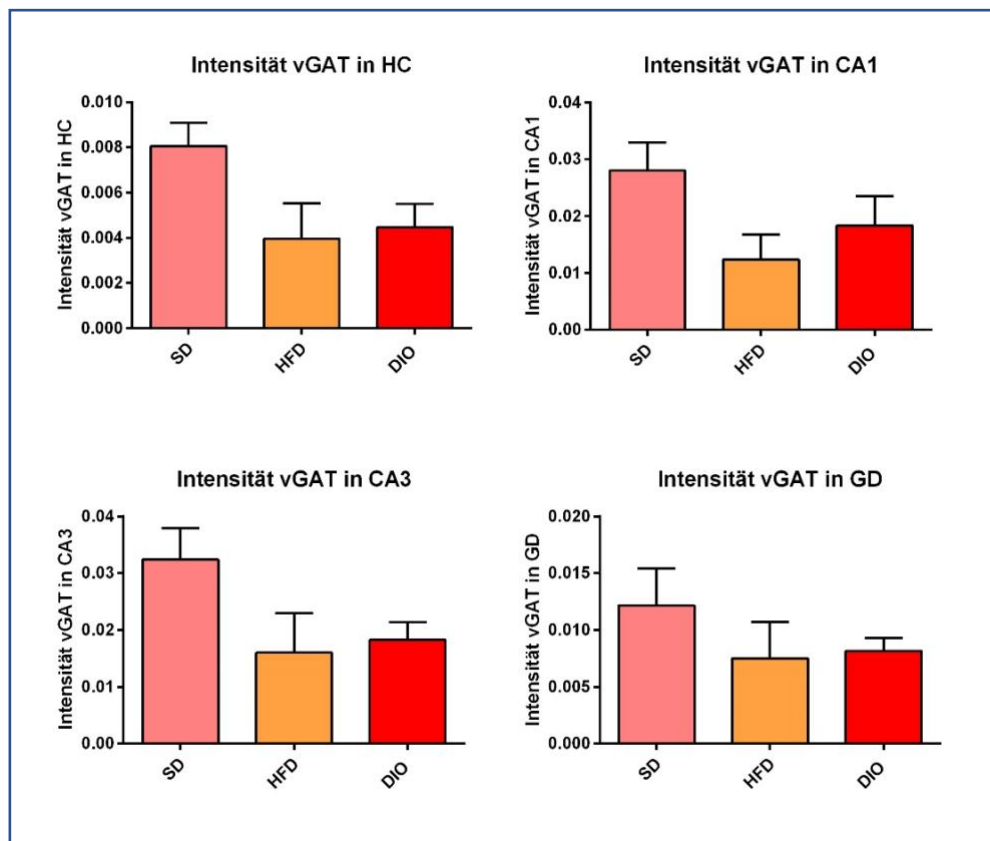


Abbildung 29

(A): Ergebnisse des Western Blot mit vGAT bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle  
 (B): Ergebnisse der Quantifizierung von vGAT in der Immunfluoreszenz

## 5. Diskussion

Die Evaluation des Effektes adipogener Diäten auf den Hippocampus ist in der Literatur bereits vielfach erfolgt. Die Ergebnisse weisen teilweise ähnliche Resultate, teilweise auch unterschiedliche Schlussfolgerungen auf (Schmitz et al. 2018; Lizarbe et al. 2018; Arnold et al. 2014; Robison et al. 2020). Zur Induktion des Phänotyps Übergewicht wurden unterschiedliche Diäten eingesetzt, die insbesondere in ihrem Fett- und Zuckergehalt Unterschiede aufwiesen. Die Suche nach einer Studie, welche den Effekt zweier unterschiedlicher adipogener Diäten auf den Hippocampus im Vergleich zu einer Standarddiät evaluiert, liefert nur wenige Ergebnisse (Lizarbe et al. 2018; Arnold et al. 2014; Greenwood and Winocur 1990). Der Fokus dieser Dissertation lag deshalb auf der Evaluation der phänotypischen Einflüsse zweier unterschiedlicher hochkalorischer Diäten im Vergleich zu einer niedrigkalorischen Diät, sowie auf der möglichen Entwicklung einer Insulin- bzw. Leptinresistenz und den resultierenden Auswirkungen auf die Neurogenese und die synaptische Plastizität im Hippocampus. Dabei sollten insbesondere Unterschiede zwischen den Effekten der HFD und DIO beachtet werden, die, im Falle einer Verwendung in einer Studie, welche lediglich den Unterschied zwischen einer hochkalorischen Diät ungeachtet ihres Zucker- oder Fettanteils im Vergleich zu einer niedrigkalorischen Diät beleuchten würde, zu einer unterschiedlichen Schlussfolgerung hinsichtlich ihres Einflusses auf den Insulin- und Leptinmetabolismus und der synaptischen Plastizität im Hippocampus führen würden.

### 5.1 Phänotyp und Fettdepot

Die Evaluation der vorhandenen Fettdepots und insbesondere die des viszeralen Fetttes ist auf Grund der Tatsache, dass viszerales Fettgewebe ein Hauptpromotor der im Zusammenhang mit Übergewicht entstehenden Inflammation ist, von Interesse (Rosen and Spiegelman 2014). Wie aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu entnehmen ist, stieg das Körpergewicht der Tiere, welche die HFD und DIO erhielten, deutlich mehr an als das der Tiere der SD-Gruppe (Abbildung 7 (A)). Dies führte zu einem deutlich signifikant erhöhten Endgewicht und daraus resultierendem erhöhtem BMI bei Experimentende an den postnatalen Tagen 96-103 (Abbildung 7 (B) und (C)). Die Tiere, welche die HFD erhielten, waren signifikant schwerer als die Tiere der SD-Gruppe. Die Tiere der DIO-Gruppe wogen nicht nur signifikant mehr als die Tiere der SD- Gruppe, sondern auch signifikant mehr als die Tiere der HFD- Gruppe. Es zeigt sich, dass die Induktion von Übergewicht sowohl mittels HFD als auch mittels DIO gelungen ist. Die Fütterung mit der zucker- und fettreichen DIO induzierte einen ausgeprägteren Phänotyp als die Fütterung mit der HFD, die vor allem einen höheren Fettanteil aufweist (Tabelle 2).

Die Tiere, welche die Standard-Diät erhielten, konsumierten pro Tag die meisten Kalorien (Abbildung 6 (D)), obwohl Fett mit 9 kcal/g deutlich mehr Kalorien enthält als Zucker mit 4kcal/g und Protein mit 4 kcal/g und die Tiere der HFD und DIO sowohl mehr Zucker als auch mehr Fett konsumierten als die Tiere der SD-Gruppe (Abbildung 5). Die Tiere der SD-Gruppe fraßen pro Tag ca. 10 kcal, während die Tiere der HFD- Gruppe ca. 9.5 kcal und die Tiere der DIO-Gruppe ca. 9 kcal pro Tag zu sich nahmen, was einer verringerten Kalorienzufuhr von 5 bzw. 10% entspricht. Die Tiere der HFD- und DIO-Gruppe, welche ca. zur Hälfte bzw. ca. zu einem Drittel ihren täglichen Bedarf aus Fett bezogen, müssen folglich weniger gefressen haben als die Tiere der SD-Gruppe, welche nur zu einem geringen Teil ihres Bedarfs über Zufuhr von Fetten bezogen (Abbildung 5).

Die Induktion eines adipösen Phänotyps gelang am besten in der DIO-Gruppe. Die Tiere nahmen zu je einem Drittel am Tag Fett und Kohlenhydrate, welche in dieser Diät hauptsächlich aus Zucker geliefert wurden, zu sich. Die Tiere der HFD-Gruppe nahmen zwar deutlich mehr Fett pro Tag zu sich, welches mehr Kalorien enthält als Zucker, die Induktion eines adipösen Phänotyps gelang allerdings weniger gut als mit Fütterung der DIO. Es lässt sich vermuten, dass eine Diät zur Induktion eines adipösen Phänotyps sowohl fett- als auch zuckerreich sein sollte.

In der Einführung unter 1.2 wurde dargestellt, dass in der Gesellschaft die Fettzufuhr mit einem Drittel des täglichen Energiebedarfs zu Lasten der Kohlenhydrat- und Proteinzufuhr zu hoch ist. Der Medianwert der Kalorienzufuhr liegt interessanterweise unter der empfohlenen Kalorienzufuhr pro Tag, sodass der Grund der steigenden Prävalenz von Übergewicht und Adipositas eher in der Zufuhr von zu viel Fett als zu vielen Kalorien zu vermuten ist. Dies zeigte sich ebenfalls in diesem Versuch.

Die Fettzufuhr der DIO-Tiere mit einem Drittel des täglichen Bedarfs durch Fette entspricht dabei am ehesten der menschlichen Fehlernährung, wohingegen die Tiere der HFD-Gruppe eine noch höhere Fettzufuhr zu Lasten der Kohlenhydrat- und Proteinzufuhr erhielten.

Die Ergebnisse des MicroCTs bestätigten den Gewichtsphänotyp. Sowohl das gesamte Fettdepot als auch das Viszerale waren in der HFD und DIO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe signifikant um ca. das dreifache erhöht (Abbildung 9 (A)-(B)). Die Zunahme war in den beiden adipogenen Diäten ähnlich und weist keine Signifikanz untereinander auf, obwohl die Tiere der DIO-Gruppe bei Versuchsende auch signifikant schwerer waren als die Tiere der HFD-Gruppe.

## **5.2 Glukose- und Leptinmetabolismus**

Erhöhte Serum-Glukose Werte führen zu einer Insulinresistenz verschiedener Gewebearten und in Folge zu einer kompensatorisch vermehrten Expression und Zirkulation im Blut von Insulin. Das Konzept dieser maßgeblich hinter dem Diabetes mellitus Typ 2 stehenden Pathophysiologie wurde bereits 1931 postuliert (Falta und Boller 1931) und einige Jahre später bestätigt (Himsworth 1936). Schon zu Lebzeiten zeigten sich in der HFD und DIO sowohl eine gestörte Glukose-Toleranz als auch

erhöhte Nüchternblutzuckerwerte (Abbildung 8 (A) und (B)). Beide untersuchten Parameter waren in der DIO signifikant stärker erhöht als in der HFD. Schaut man sich die Serum- Insulinspiegel an, so war lediglich die Insulinmenge im Organismus der DIO-Tiere im Vergleich zu den SD-Tieren signifikant erhöht (Abbildung 10 (A)). Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Versuchstiere vor Durchführung des ELISAs nicht gefastet hatten und es sich somit nicht um Nüchtern-Insulin-Werte handelt.

Die DIO weist den höchsten Zuckeranteil der drei Diäten auf und es wurde täglich dementsprechend auch von den DIO-Tieren der höchste Anteil an Zucker verzehrt (Abbildung 6 (C)). Dies erklärt sehr wahrscheinlich die im Vergleich zu beiden anderen Diäten vermehrt gestörte Glukose-Toleranz sowie die erhöhten Nüchternblutzuckerwerte. Auch andere Mausmodelle von Übergewicht kamen zu dem Schluss, dass eine zucker- und fettreiche Diät einen größeren Einfluss auf den Glukose-Metabolismus der Tiere hatte als eine rein fettreiche Diät (Masi et al. 2017; Morris et al. 2016).

