

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung

W.G. Kerckhoff-Institut

I. Physiologische Abteilung

**Kontrolle des Energiestoffwechsels im Säuglingsalter: Vergleich genetisch  
fettsüchtiger  
und normaler Ratten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Birgit Meierfrankenfeld**

Tierärztin aus Langenberg

Berlin 1996

Journal-Nr.

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Weik

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. E. Simon

Tag der Promotion: 2. August 1996

Gewidmet  
meiner Familie,  
meinen Freunden  
und allen,  
die mich mit Wohlwollen  
auf meinem Lebensweg  
begleitet haben

## Inhaltsverzeichnis

- 1 Einleitung**
  - 1.1 Bisherige Befunde zum Beginn der exzessiven Fettdeposition bei der fa/fa-Zucker-Ratte
  - 1.2 Frühe pathophysiologische Befunde, die als primäre Ursache der fa/fa-Fettsucht ausgeschlossen wurden
    - 1.2.1 Hyperphagie
    - 1.2.2 Verminderte zitterfreie Thermogenese (non-shivering thermogenesis, NST) und erniedrigter Basalstoffwechsel
    - 1.2.3 Lokale Störung im weißen Fettgewebe
  - 1.3 Frühe pathophysiologische Befunde, die als primäre Ursache der fa/fa-Fettsucht in Betracht zu ziehen sind
    - 1.3.1 Plasmainsulin
    - 1.3.2 Glykogen
    - 1.3.3 Sympathisches Nervensystem
  - 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit
- 2 Material und Methode**
  - 2.1 Versuchstierzucht
  - 2.2 Präparationsmethoden
    - 2.2.1 Tötung der Versuchstiere und Gewinnung von Plasma
      - 2.2.1.1 Feten
      - 2.2.1.2 Neugeborene und saugende Welpen
      - 2.2.1.3 Behandlung der Blutproben
    - 2.2.2 Eviszeration für die Bestimmung der Körperzusammensetzung
    - 2.2.3 Organ- und Gewebeentnahme

- 2.2.4 Entnahme von Proben für die PCR
- 2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden
  - 2.3.1 Molekularbiologische Genotyp-Identifizierung
    - 2.3.1.1 DNA-Gewinnung und Aufarbeitung
    - 2.3.1.2 Ausgangsverfahren der PCR und Auftrennung der Produkte
    - 2.3.1.3 Modifikation der Primer
  - 2.3.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung
  - 2.3.3 Triacylglycerinbestimmung
  - 2.3.4 Bestimmung des Glykogengehaltes
  - 2.3.5 Radioimmunoassay (RIA) für Insulin
- 2.4 Künstliche Aufzucht
  - 2.4.1 Versuchsaufbau
  - 2.4.2 Künstliche Ernährung
  - 2.4.3 Temperatur-Meßsystem
  - 2.4.4 Sauerstoff-Meßsystem
  - 2.4.5 Versuchsdurchführung
  - 2.4.6 Überwachung
  - 2.4.7 Auswertung
- 2.5 Statistik

### **3 Ergebnisse**

- 3.1 Geschlechter- und Genotypverteilung in Hybridwürfen
- 3.2 Befunde von normal aufgezogenen Tieren
  - 3.2.1 Postnatale Entwicklung von genotypspezifischen Unterschieden in der Körperzusammensetzung
  - 3.2.2 Perinatale Energiespeicher
    - 3.2.2.1 Triacylglyceringehalt
    - 3.2.2.2 Leberglykogen
  - 3.2.3 Plasmainsulin
- 3.3 Ergebnisse von künstlich aufgezogenen und mit Noradrenalin behandelten Tieren
  - 3.3.1 Wachstum
  - 3.3.2 Sauerstoffverbrauch
  - 3.3.3 Körperzusammensetzung
  - 3.3.4 Gesamtenergieumsatz
  - 3.3.5 Plasmaparameter

### **4 Diskussion**

- 4.1 Zuerst auftretende Unterschiede in der Körperzusammensetzung von normal aufgezogenen fa/fa- und +/-fa-Tieren
- 4.2 Einfluß des Geschlechts auf die Körpermasse und die Körperzusammensetzung
- 4.3 Perinataler Energiespeicher
- 4.4 Perinataler Plasmainsulinspiegel
- 4.5 Bedeutung der Methode der künstlichen Aufzucht und methodische Probleme
- 4.6 Für den Vergleich zwischen künstlich und normal aufgezogenen Tieren zur Verfügung stehende Befunde
- 4.7 Verhinderung der exzessiven Fettdeposition durch Noradrenalinbehandlung
- 4.8 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die Lebendmasse
- 4.9 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die fettfreie Trockenmasse
- 4.10 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf den Wassergehalt
- 4.11 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die Energiebilanz
- 4.12 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die Plasmaparameter
- 4.13 Was verursacht die exzessive Energiedeposition der fa/fa-Tiere

### **5 Zusammenfassung**

### **6 Summary**

**7 Literaturverzeichnis**

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

**Abkürzungen**

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>0</sub>	Nullstandard
BAT	Braunes Fettgewebe ( <i>brown adipose tissue</i> )
bp	Anzahl der Basenpaare eines DNA-Fragmentes
BN	Brown Norway Ratte, definierter Rattenstamm
cM	Centi-Morgan, Maßeinheit für die Austauschhäufigkeit von Genen homologer Chromosomen als Maß für den Abstand zwischen zwei Genen
$\overline{F}E_{O_2}$	Sauerstoffkonzentration der Tierkammerluft unter STPD-Bedingungen
ffTM	Fettfreie Trockenmasse
ffFM	Fettfreie Feuchtmasse
FFS	Freie Fettsäuren
$\overline{F}I_{O_2}$	Sauerstoffkonzentration der Umgebungsluft unter STPD-Bedingungen
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G6P-DH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GPO	Glycerinphosphatoxidase
kb	Kilobase, Längeneinheit für Nucleinsäuremolekül; 1 kb entspricht einer Moleküllänge von 1000 Nucleotiden
LPL	Lipoprotein Lipase
N	Anzahl der Würfe
NA	Noradrenalin
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduzierte Form)
ns	nicht signifikant
NSB	Unspezifische Bindung ( <i>non specific binding</i> )
M	Markergen
MR	Stoffwechselrate ( <i>metabolic rate</i> )
NST	Zitterfreie Thermogenese ( <i>non-shiveringthermogenesis</i> )
P <sub>B</sub>	Luftdruck
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
$P_{H_2O}$	Wasserdampfdruck
RIA	Radioimmunoassay
RQ	Respiratorischer Quotient
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
STPD	Standard-Bedingungen, die Meßwerte wurden umgerechnet auf Werte, die unter Standard-Temperatur (25°C bzw. 298 K) und Normal-Atmosphärendruck (101,3 kPa bzw. 1,013 bar) bei einer Luftfeuchtigkeit von 0% vorlägen.
t	Temperatur in °C
TA	Totalaktivität
T <sub>a</sub>	Umgebungstemperatur
T <sub>c</sub>	Rektale Körpertemperatur
TN	thermoneutral
Tr	Trockensubstanz
V	Volumen

$\dot{V}_E$	Luftfluß unter STPD-Bedingungen
$\dot{V}_{O_2}$	Sauerstoffverbrauch eines Versuchstieres unter STPD-Bedingungen
WAT	Weißes Fettgewebe ( <i>white adipose tissue</i> )
13M	Zuckerratten, definierter Rattenstamm
$\sum \dot{V}_{O_2}$	Gesamtsauerstoffverbrauch

# 1 Einleitung

Adipositas ist die häufigste ernährungsbedingte Erkrankung in der westlichen Bevölkerung. Die erhöhte Fettmasse geht dabei vielfach anderen gesundheitlichen Problemen wie sekundärem Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Hyperlipidämie voraus (FRIEDMAN UND LEIBEL 1992, ZHANG ET AL. 1994). Sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse spielen eine wichtige Rolle als Ursache für exzessive Fettdeposition (WEST ET AL. 1995). Beim Menschen ist die Beteiligung genetischer Defekte bei der Fettsuchtentwicklung nachgewiesen (BOUCHARD UND P&EACUTE;RUSSE 1993, MOLL ET AL. 1991); bei Tieren, insbesondere bei Nagern, sind zahlreiche Mutationen bekannt, die zu verschiedenen Formen der exzessiven Fettdeposition führen (FRIEDMAN UND LEIBEL 1992, JOHNSON ET AL. 1991). Solche Tiermodelle können die Aufklärung möglicher Ursachen der Adipositas beim Menschen unterstützen.

Bei Nagern sind 7 verschiedene Einzelgen-Mutationen bekannt, die einem rezessiven Erbgang unterliegen und bei Homozygoten eine Adipositas hervorrufen (BRAY ET AL. 1989). Am besten untersucht sind Mäuse, die Träger des ob (obese)-Gens oder des db (diabetes)-Gens sind, sowie Ratten, die Träger des fa (fatty)-Gens sind. Diese Mutationen führen zu einem Syndrom, das der Entwicklung einer Form der Adipositas beim Menschen sehr ähnelt, die bereits im Jugendalter einsetzt und später sekundären Diabetes mellitus hervorruft (ARGIL&EACUTE;S 1989, FRIEDMAN UND LEIBEL 1992).

Liegen die ob- und db-Mutationen bei Tieren mit sonst gleichem genetischen Hintergrund vor, so sind die daraus resultierenden Phänotypen in Bezug auf ihren Stoffwechsel sehr ähnlich, was darauf hinweist, daß die Expression dieser Gene einen pathologischen Verlauf des gleichen Stoffwechselweges oder Regulationskreises bewirkt (FRIEDMAN UND LEIBEL, 1992). Die Veränderungen im Stoffwechsel sowie die gleiche Anordnung molekularer Marker um den db-Genlocus auf Chromosom 4 bei der Maus und den fa-Genlocus auf Chromosom 5 bei der Ratte sprechen dafür, daß db und fa Mutationen in homologen Genen darstellen (TRUETT ET AL. 1991).

Die fa-Mutation trat um 1960 bei Kreuzungstieren eines Merck-Stammes M mit einem Sherman-Rattenstamm am Laboratory of Comparative Pathology in Massachusetts spontan auf. Das Ehepaar Zucker beschrieb diese Tiere 1961 und züchtete aus dem ursprünglichen Hybridstamm einen Rattenstamm, der Träger des fa-Gens war (ZUCKER UND ZUCKER 1961). Dieser Tierstamm wird heute nach den Erstbeschreibern als Zucker-Ratte oder 13M bezeichnet.

Homozygote Träger des fa-Gens unterscheiden sich bis zum Alter von 3 bis 4 Wochen in ihrem Äußeren nicht von normalen Tieren. Im Alter von 5 Wochen sind deutlich sichtbare Unterschiede im Körperfettgehalt vorhanden. Die lebenslang andauernde, exzessive Fettakkumulation der fa/fa-Tiere ist das auffälligste Merkmal der homozygoten fa-Gen-träger. Daneben zeigen die Tiere bereits im Jugendalter Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hypertriacylglycerinämie. Die schwerwiegendsten Veränderungen bei fa/fa-Tieren und den Zeitpunkt ihres Auftretens zeigt Abb. 1.

Für Mensch und Tier gilt gleichermaßen, daß eine nachträgliche Unterscheidung zwischen der primären,

zum Übergewicht führenden Stoffwechselstörung und den zahlreichen sekundären Folgen, die die exzessive Fettdeposition aufrechterhalten und verstärken, im bereits stark adipösen Organismus nicht mehr möglich ist. Tiermodelle mit genetisch bedingter Adipositas bieten die Möglichkeit die Anfänge der Adipositas und damit die primären pathophysiologischen Veränderungen, die ihr zugrunde liegen, zu untersuchen. Bisher liegen jedoch neben einer Vielzahl von Ergebnissen bei adulten Tieren wenig Informationen über die frühesten Stadien der exzessiven Fettdeposition in diesen Tiermodellen vor, da bei Untersuchungen im Säuglingsalter erhebliche methodische Schwierigkeiten auftreten (KRIEF UND BAZIN 1991). Hier bietet zwar die Zucker-Ratte auf Grund der Körpergröße gegenüber der Maus bessere Voraussetzungen, Probleme ergeben sich allerdings dadurch, daß die Weibchen zu 99 % und die Männchen zu 80 % steril sind, so daß die Zucht unter Beteiligung heterozygoter Eltern erfolgen muß. Die Würfe enthalten damit immer eine unbekannte Mischung phänotypisch normaler (+/+ oder fa/+) und genetisch zur Fettsucht determinierter (fa/fa) Individuen. Somit limitieren die Möglichkeiten zur Genotypidentifikation die in den frühesten Entwicklungsstadien durchführbaren Untersuchungen. Bis vor zwei Jahren standen hierfür nur physiologische Tests zur Verfügung, die eine sichere Genotypidentifikation - je nach Versuchsbedingungen - erst am Ende der 2. Lebenswoche erlaubten (KAUL ET AL. 1990, TRUETT ET AL. 1991). Inzwischen sind jedoch molekularbiologische Methoden entwickelt worden, die eine Zuverlässigkeit von bis zu 99 % aufweisen (KERSHAW ET AL. 1995, SMOLLER ET AL. 1993, TRUETT ET AL. 1991). Damit kann die Genotypbestimmung in jedem Alter anhand kleiner Gewebe- oder Blutproben durchgeführt werden, und es besteht die Möglichkeit, pathophysiologische Veränderungen, die bei fa/fa-Tieren zur exzessiven Fettdeposition führen, bereits in ihren Anfangsstadien zu untersuchen.

Veränderungen, die bereits während der Säugeperiode beginnen (Alter bis ca. 16 Tage)

- Gesamtkörper
  - verminderte kalteinduzierte Thermogenese <sup>7,17,113,110,117.</sup>
  - => Körperkerntemperatur unter Kältebelastung ↓
  - => O<sub>2</sub> Verbrauch ↓
  - Glukosetoleranz ↓ <sup>76.</sup>
- Plasma
  - Hyperinsulinämie <sup>1,17,114.</sup>
  - Hypetriacylglycerinämie <sup>7,76.</sup>
  - Hyperphospholipidämie <sup>71.</sup>
- Fettgehalt und Fettzellgröße sowie Enzymaktivitäten vieler Enzyme in BAT und WAT ↑ <sup>1,13,12,117.</sup>

Veränderungen, die erst nach dem Absetzen in Erscheinung treten (Alter ab ca. 30 Tage)

- Plasma
  - ungesättigte Fettsäuren ↑ <sup>7,112.</sup>
  - Corticosteron ↓ ? ↑ <sup>1,16,111,113.</sup>
  - Wachstumshormon ↓ <sup>16,117.</sup>
  - Schilddrüsenhormone ↓ <sup>10,113.</sup>
  - hypothalamisches Somatostatin ↓ <sup>74.</sup>
  - pankreatisches Somatostatin ↑ <sup>74.</sup>
  - Somatomedinaktivität ↓ <sup>13.</sup>
  - Prolactin ↑ <sup>16.</sup>

**fa-Mutation**

Veränderungen, die zum Zeitpunkt des Absetzens auftreten (Alter: 16-30 Tage)

- Gesamtkörper
  - Hyperphagie <sup>1,14,13,16,119,113.</sup>
- Plasma

	Hypercholesterinämie <sup>21, 23.</sup>
	Hyperglykämie <sup>13.</sup>
- Leber	Triacylglyceringehalt $\uparrow$ <sup>21.</sup>
	Lipogenese $\uparrow$ <sup>1, 26.</sup>
	Leberenzymaktivität $\uparrow$ <sup>1, 26.</sup>

Abb. 1: Zeitpunkt des ersten Auftretens von Anomalien bei fa/fa-Zucker-Ratten. = erhöhte Werte, = erniedrigte Werte.

Quellen: 1.) Bazin und Lavau 1982, 2.) Bazin et al. 1984, 3.) Bazin et al. 1986, 4.) Bell und Stern 1977, 5.) Boulangé et al. 1979, 6.) Boulangé et al. 1981, 7.) Charon et al. 1995, 8.) Dugail et al. 1988a, 9.) Dugail et al. 1988b, 10.) Durbin-Naltchayan et al. 1983, 11.) Fletcher et al. 1986b, 12.) Greenwood et al. 1981, 13.) Krief et al. 1989, 14.) Lavau et al. 1985, 15.) Martin et al. 1986, 16.) Martin und Gahagen 1977, 17.) Moore et al. 1985, 18.) Planche et al. 1986, 19.) Planche et al. 1987, 20.) Planche et al. 1988, 21.) Schirardin und Bach 1991, 22.) Schmidt et al. 1984, 23.) Shargill et al. 1983, 24.) Sheppard et al. 1980, 25.) Stern und Johnson 1977, 26.) Turkenkopf et al. 1982, 27.) Young et al. 1980, 28.) Zucker und Zucker 1962

## 1.1 Bisherige Befunde zum Beginn der exzessiven Fettdeposition bei der fa/fa-Zucker-Ratte

Untersuchungen von Biopsieproben haben gezeigt, daß eine erhöhte Fettspeicherung bei fa/fa-Tieren im braunen Fettgewebe (brown adipose tissue, BAT) schon im Alter von 2 Tagen erkennbar ist (BAZIN ET AL. 1984). Gleichzeitig ist auch die Thermogenesekapazität des BAT bei fa/fa-Tieren reduziert (BAZIN ET AL. 1984). Ab Ende der ersten Lebenswoche folgt eine erhöhte Fettspeicherung in dem sich erst postnatal differenzierenden weißen Fettgewebe (white adipose tissue, WAT), begleitet von der Aktivitätserhöhung der Lipoproteinlipase (DUGAIL ET AL. 1988a, GREENWOOD ET AL. 1981, BOULANGÉ ET AL. 1981), der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (DUGAIL ET AL. 1988b), der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, der Fettsäure-synthetase, der Citratlyase und des Malatenzyms (BAZIN UND LAVAU 1982).

## 1.2 Frühe pathophysiologische Befunde, die als primäre Ursache der fa/fa-Fettsucht ausgeschlossen wurden

### 1.2.1 Hyperphagie

Obwohl Hyperphagie normalerweise an der Ausprägung der fa/fa-Fettsucht beteiligt ist, wurde eine übermäßige Nahrungsaufnahme als primäre Störung experimentell eindeutig ausgeschlossen, da auch von Geburt an nahrungsdeprivierte fa/fa-Tiere schließlich einen Körperfettgehalt von > 50 % erreichen (CLEARY ET AL. 1980). Zudem entwickeln fa/fa-Welpen, die ab einem Alter von 4 Tagen künstlich aufgezogen werden, einen signifikant höheren Gesamtkörperfettgehalt als ihre identisch ernährten +/-fa-Wurfgeschwister (MARKEWICZ ET AL. 1993).

### 1.2.2 Verminderte zitterfreie Thermogenese (non-shivering thermogenesis, NST) und erniedrigter Basalstoffwechsel

Die thermogene Aktivität des sympathisch innervierten BAT spielt eine wichtige Rolle im Energiehaushalt von Kleinsäugetieren und Jungtieren (ECKERT 1986). Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, daß die Intensität der Thermogenese im BAT die Regulation des Körperfettgehaltes beeinflusst (ROTHWELL UND STOCK 1979). Bei fa/fa-Ratten ist die Thermogenesefunktion des BAT bereits im Säuglingsalter beeinträchtigt (BAZIN ET AL. 1984, KRIEF UND BAZIN 1991, PLANCHE UND JOLIFF 1986). Die erniedrigte thermoregulatorische Thermogenese im BAT kann energetisch die übermäßige

Energiedeposition der fa/fa-Welpen quantitativ erklären (MARKEWICZ ET AL. 1993, PLANCHE ET AL. 1983). Durch Noradrenalininjektionen kann jedoch die Wärmeproduktion von 16 Tage alten fa/fa- und +/fa-Welpen auf gleich hohe Werte angehoben werden und somit eine lokale Störung im BAT als Ursache für die verminderte Kälteabwehr der fa/fa-Tiere ausgeschlossen werden (SCHMIDT ET AL. 1985). Zudem kommt es bei künstlich unter thermoneutralen Bedingungen bis zur 3. Lebenswoche aufgezogenen fa/fa- und +/fa-Tieren auch nicht zu Unterschieden im aeroben Stoffwechsel (KAUL ET AL. 1990, MARKEWICZ ET AL. 1993). Es ist daher wahrscheinlich, daß die reduzierte BAT-Thermogenese der fa/fa-Welpen auf eine mangelhafte Aktivierung durch das sympathische Nervensystem zurückzuführen ist.

### **1.2.3 Lokale Störung im weißen Fettgewebe**

Die Menge der im weißen Fettgewebe gespeicherten Triacylglycerine ist abhängig von der Lipogenese und Lipolyse in den Fettzellen und dem Import von Lipiden aus dem Blut. Während der Säugeperiode mit reichlicher Zufuhr von Fetten aus der Milch steht dabei die Aufnahme von resorbierten Triacylglycerinen aus dem Blut im Vordergrund. Dieser Import von Triacylglycerinen wird von der Lipoproteinlipase (LPL) kontrolliert. Eine Erhöhung der LPL-Aktivität im WAT findet sich bereits bei 7 Tage alten fa/fa-Tieren im Vergleich zu ihren +/fa-Wurfgeschwistern (DUGAIL ET AL. 1988a, BOULANG&EACUTE; ET AL. 1981). Weiterhin sind die Aktivitäten der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase im Alter von 7 Tagen, die Aktivitäten der Fettsäuresynthetase, der Citratlyase und des Malatenzyms im Alter von 9 Tagen und die Aktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Alter von 14 Tagen im WAT von fa/fa-Tieren signifikant höher als die der +/fa-Tiere (BAZIN UND LAVAU 1982, BOULANG&EACUTE; ET AL. 1979, DUGAIL ET AL. 1988a, DUGAIL ET AL. 1988b, GREENWOOD ET AL. 1981). Gegen eine primäre Bedeutung der Aktivitätserhöhung lipogenetischer Enzyme für die exzessive Fettdeposition der fa/fa-Tiere spricht jedoch der bei thermoneutraler Aufzucht deutlich geringere genotypbedingte Unterschied im Körperfettgehalt im Vergleich zur Aufzucht unter Kältebelastung (KAUL ET AL. 1990, MARKEWICZ ET AL. 1993). Außerdem tritt innerhalb der ersten beiden Lebenswochen keine exzessive Fettdeposition bei fa/fa-Tieren auf Kosten der fettfreien Trockenmasse auf (KAUL ET AL. 1990, KÖRTNER ET AL. 1994, MARKEWICZ ET AL. 1993). Da die Fettdeposition unter diesen Bedingungen nicht ihren Maximalwert erreicht, ist das Auftreten geringerer genotypbedingter Unterschiede im Körperfettgehalt mit der Hypothese einer durch eine lokale Störung unkontrolliert angetriebenen Fettdeposition im weißen Fett als primärer Ursache der fa/fa-Fettsucht unvereinbar.

## **1.3 Frühe pathophysiologische Befunde, die als primäre Ursache der fa/fa-Fettsucht in Betracht zu ziehen sind**

### **1.3.1 Plasmainsulin**

In den ersten beiden Lebenswochen konnten bisher keine Unterschiede im Plasmainsulinspiegel von fa/fa- und +/fa-Wurfgeschwistern nachgewiesen werden (BAZIN ET LAVAU 1982, GUICHARD ET AL. 1992, P&EACUTE;NICAUD ET AL. 1991), jedoch scheinen sich bereits frühe Unterschiede in der Insulinfreisetzung bei pharmakologischer Stimulation zu ergeben (ATEF ET AL. 1991, TENENBAUM ET AL. 1994). So zeigen 16 Tage alte fa/fa-Tiere eine stärkere, durch Arginin stimulierte Insulinsekretion im Vergleich zu +/?-Tieren (ROHNER-JEANRENAUD ET AL. 1985). Ungefähr zum gleichen Zeitpunkt entwickelt sich ein leicht erhöhter Plasmainsulinspiegel bei den fa/fa-Säuglingen (BAZIN UND LAVAU 1982, CHARON ET AL. 1995, LAVAU ET AL. 1985). Eine kausale Rolle der Hyperinsulinämie für das Entstehen der Fettsucht in den ersten beiden Lebenswochen erscheint aber fraglich, da Ratten im Säuglingsalter normalerweise eine ausgeprägte Insulinresistenz und Glukoseintoleranz zeigen (ISSAD ET AL. 1987, BRAY ET AL. 1989)

Im Fetalalter ergibt sich dagegen eine andere Situation. Am Tag 21 der Gestation kommt es bei Feten verschiedener Stämme (+/+) zu einem kurzfristigen starken Anstieg des Insulinspiegels auf Werte von 150 bis 230  $\mu\text{U/ml}$ , während die Werte am Tag 20 und 22 der Gestation unter 80  $\mu\text{U/ml}$  liegen (MAYOR UND CUEZVA 1985). Diesem Insulinpeak wird eine funktionelle Bedeutung bei der Anlage des perinatalen Glykogenspeichers beigemessen (BASHAN ET AL. 1979, MARGOLIS 1983, MAYOR UND CUEZVA 1985, MENUELLE UND PLAS 1991). Frühere Untersuchungen an Zucker-Ratten haben in dieser Phase höhere Insulinwerte in Kreuzungswürfen von +/fa & fa/fa-Elterntieren im Vergleich zu Nachkommen von Elterntieren, die kein fa-Gen tragen, gezeigt (TURKENKOPF ET AL. 1982). Zudem ist die Stimulation der Lipogenese in fetalen Leberzellen durch Insulin bei Nachkommen aus +/fa & fa/fa-Kreuzungen deutlich schwächer als bei Nachkommen aus +/+ & +/fa-Kreuzungen (GOLDSTEIN UND JOHNSON 1980). Diesen Befunden wurde jedoch bisher wenig Bedeutung zugemessen, weil dabei keine individuelle Genotypbestimmung durchgeführt werden konnte, und von verschiedenen Elterntieren abstammende Gruppen miteinander verglichen werden mußten.

### 1.3.2 Glykogen

Der unter Insulinstimulation am Ende der Gestation angelegte Glykogenspeicher stellt bei der Ratte die entscheidende perinatale Energiereserve dar, da bei dieser Tierart zum Zeitpunkt der Geburt noch keine Fettspeicher vorhanden sind (MAYOR UND CUEZVA 1985). Neugeborene Ratten diabetischer Muttertiere zeigen zum Geburtszeitpunkt im Vergleich zu Neugeborenen von normalen Müttern einen signifikant verringerten Leberglykogengehalt (CUEZVA ET AL. 1982). Ob Unterschiede in der perinatalen Glykogenspeicherung von fa/fa- und +/?-Tieren auftreten, wurde bislang nicht untersucht.

### 1.3.3 Sympathisches Nervensystem

Nicht nur für die Thermogenese im BAT, sondern auch für die Insulinsekretion spielt die sympathische Kontrolle eine wesentliche Rolle (BRAY 1989, BRAY ET AL. 1989, KRIEF UND BAZIN 1991, ROHNER-JEANRENAUD ET AL. 1983a). Es gibt experimentelle Hinweise darauf, daß sowohl der gedrosselten BAT-Aktivität, wie auch der Hyperinsulinämie zumindest bei erwachsenen fa/fa-Tieren ein erniedrigter Sympathikustonus zu Grunde liegt (ROHNER-JEANRENAUD 1983a). Andere sympathisch regulierte, thermoregulatorische Funktionen, wie z.B. Vasokonstriktion, scheinen dagegen nicht von der reduzierten Aktivität des sympathischen Nervensystems bei fa/fa-Tieren betroffen zu sein (BRAY ET AL. 1989, SCHMIDT ET AL. 1984). Dies weist darauf hin, daß der fa/fa-Genotyp mit keiner generellen Störung sympathisch kontrollierter Vorgänge verbunden ist.

Tägliche orale Applikation des  $\beta$ -Agonisten BRL 35135 an 8-16 Tage alte fa/fa-Tiere behebt viele der beobachteten Stoffwechselstörungen (CHARON ET AL. 1995). Kontinuierliche orale Zufuhr von Noradrenalin während der ersten beiden Lebenswochen aktiviert die Stoffwechselrate (metabolic rate, MR) fettüchtiger und normalgewichtiger Jungtiere in gleichem Maße (KÖRTNER ET AL. 1994). Jedoch kann eine bis zum Ende der dritten Lebenswoche weitergeführte Behandlung mit Noradrenalin die Ausbildung von Unterschieden in der MR sowie den Beginn der exzessiven Fettdeposition nicht mehr verhindern (KÖRTNER ET AL. 1994). Das weist darauf hin, daß nicht-sympathisch kontrollierte Faktoren den Beginn der exzessiven Fettspeicherung in der 3. Lebenswoche initiieren, auch wenn die früheren sympathisch-kontrollierten Stadien der exzessiven Fettspeicherung unterdrückt werden könnten.

## 1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu klären, zu welchem Zeitpunkt der perinatalen Entwicklung bei fa/fa-Tieren erste genotypbedingte Unterschiede in der Energiespeicherung und der Regulation der

Energiespeicherung auftreten. Dabei soll zunächst der genaue Beginn der exzessiven Fettdeposition ermittelt werden. Weiterhin soll kontrolliert werden, ob der gestörten Energiespeicherung im Fettgewebe Störungen in dem pränatal bedeutenderen Leberglykogenspeicher vorausgehen. Im Hinblick auf die Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die exzessive Fettdeposition soll darüber hinaus geklärt werden, ob eine kontinuierliche orale Stimulation mit Sympathomimetika nicht nur die MR von fa/fa- und +/-fa-Tieren auf gleichhohe Werte anheben kann, sondern auch die Gesamtkörperzusammensetzung der fettsüchtigen Tiere bis zum Alter von 16 Tagen normal halten kann.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Versuchstierzucht

Inzuchtstämme weisen überwiegend identische Allele eines Gens auf. Bei der Kreuzung von Inzuchtstämmen kann es vorkommen, daß in der F1-Generation Allele mit einer unterschiedlichen Zahl an Basenpaaren auf homologen Chromosomen liegen. Dies gilt auch für den aufgrund der Züchtungsstrategie als "Auszuchtstamm" bezeichneten Stamm der Zuckerratten. Die F2-Generation besitzt dann je nach Neukombination Allele mit identischen (= ursprüngliche Stämme) oder verschiedenen (= F1-Generation) Zahlen an Basenpaaren. Diese Tatsache nutzten wir zur Genotypidentifizierung von Kreuzungstieren mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR). Dabei wurden selektiv unterschiedlich lange Allele eines Gens in der Nähe des fa-Locus amplifiziert und in einem Gel aufgetrennt. Die Voraussetzung für unsere Arbeit war daher die Kreuzung von Zucker-Ratten mit einem Rattenstamm, der sich in seinem Genom möglichst stark von dem der Zucker-Ratten unterschied. Diese Voraussetzung erfüllte die Brown-Norway Ratte (TRUETT ET AL. 1991).

Der Aufbau einer Hybridzucht erfolgte durch Paarungen von Wildtyp- (+/+) Brown-Norway (BN) Weibchen mit genetisch fettsüchtigen (fa/fa) Zucker-Ratten (13M) Männchen. Durch die Verpaarung von BN-Tieren mit 13M-Tieren wurden neben dem Allel für den Wildtyp am fa-Locus bei der Zucker-Ratte weitere, neue Allele eingeführt. Da ein Einfluß weiterer Gene auf die Fettsuchtentwicklung bei Zucker-Ratten diskutiert wird, sei angemerkt, daß die Untersuchungen bis auf im Text angegebene Ausnahmen an 13MBN-Nachkommen der ersten bis vierten Generation durchgeführt wurden, deren Elterntiere weibliche +/-fa-Hybridtiere und männliche fa/fa-Zucker- oder fa/fa-Hybridratten waren. Die Nachkommen besaßen damit in ihrem Genom einen Anteil von 63% bis 94% des Zucker-Ratten Genoms. Bei allen Hybridelterntieren wurde durch PCR das Vorliegen eines Cross-overs zwischen Markergen und fa-Locus ausgeschlossen (siehe Kapitel 2.3.1). Die Anzahl der verwandten Tiere geht aus Tab. 1 und 2 hervor.

*Tab. 1: Anzahl der Tiere in den Versuchsreihen, in denen keine geschlechtsspezifische Unterscheidung erfolgte.*

Parameter	Alter	Zahl der Würfe	Zahl der Tiere	
			+/fa	fa/fa
Triacylglycerine				
BAT	24h	4	9	15
Leber		4	13	13
WAT		4	12	16

Plasma		6	15	29
Leberglykogen	Feten	5	20	21
	Neugeborene	5	20	24
Insulin	Feten	8	34	35
	Neugeborene	5	21	18

Tab. 2: Anzahl der für die Gesamtkörperanalyse verwandten Tiere unter Berücksichtigung des Geschlechtes. \* = künstlich aufgezogene Tiere.

