

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam-Rehbrücke,  
Arbeitsgruppe Physiologie des Energiestoffwechsels

---

DISSERTATION

**Geschlechtsspezifische  
Körpergewichtsregulation bei Mäusen**  
Untersuchungen zur *Set-point*-Theorie  
der Körpermasse

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
**Dipl.-Ernährungswissenschaftlerin Petra Wiedmer**  
aus Cottbus

Potsdam, Februar 2004

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Körpermasse und Risiken ihrer Entgleisung	1
1.2	Die Körpermasse ist Ausdruck der Energiebilanz	2
1.3	Mechanismen der Körpermasseregulation	4
1.3.1	Die <i>Set-point</i> -Theorie	4
1.3.2	Ansätze zur Definition des Ponderostats	5
1.3.3	Alternative Hypothesen zur Körpermasseregulation	8
1.4	Der Unterschied zwischen den Geschlechtern	9
1.4.1	Die genetische und hormonelle Ausstattung der Geschlechter	9
1.4.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Körpermasseregulation	10
1.5	Zielstellung	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Tiermodell und Haltung	13
2.2	Versuchsdesign	13
2.3	Gewichtsimplantate	16
2.4	Körpermasse und Energieaufnahme	17
2.4.1	Energieaufnahme während der Energieumsatzmessungen	18
2.4.2	Bestimmung des Energiegehaltes im Futter (Bombenkalorimetrie)	18
2.5	Körperzusammensetzung	19
2.5.1	Messprinzip	19
2.5.2	Durchführung der Messungen	20
2.5.3	Versuche zur Validierung der Messungen	20
	2.5.3.1 Chemische Analyse der Fettmasse	21
	2.5.3.2 Ergebnisse der Validierung	22
2.6	Energieumsatzmessungen	24
2.6.1	Grundlagen	24
2.6.2	Berechnung von Gesamt-Energieumsatz, Ruheumsatz und Abschätzung der Bewegungsaktivität	26
2.6.3	Aufbau der Respirationsanlage	27
2.6.4	Durchführung der Energieumsatzmessungen	28
2.7	Implantation der Gewichte und Entnahme von Blut und Geweben	29
2.7.1	Narkose	29

---

2.7.2	Implantation der Gewichte	30
2.7.3	Blut- und Gewebeentnahme	30
<b>2.8</b>	<b>Bestimmung der Corticosteron- und Leptinkonzentration</b>	<b>31</b>
<b>2.9</b>	<b>Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Geweben</b>	<b>32</b>
2.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA	32
2.9.2	Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Northern Blot)	34
2.9.3	Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierter Sonde	35
2.9.3.1	Herstellung der Sonden-DNA	35
2.9.3.2	Hybridisierung der RNA auf der Nylonmembran	35
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Phänotypische Charakterisierung vor Implantation</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Chronische Effekte der Gewichtsimplantation</b>	<b>40</b>
3.2.1	Änderungen in Körpermasse und Energieaufnahme	40
3.2.2	Änderungen in der Körperzusammensetzung	45
3.2.3	Änderungen im Energieumsatz	45
<b>3.3</b>	<b>Akute Effekte der Gewichtsimplantation</b>	<b>47</b>
3.3.1	Änderungen in Körpermasse und Energieaufnahme	47
3.3.2	Änderungen in der Körperzusammensetzung	51
3.3.3	Änderungen im Energieumsatz	52
3.3.4	Hormonelle Änderungen	56
3.3.4.1	Leptin	56
3.3.4.2	Corticosteron	58
3.3.5	Änderungen der mRNA-Spiegel von Leptin, UCP1 und UCP3	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss der Gewichtsimplantation auf die Energiebilanz</b>	<b>64</b>
4.1.1	Änderungen in der Körpermasse, der Körperzusammensetzung und der Energieaufnahme	64
4.1.2	Änderungen im Energieumsatz	67
<b>4.2</b>	<b>Hormonelle Änderungen infolge der Gewichtsimplantation</b>	<b>70</b>
4.2.1	Änderungen im Plasma- und mRNA-Spiegel von Leptin	70
4.2.2	Änderungen im Corticosteronspiegel	74

