

Aus dem

Institut für Medizinische Psychologie
und Verhaltensneurobiologie Tübingen

**Modulation der frühen Gentranskription in mesolimbischen
Gehirnarealen nach einer zuckerreichen Diät**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schörk, Gregor Roland

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hallschmid

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Hage

Tag der Disputation: 16.03.2026

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Adipositas	8
1.2 Zuckerkonsum und Adipositas	11
1.3 Wirkung von Zucker auf das Gehirn	12
1.4 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Tierexperimentelle Studie	16
2.2 Perfusion	16
2.3 Immunohistochemie	17
2.4 Konfokale Bildgebung	18
2.5 Regionen von Interesse	19
2.6 Bildanalyse	19
2.7 Statistik	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Neuronale Zellaktivität nach 8-wöchiger zuckerreicher Diät	24
3.2 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene +2,52	24
3.3 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene +1,44	26
3.4 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene -1,80	27
3.5 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene +2,52 nach Glukosestimulus	28

3.6 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene	
+1,44 nach Glukosestimulus	30
3.7 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene	
-1,80 nach Glukosestimulus	32
4. Diskussion	37
4.1 Das Tuberculum olfaktorium, Modulator von Zuckerpräferenz und Stoffwechselregulation	37
4.2 Aktivierung des medialen parvozellulären paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (PaMP) nach zuckerreicher Diät und Glukosestimulus	39
4.3 Rolle der Amygdala in der Regulation von Nahrungspräferenz und neuronaler Plastizität nach zuckerreicher Diät	41
4.4 Limitationen und Ausblick	42
5. Zusammenfassung	44
Summary	46
6. Literaturverzeichnis	47
7. Erklärung zum Eigenanteil	52
Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

aca:	vordere Kommissur
AcbC:	Nucleus Accumbens Kern
AcbSh:	Nucleus Accumbens Schale
BLA:	basolateraler, amygdaloider Nucleus anterior
CM:	zentraler medialer thalamischer Nucleus
DP:	Dorsaler Pedunculus cerebellaris
DTT:	Dorsale Tenia Tecta
IL:	infralimbischer Kortex
L1-3:	Schicht 1-3 des Kortex
LSV:	lateral septaler Nucleus, ventraler Teil,
LSI:	lateral septaler Nucleus, mittlerer Teil
MS:	medialer septaler Nucleus
Nv:	navicularer Nucleus basales frontales Gehirn
PaV:	paraventriculärer Hypothalamus, ventraler Nucleus
PaXi:	paraxiphoider Nucleus des Thalamus
PaDC:	dorsales Horn des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus
PaLM:	lateral magnozellularer paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
PaMP:	medialer parvozellulärer paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
Pir 2:	piriform Kortex Schicht 2
PLH:	pedunculärer Teil des lateralen Hypothalamus
PVA:	anteriorer paraventriculärer Thalamus Nucleus, anterior

Rh: rhomboider thalamischer Nucleus
Re: thalamischer Nucleus Reuniens
Shi: septaler hippocampaler Nucleus
Tu1-3: olfaktorisches Tuberkel 1-3
VDB: verticaler Nucleus limbdiagonales Band
Vre: ventraler thalamischer Nucleus Reuniens
Xi: xiphoider thalamischer Nucleus

1. Einleitung

Die Adipositas ist eines der drängendsten globalen Gesundheitsprobleme unserer Zeit. Die stetig wachsende Prävalenz dieser chronischen Stoffwechselerkrankung ist oft eine Folge individueller Lebensstilentscheidungen und steht zunehmend im Zusammenhang mit tiefgreifenden gesellschaftlichen, kulturellen und ernährungsbedingten Verhaltensweisen. Besonders die sogenannte „westliche Ernährung“, die reich an Zucker, raffinierten Fetten und hochverarbeiteten Lebensmitteln ist, gilt als ein wesentlicher Treiber für die Zunahme der Adipositas in vielen Teilen der Welt. Neben den bekannten körperlichen Folgeerkrankungen wie Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf- und Fettlebererkrankungen rücken in den letzten Jahren auch die Auswirkungen einer zuckerreichen Ernährung auf das zentrale Nervensystem und die kognitive Leistungsfähigkeit zunehmend in den Fokus der Forschung. Neue wissenschaftliche Studien zeigen, dass übermäßiger Zuckerkonsum nicht nur metabolische Prozesse, sondern auch die Gehirnfunktion beeinflussen kann. Zum Beispiel die gezeigte Beeinträchtigung von Lern- und Gedächtnisprozessen sowie Veränderungen in der neuronalen Aktivität können eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Adipositas spielen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen einer langfristigen zuckerreichen Ernährung auf molekularer, zellulärer und neuronaler Ebene im Gehirn zu untersuchen und dadurch ein besseres Verständnis für die komplexen Zusammenhänge zwischen Ernährung, Veränderungen im Gehirn und Verhalten zu gewinnen.

Im Zentrum dieser Dissertation steht die Frage, wie sich eine mehrwöchige zuckerreiche Ernährung auf das zentrale Nervensystem, insbesondere auf zellulärer Ebene im Gehirn auswirkt. Dazu wurde ein multiparametrischer Bildgebungsansatz verwendet, der funktionelle Bildgebung (PET/fMRT) mit der immunhistochemischen Analyse neuronaler Aktivität im Gehirn von Ratten verknüpft. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, wie sich eine achtwöchige flüssige Zuckerdiät auf die neuronale Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren nach Glukosebelastung auswirkt. Der Fokus lag dabei auf der Expression des Transkriptionsfaktors cFOS als Marker für zelluläre Aktivität in verschiedenen Gehirnarealen. Die Ergebnisse zeigten eine differenzierte Reaktion im Gehirn: Während einige Regionen eine tendenziell erhöhte Zellaktivierung aufwiesen, zeigten andere eine verminderte Aktivität. In zahlreichen weiteren Gehirnarealen ließ sich keine signifikante Veränderung nachweisen. Diese regional unterschiedlichen Aktivitätsmuster deuten darauf hin, dass Zucker nicht nur isoliert, sondern kontextabhängig auf Gehirnstrukturen wirkt und deren Funktion sowie Konnektivität zu anderen Regionen modulieren kann. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wird im weiteren Verlauf der Arbeit diskutiert, inwiefern solche neuronalen Veränderungen mit veränderten Verhaltensweisen – etwa gesteigerter Nahrungssuche und -aufnahme oder Belohnungssensitivität – in Verbindung stehen könnten. Ziel der Arbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis der neuronalen Grundlagen Adipositas assoziierten Verhaltens zu leisten. Damit werden Perspektiven für präventive oder therapeutische Ansätze eröffnet, um die negativen Effekte einer zuckerreichen Ernährung gezielter zu adressieren.

1.1 Adipositas

Adipositas ist definiert als chronische Stoffwechselkrankheit, die durch eine positive Ernährungsbilanz und dadurch eine starke Zunahme von Körperfett verursacht wird. Mit der Adipositas können Folgeerkrankungen wie Diabetes und Herz-Kreislaufkrankungen einhergehen, darunter Typ-2-Diabetes, nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), Herz-Kreislauf-Erkrankungen und verschiedenen Krebsarten (WHO, 2025, Bray 2004).

Zudem erhöhen metabolische Entgleisungen das Risiko, neurodegenerative Erkrankungen wie zum Beispiel Alzheimer zu entwickeln (Cho YK et al. 2021). Die sogenannte „westliche Ernährung“ begünstigt vermutlich die Gewichtszunahme auf Grund einer erhöhten Energieaufnahme (Hu, van Dam und Liu 2001). Raffinierte Kohlenhydrate

sind ein großer Bestandteil der "westlichen Ernährung" und erhöhen die tägliche Zuckeraufnahme.

Die westliche Ernährungsweise wird mit kognitiven Beeinträchtigungen in Verbindung gebracht, insbesondere bei Lern- und Gedächtnisfunktionen, die vom Hippocampus abhängen. Studien zeigen, dass der Konsum von gesättigten Fetten und einfachen Kohlenhydraten Veränderungen im Hippocampus hervorrufen kann, die möglicherweise mit einer Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten zusammenhängen. Kanoski und Davidson (2011) stellen ein Modell vor, bei dem die westliche Ernährung eine wichtige Form der Gedächtnishemmung im Hippocampus stört. Diese Gedächtnishemmung, ermöglicht es den Tieren, auf Nahrungsreize aus der Umwelt zu verzichten. Die Folge ist, dass die Tiere mehr essen, als sie aufgrund ihres Kalorienbedarfs benötigen (Kanoski und Davidson 2011).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Adipositas und Typ-2-Diabetes wichtige Risikofaktoren während der Pathogenese von kognitiven Dysfunktionen sind. Es stellt sich die Frage, wie die Adipositas oder Diabetes zu einem um 50 % erhöhten Risiko für Demenz beitragen können? Und wie hängen Gewicht, Stoffwechsel und die Gehirngesundheit zusammen? Ein wichtiger Faktor könnte die Auswirkung von Entzündungen, die unter anderem oxidativem Stress im Gehirn produzieren sein. Jahrzehntelange Studien zu einer Vielzahl von Krankheiten, darunter Krebs und Herzerkrankungen, haben gezeigt, dass Entzündungen und insbesondere oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der menschlichen Pathologie der Demenz spielen. Viele der metabolischen Prozesse, die die Herzkranzgefäße und inneren Organe beeinträchtigen, wirken sich auch auf das Gehirn aus. Entzündungen führen zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Dies verursacht die Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Oxidantien, was letztendlich zu einer Funktionsstörung oder zum Absterben von Nervenzellen führt. Entscheidend ist, dass dieser Prozess einen Teufelskreis auslösen kann: Absterbende Nervenzellen können weitere

Entzündungen verursachen und so eine Kaskade von Neurodegenerationen auslösen (Shalev und Arbuckle 2017).

Die neuropathologische Grundlage der Adipositas wurde in verschiedenen Studien mit verschiedenen Hypophysen- oder Hypothalamus-Syndromen schon vor vielen Jahren nachgewiesen. Die wahrscheinlich früheste Beschreibung eines Hypophysentumors in Verbindung mit Adipositas wurde 1840 von Mohr veröffentlicht, obwohl ein Ursache-Wirkungs-Zusammenhang zwischen Hypophysentumoren und Adipositas erst durch zwei Veröffentlichungen von Babinski im Jahr 1900 und Fröhlich im Jahr 1901 vermutet wurde (Lee und Mattson 2014). Diese Fallberichte beschrieben die klinischen und pathologischen Merkmale dessen, was unterschiedlich als adiposogenitale Dystrophie oder hypothalamischer Infantilismus-Adipositas bezeichnet wurde. Klinisch handelte es sich bei diesen Fällen von hypothalamischer Adipositas um komplexe Störungen, die durch Kopfschmerzen, Sehstörungen oder Sehverlust, Adipositas und Hypogonadismus (Infantilismus) gekennzeichnet waren. Auch der Zellstoffwechsel ist neben dem kognitiven Verhalten nachweislich dysreguliert, was eine verringerte Expression des neuronalen Wachstumsfaktors (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), erhöhten oxidativen Stress und proinflammatorische Prozesse in Neuronen einschließt. Schlussendlich verstärken sowohl Diabetes als auch Adipositas die Entzündungen systemisch. (Lee und Mattson 2014).

Auch wenn heutzutage schon viel getan wird, um die Prävalenz der Adipositas zu reduzieren, ist sie nach wie vor eine Epidemie, die zahlreiche Länder weltweit betrifft. Schätzungen zufolge sind 50% der Erwachsenen und 16% der Kinder in der westlichen Welt übergewichtig oder fettleibig (OECD, 2017), mehr als doppelt so viel wie vor 30 Jahren (WHO, 2025), und die Prävalenzraten steigen weiter an.

1.2 Zuckerkonsum und Adipositas

Die stetige Erhöhung der Adipositasprävalenz in den letzten Jahrzehnten wird nicht zuletzt auf den erhöhten Konsum von flüssigem Zucker in Form von gesüßten Getränken wie Softdrinks, Säften und Alkohol zurückgeführt (Pereira 2006; Vartanian 2007; Wang et al., 2008; Ludwig et al., 2011; Siervo et al., 2014). Mehrere Studien an Mäusen und Ratten konnten vor allem die adipositasfördernde Wirkung von flüssiger Saccharose bestätigen (Glendinning et al., 2012; Malafaia et al., 2013; Ahmed et al., 2014). Zum Beispiel führt flüssige Saccharose bei Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Kalorienaufnahme und des Triglyceridspiegels in der Leber, während dies bei Zucker in Festform nicht der Fall ist (Ritze et al., 2014). Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Studie flüssige Saccharose im Trinkwasser (30%) ad libitum verabreicht (s. Kapitel zu Material und Methoden).

Als preiswerter Rohstoff wird Zucker in großen Mengen in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, obwohl die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt, dass der Zuckerkonsum von „freien Zuckern“, sowohl für Erwachsene als auch für Kinder, weniger als 10% der täglichen Energiemenge und vorzugsweise sogar weniger als 5% betrage (WHO, 2015). "Freie Zucker" sind in diesem Zusammenhang Monosaccharide und Disaccharide wie zum Beispiel natürlich vorkommende Zucker in Honig, Sirup, Fruchtsäften und Fruchtsaftkonzentraten. Außerdem wird raffinierter Zucker, der Lebensmitteln oder Getränken von Herstellern, Köchen oder Verbrauchern zugesetzt wird, dazu gezählt (WHO, 2015).