Alter [d]	Zahl der Zahl der Tiere			Geschlecht
	Würfe	+/fa	fa/fa	
0	6	10	8	männlich
		14	6	weiblich
1	10	14	15	männlich
		6	20	weiblich
4	7	13	7	männlich
		13	18	weiblich
7	6	10	4	männlich
		4	9	weiblich
16	7	14	10	männlich
		13	14	weiblich
16*	3	8	6	männlich
		2	7	weiblich

Die Zucker-Ratten entstammten der Zuchtkolonie am W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim. Die zur Einkreuzung verwandten Brown-Norway Ratten wurden von Charles River, Sulzfeld, bezogen. Da 80 % der fa/fa-Männchen steril waren, und selbst die übrigen nicht bei allen Weibchen eine Trächtigkeit herbeiführen konnten, wurden die Weibchen maximal über zwei der in der Regel 4-tägigen Östruszyklen mit den fa/fa-Männchen zusammengesetzt. Die Kontrolle, ob ein Deckakt erfolgreich war, erfolgte durch den Nachweis von Spermien im Vaginalabstrich am Tag nach dem Östrus (vor 15.00 Uhr). Kam es zu einer Trächtigkeit, wurde der Tag des spermienpositiven Vaginalabstriches als Tag 0 der Trächtigkeit gerechnet (COOKE ET AL. 1986b, WATTS ET AL. 1984). Da aber auch bei spermienpositiven Weibchen oft nur eine 10-13 Tage dauernde Pseudogravidität vorlag, wurde zur Begrenzung der Anzahl eingesetzter weiblicher Zuchttiere eine Zykluskontrolle durch Vaginalabstriche am 4., sowie bei Ausbleiben des Östrus am 10.-13. Tag nach dem Deckakt durchgeführt. Visuell wurde die Trächtigkeit ab dem 16. Gestationstag erkennbar.

Die Ratten wurden einzeln oder in Gruppen in Makrolon-Käfigen (EBECO, Castrop-Rauxel) mit Holzgranulateinstreu (Altromin) bei einer Raumtemperatur von 22° C und einer relativen Luftfeuchte von 50-60 % gehalten. Tragende Weibchen wurden ca. 3-6 Tage vor dem Wurftermin von der Gruppe getrennt. Die fensterlosen Räume wurden von 6.00 bis 18.00 Uhr mit Leuchtstoffröhren beleuchtet. Die Tiere erhielten pelletiertes Zuchtfutter für Ratten und Mäuse (Altromin 1314) und Wasser ad libitum.

## 2.2 Präparationsmethoden

### 2.2.1 Tötung der Versuchstiere und Gewinnung von Plasma

#### 2.2.1.1 Feten

Für die Blut- und Organentnahme bei Feten am Gestationstag 21 wurden die hochtragenden Muttertiere am Abend vor dem Eingriff (Beginn der Aktivitätsphase der Tiere) in eine klimatisierte Kammer im Tötungsraum gesetzt, in der sie bis unmittelbar vor der Tötung streßfrei mit gewohntem Lichtrhythmus und schallisoliert gehalten werden können. Zur Schnittentbindung wurden die tragenden Tiere ½ min in einer mit CO<sub>2</sub>-gesättigten Atmosphäre betäubt und dekapitiert. Die Laparotomie erfolgte median in der Linea alba. Die Inzision beider Uterushörner erfolgte etwa in ihrer Mitte. Die Feten wurden unter Durchtrennung der Nabelschnur und Eröffnung der Fruchthüllen entwickelt und in Reihenfolge der Entnahme auf eine temperierte Unterlage gelegt. Die Feten waren bereits soweit geburtsreif, daß sie sofort mit der Spontanatmung begannen. Sie wurden so rasch wie möglich in der Reihenfolge der Entnahme aus dem Uterus dekapitiert, wobei maximal 15 min zwischen Beginn des Eingriffs und Töten des letzten Fetus lagen. Zur Kontrolle des Einflusses der Tötungsmethode auf den fetalen Insulinspiegel wurden zwei weitere Muttertiere mittels intrathorakaler Injektion von T61<sup>®</sup> (Hoechst) getötet. Die Entwicklung der Welpen und die weitere Präparation erfolgte wie oben beschrieben.

#### 2.2.1.2 Neugeborene und saugende Welpen

Bei der Gewinnung von Blut- und Organproben neugeborener Tiere wurden deren Muttertiere mindestens 24 h vor dem errechneten Geburtstermin in einer licht- und schallisolierten, belüfteten und im gewohnten Rhythmus beleuchteten Box gehalten, in der während der Dunkelphase eine Rotlichtbeleuchtung vorhanden war. Durch ein kleines Fenster war so eine regelmäßige Kontrolle des Geburtsbeginns ohne Störung des Muttertieres möglich. Die neugeborenen Welpen wurden einzeln unmittelbar nach der Geburt entnommen und sofort dekapitiert. 1-7 d (Tag 0 = Tag der Geburt) alte Wurfgeschwister wurden gemeinsam von der Mutter entfernt und bis zur Tötung im thermoneutralen Temperaturbereich gehalten. Zur Blutgewinnung wurden die Tiere durch Scherenschlag dekapitiert, 16 Tage alte Tiere wurden vor der Dekapitation ½ min in einer mit CO<sub>2</sub>-gesättigten Atmosphäre betäubt. Falls kein Blut benötigt wurde, erfolgte die Tötung der Tiere durch intraabdominale Injektion einer Überdosis Pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>, CEVA).

#### 2.2.1.3 Behandlung der Blutproben

Zur Gerinnungshemmung wurde dem Blut Heparin (Liquemin 5000<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche) im Verhältnis 20:1 zugesetzt. Die Sammelröhrchen wurden unmittelbar nach der Blutgewinnung in einem Eisbad gekühlt, gewogen, bei 4° C und 2000 g 10 min zentrifugiert und in verschiedenen Aliquots bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C gelagert. Das Gewicht der Blutproben war für die Ermittlung des Verdünnungsfaktors durch das zugesetzte Heparin von Bedeutung. Alle Meßergebnisse von Plasmaproben wurden mit diesem Faktor korrigiert.

### 2.2.2 Eviszeration für die Bestimmung der Körperzusammensetzung

Die Laparotomie der in Rückenlage verbrachten Tiere erfolgte median in der Linea alba, wobei der Schnitt entlang der Rippenbögen erweitert wurde. Nach stumpfer Präparation der Milz von der großen Kurvatur des Magens wurden das Ligamentum hepatogastricum und der Ösophagus durchtrennt und Magen sowie der kraniale Dünndarm nach sorgfältiger Befreiung von der Bauchspeicheldrüse entfernt. Der restliche Darm wurde unter Belassung des Gekröses am Tierkörper entfernt. Die Harnblase wurde eröffnet und

entleert.

### 2.2.3 Organ- und Gewebeentnahme

Die Lebern der Feten und Neugeborenen wurden für die Glykogenbestimmung direkt nach dem Ausbluten der Tiere entnommen. Dazu wurden der Magen unter Durchtrennung des Ösophagus und des Ligamentum hepatogastricum sowie der kraniale Dünndarm mit der Bauchspeicheldrüse von der Leber abgetrennt und die gesamte Leber mit einem Teil des Zwerchfells entfernt. Das restliche anhaftende Zwerchfell wurde im letzten Schritt sorgfältig entfernt.

Zur Bestimmung der Gewebetriacylglycerine wurde nach der Blutgewinnung zunächst das interscapuläre BAT sorgfältig aus der umliegenden Unterhaut und dem weißen Fettgewebe herauspräpariert. Danach wurde die Leber (siehe oben) und zuletzt das inguinale WAT, das einzige in den ersten Lebenswochen gut entwickelte weiße Fettlager (PLANCHE ET AL. 1987), auf beiden Seiten entnommen.

Nach der Wägung wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Organ- und Gewebeproben bis zur Messung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4 Entnahme von Proben für die PCR

Die Präparation der Gewebeproben für die PCR (ca. 50 mg Haut oder Muskel) erfolgte immer als letzter Schritt. Die Proben wurden nach der Entnahme bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Für die Genotyp-Kontrolle der Zuchttiere wurden Ohrbiopsien (ca. 25 mg) verwandt, die mittels Lochzange aus den Ohren  $\text{CO}_2$ -betäubter Tiere entnommen wurden. Zur Selektion für die künstliche Aufzucht wurden die Genotyp-Bestimmungen z.T. mit Proben von neugeborenen Tieren durchgeführt, die dann im Alter von 4 Tagen in den Versuch eingesetzt wurden. Diesen Tieren wurde unter  $\text{CO}_2$ -Betäubung eine ca. 25 mg schwere Hautbiopsie im Bereich der losen Nackenhaut entnommen und die entstandene Wunde mit einem Heft verschlossen. Zur späteren Identifikation wurden die Tiere durch Tätowierung unterschiedlicher Pfoten gekennzeichnet. Da der Eingriff die Entwicklung der Tiere für einige Tage etwas verzögerte, wurde die Genotyp-Identifikation der Neugeborenen später mittels 2  $\mu\text{l}$  Blutproben, die ohne Betäubung des Tieres durch das Kappen von ca. 1 mm der Schwanzspitze entnommen wurden, durchgeführt.

## 2.3 Molekularbiologische und biochemische Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Genotyp-Identifizierung

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) können beliebige DNA-Sequenzen vervielfältigt werden, sofern man deren flankierende Sequenzen kennt. Man benötigt dazu Oligonucleotide, die den flankierenden Sequenzen komplementär sind. Diese Oligonucleotide übernehmen in der PCR die Rolle der Primer. Ferner werden als Substratmoleküle alle 4 Desoxyribonucleosidtriphosphate benötigt. Als Enzym wird die hitzestabile DNA-Polymerase Taq I eingesetzt. Im 1. Schritt führt man durch kurzes Erhitzen auf über  $80^{\circ}\text{C}$  eine Trennung des DNA Doppelstranges herbei. Im 2. Schritt kühlt man den Versuchsansatz ab, so daß die im Überschuß vorliegenden Primer mit den flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Segments Hybride ausbilden. Im 3. Schritt wird die Lösung auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase erwärmt und die DNA-Polymerase synthetisiert ausgehend von den Primern an jeder Matrize den komplementären Strang, so daß DNA-Doppelstränge entstehen. Der komplette Zyklus, der aus den 3 beschriebenen Schritten besteht, wird 20 - 40 mal wiederholt. Am Ende der PCR wird die Größe des amplifizierten Moleküls in der Gelelektrophorese festgestellt. Kommen im Genom Allele mit einer unterschiedlichen Anzahl an Basenpaaren, aber identischen Sequenzen am Ende des DNA-Moleküls vor (Polymorphismus), so sind die amplifizierten Zielsequenzen unterschiedlich lang

und lassen sich in der Gelelektrophorese auftrennen. Dadurch können homo- und heterozygote Tiere für dieses Allel molekularbiologisch identifiziert werden.

Voraussetzung für diese Arbeit waren die in den letzten Jahren von LEIBEL UND MITARBEITERN (Rockefeller University, New York) entwickelten molekular-biologischen Methoden zur Aufdeckung von genetischen Polymorphismen in Genloci in der Nähe des fa-Gens auf Chromosom 5. Der Genotyp am fa-Locus ließ sich dadurch bei 13 MBN-Hybriden mit einer Genauigkeit von bis zu 99 % bestimmen (KERSHAW ET AL. 1995, SMOLLER ET AL. 1993, TRUETT ET AL. 1991). Das Prinzip der Identifikation von fa/fa- und +/-fa-Tieren anhand eines molekularen Markers ist in Abb. 2 dargestellt.

### **2.3.1.1 DNA-Gewinnung und Aufarbeitung**

Das Gewebe wurde in flüssigem N<sub>2</sub> gemörsert und über Nacht einer Proteinase K-Verdauung (Boehringer Mannheim) unterzogen. Nach einstündiger Inkubation mit RNAase A (Boehringer Mannheim) wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung mit Ethanol isoliert und in Aqua bidest. aufgenommen. Alternativ wurde später die Aufarbeitung von ca. 25 mg Gewebe mittels QIAamp Tissue Kit (QIA GEN GmbH, Hilden) oder von 2 µl Blutproben mit Hilfe von InstaGene (Bio-Rad GmbH, München) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Das QIAamp Tissue Kit erleichterte die DNA-Präparation, da das zeitaufwendige Mörsern des Gewebes entfiel. Das Insta-Gene Kit ermöglichte die DNA-Präparation aus kleinsten Blutmengen. Daher wurde das Insta-Gene Kit bevorzugt zur Genotyp-Identifikation lebender Tiere eingesetzt. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt.

*Abb. 2: Der Erbgang des "fa"-Gens und eines molekularen Markers (M bzw. m).*

*Zeichnung: Heike Jauker*

### **2.3.1.2 Ausgangsverfahren der PCR und Auftrennung der Produkte**

Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt:

250 ng DNA

25 pM der Primer für das Glut-1 Gen

(5'GAA TGA AGC TAA GAA TTG ACC TTA GGT 3' und

5'GTC CAT GCC TGT CCT TTA GTG CTC TTG 3';

TRUETT ET AL. 1991; hergestellt u.a. von Eurogentec, Darmstadt)

Reaktionspuffer (Boehringer Mannheim), bestehend aus:

50 mM KCl

10 mM TrisCl (pH 8,3)

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,01 % Gelatine

je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP

0,1 Unit Taq-Polymerase I (Boehringer Ingelheim oder Gold Star DNA-

Polymerase, Eurogentec)

Das Amplifizieren der Zielsequenzen erfolgte in 30 Zyklen mit je:

1 min zum Trennen der Doppelstränge bei 94°C,

1 min zur Hybridisierung der Primer mit den DNA-Einzelsträngen

bei 58°C und

1 min zur Kettenverlängerung bei 58°C

im Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600, Fa. Perkin Elmer Cetus). Dabei wurde das 3. Segment (58° C-Stufe) um 3 sec pro Zyklus verlängert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese 5 h bei 50 V bzw. 2 h bei 100 V auf 10 x 7 cm großen Polyacrylamidgelen, wobei zur optimalen Auftrennung der DNA-Banden die 10 - 12 %igen Trenngele mit 4 %igen Sammelgelen

überschichtet wurden. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gefärbt und unter UV-Licht beurteilt und fotografiert. Die Fragmente des Brown-Norway Allels bestanden aus 185 bp, die der Zucker-Ratten aus 195 bp. Zwei versetzte Banden signalisierten daher heterozygote, eine einfache Bande homozygote Tiere (Abb. 3).

### 2.3.1.3 Modifikation der Primer

Das Glut-1 Gen lag mit ca. 8 cM relativ weit vom fa-Genlocus entfernt, so daß diese Bestimmungsmethode mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von < 8 % durch cross-over zwischen Markergenen und fa-Gen behaftet war (TRUETT ET AL. 1991). Ab Juli 1994 wurden deshalb zwei weitere Markergene eingesetzt, die ungefähr 1 cM vom fa-Gen entfernt waren (KERSHAW ET AL. 1995). Mit dieser Bestimmungsmethode erfolgte eine Nachbestimmung aller in dieser Arbeit ausgewerteten Tiere. Die Primerpaare für diese Markergene waren:

D5Rhm2: F 5'TTG ATG TCC AGC ACT CAC AG und

R 5'GAT ATA GCC ATA GGC AAG GAC

D4Mit119: F 5'AGA AAT CTT GAA TGT AAA CTC TGT GTG und

R 5'GTC TTA CTC ACA TCT GCC TCA GA

Für einen optimalen Ablauf der PCR wurden 0,2 mM Spermidin (Aldrich-Chemie, Steinheim) und zur Vereinfachung des Arbeitsablaufes auch die Taq-Polymerase direkt dem Reaktionspuffer hinzugefügt. Für die Amplifikation der Fragmente zwischen den Primern wurden folgende Thermocyclerkonditionen eingehalten (Persönliche Mitteilung von R.Leibel, 12 Juli 1994):

Primer D5Rhm2: 3 min "Warmstart" bei 94° C

20 Zyklen mit je

30 sec 94° C

30 sec 65° bis 55° C, bei jedem Zyklus um 0,5° C

abnehmend ('Touchdown'-Modifikation nach DON

ET AL. 1991)

30 sec 72° C

20 Zyklen mit je

30 sec 94° C

30 sec 55° C

30 sec 72° C

Primer D4Mit119: 3 min "Warmstart" bei 94° C

35 Zyklen mit je

30 sec 94° C

30 sec 55° C

30 sec 72° C

Die Gele zur Auftrennung der PCR-Produkte entsprachen den oben angegebenen. Die DNA-Fragmente wurden 1,5 h bei 200 V aufgetrennt. Die Größe der Fragmente betrug:

Primer D5Rhm2: 162 bp Brown-Norway Ratte

175 bp Zucker-Ratte

Primer D4Mit119: 140 bp Brown-Norway Ratte

134 bp Zucker-Ratte

+/fa

fa/fa

*Abb. 3: Ethidiumbromidgefärbte PCR-Produkte des Primers Glut-1 von +/fa- und fa/fa-Tieren, wie sie sich unter UV-Licht darstellen.*

### **2.3.2 Bestimmung der Körperzusammensetzung**

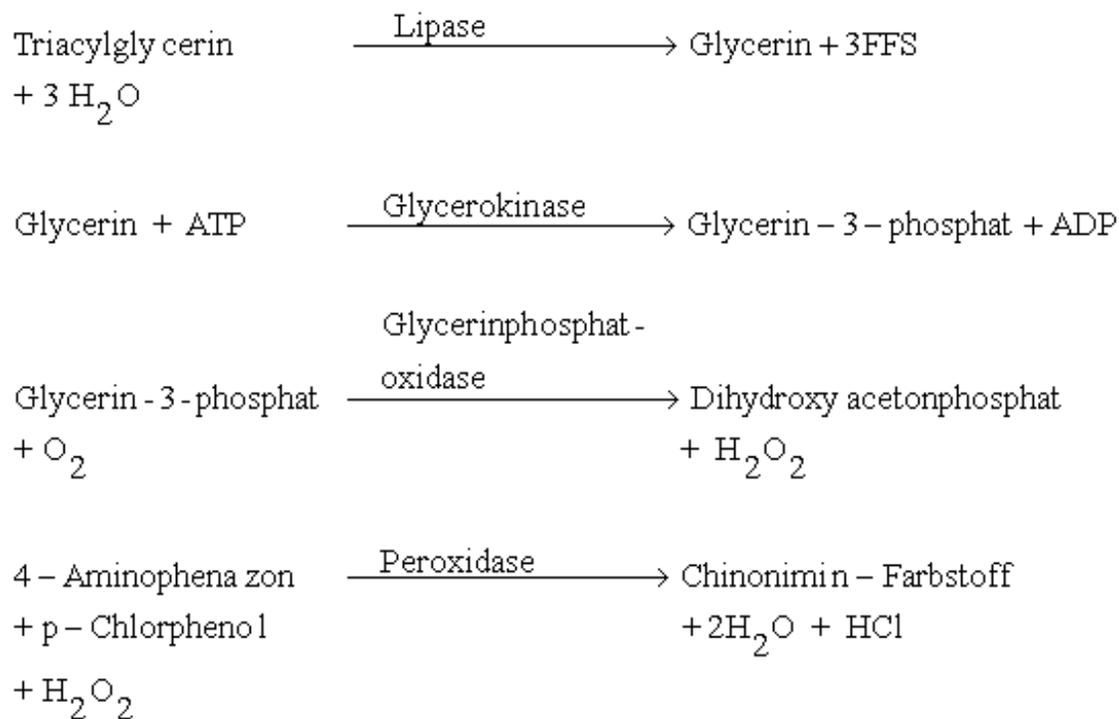
Die Methoden zur Ermittlung der Körperzusammensetzung von Ratten im Säuglingsalter wurden bereits wiederholt beschrieben (KAUL ET AL. 1990, KÖRTNER ET AL. 1994, MARKEWICZ ET AL. 1993) und sind deshalb hier nur kurz zusammengefaßt. Zunächst wurde die Lebendmasse der Tiere bestimmt, nach Tötung und Eviszeration die Feuchtmasse (d.h. Feuchtmasse = Lebendmasse - Masse des Magendarm-Traktes und des Blaseninhaltes). Bei entbluteten Tieren wurde die entnommene Blutmasse zu der ermittelten Feuchtmasse addiert. Die Trocknung bei 70° C bis zur Gewichtskonstanz ergab die Trockenmasse. Das Fett wurde 24 h bei 0 bis 4 Tage alten Welpen bzw. mindestens 48 h bei älteren Tieren im Soxhlet-Apparat extrahiert. Nach erneuter Trocknung wurde durch Wägung die fettfreie Trockenmasse (ffTM) bestimmt. Die Masse des im Körper enthaltenen Wassers ergab sich aus der Differenz von Feucht-

und Trockenmasse, die Fettmasse ergab sich aus der Differenz von Trockenmasse und ffTM. Neben den Absolutwerten wurden die prozentualen Werte bezogen auf die Feuchtmasse berechnet. Soweit für Vergleiche erforderlich, wurden auch der Fettgehalt der Trockenmasse (Fett in Tr.) und der prozentuale Wassergehalt der fettfreien Feuchtmasse (ffFM) ermittelt.

### 2.3.3 Triacylglycerinbestimmung

Zur Bestimmung der Triacylglycerine unter Verwendung eines Peridochrom-Triglyceride GPO-PAP Testkit (TG Testkit, Boehringer Mannheim) wurden das BAT und die Leberproben in 10 ml 6 %iger Albumin-Lösung (bovines Albumin, Fraktion V, Boehringer Mannheim) auf Eis homogenisiert. Bedingt durch die Konsistenz des WAT mußten der Lösung 700 mg Gummi Arabicum (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) zugesetzt werden, um auch beim WAT eine ausreichende Homogenisation zu erreichen (modifiziert nach Herstellerangabe). Für die Bestimmung von Triacylglycerinen im Plasma wurden 10 µl Proben eingesetzt.

Reaktionsprinzip:



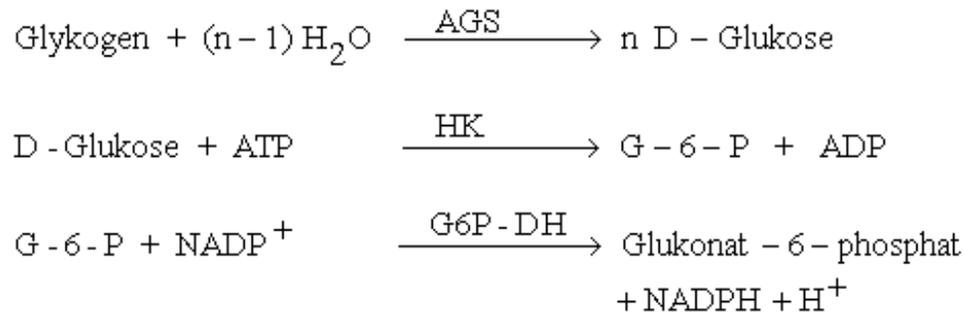
Die Bestimmungsmethode basiert auf enzymatischer Spaltung der Triacylglycerine in freies Glycerin und Freie Fettsäuren. Das freie Glycerin wird durch Glycerokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Das entstandene Glycerin-3-Phosphat wird anschließend durch Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert. Das in diesem Schritt entstehende Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon und p-Chlorphenol unter Bildung eines roten Farbstoffes, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen wird.

### 2.3.4 Bestimmung des Glykogengehaltes

Zur Bestimmung des Leberglykogengehaltes wurde ein Testkit zum Nachweis von Stärke in Lebensmitteln (Stärke Testkit, Boehringer Mannheim) eingesetzt. Um einen vorzeitigen Abbau des Leberglykogens durch zelleigene Enzyme zu vermeiden, wurden die gefrorenen Proben zur Aufarbeitung mit 1 ml kochendem Wasser überschichtet, in einem Wasserbad 5-10 min gekocht und dann in 0,1 molarem Citratpuffer (pH 4,6; Boehringer Mannheim) homogenisiert (modifiziert nach PASSONNEAU UND LAUFERDALE

1974). Das Volumen des Citratpuffers wurde so bemessen, daß der Glykogengehalt der Probelösung zwischen 0,03 und 0,4 g/l lag (für 300 mg fetales Lebergewebe ca. 10 ml). Zum Lösen des Glykogens wurden die Proben anschließend erneut 30 min gekocht und dann 20 min bei 4° C und 2200 g zentrifugiert. Während der nachfolgenden 15-minütigen Inkubation bei 55-60° C wurde das Glykogen durch das Enzym Amyloglukosidase (AGS) bei pH 4,6 zu D-Glukose gespalten. Die gebildete D-Glukose wurde bei pH 7,6 mit den Enzymen Hexokinase (HK) und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) bestimmt.

Reaktionsprinzip:



Die Menge des bei der Reaktion gebildeten NADPH war der durch Hydrolyse des Glykogens gebildeten D-Glukosemenge proportional und konnte aufgrund seiner charakteristischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden. Dabei wurde evtl. während der Präparation bereits zu Glukose abgebaut Glykogen mitbestimmt. Die Glukosebestimmung in Proben, die nicht mit Amyloglukosidase inkubiert worden waren, ergab jedoch einen Gehalt an freier Glukose von nur 0,2 %.

### 2.3.5 Radioimmunoassay (RIA) für Insulin

Insulin wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay Testkits (Serono Diagnostics, Freiburg) zur quantitativen Bestimmung von Insulin in humanem Plasma gemessen. Je nach erwarteter Insulinkonzentration wurden bei Feten 20 µl, bei Neugeborenen 30 µl und bei 16 Tage alten Tieren 50-70 µl Serumaliquots eingesetzt. Da Ratteninsulin ca. 50 % schlechter an den humanen Antikörper bindet, wurde statt des im Testkit enthaltenen humanen Insulinstandards ein Ratteninsulinstandard (1 µg/10 µl; Novo Industries Laboratories) zur Erstellung der Referenzkurve herangezogen. Diese Lösung wurde auf 24 µU/100 µl verdünnt und daraus in 6 Schritten eine 1:1 Verdünnungsreihe bis zur Konzentration von 0,375 µU/100 µl hergestellt. Weiterhin wurden folgende Kontrollansätze erstellt:

Reagentien	Proben 1-n	Kontrolle	Standard Nr. 1-7	TA	NSB	B <sub>0</sub>
Tierproben	0,1 ml	-	-	-	-	-
Serotest	-	0,1 ml	-	-	-	-
Nullstandard	-	-	-	-	0,1 ml	0,1 ml
H <sub>2</sub> O dest.	-	-	-	-	0,1 ml	-
Standards	-	-	0,1 ml	-	-	-
Tracer	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Antiserum	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	-	-	0,1 ml
Mischen und 2 h bei Raumtemperatur inkubieren						

PEG-Lösung	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	-	1,0 ml	1,0 ml
------------	--------	--------	--------	---	--------	--------

Die Totalaktivität (TA) dient dem Nachweis, wieviel Radioaktivität in jeder Probe eingesetzt wird. Die nichtspezifische Bindung (NSB) zeigt an, wieviel des eingesetzten Tracers nicht für die Reaktion mit Antikörpern zur Verfügung steht, da er unspezifisch an den Puffer oder an die Wandung des Reaktionsgefäßes gebunden ist. Der NSB/TA-Wert gibt den prozentualen Anteil des unspezifisch gebundenen Tracers wieder und lag in unserer Untersuchung unter 5 %. Der Nullstandard (B0) zeigt die maximale Bindungsfähigkeit zwischen Antikörper und Tracer (Nullwert) an. Der B0/TA-Wert sollte nicht größer als 50% sein und lag in dieser Untersuchung in der Regel zwischen 36 - 40 %.

Nach Zugabe von Antiserum und/oder radioaktivem Tracer wurden die beschriebenen Ansätze sowie die zu messenden Proben zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden freies und gebundenes Antigen durch Polyethylenglykol (PEG) getrennt. Das dabei entstandene Immunpräzipitat (Antikörper-Antigen-PEG-Komplex) wurde abzentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Radioaktivität des im Röhrchen verbliebenen Präzipitats mit einem Gammacounter (Berthold, LB951G) gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve wurde dann die Insulinkonzentration der Proben ermittelt. Die Sensitivität der Methode lag bei ca. 8 µU/ml.

In jedem RIA-Durchlauf wurden 2 - 3 Serumaliquots jedes einzelnen Tieres eines Wurfes zusammen mit im Testkit enthaltenen Kontrollproben (Serotest) und einem selbst hergestellten Rattenserumpool gemessen. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden weitere 1 - 2 Serumaliquots bereits gemessener Tiere im nächsten Durchlauf mitbestimmt. Zu dem gleichen Zweck wurden Proben von Tieren aus zwei Würfen zusätzlich in einem anderen Labor (F. Rohner-Jeanrenaud und B. Jeanrenaud, Geneva) gemessen. Die Absolutwerte der Ergebnisse aus unserem und dem Genfer Labor unterschieden sich zwar, für den Wurfgeschwistervergleich ist aber entscheidend, daß die erhaltenen Werte zueinander proportional waren (Abb. 4). Die Interassay-Variabilität spielte damit bei der statistischen Analyse der genotypspezifischen Unterschiede keine Rolle, da sich die Auswertung auf Ergebnisse von Wurfgeschwistern beschränkt, die im gleichen RIA-Durchlauf gemessen worden waren (Kapitel 2.5).

Die Intraassay-Variabilität wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\sqrt{\sum \left(\frac{d}{\bar{x}} \cdot 100\right)^2 / 2N}$$

(aus CHARD, 1982)

und lag bei 7,8 %.

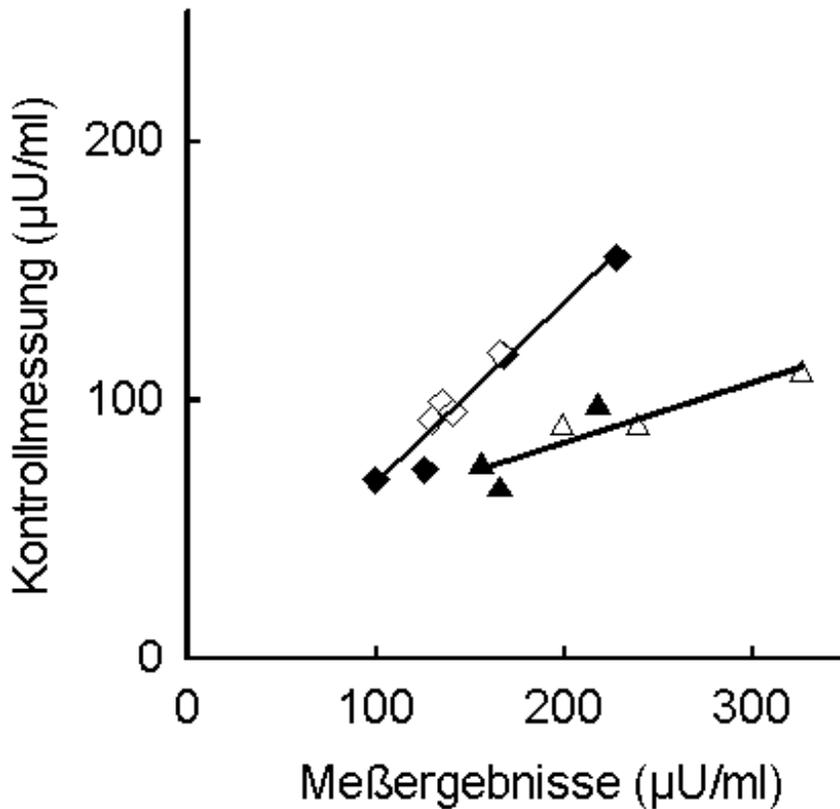


Abb. 4: Vergleich der Ergebnisse aus Radioimmunoassays für Plasmainsulin des eigenen Labors (Meßergebnisse) mit Messungen, die im Labor von B. Jeanrenaud in Genf durchgeführt wurden (Kontrollmessung). Die verschiedenen Symbole stehen jeweils für die Tiere eines Wurfes, gefüllte Symbole entsprechen den +/fa-, offene Symbole den fa/fa-Tieren.

## 2.4 Künstliche Aufzucht

Die Methode der künstlichen Aufzucht von Ratten ab einem Alter von 4 Tagen unter kontrollierten Umweltbedingungen und mit identischer Ernährung ist ein bereits mehrfach detailliert beschriebenes Verfahren (KAUL ET AL. 1990, MUMM ET AL. 1989, NÜBLEIN UND SCHMIDT 1990). Daher erfolgt hier nur noch eine kurze Zusammenfassung und die Beschreibung von Modifikationen.

### 2.4.1 Versuchsaufbau

Die Versuchstiere wurden einzeln in durchsichtigen Stoffwechselbehältern gehalten, die in einem temperierten Wasserbad innerhalb eines Klimaschranks (Weiss Technik, Lindenstruth) schwammen (Abb. 5).