---

<b>4.3</b>	<b>Änderungen im mRNA-Spiegel von UCP1 und UCP3 infolge der Gewichtsimplantation</b>	<b>76</b>
4.3.1	Einfluss der Gewichtsimplantation auf die UCP1-Genexpression	77
4.3.2	Einfluss der Gewichtsimplantation auf die UCP3-Genexpression	78
<b>4.4</b>	<b>Änderungen in der Körpermasse infolge der Gewichtsimplantation erfolgten geschlechtsspezifisch</b>	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>84</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>88</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AgRP	<i>agouti related protein</i>
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
ARC	Nucleus arcuatus
BAT	braunes Fettgewebe ( <i>brown adipose tissue</i> )
BKM	biologische Körpermasse (Körpemasse ohne Implantat)
CART	<i>cocain-amphetamin-regulated transkript</i>
CPM	Zähleinheiten pro Minute (counts per minute)
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEXA	Röntgenabsorptionsmessung ( <i>dual-energy-x-ray absorptiometry</i> )
EAT	epididymales Fettgewebe ( <i>epididymal adipose tissue</i> )
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
FFM	fettfreie Masse
FM	Fettmasse
HI	schweres Implantat ( <i>high weight implant</i> ), 10% der Körpermasse
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophyse-Nebenniere-Achse ( <i>hypothalamic-pituitary-adrenal-axis</i> )
KM	Körpermasse
KZV	Kurzzeitversuch
LHA	Lateraler Hypothalamus ( <i>lateral hypothalamic area</i> )
LO	leichtes Implantat ( <i>low weight implant</i> ), 2-3% der Körpermasse
LZV	Langzeitversuch
MCH	Melanin konzentrierendes Hormon ( <i>melanin concentrating hormone</i> )
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
$\alpha$ -MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon $\alpha$ ( <i><math>\alpha</math>-melanocyte stimulating hormone</i> )
NPY	Neuropeptid Y
OAT	Omentales Fettgewebe ( <i>omental adipose tissue</i> )
PAL	<i>physical activity level</i>
POMC	Proopiomelanocortin
RQ	respiratorischer Quotient
SAT	subkutanes Fettgewebe ( <i>subcutaneous adipose tissue</i> )
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SO	Schein-Operation
SSC	Waschpuffer für die Northern-Blot-Analyse
TM	Trockenmasse
UCP	Entkopplerprotein ( <i>uncoupling protein</i> )
VMH	ventromedialer Hypothalamus
vs.	<i>versus</i> (im Vergleich zu)
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einleitung

Die Körpermasse wird von den meisten Individuen durch die ausgewogene Bilanz von Energieaufnahme und Energieverbrauch relativ konstant gehalten. Jedoch kommt es immer häufiger zu Störungen in der Energiehomöostase und damit zu Entgleisungen in der Körpermasseregulation, und die Zahl der Übergewichtigen und Adipösen steigt weltweit stetig an (Kopelman, 2000). Die Mechanismen der Körpermasseregulation sind noch nicht hinreichend verstanden und deshalb Gegenstand intensiver Forschung, da eine über das normale Maß hinaus erhöhte Körpermasse zur Ausbildung von Stoffwechselerkrankungen führen kann. In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, inwieweit der Körper in der Lage ist, seine eigene Masse wahrzunehmen und welche Mechanismen in diesem Zusammenhang wirken, um eine normale Körpermasse aufrechtzuerhalten.

### 1.1 Die Körpermasse und Risiken ihrer Entgleisung

Die Körpermasse besteht aus zwei Kompartimenten, der fettfreien Masse (Muskulatur, Bindegewebe, Knochen, Körperflüssigkeiten) und der Fettmasse (v. a. im Fettgewebe) (Wabitsch, 2000). Die Zusammensetzung der fettfreien Masse beruht auf dem Gehalt an Kohlenhydraten und Proteinen; die Fettmasse besteht v. a. aus den in ihr gespeicherten Triglyceriden (Wabitsch, 2000). Der relative Anteil von fettfreier Masse und Fettmasse an der Körpermasse ist individuell verschieden und geschlechtsabhängig (Havel, 2000; Rosenbaum *et al.*, 2001).