Leptin wird von den Adipozyten exprimiert (MacDougald et al. 1995) und ist 1994 als appetitregulierendes Hormon erstmals beschrieben worden. Es steuert gemäß eines negativem Feedback-Mechanismus bei gefüllten Fettreserven dem Hungergefühl entgegen (Zhang et al. 1994). Der Anteil des Körperfetts korreliert mit der Expression von Leptin, was das Vorliegen einer Leptinresistenz bei Adipositas nahelegt (Considine et al. 1996).

Die Serum Leptin Werte waren in der DIO gegenüber der SD und HFD signifikant erhöht, in der HFD ist ebenfalls eine Erhöhung gegenüber der SD zu beobachten (Abbildung 10 (B)). Ursprünglich war eine Leptinresistenz so definiert, dass der Nachweis schon dann gegeben war, wenn erhöhte Werte von zirkulierendem Leptin im Blut nachgewiesen wurden bei gleichzeitig vorliegendem erhöhtem Körperfettanteil (Friedman und Halaas 1998), was in diesem Fall gegeben wäre (Abbildung 9 (A)-(B)). Eine Neudefinierung der Leptinresistenz wurde 2012 von den National Institutes of Health diskutiert, auf Grund der vielseitigen Wirkungsmechanismen von Leptin befand man die Definition von Leptinresistenz allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht als möglich (Myers et al. 2012). Bis heute wurde keine greifende Definition von Leptinresistenz gefunden (Kang et al. 2020). Bleibt man bei der ursprünglichen Definition, so lag in der HFD und DIO jeweils eine Leptinresistenz vor, wobei das zirkulierende Leptin in der DIO höher war als in der HFD, obwohl die Mäuse der beiden Gruppen annähernd gleiche Konzentrationen von viszeralem und totalem Fettgewebe in den MicroCTs aufwiesen. Die Leptinresistenz ist in der DIO folglich ausgeprägter als in der HFD. Es braucht also anscheinend auch einen hohen Kohlenhydratanteil in der Nahrung, um eine Leptinresistenz in den Versuchstieren zu induzieren.

### **5.2.1 Hippocampaler Insulinmetabolismus**

Zur Beurteilung hippocampaler Insulinsensitivität wurden der Insulinrezeptor $\beta$ , AKT, GSK3 $\beta$ , mTOR, p70s6k und deren phosphorylierte Formen untersucht.

In anderen Studien konnte nach Fütterung von Mäusen mit HFD die Induktion einer Insulinresistenz im Hippocampus gezeigt werden (Park et al. 2019; Park et al. 2022). Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen zentraler Insulinrezeptoren zu einer Dysregulation der Nahrungsaufnahme und in Folge zu Übergewicht führt. (Brüning et al. 2000)

Diese Beobachtungen bestätigten sich nicht in diesem Versuchssetting. Während der Insulinrezeptor sowohl in der HFD als auch in der DIO eine Tendenz zur Reduktion zeigte (Abbildung 11), wiesen alle vier anderen untersuchten Parameter einen erhöhten phosphorylierten/nicht phosphorylierten Zustand in der HFD und DIO auf, welche im Kruskal-Wallis bei pAKT/AKT, pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  und pmTOR/mTOR mit  $p=0,0571$ ,  $p=0,0539$  und  $p=0,0935$  knapp unter Erreichen des Signifikanzniveaus blieben (Abbildung 12-15). Es bestanden leichte Schwankungen zwischen den Effekten der HFD und DIO, welche auf Grund mangelnder Signifikanzen allerdings nicht bewertet werden sollten.

Andere Studien zeigten bei Fütterung männlicher Mäuse ähnliche Effekte auf den hippocampalen Insulinmetabolismus wie die im Rahmen des Forschungsprozesses durchgeführten Versuchen. Baranowski et al. untersuchten den Effekt einer 45% HFD u.a. auf hippocampale Insulinsensitivität nach Fütterung zwischen Woche 20 und 33 mit entweder einer SD oder HFD. Es zeigte sich ebenfalls eine Erhöhung des aktivierten AKT und GSK3 $\beta$ , welche ebenfalls in Bezug auf die SD keine Signifikanz aufwies (Baranowski et al. 2018). Arnold et al. fütterten adulten männlichen Mäusen entweder eine 60% HFD für 17 Tage oder eine 45% HFD für acht Wochen. Bei beiden HFD zeigten sich aktiviertes AKT und GSK3 $\beta$  erhöht, aktiviertes p70s6k zeigte nur bei den 60% HFD-Tieren erhöhte Konzentration im Gegensatz zur Konzentration in der SD. Bei ex vivo Stimulation mit Insulin reagierten in beiden Gruppen die Zellen des Hippocampus der SD-Tiere mit einer signifikanten Erhöhung der Aktivität von AKT, GSK3 $\beta$  und p70s6k, wohingegen die Aktivität beider Parameter in beiden HFD bei Stimulation mit Insulin gleich der Aktivität des insimulierten Gewebes blieb. Arnold et al. konnten auf diesem Weg eine Insulinresistenz nachweisen (Arnold et al. 2014). Man kann nur vermuten, dass sich in diesem Experiment ähnliche Ergebnisse gezeigt hätten. Die vorliegenden Daten könnten demnach auf eine Insulinresistenz hinweisen, welche Konsequenzen für die Gehirnfunktion mit sich bringt, ein Beweis bleibt an dieser Stelle allerdings aus.

Eine mögliche Beeinflussung der Untersuchung durch den Untersuchungszeitpunkt ist ebenfalls zu diskutieren. In einem anderen Adipositasmodell der Arbeitsgruppe wurde der Einfluss maternalen Adipositas auf den hippocampalen Insulinmetabolismus des Nachwuchses evaluiert und es konnte gezeigt werden, dass Phänotyp, Seruminsulin und GTT bereits nach 21 Tagen Pathologien aufwiesen, während nach 70 Tagen der Nachwuchs adipöser Tiere interessanterweise keinen Unterschied im Gewicht, Seruminsulin und GTT zu den Nachkommen normgewichtiger Tiere aufwiesen. Der hippocampale Insulinmetabolismus hingegen wies an p70 in verschiedenen untersuchten Parametern Pathologien auf (Schmitz et al. 2018). Die Bedeutung des Untersuchungszeitpunktes scheint folglich



von großer Bedeutung zu sein und es lässt sich vermuten, dass zu einem anderen Zeitpunkt die zentrale Insulinresistenz in diesem Modell hätte möglicherweise nachgewiesen werden können.

Die Konzentration und Aktivierung von AKT, GSK3 $\beta$ , mTOR und p70s6k unterliegt neben der Einbindung in die Insulinrezeptor-Kaskade weiteren Mechanismen.

Leptin aktiviert ebenfalls AKT (Guo et al. 2008) und analog zur Insulinresistenz konnte in anderen Studien eine Leptin-Resistenz bei Übergewicht gefunden werden (Git und Adan 2015). Der Begriff der Leptinresistenz bedarf allerdings noch einer handfesten Definition, diese über das Vorliegen einer Hyperleptinämie und einem adipösen Phänotyp zu definieren, müsste noch durch weitere Aspekte ergänzt werden (Kang et al. 2020; Myers et al. 2012). Die Serum Leptin Werte waren in der HFD und DIO signifikant gegenüber der SD erhöht (Abbildung 10 (B)) und auf Grund der Expression von Leptinrezeptoren im Hippocampus (Guo et al. 2008) ist eine Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden in Betracht zu ziehen. Da Stat3 ebenfalls von Leptin aktiviert wird (Guo et al. 2008), kann der Nachweis einer veränderten Menge dieses Proteins Anhalt für eine Leptinresistenz liefern. Es erfolgte die Untersuchung hinsichtlich der Konzentration von pStat3 sowohl mittels Western Blot als auch mittels Immunfluoreszenz. Leider ergaben sich mit beiden Methoden keine verwertbaren Ergebnisse, sodass hier weitere Hinweise für eine Leptinresistenz nicht gegeben werden können.

Dass die erhöhten Serumwerte von Leptin neben den erhöhten Serumwerten von Insulin beide einen Einfluss auf den PI3-AKT Signalweg ausgeübt haben, ist zwar sehr wahrscheinlich, eine genaue Differenzierung zwischen den Effekten kann hier nicht erfolgen.

Folglich nehmen auch andere Mediatoren einen Einfluss auf den PI3-Akt Signalweg neben dem klassischen Feedback-Mechanismus bei Hyperinsulinämie, der eine Herunterregulation des Insulinrezeptors und des PI3K-Akt Signalwegs zur Folge hat, und es ist nicht auszuschließen, dass Leptin hier ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss genommen hat.

Xu et al. untersuchten auf Grund der Beobachtung, dass ein Zusammenhang zwischen der veränderten Konzentration von mTOR und Neuroligin 3 mit Autismus-Spektrum-Störungen vorliegt, eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Konzentration von mTOR und der Konzentration von Neuroligin 3. Sie fanden eine vermehrte Phosphorylation der p70s6k im Sinne einer Überaktivierung der mTOR-kultivierten hippocampalen Neuronen mit einer reduzierten Neuroligin3-Menge. Die Überaktivierung von mTOR war ihrerseits auf eine Überaktivierung von AKT zurückzuführen (Xu et al. 2019). Auf diesen möglichen Zusammenhang wird bei der Diskussion der Ergebnisse der Konzentration von Neuroligin 3 eingegangen.

Erhöhte Aktivierung von AKT kann post-mortem gefunden werden und ist mit Neurodegeneration assoziiert (Griffin et al. 2005). Die gefundenen Ergebnisse könnten das Vorliegen degenerativer Veränderungen im Sinne einer verminderten Gedächtnisleistung implizieren. mTOR reguliert in Neuronen die Proteinmenge via s6Kinase regulierter Autophagie an der Synapse und spielt eine Rolle

bei der Langzeitpotenzierung (Tang et al. 2002). Eine veränderte Aktivierung des AKT-Signalwegs kann via GSK-3 $\beta$  zu einem Ungleichgewicht zwischen Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression führen (Peineau et al. 2007).

Obwohl bei den vorliegenden Ergebnissen von Insulinrezeptor  $\beta$ , pAKT/AKT, pGSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , pmTOR/mTOR und pp70s6k/p70s6k der Nachweis einer signifikanten Veränderung der Konzentration der o.g. Parameter bei der HFD und DIO gegenüber der SD ausblieb, ist es basierend gut möglich, dass zu einem anderen Zeitpunkt relevante Veränderungen im Bereich dieser Signalkaskaden erfolgen, welche dann ggf. einen Einfluss auf die synaptische Plastizität ausüben. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

### 5.3 Neurogenese

Alle in dieser Arbeit verwendeten Marker der Neurogenese zeigen weder im Western Blot noch in der Immunfluoreszenz signifikante Abweichungen unter den drei verschiedenen Diäten (Abbildung 16). Doublecortin wurde bereits in mehreren Versuchen der AG Hucklenbruch-Rother eingesetzt und zeigte in der Adipositas induzierten Gruppe meist eine signifikante Abweichung (Schmitz et al. 2018), welche auch von anderen Studiengruppen beobachtet wurden (Park et al. 2019; Bracke et al. 2019; Nakagawa et al. 2022). In wiederum anderen Studienmodellen fanden sich bei einer HFD keine Beeinflussung der Neurogenese (Ferreira et al. 2018). Robison et al. fanden heraus, dass die adulte Neurogenese nur geschlechtsspezifisch durch eine fetthaltige Diät beeinflusst wird. So fand sich nur bei weiblichen Mäusen eine Reduktion von Ki67 und Doublecortin in inverser Korrelation zu erhöhtem Körpergewicht und Glukosetoleranz (Robison et al. 2020). Dies könnte eine Erklärung dafür liefern, dass sich in dieser Versuchsreihe mit ausschließlich männlichen Mäusen keine Signifikanzen zeigen. Park et al. nutzten allerdings ebenso ausschließlich männliche Mäuse in ihrem Versuchssetting (Park et al. 2019), während Bracke et al. sowohl männliche, als auch weibliche Mäuse nutzten (Bracke et al. 2019) und beobachteten bei den männlichen Tieren signifikante Abweichungen in der Konzentration von Markern der Neurogenese. Daher ist ein anderer Einflussfaktor als das Geschlecht basierend auf der aktuellen Datenlage wahrscheinlicher.