*Abb. 5: Versuchsaufbau für die künstliche Aufzucht:*

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

Aus: Mumm et al. 1989

Ein Luftabsaugrohr aus Metall (= 3 mm) führte durch eine zentrale Öffnung (= 5 mm) im Deckel bis fast auf den Boden, und gewährleistete damit eine ausreichende Luftzirkulation im Behälter. Die Befestigung der Absaugrohre an einem Gestell über dem Wasserbad sicherte die Position der Tierbehälter, ohne deren Rotation zu verhindern. Alle Zuleitungen zu den Tieren (Milchkatheter und Meßfühler) wurden gemeinsam aus der zentralen Deckelöffnung herausgeführt und am Ansatzpunkt des zentralen Metallrohres befestigt. Dadurch wurde ein Verdrillen der Zuleitungen bei der Bewegung der Tiere durch eine kompensatorische Behälterrotation verhindert.

## **2.4.2 Künstliche Ernährung**

Ein Muttermilchersatz wurde nach MESSER ET AL. (1969) aus Kondensmilch (Bärenmarke 12%, Allgäuer Alpenmilch GmbH, München), Maiskeimöl (Mazola Keimöl, Heilbronn), Wasser (Stadtwerke Bad Nauheim), Aminosäuren, Mineralien (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und Vitaminen (Polybion N-Tropfen, Merck) hergestellt (Mengenangaben siehe MESSER 1969). Der Kaloriengehalt dieser Milch betrug ca. 7 - 8 kJ/ml. Dieses Gemisch wurde homogenisiert und mit einer Vakuumpumpe entgast. Die portionierten Milchproben wurden bei -20° C eingefroren und nach Bedarf im Kühlschrank (+7° C) aufgetaut. Während des Versuches wurde die Milch durch im Kühlschrank stehende Perfusionspumpen (Braun Melsungen AG) kontinuierlich über intraösophageale Katheter den Welpen zugeführt. Die Katheter bestanden aus einem 3,5 cm langen, weichen Silasticschlauch (602-105, Dow Corning, Midland, USA), der über das gebogene Ende eines 20 cm langen PP 10 Tubus (Dow Corning, Midland, USA) gezogen wurde (Abb. 6). Der gebogene Bereich lag dabei im Mundwinkel der Welpen, der weiche, kurze Schenkel endete tief im Ösophagus. Die Katheter wurden durch Heftpflaster und Sekundenkleber an der Backe und im Nacken der Tiere befestigt. Die Futterzufuhr wurde der Körpergröße und dem Magenfüllungszustand angepaßt und von 2 ml/Tag bei 4 Tage alten Tieren auf ca. 8 ml/Tag bei 16 Tage alten Tieren erhöht. Die Futterzufuhr variierte zwischen den Würfen, war aber jeweils für alle Wurfgeschwister gleich.

*Abb. 6: Oesophaguskatheter für die kontinuierliche Milchversorgung der künstlich aufgezogenen Tiere und dessen Fixation am Tier.*

Aus: Nüßlein, 1989

### 2.4.3 Temperatur-Meßsystem

Die rektale Körpertemperatur ( $T_c$ ) der Welpen und die Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) wurde kontinuierlich mit 0,06 mm dicken Kupfer-Konstantan-Thermo-drähten (California Finewire, Grover City, CA) gemessen. Zum Schutz des empfindlichen Darms war der Thermodraht von einem PP10-Schlauch überzogen, dessen Ende von einem weichen, 5 mm langen, am Ende mit Silicon-Kautschuk (E41, Wacker, München) verschlossenen Silastic-Schlauch (602-105, Außendurchmesser 0,6 mm) ummantelt war. Diese Thermoelemente wurden zwischen 18 mm (4 Tage alte Tiere) und 23 mm (16 Tage alte Tiere) tief in das Rektum der Tiere eingeführt. Vor jedem Versuch erfolgte eine Kalibrierung der Thermoelemente im Bereich zwischen 20° - 40° C. Als Eichgerät diente ein elektronisches Präzisionsthermometer (Ellab, Roedovre, Dänemark). Die Thermospannung wurde nach Verstärkung durch einen Temperatur-Meßverstärker (Kerckhoff-Institut, Eigenbau) über einen 30-Kanal-Punktdrucker (Yokogawa 3081 Hybrid Recorder, nbn Elektronik GmbH, Herrsching) aufgezeichnet und durch einen Computer (Tandon Plus, Tandon Corporation, Chatsworth, CA) gespeichert.

### 2.4.4 Sauerstoff-Meßsystem

Die Analyse der aus den Tierbehältern und der Umgebung abgesaugten Luft erfolgte mittels eines elektrochemisch arbeitenden Zwei-Kanal Sauerstoff-Analysators (S-3A/II, Ametek, Pittsburgh, USA) in einem offenen Flußsystem. Während der Versuche wurde mit einem der Analysatorkanäle ständig der Sauerstoffgehalt der Umgebungsluft registriert. Mit dem zweiten Analysatorkanal wurde abwechselnd der Sauerstoffgehalt von 7 Tierboxen und der Umgebungs-luft im zyklischen Durchlauf je 5 min gemessen (Abb. 7). Die Luft in jedem dieser 8 Meßkanäle wurde dabei durch Membranpumpen über  $\text{CaSO}_4$  gefüllte Trockenröhrchen und bei höheren Flußraten durch leere 500 ml Flaschen abgesaugt. Wegen des großen Volumens der Flaschen traten die unmittelbar am

*Abb. 7: Funktionsweise des Sauerstoff-Meßsystems. Dargestellt sind drei der acht Meßkanäle, die von einem der beiden Analysatorkanäle im zyklischen Durchlauf erfaßt werde. Der mittlere Kanal befindet sich in Meßposition. 1) Tierbehälter, 2) Trockenröhrchen mit  $\text{CaSO}_4$  (Drierite), 3) Filterröhrchen mit Aktivkohle (zur Absorption organischer Gase), 4) Membranfilter, 5) Nadelventil, 6) Wassermanometer zur Regelung und Überwachung eines identischen Bypass- und Meßluftflusses, 7) Magnetventil, 8) Membranpumpe, 9) Massenflußmesser, 10) Analysatorkanal eines elektrochemischen*

*Sauerstoffanalysators.*

Aus: Nüßlein et al. 1993

Absaugrohr herrschenden starken Schwankungen des Sauerstoffgehaltes der Tierluft am Meßgerät nicht mehr auf. Nach Durchströmen von Aktivkohlefiltern, die zur Absorption organischer Moleküle dienten, wurden Staubpartikel mit Hilfe von Membranfiltern abgefangen. Durch Magnetventile, die mit einem Zeitgeber verbunden waren, wurde die angesaugte Luft entweder zu einem Massenflußmesser (FM 360, Tylan General, Eching bei München) und von dort zum Sauerstoffanalysator geleitet, oder durch Bypasspumpen in den Raum entlassen.

Damit die Luft zu den Zeiten, in denen ein Tier nicht in Meßposition war, mit derselben Flußrate abgesaugt wurde wie in Meßposition, war zwischen den beiden Ventilen ein Wasser-Manometer zur Kontrolle eingebaut. Die Flußrate, mit der die Luft abgesaugt wurde, wurde mit zunehmendem Alter der Tiere allmählich von 125 auf 270 ml/min erhöht. Dadurch wurde der ansteigende Sauerstoffverbrauch der wachsenden Welpen berücksichtigt und die Sauerstoff-extraktion aus der Tierboxenluft bei ca. 0,5 % gehalten. Der Sauerstoffgehalt beider Analysatorkanäle, sowie eine Kennung zur Identifizierung desjenigen Meßkanals, der sich gerade in Meßposition befand, und der Luftfluß durch diesen Kanal wurden ebenfalls durch den Computer und Punktdrucker aufgezeichnet.

Die Kalibrierung des Sauerstoffanalysators im gewünschten Meßbereich erfolgte durch Gasgemische mit Sauerstoffkonzentrationen zwischen 20 und 21 %. Die Abweichung vom Sollwert lag in diesem Bereich unter 0,01 %. Zur Kalibrierung des Massenflußmessers wurde nach Einstellung eines konstanten Luftflusses die Zeit gestoppt, in der ein Seifenfilm eine markierte Strecke in einem Plexiglasrohr zurücklegte. Die im Raum herrschende Temperatur und Luftfeuchte sowie der Luftdruck wurden ermittelt. Das Luftvolumen des markierten Bereichs der Plexiglassäule wurde mit folgender Gleichung auf Standardbedingungen umgerechnet.

$V_{STPD}$  = Luftvol. unter standardisierter

Temperatur (temperature),

Druck (pressure) und

Feuchtigkeit (dryness)

$V$  = Volumen des Plexiglasrohres

$P_B$  = Luftdruck

$P_{H_2O}$  = Wasserdampfdruck

$t$  = Temperatur in °C

$$V_{STPD} = \frac{V \cdot P_B - P_{H_2O} \cdot 273}{760 \cdot 273 + t}$$

Der errechnete Luftfluß wurde gegen die am Massenflußmesser eingestellte Spannung aufgetragen. Durch

Wiederholung des Verfahrens bei unterschiedlichen Flußraten zwischen 80 und 300 ml pro min wurde die Flow-Kennlinie ermittelt.

## 2.4.5 Versuchsdurchführung

In drei Versuchsdurchläufen wurden jeweils 9-10 4 Tage alte Tiere aus einem Wurf (A-C) einzeln in die Stoffwechselbehälter gesetzt. Die Tiere wurden bis zu einem Alter von 16 Tagen (Überlebensrate: 82 %) im diffusen Dauerlicht bei einer relativen Luftfeuchte von ca. 60 % gehalten. Da Rattenwelpen im Säuglingsalter ihre metabolische Kälteabwehr aktivieren, wenn ihre Körpertemperatur ( $T_c$ ) unter  $37^\circ\text{C}$  fällt (SPIERS UND ADAIR 1986), wurde die Außentemperatur ( $T_a$ ) anfangs so eingestellt, daß die Körpertemperatur aller Welpen knapp über  $37^\circ\text{C}$  lag. Durch Wachstum und zunehmendes Haarkleid sinkt im Laufe der Aufzucht die Wärmeabgabe. Außerdem wurde durch die Behandlung mit Noradrenalin die Wärmeproduktion der Welpen gesteigert. Daher mußte die  $T_a$  im Laufe des Versuchs allmählich gesenkt werden, um den Mittelwert der  $T_c$  zwischen  $37$  und  $39^\circ\text{C}$  zu halten. Kurzfristige  $T_c$  Anstiege bis auf  $40^\circ\text{C}$  werden von den Jungtieren ohne Schäden toleriert (KÖRTNER ET AL. 1994, SCHMIDT ET AL. 1985). Die Einstellung der  $T_a$  und die resultierende  $T_c$  ist in Abb. 8 beispielhaft für Wurf C gezeigt.

Es ist bekannt, daß unter thermoneutralen Bedingungen nur bei Fütterung geringer, nicht aber großer Milchmengen bereits bis zum Alter von 16 Tagen Unterschiede in der Fettdeposition von künstlich aufgezogenen fa/fa- und +/fa-Tieren auftreten. Daher wurde die Menge der zugeführten Milch so gering wie möglich gehalten (MARKEWICZ ET AL. 1993). Da aber die den Tieren während des Versuchs zugeführte Milch auch der Verdauungsgeschwindigkeit angepaßt werden mußte, unterschieden sich die zugeführten Milchmengen (Wurf A: 57 ml pro Tier, Wurf B: 47 ml, Wurf C: 45 ml). Alle Welpen eines Wurfes erhielten in 0,1 % Ascorbinsäure gelöstes Noradrenalin (D (-)-Arterenol Hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in gleicher Konzentration und Menge mit der Milch. Die Noradrenalin-Milch wurde zweimal täglich frisch gemischt und homogenisiert. Dabei wurde das Noradrenalin (NA) so dosiert, daß die mittlere massenspezifische MR der Welpen am Ende der zweiten Versuchswoche um mehr als 100 % über die von künstlich unter thermoneutralen Bedingungen aufgezogenen +/fa-Vergleichstieren derselben Altersstufe angehoben wurde. Die Dosierung wurde abgeleitet von der näherungsweise bestimmten massenspezifischen MR, die durch Division der aktuell aus der Druckeraufzeichnung interpolierten MR durch den mittleren Massewert des Wurfes zum gleichen Meßzeitpunkt errechnet wurde. Die in unserer Untersuchung eingesetzte NA-Dosis lag nahe an dem oberen Grenzwert, der gerade noch ohne Wachstumsstörungen toleriert wurde. Die resultierende metabolische Aktivität entsprach dem Maximum, das nach akuter NA-Stimulation unter Kältebelastung aufgezogener +/fa-Welpen zu beobachten war (NÜBLEIN-HILDESHEIM UND SCHMIDT 1994). Um Störungen der Magenmotilität und -entleerung vorzubeugen, wurde die NA-Dosis innerhalb der ersten Versuchstage langsam bis zur gewünschten Stoffwechselsteigerung erhöht. Die benötigten Konzentrationen lagen dabei in unseren Versuchen zwischen  $500 - 1900 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Der Anstieg der massenspezifischen MR ist ebenfalls am Beispiel von Wurf C in Abb. 8 dargestellt.

## 2.4.6 Überwachung

Morgens zwischen 6.00 und 9.00 Uhr sowie nachmittags zwischen 16.00 und 18.30 Uhr wurden die Tiere gründlich untersucht, gewogen, die Blase und der Darm durch leichte Massage entleert, der Magenfüllungszustand beurteilt sowie der Sitz des Katheters und der Heftpflaster überprüft. Dabei wurden nachmittags die Thermoelemente entfernt und die Lage der Kupfer-Konstantan-Drähte innerhalb der durchsichtigen Schutzüberzüge kontrolliert. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die  $T_c$  und massenspezifische MR anhand der Drucker-aufzeichnungen beurteilt und gegebenenfalls die  $T_a$ , die

NA-Dosis und die Milchflußrate verändert. Bei Bedarf erfolgten Einzeltierkontrollen auch zwischen diesen Zeiten.

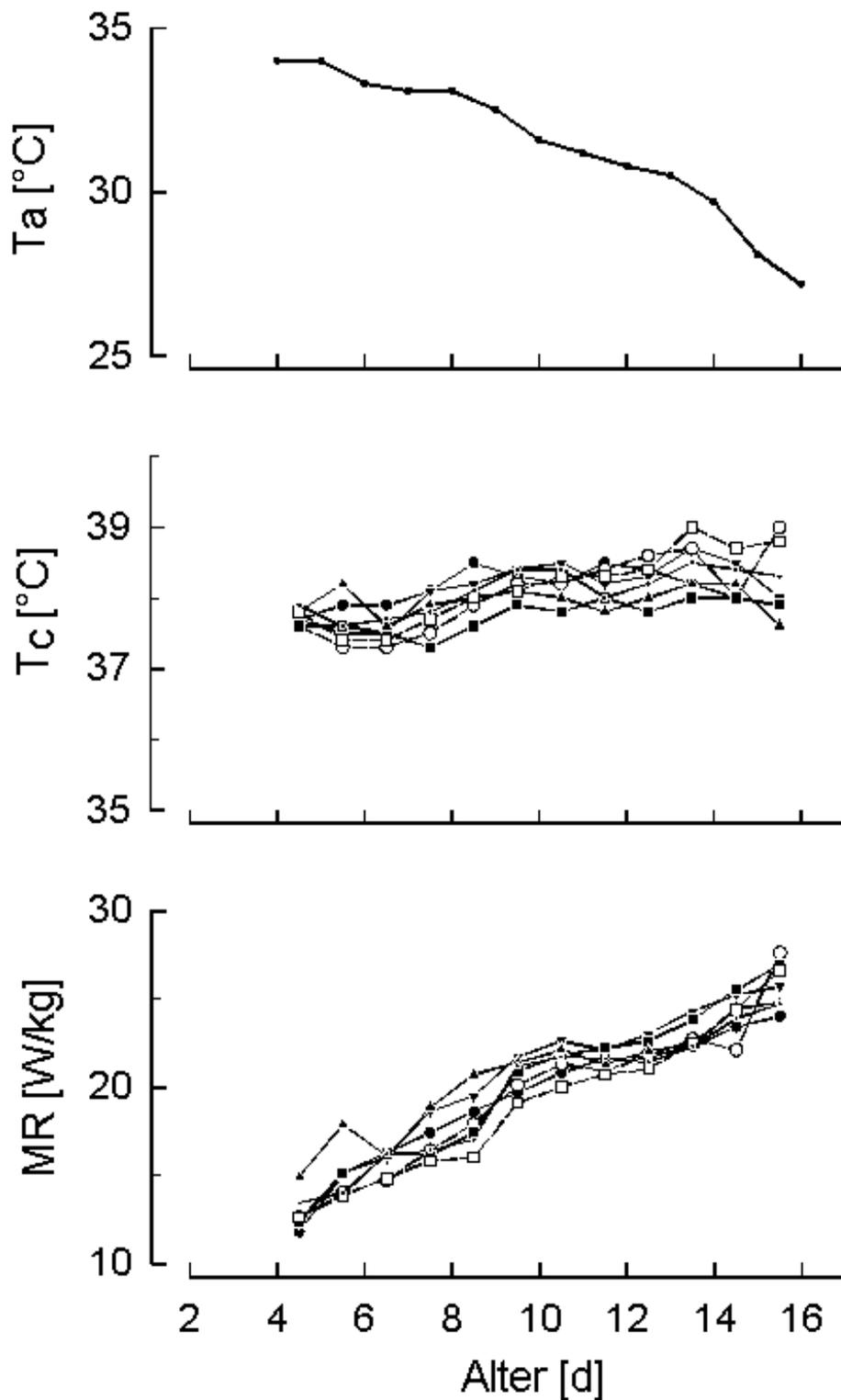


Abb. 8: Umgebungstemperatur ( $T_a$ ), rektale Körpertemperatur ( $T_c$ ) und massenspezifische Stoffwechselrate ( $MR$ ) während der künstlichen Aufzucht von Wurf C unter Noradrenalinbehandlung. +/fa: gefüllte Symbole, durchgezogene Linien; fa/fa: offene Symbole, gestrichelte Linien.

## 2.4.7 Auswertung

Nach Versuchsende wurden die Rohdaten zur Auswertung auf einen Rechner (Vax 11/780) übertragen. Fehlerhafte Meßwerte (z.B. durch Thermoelement-bruch oder Herausnahme eines Tieres aus den Tierbehältern) wurden vor der Auswertung gelöscht.

Die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs basierte gemäß der oben beschriebenen Sauerstoffmeßmethode auf ca. 35 einzelnen Meßwerten pro Tier und Tag. Dabei wurden von den 5 min Meßperioden jeweils nur die letzten 2,5 min ausgewertet, um Fehler, bedingt durch die Einstellzeit des Sauerstoff-Analysators auf den Meßwert eines neuen Meßkanals, auszuschließen. Die Spannungsdifferenz, die auftrat, wenn beide Kanäle des Zweikanalmeßsystems getrocknete Umgebungsluft maßen, wurde vom Computer jeweils gleich Null gesetzt und für die Zwischenzeit eine Regression zwischen den aufeinanderfolgenden Nullwerten gebildet. Die Sauerstoffkonzentration in den Tierbehältern entsprach damit der Spannungsdifferenz zwischen den Meßkanälen, die getrocknete Tierluft maßen und der vom Computer ermittelten Nulllinie. Aus der Flußrate und dieser Differenz wurde nach der Gleichung für das offene System von WITHERS (1977) der Sauerstoffverbrauch unter STPD-Bedingungen errechnet:

$\dot{V}_{O_2}$  = Sauerstoffverbrauch eines

Versuchstieres (STPD)

$\dot{V}_E$  = Luftfluß (STPD)

$FI_{O_2}$  = Sauerstoffkonzentration der

Umgebungsluft (STPD)

$FE_{O_2}$  = Sauerstoffkonzentration der

Tierkammerluft (STPD)

$RQ$  = Respiratorischer Quotient

$$\dot{V}_{O_2} = \frac{\dot{V}_E \cdot (FI_{O_2} - FE_{O_2})}{1 - (1 - RQ) \cdot FI_{O_2}}$$

Für beide Genotypen wurde ein respiratorischer Quotient (RQ) von 0,8, angenommen (MARKEWICZ ET AL. 1993, PLANCHE ET AL. 1983).

Für die Umrechnung des Sauerstoffverbrauchs der Tiere in die entsprechenden Energieumsatzwerte (MR) wurde der dem angenommenen RQ entsprechende Umrechnungsfaktor von 0,33 W pro ml  $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$  zugrunde gelegt, der auf dem calorischen Äquivalent von 20 J pro ml  $O_2$  basiert. Die Berechnung des massenspezifischen Sauerstoffverbrauchs bzw. der massenspezifischen MR erfolgte, indem der jeweilige Meßwert für den Sauerstoffverbrauch bzw. die MR durch den für diesen Zeitpunkt aus der Massekurve ermittelten Massewert dividiert wurde. Als weitere Parameter wurden:

- 1.) die durchschnittliche massenspezifische MR pro 24 h für jedes Tier berechnet [W/kg]
- 2.) die Gesamtmenge des pro Tier während der künstlichen Aufzucht verbrauchten Sauerstoffes [ $\dot{V}_{O_2}$ , l] bestimmt und
- 3.) daraus der gesamte aerobe Energieumsatz [kJ].

Die Berechnung des Gesamtkörperenergiegehaltes aus der Fettmasse und der ffTM erfolgte mit Hilfe folgender Umrechnungsfaktoren: Körperfett = 38 kJ/g, ffTM = 20 kJ/g. Für die Bestimmung der im Verdauungstrakt (milchgefüllt) enthaltenen Energie wurde die ffTM mit 18 kJ/g angesetzt (MARKEWICZ ET AL. 1993).

Damit unsere Befunde mit denen anderer Autoren direkt verglichen werden können, wurde aus den Daten der Arbeiten von KAUL ET AL. (1990), KÖRTNER ET AL. (1994) und MARKEWICZ ET AL. (1993) der Fettgehalt in der Trockenmasse und der prozentuale Wassergehalt in der ffFM der Versuchstiere errechnet.

## 2.5 Statistik

Bei allen angewandten statistischen Prüfverfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $p = 0.05$  angenommen. Lineare Regressionen wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Die Signifikanz der Korrelation wurde durch die Prüfung des Korrelationskoeffizienten  $r$  auf Verschiedenheit von Null anhand der  $t$ -Verteilung getestet (SACHS 1978). Die errechneten Regressionsgeraden wurden nach BROWNLEE (1965) mit Hilfe eines hauseigenen Statistikprogrammes auf Parallelität getestet. War die Nullhypothese der Parallelität nicht abzulehnen ( $p > 0,05$ ), wurden die zugehörigen  $y$ -Achsenabschnitte miteinander verglichen.

Zwischen den Würfen traten große Variationen auf, die u.a. durch unterschiedliche Welpenzahl, Laktationsleistung des Muttertieres und unterschiedliche Geburtmassen bedingt waren. Das hatte zur Folge, daß sich die für die verschiedenen Meßgrößen errechneten Mittelwerte der einzelnen Würfe erheblich voneinander unterschieden. Deswegen wurden für alle Meßgrößen die Abweichungen vom jeweiligen Wurfmittelwert errechnet und für den Vergleich zwischen +/fa- und fa/fa-Tieren verwendet. Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte und Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM) angegeben.

Bei der Analyse der Gesamtkörperzusammensetzung normal aufgezogener Tiere wurde die statistische Signifikanz von Unterschieden mit Hilfe einer 3-faktoriellen Varianzanalyse unter Berücksichtigung von Genotyp, Geschlecht und Altersstufen ermittelt, gefolgt von einem multiplen Abschlußtest (DUNCAN-Test) zum Vergleich der einzelnen Gruppenmittelwerte. Für die drei Würfe künstlich aufzogener, 16 Tage alter Tiere wurde entsprechend eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Genotyp und Geschlecht als Faktoren und Wurf als Blockfaktor durchgeführt, ebenfalls gefolgt von einem DUNCAN-Test. Da die Varianz nicht homogen war, wurde die Varianzanalyse jeweils mit Rangwerten durchgeführt. Diese Auswertungen erfolgten mit Hilfe des PC-Programmes SPSSWin 5.03 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Für die Messungen aller anderen, nur bei einer Altersstufe untersuchten, Parameter war der Datenpool zu klein, um eine aussagekräftige statistische Analyse der Geschlechtseinflüsse durchzuführen. Aus diesem

Grunde - und weil eine Betrachtung der Daten keinen Hinweis für eine Reduktion der Variabilität bei der getrennten Betrachtung der einzelnen Geschlechter ergab - wurden die Signifikanzen der genotypbedingten Unterschiede bei normalverteilten Meßwerten in der Abweichung vom Wurfmittelwert durch t-Test, bei nicht normalverteilten Meßwerten mittels MANN-WHITNEY-Test (U-Test) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes SigmaStat (Jandel Corporation, Erkrath, FRG).

Die in dieser Studie verwandte Rattenkolonie wurde mit Hilfe des Zeichentestes (Z-test) auf symmetrische Verteilung der Geschlechter und Genotypen überprüft (Sigma Stat).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Geschlechter- und Genotypverteilung in Hybridwürfen

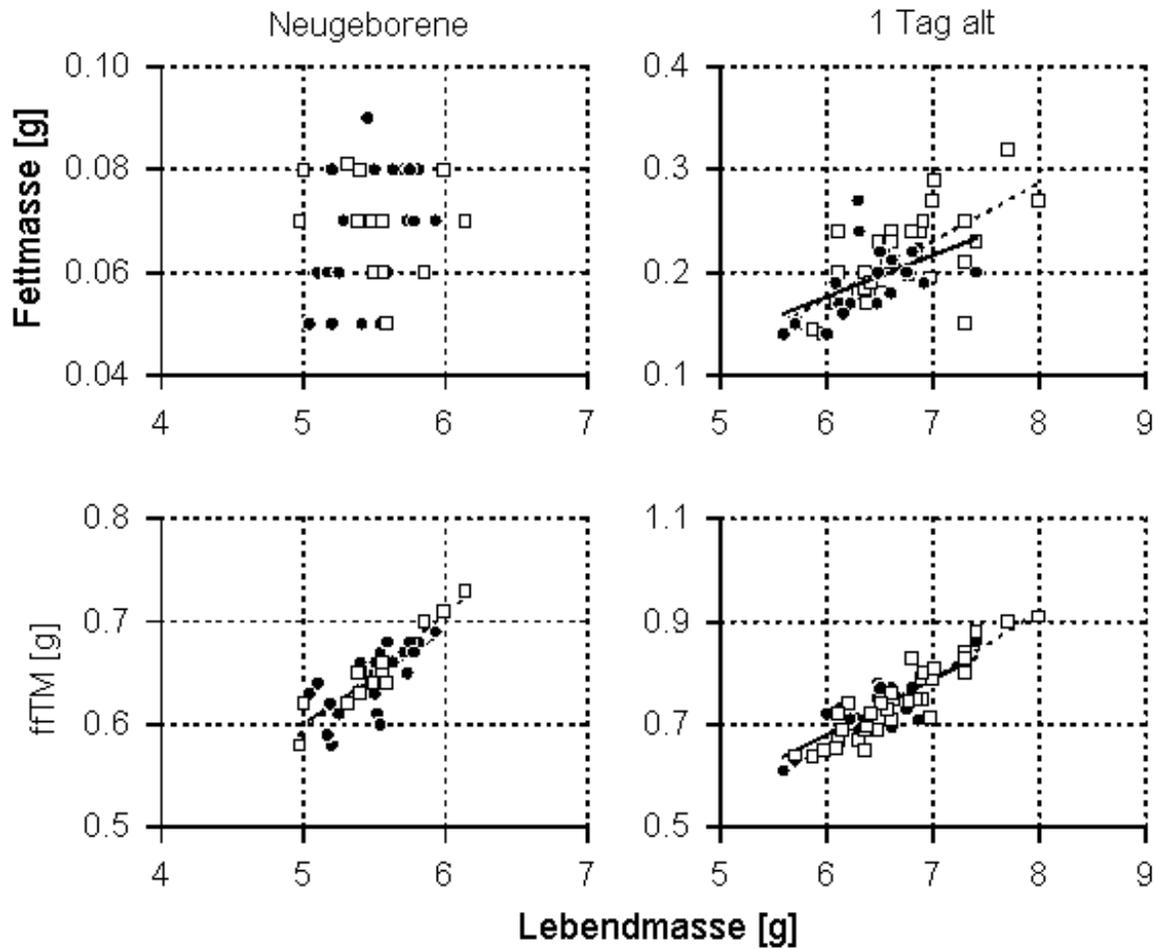
Bei 378 Nachkommen aus 43 fa/fa & +/-fa-13MBN Kreuzungen, die im Zeitraum vom November 1993 bis April 1995 in der Rattenkolonie des W.G. Kerckhoff-Institutes geboren wurden, entsprach die Anzahl männlicher und weiblicher Tiere der erwarteten 1: 1-Verteilung, dagegen zeigten die Genotypen eine Abweichung von der erwarteten Verteilung (Tab. 3). Unter den 190 Weibchen waren die fa/fa-Tiere mit 112 überrepräsentiert. Dadurch waren auch die fa/fa-Tiere mit 209 von 378 Tieren stärker vertreten als die +/-fa-Tiere.

Tab. 3: Ergebnisse des Zeichentestes zur Prüfung der Signifikanz der Abweichungen von der erwarteten 1: 1-Verteilung der Geschlechter bzw. Genotypen. ns = nicht signifikant

		männlich	weiblich	
	378	188	190	ns
fa/fa	209	97	112	ns
+/-fa	169	91	78	ns
	p 0,05	ns	p 0,05	

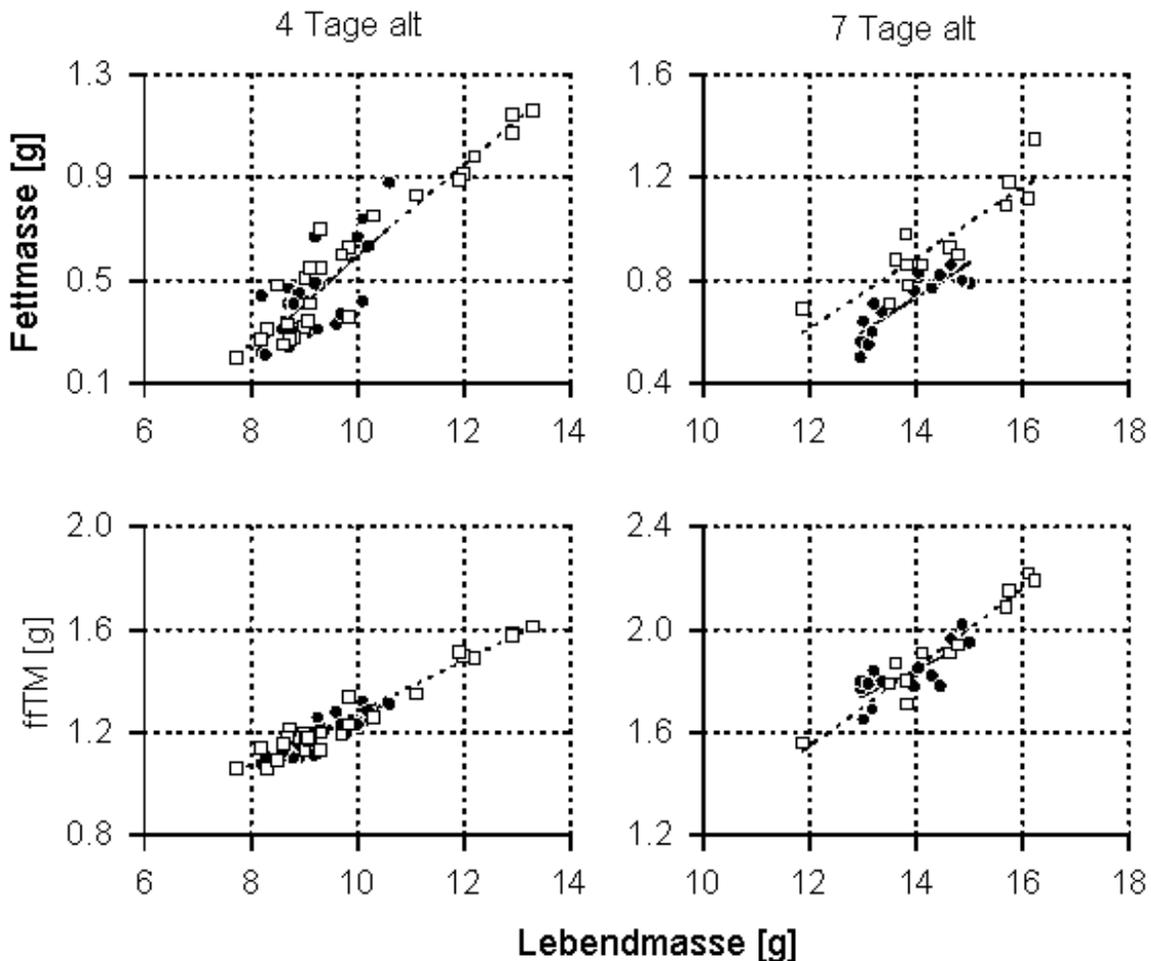
#### 3.2 Befunde von normal aufgezogenen Tieren

##### 3.2.1 Postnatale Entwicklung von genotypspezifischen Unterschieden in der Körperzusammensetzung



Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Gesamtkörperfett der Welpen beider Genotypen mit 50-90 mg sehr gering und weist keine stabile Korrelation mit der Lebendmasse auf. Bereits nach 24 Stunden hat sich die Fettmasse mehr als verdoppelt und korreliert mit der Lebendmasse (Abb. 9, Tab. 4).