Der Zuckerkonsum in Form von zuckerhaltigen Lebensmitteln hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen (WHO 2025), in Deutschland von 1960 bis 2017 um fast 15% (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2019). Der Zuckerkonsum in Deutschland macht bei Frauen und Männern etwa 13-14% der aufgenommenen Energiemenge aus (Ernst et al. 2019). Die Hauptquellen von "freiem Zucker" sind

Erfrischungsgetränke, Fruchtsäfte und Süßwaren sowie Backwaren (Ernst et al. 2019).

1.3 Wirkung von Zucker auf das Gehirn

Innerhalb von nur fünf Tagen nach Beginn einer Cafeteria-Diät (mit oder ohne 10 % flüssiger Saccharose) oder einer mit flüssiger Saccharose ergänzten Chow-Diät wurden Beeinträchtigungen bei der vom Hippocampus abhängigen Ortserkennungsaufgabe bei den Ratten festgestellt. Diese Ratten waren jedoch in der Lage, nach ebenfalls nur 5 Tagen Diät ein neues Objekt bei der vom Perirhinalbereich abhängigen Objekterkennungsaufgabe zu identifizieren. Nach einem Monat Diät gab es keine Auswirkungen der Diät auf die Expression neurotropher Marker wie zum Beispiel den neurotrophen Faktor (BDNF) im Hippocampus. Interessanterweise gab es aber große entzündliche Veränderungen. Insbesondere wiesen die mit Cafeteria-Futter und Saccharose gefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten erhöhte Werte des Tumornekrosefaktors Alpha (TNF- α) und des Interleukins 1 Beta (IL-1 β) im Hippocampus auf. Diese Werte waren allerdings nur bei den mit Saccharose gefütterten Ratten tendenziell erhöht, während bei den nur mit Cafeteria-Futter gefütterten Ratten keine dieser Veränderungen zu beobachten waren. Anzumerken ist, dass die entzündlichen Veränderungen in engem Zusammenhang mit Defiziten bei der Ortserkennung standen. (Beilharz et al., 2014; Kendig, 2014; Beilharz et al., 2015), des Belohnungsverhaltens (Ahmed et al., 2013; Lockie et al., 2015) und der Reaktion auf Stress (Morris et al., 2015) wurden allesamt als Folge der zuckerhaltigen Diäten beobachtet. Abträgliche Veränderungen der Struktur oder Funktion von zentralnervösen Regionen wie dem Hypothalamus, der Amygdala, dem ventralen tegmental Bereich und dem Nucleus accumbens werden mit zuckerinduzierten kognitiven Veränderungen in Verbindung gebracht (Diepenbroek et al., 2013; Stice et al., 2013). Allerdings haben nur wenige Studien eine Korrelation zwischen peripheren

und zentralen molekularen Veränderungen hergestellt, die für solche Beeinträchtigungen verantwortlich sein könnten.

Bis heute fehlt ein umfassendes Verständnis darüber, wie sich die chronische Aufnahme von zuckerreichen Diäten auf die Signalübertragung in zentralen neuronalen Netzwerken auswirkt. Viele Hirnareale sind an der Wahrnehmung von Nährstoffen aus der Nahrung und deren Stoffwechselprodukten beteiligt (Steinbusch et al. 2015, Koekkoek et al. 2017). Ein Beispiel ist die glykämie regulierende Rolle von glukosesensitiven Neuronen in hypothalamischen Kernen, die umfassend untersucht wurde (Steinbusch et al. 2015). Während glykämische Regulationsprozesse unter anderem im Hypothalamus und Hirnstamm gesteuert werden (Morton et al. 2006), wurde dem mesolimbischen System eine Rolle bei der Modulation des hedonischen Essverhaltens zugeschrieben (Berthoud 2011 et al. 2011).

Multiparametrische bildgebende Verfahren sind sehr gut geeignet, um zu untersuchen, wie zuckerreiche Diäten die Gehirnfunktion beeinflussen. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit dem Radiotracer [¹⁸F] Fluordesoxyglukose ([¹⁸F]FDG) kann zum Beispiel den zellulären Glukoseverbrauch darstellen, der die Gehirnaktivität auf metabolischer Ebene widerspiegelt (Sala-Rabanal, et al. 2016). Ergänzend dazu zeigt die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRI), die das vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhängige Signal (BOLD) verwendet, die Hirnaktivität über hämodynamische Veränderungen (Ogawa, et al. 1990). Veränderungen der funktionellen Konnektivität (FC), werden durch kohärente Fluktuationen zwischen den BOLD-Signalen verschiedener Hirnregionen identifiziert (Biswal, et al. 1995).

Insgesamt spiegeln sowohl die [¹⁸F]FDG-PET- als auch die fMRI-Messungen die neuronale Aktivität nur indirekt wider und können durch die frühe Gen-Bildgebung ergänzt werden. Dabei wird die Expression früher Transkriptionsfaktoren (z. B. c-Fos), die bei der Zellaktivierung in den Zellkernen exprimiert werden gemessen und mit neuronalen Markern (z. B.

NeuN) kolokalisiert (Herrera 1996, Herdegen 1998). Die Kombination von [18F]FDG-PET, fMRI und frühem Gen-Imaging liefert einzigartige Informationen zur Entschlüsselung der Auswirkungen einer zuckerreichen Ernährung auf das Gehirn.

1.4 Fragestellung

In einer Vorläuferstudie in dem hier verwendeten Nagetiermodell setzten wir den oben beschriebenen multiparametrischen Bildgebungsansatz ein, um die Veränderungen der Gehirnfunktion bei der akuten Verarbeitung einer intravenösen Glukosebelastung durch eine zuckerreiche Diät zu untersuchen (noch nicht publizierte Daten). Die Analyse von physiologischen Diabetes-Markern soll dabei weitere systemische und neurologische Veränderungen aufzeigen.

Um vorbeugende Maßnahmen und wirksame Behandlungen zur Reduktion der Adipositas entwickeln zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die zellulären Veränderungen, die der Entstehung von Adipositas zugrunde liegen, zu verstehen. In der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden deshalb die Veränderungen von Transkriptionsfaktoren nach einer achtwöchigen flüssigen, zuckerreichen Diät auf zentraler zellulärer und neuronaler Ebene untersucht. Mit Antikörperfärbungen wurde die neuronale Zellaktivität nach einem Glukosestimulus in verschiedenen Gehirnregionen gemessen. Dabei wurden neuronale Zellen mit dem neuronenspezifischen Antikörper NeuN und aktivierte Zellen mit Hilfe des Transkriptionsfaktors cFOS markiert. Die mit Antikörper gefärbten Regionen wurden mit Hilfe von Aktivitätsmustern der PET/fMRT Analyse ausgewählt.

Im Zentrum steht die Fragestellung, in welcher Weise eine mehrwöchige zuckerreiche Ernährung das zentrale Nervensystem beeinflusst. Hier wird der Fokus auf zelluläre Mechanismen im Gehirn gelegt, das heißt wir haben die Veränderung der Aktivität von Neuronen nach der zuckerreichen Diät systematisch analysiert. Ziel war es, die Auswirkungen einer achtwöchigen

flüssigen zuckerreichen Diät auf die neuronale Aktivität nach einer Glukosestimulation systematisch zu untersuchen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein multiparametrischer Untersuchungsansatz gewählt, der funktionelle Bildgebung (PET/fMRT) mit immunhistochemischen Analysen verknüpft. Mittels Antikörperfärbungen wurde die neuronale Aktivität erfasst, wobei cFOS als Marker für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und NeuN als neuronenspezifischer Marker eingesetzt wurden. Die Auswahl der untersuchten Hirnregionen orientierte sich an Aktivitätsmustern, die zuvor durch die funktionelle Bildgebung identifiziert worden waren.

Auf Gehirnschnitten wurde die regionalspezifische Modulation der neuronalen Aktivität untersucht. Die Frage war, ob bestimmte Hirnareale nach der Zuckerdiät eine erhöhte oder reduzierte cFOS-Expression aufweisen, oder keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden kann. Die Frage war, ob eine zuckerreiche Ernährung zu einem globalen Effekt auf das Gehirn führt, oder differenziert und kontextabhängig auf einzelne Strukturen wirkt. Dadurch würden sowohl die Funktion einzelner Regionen als auch deren Konnektivität zu anderen neuronalen Netzwerken potenziell moduliert.

Innerhalb der Diskussion wird erörtert, inwiefern die beobachteten neuronalen Veränderungen mit modifiziertem Verhalten, insbesondere mit gesteigerter Nahrungsaufnahme, veränderter Nahrungssuche oder einer erhöhten Belohnungssensitivität, in Verbindung gebracht werden können. Damit leistet die Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der neuronalen Grundlagen Adipositas assoziierter Verhaltensweisen.

Langfristig dient die in dieser Dissertation bearbeitete Fragestellung dazu, Erkenntnisse für die Entwicklung präventiver sowie therapeutischer Ansätze, die gezielt auf die negativen Effekte einer zuckerreichen Ernährung abzielen zu generieren.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Ablauf der Studie

In der vorliegenden Studie erhielten Lewis-Ratten acht Wochen lang entweder reguläres Trinkwasser oder eine zuckerreiche Trinklösung. Die Tiere wurden dazu in eine mit Wasser versorgte Gruppe (n=32) und eine Gruppe, die mit 30% Saccharose angereicherte Lösung erhielt (n=32), aufgeteilt. Beide Gruppen wurden unabhängig von der unterschiedlichen Trinklösung acht Wochen lang mit phytoöstrogenreduziertem Futter gefüttert. Wasser-, Saccharose- sowie die Futterraufnahme wurden zweimal wöchentlich protokolliert. Außerdem wurden die Ratten zweimal pro Woche gewogen. Nach 8 Wochen wurden die Ratten anästhesiert, die Gehirne und Organe perfundiert und wie im Folgenden beschrieben mit Paraformaldehyd fixiert. Alle in dieser Studie verwendeten experimentellen Verfahren wurden in Übereinstimmung mit den europäischen Tierschutzgesetzen und -richtlinien (Richtlinie 86/609, 1986 Europäische Gemeinschaft) durchgeführt und vom Regierungspräsidium Tübingen unter der Genehmigungsnummer MPV 3/16 genehmigt.

2.2 Perfusion

Für die Perfusion wurden Einschnitte entlang des Brustkorbs der Ratte vorgenommen, um das Herz freizulegen, und die Perfusionsnadel wurde mit einer festen Druck- und Drehbewegung in die linke Herzkammer eingeführt, die durch einen dunkleren Fleck gekennzeichnet ist, der gebündeltes Blut enthält, während das Herz mit einer Zange festgehalten wurde. Nach dem Einstich wurde die Perfusionspumpe auf eine kontinuierliche Infusionsrate von 10 ml/Minute eingestellt, und an der Nadeleinstichstelle wurde beobachtet, ob Flüssigkeit aus dem Herzen austritt. Im Falle einer unzureichenden Nadeleinführung wurde das Herz mit einem Hämostat um die Perfusionsnadel herum abgeklemmt, um den Druck aufrechtzuerhalten. Nach erfolgreichem Einstechen der Nadel wurde ein kleiner Schnitt in den rechten Vorhof des Herzens gesetzt, um den Blutfluss

aus dem Herzen zu ermöglichen. Die Infusionsrate wurde auf 50 ml/Minute erhöht, und die Ratte wurde mit 50 ml 1x DPBS perfundiert, bevor auf 4,5% PFA umgestellt wurde. Es wurden 150-200 ml 4,5%iges PFA verwendet, bis die vollständige Perfusion durch die Versteifung von Hals, Schwanz, von Gliedmaßen und Nase, die Verfärbung der Extremitäten und der Nase sowie eine Bewegung der Gliedmaßen während der PFA-Zirkulation durch den Körper bestätigt wurde.

Nach erfolgreicher Perfusion wurde die Ratte enthauptet, und das Gehirn wurde entfernt. Die Hirnentfernung erfolgte durch einen vertikalen Schnitt an der Rückseite des Schädels, der horizontal bis zu den Augenhöhlen verlängert wurde. Anschließend wurde die Schädeldecke entfernt und das Gehirn mit einem stumpfen Spatel von der Schädelbasis abgetrennt. Das Gehirn wurde in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen mit 25 ml 4,5%igem Wasser gegeben und eine Stunde lang auf Eis gelegt, bevor es in 1x DPBS gewaschen, in ein neues Fläschchen mit 25 ml 1x DPBS überführt und bei 4 °C gelagert wurde.

2.3 Immunohistochemie

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Tiere transkardial mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, gefolgt von 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4). Die Gehirne wurden extrahiert, über Nacht in PFA 4% postfixiert und koronal in 60 µm-Schritten geschnitten. Einzelne Schnitte wurden entnommen und in mit PBS 0,1 M gefüllte Vertiefungen getaucht. Die Immunchemie für c-Fos und NeuN wurde an freischwimmenden Schnitten durchgeführt. Die Bregmaebenen -1,80 mm, +1,44 mm und +2,54 mm, gemäß den Koordinaten des Atlas von Paxinos und Watson, 2007, wurde aufgrund der in den fMRI- und PET-Daten der Vorläuferstudie beobachteten Hirnaktivität gewählt. Entsprechend wurden Veränderungen in diesen Regionen durch die zuckerreiche Diät in der vorliegenden Studie auch auf zellulärer Ebene untersucht.