Das Fettgewebe ist ein endokrines Organ, dient aber aufgrund seiner hohen Speicherkapazität v. a. als effektiver Energiespeicher und Puffer für Perioden mit unterschiedlich hohem Nahrungsangebot. Diese hohe Speicherkapazität stellte im Verlauf der Evolution einen Überlebensvorteil in Lebensphasen geringen Nahrungsangebots oder besonders hohen Energiebedarfs dar. Die genetische Ausstattung, die dem Menschen im Steinzeitalter durch eine hohe Kapazität zur Energiespeicherung das Überleben sicherte, kann jedoch unter den heutigen Lebensbedingungen zur Ausbildung der Adipositas und damit assoziierter Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Typ 2 und Hypertonie führen („thrifty genotype“ hypothesis; Neel, 1999). Die individuelle, genetische Ausstattung verursacht daher erst durch das zusätzliche Einwirken bestimmter exogener Faktoren (z. B. langanhaltende energiereiche Ernährung oder/und verminderte körperliche Aktivität) eine Auslenkung der normalen Körpermasse und die phänotypische Manifestation der Adipositas (Levin und Keesey, 1998; Berthoud, 2002).

Die Analyse der Mechanismen der Körpermasseregulation ist deshalb von großem Interesse

für die Lebensqualität des Einzelnen sowie für die Reduzierung der mit der Adipositas verbundenen Kosten des Gesundheitssystems.

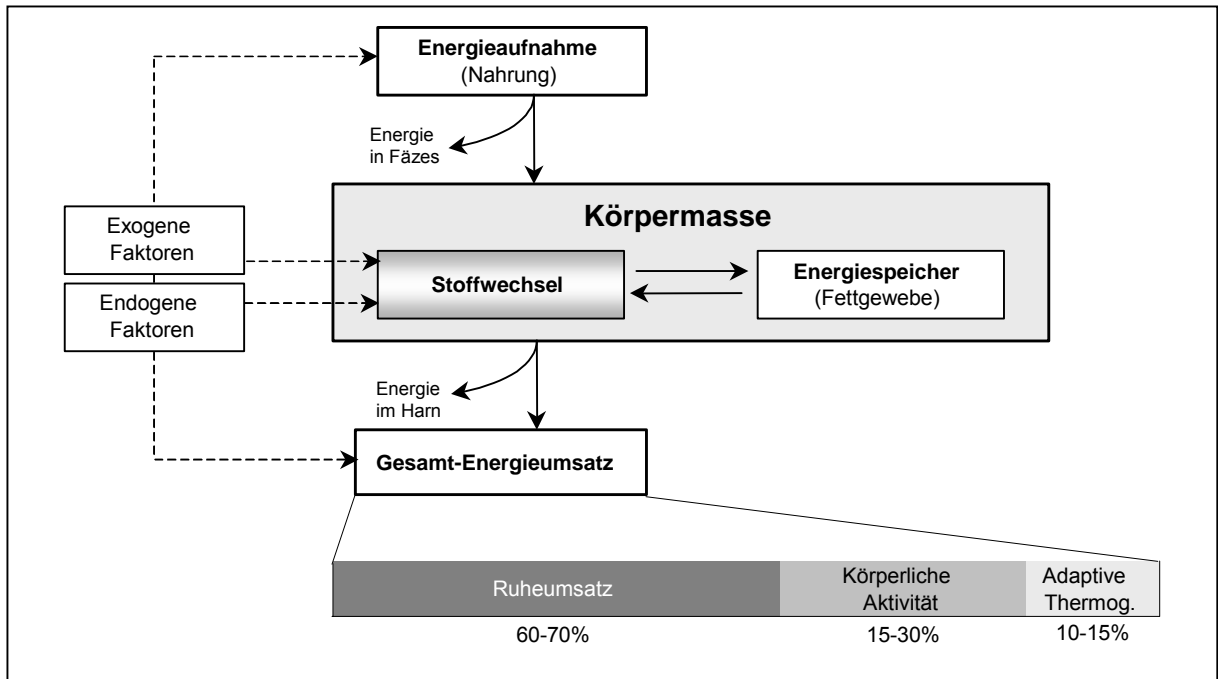
## 1.2 Die Körpermasse ist Ausdruck der Energiebilanz