Abb. 9: Korrelation zwischen Fettmasse bzw. fettfreier Trockenmasse (ffTM) und Lebendmasse von neugeborenen und 1 Tag alten +/fa- (•, -) und fa/fa- (---) Tieren.



Die Fettmasse nimmt im Laufe der ersten Lebenswoche weiterhin rasch zu, und ist bei 7 Tage alten fa/fa-Tieren erstmals signifikant gegenüber der Fettmasse der +/fa-Tiere erhöht ( $p < 0,001$  für den Unterschied zwischen parallelen Regressionsgeraden, Abb. 10, Tab. 4). Die ffTM der Hybridwelpen korreliert bereits von Geburt an mit der Lebendmasse, aber die Regressionsgeraden von fa/fa- und +/fa-Tieren unterscheidet sich bis zum Ende der ersten Lebenswoche noch nicht.

*Abb. 10: Korrelation zwischen Fettmasse bzw. fettfreier Trockenmasse (ffTM) und Lebendmasse von 4 und 7 Tage alten +/fa- (•, —) und fa/fa- (□, ---)Tieren.*

Bei 16 Tage alten Tieren ist der Unterschied in der Fettspeicherung zwischen fa/fa- und +/fa-Tieren bereits groß genug, um eine verlässliche phänotypische Unterscheidung beider Genotypen anhand des Gesamtkörperfettgehaltes durchführen zu können (BELL UND STERN 1977, KAUL ET AL. 1990, MARKEWICZ ET AL. 1993). In dieser Altersstufe kann deshalb die Körperzusammensetzung der Hybridwelpen mit der von Zucker-Ratten-Jungtieren verglichen werden. Der Zusammenhang zwischen Lebend- und Fettmasse läßt sich sowohl für fa/fa- wie +/fa-Welpen aus der Hybridzucht wie für solche aus der derzeit vorhandenen Tierkolonie und solche aus der Zucker-Ratten-Kolonie von 1987 (KAUL ET AL. 1990) mit guter Näherung durch die gleichen Regressionsgeraden beschreiben (Abb. 11, Tab. 4). Das ist von besonderem Interesse im Hinblick auf die Diskussion, ob durch die Einkreuzung der Brown-Norway-Ratten die typische fa/fa-Adipositas bei Hybridtieren einen anderen Entwicklungsverlauf

zeigen könnte (vgl. S. 10). Im Alter von 16 Tagen ergeben sich demnach keine Hinweise auf eine unterschiedliche phänotypspezifische Ausprägung zwischen fa/fa-13MBN-Hybridratten und den fa/fa-13M-Ratten. Die Beziehung zwischen Fett- und Lebendmasse ist bei den fa/fa-Tieren im Vergleich zu +/-fa-Tieren

*Tab. 4: Korrelationskoeffizienten (r) für die signifikanten Korrelationen von Fettmasse bzw. fettfreier Trockenmasse (ffTM) mit der Lebendmasse.*

Alter [d]	Genotyp	Fettmasse r	ffTM r
0	+/fa	---	0,72
	fa/fa	---	0,95
1	+/fa	0,51	0,82
	fa/fa	0,69	0,92
4	+/fa	0,72	0,84
	fa/fa	0,95	0,97
7	+/fa	0,87	0,76
	fa/fa	0,89	0,97
16	+/fa	0,95	0,96
	fa/fa	0,89	0,95

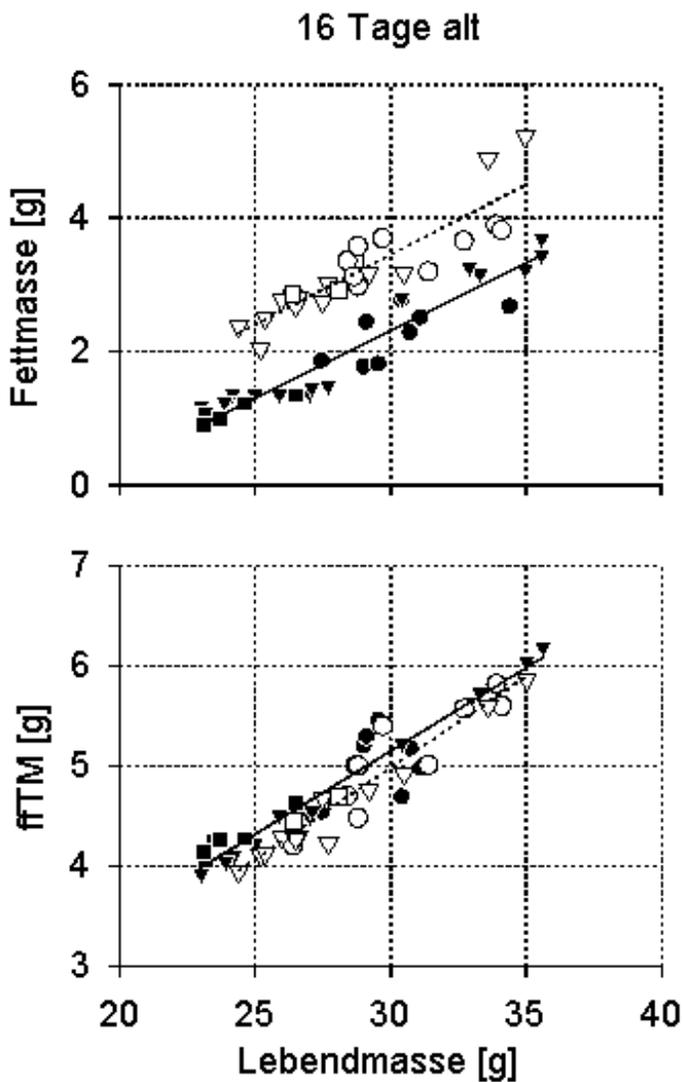


Abb. 11: Korrelation zwischen Fettmasse bzw. fettfreier Trockenmasse (ffTM) und Lebendmasse von 16 Tage alten +/fa- (gefüllte Symbole, durchgezogene Linien) und fa/fa- (offene Symbole, gestrichelte Linien) Zuckerratten und Hybridtieren. : Zuckerratten von 1987; : Zuckerratten von 1994; : Hybridtiere.

deutlich zu höheren Werten parallelverschoben ( $p < 0,001$ ), wogegen die Beziehung zwischen der ffTM und der Lebendmasse der fa/fa-Tiere im Gegensatz dazu geringfügig, aber auch signifikant ( $p < 0,01$ ) zu niedrigeren Werten parallelverschoben ist.

Unterschiede in der Körperzusammensetzung von fa/fa- und +/fa-Tieren sind in der Abb. 12 als Abweichung vom Wurfmittelwert dargestellt. Da Geschlechtsunterschiede in der Körperzusammensetzung bereits früh in der Entwicklung auftreten (TRUETT ET AL. 1995) und die Verteilung von männlichen und weiblichen Tieren auf die beiden Genotypen variiert, werden die Daten beider Geschlechter getrennt aufgeführt.

*Abb. 12: Vergleich der Körperzusammensetzung weiblicher und männlicher +/fa- (-) und fa/fa- (---) Tiere. Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert mit dem Standardfehler (SEM, nur in einer Richtung dargestellt). fTMM = fettfreie Trockenmasse.*

Die Werte für die Feuchtmasse 1 bis 16 Tage alter männlicher fa/fa-Tiere weichen mit dem Lebensalter zunehmend von der Feuchtmasse der +/fa-Tiere nach oben ab. Gleiches gilt für die weiblichen fa/fa-Tiere in Bezug auf ihre +/fa-Wurfgeschwister. Die weiblichen fa/fa- bzw. +/fa-Tiere zeigen in jeder Altersstufe eine geringere Feuchtmasse als die männlichen Wurfgeschwister des gleichen Genotyps (multifaktorielle Varianzanalyse, signifikanter Einfluß von Genotyp und Geschlecht und Interaktion zwischen Genotyp und Alter, Tab. 5). Der Vergleich von Abb. 12 und Abb. 13 zeigt, daß sich die Veränderungen von Feucht- und Lebendmasse weitgehend entsprechen.

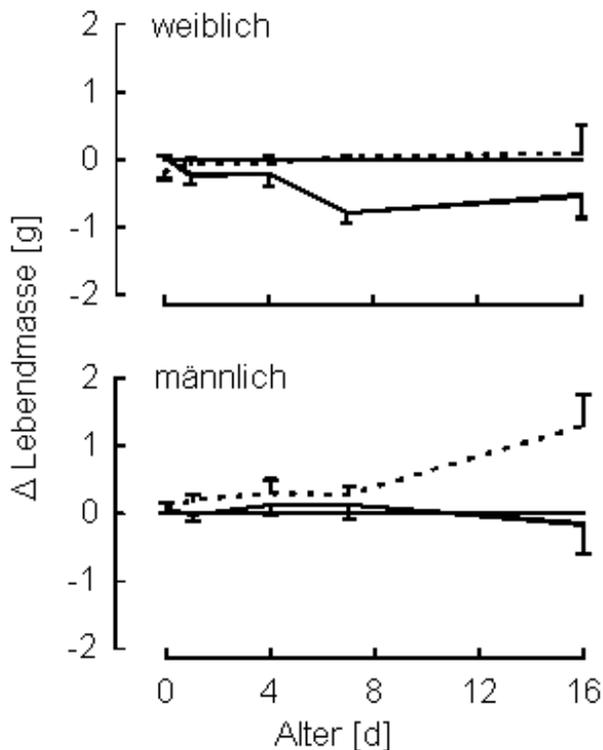


Abb. 13: Vergleich der Lebendmasse weiblicher und männlicher +/fa- (-) und fa/fa- (---) Tiere. Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert mit dem Standardfehler (SEM, nur in einer Richtung dargestellt).

Tab. 5: Durch Varianzanalyse ermittelter Einfluß von Alter, Genotyp und Geschlecht auf die Feuchtmasse, Fettmasse, fettfreie Trockenmasse (ffTM) und Wassermasse. Untersucht wurde die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert für die Absolutwerte und die prozentualen, auf die Feuchtmasse bezogenen Werte. f (fatty) = fa/fa-Tiere, l (lean) = +/fa-Tiere, w = weibliche Tiere, m = männliche Tiere.

	Absolutwerte				prozentuale Werte		
abhängige Variable	Feuchtmasse	Fettmasse	ffTM	Wassermasse	Fettmasse	ffTM	Wassermasse
Alter (A)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Genotyp (G)	p<0,001 f > l	p<0,001 f > l	p<0,05 f > l	ns	p<0,001 f > l	p<0,001 l > f	p<0,001 l > f
Geschlecht (S)	p<0,001 m > w	ns	p<0,001 m > w	p<0,001 m > w	ns	ns	ns
A und G	p<0,05	p<0,001	ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001
A und S	ns	p<0,05	ns	ns	ns	ns	ns
G und S	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Der Unterschied in der Feuchtmasse zwischen beiden Genotypen ist hauptsächlich durch die Zunahme der Fettmasse der fa/fa-Welpen im Vergleich zu den +/-fa-Wurfgeschwistern bedingt (signifikanter Einfluß des Genotyps und Interaktion zwischen Genotyp und Alter, Tab. 5). Wie Abb. 12 zeigt, beginnt die exzessive Fettdeposition bei fa/fa-Welpen beider Geschlechter zum gleichen Zeitpunkt: Genotypspezifische Unterschiede in der Fettmasse treten bereits bei 4 Tage alten Tieren auf und werden bei 7 Tage alten Tieren signifikant (Tab. 6).

Quantitative Unterschiede in der Feuchtmasse, die sich nicht durch Unterschiede in der Fettmasse und ffTM erklären lassen (Abb. 12), ergeben sich aus Unterschieden in der Wassermasse (Abb. 14). Die statistische Analyse der Wassermasse ergibt keinen genotypspezifischen, wohl aber einen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied (Tab. 5). Wegen der kleineren Feuchtmasse der weiblichen Tiere tritt jedoch kein geschlechtsspezifischer Unterschied mehr auf, wenn man den prozentualen Wasseranteil an der Feuchtmasse zwischen den Geschlechtern vergleicht. Im prozentualen Wasseranteil der Feuchtmasse sind dagegen genotypspezifische Unterschiede vorhanden: Aufgrund ihrer größeren Fettmasse ist der prozentuale Wasseranteil der fa/fa-Ratten kleiner als der ihrer +/-fa-Wurfgeschwister (signifikanter Einfluß des Genotyps und Interaktion zwischen Genotyp und Alter, Tab. 5).

Die ffTM von fa/fa-Welpen ist von der Geburt bis zum Alter von 16 Tagen nur geringfügig, aber signifikant höher als die der +/-fa-Welpen (Tab. 5, Abb. 12). Die wesentlich größere Fettmasse der fa/fa-Tiere ist die Ursache dafür, daß der prozentuale Anteil der ffTM an der Feuchtmasse bei fa/fa-Tieren signifikant niedriger ist als bei ihren +/-fa-Wurfgeschwistern (Tab. 5). Wie Tab. 5 außerdem zeigt, ist die ffTM weiblicher Tiere kleiner als die männlicher Tiere. Drückt man die ffTM als prozentualen Anteil an der Feuchtmasse aus, ist dieser geschlechtsspezifische Unterschied auf Grund der geringeren Feuchtmasse der weiblichen Tiere nicht mehr nachzuweisen.

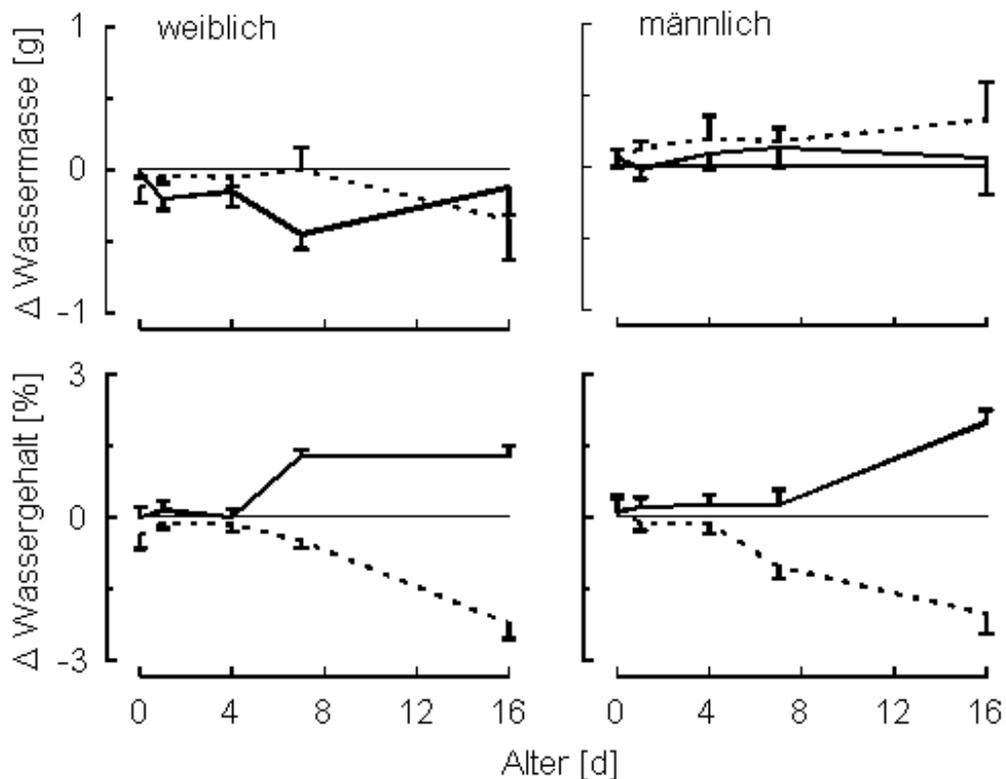


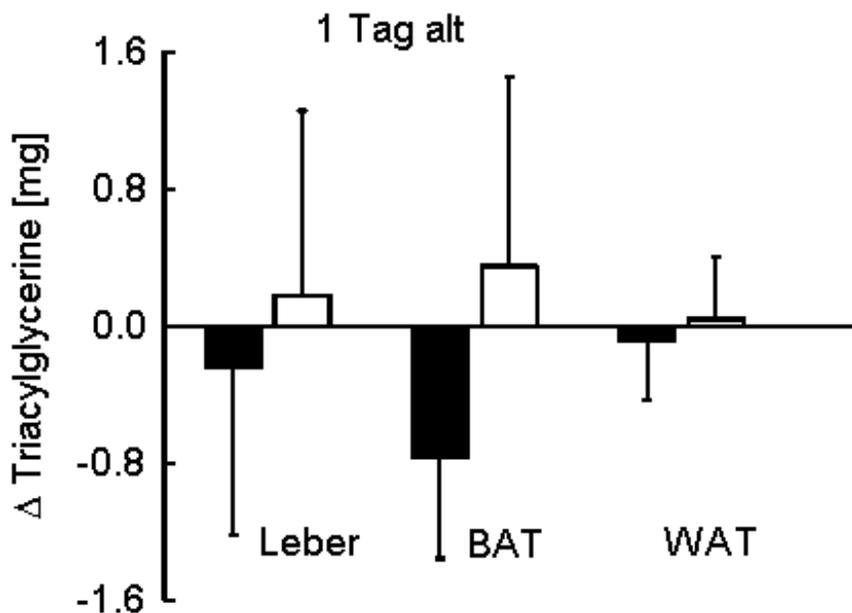
Abb. 14: Vergleich der Wassermasse und des prozentualen Wassergehaltes der Feuchtmasse von weiblichen und männlichen +/fa- (-) und fa/fa- (---) Tieren. Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert mit dem Standardfehler (SEM).

Tab. 6: Genotypspezifische Effekte, bestimmt mit Hilfe des Duncan's multiple range Testes. Weitere Erklärungen s. Tab. 5.

Alter	Ge- schlecht	Absolutwerte				prozentuale Werte		
		Feucht-masse	Fett-masse	ffTM	Wasser-masse	Fett-masse	ffTM	Wasser-masse
0	männl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	weibl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1	männl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	weibl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4	männl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	weibl.	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7	männl.	ns	p<0,05	ns	ns	p<0,05	ns	p<0,05
	weibl.	p<0,05	p<0,05	p<0,05	ns	p<0,05	ns	p<0,05
16	männl.	p<0,05	p<0,05	ns	ns	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	weibl.	ns	p<0,05	ns	ns	p<0,05	p<0,05	p<0,05

## 3.2.2 Perinatale Energiespeicher

### 3.2.2.1 Triacylglycerinegehalt



Das inguinale Fettdepot wiegt bei den 1 Tage alten Tieren im Mittel 58 mg (SEM = 8), das BAT 67 mg (SEM = 7) und die Leber wiegt 273 mg (SEM = 20, N jeweils = 4 Würfe). Obwohl der Triacylglycerinegehalt in jedem der drei Organe bei den fa/fa-Welpen geringfügig höher liegt als bei den +/fa-Welpen (Abb. 15), ist die Variabilität - auch innerhalb eines Wurfes und eines Geschlechtes - so groß, daß keine genotypspezifischen Unterschiede nachzuweisen sind ( $p = 0,70$ ). Die Plasmatriacylglycerinwerte der Tiere aus 6 Würfen liegen zwischen 0,8 und 3 g/l. Bei starker Streuung der Werte unterscheiden sich die geringfügig niedrigen Werte der genetisch fettsüchtigen Tiere nicht signifikant von denen der +/fa-Tiere ( $p = 0,3$ ).

*Abb. 15: Vergleich der Gesamtmenge der Triacylglycerine der Leber, des interscapulären braunen Fettgewebes (BAT) und des inguinalen weißen Fettgewebes (WAT) von 1 Tag alten +/fa- (○) und fa/fa- (●) Tieren. Gezeigt ist die Abweichung (Δ) vom Wurfmittelwert.*

### 3.2.2.2 Leberglykogen

Die Lebermasse der Feten ist mit 362 mg (SEM = 11, N = 5 Würfe) signifikant höher als die der neugeborenen Tiere mit 326 mg (SEM = 13, N = 5 Würfe), wobei weder bei den Feten noch bei den neugeborenen Tieren genotypspezifische Unterschiede zu erkennen sind. Der prozentuale Leberglykogengehalt der Feten und Neugeborenen unterscheidet sich nicht und liegt, ebenfalls ohne genotypspezifische Unterschiede, zwischen 7 % und 11 %. Die Abweichung des Gesamtleberglykogens vom Wurfmittelwert (Abb. 16) zeigt keine Unterschiede zwischen fa/fa- und +/fa-Genotypen. Bei der Betrachtung der Einzelwerte (Abb. 17) wird deutlich, daß die starke Variabilität nicht durch Unterschiede zwischen den einzelnen Würfen bedingt ist, sondern auch innerhalb der Würfe auftritt.

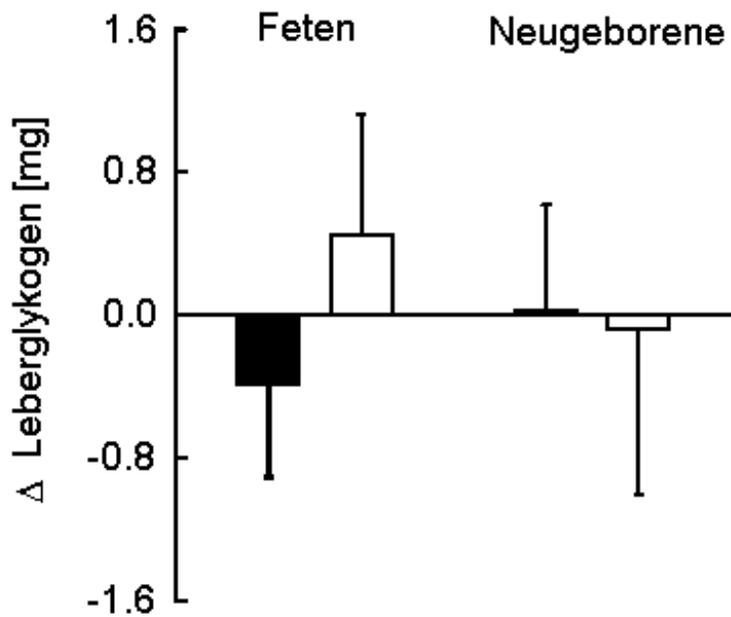
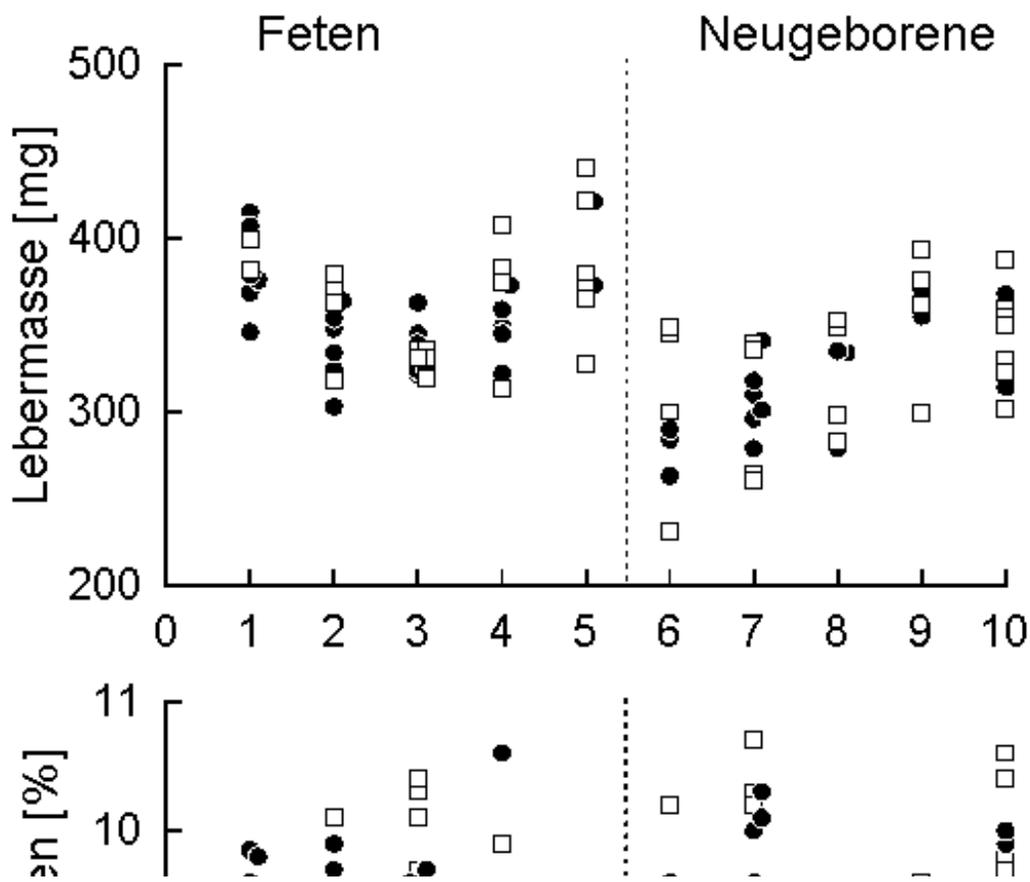


Abb. 16: Vergleich der Gesamtmenge des Leberglykogens von Feten und Neugeborenen +/fa- (□) und fa/fa- (●) Tiere. Gezeigt ist die Abweichung (Δ) vom Wurfmittelwert.



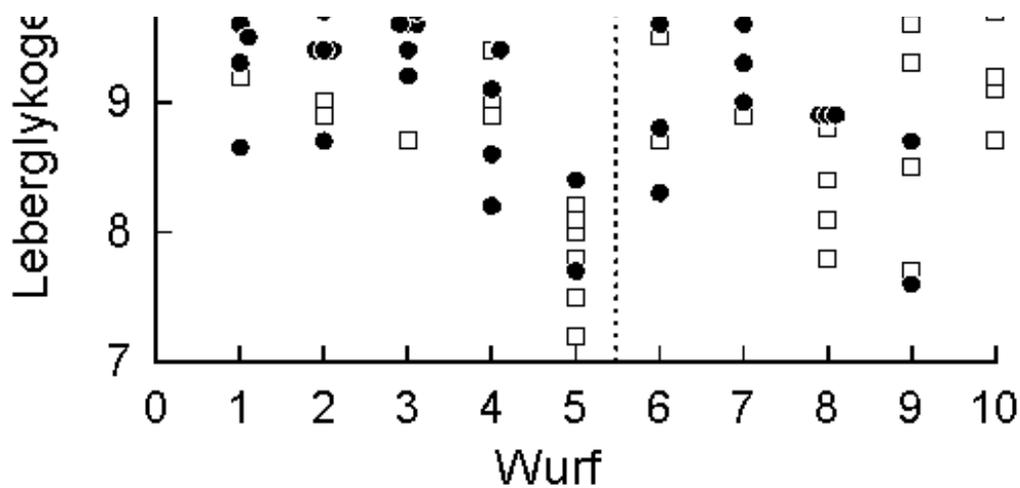


Abb. 17: Lebermasse und prozentualer Glykogengehalt der Leber von +/fa- (●) und fa/fa- (□) Feten am Tag 21 der Gestation und von neugeborenen Tieren innerhalb 10 min nach natürlicher Geburt.

### 3.2.3 Plasmainsulin

Bei der Aktivierung der Glykogensynthetase in der späten fetalen Entwicklungsphase ist Insulin von großer Bedeutung (MARGOLIS 1983, MAYOR UND CUEZVA 1985, MENUELLE UND PLAS 1991). Da in unseren Untersuchungen genotypspezifische Unterschiede in der perinatalen Glykogenspeicherung nicht auftraten, wurde der von anderen Autoren postulierte genotypspezifische Unterschied in den Plasmainsulinspiegeln von Feten am Tag 21 der Gestation überprüft. Wir fanden, daß der fetale Plasmainsulinspiegel der Hybridtiere ebenso hoch und variabel ist wie der, der für Zucker- und Albinoratten angegeben wird (MAYOR UND CUEZVA 1985, TURKENKOPF ET AL. 1982). Die Plasmainsulinwerte streuen jedoch ohne Genotyp-Korrelation zwischen 100-400  $\mu\text{U/ml}$ , der Mittelwert liegt bei 190  $\mu\text{U/ml}$  (SEM = 13, N = 8 Würfe). Etwa einen halben Tag später, weniger als 10 min nach natürlicher Geburt, liegen die Plasmainsulinspiegel mit 88  $\mu\text{U/ml}$  (SEM = 4, N = 5 Würfe) um ca. 50 % niedriger als die der Feten am Tag 21 der Gestation (Abb. 18). In Abb. 19 ist die Abweichung der Plasmainsulinspiegel vom Wurfmittelwert dargestellt. Auch hier zeigt sich sowohl für Feten als auch für Neugeborene kein Einfluß des Genotyps.

Um zu prüfen, ob die zur Tötung des Muttertieres verwandte Methode einen Einfluß auf den Insulinspiegel der Feten haben könnte, wurden zwei Muttertiere anstatt durch Dekapitation nach  $\text{CO}_2$ -Narkose durch intrathorakale T61-Injektion getötet. Wie Abb. 18 zeigt, ist weder ein Unterschied des fetalen Insulingehalts zwischen diesen beiden Würfen (#7 und 8) und den anderen nachzuweisen, noch ergeben sich in diesen Würfen genotypspezifische Unterschiede. Zur weiteren Kontrolle wurde der Plasmainsulinspiegel von Feten aus zwei weiteren Würfen (#9 und 10) bestimmt, die aus Kreuzungen von männlichen +/+ Zucker-Ratten und weiblichen +/fa-13MBN Hybridtieren stammten, also keine fa/fa-Tiere enthalten konnten. Auch die Werte von diesen Feten (+/+ und +/fa) streuen im gleichen Bereich, wie die von Feten der Würfe, die fa/fa-Tieren enthalten.

Abb. 18: Plasmainsulinspiegel von +/fa- (●) und fa/fa- (□) Feten am Tag 21 der Gestation und neugeborenen Tieren. Die Würfe #9 und 10 (□) stammen aus Kreuzungen von +/+-Männchen mit +/fa-Weibchen.

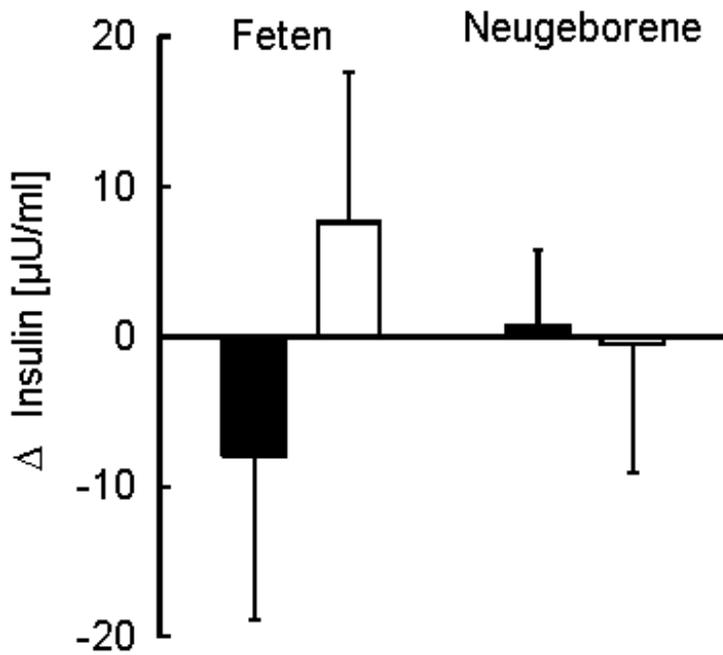
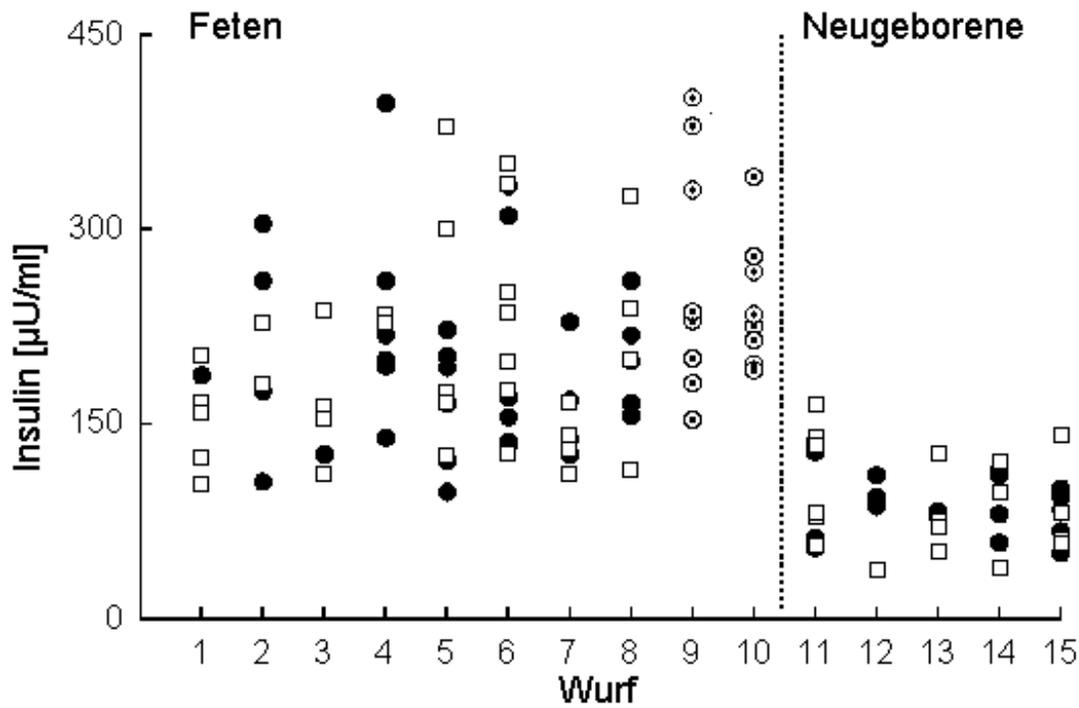


Abb. 19: Vergleich des Plasmainsulinspiegels von  $+/fa-$  (●) und  $fa/fa-$  (○) Fetes am Tag 21 der Gestation und von neugeborenen Tieren innerhalb von 10 min nach natürlicher Geburt. Gezeigt ist die Abweichung (□) vom Wurfmittelwert.