Neuronale Aktivität auf zellulärer Ebene wurde mit einem Antikörper gegen das c-Fos-Protein, einen frühen Transkriptionsfaktor, nachgewiesen. Zusätzlich wurde NeuN, ein Marker für Neuronen, verwendet, um festzustellen, wie viele c-Fos-positive Zellen wirklich neuronal sind. Es wurden drei Schichten pro Bregmaebene angefärbt. In allen Fällen wurde dreimal mit PBS 0,1 M gewaschen, und die Blocklösung bestand aus 10%igem Ziegenserum (s-1000, Vector Laboratories, Linaris Biological Products, Deutschland) in 1x PBS. Nach dem Waschen wurden die Schnitte zwei Stunden in der Blocklösung vorinkubiert. Ein c-Fos-Antikörper (1:1000, monoklonaler Maus-Antikörper (C-10), sc-271243, Santa Cruz Biotechnology, USA) wurde aufgetragen und die Schnitte wurden 72 Stunden lang bei 4 °C im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (1:2000, Alexa Flour 488, Ziege Anti-Maus IgG H+L, ab150117, Abcam, Deutschland) für 2 Stunden bei RT aufgetragen. Auf die gewaschenen Schnitte wurde der Anti-NeuN-Antikörper (Anti-NeuN, Klon A60, Alexa Fluor®555 konjugiert, Agilent, Deutschland) in einer Blockierungslösung aufgetragen und 72 Stunden bei 4°C inkubiert, gefolgt vom Waschen der Schnitte. Schließlich wurden die Schnitte mit DAPI gefärbt (10 min, RT). Die Schnitte wurden mit Fluoromount-G (H-100, VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, Linaris Biological Products, Deutschland) auf Objektträger montiert.

2.4 Konfokale Bildgebung

Die Bilder der Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskopiesystem (Konfokales Mikroskop LSM 710, Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Die Bilder wurden durch lineare Helligkeits- und Kontrasttransformationen nachbearbeitet, um die Sichtbarkeit zu verbessern. Für die Abbildungen wurden die Bilder mit CorelPhotoPaintX6 (CorelPhotoPaintX6, Corel Cooperation, Kanada) bearbeitet.

2.5 Regionen von Interesse

Die Regionen von Interesse (ROI, regions of interest) wurden unter Verwendung eines DAPI-Antikörpers und der in Paxinos und Watson (2007) beschriebenen anatomischen Richtlinien bestimmt. Die Analyse der den zwei Versuchsgruppen entnommenen Schnitte erfolgte verblindet.

Folgende Regionen wurden auf c-Fos- und NeuN-markierte Zellen hin untersucht: Schicht 1-3 Kortex (L1-3), dorsale Tenia Tecta (DTT), dorsaler Pedunculus cerebellaris (DP), infralimbischer Kortex (IL), navicularer Nucleus basales frontales Gehirn (Nv), Nucleus Accumbens Kern (AcbC), Nucleus Accumbens Schale (AcbSh), Commissura anterior (aca), lateraler septaler Nucleus ventraler Teil (LSV), lateraler septaler Nucleus, mittlerer Teil (LSI), septaler hippocampaler Nucleus (Shi), medialer septaler Nucleus (MS), verticaler Nucleus limbdiagonales Band (VDB), vordere Kommissur (aca), olfaktorischer Tuberkel 1 (Tu1), anteriorer paraventriculärer Thalamus Nucleus anterior (PVA), zentraler medialer thalamischer Nucleus (CM), paraventriculärer Hypothalamus, medial, parvozellulär (PaMP), paraventriculärer Hypothalamus, ventraler Nucleus (PaV), paraventriculärer Hypothalamus, dorsales Horn (PaDC), paraventriculärer Hypothalamus, lateral, magnozollulär (PaLM), rhomboider thalamischer Nucleus (Rh) thalamischer Nucleus Reuniens (Re), ventraler thalamischer Nucleus Reuniens (Vre), paraxiphoider Nucleus des Thalamus (PaXi) xiphoider thalamischer Nucleus (Xi), pedunculärer Teil des lateralen Hypothalamus (PLH), piriform Kortex Schicht 2, (Pir 2), basolateraler, amygdaloider Nucleus anterior (BLA).

2.6 Bildanalyse

Die gescannten Bilder wurden mit der Software ImageJ (National Institutes of Health) ausgewertet und für die Abbildungen bearbeitet. Die Anzahl der für c-Fos und NeuN markierten Zellen sowie die Ko-Lokalisierung wurden manuell auf der Fiji-Softwareplattform mit dem ImageJ-Plugin Cell Counter

(NIH, USA) gezählt. Für jedes Experiment wurde die Anzahl der Zellen aus den Zählungen von drei Schnitten pro Bregmaebene gemittelt.

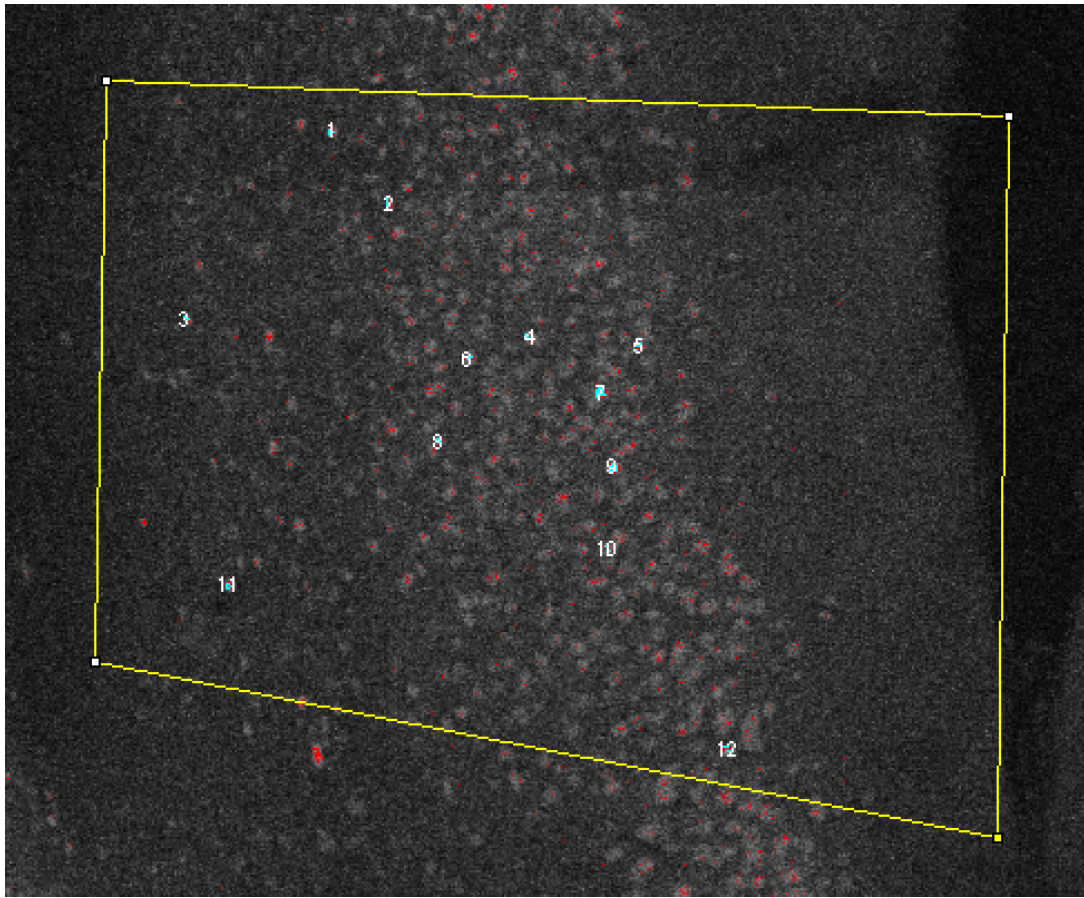


Abbildung 1: Bregma +2.52 DP links, cFOS Antikörper plus Alexa488-Sekundärantikörper. DP, dorsaler Pedunculus cerebellaris.

Abbildung 1 zeigt den dorsalen Pedunculus cerebellaris in Bregma Ebene +2,52. Die Zellen sind mit einer cFos Antikörperfärbung gefärbt. Das gelbe Rechteck umrahmt die Fläche in der die Zellen mit signifikanter Färbung gezählt wurden. Die Zellen mit signifikanter Färbung sind numeriert. Hier wurde als anschauliches Beispiel ein Bild mit wenigen Zellen gewählt. Man sieht die Numerierung von 1-12 (Abb. 1).

Abbildung 2 zeigt ebenfalls die cFOS Antikörperfärbung in der Bregmaebene +2,52, diesmal im dorsalen Pedunculus cerebellaris, diesmal allerdings auf der rechten Seite des Ventrikels. Umrahmt im gelben

Rechteck ist wieder die Fläche zu sehen, in der die Zellen gezählt wurden. Diesmal sieht man die Zellzahl von 1-10 anhand der Numerierung (Abb. 2).

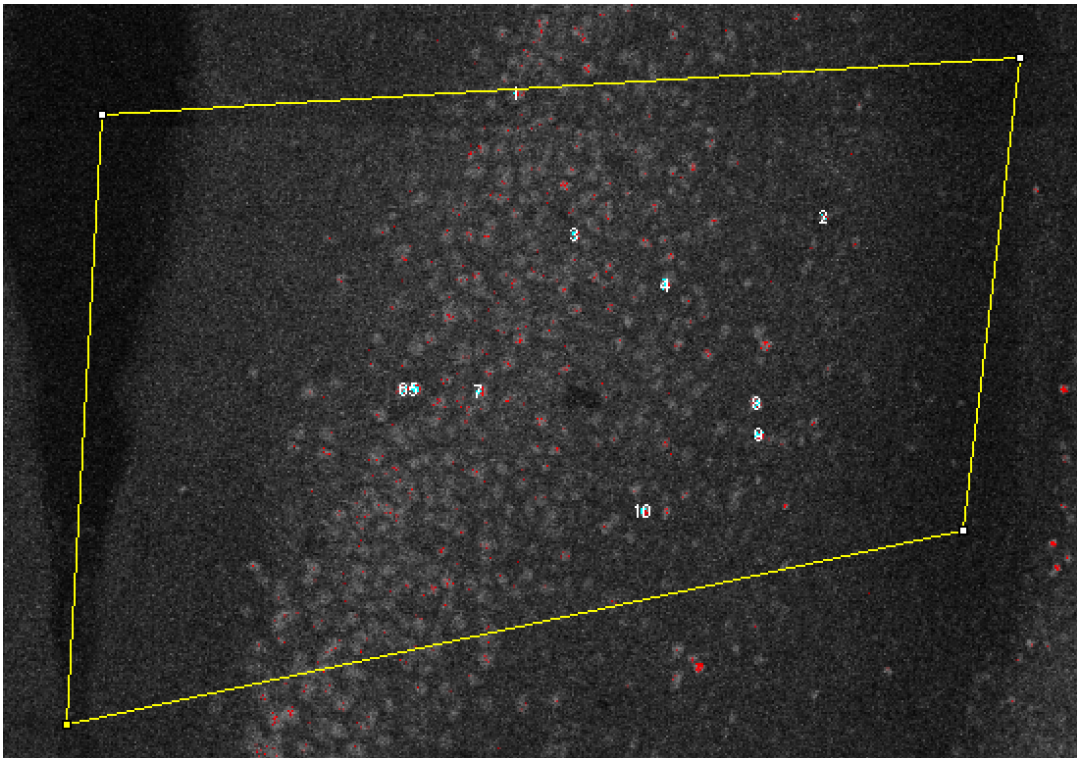


Abbildung 2: Bregma +2,52 DP rechts, cFOS Antikörper plus Alexa488 Sekundärantikörper. DP, dorsal peduncular cortex.

In Abbildung 3 sieht man eine vergleichsweise hohe Zelldichte. Zu sehen sind Zellen der Schicht 2 im Kortex, links, ebenfalls gefärbt auf der Bregmaebene +2,52 mit einem cFOS Antikörper (Abb. 3).

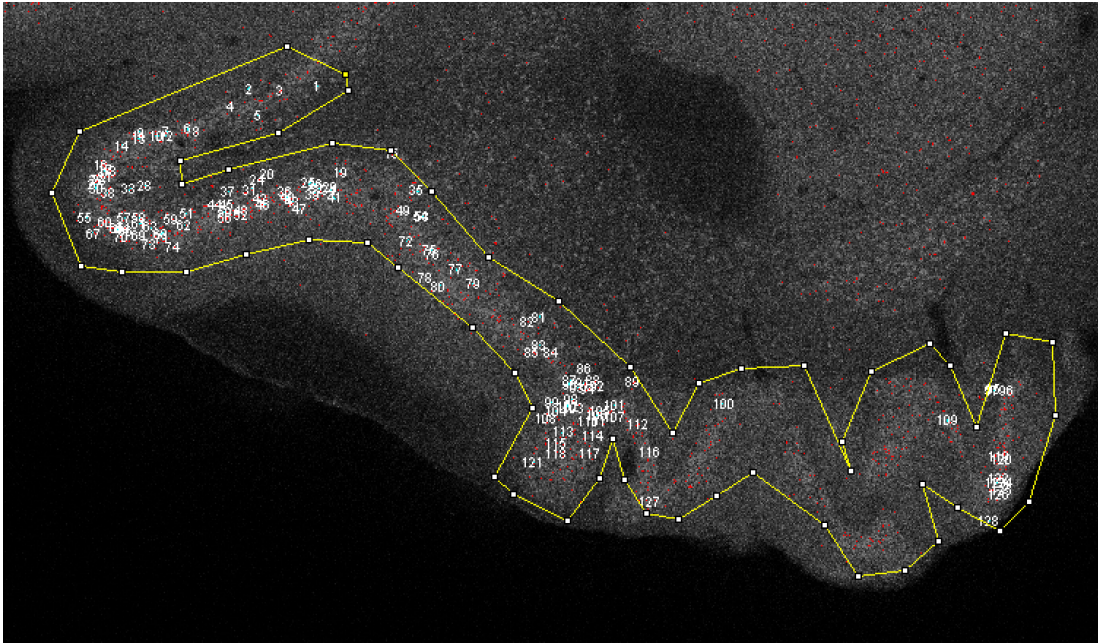


Abbildung 3: Bregma +2.52 2r, cFOS Antikörper mit Alexa488 Sekundäantikörper. 2l, Schicht 2 Kortex.