Die Körpermasse resultiert aus dem Verhältnis von Energieaufnahme und Energieabgabe (s. Abb. 1-1) und reflektiert demzufolge das Ausmaß der Energiebilanz (Hervey, 1969). In die Energiebilanz greifen endogene Faktoren (genetische Voraussetzungen, Hormone, Neurotransmitter) und exogene Faktoren (Umwelteinflüsse, Lebensstil, Ernährung) regulatorisch ein und beeinflussen die Energieaufnahme, den gesamten Energiestoffwechsel und den Energieverbrauch. Solange das Verhältnis von Energieaufnahme und Energieumsatz infolge dieser Regulationsprozesse ausgewogen ist, besteht eine ausgeglichene Energiebilanz, die sich in einer stabilen Körpermasse äußert. Bei einem chronischen Ungleichgewicht zwischen der Aufnahme und dem Verbrauch von Energie kommt es entweder zu einer positiven Energiebilanz (Energieaufnahme > Energieverbrauch) verbunden mit einer Zunahme der Körpermasse oder zu einer negativen Energiebilanz (Energieaufnahme < Energieverbrauch) verbunden mit einer Abnahme der Körpermasse.

Die Energieaufnahme entspricht dem Energiegehalt der zugeführten Nahrung. Die darin enthaltenen Nährstoffe werden je nach Bedarf entweder zur Energiegewinnung abgebaut (oxidiert) und verbraucht (Energieumsatz) oder umgebaut und als Körperenergie gespeichert. Da der Anteil der Körperenergie in Form von Protein und Kohlenhydraten nur sehr wenig variiert, beziehen sich Änderungen in der Körpermasse im wesentlichen auf Änderungen in der Fettmasse (Jequier und Tappy, 1999).

Die Energieabgabe wird hauptsächlich durch den Energieumsatz bestimmt. Die dabei produzierte Energie dient drei hauptsächlich Funktionen: zur Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion von Zellen und Organen (Grundumsatz), zur körperlichen Aktivität und zur adaptiven Thermogenese (induziert v. a. durch Kälte oder Nahrungsaufnahme) (s. Abb. 1-1).

Der Grundumsatz entspricht theoretisch der Summe der Umsätze, die alle Körperzellen zur Aufrechterhaltung ihrer Grundfunktion benötigen. Da jedoch einige Organe zur Lebenserhaltung des Organismus ständig aktiv Energie umsetzen müssen (z. B. Gehirn, Herz, Atmungsmuskulatur, Leber, Nieren), ist der Grundumsatz nur eine theoretische Größe und nicht direkt messbar (Ulmer, 2000). Er wird näherungsweise durch den Ruheumsatz bestimmt. Dieser beschreibt den Energieumsatz während körperlicher und geistiger Ruhe und wird beim Menschen mittels indirekter Kalorimetrie unter definierten Bedingungen



**Abb. 1-1:** Komponenten des Energiestoffwechsels und prozentuale Anteile von Ruheumsatz, körperlicher Aktivität und adaptiver Thermogenese (adaptive Thermog.) am Gesamt-Energieumsatz (modifiziert nach Lowell und Spiegelman, 2000 und Wilson und Morley, 2003).

gemessen (morgens, liegend, nüchtern, bei Thermoneutraltemperatur) (Ulmer, 2000). Da dabei keine mechanische Arbeit geleistet wird und keine adaptive Thermogenese (s. u.) erfolgt, entspricht die gesamte umgesetzte Energie der freigesetzten Wärme (Lowell und Spiegelman, 2000). Der Ruheumsatz ist abhängig von der genetischen Veranlagung, vom Alter, dem Geschlecht und dem Anteil der fettfreien Masse an der Körpermasse (Bogardus *et al.*, 1986; Heymsfield *et al.*, 2002).