Hier rückt insbesondere das Alter bzw. der Zeitpunkt der Schädigung der adipogenen Diät in den Fokus. Bei Schmitz et al. wurden die Effekte einer maternalen Adipositas auf die Nachkommen untersucht, es handelte sich um den Effekt eines perinatalen Nährstoffüberschusses (Schmitz et al. 2018). Park et al. entschieden sich für eine deutlich längere Exposition der HFD von 20 Wochen (Park et al. 2019). Zusammenfassend scheint der Schädigungszeitpunkt und die Dauer eine relevante Rolle für die Auswirkungen auf die Neurogenese zu spielen.

## 5.4 Präsynapse

Die Quantifizierung der Synapsen via Synaptophysin ergab im Western Blot zunächst keine signifikanten Abweichungen zwischen den Diätgruppen. Diese Ergebnisse bestätigen sich in der Immunfluoreszenz bei Betrachtung des gesamten Hippocampus. Bei Messung der Intensität in den verschiedenen Unterregionen, zeigte sich vor allem in CA3 eine signifikante Reduktion von Synaptophysin in der DIO gegenüber beiden anderen Diäten und im Gyrus dentatus von der DIO gegenüber der HFD (Abbildung 17). Eine im Zusammenhang mit Übergewicht stehende Reduktion von Synaptophysin konnte bereits mehrfach in der Literatur nachgewiesen werden. Kawamura et al. sowie Baumgarner et al. konnten eine Reduktion von Synaptophysin im Hippocampus nach Fütterung mit 60% HFD feststellen (Baumgarner et al. 2014; Kawamura et al. 2021), während Stranahan et al. eine Reduktion von Synaptophysin bei Ratten nach Fütterung einer hochkalorischen Diät sowohl im gesamten Hippocampus, als auch in CA1 beobachteten (Stranahan et al. 2008). Die zucker- und fettreiche DIO scheint die Anzahl der Synapsen im Gyrus dentatus und CA3 zu vermindern, ohne dabei die Anzahl der Synapsen in der CA1 Region zu beeinflussen.

Eine solche Reduktion von Synaptophysin wurde unlängst in einer Metaanalyse mit der Dysregulation synaptischer Aktivität bei Schizophrenie assoziiert (Osimo et al. 2019). Eine mit Schizophrenie einhergehende neuronale Dysfunktion geht allerdings meist auch mit einer Herunterregulation von AKT/MTOR einher, diese konnten wir in unserem Modell zum untersuchten Zeitpunkt nicht nachweisen (Chadha und Meador-Woodruff 2018).

Die Fütterung mit HFD und DIO bewirkte hinsichtlich der Menge von Synapsin und pSynapsin eine Reduktion beider Proteine, wodurch sich kein Unterschied im pSynapsin/Synapsin Quotienten zeigte (Abbildung 18). Synapsin nimmt eine wichtige Rolle im negativen Feedback-Mechanismus von Nahrungsaufnahme ein und ist auf Grund dessen in diesem Versuchssetting von Interesse (Campos et al. 2013). Zudem spielt (p)Synapsin eine Rolle in der Signaltransduktion, und ist wesentlich an der Regulation der Transmitterfreisetzung beteiligt. In anderen Studien zeigten sich eine erhöhte Aktivierung von Synapsin bei Fütterung mit adipogenen Diäten (Liao et al. 2013). Auch im Modell der maternalen Adipositas der Arbeitsgruppe konnte bei den Nachkommen eine 70% signifikante Reduktion von phosphoryliertem Synapsin nachgewiesen werden (Schmitz et al. 2018). In diesem Versuchssetting ist die Konzentration von pSynapsin/Synapsin nicht durch eine der beiden adipogenen Diäten beeinflusst worden.

In der Immunfluoreszenz erfolgte auch die Quantifizierung von SNAP25, welches als Teil des SNARE-Komplexes die Mobilisation von Vesikeln zur Synapse ermöglicht (Chen et al. 1999). Während die Konzentration in der DIO-Gruppe erhöht war, war die Konzentration in der HFD-Gruppe ähnlich der Menge von SNAP25 in der SD-Gruppe. In CA1 war SNAP25 in der HFD wenig vorhanden (Abbildung 19). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Lizarbe et al., welche eine 60% HFD und eine 45% HFD gegen eine

SD testeten. Hier ergaben sich hinsichtlich der Konzentration von SNAP25 auch nur signifikante Unterschiede in der 60% HFD (Lizarbe et al. 2018). Reduktion von SNAP 25 ist wie die Reduktion von Synaptophysin assoziiert mit Schizophrenie (Osimo et al. 2019) und mit Manie (Abrial et al. 2014). Bei der Evaluation präsynaptischer Vesikel ergeben sich unterschiedliche Schlussfolgerungen für die HFD und DIO. Während die DIO in CA3 und Gyrus dentatus zu einer Reduktion von präsynaptischen Markern führte und sich somit Hinweise für eine Reduktion von Synapsen ergaben, führte die HFD zu einer Beeinträchtigung über den SNARE-Komplex des Exozytosevorgangs vor allem in CA1. Eine Reduktion von Synapsin, welches auch an der Exozytose beteiligt ist, konnte nicht beobachtet werden. Beide präsynaptischen Vorgänge sind mit Pathologien assoziiert, welche auf einer Dysregulation von synaptischer Aktivität fußen (Osimo et al. 2019; Abrial et al. 2014).

## 5.5 Postsynapse

Neuroigin 3 war sowohl im gesamten Hippocampus als auch in CA1 und Gyrus dentatus in der DIO-Gruppe zweifach signifikant gegenüber der Konzentration in der SD vermindert. Die HFD zeigte ähnliche Tendenzen, ohne Signifikanzen aufzuweisen (Abbildung 20). Wie bereits zuvor erwähnt, reguliert eine verminderte Konzentration von Neuroigin 3 die Aktivität von AKT und mTOR herauf und führt so zu längeren Dendriten und einer vermehrten neuronalen Komplexität (Xu et al. 2019). AKT, mTOR und p70s6k zeigten alle drei Tendenzen eines vermehrten Aufkommens in den adipogenen Diäten. Falls ein Zusammenhang auch hier besteht, müsste die hier vor allem in der DIO gezeigte verringerte Konzentration von Neuroigin 3 einen größeren Einfluss auf die Menge von AKT und mTOR in der DIO aufweisen. Dies ist allerdings nicht der Fall, die Menge von aktiviertem AKT und mTOR ist sogar in der HFD eher ausgeprägt als in der DIO. Eine Beeinflussung von Neuroigin 3 des Pi3-Akt-Signalweges ist zu diesem Zeitpunkt nicht anzunehmen.

Veränderungen in der Konzentration von Neuroigin 3, welche um das Jahr 2000 herum erstmals beschrieben wurden, (Philibert et al. 2000), sind mit Autismus-Spektrum-Störungen assoziiert (Comoletti et al. 2004), und gehen mit einer vermehrten Transmission an inhibitorischen Synapsen einher (Tabuchi et al. 2007). Im Mausmodell sind bei einer Inaktivierung des Neuroigin 3-Komplexes die Symptome einer Autismus-Spektrum-Störung reproduzierbar (Radyushkin et al. 2009). Im Knockout-Modell sind erhöhte Transmissionen an inhibitorischen Synapsen allerdings nicht nachzuweisen (Tabuchi et al. 2007), zumindest nicht durch einen isolierten Neuroigin-Knockout (Chanda et al. 2017). Chanda et al. kommen in einer anderen Studie zu dem Ergebnis, dass Neuroigin 3 auch einen Einfluss auf die Integrität einer exzitatorischen Synapse durch Beeinflussung der postsynaptischen AMPA-Rezeptordichte und Funktion hat (Chanda et al. 2016). Diesen Zusammenhang wiesen Polepalli et al. ebenfalls nach (Polepalli et al. 2017). Da die Menge von Neuroigin 3 sowohl die Funktion der inhibitorischen als auch der exzitatorischen Synapsen beeinflusst,

und auf Grund der zweifach signifikanten Reduktion von Neuroligin 3 in der DIO gegenüber der SD, erfolgten die weiteren folgenden Untersuchungen postsynaptischer Marker.

### 5.5.1 Exzitatorischer Impuls

Die Konzentration des für exzitatorische Synapsen spezifischen Neuroligin 1 wies vor allem in der DIO einen verminderten Gehalt auf (Abbildung 21).

Die Bindung von präsynaptischem Neurexin und postsynaptischem Neuroligin ist für die Bildung von Synapsen ein wichtiger molekularer Vorgang (Clarris et al. 2002). In diesem Vorgang scheint, wie oben bereits erwähnt, die Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren ebenfalls eine Rolle zu spielen (Heine et al. 2008; Chanda et al. 2016; Polepalli et al. 2017). Zudem konnte eine Beeinflussung des NMDA-Rezeptors nachgewiesen werden, was zu einer Veränderung der Langzeitpotenzierung führt (Wu et al. 2019). Diese molekulare Veränderung verursacht eine Veränderung im Verhalten von Nagern (Luo et al. 2020; Blundell et al. 2010).

Die Aktivierung von GluR1 zeigte sich in der HFD und DIO gegenüber der SD im gesamten Hippocampus, CA1 und Gyrus dentatus erhöht, eine Signifikanz ergab sich nur in der HFD gegenüber der SD in CA1. In CA3 war die Konzentration von pGluR1/GluR1 in den beiden adipogenen Diäten dagegen tendenziell erniedrigt (Abbildung 22). Auch Liao et al. konnten eine erhöhte Aktivierung von GluR1 im Hippocampus bei Ratten mit Diabetes Typ 2 feststellen (Liao et al. 2013). Eine Beeinflussung der Menge der untersuchten AMPA-Untereinheiten durch die reduzierte Konzentration von Neuroligin 1 ist hier eher nicht anzunehmen, da sich vorrangig Effekte in der DIO zeigen müssten.

Die Konzentration des NMDA1-Rezeptors war im gesamten Hippocampus sowie in den untersuchten Subregionen vor allem in der DIO gegenüber der SD erniedrigt (Abbildung 23). Bei recht großer Standardabweichung in der SD-Gruppe blieb eine Signifikanz allerdings aus. Hier kann angenommen werden, dass das in der DIO reduzierte Neuroligin 1 einen Einfluss auf die NMDA1-Rezeptordichte genommen hat. Das zweifach signifikant reduzierte Neuroligin 3 in der DIO könnte hier ebenfalls einen Einfluss ausgeübt haben.