Die Zellen mit cFOS Färbung auf der linken Seite der Schicht 2 im Kortex wurden ebenfalls auf der Bregmaebene +2,52 gezählt und ausgewertet (siehe Abb. 4).

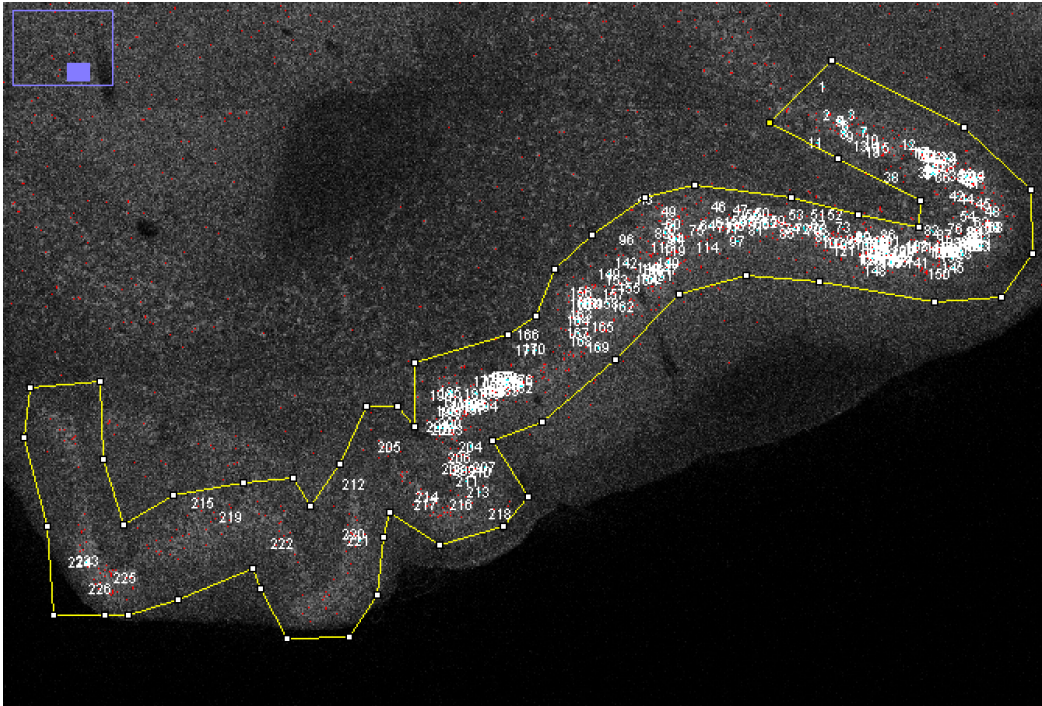


Abbildung 4: Bregma +2.52 2l, cFOS Antikörper mit Alexa488 Sekundäantikörper. 2l, Schicht 2 Kortex.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (Version 8.0.0 für Windows, GraphPad Software, USA). Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Saccharose-Gruppe wurden mit dem Student's T-Test ermittelt, wobei das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ festgelegt wurde. Post-hoc-Tests wurden gegebenenfalls mit Tukey's Honestly Significant Difference-Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Neuronale Zellaktivität nach 8-wöchiger zuckerreicher Diät

Die neuronale Zellaktivität nach einer 8-wöchigen zuckerreichen Diät wurde auf drei verschiedenen Bregmaebenen untersucht. Der Transkriptionsfaktor c-Fos ist nicht spezifisch für Neurone. Deshalb wurde eine doppelte immunhistochemische Färbung mit cFOS und dem neuronalen Marker NeuN durchgeführt, um Neuronen, die cFOS exprimieren, eindeutig zu markieren (Herrera et al., 1996). Damit die ROIs auf der jeweiligen Bregmaebene ausfindig gemacht werden konnten und sichergestellt werden konnte, dass die cFOS Färbung mit einer Zelle assoziiert ist, wurde ein histologischer Zellkernmarker (DAPI) verwendet (Abbildungen 5-7).

3.2 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene +2,52

Abbildung 5 präsentiert die Übersicht eines Gehirnschnittes der Bregmaebene +2,52, der mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung für cFOS, NeuN und DAPI untersucht wurde. In dieser Bregmaebene ist eine erkennbare cFOS-Färbung in den olfaktorischen Tuberkeln sowie im mittleren Teil des Gehirnschnittes und entlang der äußeren kortikalen Ränder zu beobachten. Die Gehirnschnitte, die mit NeuN und DAPI gefärbt wurden, zeigen eine hohe Zelldichte in diesen spezifischen Arealen.

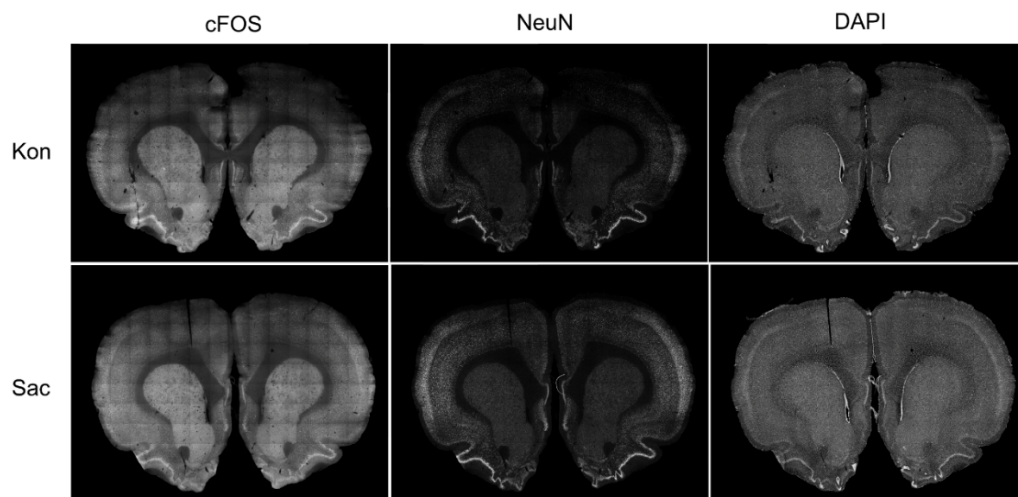


Abbildung 5: Bregma +2,52 cFos, NeuN und DAPI-Antikörperfärbung. Gehirnschnitte von Kontroll- und Saccharoseratten (Kon, oben, Sac unten) mit cFOS Färbung (links), NeuN Färbung (mitte) und DAPI Färbung (rechts).

Jedoch lässt sich anhand dieser Abbildung nicht feststellen, ob die Ratten in der Kontrollgruppe oder die mit Saccharose gefütterten Ratten eine höhere oder niedrigere cFOS-Aktivität aufweisen. Um dies zu klären, wurden einzelne Areale vergrößert und die Zellen, die mit cFOS und NeuN-Antikörpern gefärbt waren, gezählt (siehe Abbildungen 1-4). Die Vergrößerung der spezifischen Areale und die Zählung der mit cFOS und NeuN gefärbten Zellen ermöglichen eine präzisere Analyse und den Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen den verschiedenen Gruppen. Insbesondere die Auswirkungen der Saccharose-Fütterung auf die frühe Genexpression ist ein Hinweis auf neuronale Aktivität, da cFOS als Indikator für neuronale Aktivität dient. Diese Untersuchung zeigte Unterschiede in der frühen Genaktivität mit cFOS als Marker für neuronale Zellaktivität in drei verschiedenen Bregmaebenen der mit Saccharose gefütterten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten.

3.3 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene +1,44

Abbildung 6 zeigt eine detaillierte Übersicht eines Gehirnschnittes auf Bregma-Ebene +1,44, der mit einer immunohistologischen Färbung für cFOS, NeuN und DAPI untersucht wurde. Die cFOS-Färbung zeigt die höchste Aktivität in den Bereichen Tu1-3, in diesem spezifischen Bregma-Level. Bei den Schnitten, die mit NeuN und DAPI gefärbt wurden, ist eine bemerkenswert hohe Zelldichte zu erkennen. Um die Zählung durchzuführen, haben wir bestimmte Regionen von Interesse (ROIs) ausgewählt und vergrößert. In diesen vergrößerten Ausschnitten wurden sowohl die mit cFOS als auch mit NeuN gefärbten Zellen gezählt und die Ergebnisse wurden zwischen den Kontrollratten und den Ratten, die mit Saccharose gefüttert wurden, verglichen.

Die Identifizierung der prominenten Aktivität in den Tu1-3-Bereichen bei Bregma-Ebene +1,44 durch die cFOS-Färbung zeigt die Stimulation der frühen Genexpression in den Zellen dieser Region und damit die neuronale Aktivität in diesem spezifischen Bereich des Gehirns.

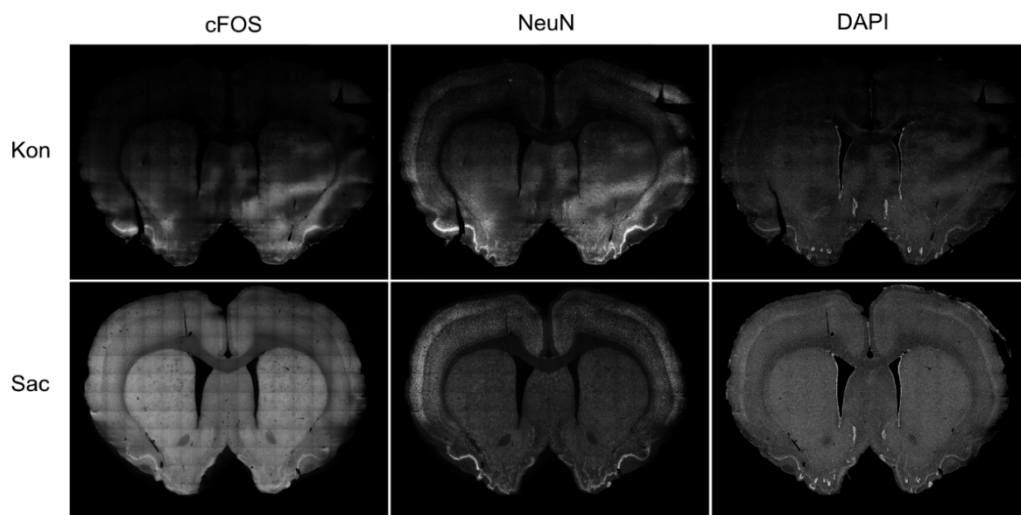


Abbildung 6: Bregma +1.44 cFos, NeuN und DAPI Antikörperfärbung. Gehirnsschnitte von Kontroll- und Saccharoseratten (Kon, oben, Sac unten) mit cFOS Färbung (links), NeuN Färbung (mitte) und DAPI Färbung (rechts).

3.4 Übersicht cFos, NeuN und DAPI Färbung auf Bregmaebene -1,80

In Abbildung 7 wird eine umfassende Übersicht eines Gehirnschnittes auf Bregma-Ebene -1,80 präsentiert, der mit einer immunohistologischen Färbung für cFOS, NeuN und DAPI gefärbt wurde. In diesem spezifischen Bregma-Level zeigt die cFOS-Färbung eine signifikante Aktivität in der von uns gewählten ROI, nämlich pir2. Ebenso wie in den zuvor beschriebenen Schnitten, die mit NeuN und DAPI gefärbt wurden, lässt sich auch hier eine bemerkenswert hohe Zelldichte feststellen.

Um eine genaue Zählung durchzuführen, wurden spezifische Ausschnitte, nämlich die von uns gewählten ROIs, vergrößert (siehe Abbildung 8). In diesen vergrößerten Ausschnitten wurden die Zellen, die mit cFOS und NeuN gefärbt waren, verblindet für die einzelnen Gruppen gezählt. Anschließend haben wir auch hier die Ergebnisse der Kontrollratten und der Ratten, die mit Saccharose gefüttert wurden, verglichen, um potenzielle Unterschiede zu ermitteln.