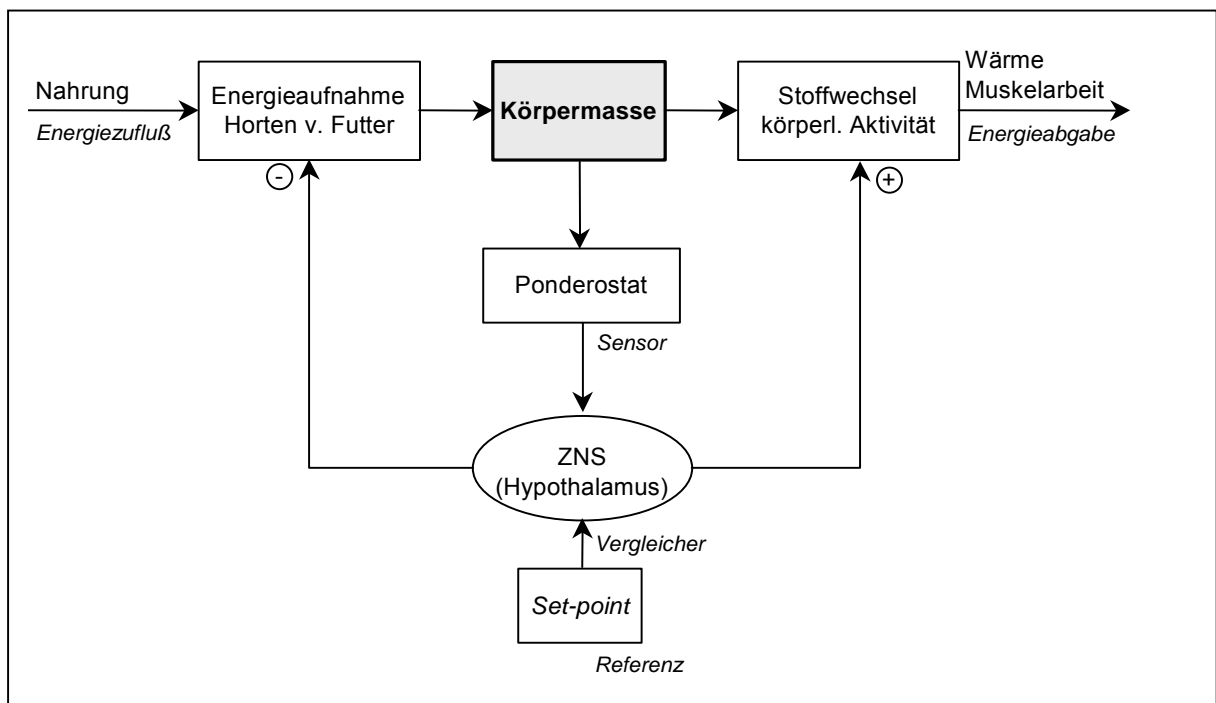
Die basale Thermogenese umfasst die Wärmeabgabe, die durch ständig ablaufende biochemische Reaktionen zur Aufrechterhaltung aller Körperfunktionen frei wird. Diese Reaktionen verlaufen meist exotherm, sodass die dabei entstehende Wärme in der Regel zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ausreicht. Die Thermogenese kann durch die Aufnahme von Nahrung (nahrungsinduzierte oder postprandiale Thermogenese), durch die Umgebungstemperatur (kälteinduzierte Thermogenese) und durch Infektionen (Fieber) aktiviert werden. Diese adaptive Thermogenese ermöglicht die optimale Anpassung des Organismus an seine Umweltbedingungen, z. B. an eine kalte Umgebungstemperatur (Körpertemperatur aufrecht erhalten) oder an eine erhöhte Nahrungsaufnahme (überflüssige Energie abgeben).