Eine Reduktion von Neuroligin 1 im Hippocampus ist über die Beeinflussung des Vorhandenseins von postsynaptischen Rezeptoren mit reduzierter Bildung von Gedächtnisinhalten assoziiert. Das Ausmaß der kognitiven Degeneration korreliert mit der Reduktion des Neuroligins und kann bei Alzheimer-Demenz nachgewiesen werden (Dufort-Gervais et al. 2020; Goetzl et al. 2018).

Auch mTOR kann einen modulierenden Einfluss auf die Menge von GluR1 ausüben. Es erhöht die Konzentration von GluR1 an der Postsynapse und unterstützt so die Gedächtniskonsolidierung im Hippocampus (Slipczuk et al. 2009). Da pmTOR/mTOR sowohl in der HFD als auch in der DIO Gruppe erhöht war, ist eine Beeinflussung des pGluR1/GluR1 Quotienten möglich. So könnte ein möglicher Effekt des reduzierten Neuroligin 1 in der DIO auf die Konzentration von pGluR1/GluR1 gegenläufig

beeinflusst worden sein. Der Effekt des erhöhten pmTOR/mTOR Quotienten auf pGluR1/GluR1 könnte ebenfalls durch das reduzierte Neuroligin 1 in der DIO abgeschwächt worden sein und erklären, warum der pGluR1/GluR1 Quotient in der DIO nicht so stark erhöht ist, wie in der HFD.

Die Menge von vGLUT2 war in der HFD und DIO ähnlich oder etwas geringer ausgeprägt als in der SD. Klare Tendenzen oder Unterschiede zwischen der HFD und DIO ließen sich nicht erkennen (Abbildung 24). Die Konzentration von vGLUT2 ist im Hippocampus im Stratum granulare und Stratum moleculare externum des Gyrus dentatus, und im Stratum pyramidale, Stratum lacunosum-moleculare und in den Schaffer Kollateralen der CA1-3 Region zu finden (Jung et al. 2018). Eine Verminderung von vGLUT2 im Hippocampus wird mit steigendem Alter beobachtet und steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit verminderter Gedächtnisleistung im Alter (Jung et al. 2018), was auch bei Knockout-Mäusen beobachtet werden kann (Nordenankar et al. 2015). Da hier die Menge von vGLUT2 kaum bis gering vermindert ist, ist davon auszugehen, dass das Reuptake und Recycling von ausgeschütteten Transmittern an den glutamatergen Synapsen im Hippocampus der Tiere, welche eine adipogene Diät erhielten, kaum beeinflusst wurde.

### **5.5.2 Inhibitorischer Impuls**

Auch Neuroligin 2 ist für die Ausreifung und Funktion von Synapsen von Relevanz. Während eine vermehrte Konzentration von Neuroligin 2 mehr inhibitorische Signale zur Folge hat, führt ein Knockout zur Reduktion der Aktivität der gabaergen Achse (Chubykin et al. 2007). Eine Verminderung der Hemmung auf die exzitatorischen Neurone durch inhibitorische Interneurone führt zu einer Veränderung von Vesikelausschüttung, welche in Tierversuchen zu einer Ausprägung eines ängstlichen Phänotyps (Hines et al. 2008; Blundell et al. 2009), oder auch zu Veränderungen der Aggressivität führte (Kohl et al. 2013; van der Kooij et al. 2014). Studien genetischer Mutationen im Neuroligin 2 Gen bei schizophrenen Patienten zeigten eine Häufung von Mutationen gegenüber der Kontrollgruppe (Sun et al. 2011). Bei Induktion der gleichen genetischen Mutation im Mausmodell konnte so ein Schizophrenie ähnliches Verhalten der Tiere bewirkt werden (Jiang et al. 2018). Auch eine Rolle in der Entwicklung von Autismus, wie es bei Neuroligin 3 der Fall ist, wird diskutiert (Pettem et al. 2013).

In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine Reduktion von Neuroligin 2 in der HFD gegenüber der SD und DIO im gesamten Hippocampus, CA3 und Gyrus dentatus (Abbildung 25). Schaut man sich die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von GABA A an, so war hier eine signifikante Reduktion des Rezeptors in der HFD gegenüber der SD und DIO auch im gesamten Hippocampus, CA3 und Gyrus dentatus zu sehen (Abbildung 26). Es ist folglich wahrscheinlich, dass die reduzierte Menge von Neuroligin 2, auch wenn sie unter Erreichen des Signifikanzniveaus blieb, eine reduzierte Konzentration des GABA A- Rezeptors in der HFD zur Folge haben könnte. Dies war vor allem in CA3 und Gyrus dentatus sowie im gesamten Hippocampus zu beobachten.

Eine Veränderung der Konzentration von GABA A Rezeptoren als Folge von Fehlernährung konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Nedergaard und Andreasen 2018) und es könnte sein, dass hier eine Verbindung zu Krankheiten wie Schizophrenie und Autismusspektrumstörungen, welche auf einer Imbalance der exzitatorischen und inhibitorischen Achse beruhen, gezogen werden könnte (Xie et al. 2019). So weisen Mäuse bei Knockout von GABA-A Untereinheiten ein Schizophrenie ähnliches Verhalten auf (Yeung et al. 2018).

Die Ergebnisse der Konzentration des GABA B-Rezeptors wiesen in der HFD eine vermehrte Menge auf, während in der DIO die Proteinmenge in allen Subregionen ähnliche Werte wie in der SD zeigten (Abbildung 27). Neuroligin 2 scheint hier die Konzentration des Rezeptors nicht zu beeinträchtigen.

Im Hippocampus modulieren GABA B Rezeptoren vorrangig den exzitatorischen Effekt von CA3 glutamatergen Synapsen (Lang et al. 2014). Der GABA B-Rezeptor Agonist Baclofen kann in übergewichtigen Mäusen zu einer Reduktion von Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme sowie zu einer verbesserten Glukosetoleranz führen (Sato et al. 2007). Inwieweit der GABA B Rezeptor im Hippocampus von adipogenen Diäten beeinflusst wird, kann aus der Literaturrecherche auf Grund mangelnder Studien nicht evaluiert werden. Es lassen sich allerdings Hinweise finden, dass eine Erhöhung der Expression des GABA-B Rezeptors im Hippocampus mit psychotischem Verhalten bei Nagern assoziiert ist (Grüter et al. 2015).

Die HFD scheint die physiologische Funktion der inhibitorischen Synapse zu verändern. Schlüsselprotein ist hier das Neuroligin 2 über dessen Herunterregulation eine Verminderung des GABA-A-Rezeptors resultiert. Dies führt zu einer verminderten Hemmung der Interneurone auf die exzitatorischen Neurone im Hippocampus. Diese sogenannte E/I Imbalance ist u.a. mit Schizophrenie und Autismusspektrumstörungen assoziiert (Xie et al. 2019; Yeung et al. 2018), welche ihrerseits mit einer erhöhten Konzentration des GABA-B-Rezeptors assoziiert ist (Grüter et al. 2015), welche hier auch beobachtet werden kann.

Gephyrin sichert an inhibitorischen Synapsen die Verankerung von GABA-Rezeptoren im Zytoskelett und garantiert die Akkumulation der Rezeptoren an der richtigen Stelle gegenüber der Präsynapse (Craig et al. 1996). Eine Reduzierung im Zusammenhang mit Übergewicht konnte u.a von Lizarbe et al. nachgewiesen werden (Lizarbe et al. 2018). Eine Verminderung von Gephyrin führt u.a. zu einer verminderten Konzentration von GABA A-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (Jacob et al. 2005) und so zu einer verringerten Frequenz und Amplitude inhibitorischer Signale (Yu et al. 2007). Auf Grund dieses Effektes auf die gabaerge Achse wird eine mögliche Rolle von Gephyrin in der Entwicklung von Schizophrenie und Autismusspektrumstörungen diskutiert (Pizzarelli et al. 2020). In diesem Versuch ergab sich allerdings kein Anhaltspunkt für Veränderungen der Konzentration von Gephyrin in der HFD und DIO gegenüber der SD-Gruppe.

VGAT ist in der HFD und DIO tendenziell geringer vorhanden (Abbildung 29), es findet folglich ein geringes Reuptake und Recycling der in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Transmitter statt (Chaudhry et al. 1998).

## **5.6 Limitationen und Ausblick**

Diese Arbeit zeigt, dass bei der Durchführung diäteninduzierter Adipositasstudien die genaue Auswahl der adipogenen Diät in detaillierter Kenntnis der Zusammensetzung von hoher Relevanz für die Fragestellung und die zu erzielenden Ergebnisse ist. Hier könnte eine Begründung der teilweise unterschiedlichen Studienergebnisse in der Fachliteratur liegen, da unterschiedliche Diäten oder Modelle zur Induktion des Phänotyps Übergewicht genutzt wurden. Oft wird eine 60% HFD verwendet, welche auch die standardmäßig verwendete hochkalorische Diät in den Laboren der Kinderklinik der Universität zu Köln darstellt. Wie in der Einführung bereits erwähnt, wird in Deutschland von vielen Menschen eine zu fettreiche Diät verzehrt, welche einen großen Einfluss auf die steigende Prävalenz von Übergewicht nimmt. Der Anteil des Fetts an der Nahrung liegt allerdings weit entfernt von den 60%, welche die HFD enthält, daher wäre die Induktion von Übergewicht im Mausmodell durch die zucker- und fettreiche DIO realitätsnaher, um zu evaluieren, welche Folgen sich auf metabolischer Ebene finden.

Da die Dauer der Intervention und der Zeitpunkt der Untersuchung hinsichtlich Insulinresistenz von Relevanz ist, wäre hier ebenfalls eine Optimierung des Versuchsaufbaus zu überlegen. Wie schon bereits erwähnt, könnte die zentrale Insulinresistenz ggf. erst später als die periphere Insulinresistenz nachgewiesen werden können. Ebenfalls zu überlegen wäre gewesen, ob die Bestimmung der Insulinmetabolismusparameter nicht nur zu einem sondern zu mehreren Zeitpunkten hätte erfolgen sollen, um so zu erforschen, ob eine Insulinresistenz ggf. nur zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgewiesen werden kann.

Eine in-vitro Stimulation der Hippocampus Zellen mit Insulin ggf. mit Knockdown gewisser Proteine hätte gegebenenfalls weitere interessante Ergebnisse liefern können, um kausale Zusammenhänge zu sichern. So hätte gegebenenfalls eine genauere Differenzierung von einer Leptinresistenz möglich sein können. Vor dem Hintergrund stetig neuer Forschungsergebnisse könnten bei einer Neudefinition oder ergänzenden Definition der Leptinresistenz ein Teil der Ergebnisse neu diskutiert werden.

Die Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese konnte durch die Fütterung mit adipogenen Diäten zu diesem Untersuchungszeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Alle drei untersuchten Marker wiesen keine signifikanten Schwankungen auf. Da in diversen anderen Studien eine Beeinflussung der Neurogenese durch adipogene Diäten belegt werden konnte, ist eine möglicherweise zu kurze Nahrungsintervention zu überlegen.