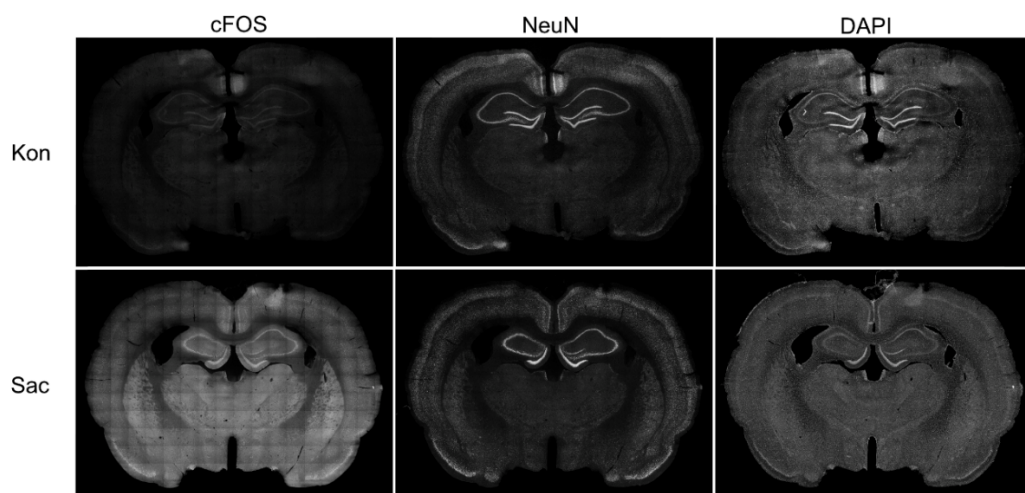


Abbildung 7: Bregma -1.80 cFos, NeuN und DAPI Antikörperfärbung. Gehirnscnritte von Kontroll- (Kon, oben) und Saccharoseratten (Sac, unten) mit cFOS Färbung (links), NeuN Färbung (mitte) und DAPI Färbung (rechts).

3.5 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene +2,52 nach Glukosestimulus

Die Analyse der Schnittebene Bregma +2,52 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in verschiedenen Arealen, einschließlich 123 DTT rechts/links, DP rechts/links, IL rechts/links, Nv rechts/links, AcbC, AcbSh, aca rechts/links und L2-Schicht rechts. Es wurden jedoch bei Ratten, die mit Saccharose gefüttert wurden, Beobachtungen in Bezug auf die neuronale Aktivität in der zweiten Schicht des linken Cortex gemacht. Eine Tendenz zu einer erhöhten neuronalen Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde gemessen ($p = 0,06$).

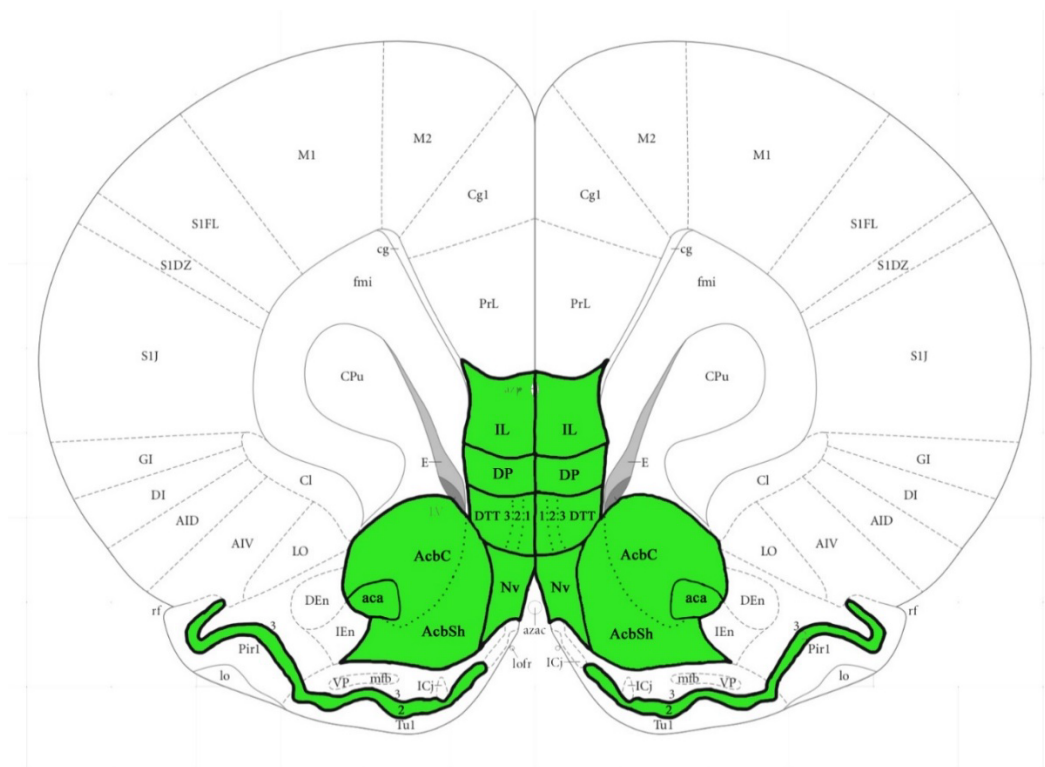


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Bregma-Level +2.52. Untersucht wurden die mit grün unterlegten Areale: Schicht 2 Kortex (L2), dorsale Tenia Tecta (DTT), dorsaler Pedunculus cerebellaris (DP), infralimbischer Kortex (IL), naviculare Nucleus basales frontales Gehirn (Nv), Nucleus Accumbens Kern (AcbC), Nucleus Accumbens Schale (AcbSh), Commissura anterior (aca). Verändert nach Paxinos und Watson, 2007.

Die in Tabelle 1 gezeigten Messwerte demonstrieren, dass in der Kontrollgruppe eine frühe Genexpression von $179,25 \pm 71,37$ Zellen festgestellt wurde, während sie in der Saccharose-Gruppe bei $444,25 \pm 91,11$ Zellen lag.

Tabelle 1: Neuronen mit c-FOS Aktivität in Bregma +2.52 in mit Saccharose gefütterten versus Kontrollratten.

Bregma +2.52	Kontrolle	Saccharose	
Areal	Zellzahl	Zellzahl	P-Wert
123 DTTr	6,75±2,48	9,75±3,07	0,48
123 DTTI	4,11±1,78	8,75±1,98	0,17
DPr	8,08±2,04	6,50±1,50	0,55
DPI	9,08±3,55	7,50±2,60	0,73
ILr	11,17±7,94	5,42±0,95	0,50
ILI	5,92±2,50	5,25±2,25	0,85
Nvr	1,34±0,56	1,83±0,61	0,57
Nvl	1,33±0,36	2,50±0,96	0,36
AcbC,AcbSh,aca r	38,59±8,31	53,44±1,68	0,20
AcbC,AcbSh,aca l	37,50±13,95	54,50±4,48	0,29
Tu 2 r	417,17±247,30	485,67±132,94	0,82
Tu 2 l	179,25±71,37	444,25±91,11	0,06

Abkürzungen: Dorsale Tenia Tecta (DTT), dorsaler Pedunculus cerebellaris (DP), infralimbischer Kortex (IL), navicularer Nucleus basales frontales Gehirn (Nv), Nucleus Accumbens Kern (AcbC), Nucleus Accumbens Schale (AcbSh), Commissura anterior (aca), Schicht 2 Kortex (L2).

3.6 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene +1,44 nach Glukosestimulus

Die Zellaktivität und Expression des Transkriptionsfaktors cFOS wurden in der Schnittebene Bregma-Level +1.44 untersucht, und es wurde festgestellt, dass bei mit Saccharose gefütterten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Aktivität in einem bestimmten Areal vorlag. Die Anzahl der Zellen, die sowohl c-FOS- als auch NeuN-positiv waren, wurde in den Arealen LSV, LSI, Shi, MS, VDBm, AcbC, AcbSh, aca (rechts und links) sowie 2,3Tu1 (rechts und links) bestimmt.

Die signifikante Erhöhung der kolokalisierten c-FOS- und NeuN-gefärbten Zellen wurde in der linken 2,3Tu1-Region detektiert (Abbildung 9; $P \leq 0,05$). In der Kontrollgruppe wurde eine durchschnittliche Anzahl von $104,56 \pm 31,24$ positiv gefärbter Zellen gefunden, während in der Saccharose-Gruppe eine erhöhte Anzahl von $248,22 \pm 34,06$ gefärbter Zellen beobachtet wurde (siehe Tabelle 2).

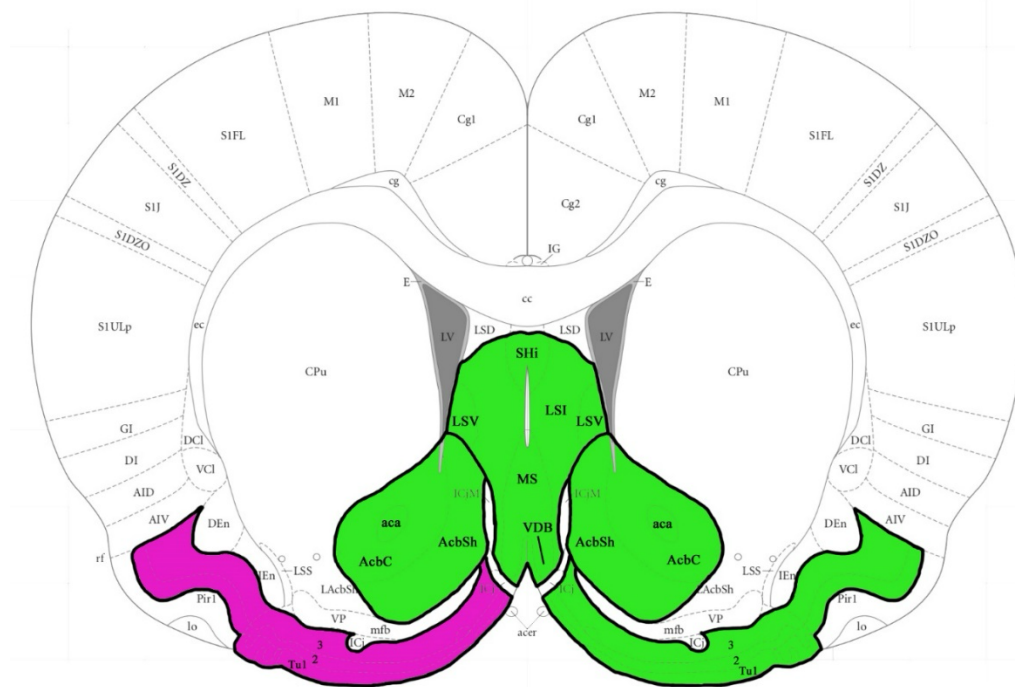


Abbildung 9: Schematische Darstellung von Bregma-Level +1.44. Zellen mit cFOS und NeuN Expression wurden in den mit grün und pink unterlegten Arealen LSV, LSI, Shi, MS, VDBm, AcbC, AcbSh, aca rechts&links, 2,3,Tu1 rechts&links gezählt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5 pro Gruppe). Grün: Areale, die keinen signifikanten Unterschied nach der Zellzählung zeigten. Pink: Areal mit signifikant erhöhten cFOS Färbung in mit Saccharose gefütterten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren. Abkürzungen gefärbte Areale: Nucleus

Accumbens Kern (AcbC), Nucleus Accumbens Schale (AcbSh), Commissura anterior (aca), lateraler septaler Nucleus ventraler Teil (LSV), lateraler septaler Nucleus, mittlerer Teil (LSI), septaler hippocampaler Nucleus (Shi), medialer septaler Nucleus (MS), verticaler Nucleus limbdiagonales Band (VDB), vordere Commissur (aca), olfaktorischer Tuberkel 1-3 (Tu1). Verändert nach Paxinos und Watson, 2007.

Tabelle 2: Neuronen mit c-FOS Aktivität in Bregma +1.44 in mit Saccharose gefütterten versus Kontrollratten.

Bregma +1.44	Kontrolle	Saccharose	
Areal	Zellzahl	Zellzahl	P-Wert
LSV,LSI,Shi,MS,VDB m	32,75±15,11	43,92±15,96	0,63
AcbC,AcbSh,aca r	65,83±36,82	8,89±6,44	0,25
AcbC,AcbSh,aca l	32,67±10,01	6,11±4,06	0,09
Tu 1-3 r	485,84±214,64	868,17±377,86	0,41
Tu 1-3 l	104,56±31,24	248,22±34,06	0,05

Abkürzungen: Nucleus Accumbens Kern (AcbC), Nucleus Accumbens Schale (AcbSh), vordere Kommissur (aca), lateraler septaler Nucleus ventraler Teil (LSV), lateraler septaler Nucleus, mittlerer Teil (LSI), septaler hippocampaler Nucleus (Shi), medialer septaler Nucleus (MS), verticaler Nucleus limbdiagonales Band (VDB), olfaktorischer Tuberkel 1-3 (Tu1-3).

3.7 Analyse der neuronalen Aktivität in der Bregmaebene -1,80 nach Glukosestimulus

Die dritte Bregma-Ebene, in der die neuronale Aktivität nach einem Zuckerstimulus mittels cFOS-Färbung gemessen wurde, war Bregma -1.80. In dieser Ebene wurden verschiedene Areale untersucht, darunter PVAm, CMm, PaMP (rechts und links), Rh, Re, Vre, PaXi, Xim und PLH (rechts und links) (siehe Abbildung 10 und Tabelle 3). Dabei wurden erneut die Zellen mit Genexpression des Transkriptionsfaktors cFOS und einer Färbung spezifisch für NeuN gezählt.

Um die Ergebnisse übersichtlich darzustellen, wurden die Gehirnareale, in denen bei mit Saccharose gefütterten Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöhte cFOS- und NeuN-gefärbte Zellen festgestellt wurden, pink eingefärbt. Gehirnareale, in denen keine signifikanten Unterschiede in

der cFOS-Färbung beobachtet wurden, erhielten eine grüne Färbung (Abbildung 10).