### 3.3 Ergebnisse von künstlich aufgezogenen und mit Noradrenalin behandelten Tieren

#### 3.3.1 Wachstum

Die Lebendmasse der im Alter von 4 bis 16 Tagen künstlich aufgezogen und mit Noradrenalin behandelten Tiere steigt von etwa 10 auf 20 g an (Abb. 20). Dabei ist Zunahme in den ersten Versuchstagen etwas geringer als gegen Versuchsende. Die Tiere erreichen damit nicht die gleiche Körpermasse wie normal aufgezogene 16 Tage alte Tiere (Abb. 11). Die Lebendmasse der Tiere aus Wurf A liegt während der gesamten Versuchsdauer über der der Tiere aus Wurf B und C (Abb. 20).

Die genotypspezifischen Unterschiede im Wachstum sind in Abb. 21 dargestellt. Zu Versuchsbeginn haben die fa/fa-Tiere eine geringfügige, aber nicht signifikant höhere Körpermasse als die +/-fa-Tiere ( $p = 0,3$ ; dreifaktorielle Varianzanalyse mit Genotyp und Geschlecht als Faktoren und Wurf als Blockfaktor). Dieser Unterschied bleibt bis zum Alter von 12 Tagen erhalten (Abb. 21). In den letzten Versuchstagen nehmen die fa/fa-Tiere jedoch deutlich langsamer zu als die +/-fa-Geschwister, so daß die Werte für die Lebendmasse der fa/fa-Tiere unter dem Wurfmittelwert liegen und die der +/-fa-Tiere darüber. Am Versuchsende im Alter von 16 Tagen sind die fa/fa-Tiere um mehr als 1 g leichter als ihre +/-fa-Wurfgeschwister. Diese Entwicklung weicht deutlich von der natürlich aufgezogener, unbehandelter Tiere ab, bei denen fa/fa-Tiere im Alter von 16 Tagen schwerer als ihre +/-fa-Wurfgeschwister sind (Abb. 13).

#### 3.3.2 Sauerstoffverbrauch

Der Gesamtsauerstoffverbrauch der fa/fa-Tiere erreicht während der künstlichen Aufzucht unter Noradrenalinbehandlung - ähnlich wie in den Versuchen von KÖRTNER ET AL. (1994) - gleich hohe Werte wie der Gesamtsauerstoff-

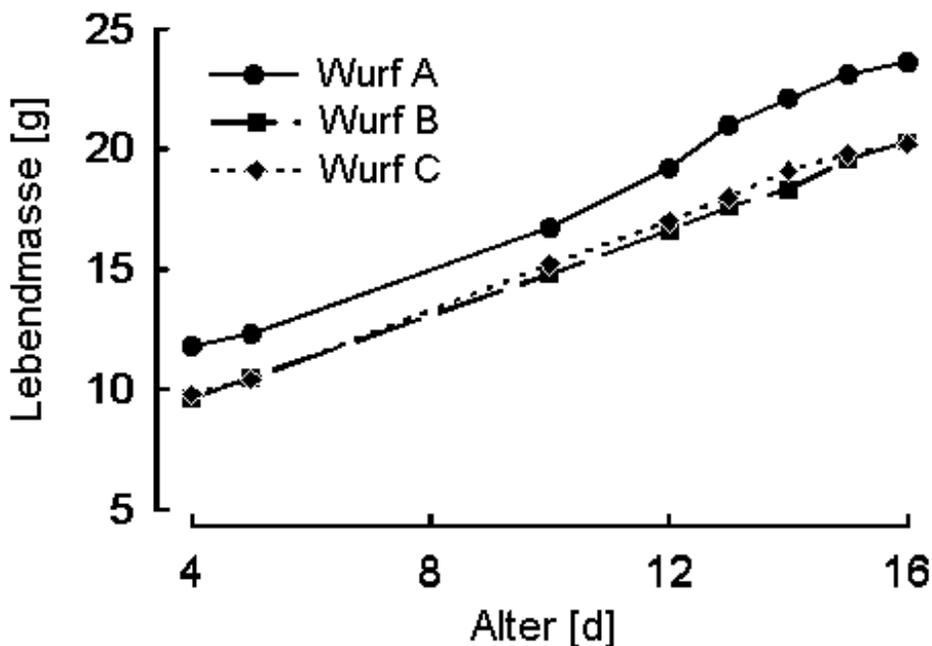


Abb. 20: Durchschnittliche Lebendmasse der künstlich aufgezogenen noradrenalinbehandelten Tiere aus den Würfen A-C.

verbrauch der gleich behandelten +/fa-Wurfgeschwister (Tab. 7). Allerdings treten Unterschiede zwischen den Würfen auf. Der Gesamtsauerstoffverbrauch der Tiere in Wurf A liegt über dem der Tiere in den Würfen B und C (Tab. 7). Dagegen ist der massenspezifische Sauerstoffverbrauch und damit auch die massenspezifische MR der Würfe A-C ähnlich (Abb. 22 oben), da die Tiere in Wurf A eine höhere Lebendmasse haben (Abb. 20). Betrachtet man aber beide Genotypen getrennt, weisen die fa/fa-Tiere auf Grund der geringeren Zunahme der Lebendmasse (Abb. 21) am Versuchsende eine höhere massenspezifische MR auf als ihre +/fa-Wurfgeschwister (Abb. 22 unten).

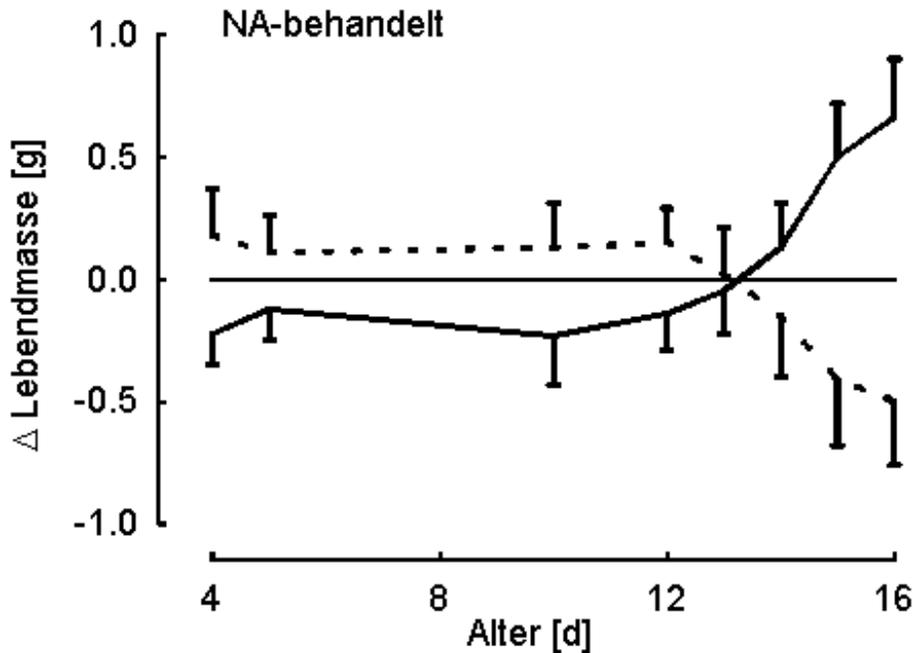


Abb. 21: Vergleich der Lebendmasse der noradrenalinbehandelten +/fa- (-) und fa/fa- (---) Tiere. Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert mit dem Standardfehler (SEM; nur in einer Richtung dargestellt).

### 3.3.3 Körperzusammensetzung

Im Alter von 16 Tagen ist die Feuchtmasse der fa/fa-Tiere signifikant niedriger als die der +/fa-Wurfgeschwister (Tab. 8). Neben dem genotypspezifischen Unterschied ist auch eine signifikant höhere Feuchtmasse bei männlichen Tieren nachzuweisen (Tab. 8). Im Vergleich zur Fettmasse der normal aufgezogenen 16 Tage alten Tiere (Abb. 11) ist die Fettmasse der behandelten fa/fa- und +/fa-Tiere sehr niedrig (Tab. 7). Ein genotypspezifischer Unterschied tritt nicht auf ( $p = 0,8$ ), dagegen ist die Fettmasse der weiblichen Tiere signifikant höher als die der männlichen Tiere (Tab. 8). Die Werte für die ffTM der noradrenalin-behandelten Tiere liegen geringfügig unter den Ergebnissen für die ffTM normal aufgezogener Tiere. Wenn man aber die niedrigere Lebendmasse der noradrenalinbehandelten Tiere berücksichtigt, wird deutlich, daß der Anteil der

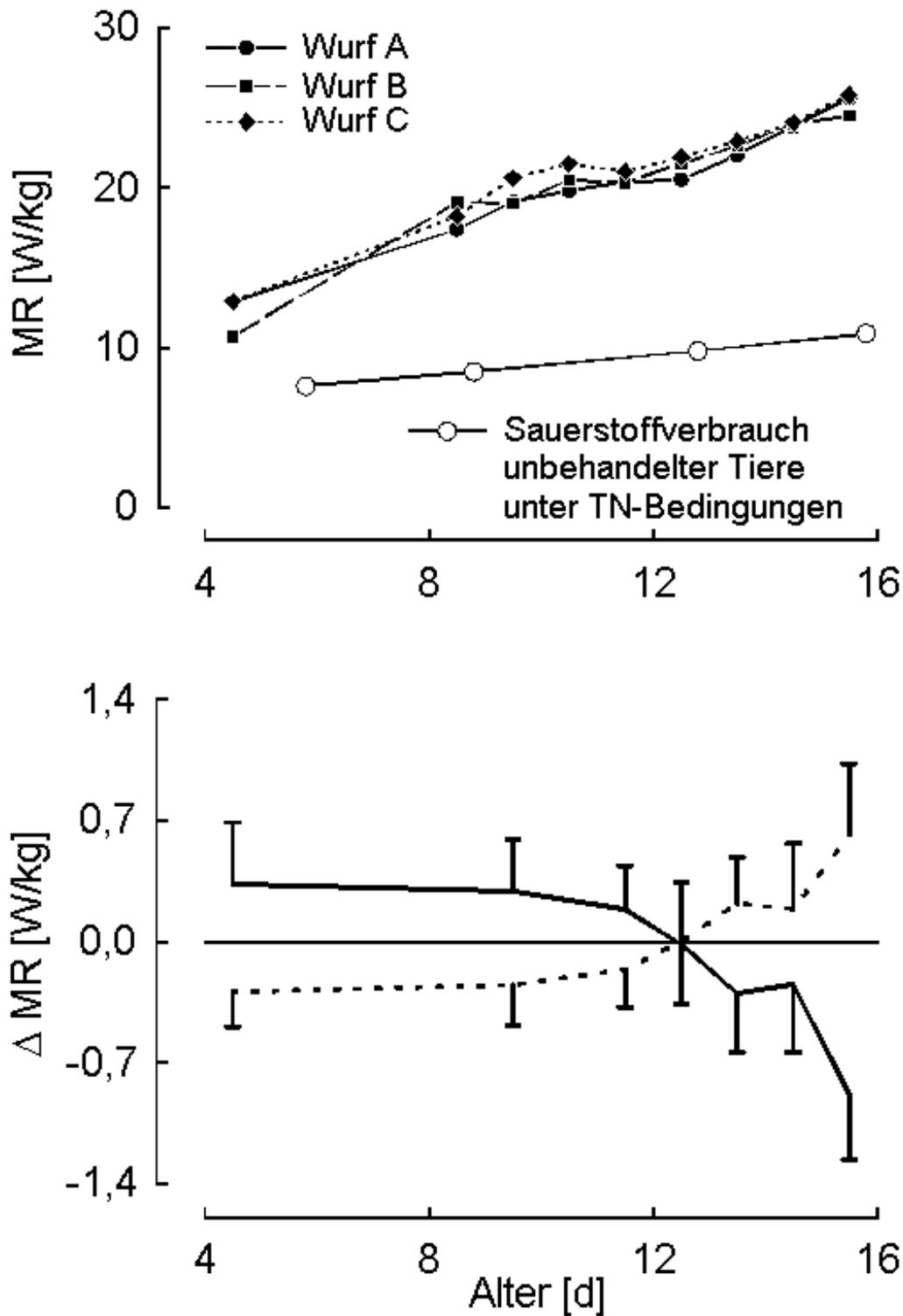


Abb. 22: Durchschnittliche massenspezifische MR der noradrenalinbehandelten Tiere aus den Würfen A-C (oben) und Abweichung ( $\Delta MR$ ) der Werte von +/fa- (—) und fa/fa- (---) Tieren vom Wurfmittelwert (unten) mit dem Standardfehler (SEM; nur in einer Richtung dargestellt). Die zum Vergleich gezeigten Thermoneutralwerte wurde aus Kaul et al. 1990 entnommen.

Tab. 7: Feuchtmasse, Fettmasse und fettfreie Trockenmasse (ffTM) künstlich aufzogener, noradrenalinbehandelter 16 Tage alter Welpen sowie deren Gesamtsauerstoffverbrauch ( $\sum \dot{V}_{O_2}$ ) während

## des Versuchszeitraums.

Wurf	Feuchtmasse		Wassermasse		Fettmasse		ffTM [g]		$\sum \dot{v}_{O_2}$ [l]	
	[g]		[g]		[g]		fa/fa +/fa		fa/fa +/fa	
A	20.2	20.9	14.8	15.4	1.3	1.6	4.1	3.9	18.8	16.9
	18.1	22.2	12.4	16.7	1.9	1.4	3.8	4.1	16.6	16.8
	19.1		14.0		1.3		3.8		17.2	
	20.2		14.6		1.6		4.0		17.1	
	21.0		15.5		1.6		3.9		17.0	
B	18.2	19.0	13.8	14.7	0.9	0.9	3.5	3.4	15.3	15.4
	17.8	17.7	13.7	13.6	0.7	0.7	3.4	3.4	15.6	
	15.2		11.2		0.9		3.1		15.7	
	16.7		12.5		0.9		3.3		15.4	
	17.0		12.7		1.0		3.3			
C	17.5	17.8	13.3	13.7	0.8	0.6	3.4	3.5	16.1	15.8
	16.5	17.6	12.3	13.3	0.9	0.8	3.3	3.5	15.8	16.6
	16.4	18.7	12.3	14.3	0.8	0.9	3.3	3.5		16.5
		17.7		13.5		0.8		3.4		15.7
		18.0		13.8		0.8		3.5		15.8
		17.0				0.6		3.3		

ffTM an der Körpermasse der behandelten Tiere höher ist als der der normal aufgezogenen Tiere (vgl. Tab. 7 und Abb. 11). Wie bei der Fettmasse zeigt sich auch bei der ffTM kein signifikanter Einfluß des Genotyps ( $p = 0,1$ ). Die ffTM der männlichen Tiere ist signifikant höher als die der weiblichen (Tab. 8). Die im Körper enthaltene Wassermasse zeigt als einziger Parameter der Körperzusammensetzung neben dem signifikanten Einfluß des Geschlechts auch einen signifikanten Einfluß des Genotyps (Tab. 8). Dabei ist die Wassermasse der +/fa-Tiere höher als die der fa/fa-Tiere und die der männlichen Tiere höher als die der weiblichen.

Tab. 8: Durch zweifaktorielle Varianzanalyse ermittelter Einfluß von Genotyp und Geschlecht auf die Feuchtmasse, die Fettmasse, die fettfreie Trockenmasse (ffTM) und die Wassermasse. Untersucht wurden die Abweichung ( $\dot{v}$ ) vom Wurfmittelwert bei 16 Tage alten Tieren. Neben den Absolutwerten wurde der prozentuale Anteil des Fettes in der Trockenmasse (Tr.) und der Anteil des Wassers in der fettfreien Feuchtmasse (ffFM) analysiert. f (fatty) = fa/fa-Tiere, l (lean) = +/fa-Tiere, w = weibliche Tiere, m = männliche Tiere.

Absolutwerte				prozentuale Werte	
Feucht- masse	Fett- masse	ffTM	Wasser- masse	Fett in Tr.	Wasser in ffFM

Genotyp (G)	p<0,05 f < 1	ns	ns	p<0,001 f < 1	ns	p<0,01 f < 1
Geschlecht (S)	p<0,05 m > w	p<0,05 m < w	p<0,05 m > w	p<0,05 m > w	p<0,05 m < w	p<0,05 m > w
G und S	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Wegen der beobachteten Unterschiede in der Wassermasse von fa/fa- und +/-fa-Tieren wurde der prozentuale Fettgehalt nicht auf die Feuchtmasse, sondern auf die Trockenmasse bezogen. Die Werte für den prozentualen Fettgehalt in der Trockenmasse der behandelten fa/fa- und +/-fa-Tiere liegen zwischen 15 % und 33 %. Im Vergleich dazu streuen die Werte für den prozentualen Fettgehalt in der Trockenmasse normal aufgezogener 16 Tage alter +/-fa-Tiere im Bereich von 18 - 37 %. Bei den behandelten Tieren treten zwar geschlechts-, aber keine genotypspezifischen ( $p = 0,3$ ) Unterschiede auf (Tab. 8). Um umgekehrt auch die Unterschiede im Wassergehalt unabhängig von den Unterschieden im Fettgehalt beobachten zu können, wurde in dieser Versuchsserie der prozentuale Wassergehalt der fettfreien Feuchtmasse ermittelt. Der auf die fettfreie Feuchtmasse bezogene Wassergehalt der noradrenalinbehandelten Tiere aus künstlicher Aufzucht liegt mit 77 - 81 % im gleichen Streuungsbereich wie der normal aufgezogener Tiere. Wie für die Wassermasse, ergibt sich für den prozentualen Wassergehalt sowohl ein signifikanter Einfluß des Geschlechtes als auch des Genotyps, wobei auch hier die +/-fa-Tiere und die männlichen Tieren die höheren Werte aufweisen (Tab. 8).

### 3.3.4 Gesamtenergieumsatz

Als Ausgangswerte für die Bestimmung des Energiezuwachses in der Körpersubstanz während der künstlichen Aufzucht wurden die Energiegehalte 4 Tage alter Tiere verwendet (s.S. 43). Abb. 23 zeigt die enge Korrelation zwischen Lebendmasse und Energiegehalt 4 Tage alter fa/fa- und +/-fa-Tiere. Da die Regressionsgeraden für beide Genotypen nicht signifikant voneinander verschieden waren, wurde eine gemeinsame Regressionsgerade berechnet.

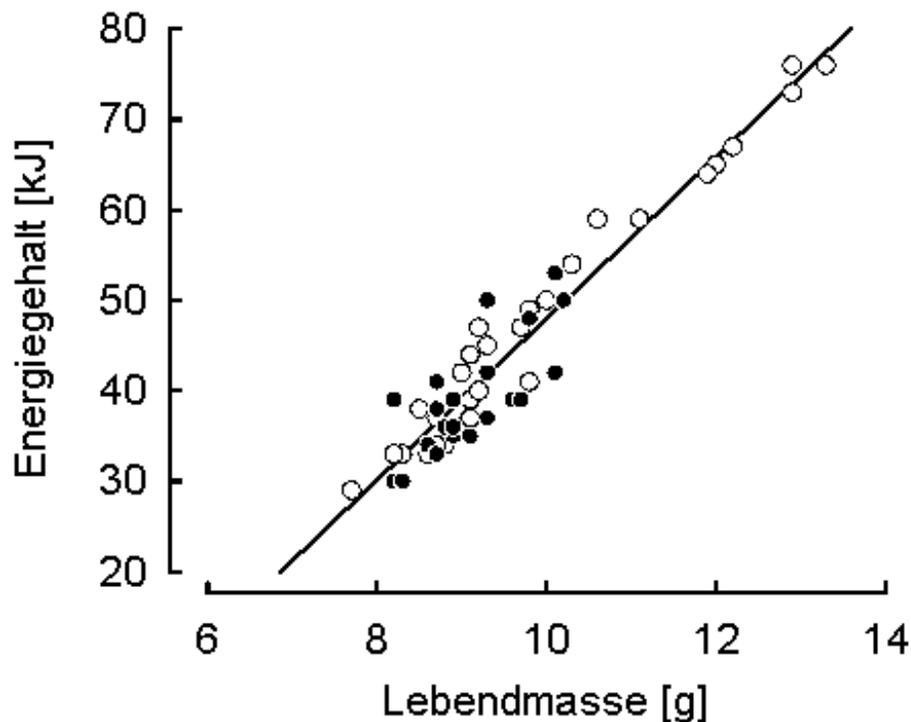


Abb. 23: Beziehung zwischen Energiegehalt und Lebendmasse von 4 Tage alten +/fa- (○) und fa/fa- (●) Tieren.

Die Ausgangsenergie der in die künstliche Aufzucht eingesetzten 4 Tage alten Tiere liegt in Wurf A zwischen 58 und 75 kJ/Tier, in Wurf B und C zwischen 37 und 57 kJ/Tier. Es lassen sich weder genotypspezifische Unterschiede ( $p = 0,3$ ) noch geschlechtsspezifische Unterschiede ( $p = 1,0$ ) erkennen. Im Verlauf des Versuches ist der Energiezuwachs der fa/fa- und +/fa-Tiere ( $p = 0,3$ ) sowie der von Weibchen und Männchen ( $p = 0,7$ ) sehr ähnlich, so daß auch die am Versuchsende insgesamt im Körper enthaltene Energie mit 135 - 150 kJ/Tier in Wurf A und 90 - 105 kJ/Tier in Wurf B und C nicht signifikant zwischen den Genotypen ( $p = 1,0$ ) und Geschlechtern ( $p = 0,2$ ) differiert. Die Absolutwerte des Körperenergiezuwachses liegen bei dem mit einer höheren Milchmenge versorgten Wurf A mit 60 - 80 kJ/Tier deutlich über denen der Würfe B und C mit 45 - 65 kJ/Tier. Der aerobe Energieumsatz der Tiere aus Wurf A liegt bei 340 - 380 kJ/Tier, der aus Wurf B und C bei 310 - 335 kJ/Tier. Daraus folgt, daß die während der künstlichen Aufzucht deponierte Energie nur ca. 13 - 20 % (Wurf A) bzw. 12 - 17 % (Wurf B und C) der insgesamt umgesetzten Energie ausmacht. Da auch der aerobe Energieumsatz keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen aufweist, ergeben sich im Gesamtenergieumsatz (Tab. 9) weder genotypspezifische ( $p = 0,2$ ) noch geschlechtsspezifische ( $p = 0,6$ ) Unterschiede. Dies zeigt, daß durch Noradrenalinbehandlung alle Unterschiede in der Energiebilanz von fa/fa- und +/fa-Tieren unterdrückt werden können.

Tab. 9: Gesamtenergieumsatz [kJ] künstlich aufzogener +/fa-Welpen und die Differenz zwischen fa/fa- und +/fa-Wurfgeschwistern. Für die Bewertung des Streuungsmaßes der Differenz vgl. Tab. 10, unerklärte Bilanzdifferenz.

Wurf	4-16 Tage	fa/fa - +/fa
A	417	+ 3
B	374	- 7

### 3.3.5 Plasmaparameter

Am Ende der künstlichen Aufzucht wurden Plasmatriacylglycerine und Plasmainsulin bestimmt. Der Plasmatriacylglycerin Gehalt variiert zwischen 0,5 und 2,5 g/l, der Plasmainsulingehalt zwischen 30 und 170  $\mu\text{U/ml}$  (Abb. 24). Genotypspezifische Unterschiede ergeben sich weder im Plasmatriacylglycerin Gehalt ( $p = 0,5$ ), noch im Plasmainsulingehalt ( $p = 0,7$ ) der noradrenalinbehandelten Tiere. Bei beiden Parametern treten auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

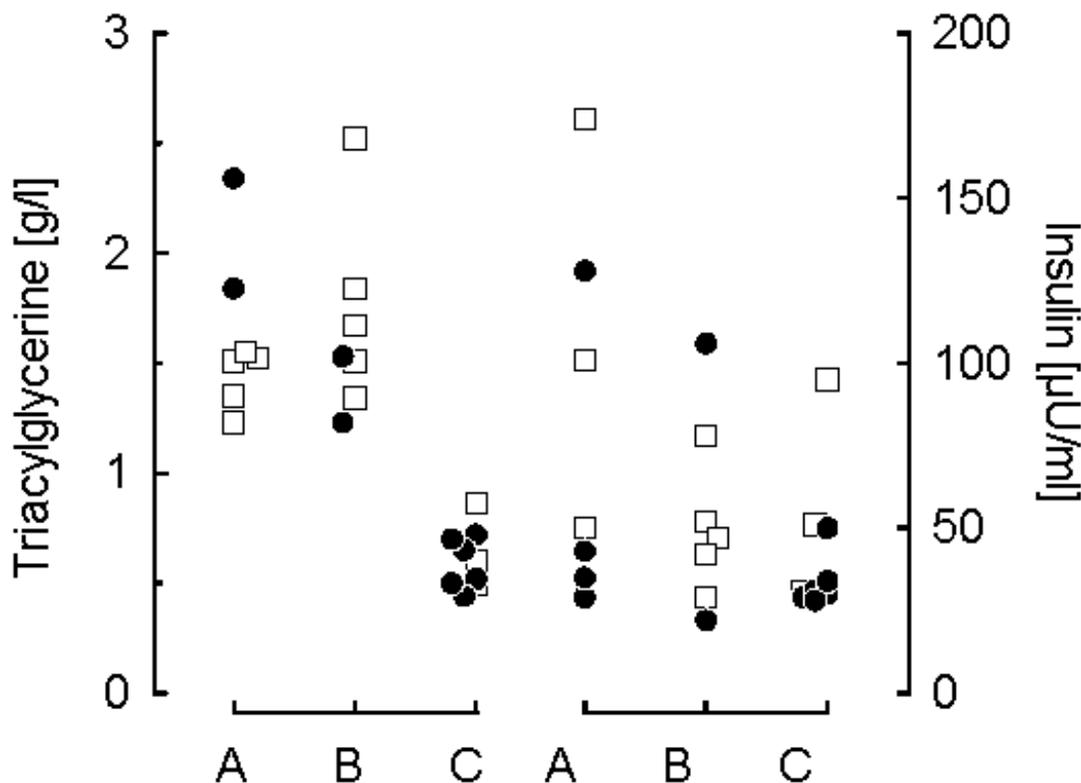


Abb. 24: Plasmatriacylglycerin- und Insulinspiegel der 16 Tage alten +/fa- (□) und fa/fa- (●) Tieren aus den Würfen A - C.

## 4 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an 13MBN-Hybridtieren beiderlei Geschlechts durchgeführt, deren Genotyp mittels PCR bestimmt wurde. Dabei ergab sich als unerwarteter Befund bei einer 1: 1 Verteilung der männlichen und weiblichen Tiere ein verminderter Anteil von +/fa-Weibchen zugunsten der fa/fa-Weibchen. Besonders in kleinen Würfen überwogen fa/fa-Tiere. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die fa/fa-Tiere intrauterin bessere Überlebenschancen haben. Allerdings beobachtete TRUETT ET AL. (1995) bei 159 Nachkommen heterozygoter Hybridtiere eine Unterrepräsentation weiblicher fa/fa-Tiere. Eine endgültige Klärung dieser Frage wäre nur mit größeren Tierzahlen möglich.

## 4.1 Zuerst auftretende Unterschiede in der Körperzusammensetzung von normal aufgezogenen fa/fa- und +/fa-Tieren

Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung ist, daß weder Unterschiede in der perinatalen Energiespeicherung noch im perinatalen Plasmainsulinspiegel Voraussetzungen für die Entwicklung einer signifikant höheren Fettmasse von 7 Tage alten fa/fa- gegenüber +/fa-Tieren sind. Zwei vorhergehende Studien, die mit geringen Tierzahlen an genetisch homogeneren Gruppen von Tieren durchgeführt worden waren, wiesen auf einen sprunghaften Beginn der übermäßigen Fettdeposition bei fa/fa-Tieren kurz nach der Geburt hin (BAZIN ET AL. 1984, JAUKER ET AL. 1994). Die vorliegende Untersuchung beweist jedoch anhand einer großen Zahl von 13MBN-Hybridtieren, die durch die Mischung von 13M und BN Allelen in ihrem Genom stärker variieren als Tiere des 13M-Stammes, daß die Fettdeposition der fa/fa-Tiere die der +/fa-Wurfgeschwister nicht notwendigerweise vor dem Ende der ersten Lebenswoche übersteigt. Daß die Untersuchung der Körperzusammensetzung kein zu ungenauer Nachweis für die zuerst auftretenden Unterschiede zwischen fa/fa- und +/fa-Tieren ist, bestätigen Messungen der Gewebstriacylglycerine in BAT, WAT und Leber bei 1 Tag alten Tieren. Der Gewebstriacylglycerin Gehalt zeigt bei 1 Tag alten Tieren die gleiche lockere Relation zum Genotyp wie das Gesamtkörperfett. Entsprechend fanden PLANCHE ET AL. (1988) in einer genetisch homogeneren Tiergruppe (unter Verwendung von WAT-Biopsieproben von später phänotypisch identifizierten Zucker-Ratten) keine genotypspezifischen Unterschiede in den Triacylglycerinwerten von 3 Tage alten Tieren. Erst bei 6 - 8 Tage alten fa/fa-Tieren konnten sie im Vergleich zu +/fa-Tieren signifikant höhere Triacylglycerinwerte im WAT nachweisen.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde - selbst unter gleich-geschlechtlichen Wurfgeschwistern - eine starke Variabilität in der perinatalen Energiespeicherung beobachtet. Als Ursache für diese Variabilität kommen der Einfluß des 13M-Erbanteils, unterschiedliche Wurfgrößen und unterschiedliche Laktationsleistungen der Muttertiere in Frage. Der ermittelte Datenpool ist jedoch für eine zuverlässige Analyse der Ursache zu klein. Wichtig ist jedoch die Feststellung, daß diese Variabilität genotypspezifische Unterschiede in der Fettmasse 16 Tage alter Tiere nicht mehr zu maskieren vermag. Nachkommen der neuen Hybridkolonie zeigen dieselbe stabile Interaktion zwischen Genotyp, Lebendmasse und Fettmasse wie Tiere aus dem derzeitigen Bestand der Zucker-Ratten-Kolonie des Kerckhoff-Institutes und der gleichen Zucker-Ratten-Kolonie von 1987 (KAUL ET AL. 1990). Die 1987 erhobenen Daten entsprachen wiederum älteren Befunden von einer anderen Zucker-Ratten-Kolonie (BELL UND STERN 1977). Unabhängig von der Variabilität des genetischen Hintergrundes und von geschlechtsspezifischen Unterschieden hat jedes gesunde, 16 Tage alte fa/fa-Tier, das bei Temperaturen unterhalb des Thermoneutralbereiches aufgezogen wird, eine höhere Fettmasse als irgendeines seiner +/fa-Wurfgeschwister (MARKEWICZ ET AL. 1993 und vorliegende Untersuchung).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß beide Genotypen innerhalb der ersten 24 Lebensstunden zu einer intensiven Fettdeposition fähig sind, ohne daß es dabei notwendigerweise zu genotypspezifischen Unterschieden kommt. Daraus kann man schließen, daß die Besonderheiten des perinatalen Hormonstatus und der perinatalen Stoffwechselsituation als Ursache für den Beginn der fa/fa-Adipositas weitgehend auszuschließen sind.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Schlußfolgerung früherer Studien, die zeigten, daß der Beginn der exzessiven Fettsucht bei fa/fa-Tieren nicht auf Kosten einer reduzierten fTM erfolgte (KAUL ET AL.