Sowohl die Insulinresistenz als auch die Neurogenese betreffend ist ein Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Untersuchung naheliegend, gegebenenfalls hätte sich an einem anderen Zeitpunkt eine Insulinresistenz oder verminderte Neurogenese ergeben. Eine zentrale Insulinresistenz könnte ggf. erst später als die periphere Insulinresistenz nachweisbar gewesen sein.

Die DIO ist mit einem Fettgehalt von 45% und einem Kohlenhydratanteil von 35% der in Kapitel 1.2 erwähnten durchschnittlichen Fettzufuhr von 32-36% und Kohlenhydratzufuhr von 43-52% der deutschen Bevölkerung am ähnlichsten. Die durch diese Diät induzierten Pathologien im Hippocampus könnten gegebenenfalls auch beim Menschen nachgewiesen werden. Die weitergehende Forschung diesbezüglich würde sicherlich interessante Ergebnisse liefern. Hier wäre ebenfalls von Interesse, ob die im Tiermodell gezeigten Pathologien klinisch apparent werden könnten, hierzu wären retrospektiv ergänzend in diesem Versuchssetting Verhaltenstestungen mit dem Fokus auf der Detektion neuropsychiatrischer Verhaltensänderungen sinnvoll gewesen. Diese hätten zusammen mit den Ergebnissen der veränderten Konzentration von prä- und postsynaptischen Markern, welche in anderen Studien in den Zusammenhang mit Verhaltenspathologien gebracht werden konnten, weitere Schlussfolgerungen erlaubt.

Des Weiteren ist anzumerken, dass einige Ergebnisse knapp unter Erreichen des Signifikanzniveaus lagen, dies könnte vorrangig mit der geringen Anzahl von sechs Tieren pro Versuchsgruppe zusammenhängen. Mehr Tiere pro Gruppe hätten repräsentativere Ergebnisse liefern können.

Als Ausblick ergeben sich daher folgende Fragen:

- Ist der Nachweis einer Insulinresistenz abhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung?
- Wäre eine weiterführende Definition von Leptinresistenz sinnvoll, um eine Abgrenzung pathologischer Veränderungen nach Zufuhr adipogener Diäten von den Effekten einer Insulinresistenz abzugrenzen?
- Sind bei Nahrungsinterventionstudien mit Fokussierung auf Pathologien des Hippocampus Verhaltenstests standardmäßig sinnvoll um die gefunden pathologischen Veränderungen in einen klinischen Zusammenhang zu bringen?
- Inwieweit können die im Tiermodell nachgewiesenen Veränderungen auch beim Menschen auftreten?

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(1):41–53. doi:10.1038/nrn1824.
2. Abdalla MMI. Central and peripheral control of food intake. *Endocr Regul.* 2017;51(1):52-70. doi:10.1515/enr-2017-0006
3. Abrial E, Bétourné A, Etiévant A, Lucas G, Scarna H, Lambás-Señas L, Haddjeri N. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014. doi:10.1093/ijnp/pyu031.
4. Albin RL, Sakurai SY, Makowiec RL, Gilman S. Excitatory and inhibitory amino acid neurotransmitter binding sites in the cerebellar cortex of the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 1991;4(6):429–37. doi:10.1016/0891-0618(91)90023-6.
5. Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, Carlson GC, Browne CA, Kazi H, et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis.* 2014;67:79–87. doi:10.1016/j.nbd.2014.03.011.
6. Bae-Gartz I, Janoschek R, Breuer S, Schmitz L, Hoffmann T, Ferrari N, et al. Maternal Obesity Alters Neurotrophin-Associated MAPK Signaling in the Hypothalamus of Male Mouse Offspring. *Front Neurosci.* 2019;13:962. doi:10.3389/fnins.2019.00962.
7. Bae-Gartz I, Kasper P, Großmann N, Breuer S, Janoschek R, Kretschmer T, et al. Maternal exercise conveys protection against NAFLD in the offspring via hepatic metabolic programming. *Sci Rep.* 2020;10(1):15424. doi:10.1038/s41598-020-72022-6.
8. Baranowski BJ, Bott KN, MacPherson REK. Evaluation of neuropathological effects of a high-fat high-sucrose diet in middle-aged male C57BL6/J mice. *Physiol Rep.* 2018;6(11):e13729. doi:10.14814/phy2.13729.
9. Baumgarner KM, Setti S, Diaz C, Littlefield A, Jones A, Kohman RA. Diet-induced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge. *Behav Brain Res.* 2014;267:33–41. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.017.
10. Baver SB, Hope K, Guyot S, Bjørbaek C, Kaczorowski C, O'Connell KMS. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci.* 2014;34(16):5486–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.4861-12.2014.
11. Bélanger A, Lavoie N, Trudeau F, Massicotte G, Gagnon S. Preserved LTP and water maze learning in hyperglycaemic-hyperinsulinemic ZDF rats. *Physiol Behav.* 2004;83(3):483–94. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.031.
12. Biessels G-J, Kamal A, Urban IJA, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research.* 1998;800(1):125–35. doi:10.1016/s0006-8993(98)00510-1.
13. Blundell J, Tabuchi K, Bolliger MF, Blaiss CA, Brose N, Liu X, et al. Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2. *Genes Brain Behav.* 2009;8(1):114–26. doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00455.x.
14. Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, et al. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J. Neurosci.* 2010;30(6):2115–29. doi:10.1523/JNEUROSCI.4517-09.2010.
15. Bondan EF, Cardoso CV, Martins MdFM, Otton R. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2019;77(9):601–8. doi:10.1590/0004-282X20190091.

16. Boraxbekk C-J, Stomby A, Ryberg M, Lindahl B, Larsson C, Nyberg L, Olsson T. Diet-Induced Weight Loss Alters Functional Brain Responses during an Episodic Memory Task. *Obes Facts*. 2015;8(4):261–72. doi:10.1159/000437157.
17. Bracke A, Domanska G, Bracke K, Harzsch S, van den Brandt J, Bröker B, Bohlen Und Halbach O von. Obesity Impairs Mobility and Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Exp Neurosci*. 2019;13:1179069519883580. doi:10.1177/1179069519883580.
18. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000;289(5487):2122–5. doi:10.1126/science.289.5487.2122.
19. Budreck EC, Scheiffele P. Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *Eur J Neurosci*. 2007;26(7):1738–48. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05842.x.
20. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol*. 1996;25(12):821–8. doi:10.1007/BF02284844.
21. Calvo-Ochoa E, Hernández-Ortega K, Ferrera P, Morimoto S, Arias C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(6):1001–8. doi:10.1038/jcbfm.2014.48.
22. Campos CA, Shiina H, Silvas M, Page S, Ritter RC. Vagal afferent NMDA receptors modulate CCK-induced reduction of food intake through synapsin I phosphorylation in adult male rats. *Endocrinology*. 2013;154(8):2613–25. doi:10.1210/en.2013-1062.
23. Chadha R, Meador-Woodruff J. S192. AKT-MTOR SIGNALING PATHWAY IS DOWNREGULATED IN SCHIZOPHRENIA. *Schizophrenia Bulletin*. 2018;44(suppl\_1):S400-S400. doi:10.1093/schbul/sby018.979.
24. Chanda S, Aoto J, Lee S-J, Wernig M, Südhof TC. Pathogenic mechanism of an autism-associated neuroligin mutation involves altered AMPA-receptor trafficking. *Mol Psychiatry*. 2016;21(2):169–77. doi:10.1038/mp.2015.20.
25. Chanda S, Hale WD, Zhang B, Wernig M, Südhof TC. Unique versus Redundant Functions of Neuroligin Genes in Shaping Excitatory and Inhibitory Synapse Properties. *J. Neurosci*. 2017;37(29):6816–36. doi:10.1523/JNEUROSCI.0125-17.2017.
26. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. The Vesicular GABA Transporter, VGAT, Localizes to Synaptic Vesicles in Sets of Glycinergic as Well as GABAergic Neurons. *J. Neurosci*. 1998;18(23):9733–50. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-23-09733.1998.
27. Cheke LG, Bonnici HM, Clayton NS, Simons JS. Obesity and insulin resistance are associated with reduced activity in core memory regions of the brain. *Neuropsychologia*. 2017;96:137–49. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2017.01.013.
28. Chen YA, Scales SJ, Patel SM, Doung Y-C, Scheller RH. SNARE Complex Formation Is Triggered by Ca<sup>2+</sup> and Drives Membrane Fusion. *Cell*. 1999;97(2):165–74. doi:10.1016/s0092-8674(00)80727-8.
29. Chubykin AA, Atasoy D, Etherton MR, Brose N, Kavalali ET, Gibson JR, Südhof TC. Activity-dependent validation of excitatory versus inhibitory synapses by neuroligin-1 versus neuroligin-2. *Neuron*. 2007;54(6):919–31. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.029.
30. Clarris HJ, McKeown S, Key B. Expression of neurexin ligands, the neuroligins and the neurexophilins, in the developing and adult rodent olfactory bulb. *Int J Dev Biol*. 2002;46(4):649–52.
31. Cohen JB. Hypertension in Obesity and the Impact of Weight Loss. *Curr Cardiol Rep*. 2017;19(10):98. doi:10.1007/s11886-017-0912-4.

32. Comoletti D, Jaco A de, Jennings LL, Flynn RE, Gaietta G, Tsigelny I, et al. The Arg451Cys-neurologin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *J. Neurosci.* 2004;24(20):4889–93. doi:10.1523/JNEUROSCI.0468-04.2004.
33. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334(5):292–5. doi:10.1056/NEJM199602013340503.
34. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine.* 1941;47(2):200–2. doi:10.3181/00379727-47-13084P.
35. Cops KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565–82. doi:10.1007/s00125-012-2644-8.
36. Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS. Clustering of Gephyrin at GABAergic but Not Glutamatergic Synapses in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 1996;16(10):3166–77. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-10-03166.1996.
37. Datan E, Shirazian A, Benjamin S, Matassov D, Tinari A, Malorni W, et al. mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology.* 2014;452-453:175–90. doi:10.1016/j.virol.2014.01.008.
38. Dean C, Scholl FG, Choih J, et al. Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci.* 2003;6(7):708-716. doi:10.1038/nn1074
39. DECODE Study Group. Does diagnosis of the metabolic syndrome detect further men at high risk of cardiovascular death beyond those identified by a conventional cardiovascular risk score? The DECODE Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14(2):192–9. doi:10.1097/01.hjr.0000230107.78524.da.
40. Di Paolo S, Teutonico A, Leogrande D, Capobianco C, Schena PF. Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin signaling downregulates insulin receptor substrates 1 and 2 and AKT activation: A crossroad between cancer and diabetes? *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2236–44. doi:10.1681/ASN.2006030196.
41. Doré S, Kar S, Rowe W, Quirion R. Distribution and levels of [125I]IGF-I, [125I]IGF-II and [125I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats. *Neuroscience.* 1997;80(4):1033–40. doi:10.1016/s0306-4522(97)00154-1.
42. Dufort-Gervais J, Provost C, Charbonneau L, Norris CM, Calon F, Mongrain V, Brouillette J. Neurologin-1 is altered in the hippocampus of Alzheimer's disease patients and mouse models, and modulates the toxicity of amyloid-beta oligomers. *Sci Rep.* 2020;10(1):6956. doi:10.1038/s41598-020-63255-6.
43. Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 1995;14(2):224–31.
44. Eichenbaum H, Cohen NJ. Can we reconcile the declarative memory and spatial navigation views on hippocampal function? *Neuron.* 2014;83(4):764–70. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.032.
45. Elliott JC, Dover SD. X-ray microtomography. *J Microsc.* 1982;126(Pt 2):211–3. doi:10.1111/j.1365-2818.1982.tb00376.x.
46. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971;8(9):871–4. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-x.
47. Falta W, Boller R. Insulärer und Insulinresistenter Diabetes. *Klin Wochenschr.* 1931;10(10):438–43. doi:10.1007/BF01736348.
48. Ferreira A, Castro JP, Andrade JP, Dulce Madeira M, Cardoso A. Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat. *Neurobiol Learn Mem.* 2018;155:197–207. doi:10.1016/j.nlm.2018.07.014.