Die Analyse ergab, dass die Anzahl der kolokalisierten cFOS- und NeuN-gefärbten Zellen in den Arealen PaMP rechts ($P^* < 0,001$), links ($P^* < 0,05$), PLH rechts/links (beide Areale $P^* < 0,05$) und BLA links ($P^* < 0,05$) erhöht war (siehe Abbildung 10, pinke Areale, und Tabelle 3).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Gabe von Saccharose spezifische Auswirkungen auf die neuronale Aktivität in diesen Gehirnarealen haben kann. Die erhöhte cFOS-Expression in Verbindung mit Saccharose-Fütterung legt nahe, dass diese Areale an der Verarbeitung oder Reaktion auf Zuckerreiz beteiligt sein könnten.

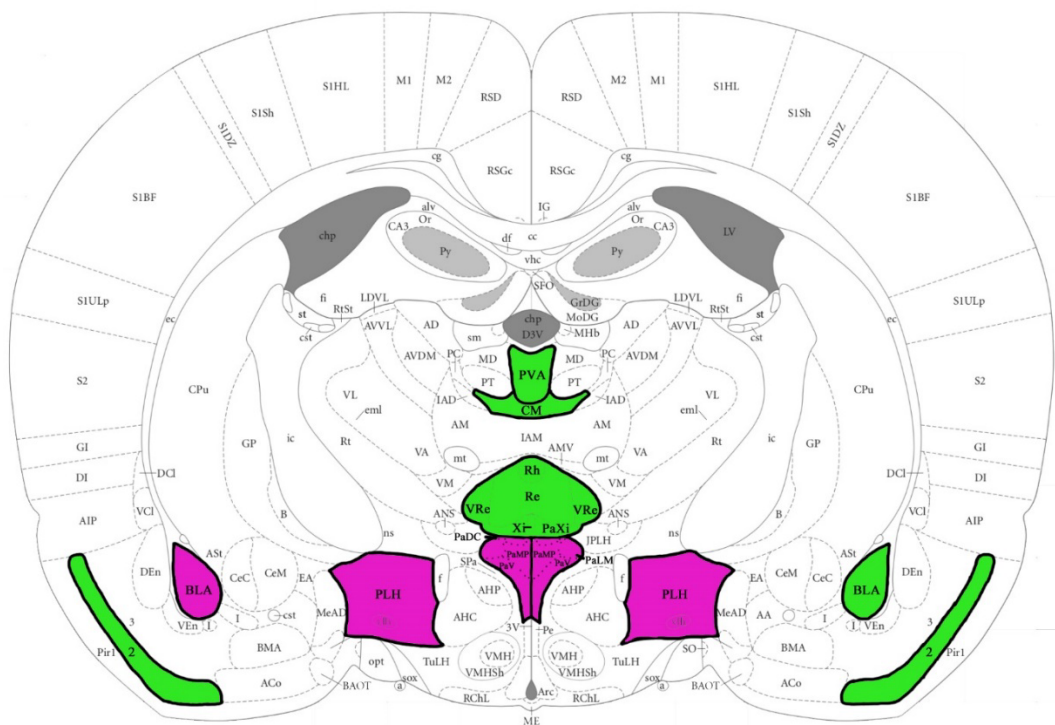


Abbildung 10: Zellaktivität in Bregma-Level -1.80 ist in pink eingefärbten Arealen erhöht in mit Saccharose gefütterten im Vergleich zu Kontrollratten. Die Anzahl der c-Fos- und NeuN positiven Zellen wurden in Bregma-Level -1.80 in den Arealen PVAm, CMm, PaMP rechts & links, Rh, Re, Vre, PaXi, Xim, PLH rechts/links bestimmt. Die Anzahl der kolokalisierten c-Fos- und

NeuN-gefärbten Zellen ist in den Arealen PaMP rechts & links, PLH rechts & links, BLAI erhöht. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM (n = 5 pro Gruppe). Abkürzungen: anteriorer paraventriculärer Thalamus Nucleus anterior (PVA), zentraler medialer thalamischer Nucleus (CM), paraventriculärer hypothalamischer Nucleus, medialer parvozellulärer Teil (PaMP), paraventriculärer hypothalamischer Nucleus, ventral (PaV), paraventriculärer Hypothalamus dorsales Horn (PaDC), paraventriculärer Hypothalamus lateral, magnozellular (PaLM), rhomboider thalamischer Nucleus (Rh), thalamischer Nucleus Reuniens (Re), ventraler thalamischer Nucleus Reuniens (Vre), paraxiphoider Nucleus des Thalamus (PaXi) xiphoider thalamischer Nucleus (Xi), pedunculärer Teil des lateralen Hypothalamus (PLH), basolateraler, amygdaloider Nucleus anterior (BLA), piriform Kortex Schicht 2 (Pir2). Verändert nach Paxinos und Watson, 2007.

Tabelle 3: Neuronen mit c-FOS Aktivität in Bregma -1.80 in mit Saccharose gefütterten versus Kontrollratten.

Bregma -1.80	Kontrolle	Saccharose	
Areal	Zellzahl	Zellzahl	P-Wert
PVAm	5,67 \pm 0,88	6,79 \pm 0,93	0,46
CMm	7,17 \pm 2,82	8,75 \pm 4,19	0,76
PaMP rechts	14,33 \pm 1,01	119,50 \pm 7,09	<0,001*
PaMP links	8,92 \pm 2,30	113,42 \pm 37,07	<0,05*
Rh,Re,Vre,PaXi,Xi m	21,33 \pm 7,35	22,88 \pm 7,34	0,89
PLH rechts	2,25 \pm 1,17	8,71 \pm 1,96	<0,05*
PLH links	1,59 \pm 0,52	9,04 \pm 2,25	<0,05*
BLA rechts	0,75 \pm 0,44	34,13 \pm 24,69	0,23
BLA links	0,92 \pm 0,71	12,75 \pm 3,64	<0,05*

Pir2 rechts	3,59±1,66	59,08±31,13	0,13
Pir2 links	6,33±3,17	142,63±69,76	0,16

Abkürzungen: anteriorer paraventriculärer Thalamus Nucleus anterior (PVA), zentraler medialer thalamischer Nucleus (CM), paraventriculärer hypothalamischer Nucleus, medialer parvozellulärer Teil (PaMP), paraventriculärer hypothalamischer Nucleus, ventral (PaV), paraventriculärer Hypothalamus dorsales Horn (PaDC), paraventriculärer Hypothalamus lateral, magnozellular (PaLM), rhomboider thalamischer Nucleus (Rh) thalamischer Nucleus Reuniens (Re), ventraler thalamischer Nucleus Reuniens (Vre), paraxiphoider Nucleus des Thalamus (PaXi), xiphoider thalamischer Nucleus (Xi), pedunculärer Teil des lateralen Hypothalamus (PLH), basolateraler, amygdaloïder Nucleus anterior (BLA), piriform Kortex Schicht 2 (Pir2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der Gabe eines Glukosestimulus in drei unterschiedlichen Bregma-Ebenen die neuronale Aktivität und die Expression des Transkriptionsfaktors cFOS in verschiedenen Hirnarealen untersucht wurden. In der Schnittebene Bregma +2,52 zeigten sich zwischen Saccharose-gefütterten Ratten und Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in den meisten untersuchten Regionen. Lediglich in der Schicht 2 des linken Kortex war eine Tendenz zu erhöhter neuronaler Aktivität in der Saccharose-Gruppe zu beobachten ($p = 0,06$).

In der Bregmaebene +1,44 wurde ebenfalls nur in einem Areal ein signifikanter Unterschied festgestellt. In der linken Region Tu 1–3 wiesen die Saccharose-gefütterten Tiere eine deutlich höhere Anzahl cFOS- und NeuN-positiver Zellen auf als die Kontrollgruppe ($p = 0,05$), während in allen übrigen Arealen keine signifikanten Veränderungen erkennbar waren.

Deutlichere Effekte zeigten sich in der Ebene Bregma $-1,80$. Hier war die Anzahl cFOS- und NeuN-positiver Zellen in mehreren Hirnarealen bei Saccharose-gefütterten Tieren signifikant erhöht. Dies betraf das PaMP rechts ($p < 0,001$) und links ($p < 0,05$), den PLH rechts und links (jeweils $p < 0,05$) sowie den BLA links ($p < 0,05$). In den übrigen untersuchten Regionen dieser Ebene wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem Nagermodell den Einfluss einer zuckerreichen Ernährung auf das Gehirn zu eruieren, um die Mechanismen zu untersuchen, die dem Zusammenhang zwischen hochkalorischer, kohlenhydratreicher Nahrung und Einschränkungen der Gehirnfunktion zugrunde liegen. Gemessen wurde die neuronale Aktivität in ROIs auf drei verschiedenen Bregmaebenen, gewählt analog zu Gehirnarealen, die nach zuckerreicher achtwöchiger Diät und Zuckerstimulus via PET/fMRI eine Veränderung ihrer Aktivität gezeigt hatten. Es ergab sich, dass die neuronale Aktivität auf zellulärer Ebene in verschiedenen Gehirnarealen nach achtwöchiger zuckerreicher Diät erhöht war.

Um die Auswirkungen der Fütterung mit Saccharose auf die Gehirnaktivität zu untersuchen, haben wir die mit Saccharose gefütterten Ratten mit Kontrollratten, die Wasser statt Saccharoselösung erhielten, verglichen. Die Auszählung der mit cFOS und NeuN gefärbten Zellen in den ausgewählten ROIs ermöglichte es uns, potenzielle Unterschiede der neuronalen Aktivität zwischen den beiden Gruppen zu identifizieren. Diese Vergleichsanalyse liefert wichtige Erkenntnisse darüber, wie die zuckerreiche Ernährung das neuronale Aktivitätsmuster auf zellulärer Ebene beeinflussen kann.

4.1 Das Tuberculum olfactorium, Modulator von Zuckerpräferenz und Stoffwechselregulation

Auf zellulärer Ebene wurde in der Bregmaebene +2,54 keine signifikanten Unterschiede der neuronalen Aktivität gemessen. In der linken olfaktorischen Tuberkel 2 wurde jedoch eine tendenzielle Erhöhung der zellulären neuronalen Aktivität nach zuckerreicher Diät festgestellt. Auch auf Bregmaebene +1,44 ist die Zellzahl mit erhöhter cFOS Expression, das heißt erhöhter Zellaktivität im olfaktorischen Tuberkel 1-3 erhöht.

Das Tuberculum olfactorium, auch bekannt als Riechhügel, ist eine Region im limbischen System des Gehirns und spielt eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung von Geruchsinformationen. Es liegt im ventralen Teil des frontalen Cortex und ist eng mit anderen Riechzentren verbunden. Eine Vielzahl von Neuronen im Tuberculum olfactorium ist für die Verarbeitung und Integration von nicht nur olfaktorischen Reizen, sondern unter anderem für Lernen, motivierte Verhaltensweisen und sogar bei der Suche nach psychoaktiven Drogen verantwortlich (Wesson 2020).

Neuere Studien haben darauf hingewiesen, dass das Tuberculum olfactorium eine direkte Rolle bei der Regulation der Zucker-Aufnahme spielt. Die Aktivierung von Neuronen im Tuberculum olfactorium kann zu einer erhöhten Vorliebe für zuckerhaltige Lebensmittel führen. Dies legt nahe, dass das Tuberculum olfactorium an der Entstehung von übermäßigem Zuckerkonsum und damit verbundenen Gesundheitsproblemen beteiligt sein könnte (Nogi et al., 2020).

Eine andere Studie zeigt, dass es im Bulbus olfactorius via GLP-1 aktivierte neuronale Schaltkreise gibt, welche die Nahrungsaufnahme reduzieren und die Insulinsekretion bei fettleibigen Mäusen steigern. Der Anstieg der Insulinsekretion wird im paraventriculären Hypothalamus durch eine verringerte sympathische Nervenaktivität vermittelt (Montaner et al. 2024). Auch wenn das Tuberculum olfactorium etwas entfernt vom bulbus olfactorius liegt, zeigt diese Studie, dass die Riechbahn in die Gewichtsregulierung involviert ist.

Die Aufnahme von Zucker wirkt im Gehirn auf das Belohnungssystem, das angenehme Empfindungen und Verlangen vermittelt und durch die Freisetzung von Neurotransmittern wie Dopamin gekennzeichnet ist. Interessanterweise hat sich gezeigt, dass das Tuberculum olfactorium an der Verarbeitung und Modulation dieser belohnenden Effekte beteiligt ist (Murata et al. 2015).

Die Aktivität des Tuberculum olfactoriums wird durch verschiedene neuromodulatorische Mechanismen beeinflusst. Diese Mechanismen

können die Empfindlichkeit des Tuberculum olfaktoriums gegenüber zuckerhaltigen Reizen erhöhen oder verringern. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Stress die Aktivität des Tuberculum olfaktoriums beeinflusst und zu einer verstärkten Zuckerpräferenz führen kann (Murata et al. 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Tuberculum olfaktorium eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung von Geruchsinformationen spielt und auch an der Regulation der Zucker-Aufnahme beteiligt ist. Die Aktivierung des Tuberculum olfaktoriums kann zu einer erhöhten Vorliebe für zuckerhaltige Lebensmittel führen und möglicherweise einen Beitrag zur Entwicklung von Fettleibigkeit und Stoffwechselstörungen leisten. Ein besseres Verständnis der Funktion des Tuberculum olfaktorium könnte dazu beitragen, gezielte Therapien zu entwickeln, um den übermäßigen Zuckerkonsum und die damit verbundenen gesundheitlichen Risiken zu bekämpfen.