### 1.3 Mechanismen der Körpermasseregulation

#### 1.3.1 Die *Set-point*-Theorie

Ob normalgewichtig, übergewichtig oder adipös, die meisten Individuen halten ihre Körpermasse über lange Zeiträume trotz kurzzeitiger Änderungen in der Energiebilanz relativ stabil (Leibel, 1990; Leibel *et al.*, 1995; Jequier und Tappy, 1999; Schwartz *et al.*, 2000). Diese Beobachtung führte zur Formulierung der sogenannten Sollwert- oder *Set-point*-Theorie für die Körpermasse und zur Postulierung eines Signals, das durch Änderungen in der Körpermasse reguliert wird, dem Ponderostat (*ponder-*, lat. Gewicht; *-stata*, lat. stehend). Die Signalstärke des Ponderostats ist eine direkte Funktion der Körpermasse. Abbildung 1-2 zeigt eine schematische Modellvorstellung der Körpermasseregulation nach der *Set-point*-Theorie. Abweichungen von der *Set-point*-Körpermasse werden demnach durch die Signalstärke (Konzentration) des Ponderostats reflektiert und im Zentralnervensystem (ZNS) wahrgenommen. Entsprechend der Abweichungen von der *Set-point*-Körpermasse werden Rückkopplungsmechanismen aktiviert, die sowohl die Nahrungsaufnahme als auch den Energieumsatz beeinflussen und zur Regeneration der individuellen *Set-point*-Körpermasse führen. Es wird vermutet, dass die Integration der vom Ponderostat vermittelten Signale v. a.



**Abb. 1-2:** Schematische Darstellung der Körpermasseregulation entsprechend der *Set-point*-Theorie. Kursiv sind die prinzipiellen Stellglieder einer Regulation verdeutlicht. (+) entspricht einem Rückkopplungsmechanismus in gleicher Richtung zur Änderung der Körpermasse, (-) entspricht einem Rückkopplungsmechanismus in entgegengesetzter Richtung zur Änderung der Körpermasse, ZNS=Zentralnervensystem (modifiziert nach Cabanac, 2001).

im Hypothalamus erfolgt (Cabanac *et al.*, 1971; Bradley, 1978; Keesey und Corbett, 1984; Cabanac, 2001).

Die *Set-point*-Theorie dient als Erklärungsansatz für bestimmte Phänomene, die zur Aufrechterhaltung bzw. Verteidigung einer individuell stabilen Körpermasse beitragen, z. B.:

- Sowohl bei Adipösen als auch bei Normalgewichtigen kommt es während einer Reduktion bzw. Erhöhung der Körpermasse zu einer kompensatorischen Verminderung bzw. Erhöhung des Energieumsatzes (Leibel, 1990; Leibel *et al.*, 1995; Keesey und Corbett, 1984; Harris, 1990; Jequier und Tappy, 1999).
- Ratten zeigten während einer durch erhöhte Aktivität herbeigeführten Körpermasseabnahme eine erhöhte Präferenz für fettreiches Futter und zuckerhaltiges Wasser. Offensichtlich beeinflusste die negative Energiebilanz das Geschmacksempfinden zugunsten der Aufnahme energiereicherer Nahrung mit dem Zweck, die ursprüngliche Körpermasse wiederzuerlangen (Nisbett *et al.*, 1973).
- Nach Reduktion ihrer Körpermasse unter die *Set-point*-Körpermasse und bei zeitlich begrenztem Futterzugang am Tag kommt es bei Ratten zu einem mit der Körpermassereduktion korrelierenden Horten von Futter (Cabanac und Richard, 1996).

Anorexie bzw. Adipositas werden nach der *Set-point*-Theorie mit einer Verschiebung des Sollwerts zu einer niedrigeren bzw. höheren Körpermasse erklärt (Cabanac *et al.*, 1971; Bradley, 1978; Cabanac und Richard, 1996; Levin und Keesey, 1998).