49. Fiedorowicz JG, Palagummi NM, Forman-Hoffman VL, Miller DD, Haynes WG. Elevated prevalence of obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular risk factors in bipolar disorder. *Ann Clin Psychiatry*. 2008;20(3):131–7. doi:10.1080/10401230802177722.
50. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet M-C, et al. Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons. *Neuron*. 1999;23(2):247–56. doi:10.1016/S0896-6273(00)80777-1.
51. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763–70. doi:10.1038/27376.
52. Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu X-Y. Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 2008;283(26):18238–47. doi:10.1074/jbc.M800053200.
53. Git KCG de, Adan RAH. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev*. 2015;16(3):207–24. doi:10.1111/obr.12243.
54. Goetzl EJ, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D, Schwartz JB. Declining levels of functionally specialized synaptic proteins in plasma neuronal exosomes with progression of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2018;32(2):888–93. doi:10.1096/fj.201700731R.
55. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med*. 1976;119(1):85–90. doi:10.1620/tjem.119.85.
56. Greenwood CE, Winocur G. Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet. *Behavioral and Neural Biology*. 1990;53(1):74–87. doi:10.1016/0163-1047(90)90831-p.
57. Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, et al. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 2005;93(1):105–17. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02949.x.
58. Grillo CA, Tamashiro KL, Piroli GG, Melhorn S, Gass JT, Newsom RJ, et al. Lentivirus-mediated downregulation of hypothalamic insulin receptor expression. *Physiol Behav*. 2007;92(4):691–701. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.043.
59. Grillo CA, Piroli GG, Evans AN, Macht VA, Wilson SP, Scott KA, et al. Obesity/hyperleptinemic phenotype adversely affects hippocampal plasticity: effects of dietary restriction. *Physiol Behav*. 2011;104(2):235–41. doi:10.1016/j.physbeh.2010.10.020.
60. Grillo CA, Piroli GG, Junor L, Wilson SP, Mott DD, Wilson MA, Reagan LP. Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus. *Physiol Behav*. 2011;105(1):138–44. doi:10.1016/j.physbeh.2011.02.028.
61. Grüter T, Wiescholleck V, Dubovyk V, Aliane V, Manahan-Vaughan D. Altered neuronal excitability underlies impaired hippocampal function in an animal model of psychosis. *Front Behav Neurosci*. 2015;9:117. doi:10.3389/fnbeh.2015.00117.
62. Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *J Biol Chem*. 2008;283(3):1754–63. doi:10.1074/jbc.M703753200.
63. Hauner H, Bechthold A, Boeing H, Brönstrup A, Buyken A, Leschik-Bonnet E, et al. Evidence-based guideline of the German Nutrition Society: carbohydrate intake and prevention of nutrition-related diseases. *Ann Nutr Metab*. 2012;60 Suppl 1:1–58. doi:10.1159/000335326.
64. Heine M, Thoumine O, Mondin M, Tessier B, Giannone G, Choquet D. Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20947–52. doi:10.1073/pnas.0804007106.
65. Henny P, Jones BE. Vesicular glutamate (VGLut), GABA (VGAT), and acetylcholine (VACht) transporters in basal forebrain axon terminals innervating the lateral hypothalamus. *J Comp Neurol*. 2006;496(4):453–67. doi:10.1002/cne.20928.

66. Herzog JI, Thome J, Demirakca T, Koppe G, Ende G, Lis S, et al. Influence of Severity of Type and Timing of Retrospectively Reported Childhood Maltreatment on Female Amygdala and Hippocampal Volume. *Sci Rep.* 2020;10(1):1903. doi:10.1038/s41598-020-57490-0.
67. Himsworth HP. DIABETES MELLITUS. *The Lancet.* 1936;227(5864):127–30. doi:10.1016/S0140-6736(01)36134-2.
68. Hines RM, Wu L, Hines DJ, Steenland H, Mansour S, Dahlhaus R, et al. Synaptic imbalance, stereotypies, and impaired social interactions in mice with altered neuroligin 2 expression. *J. Neurosci.* 2008;28(24):6055–67. doi:10.1523/JNEUROSCI.0032-08.2008.
69. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983;67(5):968–77. doi:10.1161/01.cir.67.5.968.
70. Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. *J. Neurosci.* 2005;25(45):10469–78. doi:10.1523/JNEUROSCI.2267-05.2005.
71. Janoschek R, Bae-Gartz I, Vohlen C, Alcázar MAA, Dinger K, Appel S, et al. Dietary intervention in obese dams protects male offspring from WAT induction of TRPV4, adiposity, and hyperinsulinemia. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24(6):1266–73. doi:10.1002/oby.21486.
72. Janoschek R, Handwerk M, Hucklenbruch-Rother E, Schmitz L, Bae-Gartz I, et al. Heterogeneous effects of individual high-fat diet compositions on phenotype, metabolic outcome, and hepatic proteome signature in BL/6 male mice. *Nutrition and Metabolism Bd.* 20, Nr. 1, S. 8. Feb. 2023. doi: 10.1186/s12986-023-00729-0.
73. Jenö P, Ballou LM, Novak-Hofer I, Thomas G. Identification and characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(2):406–10. doi:10.1073/pnas.85.2.406.
74. Jiang D-Y, Wu Z, Forsyth CT, Hu Y, Yee S-P, Chen G. GABAergic deficits and schizophrenia-like behaviors in a mouse model carrying patient-derived neuroligin-2 R215H mutation. *Mol Brain.* 2018;11(1):31. doi:10.1186/s13041-018-0375-6.
75. Jung HY, Yoo DY, Park JH, Kim JW, Chung JY, Kim DW, et al. Age-dependent changes in vesicular glutamate transporter 1 and 2 expression in the gerbil hippocampus. *Mol Med Rep.* 2018;17(5):6465–71. doi:10.3892/mmr.2018.8705.
76. Kang Y, Ge Y, Cassidy RM, Lam V, Luo L, Moon K-M, et al. A combined transgenic proteomic analysis and regulated trafficking of neuroligin-2. *J Biol Chem.* 2014;289(42):29350–64. doi:10.1074/jbc.M114.549279.
77. Kang K-W, Ok M, Lee S-K. Leptin as a Key between Obesity and Cardiovascular Disease. *J Obes Metab Syndr.* 2020;29(4):248–59. doi:10.7570/jomes20120.
78. Kanoski SE, Grill HJ. Hippocampus Contributions to Food Intake Control: Mnemonic, Neuroanatomical, and Endocrine Mechanisms. *Biol Psychiatry.* 2017;81(9):748–56. doi:10.1016/j.biopsych.2015.09.011.
79. Kapuściński J, Yanagi K. Selective staining by 4', 6-diamidino-2-phenylindole of nanogram quantities of DNA in the presence of RNA on gels. *Nucleic Acids Res.* 1979;6(11):3535–42. doi:10.1093/nar/6.11.3535.
80. Kawamura N, Katsuura G, Yamada-Goto N, Novianti E, Inui A, Asakawa A. Impaired brain fractalkine-CX3CR1 signaling is implicated in cognitive dysfunction in diet-induced obese mice. *BMJ Open Diab Res Care.* 2021;9(1):e001492. doi:10.1136/bmjdr-2020-001492.
81. Kerner W, Brückel J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel.* 2007;2(S 2):147–9. doi:10.1055/s-2007-960631.
82. Kneussel M, Betz H. Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol.* 2000;525 Pt 1:1–9. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-4-00001.x.

83. Kohl C, Riccio O, Grosse J, Zanoletti O, Fournier C, Schmidt MV, Sandi C. Hippocampal neuroligin-2 overexpression leads to reduced aggression and inhibited novelty reactivity in rats. *PLoS One*. 2013;8(2):e56871. doi:10.1371/journal.pone.0056871.
84. Kondo H, Lavenex P, Amaral DG. Intrinsic connections of the macaque monkey hippocampal formation: II. CA3 connections. *J Comp Neurol*. 2009;515(3):349–77. doi:10.1002/cne.22056.
85. Könnner AC, Janoschek R, Plum L, et al. Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production. *Cell Metab*. 2007;5(6):438–449. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.004
86. Krems C, Walter C, Heuer T. Nationale Verzehrstudie II Lebensmittelverzehr und Nährstoffzufuhr auf Basis von 24h-Recalls. 2013.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. doi:10.1038/227680a0.
88. Lang M, Moradi-Chameh H, Zahid T, Gane J, Wu C, Valiante T, Zhang L. Regulating hippocampal hyperexcitability through GABAB Receptors. *Physiol Rep*. 2014;2(4):e00278. doi:10.14814/phy2.278.
89. Lang BT, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain Research*. 2009;1258:25–33. doi:10.1016/j.brainres.2008.12.026.
90. Li X-L, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience*. 2002;113(3):607–15. doi:10.1016/s0306-4522(02)00162-8.
91. Liao M-H, Xiang Y-C, Huang J-Y, Tao R-R, Tian Y, Ye W-F, et al. The disturbance of hippocampal CaMKII/PKA/PKC phosphorylation in early experimental diabetes mellitus. *CNS Neurosci Ther*. 2013;19(5):329–36. doi:10.1111/cns.12084.
92. Lim NF, Nowycky MC, Bookman RJ. Direct measurement of exocytosis and calcium currents in single vertebrate nerve terminals. *Nature*. 1990;344(6265):449–51. doi:10.1038/344449a0.
93. Lizarbe B, Soares AF, Larsson S, Duarte JMN. Neurochemical Modifications in the Hippocampus, Cortex and Hypothalamus of Mice Exposed to Long-Term High-Fat Diet. *Front Neurosci*. 2018;12:985. doi:10.3389/fnins.2018.00985.
94. Lobnig BM, Krömeke O, Optenhostert-Porst C, Wolf OT. Hippocampal volume and cognitive performance in long-standing Type 1 diabetic patients without macrovascular complications. *Diabet Med*. 2006;23(1):32–9. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01716.x.
95. Luo J, Tan JM, Nithianantharajah J. A molecular insight into the dissociable regulation of associative learning and motivation by the synaptic protein neuroligin-1. *BMC Biol*. 2020;18(1):118. doi:10.1186/s12915-020-00848-7.
96. Luse SA. Electron microscopic observations of the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(5):531–42. doi:10.1083/jcb.2.5.531.
97. Macdonald RL, Young AB. Pharmacology of GABA-mediated inhibition of spinal cord neurons in vivo and in primary dissociated cell culture. *Mol Cell Biochem*. 1981;38 Spec No(Pt 1):147–62. doi:10.1007/BF00235693.
98. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9034–7. doi:10.1073/pnas.92.20.9034.
99. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–74. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009.
100. Masi LN, Martins AR, Crisma AR, do Amaral CL, Davanzo MR, Serdan TDA, et al. Combination of a high-fat diet with sweetened condensed milk exacerbates inflammation and insulin resistance induced by each separately in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):3937. doi:10.1038/s41598-017-04308-1.
101. Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S-i, Ottersen OP. Organization of AMPA Receptor Subunits at a Glutamate Synapse: A Quantitative Immunogold Analysis of Hair Cell Synapses in