4.2 Aktivierung des medialen parvozellulären paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (PaMP) nach zuckerreicher Diät und Glukosestimulus

Die signifikante Erhöhung der neuronalen Zellaktivität nach der zuckerreichen Diät und dem Glukosestimulus konnten wir auch in der Bregmaebene -1.80 messen. Auch wenn die LPH-Areale rechts und links im Bregmalevel -1.80 eine Erhöhung der neuronalen Zellaktivität zeigten, handelte es sich hier um die Erhöhung von 2 auf 9 Zellen, was auch eine zufällige Erscheinung sein kann. Dasselbe gilt für die Erhöhung der neuronalen Aktivität in der Region BLA links von 1 auf 13 Zellen.

Eindeutiger war die neuronale Zellaktivität in dem Areal PaMP rechts und links von 14 auf 120 Zellen rechts und von 9 auf 113 Zellen links erhöht. Hier können wir mit mehr Gewissheit von einer Erhöhung der Aktivität sprechen.

Der PaMP ist der mediale parvozelluläre (kleinzellige) Teil des paraventriculären Nucleus (PVN) oder einfach ausgedrückt, ein Kern des Hypothalamus. Anatomisch grenzt der PVN an den dritten Ventrikel (siehe Abbildung 10). Er liegt in der periventriculären Zone und ist nicht mit dem periventriculären Nucleus zu verwechseln, der sich weiter medial, unterhalb des dritten Ventrikels befindet. Der PVN ist stark vaskularisiert und wird durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt, obwohl sich seine neuroendokrinen Zellen an Stellen (in der Eminenz und im Hypophysenhinterlappen) jenseits der Blut-Hirn-Schranke ausbreiten (Ferguson et al. 2008). Viele seiner Neuronen projizieren in die hintere Hypophyse und sezernieren Oxytocin, Vasopressin, Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH) (Nillni, 2010). CRH und TRH wirken auf verschiedene Zielneuronen im Hypophysenvorderlappen. Der PVN vermittelt durch die Sezernierung der verschiedenen Hormone in Teile der Hypophyse verschiedene Funktionen, darunter die Osmoregulation, den Appetit und die Reaktion des Körpers auf Stress (Fox, 2011).

Die Axone der neurosekretorischen Neuronen des PVN projizieren zur medianen Eminenz (ME), einem kleinen Areal an der Basis des Gehirns. Die ME gibt via neurosekretorischer Nervenendigungen ihre Hormone an den primären Kapillarplexus des Portalsystems ab. Außerdem enthält sie Faserendigungen von zahlreichen hypothalamischen neuroendokrinen Neuronen, die verschiedene Neurotransmitter oder Neuropeptide darunter Vasopressin, Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH), Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH), Dopamin (DA) und Somatostatin (Wachstumshormonfreisetzungshemmendes Hormon, GIH) in die Blutgefäße des hypophysären Portalsystems abgeben. Die Blutgefäße transportieren die Peptide in die vordere Hypophyse (Palkovits, 1984)

4.3 Rolle der Amygdala in der Regulation von Nahrungspräferenz und neuronaler Plastizität nach zuckerreicher Diät

Die Amygdala spielt eine zentrale Rolle bei erlernten aversiven oder appetitiven Reizen. Außerdem wird vermutet, dass sie die Nahrungspräferenz beeinflusst (Petrovich et al. 2009; Zhang et al. 2009). Die zentrale Amygdala hat vermutlich auch eine Funktion bei der Unterdrückung der Nahrungsaufnahme. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass insbesondere CeC PKC- δ + Neuronen direkt von anorexigenen IPBN CGRP+ Neuronen innerviert werden. Die Aktivität dieser Neurone ist für die Unterdrückung der Nahrungsaufnahme durch CCK, bitteren Geschmack und natürliche Sättigung notwendig (Cai et al. 2014).

In einer weiteren Studie wurden Saccharose konsumierende jugendliche Ratten 4 Wochen und 12 Wochen untersucht und mit altersgleichen Wasser-Kontrollen verglichen (Shariff, et al. 2017). Die Ergebnisse deuten auf maladaptive Veränderungen in der dendritischen Architektur der BLA-Hauptneuronen hin, insbesondere an den apikalen Dendriten nach langfristigem Saccharosekonsum. Außerdem wurde eine reduzierte Gesamtlänge der dendritischen Äste der BLA-Hauptneuronen nach kurz- und langfristigem Saccharosekonsum beobachtet. Darüber hinaus verursachte der langfristige Saccharosekonsum eine signifikante Verringerung der Länge und Komplexität der apikalen Dendriten (Shariff, et al. 2017). Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse den Einfluss zwischen kurz- und langfristigem Saccharosekonsum auf die Morphologie der BLA-Hauptneuronen und deuten auf eine Störung der synaptischen Verbindungen zu diesen Neuronen hin.

Die Inhibition der Erregbarkeit der BLA reduzierte das appetitive Trinkverhalten, d.h. die Aufnahme von Ethanol und Saccharose (Butler, et al., 2014). Dagegen hatte eine BLA-Inaktivierung keine Auswirkungen auf die Anzahl der Hebeldrücke für Saccharose-Pellets, was darauf hindeutet, dass die primäre Motivation intakt bleibt, wenn die BLA inaktiv ist. Nach einem Test unter spezifischer Sättigung für Saccharose-Pellets machte die

BLA-Inaktivierung die Tiere weniger empfindlich für Abwertung im Vergleich zur Kontrolle. Das heißt, die basolaterale Amygdala unterstützt die Aufrechterhaltung des Wertes und die Wahl einer bevorzugten Option (Hart, et al. 2017).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Hemmung des BLA-VHC-Signalwegs das appetitive Trinkverhalten sowohl bei Alkohol als auch bei Saccharose signifikant reduzierte, während es keine Auswirkungen auf den Konsum von Alkohol hatte. Zusammengenommen liefern diese Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass der BLA-vHC-Kreislauf das appetitive Belohnungsverhalten bei Alkohol und natürlichen Belohnungen wie zum Beispiel Saccharose regulieren kann (Bach 2023).

Weitere Studien zeigen, dass nicht nur die Zellaktivierung, sondern auch die Morphologie und eventuell auch die Anzahl der Neuronen durch die zuckerreiche Diät beeinflusst wird. Für eine zukünftige Studie könnte es interessant sein, die Anzahl der Astrozyten und ihre Aktivierung in bestimmten Regionen zu untersuchen. Gliazellen, einschließlich Astrozyten, sind nämlich nicht nur für die strukturelle und nährstoffliche Unterstützung von Neuronen sowie die synaptische Übertragung wichtig, sondern auch für die neuroendokrine Kontrolle des Stoffwechsels und des Energiehaushalts (Fuente-Martin et al. 2019).

4.4 Limitationen und Ausblick

Ein wichtiger, die Interpretation der Ergebnisse maßgeblich beeinflussender Punkt ist die von uns eingestellte Anzahl der Pixel, die als Färbung gelten. Diese wurde für die Zellzählung streng gewählt, damit keine Artefakte gezählt werden. Wenn man die Pixeleinstellungen anders gesetzt hätte, hätte man mit anderen Ergebnissen rechnen können. Außerdem wurde die Zählungen auf original gefärbten Schnitten ohne digitale Bearbeitung durchgeführt.

Zu erwähnen ist auch noch, dass es hohe Schwankungen der gefärbten Zellen zwischen den Tieren gab. Diese gravierenden Unterschiede sind nicht selten bei Fütterungsstudien. Fakt ist, dass hohe Zellzahlschwankungen die statistische Auswertung beeinflussen und zu weniger signifikanten Ergebnissen führen.

Es ist außerdem wichtig anzumerken, dass diese Beobachtungen auf drei spezifische Bregma-Level und die untersuchten Areale beschränkt sind. Es könnte interessant sein, weitere Schnittebenen und Areale zu untersuchen, um ein umfassenderes Bild der Auswirkungen von Saccharose auf die neuronale Aktivität zu erhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zuckerreiche Diät einen Einfluss auf verschiedene Regionen des Gehirns zeigt. Einige Regionen zeigten tendenziell eine höhere Zellaktivierung (Tu 1-3 I, PaMP rechts/links, BLA left, Bregma -1.80) andere eine geringere Aktivierung (AcbC, AcbSh, aca I, Bregma +1.44), während der Rest keine messbare Zellaktivierung zeigte. Je nach Region könnte die Aktivierung die Funktion und die Konnektivität der Struktur zu anderen Zielregionen beeinflussen. Weitere Studien sind erforderlich, um den funktionellen Aspekt jeder dieser Regionen zu untersuchen und die positiven oder negativen Auswirkungen der zuckerreichen Diät auf das Gehirn zu untersuchen. Die hier vorgestellten Erkenntnisse über fettleibigkeitsbedingte neuronale Veränderungen könnten genutzt werden, um zu verstehen, ob wir das gesteigerte Verhalten bei der Nahrungssuche sowie das Belohnungsverhalten durch die Behandlung bestimmter Hirnregionen bei Menschen mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von Fettleibigkeit verringern können. Alternativ können wir die negativen Auswirkungen der zuckerreichen Diät begrenzen, indem wir die Verbindung zwischen den Gehirnregionen und ihrer Funktionalität verstehen.

Weitere Studien sind notwendig, um die vollständigen neuronalen Netzwerkveränderungen zu verstehen, die nach einer zuckerreichen Diät entstehen.

5. Zusammenfassung

Übergewicht und Adipositas sind globale Probleme, für die bis heute keine flächendeckenden Interventionen existieren. Deshalb ist es wichtig zu untersuchen, welche ernährungsbedingten zentralnervösen Veränderungen Übergewicht und Adipositas auslösen oder begünstigen, und die ihnen zu Grunde liegenden Störungen zellulärer Mechanismen zu verstehen, so dass sie im zweiten Schritt behoben werden können. Die vorliegende Studie befasste sich aus diesem Grund mit der Wirkung einer zuckerreichen Ernährung auf das Gehirn. Dazu wurden männliche Lewis-Ratten acht Wochen lang mit einer Standarddiät und entweder 30% Saccharoselösung (n=32) oder Wasser (n=32) *ad libitum* gefüttert. Die Gehirnaktivität wurde anhand der zellulären Aktivität in verschiedenen Gehirnarealen gemessen. Zu diesem Zweck wurden Neurone mit dem neuronenspezifischen Antikörper NeuN und aktivierte Zellen mit Hilfe des Transkriptionsfaktors cFOS, als Marker der frühen Genexpression in den Bregma-Ebenen +2.54, +1.44 und -1.80 markiert und gezählt. Die Auswahl der Regionen fußte auf Aktivitätsmustern, die im Vorfeld der Studie durch eine PET/fMRT-Analyse detektiert worden waren.

Die immunhistochemische Quantifizierung von c-Fos und NeuN ergab in der mit zuckerreicher Diät gefütterten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der aktiven Zellen in Bregma +1.44 und -1.80 im medialen parvozellulären paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (links und rechts), in paraventriculären hypothalamischen Regionen (links und rechts) und in der linken basolateralen Amygdala. In Bregma +1.44 zeigte das Tuberkel 1-3 eine erhöhte Zellaktivität in der mit Saccharose gefütterten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Keine signifikante Änderung der Zellaktivität wurde in Bregma +2.54 gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass zuckerreiche im Vergleich zu Kontrolldiät spezifische Veränderungen auf zellulärer Ebene induziert, wobei nicht alle Regionen gleichermaßen betroffen sind. Die untersuchten Areale wurden aufgrund ihrer Aktivität ausgewählt durch die bildgebenden Verfahren.

Dabei gab es Areale mit erhöhter Aktivität und auch Areale mit reduzierter Aktivität im Vergleich zu den Ratten gefüttert mit einer Kontrolldiät. In der Tabelle haben wir gezeigt, es gab Areale mit erhöhter bzw. mit reduzierter Aktivität, die meisten Areale hatten jedoch eine unveränderte Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass ein erhöhter Zuckerkonsum sehr spezifische Auswirkungen in speziellen Gehirnstrukturen hat. Weitere Studien sind nötig, um die funktionale Relevanz der beobachteten Veränderungen der Zellaktivität nach zuckerreicher Diät in spezifischen Gehirnarealen besser zu verstehen.

Summary

Overweight and obesity are global problems that to date cannot be solved with interventions across the board. Therefore, it is important to understand what central nervous changes account for overweight and obesity in order to understand in the future the underlying cellular mechanisms that lead to long-term behavioral change and to address them in the second step.

In the present study, male Lewis rats were fed a standard diet and either 30% sucrose solution or water ad libitum for eight weeks. Brain activity of the rats was analyzed by PET/fMRI after a glucose stimulus and taken as a basis for cellular measurement of activity in different brain areas. Neuronal cells were labeled with the neuron-specific antibody NeuN and activated cells were labeled and counted using the transcription factor cFOS, as a marker for early gene expression, in Bregma levels +2.54, +1.44, and -1.80. Antibody-stained regions were selected using activity patterns from PET/fMRI analysis.

Immunohistochemical quantification of c-Fos and NeuN revealed increased active cells in Bregma +1.44 and -1.80 in the paraventricular hypothalamic medial parvocellular region (PaMP right $P < 0.001$ and left $P < 0.05$), paraventricular hypothalamic regions (PLH right $P < 0.05$ and left $P < 0.05$), and basolateral amygdala (BLA left $P < 0.05$) detected regions.