1990, KÖRTNER ET AL. 1994, MARKEWICZ ET AL. 1993). Der Vergleich mit +/-fa-Wurfgeschwistern zeigt sogar geringgradig erhöhte Werte der ffTM bei 16 Tage alten fa/fa-Tieren, jedoch in einem geringeren Ausmaß als in einer kürzlich veröffentlichten Studie vermutet wurde (TRUETT ET AL. 1995). Es ist allerdings zu beachten, daß der prozentuale Anteil der ffTM an der Körpermasse mit zunehmender Fetteinlagerung bei fa/fa-Tieren zunehmend geringer wird. Dieses Phänomen wurde mehrfach fälschlich als reduziertes Wachstum der ffTM interpretiert (BELL UND STERN 1977, GREENWOOD 1981).

## 4.2 Einfluß des Geschlechts auf die Körpermasse und die Körperzusammensetzung

Die multifaktorielle Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Effekt des Geschlechtes auf die Feuchtmasse, auf die Absolutwerte der ffTM und auf die Wassermasse, nicht jedoch auf die Fettmasse der normal aufgezogenen Tiere. Dabei liegen die Werte der männlichen über denen der weiblichen Tiere. Bezieht man Fettmasse, ffTM und Wassermasse prozentual auf die Feuchtmasse, so sind auf Grund der niedrigeren Feuchtmasse der weiblichen Tiere keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede nachzuweisen. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen fanden BELL UND STERN (1977) bei 13-31 Tage alten Tieren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Absolutwerten von Fettmasse, ffTM und Wassermasse, jedoch signifikante Unterschiede in den prozentualen Werten. Das ist auffällig, da o.a. Autoren weder signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede in der Lebend- noch in der Feuchtmasse feststellten. Neuere Studien bestätigen jedoch unsere Befunde. TRUETT ET AL. (1995) beschrieben signifikante Einflüsse des Geschlechtes auf die Lebendmasse bei 7 und 14 Tage alten 13MBN-Tieren, wobei die weiblichen Tiere im Alter von 7 Tagen im Durchschnitt 4 % leichter als die männlichen waren. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied wurde jedoch im Alter von 14 Tagen wieder geringer.

Der nicht berücksichtigte geschlechtsspezifische Unterschied in der Feuchtmasse könnte einer der Gründe sein, warum das Alter, in dem genotypspezifische Unterschiede in der Lebendmasse von fa/fa- und +/-fa-Tieren erstmals festgestellt wurden, zwischen 2 und 31 Tagen differiert (MOORE ET AL. 1985, BOULANGE ET AL. 1981, BELL UND STERN 1977).

## 4.3 Perinataler Energiespeicher

Der Leberglykogenspeicher stellt bei Ratten das quantitativ wichtigste Energiereservoir für den frühen postnatalen Zeitraum dar (FREINKEL 1980, MAYOR ET CUEZVA 1985). Durch den unmittelbar nach der Geburt einsetzenden Abfall des Plasmainsulinspiegels und Anstieg des Plasmaglukagons wird die Glykogen-Phosphorylase aktiviert (GIRARD ET AL. 1973, MAYOR UND CUEZVA 1985, MENEILLE UND PLAS 1991). Der Glykogenabbau in der Leber beginnt aber erst etwa 1 - 2 h nach der Geburt (LANGER ET AL. 1975, MARGOLIS 1983, MAYOR UND CUEZVA 1985). Daher entspricht die in der vorliegenden Untersuchung bei neugeborenen Tieren (Tötung innerhalb von 10 min nach der Geburt) ermittelte Glykogenmasse noch der der Feten am Tag 21 der Gestation, dem Zeitpunkt, zu dem die pränatale Glykogeneinlagerung abgeschlossen ist.

In der Literatur werden für den perinatalen Leberglykogengehalt Werte von ca. 7 - 9 % angegeben (CUEZVA ET AL. 1982, GIRARD ET AL. 1973, MARGOLIS 1983, MAYOR UND CUEZVA 1985). Geringe Unterschiede in den Angaben der genannten Autoren können durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden für Glykogen sowie durch die Verwendung unterschiedlicher Rattenstämme bedingt sein. Der von uns gemessene perinatale Leberglykogengehalt liegt mit 9 % im oberen Grenzbereich. Daher ist anzunehmen, daß unsere Ergebnisse nicht durch einen vorangehenden Glykogenabbau verfälscht wurden, der genotypspezifische Unterschiede hätte verdecken können.

Im BAT wurden die ersten postnatalen genotypspezifischen Unterschiede in der Fettspeicherung nachgewiesen (BAZIN ET AL. 1984). Daher scheint die Feststellung von Bedeutung, daß sich zum Zeitpunkt der Geburt keine genotypspezifischen Unterschiede im Glykogengehalt des BAT nachweisen lassen (M. ABELENDA, K. HOYER UND B. MEIERFRANKENFELD, unveröffentlichte Ergebnisse). Die bisherigen Befunde sprechen also dafür, daß der innerhalb der ersten Lebenswochen einsetzenden exzessiven Fettdeposition der fa/fa-Tiere keine Störung in der perinatalen Glykogenspeicherung vorausgeht.

## 4.4 Perinataler Plasmainsulinspiegel

In dieser Untersuchung treten keine Unterschiede in den perinatalen Plasmainsulinspiegeln von individuell genotypisierten fa/fa & +/-fa-Tieren auf. Zudem ergibt auch der Vergleich von fa/fa-Feten mit Nachkommen aus +/-+ & +/-fa-Paarungen, daß die Plasmainsulinspiegel beider Tiergruppen im gleichen Bereich liegen. Zwar fanden TURKENKOPF ET AL. (1992) bei Nachkommen aus +/-fa & fa/fa-Kreuzungen am Tag 21 der Gestation höhere Plasmainsulinspiegel als bei Nachkommen von +/-+Tieren, jedoch ist die Schlußfolgerung in Bezug auf einen genotypspezifischen Unterschied nicht gesichert, da keine Genotyp-bestimmung durchgeführt werden konnte. Entsprechend unseren Befunden wurden in einer neueren Studie ebenfalls keine Unterschiede im Plasmainsulingehalt der verschiedenen, molekularbiologisch identifizierten Genotypen am Tag 21 der Gestation gefunden (TENENBAUM ET AL. 1994). Es wurde jedoch eine erhöhte Insulinfreisetzung nach pharmakologischer Stimulation bei einigen, aber nicht allen fa/fa-Tieren festgestellt.

Die Konzentration dieses für das fetale Wachstum und die Glykogensynthese bedeutsamen Hormons (COOKE ET AL. 1986a und 1986b, MAYOR UND CUEZVA 1985), scheint also auch innerhalb eines Genotyps stark zu variieren. Berücksichtigt man auch die fehlenden genotypspezifischen Unterschiede in der perinatalen Glykogenspeicherung so gibt es bislang keinen Hinweis darauf, daß Unterschiede in der perinatalen Insulinsekretion für die Manifestation des fa-Genotyps von ursächlicher Bedeutung sind.

## 4.5 Bedeutung der Methode der künstlichen Aufzucht und methodische Probleme

Die künstliche Aufzucht stellt bei Arten wie der Ratte, die in den ersten Lebenswochen noch nicht zur selbstständigen Nahrungsaufnahme fähig sind, die einzige Möglichkeit dar, kontinuierliche Untersuchungen unter definierten metabolischen und thermischen Bedingungen durchzuführen. Dazu war die erstmals von MESSER ET AL. (1969) beschriebene und später von HALL (1975) weiterentwickelte Methode so modifiziert worden (KAUL ET AL. 1990, NUESSELEIN UND SCHMIDT 1990), daß Stoffwechselfmessungen möglich wurden. Die künstliche Aufzucht gestattet uns die Einhaltung und Kontrolle einer genau definierten Temperatur, wogegen sich im Nest aufgrund der Verhaltensinteraktionen sowohl zwischen Mutter und Jungtieren, als auch zwischen den Wurfgeschwistern die Temperaturbedingungen für jedes Einzeltier permanent ändern. Die künstliche Ernährung gewährleistet darüberhinaus eine einheitliche Milchaufnahme aller Wurfgeschwister und ermöglicht eine präzise, ununterbrochene orale Medikation.

Für die Bewertung der Plasmaparameter ist zu beachten, daß es durch die künstliche Ernährung mit der von MESSER ET AL. (1969) beschriebenen Ersatzmilch zum atypischen Ketonkörper- und Kohlenhydratstoffwechsel kommt (SONNENBERG ET AL. 1982) und daß die Masse vieler innerer Organe (Herz, Niere, Nebenniere, BAT) zur Zeit des "Absetzens" verringert ist (DIAZ ET AL. 1983,

SMART ET AL. 1983). Durch die künstliche Aufzucht entwickeln die Tiere gegenüber gleich alten normal aufgezogenen Ratten außerdem Defizite im Gehirnwachstum (DIAZ ET AL. 1983, MOORE ET AL. 1990). Wahrscheinlich sind diese Abnormitäten durch den im Vergleich zur Muttermilch geringen Protein- und hohen Kohlenhydratgehalt bedingt (MESSER ET AL. 1969, SMART ET AL. 1984). Entscheidend für die hier vorliegende Arbeit ist jedoch, daß die fa/fa-Tiere bei künstlicher Aufzucht trotz identischer Milchzufuhr und Temperaturbedingungen in den ersten beiden Lebenswochen weiterhin mehr Fett als ihre gleichbehandelten +/fa-Wurfgeschwister deponieren (MARKEWICZ ET AL. 1993). Demnach kann die künstliche Aufzucht zwar die normale Entwicklung der Tiere beeinflussen, sie unterdrückt jedoch nicht die primären, für das Auftreten der exzessiven Fettdeposition innerhalb der ersten beiden Lebenswochen verantwortlichen Faktoren, die Gegenstand dieser Untersuchung sind.

## 4.6 Für den Vergleich zwischen künstlich und normal aufgezogenen Tieren zur Verfügung stehende Befunde

Um die Auswirkungen der Noradrenalinbehandlung von dem Effekt der künstlichen Aufzucht auf die Entwicklung der Jungtiere trennen zu können, waren Vergleiche nicht nur mit den Ergebnissen von normal aufgezogenen Tieren (S. 40 ff.), sondern auch mit Daten von künstlich unter unterschiedlichen Bedingungen bis zum Alter von 16 bzw. 21 Tagen aufgezogenen fa/fa- und +/fa-Tieren aus anderen Untersuchungen notwendig (Tab. 10). Für den Vergleich wesentlich waren Untersuchungen an unbehandelten, unter intermittierender Kältebelastung aufgezogenen Tieren (MARKEWICZ ET AL. 1993). Dabei wurden die Temperaturänderungen simuliert, die dadurch auftreten, daß das Muttertier das Nest zeitweise verläßt. Unter diesen Bedingungen kam der Defekt in der Kälteabwehr der fa/fa-Jungtiere deutlich zum Ausdruck (MARKEWICZ ET AL. 1993, PLANCHE ET AL. 1983). Zum anderen war deshalb der Vergleich mit Tieren wichtig, bei denen der genotypspezifische Unterschied in der thermoregulatorischen Thermogenese durch thermoneutrale Aufzucht ausgeschaltet wurde. Daten von fa/fa- und +/fa-Tiere aus thermoneutraler Aufzucht wurden aus der Untersuchung von MARKEWICZ ET AL. (1993) entnommen, in der die Tiere mit einer ähnlichen Milchmenge aufgezogen worden waren wie die Tiere unter intermittierender Kältebelastung. Im Gegensatz zu thermoneutral aufgezogenen Tieren von KAUL ET AL. (1990), die mit der maximal verdaubaren Milchmenge versorgt worden waren, trat bei den thermoneutral aufgezogenen Tieren von MARKEWICZ ET AL. (1993) bis zum Alter von 16 Tagen ein kleiner, aber signifikanter Unterschied in der Fettmasse auf. Außerdem wurde zum Vergleich auf Daten von einem mit noradrenalinbehandelten Wurf zurückgegriffen, der eine Dosis erhalten hatte, die die massenspezifische MR um 50 % steigerte (KÖRTNER ET AL. 1994).

Autor	Alter der Tiere [d]	Bedin-gungen	Milch-menge [ml]	aerober Umsatz [kJ]		Massenspezif. MR über TN-Niveau	Gesamtenergie-umsatz [kJ]	unerklärte Bilanz-Differenz [kJ] fa/fa - +/fa	Anteil der deponierten Energie am Gesamtenergieumsatz		Fett [g] fa/fa +/fa
				+fa	fa/fa				+fa	fa/fa	
Markew.	4-16	kalt/warm	37-40	160-180	120-140	in Kaltperioden +/fa fa/fa 50% 0%	220	-1	30%	40%	+ 1
Markew.	4-16	TN	37-40	120-140	120-140	0%	220	+11	44%	49%	+ 0,2

Kaul	4-16	TN	45-65	150	160	0%	400	+6	48%	49%	0
Kaul	4-21	TN	85-105	320	310	0%	680	+19	51%	55%	+0,4-1,6
Körtner*	4-16	NA 50%	43	230	242	in 2. Lebenswoche 51%	550	+11	32%	31%	0
Körtner	4-21	NA 50%	96	450	425	in 3. Lebenswoche 45%	660	+11	33%	37%	+ 1
Körtner	4-21	NA 100%	80-90	517	493	in 2.Lebenswoche 110% in 3. Lebenswoche 100%	650	+4	19%	24%	+ 1
Meierf.	4-16	NA 100%	45-57	325	330	in 2. Lebenswoche 120%	390	-6	15%	16%	0

*Tab. 10: Zum Vergleich mit den noradrenalinbehandelten Tieren dieser Untersuchung herangezogene Daten von künstlich unter verschiedenen Bedingungen im Alter von 4 bis 16 bzw. 21 Tagen aufgezogenen Tieren. Markew.: Markewicz et al. (1993); Körtner: Körtner et al. (1994); Kaul: Kaul et al. (1990); Meierf.: eigene Befunde. kalt/warm: intermittierende Kältebelastung; MR: Stoffwechselrate; TN: thermoneutral; NA ...%: Noradrenalin behandelt bis zum Anstieg der durchschnittlichen massenspezifischen Stoffwechselrate um...%; : Differenz; \* Daten von nur einem Wurf (5 Tiere)*

## 4.7 Verhinderung der exzessiven Fettdeposition durch Noradrenalinbehandlung

Der wichtigste Befund der vorliegenden Untersuchung ist, daß der Fettgehalt von fa/fa- und +/fa-Tieren durch die Applikation von NA während der künstlichen Aufzucht auf einem gleich niedrigen Niveau gehalten werden kann wie der Fettgehalt von normal aufgezogenen +/fa-Tieren (Abb. 25). Abb. 25 vergleicht den prozentualen Fettgehalt in der Trockenmasse der unterschiedlich behandelten Tiere miteinander. Durch den Bezug des Fettgehaltes auf die Trockenmasse statt auf die Feuchtmasse, bleibt der unterschiedliche Wassergehalt von fa/fa- und +/fa-Tieren aus verschiedenen Versuchsgruppen ohne störenden Einfluß auf den betrachteten Fettgehalt.

Die künstliche Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen vermag den genotypspezifischen Unterschied zwar erheblich zu verringern, jedoch erfolgt die Angleichung des Körperfettgehaltes dabei auf dem erhöhten Niveau der normal aufgezogenen fa/fa-Tiere. Damit wird deutlich, daß unter thermoneutralen Bedingungen nicht die exzessive Fettdeposition der fa/fa-Tiere verringert, sondern die Fettdeposition der +/fa-Tiere auf entsprechend hohe Werte gesteigert wird. Dagegen bewirkt die Noradrenalinbehandlung effektiv die Verhinderung einer exzessiven Fettdeposition der fa/fa-Tiere bis zum Alter von 16 Tagen. Die von KÖRTNER ET AL. (1994) mit einer geringeren NA-Dosis behandelten Tiere zeigen unter

Nivellierung der genotypspezifischen Unterschiede eine deutlich niedrigere Fettdeposition im Vergleich zu thermoneutral aufgezogenen Tieren. Im Vergleich zu normal aufgezogenen  $+/fa$ -Tieren ist ihre Fettdeposition aber immer noch deutlich erhöht. Wird die Aufzucht von Tieren, die mit einer ähnlichen NA-Dosis wie in dieser Studie behandelt wurden, dagegen bis zum Alter von 21 Tagen fortgesetzt, können genotypspezifische Unterschiede in der Fettdeposition nicht mehr verhindert werden.

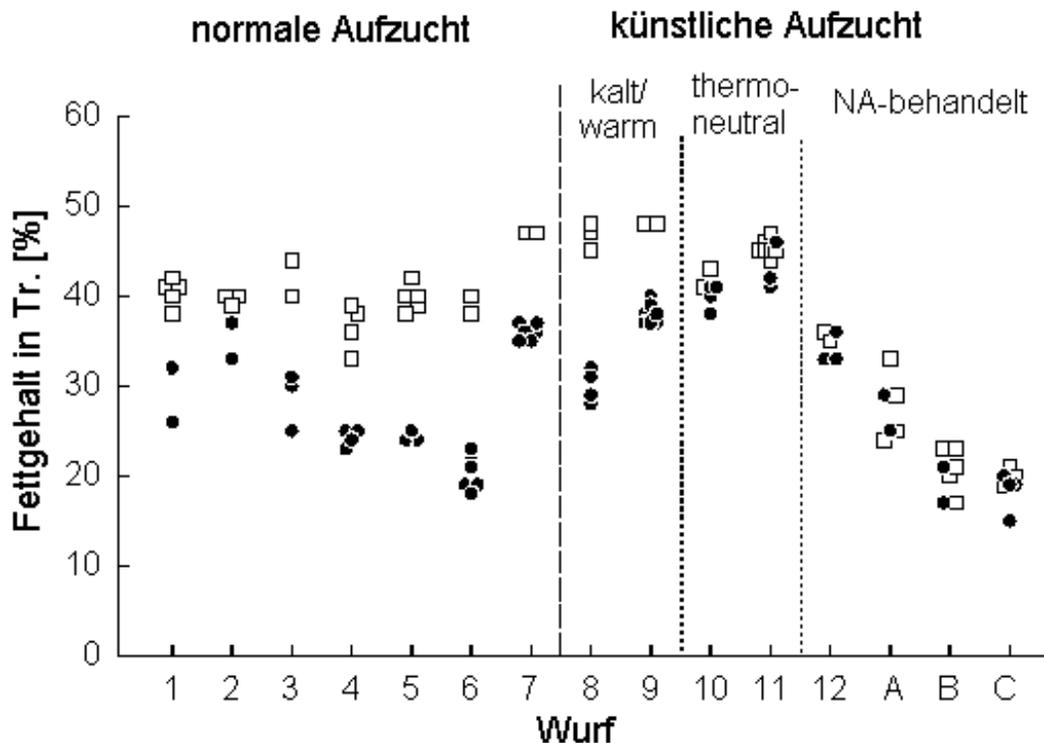


Abb. 25: Prozentualer Fettgehalt in der Trockenmasse (Tr.) von normal (vgl. Kap. 3.2.1) und künstlich aufgezogenen  $+/fa$ - (□) und  $fa/fa$ - (●) Tieren. Zum Vergleich mit den noradrenalinbehandelten Würfen A - C sind Befunde von künstlich aufgezogenen Tieren aus anderen Untersuchungen gezeigt: Würfe # 8 und 9: intermittierende Kältebelastung, Würfe # 10 und 11: thermoneutrale Bedingungen (Markewicz et al. 1993), Würf # 12: Noradrenalinbehandlung mit einer Dosis, die die massenspezifische Stoffwechselrate um 50 % steigerte (Körtner et al. 1994).

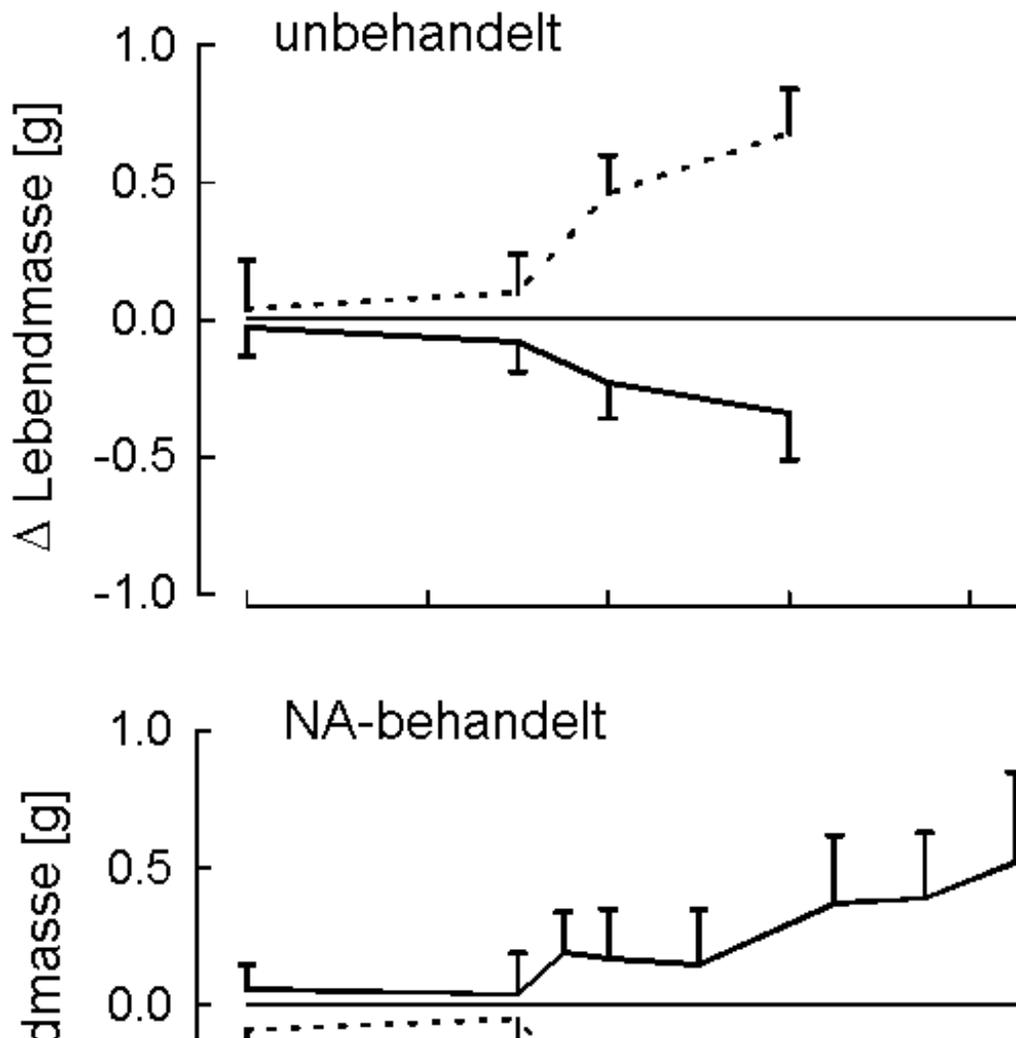
Weiterhin dokumentiert Abb. 25 daß, wie oben bereits erwähnt, die Verhinderung der exzessiven Fettdeposition bis zum Alter von 16 Tagen keine Folge der künstlichen Aufzucht per se ist. Bei künstlicher Aufzucht unter intermittierender Kältebelastung (Würf # 8 und 9) liegt der prozentuale Fettgehalt in der Trockenmasse zwar im oberen Bereich der Tiere mit entsprechendem Genotyp aus normaler Aufzucht, aber es kommt zu etwa dem gleichen Unterschied in der Fettdeposition von  $fa/fa$ - und  $+/fa$ -Würfgeschwistern wie bei Aufzucht durch die Mutter.

## 4.8 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die Lebendmasse

In der vorliegenden Arbeit wurde bei noradrenalinbehandelten Tieren vom Ende der 2. Lebenswoche an eine geringere Zunahme der Lebendmasse von  $fa/fa$ - im Vergleich zu  $+/fa$ -Tieren beobachtet. Die Lebendmasse der bis zum Alter von 21 Tagen mit NA-behandelten Tiere (Abb. 26 unten; abgeleitet aus

Daten von KÖRTNER ET AL. 1994) zeigte eine ähnliche Entwicklung wie die der noradrenalinbehandelten Tiere in unserer Untersuchung (vgl. Abb. 21). Allerdings waren dort die Unterschiede in der Lebendmasse zunächst weniger deutlich zu erkennen, obwohl die Tiere mit einer ähnlichen NA-Dosierung behandelt worden waren. Dies könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, daß die verwendete NA-Dosierung in der 2. Lebenswoche etwas geringer war und damit die massenspezifische MR im Mittel um 107 % über die Werte thermoneutral aufgezogener, unbehandelter Tiere angehoben wurde, wogegen in der vorliegenden Untersuchung eine Steigerung um 122 % erzielt wurde (vgl. Abb. 21). Außerdem wurde in der Untersuchung von KÖRTNER ET AL. (1994) zu Beginn der 3. Lebenswoche, also zu dem Zeitpunkt, zu dem die Unterschiede in der vorliegenden Studie deutlich hervortreten begannen, die Noradrenalinbehandlung für 24 h unterbrochen, um den Genotyp mittels Kältetest zu ermitteln. Nach Wiederaufnahme der Noradrenalinbehandlung Mitte der 3. Lebenswoche war aber auch in der Untersuchung von KÖRTNER ET AL. (1994) bei fa/fa-Tieren eine deutlich geringere Zunahme der Lebendmasse zu beobachten als bei ihren +/fa-Wurfgeschwistern. Das ist gerade in Anbetracht der in diesem Alter beginnenden exzessiven Fettdeposition der fa/fa-Tiere auffallend.

Daß der in der vorliegenden Studie beobachtete genotypspezifische Unterschied in der Lebendmasse ebenfalls eine Folge der pharmakologischen Behandlung und nicht Folge der veränderten Aufzuchtbedingungen ist, legt der Vergleich mit den Tieren, die unter intermittierender Kältebelastung künstlich aufgezogen wurden, nahe. Die aus der Arbeit von MARKEWICZ ET AL (1993) abgeleiteten Daten



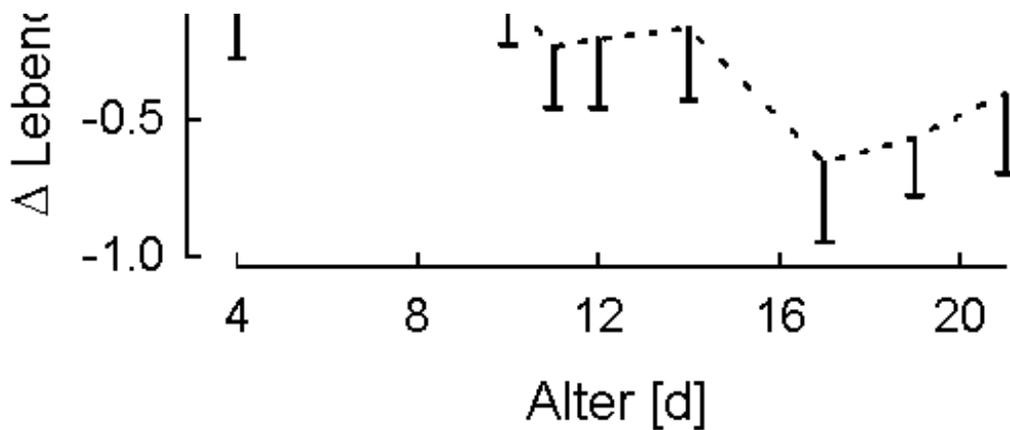


Abb. 26: Vergleich der Lebendmasse von unbehandelten und noradrenalin-behandelten +/fa- (-) und fa/fa- (---) Tieren aus anderen Untersuchungen. Dargestellt sind die Befunde von künstlich unter intermittierender Kältebelastung aufgezogenen Tieren (oben; Markewicz et al. 1993) und Tieren die mit einer NA-Dosierung behandelt worden waren, die die massenspezifische Stoffwechselrate um ca. 100 % an hob (unten; Körtner et al. 1994). Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert mit dem Standardfehler (SEM).

(Abb. 26 oben) zeigen bei künstlich aufgezogenen Tieren eine ähnliche Entwicklung der Lebendmasse wie bei normal aufgezogenen Tieren (vgl. Abb. 13). Allerdings sind diese Daten mit Vorsicht zu interpretieren, da bei Tieren, die unter Kältebelastung künstlich aufgezogen werden, genotypabhängige Unterschiede im Magen- und Harnblasenfüllungszustand zu vermuten sind (MARKEWICZ ET AL. 1993). Dies würde erklären, weshalb zu Beginn der 3. Lebenswoche genotypspezifische Unterschiede in der Feuchtmasse (Abb. 28) trotz Unterschieden in der Lebendmasse (Abb. 26) bei unbehandelten, künstlich aufgezogenen Tieren nicht nachweisbar waren.

## 4.9 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalin-behandlung auf die fettfreie Trockenmasse

Die bei der künstlichen Aufzucht beobachtete verringerte Zunahme der fffTM wird durch NA-Applikation verbessert, obwohl NA zu einer extremen Stoffwechselsteigerung führt. Durch die NA-Applikation werden aber nicht die Werte normal aufzogener Tiere erreicht (Abb. 27). Bei künstlich aufgezogenen Tieren mit und ohne Noradrenalinbehandlung treten keine genotypspezifischen Unterschiede in der fffTM auf (Abb. 28). Unter Noradrenalinbehandlung kommt es also nicht gleichzeitig mit der Hemmung der exzessiven Fettdeposition zu einer genotypspezifischen Hemmung des Wachstums der fffTM der fa/fa-Tiere. Die genotypspezifischen Unterschiede in der Feuchtmasse der noradrenalinbehandelten Tiere beruhen somit ausschließlich auf Unterschieden in der Wassermasse. Bei den künstlich unter intermittierender Kältebelastung aufgezogenen fa/fa-Tieren findet sich dagegen neben der niedrigeren Wassermasse eine um soviel größere Fettmasse, daß keine genotypspezifischen Unterschiede in der Feuchtmasse zu beobachten sind (Abb. 28).

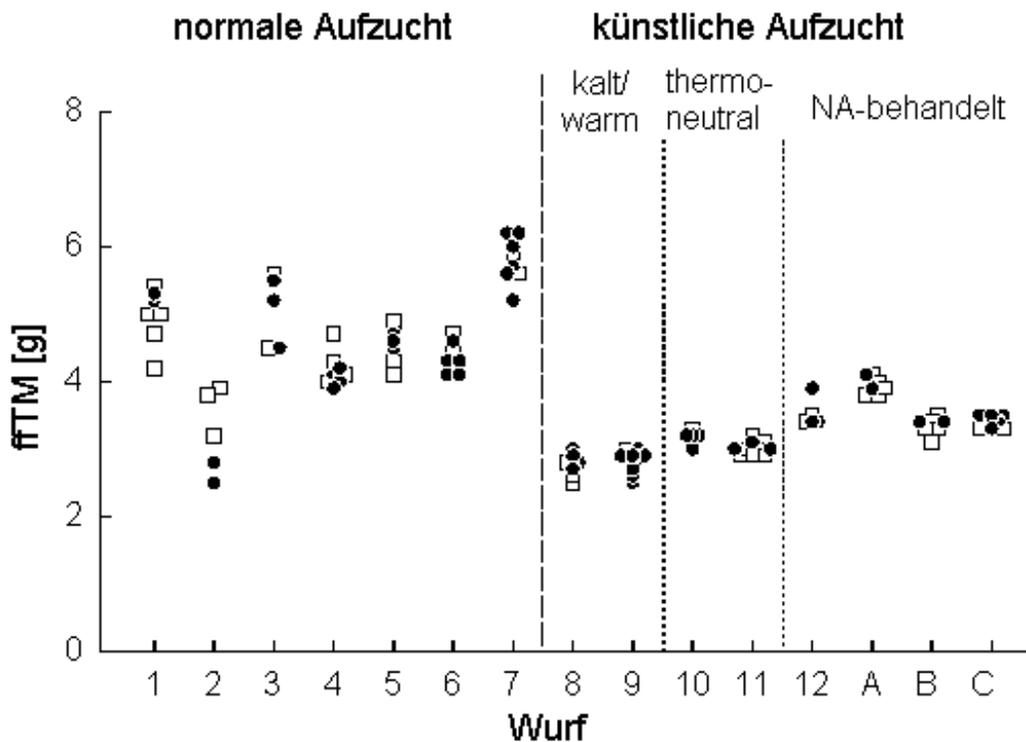


Abb. 27: Fettfreie Trockenmasse von normal (vgl. Kap. 3.2.1) und künstlich aufgezogenen +/fa- (○) und fa/fa- (●) Tieren. Zum Vergleich mit den noradrenalinbehandelten Würfen A - C sind Befunde von künstlich aufgezogenen Tieren aus anderen Untersuchungen gezeigt: Würfe # 8 und 9: intermittierende Kälte-belastung, Würfe # 10 und 11: thermoneutrale Bedingungen (Markewicz et al. 1993), Wurf # 12: Noradrenalinbehandlung mit einer Dosis, die die massenspezifische Stoffwechselrate um 50 % steigerte (Körtner et al. 1994).