- the Rat Organ of Corti. *J. Neurosci.* 1996;16(14):4457–67. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-14-04457.1996.
102. McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.* 2010;93(4):546–53. doi:10.1016/j.nlm.2010.02.002.
  103. Mensink GBM, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C. Übergewicht und Adipositas in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013;56(5-6):786–94. doi:10.1007/s00103-012-1656-3.
  104. Merino P, Diaz A, Torre ER, Yepes M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) regulates the expression and function of growth-associated protein 43 (GAP-43) in the synapse. *J Biol Chem.* 2020;295(2):619–30. doi:10.1074/jbc.RA119.010644.
  105. Migueles JH, Cadenas-Sanchez C, Esteban-Cornejo I, Torres-Lopez LV, Aadland E, Chastin SF, et al. Associations of Objectively-Assessed Physical Activity and Sedentary Time with Hippocampal Gray Matter Volume in Children with Overweight/Obesity. *J Clin Med* 2020. doi:10.3390/jcm9041080.
  106. Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2014;42:10–21. doi:10.1016/j.bbi.2014.04.001.
  107. Mizuguchi M, Qin J, Yamada M, Ikeda K, Takashima S. High Expression of Doublecortin and KIAA0369 Protein in Fetal Brain Suggests Their Specific Role in Neuronal Migration. *The American Journal of Pathology.* 1999;155(5):1713–21. doi:10.1016/S0002-9440(10)65486-7.
  108. Morris JL, Bridson TL, Alim MA, Rush CM, Rudd DM, Govan BL, Ketheesan N. Development of a diet-induced murine model of diabetes featuring cardinal metabolic and pathophysiological abnormalities of type 2 diabetes. *Biol Open.* 2016;5(8):1149–62. doi:10.1242/bio.016790.
  109. Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppertsberg JP. A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science.* 1994;266(5187):1059–62. doi:10.1126/science.7973663.
  110. Mueller K, Sacher J, Arelin K, Holiga S, Kratzsch J, Villringer A, Schroeter ML. Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Transl Psychiatry.* 2012;2:e200. doi:10.1038/tp.2012.121.
  111. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992;116(1):201–11.
  112. Myers MG, Heymsfield SB, Haft C, Kahn BB, Laughlin M, Leibel RL, et al. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metab.* 2012;15(2):150–6. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.002.
  113. Nakagawa K, Islam S, Ueda M, Nakagawa T. Endoplasmic reticulum stress contributes to the decline in doublecortin expression in the immature neurons of mice with long-term obesity. *Sci. Rep., Bd. 12, Nr. 1, S. 1022.* 2022. doi: 10.1038/s41598-022-05012-5.
  114. Nakandakari SCBR, Muñoz VR, Kuga GK, Gaspar RC, Sant'Ana MR, Pavan ICB, et al. Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2019;79:284–93. doi:10.1016/j.bbi.2019.02.016.
  115. NCD Risk Factor Collaboration. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet.* 2016;387(10026):1377–96. doi:10.1016/s0140-6736(16)30054-x.
  116. Nedergaard S, Andreasen M. Opposing effects of 2-deoxy-d-glucose on interictal- and ictal-like activity when K<sup>+</sup> currents and GABAA receptors are blocked in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol.* 2018;119(5):1912–23. doi:10.1152/jn.00732.2017.



117. Nguyen L, He Q, Meiri KF. Regulation of GAP-43 at serine 41 acts as a switch to modulate both intrinsic and extrinsic behaviors of growing neurons, via altered membrane distribution. *Mol Cell Neurosci.* 2009;41(1):62–73. doi:10.1016/j.mcn.2009.01.011.
118. Nordenankar K, Smith-Anttila CJA, Schweizer N, Viereckel T, Birgner C, Mejia-Toiber J, et al. Increased hippocampal excitability and impaired spatial memory function in mice lacking VGLUT2 selectively in neurons defined by tyrosine hydroxylase promoter activity. *Brain Struct Funct.* 2015;220(4):2171–90. doi:10.1007/s00429-014-0778-9.
119. O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research.* 1971;34(1):171–5. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1.
120. Osimo EF, Beck K, Reis Marques T, Howes OD. Synaptic loss in schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Mol Psychiatry.* 2019;24(4):549–61. doi:10.1038/s41380-018-0041-5.
121. Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia.* 1996;39(11):1392–7. doi:10.1007/s001250050588.
122. Papez JW. A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1995;7(1):103–12. doi:10.1176/jnp.7.1.103.
123. Park H-S, Park S-S, Kim C-J, Shin M-S, Kim T-W. Exercise Alleviates Cognitive Functions by Enhancing Hippocampal Insulin Signaling and Neuroplasticity in High-Fat Diet-Induced Obesity. *Nutrients* 2019. doi:10.3390/nu11071603.
124. Park S-S, Kim T-W, Kim B-K, Kim S-H, Park J-S, Shin M-S. The effects of exercise and diet on mental status, insulin signaling pathway, and microbiome in obese mice. *J. Exerc. Rehabil., Bd. 18, Nr. 3, S. 171–178.* 2022. doi: 10.12965/jer.2244278.139.
125. Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, et al. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron.* 2007;53(5):703–17. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.029.
126. Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(9):1687–99. doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004.
127. Pettem KL, Yokomaku D, Takahashi H, Ge Y, Craig AM. Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *J Cell Biol.* 2013;200(3):321–36. doi:10.1083/jcb.201206028.
128. Philibert RA, Winfield SL, Sandhu HK, Martin BM, Ginns EI. The structure and expression of the human neuroligin-3 gene. *Gene.* 2000;246(1-2):303–10. doi:10.1016/S0378-1119(00)00049-4.
129. Pizzarelli R, Griguoli M, Zacchi P, Petrini EM, Barberis A, Cattaneo A, Cherubini E. Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience.* 2020;439:125–36. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.07.036.
130. Platt TL, Beckett TL, Kohler K, Niedowicz DM, Murphy MP. Obesity, diabetes, and leptin resistance promote tau pathology in a mouse model of disease. *Neuroscience.* 2016;315:162–74. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.12.011.
131. Polepalli JS, Wu H, Goswami D, Halpern CH, Südhof TC, Malenka RC. Modulation of excitation on parvalbumin interneurons by neuroligin-3 regulates the hippocampal network. *Nat Neurosci.* 2017;20(2):219–29. doi:10.1038/nn.4471.
132. Prybylowski K, Fu Z, Losi G, Hawkins LM, Luo J, Chang K, et al. Relationship between Availability of NMDA Receptor Subunits and Their Expression at the Synapse. *J. Neurosci.* 2002;22(20):8902–10. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-20-08902.2002.

133. Qiu J, Ogus S, Lu R, Chehab FF. Transgenic Mice Overexpressing Leptin Accumulate Adipose Mass at an Older, But Not Younger, Age\*\*This work was funded by NIH Grant HD-35142. *Endocrinology*. 2001;142(1):348-358. doi:10.1210/endo.142.1.7909
134. Radyushkin K, Hammerschmidt K, Boretius S, Varoqueaux F, El-Kordi A, Ronnenberg A, et al. Neurologin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. *Genes Brain Behav*. 2009;8(4):416–25. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00487.x.
135. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*. 1963;29:91–8.
136. Ramos-Rodriguez JJ, Molina-Gil S, Ortiz-Barajas O, Jimenez-Palomares M, Perdomo G, Cozar-Castellano I, et al. Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS One*. 2014;9(2):e89229. doi:10.1371/journal.pone.0089229.
137. Rankin J, Matthews L, Cobley S, Han A, Sanders R, Wiltshire H, Baker J. Psychological consequences of childhood obesity: psychiatric comorbidity and prevention. *AHMT*. 2016;7:125–46. doi:10.2147/AHMT.S101631.
138. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(7):3116–20. doi:10.1073/pnas.76.7.3116.
139. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA*. 1997;277(19):1539–45. doi:10.1001/jama.1997.03540430051032.
140. Robison LS, Albert NM, Camargo LA, Anderson BM, Salinero AE, Riccio DA, et al. High-Fat Diet-Induced Obesity Causes Sex-Specific Deficits in Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *eNeuro* 2020. doi:10.1523/ENEURO.0391-19.2019.
141. Rolls ET. The storage and recall of memories in the hippocampo-cortical system. *Cell Tissue Res*. 2018;373(3):577–604. doi:10.1007/s00441-017-2744-3.
142. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20–44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012.
143. Rozin P, Dow S, Moscovitch M, Rajaram S. What Causes Humans to Begin and End a Meal? A Role for Memory for What Has Been Eaten, as Evidenced by a Study of Multiple Meal Eating in Amnesic Patients. *Psychol Sci*. 1998;9(5):392–6. doi:10.1111/1467-9280.00073.
144. Sandoval-Salazar C, Ramírez-Emiliano J, Trejo-Bahena A, Oviedo-Solís CI, Solís-Ortiz MS. A high-fat diet decreases GABA concentration in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Biol Res*. 2016;49:15. doi:10.1186/s40659-016-0075-6.
145. Sato I, Arima H, Ozaki N, Ozaki N, Watanabe M, Goto M, et al. Peripherally administered baclofen reduced food intake and body weight in db/db as well as diet-induced obese mice. *FEBS Lett*. 2007;581(25):4857–64. doi:10.1016/j.febslet.2007.09.011.
146. Schiebler W, Jahn R, Doucet JP, Rothlein J, Greengard P. Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J Biol Chem*. 1986;261(18):8383–90.
147. Schienkiewitz A, Kuhnert R, Blume M, Mensink G. Overweight and obesity among adults in Germany - Results from GEDA 2019/2020-EHIS. 2022. doi:10.25646/10293.
148. Schmitz L, Kuglin R, Bae-Gartz I, Janoschek R, Appel S, Mesaros A, et al. Hippocampal insulin resistance links maternal obesity with impaired neuronal plasticity in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;89:46–52. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.12.023.
149. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus Lernatlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. S331-332. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2015.
150. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11–21. doi:10.1136/jnnp.20.1.11.