In Bregma +1.44, tubercle 1-3 (Tu1-3, $P \leq 0.05$) showed increased cell activity in the sucrose-fed group. No significant change in cell activity was measured in Bregma +2.54.

The results indicate that, in part, PET/fMRI activity is also measurable at the cellular level, but not across all regions. Further studies are needed to understand the underlying mechanisms of changes in cellular activity following high-sugar diets in specific brain areas.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, S., Kashem, M. A., Sarker, R., Ahmed, E. U., Hargreaves, G. A., & McGregor, I. S. (2014). Neuroadaptations in the striatal proteome of the rat following prolonged excessive sucrose intake. *Neurochem Res*, 39(5), 815-824.
2. Ahmed, S. H., Guillem, K., & Vandaele, Y. (2013). Sugar addiction: pushing the drug-sugar analogy to the limit. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16(4), 434-439.
3. Bach, E. C., Ewin, S. E., Heaney, C. F., Carlson, H. N., Ortelli, O. A., Almonte, A. G., Chappell, A. M., Raab-Graham, K. F., & Weiner, L. J. (2023). Chemogenetic inhibition of a monosynaptic projection from the basolateral amygdala to the ventral hippocampus selectively reduces appetitive, but not consummatory, alcohol drinking-related behaviours. *Eur J Neurosci*, 57(8), 1241-1259.
4. Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain Behav Immun*, 37, 134-141.
5. Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2015). Diet-induced cognitive deficits: The role of fat and sugar, potential mechanisms and nutritional interventions. *Nutrients*, 7(8), 6719-6738.
6. Berthoud, H. R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol*, 21(6), 888-896.
7. Biswal, B., Yetkin, F. Z., Haughton, V. M., & Hyde, J. S. (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med*, 34(4), 537-541.
8. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (2019). Deutschland, wie es isst - der BMEL-Ernährungsreport 2019. <https://www.bmel.de/DE/themen/ernaehrung/ernaehrungsreport2019.html>
9. Butler, T. R., Chappell, A. M., & Weiner, L. J. (2014). Effect of β 3 adrenoceptor activation in the basolateral amygdala on ethanol seeking behaviors. *Psychopharmacology (Berl)*, 231(1), 293-303.
10. Cai, H., Haubensak, W., Anthony, T. E., & Anderson, D. J. (2014). Central amygdala PKC- δ (+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat Neurosci*, 17(9), 1240-1248.
11. Cho, Y. K., Lee, J., Kim, H. S., Park, J. Y., Lee, W. J., Kim, Y. J., & Jung, C. H. (2021). The risk of Alzheimer's disease according to dynamic

- changes in metabolic health and obesity: a nationwide population-based cohort study. *Aging (Albany NY)*, 13(13), 16974-16989.
12. Diepenbroek, C., van der Plasse, G., Eggels, L., Rijnsburger, M., Feenstra, M. G., Kalsbeek, A., Denys, D., Fliers, E., Serlie, M. J., & la Fleur, S. E. (2013). Alterations in blood glucose and plasma glucagon concentrations during deep brain stimulation in the shell region of the nucleus accumbens in rats. *Front Neurosci*, 7, 226.
 13. Ernst, J. B., Arens-Azevêdo, U., Bitzer, B., Bosy-Westphal, A., de Zwaan, M., Egert, S., Fritsche, A., Gerlach, S., Hauner, H., Heseker, H., Koletzko, B., Müller-Wieland, D., Schulze, M., Virmani, K., Watzl, B., Buyken, A. E. (2019). Quantitative recommendation on sugar intake in Germany. *Ernährungs Umschau*, 66(2), 26-34.
 14. Ferguson, A. V., Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets*, 12(6), 717-727.
 15. Fox, S. I. (2011). *Human Physiology* (12th ed.). McGraw Hill. p. 665.
 16. Fuente-Martín, E., Mellado-Gil, J. M., Cobo-Vuilleumier, N., Martín-Montalvo, A., Romero-Zerbo, S. Y., Diaz Contreras, I., Hmadcha, A., Soria, B., Martín Bermudo, F., Reyes, J. C., Bermúdez-Silva, F. J., Lorenzo, P. I., Gauthier, B. R. (2019). Dissecting the Brain/Islet Axis in Metabesity. *Genes (Basel)*, 10(5), 350.
 17. Glendinning, J. I., Gillman, J., Zamer, H., Margolskee, R. F., & Sclafani, A. (2012). The role of T1r3 and Trpm5 in carbohydrate-induced obesity in mice. *Physiol Behav*, 107(1), 50-58.
 18. Hart, E. E., Gerson, J. O., Zoken, Y., Garcia, M., & Izquierdo, A. (2017). Anterior cingulate cortex supports effort allocation towards a qualitatively preferred option. *Eur J Neurosci*, 46(1), 1682-1688.
 19. Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev*, 28(3), 370-490.
 20. Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, 50(2-3), 83-107.
 21. Hu, F. B., van Dam, R. M., & Liu, S. (2001). Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia*, 44, 805-817.

22. Kendig, M. D. (2014). Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents: A review. *Appetite*, 80, 41-54.
23. Koekkoek, L. L., Mul, J. D., & la Fleur, S. E. (2017). Glucose-Sensing in the Reward System. *Front Neurosci*, 11, 716.
24. Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*, 103, 59-68.
25. Lee, E. B., & Mattson, M. P. (2014). The neuropathology of obesity: insights from human disease. *Acta neuropathologica*, 127, 3-28.
26. Lockie, S. H., Dinan, T., Lawrence, A. J., Spencer, S. J., & Andrews, Z. B. (2015). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in reward processing tasks. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 144-150.
27. Ludwig, D. S., Sanbonmatsu, L., Gennetian, L., Adam, E., Duncan, G. J., Katz, L. F., Kessler, R. C., Kling, J. R., Lindau, S. T., Whitaker, R. C., McDade, T. W. (2011). Neighborhoods, Obesity, and Diabetes – A Randomized Social Experiment. *N Engl J Med*, 365, 1509-1519.
28. Malafaia, A. B., Nassif, P. A., Ribas, C. A., Ariede, B. L., Sue, K. N., & Cruz, M. A. (2013). Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arq Bras Cir Dirg*, 26 Suppl 1, 17-21.
29. Montaner, M., Denom, J., Simon, V., Jiang, W., Holt, M. K., Brierley, D. I., Rouch, C., Foppen, E., Kassis, N., Jarriault, D., Khan, D., Eygret, L., Mifsud, F., Hodson, D. J., Broichhagen, J., Van Oudenhove, L., Fioramonti, X., Gault, V., Cota, D., Reimann, F., Gribble, F. M., Migrenne-Li, S., Trapp, S., Gurden, H., & Magnan, C. (2024). A neuronal circuit driven by GLP-1 in the olfactory bulb regulates insulin secretion. *Nat Commun*, 15(1), 6941.
30. Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289-295.
31. Morris, M. J., Beilharz, J. E., Maniam, J., Reichelt, A. C., & Westbrook, R. F. (2015). Why is obesity such a problem in the 21st century? The intersection of palatable food, cues and reward pathways, stress and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 58, 35-45.
32. Murata, K., Kanno, M., Ieki, N., Mori, K., & Yamaguchi, M. (2015). Mapping of Learned Odor-Induced Motivated Behaviors in the Mouse Olfactory Tubercle. *J Neurosci*, 35(29), 10581-10599.

33. Murata, K. (2020). Hypothetical Roles of the Olfactory Tubercle in Odor-Guided Eating Behavior. *Front Neural Circuits*, 14, 577880.
34. Nilni, E. A. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol*, 31(2), 134-156.
35. Nogi, Y., Ahasan, M. M., Murata, Y., Taniguchi, M., Sha, M. F. R., Ijichi, C., & Yamaguchi, M. (2020). Expression of feeding-related neuromodulatory signalling molecules in the mouse central olfactory system. *Sci Rep*, 10(1), 890.
36. OECD. (2017). *Obesity Update 2017*.
<https://asvis.it/public/asvis/files/Obesity-Update-May-2017-final.pdf>
37. Ogawa, S., Lee, T. M., Kay, A. R., & Tank, D. W. (1990). Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24), 9868-9872.
38. Palkovits, M. (1984). Neuropeptides in the hypothalamo-hypophyseal system: lateral retrochiasmatic area as a common gate for neuronal fibers towards the median eminence. *Peptides*, 5 Suppl 1, 35-39.
39. Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). Academic Press, San Diego.
40. Petrovich, G. D., Ross, C. A., Mody, P., Holland, P. C., & Gallagher, M. (2009). Central, but not basolateral, amygdala is critical for control of feeding by aversive learned cues. *J Neurosci*, 29(48), 15205-15212.
41. Pereira, M. A. (2006). The possible role of sugar-sweetened beverages in obesity etiology: a review of the evidence. *Int J Obes*, 30, S28-S36.
42. Ritze, Y., Bárdos, G., D'Haese, J. G., Ernst, B., Thurnheer, M., Schultes, B., & Bischoff, S. C. (2014). Effect of high sugar intake on glucose transporter and weight regulating hormones in mice and humans. *PLoS ONE*, 9(7), e101702.
43. Sala-Rabanal, M., Hirayama, B. A., Ghezzi, C., Liu, J., Huang, S. C., Kepe, V., Koepsell, H., Yu, A., Powell, D. R., Thorens, B., Wright, E. M., & Barrio, J. R. (2016). Revisiting the physiological roles of SGLTs and GLUTs using positron emission tomography in mice. *J Physiol*, 594(15), 4425-4438.
44. Shalev, D., & Arbuckle, M. R. (2017). Metabolism and Memory: Obesity, Diabetes, and Dementia. *Biol Psychiatry*, 82, e81-e83.

45. Shariff, M., Klenowski, P., Morgan, M., Patkar, O., Mu, E., Bellingham, M., Belmer, A., Bartlett, S. E. (2017). Binge-like sucrose consumption reduces the dendritic length and complexity of principal neurons in the adolescent rat basolateral amygdala. *PLoS One*, 12(8), e0183063.
 46. Siervo, M., Montagnese, C., Mathers, J. C., Soroka, K. R., Stephan, B. C., et al. (2014). Sugar consumption and global prevalence of obesity and hypertension: an ecological analysis. *Public Health Nutr*, 1-10.
 47. Stice, E., Burger, K. S., & Yokum, S. (2013). Relative ability of fat and sugar tastes to activate reward, gustatory, and somatosensory regions. *Am J Clin Nutr*, 98(6), 1377-1384.
 48. Steinbusch, L., Labouèbe, G., & Thorens, B. (2015). Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 26(9), 455-466.
 49. Vartanian, L. R., Schwartz, M. B., & Brownell, K. D. (2007). Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *Am J Public Health*, 97(4), 667-675.
 50. Wang, C. Y., Bleich, S. N., & Gortmaker, S. L. (2008). Increasing caloric contribution from sugar-sweetened beverages and 100% fruit juices among US children and adolescents, 1998-2004. *Pediatrics*, 121(6), e1604-e1611.
 51. Wesson, D. W. (2020). The Tubular Striatum. *J Neurosci*, 40(39), 7379-7386.
 52. WHO. (2015). *Guideline: Sugars intake for adults and children*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549028>
 53. WHO. (2025). *Obesity and Overweight (Fact sheet)*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
-

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Doktorarbeit wurde am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie unter Betreuung von Professor Dr. Manfred Hallschmid und Dr. Yvonne Ritze durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Yvonne Ritze. Die Versuche wurden von Dr. Yvonne Ritze sowie Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Werner-Siemens-Zentrums durchgeführt.

Die Färbungen, Mikroskopaufnahmen und Analysen wurden von mir nach Einarbeitung durch Dr. Yvonne Ritze eigenständig durchgeführt. Die Auswertung der Zellzahlen wurde von mir nach Einarbeitung durch Dr. Yvonne Ritze selbstständig durchgeführt. Die Datenanalyse und Erstellung der Abbildungen 14-23 wurden von Dr. Yvonne Ritze in Zusammenarbeit mit mir durchgeführt. Die Erstellung der restlichen Abbildungen erfolgte durch mich.

Ich, Gregor Roland Schörk versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 23.03.2026

Gregor Roland Schörk

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Hallschmid für seine Unterstützung und das Ermöglichen dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. Yvonne Ritze, die mich nicht nur während der gesamten Dauer meiner Forschung begleitet hat, sondern auch als vertrauenswürdige und kompetente Betreuerin fungierte. Ihre Anleitung war von unschätzbarem Wert und hat mir geholfen, Hindernisse zu überwinden und Lösungswege zu finden.

Des Weiteren möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Medizinische Psychologie für die anregenden Diskussionen danken, die meine Perspektive erweitert und meinen Forschungsansatz verfeinert haben. Ihre Anmerkungen und Hinweise haben mir geholfen, meinen Blickwinkel zu schärfen und alternative Herangehensweisen zu erkunden.

Ein herzlicher Dank gebührt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser intensiven Forschungsphase stets ermutigt und unterstützt haben. Ihre Geduld und ihr Verständnis in Zeiten, in denen ich stark eingespannt war, haben mich motiviert, weiterzumachen und das Beste aus mir herauszuholen.

Abschließend gilt mein Dank allen, die dazu beigetragen haben, diese Reise zu einer bedeutenden und lohnenswerten Erfahrung zu machen.