### 1.3.2 Ansätze zur Definition des Ponderostats

Ein wesentlicher Kritikpunkt der *Set-point* Theorie liegt in der Tatsache, dass bisher kein spezifisches Rückkopplungssignal für die Körpermasse beschrieben werden konnte (Berthoud, 2002; Macdonald, 2003). Die Natur des Ponderostats ist nicht bekannt. Man könnte Sensoren in der Fußsohle (Wade, 2004 ) oder im Skelettmuskel als potentielle Signalgeber vermuten, ähnlich den Mechanorezeptoren, die bei der Wahrnehmung von Gelenkposition und Gelenkbewegungen eine Rolle spielen (Macdonald, 2003). Doch solche Mechanismen sind für die Körpermasseregulation nicht bekannt. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass nicht die Körpermasse als solche reguliert wird, sondern ein eng mit der Körpermasse korrelierendes Kompartiment, das seinerseits durch einen die Größe dieses Kompartiments widerspiegelnden Faktor kontrolliert wird (Cabanac, 2001).

Die Vorstellungen über die Regulation der Energiebilanz und folglich der Körpermasse

basieren hauptsächlich auf der Weiterentwicklung zweier Theorien, der lipostatischen Theorie von Kennedy (1953) und der glukostatischen Theorie nach Mayer (1955).

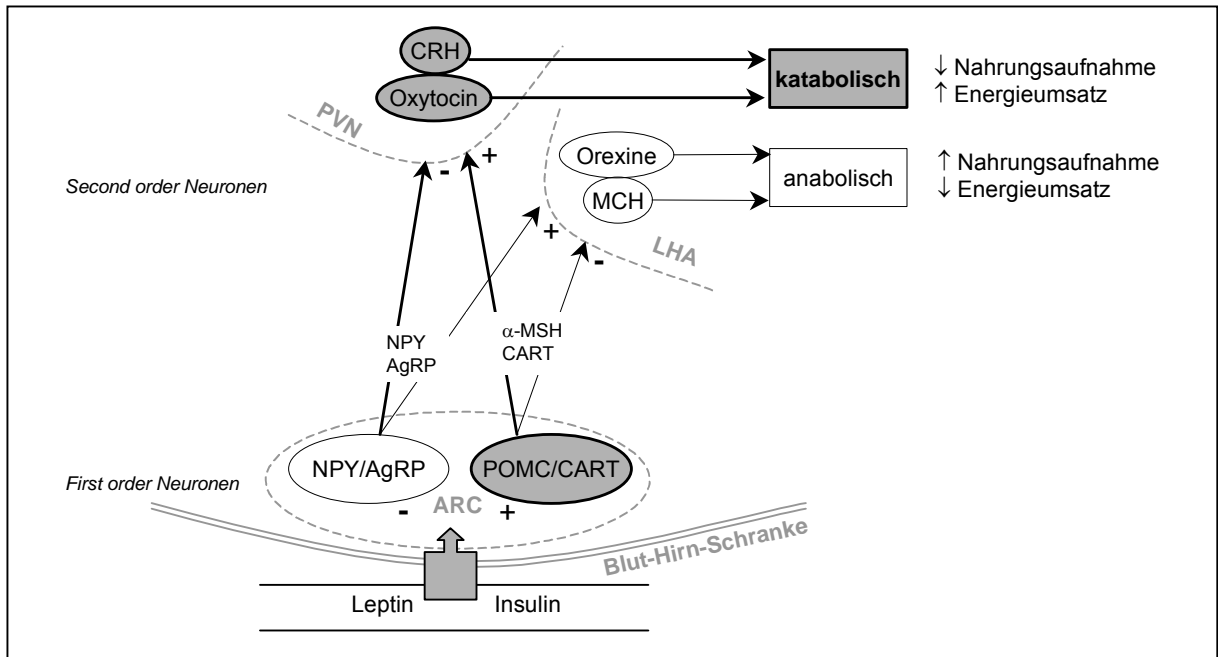
*Lipostatische Theorie.* Diese Hypothese geht davon aus, dass die Körpermasse über einen in Korrelation zur Fettmasse sezernierten Faktor reguliert wird (Kennedy, 1953; Hervey, 1969; Bradley, 1978; Jequier und Tappy, 1999). Es wird angenommen, das Ponderostat sei ein Lipostat, das die Körpermasse indirekt über die Regulation der Fettmasse kontrolliert (Bradley, 1978; Cabanac und Gosselin, 1996). Die lipostatische Theorie stellt damit einen Erklärungsansatz für die langfristige Regulation der Körpermasse dar (Mayer, 1955).