## 4.10 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalin-behandlung auf den Wassergehalt

Wegen der unterschiedlichen Fettmasse der verschiedenen Untersuchungsgruppen wurde nicht der Wassergehalt der Feuchtmasse sondern der ffFM berechnet. Dabei zeigt sich, daß der Wassergehalt der künstlich aufgezogenen, unbehandelten Tiere über dem normal aufgezogener Tiere liegt (Abb. 29). Das dürfte auf die extrem hohe Osmolarität der Ersatzmilch (ca. 660 mosmol/l) im Vergleich zur Rattenmilch (ca. 350 mosmol/l) zurückzuführen sein (SONNENBERG ET AL. 1982).

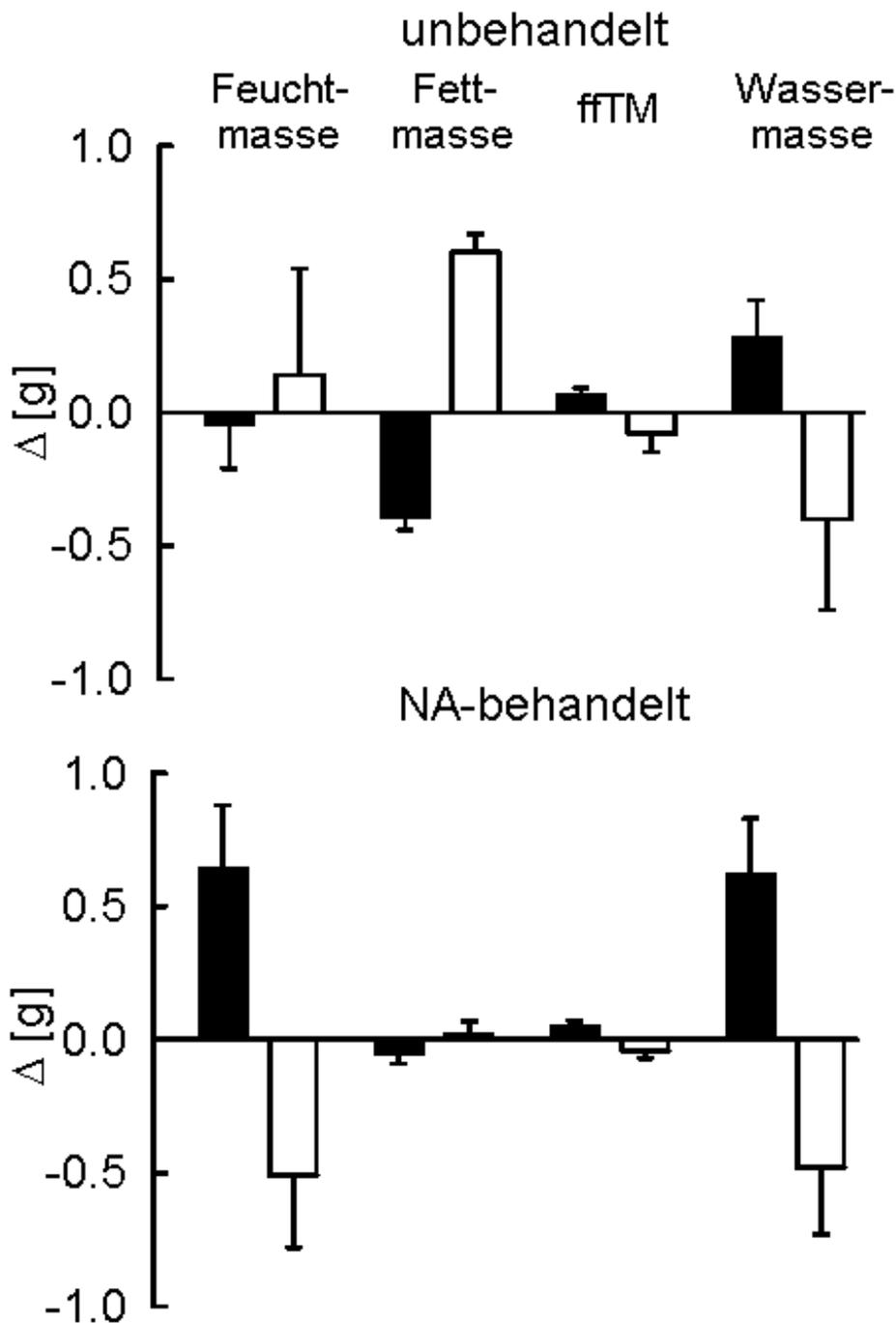


Abb. 28: Vergleich der Gesamtkörperzusammensetzung von künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen, unbehandelten (Markewicz et al. 1993) und noradrenalinbehandelten  $+/fa-$  (○) und  $fa/fa-$  (●) Tieren. Gezeigt ist die Abweichung (Δ) vom Wurfmittelwert. ffTM = fettfreie Trockenmasse.

Durch die Noradrenalinbehandlung sinkt der Wassergehalt auf Werte ab, die denen natürlich aufzogener Tiere entsprechen. Dabei liegt der Wassergehalt der mit einer geringeren Dosis behandelten Tiere von KÖRTNER ET AL. 1994 zwischen den Werten der unbehandelten und der mit hoher NA-Dosis behandelten künstlich aufgezogenen Tiere (Abb. 29).

Die Ursachen des geringeren Wassergehaltes der noradrenalinbehandelten Tiere könnte eine NA-induzierte, arterielle Hypertension sein (ROMAN 1986). JUNGBLUTH ET AL. (1994) konnte in der

Entenniere nachweisen, daß eine systemische Noradrenalininfusion zu einer arteriellen Hypertension, einer reflektorischen Bradykardie, einer verstärkten Diurese und Natriumausscheidung bei unveränderter glomerulärer Filtrationsrate und einem verminderten renalen Blutfluß führte. Da die Mechanismen der Flüssigkeits- und Elektrolytexkretion in der Vogelniere mit denen in der Säugerniere vergleichbar sind (JUNGBLUTH ET AL. 1994), sind entsprechende Noradrenalinwirkungen auch in der Rattenniere wahrscheinlich. Weiterhin wäre ein direkter Effekt des Noradrenalins auf den tubulären Transport (CARG 1992), die renale Autoregulation (PERSSON ET AL. 1990) oder das Renin-Angiotensin System (BLAIR ET AL. 1986, JOHNSON ET AL. 1979) denkbar.

Neben dem insgesamt niedrigeren Wassergehalt der noradrenalinbehandelten Tiere in dieser Untersuchung fällt ein niedrigerer Wassergehalt der fa/fa-Tiere im Vergleich zu den identisch behandelten +/-fa-Wurfgeschwistern auf. Dieser Unterschied wird bei der Betrachtung der Abweichung vom Mittelwert besonders deutlich (Abb. 30). Da, wie in Kapitel 3.3.3 dargelegt, neben diesem genotypspezifischen Unterschied auch geschlechtsspezifische Effekte auftreten und die Geschlechter der Tiere aus anderen Untersuchungen nicht mehr zu ermitteln waren, ist die Darstellung mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet. Allerdings zeigen die Daten der normal aufgezogenen Tiere, daß ein entsprechender geschlechtsspezifischer Unterschied im Wassergehalt der ffFM

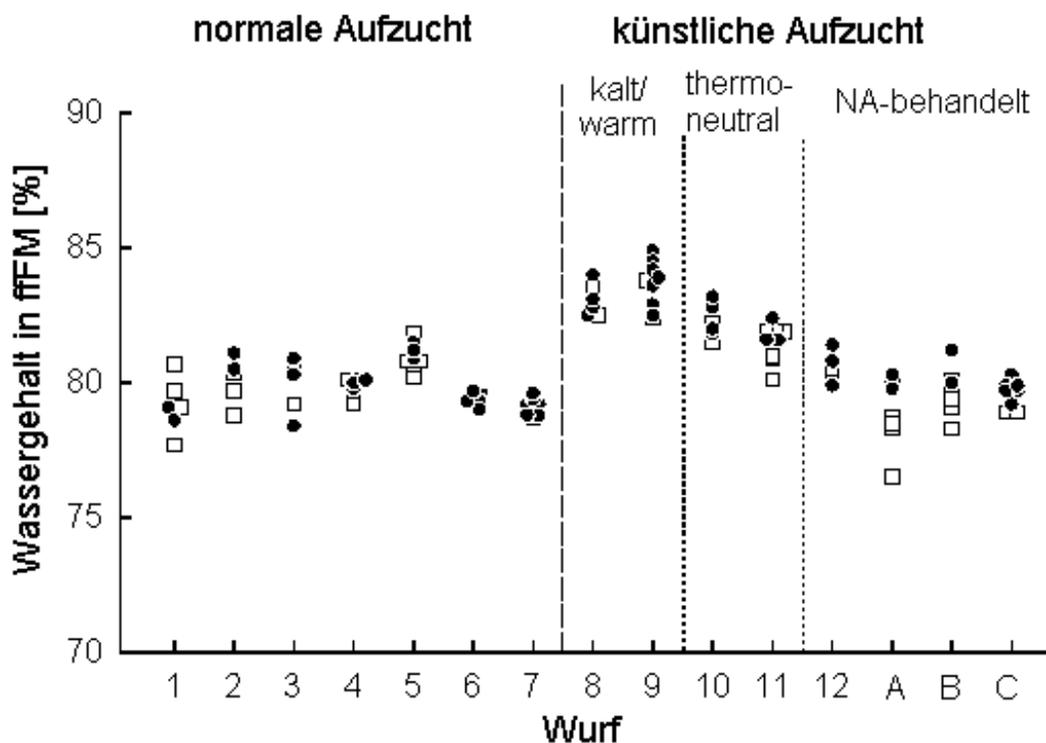


Abb. 29: Wassergehalt der fettfreien Körpermasse (ffFM) von normal (vgl. Kap. 3.2.1) und künstlich aufgezogenen +/-fa- (□) und fa/fa- (●) Tieren. Zum Vergleich mit den noradrenalinbehandelten Würfen A - C sind Befunde von künstlich aufgezogenen Tieren aus anderen Untersuchungen gezeigt: Würfe # 8 und 9: intermittierende Kältebelastung, Würfe # 10 und 11: thermoneutrale Bedingungen (Markewicz et al. 1993), Wurf # 12: Noradrenalinbehandlung mit einer Dosis, die die massenspezifische Stoffwechselrate um 50 % steigerte (Körtner et al. 1994).

nicht auftritt ( $p = 0,5$ ; zweifaktorielle Varianzanalyse mit Geschlecht und Genotyp als Faktoren), so daß mit einer Verfälschung der Werte durch geschlechtsspezifische Effekte allenfalls bei den künstlich

aufgezogenen Tieren gerechnet werden muß. Im Gegensatz zu den noradrenalinbehandelten Tieren findet sich bei normal und künstlich unter intermittierender Kältebelastung aufgezogenen Tieren kein oder nur ein geringfügig niedrigerer Wassergehalt der fa/fa-Tiere. Erstaunlicherweise tritt jedoch auch bei künstlicher Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen ein deutlich niedrigerer Wassergehalt bei den fa/fa-Tieren auf.

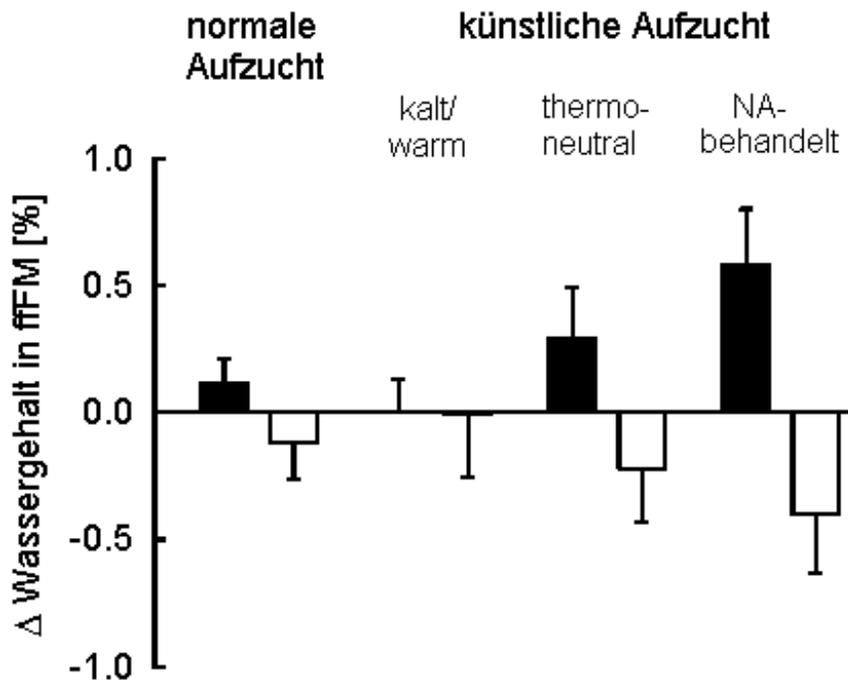


Abb. 30: Vergleich des Wassergehaltes in der fettfreien Feuchtmasse (ffFM) von normal aufgezogenen (vgl. Kap. 3.2.1) und künstlich aufgezogenen +/fa- (■) und fa/fa- (□) Tieren. Neben den Befunden der noradrenalinbehandelten Würfe A - C wurden die Daten von Tieren dargestellt, die unter Kältebelastung und bei Thermoneutralität (Markewicz et al. 1993) aufgezogen wurden. Gezeigt ist die Abweichung (Δ) vom Wurfmittelwert.

Obwohl der Körperwassergehalt durch die Noradrenalinbehandlung vermindert wird, scheinen genotypspezifische Unterschiede im Wassergehalt nicht aus der Noradrenalinbehandlung per se zu resultieren, da sie nicht nur unter diesen Bedingungen zu beobachten sind. Interessant ist allerdings, daß diese genotypspezifischen Unterschiede im Wassergehalt gerade unter Bedingungen auftreten, unter denen Unterschiede im Fettgehalt vermindert oder gänzlich verhindert werden können. Eine Erklärung dazu ist gegenwärtig nicht möglich.

## 4.11 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalinbehandlung auf die Energiebilanz

Der normalerweise bei fa/fa-Tieren auftretende, erniedrigte aerobe Energieumsatz (PLANCHE ET AL. 1983, PLANCHE ET AL. 1988, KAUL ET AL. 1985, MARKEWICZ ET AL. 1993) konnte durch die in der vorliegenden Untersuchung verwandte NA-Dosierung auf das gleiche Niveau wie das der +/fa-Tiere angehoben werden. Unser Ergebnis bestätigt Befunde von KÖRTNER ET AL. (1994), die gezeigt hatten,

daß genotypspezifische Unterschiede im aeroben Gesamtstoffwechsel bis zum Alter von 16 Tagen nivelliert werden konnten, gleichgültig ob die massenspezifische MR durch entsprechende Dosierung um etwa 50 % oder um 100 % über die Werte thermoneutral aufgezogener unbehandelter Tiere angehoben wurde. Diese Ergebnisse stehen wiederum in Einklang mit der Feststellung von SCHMIDT ET AL. (1985), daß die Ursache für die erniedrigte Thermogenese unter Kältebelastung normal aufgezogener fa/fa-Tiere keine lokale Störung im BAT ist.

Der gesamte aerobe Energieumsatz während der künstlichen Aufzucht mit Noradrenalinbehandlung bis zum Alter von 16 Tagen ist bei beiden Genotypen 2,1 (vorliegende Untersuchung) bzw. 1,8 (KÖRTNER ET AL. 1994) mal so hoch wie der Gesamtverbrauch der mit ähnlicher Nahrungszufuhr thermoneutral aufgezogenen Tiere (KAUL ET AL. 1990). Unter thermoneutralen Bedingungen beträgt der Anteil der deponierten an der insgesamt umgesetzten Energie von +/-fa-Tieren bei reichlicher Nahrungszufuhr 48 % und bei reduzierter Nahrungszufuhr 44 % und liegt damit in beiden Fällen nur geringfügig unter dem gleichbehandelter fa/fa-Tiere mit 49 % (KAUL ET AL. 1990, KÖRTNER ET AL. 1994). Durch die massive Stoffwechselsteigerung noradrenalinbehandelter Tiere wird dagegen nur 15 % der umgesetzten Energie deponiert. Wie Abb. 31, rechts, anhand der Abweichung der deponierten Energie vom Wurfmittelwert zeigt, treten dabei keine genotypspezifischen Unterschiede auf.

Bei hochdosierter Noradrenalinbehandlung bis zum Alter von 21 Tagen liegt der Anteil der deponierten Energie bei +/-fa-Tieren mit ca. 19 % nur geringfügig höher als in unserer Untersuchung. Mit einem Anteil von ca. 24 % bei den fa/fa-Tieren tritt jedoch ein deutlicher genotypspezifischer Unterschied auf (KÖRTNER ET AL. 1994). Ein entsprechender, leichter Anstieg des Anteils der deponierten Energie der +/-fa-Tiere bei gleichbleibender Stoffwechsellaage in der 3. Lebenswoche wurde auch bei vergleichender Betrachtung der Ergebnisse anderer Versuchsserien festgestellt (KAUL ET AL. 1990, KÖRTNER ET AL. 1994).

Ein mit über 30 % der umgesetzten Energie deutlich größerer Anteil wird dagegen bei den mit einer geringeren NA-Dosierung behandelten Würfen deponiert (KÖRTNER ET AL. 1994). Dieses Verhältnis von deponierter zu umgesetzter Energie entspricht dem, das bei spontaner Stoffwechselaktivierung durch eine moderate, die Bedingungen im Nest simulierende Kältebelastung bei +/-fa-Tieren beobachtet wurde (MARKEWICZ ET AL. 1993).

Unter den gleichen Bedingungen erreichen die unbehandelten fa/fa-Tiere dagegen durch die zugunsten der Fettdeposition reduzierte Thermogenese während der Kälteperioden mit einem Anteil von 40 % der umgesetzten Energie eine deutlich höhere Energiedeposition. Dieser genotypspezifische Unterschied wird, betrachtet als Abweichung vom Wurfmittelwert, besonders deutlich (Abb. 31, links). Durch die hohe NA-Dosierung bis zum Alter von 16 Tagen kann somit der Anteil der deponierten Energie auf sehr niedrige Werte reduziert werden, ohne daß es zur Entwicklung genotypspezifischer Unterschiede kommt.

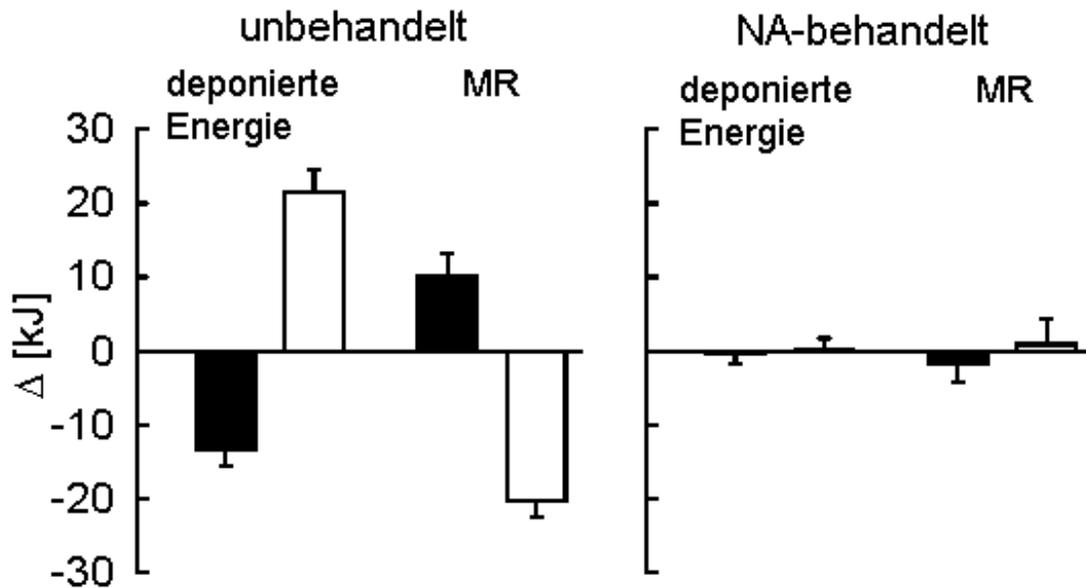


Abb. 31: Vergleich des Energieumsatzes von künstlich unter Kältebelastung aufgezogenen, unbehandelten (Markewicz et al. 1993) und noradrenalin-behandelten +/fa- ( ) und fa/fa- ( ) Tieren (eigene Befunde). Gezeigt ist die Abweichung ( ) vom Wurfmittelwert. MR = aerobe Stoffwechselrate

Studien verschiedener Autoren an künstlich aufgezogenen, unbehandelten Tieren haben gezeigt, daß unter thermoneutralen Bedingungen die exzessive Fettdeposition der fa/fa-Tiere bis zum Alter von 16 Tagen nicht vollständig durch Unterschiede im aeroben Energieumsatz oder im Wachstum der fffTM erklärt werden kann (KAUL ET AL. 1990, MARKEWICZ ET AL. 1993). Nachdem die energetischen Äquivalente der Differenzen in der Fettmasse, der fffTM und im aeroben Energieumsatz berücksichtigt worden waren, blieb zwischen den Genotypen eine Bilanzdifferenz zugunsten der künstlich thermoneutral aufgezogenen fa/fa-Tiere. Diese Differenz beruht wahrscheinlich auf einer geringfügig besseren Nahrungsresorption bei fa/fa-Tieren unter thermoneutralen Bedingungen (MARKEWICZ ET AL. 1993). Bei künstlicher Aufzucht unter intermittierender Kältebelastung war eine entsprechende Bilanzdifferenz nicht zu beobachten (MARKEWICZ ET AL. 1993). In dem von KÖRTNER ET AL. (1994) bis zum Alter von 16 Tagen unter niedriger NA-Dosierung aufgezogenen Wurf war der Gesamtenergieumsatz (aerobe Energieumsatz plus deponierte Energie) der fa/fa-Tiere um 11 kJ höher als der der +/fa-Geschwister (vgl. Tab. 10). Dieser an 5 Tieren eines Wurfs erhobene Befund hatte die Frage aufgeworfen, ob der beobachtete Unterschied in der Gesamtenergiebilanz auch bei noradrenalinbehandelten Tieren bestehen bleibt. Unsere Untersuchungen zeigen, daß es zumindest bei hoher NA-Dosierung innerhalb der ersten 2 Lebenswochen möglich ist, diesen Unterschied in der Energiebilanz zwischen fa/fa- und +/fa-Tieren zumindest auszugleichen (s. Tab. 10). Die vermutlich bessere Nahrungsresorption der fa/fa-Tiere ist bei hoher NA-Dosierung bis zum Alter von 16 Tagen nicht mehr nachzuweisen. Wird die hochdosierte Noradrenalinbehandlung jedoch bis zum Alter von 21 Tagen fortgesetzt, tritt parallel mit der Entwicklung genotypspezifischer Unterschiede in der Fettdeposition, der fffTM und im aeroben Energieumsatz wieder ein geringer (ca. 4 kJ) Energieüberschuß der fa/fa-Tiere im Vergleich zu den +/fa-Tieren auf (KÖRTNER ET AL. 1994).

## 4.12 Auswirkungen der künstlichen Aufzucht und der Noradrenalin-behandlung auf die Plasmaparameter

Die Plasmainsulinspiegel künstlich aufgezogener Tiere sind auf Grund des höheren Kohlenhydratangebots mit der Kunstmilch gegenüber denen normal aufgezogener Welpen leicht erhöht (SONNENBERG ET AL. 1982). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Die künstlich aufgezogenen +/-fa-Tiere wiesen einen Insulinspiegel von 59  $\mu\text{U/ml}$  (SEM = 13, N = 3 Würfe) auf, während man in der Literatur Werte für normal aufgezogene +/-fa-Tiere von 20 - 50  $\mu\text{U/ml}$  findet (BAZIN UND LAVAU 1982, TURKENKOPF ET AL. 1982, CHARON ET AL. 1995).

Nach P&EACUTE;NICAUD ET AL. (1991), BAZIN UND LAVAU (1982), CHARON ET AL. (1995) und LAVAU ET AL. (1985) ist der Plasmainsulinspiegel 15 - 17 Tage alter, normal aufgezogener fa/fa-Tieren mit 30 - 60  $\mu\text{U/ml}$  gegenüber +/-fa-Tieren leicht erhöht. Andererseits beobachteten GUICHARD ET AL. (1992), ROHNER-JEANRENAUD ET AL. (1983b), FLETCHER ET AL. (1986b) und TURKENKOPF ET AL. (1982) keine genotypspezifische Beeinflussung des Plasmainsulinspiegels bei Tieren im gleichen Alter. Daß einige Autoren keine genotypspezifischen Unterschiede nachweisen konnten, könnte daraus resultieren, daß die Plasmainsulinkonzentrationen abhängig von der Tageszeit, dem Abstand von der letzten Säugephase und den thermischen Bedingungen unterschiedlich sind. Neuere Untersuchungen, die unter Berücksichtigung der erwähnten Aspekte durchgeführt wurden, haben sowohl unter Kältebelastung als auch unter thermoneutralen Bedingungen deutliche genotypspezifische Unterschiede im Plasmainsulinspiegel gezeigt (K. SCHWARZER, unveröffentlichte Befunde). Dabei wurden die Tiere vor der Blutentnahme 2 h von der Mutter getrennt, in dieser Zeit bei 20-21°C oder unter thermoneutralen Bedingungen gehalten und zu Beginn der Aktivitätsphase (Ende der Lichtphase) getötet, um das Untersuchungsmaterial stets unter den gleichen tagesperiodischen und metabolisch stabilen Bedingungen (NÜßLEIN-HILDESHEIM UND SCHMIDT 1994) zu gewinnen. Unter diesen Voraussetzungen lagen die Insulinkonzentrationen der fa/fa-Tiere etwa 10  $\mu\text{U/ml}$  über den Werten der +/-fa-Tiere, für die in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben Werte zwischen 20 und 50  $\mu\text{U/ml}$  gemessen wurden.

Unterschiede zwischen Plasmainsulinspiegeln von 16 Tage alten fa/fa- und +/-fa-Tieren sind nach einer Dauermedikation mit NA nicht mehr nachzuweisen. Allerdings liegen die Plasmainsulinspiegel der behandelten, künstlich aufgezogenen Tiere im Vergleich zu denen der unbehandelten, normal aufgezogenen Tieren, auf einem im Durchschnitt höheren Niveau. Der erhöhte Mittelwert wird, wie Abb. 24 zeigt, durch einige deutlich nach oben abweichende Werte verursacht. Einen im Mittel höheren Plasmainsulinspiegel beobachtete auch SONNENBERG ET AL. (1982) in Folge der künstlichen Aufzucht. Dieser Effekt wird anscheinend auch durch die Noradrenalinbehandlung nicht unterdrückt. Leider geht aus den Angaben von SONNENBERG ET AL. (1982) nicht hervor, ob in ihrer Studie eine ähnlich starke Streuung der Insulinwerte zu beobachten war wie in unserer Untersuchung.

BOULANG&EACUTE; ET AL. (1981) zeigten, daß der Plasmatriacylglyceringehalt von +/-fa-Tieren zwischen der ersten und zweiten Lebenswoche von 1,1 g/l auf 0,7 g/l abfiel, während der der fa/fa-Tiere nahezu konstant war. Daraus resultierte eine signifikante Hypertriacylglycerinaemie der fa/fa-Tiere ab der zweiten Lebenswoche, die lebenslang bestehen blieb. Auch CHARON ET AL. (1995) fanden mit 0,19 g/l einen gegenüber +/-fa-Wurfgeschwistern um 50 % höheren Plasmatriacylglyceringehalt bei 16 Tage alten fa/fa-Tieren. Durch wiederholte orale Gabe des  $\beta$ -Rezeptor-Agonisten BRL 35135 konnte der Plasmatriacylglyceringehalt der fa/fa-Tiere nur um 15 % gesenkt werden, während der Plasmatriacylglycerinspiegel der +/-fa-Tiere unverändert blieb. Die vorliegenden Befunde zeigen aber deutlich, daß durch die kontinuierliche Behandlung mit NA bei beiden Genotypen normale

Plasmatriacylglycerinspiegel (0,13 g/l) erreicht werden können.

#### 4.13 Was verursacht die exzessive Energiedeposition der fa/fa-Tiere?

Bei der Sequenzierung des ob-Gens der Maus wurde ein Exon gefunden, dessen Transkript nur im weißen Fettgewebe nachweisbar ist (ZHANG ET AL. 1994). Die mRNA, die das Transkript des Exons enthält, weist im WAT von ob/ob-Tieren im Vergleich zu +/-Tieren eine ca. 20-fach höhere Konzentration auf, da die Mutation auf Grund einer Translationshemmung die Bildung des zugehörigen Proteins unterbindet. Die Basensequenz der mRNA läßt vermuten, daß es sich bei dem zugehörigen ob-Protein um ein sekretorisches Protein handelt.

Diese aktuellen Befunde wurden mit einer vor Jahren aufgestellten Hypothese in Verbindung gebracht, die aus Ergebnissen von Parabioseversuchen resultierte (RINK ET AL. 1994, PELLEYMOUNTER ET AL. 1995). Parabiose ist die teilweise chirurgische Vereinigung zweier Tiere, wobei es zur direkten Verbindung zwischen Kapillargefäßen in der Haut kommt. Als Ergebnis einer Parabiose von ob/ob-Mäusen und normalen Mäusen wurde postuliert, daß vom weißen Fettgewebe der normalen Tiere ein Sättigungsfaktor und/oder antilipogenetischer Faktor gebildet wird, der den ob/ob-Tieren fehlt (COLEMAN ET AL. 1973, FRIEDMAN UND LEIBEL, 1992, HARRIS UND MARTIN 1984, HARRIS ET AL. 1987, HARRIS ET AL. 1995, VAN DYKE ET AL. 1948). Analoge Versuche mit db/db-Mäusen und fa/fa-Ratten ergaben, daß diese Mutanten zwar den Sättigungsfaktor bilden, daß aber eine Reaktion des Organismus auf den Sättigungsfaktor ausbleibt (COLEMAN 1978, HARRIS ET AL. 1987, HALAAS ET AL. 1995). Man nimmt daher an, daß ein Defekt an den Rezeptoren des Sättigungsfaktors vorliegt (CAMPFIELD ET AL. 1995, COLEMAN UND HUMMEL 1973, RINK ET AL. 1994). Rezeptoren werden u.a. im Gehirn vermutet (CAMPFIELD ET AL. 1995).

Eine mangelhafte Aktivierung des ventromedialen Hypothalamus, insbesondere der sympathischen Kerngebiete durch Inkompatibilität zwischen Sättigungsfaktor und Rezeptor könnte einen verminderten Sympathikustonus und damit z.B. die verminderte BAT Thermogenese im Säuglingsalter sowie die später deutlich werdende, erhöhte Insulinsekretion erklären.

Vor der Geburt, solange die sympathische Aktivität als minimal angesehen werden kann, wird die Energiespeicherung nach bisherigen Erkenntnissen überwiegend vom Insulin:Glucagonverhältnis reguliert (GIRARD ET AL. 1989; MAYOR UND CUEZVA 1985). Das könnte erklären, warum zum Zeitpunkt der Geburt kein Unterschied in der Körperzusammensetzung von fa/fa- und +/-fa-Tieren auftritt.

Da neugeborene Ratten ihre Thermogenese nicht vor dem ersten Säugen aktivieren (TAYLOR ET AL. 1960) und da die Muttertiere in den ersten zwei Tagen nach dem ersten Säugen fast konstant die Jungtiere wärmen (SCHMIDT ET AL. 1987), gibt es keine Unterschiede in der thermoregulatorischen Thermogenese die den Energiehaushalt beeinflussen könnten. Danach beginnen die Muttertiere jedoch, das Nest für zunehmend längere Perioden zu verlassen, besonders zu Beginn der Dunkelphase, wenn die thermoregulatorische Aktivität der normalen (+/?) Jungtiere hoch ist (NUESSLEIN ET AL. 1990, SCHMIDT ET AL. 1987). Das bedeutet, daß genotypspezifische Unterschiede im thermoregulatorischen Energieverbrauch langsam an Bedeutung gewinnen. Körpertemperaturmessungen unter Nestbedingungen haben solche Unterschiede in 5 - 8 Tage alten Welpen nachgewiesen (SCHMIDT ET AL. 1984), und ihre maximale Ausprägung bei 16 Tage alten Tieren gezeigt (KAUL ET AL. 1985).