151. Shanley LJ, Irving AJ, Harvey J. Leptin Enhances NMDA Receptor Function and Modulates Hippocampal Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 2001;21(24):RC186-RC186. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-24-j0001.2001.
152. Sihra TS, Wang JK, Gorelick FS, Greengard P. Translocation of synapsin I in response to depolarization of isolated nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(20):8108–12. doi:10.1073/pnas.86.20.8108.
153. Singh MK, Leslie SM, Packer MM, Zaiko YV, Phillips OR, Weisman EF, et al. Brain and behavioral correlates of insulin resistance in youth with depression and obesity. *Horm Behav.* 2019;108:73–83. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.03.009.
154. Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One.* 2009;4(6):e6007. doi:10.1371/journal.pone.0006007.
155. Song JY, Ichtchenko K, Südhof TC, Brose N. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(3):1100–5. doi:10.1073/pnas.96.3.1100.
156. Stephan H., editor. *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen.* 4th ed. Berlin: Springer Verlag; 1975.
157. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus.* 2008;18(11):1085–8. doi:10.1002/hipo.20470.
158. Stranahan AM. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience.* 2015;309:125–39. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.04.045.
159. Strominger JL. The relation between water intake and food intake in normal rats and in rats with hypothalamic hyperphasia. *Yale J Biol Med.* 1947;19(3):279-288.
160. Sun C, Cheng M-C, Qin R, Liao D-L, Chen T-T, Koong F-J, et al. Identification and functional characterization of rare mutations of the neuroligin-2 gene (NLGN2) associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2011;20(15):3042–51. doi:10.1093/hmg/ddr208.
161. Suzuki WA, Amaral DG. Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J. Neurosci.* 1994;14(3):1856–77. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-03-01856.1994.
162. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science.* 2007;318(5847):71–6. doi:10.1126/science.1146221.
163. Tan ZS, Spartano NL, Beiser AS, DeCarli C, Auerbach SH, Vasan RS, Seshadri S. Physical Activity, Brain Volume, and Dementia Risk: The Framingham Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017;72(6):789–95. doi:10.1093/gerona/glw130.
164. Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras A-C, Sonenberg N, Schuman EM. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):467–72. doi:10.1073/pnas.012605299.
165. Thon M, Hosoi T, Ozawa K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:138. doi:10.3389/fendo.2016.00138.
166. Tsai S-F, Wu H-T, Chen P-C, Chen Y-W, Yu M, Wang T-F, et al. High-fat diet suppresses the astrocytic process arborization and downregulates the glial glutamate transporters in the hippocampus of mice. *Brain Research.* 2018;1700:66–77. doi:10.1016/j.brainres.2018.07.017.
167. Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):63–76. doi:10.1128/MCB.26.1.63-76.2006.

168. Valcarcel-Ares MN, Tucsek Z, Kiss T, Giles CB, Tarantini S, Yabluchanskiy A, et al. Obesity in Aging Exacerbates Neuroinflammation, Dysregulating Synaptic Function-Related Genes and Altering Eicosanoid Synthesis in the Mouse Hippocampus: Potential Role in Impaired Synaptic Plasticity and Cognitive Decline. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019;74(3):290–8. doi:10.1093/gerona/gly127.
169. Valladolid-Acebes I, Merino B, Principato A, Fole A, Barbas C, Lorenzo MP, et al. High-fat diets induce changes in hippocampal glutamate metabolism and neurotransmission. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302(4):E396–402. doi:10.1152/ajpendo.00343.2011.
170. van der Heide LP, Kamal A, Artola A, Gispen WH, Ramakers GMJ. Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem.* 2005;94(4):1158–66. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03269.x.
171. van der Kooij MA, Fantin M, Kraev I, Korshunova I, Grosse J, Zanoletti O, et al. Impaired hippocampal neuroligin-2 function by chronic stress or synthetic peptide treatment is linked to social deficits and increased aggression. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(5):1148–58. doi:10.1038/npp.2013.315.
172. van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971;15(3):232–6. doi:10.1016/0014-5793(71)80319-8.
173. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, et al. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer’s Disease. *Mediators of Inflammation.* 2015;2015(6):1–17. doi:10.1155/2015/105828.
174. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989;92 (Pt 4):531–40.
175. Wannamethee SG, Shaper AG. Weight change and duration of overweight and obesity in the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999;22(8):1266–72. doi:10.2337/diacare.22.8.1266.
176. WHO. The SuRF Report 2: Surveillance of chronic disease ; Risk ; Factors: Country-level data and comparable estimates; 2005.
177. Wolfram G, Bechthold A, Boeing H, Ellinger S, Hauner H, Kroke A, et al. Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Fat Intake and Prevention of Selected Nutrition-Related Diseases. *Ann Nutr Metab.* 2015;67(3):141–204. doi:10.1159/000437243.
178. Woodward SH, Kaloupek DG, Streeter CC, Kimble MO, Reiss AL, Eliez S, et al. Hippocampal volume, PTSD, and alcoholism in combat veterans. *Am J Psychiatry.* 2006;163(4):674–81. doi:10.1176/appi.ajp.163.4.674.
179. Wu X, Morishita WK, Riley AM, Hale WD, Südhof TC, Malenka RC. Neuroligin-1 Signaling Controls LTP and NMDA Receptors by Distinct Molecular Pathways. *Neuron.* 2019;102(3):621–635.e3. doi:10.1016/j.neuron.2019.02.013.
180. Xie X, Yang H, An JJ, Houtz J, Tan J-W, Xu H, et al. Activation of Anxiogenic Circuits Instigates Resistance to Diet-Induced Obesity via Increased Energy Expenditure. *Cell Metab.* 2019;29(4):917–931.e4. doi:10.1016/j.cmet.2018.12.018.
181. Xu J, Du Y-L, Xu J-W, Hu X-G, Gu L-F, Li X-M, et al. Neuroligin 3 Regulates Dendritic Outgrowth by Modulating Akt/mTOR Signaling. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:518. doi:10.3389/fncel.2019.00518.
182. Yarom M, Zurgil N, Zisapel N. Calcium permeability changes and neurotransmitter release in cultured brain neurons. II. Temporal analysis of neurotransmitter release. *J Biol Chem.* 1985;260(30):16294–302.

183. Yeung RK, Xiang Z-H, Tsang S-Y, Li R, Ho TYC, Li Q, et al. Gabrb2-knockout mice displayed schizophrenia-like and comorbid phenotypes with interneuron-astrocyte-microglia dysregulation. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):128. doi:10.1038/s41398-018-0176-9.
184. Yu W, Jiang M, Miralles CP, Li R-W, Chen G, Blas AL de. Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol Cell Neurosci*. 2007;36(4):484–500. doi:10.1016/j.mcn.2007.08.008.
185. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425–32. doi:10.1038/372425a0.
186. Zhang W-J, Tan Y-F, Yue JTY, Vranic M, Wojtowicz JM. Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurol Scand*. 2008;117(3):205–10. doi:10.1111/j.1600-0404.2007.00928.x.
187. Zhang HH, Lipovsky AI, Dibble CC, Sahin M, Manning BD. S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell*. 2006;24(2):185–97. doi:10.1016/j.molcel.2006.09.019.

## 7. Anhang

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle		Seite
1	Adipositas und BMI	S. 11
2	Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinanteile der drei verwendeten Diäten	S. 22
3	Verwendete Geräte und Software; Proteinbestimmung und Western Blot	S. 28-29
4	Verwendete Geräte und Software; Kryotomschnitte und Immunfluoreszenz	S. 29
5	Chemikalien, Puffer und Stammlösungen; Proteinbestimmung und Western Blot	S. 30-31
6	Chemikalien, Puffer und Stammlösungen; Immunfluoreszenz	S. 31-32
7	Antikörper; Western Blot	S. 32-33
8	Antikörper; Immunfluoreszenz	S. 33-34

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
1	Horizontalschnitt des Hippocampus der Maus angefärbt mit Zellkernfärbung Dapi	S. 14
2	Schema der intrazellulären Insulin-Kaskade; untersuchte Proteine in rot	S. 17
3	Exzitatorische (links) und inhibitorische (rechts) Synapse; untersuchte Proteine in rot	S. 20
4	Dapi, NeuN und Doublecortin Färbung eines Schnittes nach Anpassung der Helligkeit und Abzug des Hintergrundrauschens	S. 27
5	Protein, Fett und Zuckerezufuhr pro Tag je Diät	S. 35
6	(A): Protein Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag (B): Fett Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag (C): Zucker Zufuhr in Gramm pro Maus pro Tag (D) Kalorienzufuhr in kcal pro Maus pro Tag	S. 36
7	(A): Gewicht der Mäuse in Gramm von Woche drei bis 14 wöchentlich gemessen (B): Gewicht der Mäuse in Gramm nach Tötung (C): BMI in Gramm pro Quadratzentimeter nach Tötung	S. 37

8	(A): Oraler Glukose-Toleranz-Test durchgeführt in Woche 10, Glukose-Messung in Milligramm pro Deziliter nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten (B): Nüchternblutzuckerwert nach 6 Stunden Fasten gemessen in Milligramm pro Deziliter in Woche 10	S. 38-39
9	(A): Auswertung des totalen Fetts (B): Auswertung des viszeralen Fetts	S. 39
10	(A): Insulin ELISA gemessen in ng/ml (B): Leptin ELISA gemessen in ng/ml	S. 40
11	Ergebnisse Western Blot Insulinrezeptor $\beta$ bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle	S. 41
12	Ergebnisse des Western Blots mit AKT und PAKT bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle	S. 41-42
13	Ergebnisse des Western Blots mit GSK3 $\beta$ und pGSK3 $\beta$ bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle	S. 42-43
14	Ergebnisse des Western Blots mit mTOR und pmTOR in Bezug auf HPRT als Ladungskontrolle	S. 43-44
15	Ergebnisse des Western Blot mit p70s6k und pp70s6k in Bezug auf HPRT als Ladungskontrolle	S.44-45
16	(A): Ergebnisse des Western Blot mit GAP-43 bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle (B): Ergebnisse des Western Blot mit Doublecortin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle (C): Ergebnisse der Quantifizierung von Doublecortin in der Immunfluoreszenz sowohl als Intensitätsmessung, als auch gezählt im GD (D): Ergebnisse der Quantifizierung von Ki67 in der Immunfluoreszenz sowohl als Intensitätsmessung, als auch gezählt im HC	S. 46-47
17	(A): Ergebnisse des Western Blots mit Synaptophysin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle (B): Ergebnisse der Quantifizierung von Synaptophysin in der Immunfluoreszenz	S. 48
18	Ergebnisse des Western Blot mit Synapsin und pSynapsin bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle	S. 49
19	Ergebnisse der Quantifizierung von SNAP25 in der Immunfluoreszenz	S. 50
20	Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 3 in der Immunfluoreszenz	S. 51
21	Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 1 in der Immunfluoreszenz	S. 52
22	Ergebnisse der Quantifizierung von pGluR1/GluR1 in der Immunfluoreszenz	S. 53
23	Ergebnisse der Quantifizierung von NMDA1 in der Immunfluoreszenz	S. 54
24	(A): Ergebnisse des Western Blot mit vGLUT2 bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle (B): Ergebnisse der Quantifizierung von vGLUT2 in der Immunfluoreszenz	S. 54-55

25	Ergebnisse der Quantifizierung von Neuroligin 2 in der Immunfluoreszenz	S. 56
26	Ergebnisse der Quantifizierung des GABA A Rezeptors in der Immunfluoreszenz	S. 57
27	Ergebnisse der Quantifizierung des GABA B Rezeptors in der Immunfluoreszenz	S. 57
28	Ergebnisse der Quantifizierung von Gephyrin in der Immunfluoreszenz	S. 58
29	(A): Ergebnisse des Western Blot mit vGAT bezogen auf HPRT als Ladungskontrolle (B): Ergebnisse der Expression von vGAT in der Immunfluoreszenz	S. 58