Dieser Entwicklungsablauf geht parallel mit der in unserer Untersuchung beobachteten Entstehung von Unterschieden in der Körperzusammensetzung normal aufgezogener Jungtiere, die sich durch Noradrenalinbehandlung bis zum Alter von 16 Tagen unterdrücken lassen. Demnach wäre die verminderte Thermogenese junger fa/fa-Tiere zwar nicht die Ursache der Fettsuchtentwicklung, wohl aber ein Hinweis auf eine spezifisch gestörte Sympathikusaktivierung als primären Faktor.

Mit der Änderung der hormonellen Situation bei der Umstellung von der Säugephase auf die Aufnahme fester, kohlenhydratreicher Nahrung ist die künstliche sympathische Stimulation allein nicht mehr in der Lage, die weitere Entwicklung der exzessiven Fettdeposition aufzuhalten. Obwohl die möglichen Mechanismen immer noch unklar sind, scheint es offensichtlich, daß andere Faktoren neben der verminderten sympathischen Aktivität ab der 3. Lebenswoche an Bedeutung bei der Entwicklung der exzessiven Fettdeposition gewinnen. Die Klärung der Frage, in wie weit das ob-Protein in diese Prozesse involviert ist, wird in der nächsten Zeit ein Schwerpunkt der fa/fa-Adipositas-Forschung sein.

## 5 Zusammenfassung

Das defekte Gen "fa" bedingt bei homozygotem Auftreten eine exzessive Fettdeposition und die Veranlagung zum sekundären Diabetes. Ziel dieser Untersuchungen war erstens eine systematische Analyse der zuerst auftretenden Störungen in der Energiespeicherung bei fa/fa-Ratten und zweitens, die Aufklärung der Bedeutung des sympathischen Nervensystems für die Entwicklung dieser Störung.

Als Versuchstiere wurden Zucker-Ratten (13M) x Brown-Norway Ratten (BN) Kreuzungstiere verwendet. Deren Genotyp konnte bereits in der perinatalen Periode ermittelt werden, indem Polymorphismen in bekannten Markergenen in unmittelbarer Nähe des fa-Genlocus mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) dargestellt wurden.

Analysen der Körperzusammensetzung von 0 bis 16 Tage alten Tieren zeigten, daß die Fettmasse der fa/fa-Tiere die der +/fa-Wurfgeschwister erst ab einem Alter von 7 Tagen signifikant überstieg. Bei 16 Tage alten fa/fa-Hybridtieren war ebenso wie bei fa/fa-Zucker-Ratten die Fettmasse so viel größer als die der +/fa-Geschwister, daß der Genotyp bereits anhand der Beziehung zwischen Körperfettmasse und Lebendmasse erkannt werden konnte. Die fettfreie Trockenmasse (ffTM) der fa/fa-Welpen war bis zum Alter von 16 Tagen geringfügig höher als die der +/fa-Welpen. Die Wassermasse von Tieren beider Genotypen unterschied sich nicht. Bedingt durch die höhere Fettmasse bei leicht erhöhter ffTM der fa/fa-Tiere ergab sich auch ein signifikanter Einfluß des Genotyps auf die Feuchtmasse.

Die Gewebetriacylglycerine im braunen Fettgewebe, im weißen Fettgewebe und in der Leber sowie die Plasmatriacylglycerine 1 Tag alter Tiere zeigten ebensowenig genotypspezifische Unterschiede, wie das Leberglykogen und der Plasmainsulinspiegel von Feten und Neugeborenen. Genotypspezifische Abnormitäten während der perinatalen Phase spielen also keine Rolle für die Entwicklung der fa/fa-Fettsucht.

Die Bedeutung einer Unterfunktion des sympathischen Nervensystems für die Entwicklung der fa/fa-Adipositas wurde durch eine chronisch orale Stoffwechselaktivierung mittels Noradrenalin (NA) während der künstlichen Aufzucht bei 4 bis 16 Tage alten Tieren ermittelt. Durch diese Behandlung konnte bei einer Steigerung der massenspezifischen metabolischen Rate beider Genotypen auf 120 % des Thermoneutralniveaus der Gesamtenergieumsatz beider Tiergruppen auf gleiche Werte angehoben werden. Gleichzeitig kam es dabei zu einer Nivellierung der Fettdeposition beider Genotypen auf einem niedrigen

Niveau. Dagegen bewirkte die Behandlung keine genotypspezifische Reduktion des Wachstums der ffTM der fa/fa-Tiere. Die geringere Zunahme der Lebendmasse der fa/fa-Tiere im Vergleich zu ihren +/-fa-Geschwistertieren am Ende der 2. Lebenswoche konnte auf die Entwicklung eines deutlich niedrigeren Körperwassergehaltes zurückgeführt werden. Weiterhin verhinderte die NA-Behandlung die Entwicklung von genotypspezifischen Unterschieden in den Plasmainsulin- und Plasmatriacylglycerinspiegeln. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß für die Ätiologie der Frühstadien der fa/fa-Adipositas die Unterfunktion des sympathischen Nervensystems von entscheidender Bedeutung ist.

## 6 Summary

The defective gene "fa" results in a syndrome that includes excessive body fat deposition, hyperglycemia and hyperinsulinemia. The first aim of this study was to systematically analyse the earliest disturbances in energy deposition of fa/fa rats. The second aim was to determine the influence of the sympathetic nervous system on the development of these disturbances.

Animals used in this study were the offspring of Zucker rat x Brown Norway rat hybrid matings. The genotype of these animals could already be identified during the perinatal period using established polymerase chain reaction (PCR) techniques to detect differences in known marker genes which are located less than 2 cM from the fa gene.

Whole body composition analysis of 0- to 16-day-old pups demonstrated that body fat of fa/fa animals does not significantly exceed that of +/-fa animals before 7 days of age. By 16 days of age the body fat content of fa/fa hybrids as well as of fa/fa Zucker rats was so much higher than that of their +/-fa littermates that their genotype could be identified by the relationship between body fat and body mass. At this age the fat free dry mass (ffTM) of fa/fa pups was slightly higher than that of their +/-fa littermates. There was no genotype difference in body water mass. The higher fat mass together with a slightly higher ffTM of fa/fa animals resulted in a significant effect of the genotype on body mass.

Triglyceride content in brown adipose tissue, white adipose tissue, liver and plasma of 1-day-old fa/fa pups was not different from that of their lean littermates. Moreover, there could be found neither genotype differences in liver glycogen, the crucial perinatal energy store, nor in the plasma insulin of fetuses and newborn animals.

The importance of the decreased sympathetic tone for the development of the fa/fa adipositas was tested by chronic oral treatment of 4- to 16-day-old, artificially reared animals with Noradrenalin (NA). This treatment increased the total metabolic rate of both genotypes to the same extent while the mass specific metabolic rate was elevated 120 % above the thermoneutral level. Moreover the fat deposition of both genotypes was equalized at low values. In contrast, the treatment induced no genotype-specific reduction of the fat free dry mass. The reduced growth of fa/fa animals during the 2nd week of life was a consequence of their body water content decreasing compared to that of their +/-fa littermates. Furthermore the development of genotype differences in plasma insulin levels and plasma triglycerides could be eliminated by NA treatment. These results indicate that decreased sympathetic outflow is of crucial importance for the development of the earliest stages of the fa/fa adipositas.

# 7 Literaturverzeichnis

ARGIL&EACUTE;S N. (1989)

The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism.

Prog. Lipid Res. **28** 53 - 66

ATEF N., BRUL&EACUTE; C., BIHOREAU M.T., KTORZA A., PICON L., P&EACUTE;NICAUD L. (1991)

Enhanced insulin secretory response to acetylcholine by perfused pancreas of 5-day-old preobese Zucker rats.

Endocrinology **129** 2219 - 2224

BASHAN N., GROSS V., MOSES S., GUTMAN A. (1979)

Rat liver glycogen metabolism in the perinatal period.

Biochim. Biophys. Acta **587** 145

BAZIN R. UND LAVAU M. (1982)

Development of hepatic and adipose tissue lipogenic enzymes and insulinemia during suckling and weaning on to a high-fat diet in Zucker rats. J. Lipid Res. **23** 839 - 849

BAZIN R., ET&EACUTE;VE D., LAVAU M. (1984)

Evidence for decreased GDP binding to brown-adipose-tissue mitochondria of obese Zucker (fa/fa) rats in the very first days of life.

Biochem. J. **221** 241 - 245

BAZIN R., KRIEF S., DUPUY F., LAVAU M. (1986)

Effet de la surrénalectomie sur la capacité de thermogénèse du tissu adipeux brun et le développement de l'obésité chez le rat fa/fa.

Reprod. Nutr. Dev. **26** 643 - 648

BELL G.E. UND STERN J.S. (1977)

Evaluation of body composition of young obese and lean Zucker rats. Growth **41** 63 - 80

BLAIR M.L. CHEN Y.-H., HISA H. (1986)

Elevation of plasma renin activity by -adrenoceptor agonists in conscious dogs.

Am. J. Physiol. **251** E695 - E702

BOUCHARD C. UND P&EACUTE;RUSSE L. (1993)

Genetics of obesity.

Annu. Rev. Nutr. **13** 337 - 54

BOULANG&EACUTE; A., PLANCHE E., DE GASQUET P. (1979)

Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (fa/fa).

J. Lipid Res. **20** 857 - 864

BOULANG&EACUTE; A., PLANCHE E., DE GASQUET P. (1981)

Onset and development of hypertriglyceridemia in the Zucker rat (fa/fa). Metabolism **30** 1045 - 1052

BRAY G.A. (1989)

Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity-finding the needle in the haystack.

Am. J. Clin. Nutr. **50** 891 - 902

BRAY G.A., YORK D.A., FISLER J.S. (1989)

Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system.

Vitam Horm **45** 1 - 125

BROWNLEE K.A. (1957)

The principles of experimental design.

Industrial quality control **13** 12 - 20

CAMPFIELD L.A., SMITH F.J., GUISEZ Y., DEVOS R., BURN P. (1995)

Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.

Science **269** 546 - 549

CARG L.C. (1992)

Actions of adrenergic and cholinergic drugs on renal tubular cells.

Pharmac. Rev. **44** 81 - 102

CHARD T. (1982)

An introduction to radioimmunoassay and related techniques.

Elsevier Biochemical Press Amsterdam; Amsterdam, New York, Oxford S. 217

CHARON C., MARIE V., DUPUY F., BAZIN R. (1995)

Effect of chronic treatment with BRL 35135 on the onset of obesity in Zucker rat (fa/fa).

Am. J. Physiol. **31** E1039 - 1045

CLEARY M.P., VASSELLI J.R., GREENWOOD M.R.C. (1980)

Development of obesity in Zucker obese (fa/fa) rat in absence of hyperphagia.

Am. J. Physiol. **238** E284 - E292

COLEMAN D.L. (1973)

Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice.

Diabetologia **9** 294 - 298

COLEMAN D.L. (1978)

Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.

Diabetologia **14** 141 - 148

COLEMAN D.L., HUMMEL K.P. (1973)

The influence of genetic background on the expression of the obese (ob) gene in the mouse.

Diabetologia **9** 287 - 293

COOKE P.S., HIGA L., NICOLL C.S. (1986a)

Insulin but not GH directly stimulates growth of transplanted fetal rat paws. Am. J. Physiol. **251** E624 - E629

COOKE P.S., YONEMURA C.U., RUSSELL S.M., C.S. NICOLL (1986b)

Growth and differentiation of fetal rat intestine transplants: dependence on insulin and growth hormone.

Biol. Neonate **49** 211 - 218

CUEZVA J.M., BURKETT E.S., BURKETT D.S., KERR D.S., RODMAN H.M., PATEL M.S.. (1982)  
The newborn of diabetic rat. I. Hormonal and metabolic changes in the postnatal period.  
Pediatr. Res. **16** 632 - 637

DIAZ J., MOORE E., PETRACCA F., STAMPER C. (1983)  
Somatic and central nervous system growth in artificially reared rat pups. Brain Res. Bull. **11** 643 - 647

DON R.H., COX P.T., WAINWRIGHT B.J., BAKER K., MATTICK J.S (1991)  
'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.  
Nucleic Acids Res. **19** 4008

DUGAIL I., QUINGARD-BOULANG&EACUTE; A., BRIGANT L., ETIENNE J., NOE L., LAVAU M. (1988a)  
Increased lipoprotein lipase content in the adipose tissue of suckling and weanling obese Zucker rats.  
Biochem. J. **249** 45 - 49

DUGAIL I., QUINGARD-BOULANG&EACUTE; A., BAZIN R., LE LIEPVRE X., LAVAU M (1988b)  
Adipose-tissue-specific increase in glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase activity and mRNA amounts in suckling pre-obese Zucker rats. Biochem. J. **254** 483 - 487

DURBIN-NALTCHAYAN S., BOUHIK J., MICHEL R. (1983)  
Thyroid status in the obese syndrome of rats.  
Horm. Metab. Res. **15** 547 - 549

ECKERT R. (1986)  
Tierphysiologie  
Thieme, Stuttgart, New York

FLETCHER J.M. (1986a)  
Effects of adrenalectomy before weaning in the genetically obese Zucker rat (fa/fa).  
British Journal of Nutrition **56** 141 - 151

FLETCHER J.M., HAGGARTY P., WAHLE K.W.J., REEDS P.J. (1986b)  
Hormonal studies of young lean and obese Zucker rats.  
Horm. Metabol. Res. **18** 290 - 295

FREINKEL N. (1980)  
Of pregnancy and progeny.  
Diabetes **29** 1023

FRIEDMAN J.M., LEIBEL R.L. (1992)  
Tackling a weighty problem.  
Cell **69** 217 - 220

GIRARD J.R. (1989)  
Control of fetal and neonatal glucose metabolism by pancreatic hormones. Baill. Clin. Endocrin. Metab. **3** 817 - 836

GIRARD J.R., CUENDET G.S., MARLISS E.B., KERVRAN A., RIEUTORT M., ASSAN R. (1973)  
Fuels, hormones, and liver metabolism at term and during the early postnatal period in the rat.

J. Clin. Invest. **52** 3190 - 3200

GOLDSTEIN A.L., JOHNSON P.R. (1980)

Primary cultures of fetal hepatocytes from the genetically obese Zucker rat. Characterization and total lipogenesis.

In vitro **16** 288 - 296

GREENWOOD M.R.C., CLEARY M., STEINGRIMSDOTTIR L., VASSELLI J.R. (1981)

Adipose tissue metabolism and genetic obesity: the LPL hypothesis.

Recent advances in obesity research **3** 75 - 79

GUICHARD C., DUGAIL I., LE LIEPVRE X., LAVAU M. (1992)

Genetic regulation of fatty acid synthetase expression in adipose tissue: overtranscription of the gene in genetically obese rats.

J. Lipid Res. **33** 679 - 687

HALAAS, J.L., GAJIWALA K.S., MAFFEI M., COHEN S.L., CHAIT B.T., RABINOWITZ D., LALLONE R.L., BURLEY S.K., FRIEDMAN J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science **269** 543 - 546

HALL W.G. (1975)

Weaning and Growth of Artificially reared rats.

Science Wash. DC **190** 1313 - 1315

HARRIS R.B.S., HERVEY E., HERVEY G.R., TOBIN G. (1987)

Body composition of lean and obese Zucker rats in parabiosis.

International Journal of Obesity **11** 272 - 283

HARRIS R.B.S., MARTIN R.J. (1984)

Specific depletion of body fat in parabiotic partners of tube-fed obese rats. Am. J. Physiol. **247** R380 - R386

HARRIS R.B.S., MARTIN R.J., BRUCH R.C. (1995)

Dissociation between food intake, diet composition, and metabolism in parabiotic partners of obese rats.

Am. J. Physiol. **268** R874 - R883

ISSAD T., COUPE C., FERRE P., GIRARD J. (1987)

Insulin resistance during suckling period in rats.

Am. J. Physiol. **253** E142 - E148

JAUKER H., MEIERFRANKENFELD B., KLINGENSPOR M., SCHMIDT I. (1994)

Onset of obesity in fatty (fa/fa) Zucker rat x Brown Norway Crosses (Abstract).

Pflügers Arch. Vol. **426**, Suppl. 1,

JOHNSON, P.R., GREENWOOD M.R.C., HORWITZ B.A., STERN J.S (1991)

Animal models of obesity: Genetic aspects.

Annu. Rev. Nutr. **11** 325 - 53

JOHNSON M.D., D.N. SHIER AND A.V. BARGER. Circulating catecholamines and control of plasma renin activity in conscious dogs. Am. J. Physiol. **236**: H463-H470, 1979.

JUNGBLUTH D., SIMON-OPPERMANN C., SCHÜTZ H., GERSTBERGER R., SIMON E. (1994)

Noradrenergic modulation of avian kidney function.

Comp. Biochem. Physiol. **108A** 7 - 16

KAUL R., HELDMAIER G., SCHMIDT I. (1990)

Defective thermoregulatory thermogenesis does not cause onset of obesity in Zucker rats.

Am. J. Physiol. **259** E11 - E18

KAUL R., SCHMIDT I., CARLISLE H.J. (1985)

Maturation of thermoregulation in Zucker rats.

Int. J. Obes. **9** 401 - 409

KERSHAW E.E., CHUA S.C., WILLIAMS J.A., MURPHY E.M., LEIBEL R.L. (1995) Molecular mapping of SSRs for Pgm1 and C8b in the vicinity of the rat fatty locus.

Genomics **27** in press,

KÖRTNER G., PETROVA O., VOGT S., SCHMIDT I. (1994)

Sympathetically and nonsympathetically mediated onset of excess fat deposition in Zucker rats.

Am. J. Physiol. **267** E947 - E953

KRIEF S., BAZIN R., DUPUY F., LAVAU M. (1989)

Role of brown adipose tissue in glucose utilization in conscious preobese Zucker rats.

Biochem. J. **263** 305-308

KRIEF, S. UND BAZIN R. (1991)

Genetic obesity: Is the defect in the sympathetic nervous system? A review through developmental studies in the preobese rat.

Genetic obesity **198** 528 - 538

LANGER H., RAUTENBERG W., ZINKLER D. (1975)

Thermogenese durch Glykogeneinsatz im braunen Fettgewebe der neugeborenen Ratte.

Ver. Dtsch. Zool. Ges. **1974** 242 - 245

LAVAU M., BAZIN R., GUERRE-MILLO M. (1985)

Increased capacity for fatty acid synthesis in white and brown adipose tissues from 7-day-old obese Zucker pups.

Int. J. Obes. **9** 61 - 66

MARGOLIS R.N. (1983)

Regulation of hepatic glycogen metabolism in pre- and postnatal rats. Endocrinology **113** 893 - 902

MARKEWICZ B., KUHMICHEL G., SCHMIDT I. (1993)

Onset of excess fat deposition in Zucker rats with and without decreased thermogenesis.

Am. J. Physiol. **265** E478 - E486

MARTIN R.J., HARRIS R.B.S., JONES D.D. (1986)

Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker fatty rat (fa/fa). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **183** 1 - 10

MARTIN R.J., GAHAGAN J.H. (1977)

The influence of age and fasting on serum hormones in the lean and obese Zucker rats.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **154** 610 - 614

MAYOR F. UND CUEZVA J.M. (1985)

Hormonal and metabolic changes in the perinatal period.

Biol. Neonate **48** 185 - 196

MENUELLE P. UND PLAS C. (1991)

Variations in the antagonistic effects of insulin and glucagon on glycogen metabolism in cultured foetal hepatocytes.

Biochem. J. **277** 111 - 117

MESSER M., THOMAN E.B., TERRASA A.G., DALLMAN P.R. (1969)

Artificial feeding of infant rats by continuous gastric infusion.

J. Nutr. **98** 404 - 410

MOLL P.P., BURNS T.L., LAVER R.M. (1991)

The genetic and environmental sources of body mass index variability: the muscatine ponderosity family study.

Am. J. Hum. Genet. **49** 1243 - 1255

MOORE E., STAMPER C., DIAZ J., MUROWCHICK E. (1990)

Artificial rearing of rat pups using rat milk.

Dev. Psychobiol. **23** 169 - 178

MOORE B.J., ARMBRUSTER S.J., HORWITZ B.A., STERN J.S. (1985)

Energy expenditure is reduced in preobese 2-day Zucker fa/fa rats.

Am. J. Physiol. **249** R262 - R265

MUMM B., KAUL R., HELDMAIER G., SCHMIDT I. (1989)

Endogenous 24-hour cycle of core temperature and oxygen consumption in week-old Zucker rat pups.

J. Comp. Physiol. B. **159** 569 - 575

NÜBLEIN B. (1989)

Entwicklung eines circadianen Kerntemperatur-Rhythmus in den ersten Lebenswochen von Zuckerratten.

Diplomarbeit, FB Biologie/Zoologie, Philipps-Universität Marburg,

NÜBLEIN B., PETROVA O., SCHILDHAUER K., SCHMIDT I. (1993)

Morning depression of cold defense in juvenile rats.

In: Pleschka K. and Gerstberger R. (eds), Integrative and cellular aspects of autonomic functions. John Libbey, London **1994** 295 - 304

NÜBLEIN B. UND SCHMIDT I. (1990)

Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats.

Am. J. Physiol. **259** R270 - R276

NÜBLEIN-HILDESHEIM B. UND SCHMIDT I. (1994)

Norepinephrine-induced phase shifts of the juvenile circadian core temperature rhythm in rat pups.

In: Thermal Balance in Health and Disease, Advances in Pharmacological Sciences, Birkhäuser Verlag, Basel, **1994** 175 - 180

OSBORN J.L., DIBONA G.F., THAMES M.D. (1982)

Role of renal alpha-adrenoceptors mediating renin secretion.

Am. J. Physiol. **242** F620 - F626

PASSONNEAU J. UND LAUFERDALE V.R. (1974)

A comparison of three methods of glycogen measurements in tissues. Analytical Biochemistry **60** 405 - 412

PELLEYMOUNTER M.A., CULLEN M.J., BAKER M.B., HECHT R., WINTERS D., BOONE T., COLLINS F. (1995)

Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science **269** 540 - 543

P&EACUTE;NICAUD L., FERR&EACUTE; P., ASSIMACOPOULAS-JEANNET F., PERDEREAU D., LETURQUE A., JEANRENAUD B., PICON L., GIRARD J. (1991)

Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats.

Biochem. J. **279** 303 - 308

PERSSON P.B., EHMKE H., NAFZ B., KIRCHHEIM H.R. (1990)

Sympathetic modulation of renal autoregulation by caroid occlusion in dogs. Am. J. Physiol. **258** F364 - F370

PLANCHE E., JOLIFF M., DE GASQUET P., LE LIEPVRE X. (1983)

Evidence of a defect in energy expenditure in 7-day old Zucker rat (fa/fa). Am. J. Physiol. **245** E107 - E113

PLANCHE E. UND JOLIFF M. (1986)

La thermogénèse induite par l'alimentation chez le rat Zucker âgé de 2 et 7 jours.

Reprod. Nutr. Dévelop. **26** 91 - 96

PLANCHE E. UND JOLIFF M. (1987)

Evolution des dépenses energetiques chez le rat Zucker au cours de la première semaine de la vie. Effect de l'heure des mesures.

Reprod. Nutr. Bev. **27** 673 - 679

PLANCHE E., JOLIFF M., BAZIN R. (1988)

Energy expenditure and adipose tissue development in 2 to 8-day-old Zucker rats.

Int. J. Obesity **12** 353 - 360

RINK R.J. (1994)

In search of a satiety factor.

Nature **372** 406 - 407

ROHNER-JEANRENAUD F., BOBBIONI E., IONESCU E., SAUTER J.-F., JEANRENAUD B. (1983a)

Central nervous system regulation of insulin secretion.

Advances in metabolic disorders **10** 193 - 220

ROHNER-JEANRENAUD F., HOCHSTRASSER A.-C., JEANRENAUD B. (1983b)

Hyperinsulinemia of preobese and obese fa/fa rats is partly vagus nerve mediated.

Am. J. Physiol. **244** E317 - E322

ROHNER-JEANRANAUD F. UND JEANRANAUD B. (1985)

Involvement of the cholinergic system in insulin and glucagon oversecretion of genetic preobesity.  
Endocrinology **116** 830 - 834

ROMAN R.J. (1986)

Pressure diuresis and mechanisms in the control of renal function and arterial pressure.  
Fedn. Proc. **45** 2878 - 2884

ROTHWELL N.J. UND STOCK M.J. (1979)

A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis.  
Nature **281** 31 - 35

SACHS L. (1978)

Angewandte Statistik: statist. Methoden u. ihre Anwendung.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SCHIRARDIN H. UND BACH A. (1981)

Serum lipids in 8- to 35-day old Zucker rats.  
Arch. Int. Physiol. Biochem. **89** 201 - 206

SCHMIDT I., KAUL R., CARLISLE H.J. (1984)

Body temperature of huddling newborn Zucker rats.  
Pflügers Arch. **401** 418 - 420

SCHMIDT I., STAHL J., KAUL R., CARLISLE H.J. (1985)

Cold-rearing normalizes capacity for norepinephrine-stimulated thermogenesis but not body temperature in 16-day-old fatty Zucker rats. Life Sciences **38** 129 - 136

SCHMIDT I., KAUL R., HELDMAIER G. (1987)

Thermoregulation and diurnal rhythms in 1-week-old rat pups.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. **65** 1355 - 1364

SHARGILL N.S., YORK D.A., MARCHINGTON D.R. (1983)

Regulation of hepatic tyrosine aminotransferase in genetically obese rats. Biochim Biophys Acta **756** 297 - 307

SHEPPARD M.C., SHAPIRO B., HUDSON A., PIMSTONE B.L. (1980)

Tissue and serum somatostatin-like immunoreactivity in lean and obese Zucker rats.  
Horm. Metab. Res. **12** 236 - 239

SMART J.L., STEPHENS D.N., KATZ H.B. (1983)

Growth and development of rats artificially reared on a high or a low plane of nutrition.  
Br. J. Nutr. **49** 497 - 506

SMART J.L., STEPHENS D.N., TONKISS J., AUESTAD N.S., EDMOND J. (1984) Growth and development of rats artificially reared on different milk substitutes.

Br. J. Nutr. **52** 227 - 237

SMOLLER J.W., TRUETT G.E., HIRSCH J., LEIBEL R.L. (1993)

A molecular genetic method for genotyping fatty (fa/fa) rats.  
Am. J. Physiol. **264** R8 - R11

SONNENBERG N., BERGSTROM J.D., HA Y.H., EDMONT J. (1982)

Metabolism in the artificially reared rat pup: effect of an atypical rat milk substitute. *J. Nutr.* **112** 1506 - 1514

SPIERS D.E., ADAIR E.R. (1986)

Ontogeny of homeothermy in the immature rat: metabolic and thermal responses. *J. Appl. Physiol.* **60** 1190 - 1197

STERN J.S. UND JOHNSON P.R. (1977)

Size and number of adipocytes and their implications.

In *Advances in Modern Nutrition. Diabetes, Obesity and Vascular Disease*, Washington, DC: Hemisphere; ed. H.M. Katzen, R.J. Mahler **2** 303 - 341

TAYLOR P.M. (1960)

Oxygen consumption in newborn rats.

*J. Physiol. Lond.* **154** 153 - 168

TENENBAUM R., OCHOA F.Y., SASSANO M.L., CHUA S.C., LEIBEL R.L., CAMPFIELD L.A. (1994)

Altered insulin secretion from the pancreas of pre-obese Zucker rat pups: Evidence for an early and persistent genetic defect (Abstract).

*Int. J. Obes.* **18** P258

TRUETT G.E., BAHARY N., FRIEDMAN J.M., LEIBEL R.L. (1991)

Rat obesity gene fatty (fa/fa) maps to chromosome 5: Evidence for homology with the mouse gene diabetes (db).

*Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** 7806 - 7809

TRUETT G.E., TEMPELMAN R.J., WALKER J.A. (1995)

Codominant effects of the fatty (fa) gene during early development of obesity.

*Am. J. Physiol.* **268** E15 - E20

TURKENKOPF I.J., JOHNSON P.R., GREENWOOD M.R.C. (1982)

Development of pancreatic and plasma insulin in prenatal and suckling Zucker rats.

*Am. J. Physiol.* **242** E220 - E225

VAN DYKE D.C., HUFF R.L., EVANS H.M. (1948)

The efficiency of the vascular union in parabiosis.

*Stanford Med. Bull.* **6** 271 - 275

WATTS C. UND GAIN K.R. (1984)

Insulin in the rat fetus. A new form of circulating insulin.

*Diabetes* **33** 50 - 56

WEST D.B., WAGUESPACK J., MCCOLLISTER S. (1995)

Dietary obesity in the mouse: interaction of strain with diet composition. *Am. J. Physiol.* **268** R658 - R665

WITHERS P.C. (1977)

Measurements of  $V_{O_2}$ ,  $V_{CO_2}$ , and evaporative water loss with a flow-through mask.

*J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* **42** 120 - 123

YOUNG R.A., TULP O.L., HORTON E.S. (1980)

Thyroid and growth responses of young Zucker obese and lean rats to a low protein-high carbohydrate diet. J. Nutr. **110** 1421 - 1431

ZHANG Y., PROENCA R., MAFFEI M., BARONE M., LEOPOLD L., FRIEDMAN J.M. (1994)

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature **372** 425 - 432

ZUCKER L.M. UND ZUCKER T.F. (1961)

Fatty, a new mutation in the rat.

J. Hered. **52** 275 - 278

ZUCKER T.F. UND ZUCKER L.M. (1962)

Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **110** 165 - 171

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im folgenden herzlich bedanken möchte.

Herrn Prof. E. Simon danke ich für die Genehmigung, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung beim Anfertigen meiner Dissertation. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Sie hat durch ihr Engagement im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 680/2-1 der DFG die finanziellen Voraussetzungen für die Durchführung dieser Arbeit geschaffen.

Heike Jauker, Kirsten Hoyer, Petra Buchberger und Ralf Valentin haben mich unermüdlich mit dem Identifizieren der Rättchen und dem Messen von Glykogen und Triacylglycerinen unterstützt. Heike Jauker danke ich besonders für die Etablierung der PCR zur Identifikation des fa-Genlocus an unserem Institut, womit sie die Grundlagen für diese Arbeit setzte. Weiterhin gilt mein Dank Markus Gessner, Susanne Klaus und Georg Breier, die uns PCR Amateuren ständig bereitwillig Hilfestellung leisteten.

Maria Abelenda hat mir während ihres halbjährigen Aufenthaltes an unserem Institut im Rahmen eines Humboldt-Stipendiums immer bereitwillig geholfen und ist mir dabei eine sehr gute Freundin geworden.

Ausdrücklich erwähnen möchte ich weiterhin die unermüdliche Hilfe von Heiko Döring, der viele unerwähnte Grundlagen zur Erstellung dieser Arbeit schaffte, zahlreiche Eichungen und Reparaturen vornahm und uns stets mit seinen Kommentaren und Überraschungseiern bei Laune hielt.

Diana Fuchs hat sich im Rahmen dieser Arbeit zur Expertin für Insulin-RIA's entwickelt und ihr methodisches Wissen jederzeit bereitwillig weitergegeben.

Bernard Jeanrenaud und Françoise Rohner-Jeanrenaud danke ich für anregende Diskussionen sowie die RIA-Kontrollmessungen in ihrem Labor.

Martin Klingenspor und Knut Schwarzer haben einen erheblichen Beitrag zur statistischen Bewertung der hier vorgestellten Ergebnisse geleistet.

Unsere Computerexperten Helmut Busch und Jolanthe Thomanek erhalten für das besonders geduldige Ertragen meiner Schimpftiraden über unfähige Programme und schlechtgelaunte Computer sowie für das

Einarbeiten in alle neuen Programme und ihre ständig bereitwillige Beantwortung tausendundeiner Frage, ein besonders dickes Lob.

Allen Technischen Assistentinnen sei für die Hilfe bei der Herstellung von Verbrauchsmaterialien zur Durchführung der Experimente gedankt, ebenso dem Personal der elektronischen und mechanischen Werkstatt für die Hilfe bei allen Neuanfertigungen und Reparaturen der Versuchsstände.

Allen ehemaligen und heutigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen der I. Physiologischen Abteilung des Bad Nauheim möchte ich für die gute Kooperation danken.

## Lebenslauf

Name:	Meierfrankenfeld
Vorname:	Birgit
Geburtsdatum:	16.04.1967
Geburtsort:	Langenberg, NRW
Familienstand:	ledig
Beruflicher Werdegang:	
1973 bis 1977	Gemeinschaftsgrundschule Langenberg
1977 bis 1986	Ratsgymnasium Rheda-Wiedenbrück
12.06.1986	Abitur
1986 bis 1992	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
21.04.1992	Approbation als Tierarzt
27.03.92 bis 28.06.92	Hospitation in der Allpets-Clinic Boulder, Colorado, USA
01.07.92 bis 31.10.93	Assistentin in der Tierärztlichen Klinik Dr. Suschka in Gütersloh
01.11.93 bis 30.09.95	wissenschaftliche Hilfskraft und Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung Physiologie, Bad Nauheim
seit 01.10.95	Veterinärreferendarin der Bezirksregierung Detmold