Ein prominenter Kandidat zur Unterstützung dieser Theorie ist das 1994 identifizierte Peptidhormon Leptin. Es wird fast ausschließlich vom weißen Fettgewebe in Relation zur Größe der Fettspeicher sezerniert (Zhang *et al.*, 1994). Leptin vermittelt über die Bindung an hypothalamische Rezeptoren vor allem im Nucleus arcuatus (ARC) die Hemmung und Aktivierung neuronaler Signalkaskaden. Dieser Prozess führt durch Hemmung der Nahrungsaufnahme und Aktivierung des Energieumsatzes zu einer katabolischen Stoffwechsellage und damit zu einer Körpermasseabnahme (Jequier und Tappy, 1999; Elmquist, 2001; Ahima und Flier, 2000). Leptin erfüllt somit die drei wesentlichen Anforderungen an ein lipostatisches Signal (Seeley und Woods, 2003):

- Die zirkulierende Blutkonzentration ist proportional zur Körperfettmasse.
- Es wird über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn transportiert und interagiert im ZNS mit Leptin-Rezeptoren.
- Es führt schließlich zu Änderungen in der Energiebilanz durch Änderungen in der Nahrungsaufnahme und im Energieumsatz.

Aber auch Insulin wirkt regulierend auf die Fettmasse sowie auf Nahrungsaufnahme und Energieumsatz (Havel, 2000; Seeley und Woods, 2003). Insulin wird in Relation zur Glukoseversorgung der  $\beta$ -Zellen in der Bauspeicheldrüse sezerniert, und die basale Sekretionsrate korreliert langfristig mit der Fettmasse (Seeley und Woods, 2003). Sowohl Leptin als auch Insulin verfügen über Rezeptoren im Hypothalamus und nutzen ähnliche Signalkaskaden um die Körpermasse zu regulieren (Schwartz *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2002). Eine schematische Übersicht über die postulierte Signalvermittlung von Leptin und Insulin im Hypothalamus ist in Abb. 1-3 dargestellt.

Die lipostatische Theorie ist ebenfalls Grundlage der *Set-point*-Hypothese von Hervey (1969). Er postulierte, dass die Glucocorticoidkonzentration im Blut einen Einfluss auf die Regulation der Fettmasse und damit auf die Regulation der Körpermasse hat. Diese



**Abb. 1-3:** Schematische Darstellung der durch Leptin und Insulin vermittelten hypothalamischen Signalkaskaden zur Regulation der Körpermasse. Leptin und Insulin aktivieren im Nucleus Arcuatus (ARC) rezeptorvermittelt Neurone, die Proopiomelanocortin (POMC) und *cocain-amphetamin-regulated transcript* (CART) co-exprimieren.  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), ein Spaltprodukt von POMC, und möglicherweise auch CART vermitteln durch Stimulation von Neuronen des paraventriculären Nucleus (PVN) und Hemmung von Neuronen des lateralen Hypothalamus (LHA) katabolische Effekte. Leptin und Insulin inhibieren außerdem im ARC rezeptorvermittelt Neurone, die Neuropeptid Y (NPY) und *agouti-related protein* (AgRP) co-exprimieren. Auch NPY und AgRP werden im PVN und im LHA freigesetzt und vermitteln dort durch Hemmung von Neuronen des PVN und Stimulierung von Neuronen des LHA anabolische Effekte. Katabolische Effekte werden zum Teil von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Oxytocin freisetzenden Neuronen im PVN vermittelt; anabolische Effekte werden teilweise durch Neuronen vermittelt, die *melanin concentrating hormone* (MCH) und Orexine im LHA freisetzen. + Stimulierung, - Hemmung,  $\uparrow$  Erhöhung,  $\downarrow$  Reduktion, grau unterlegt: katabolisch wirkende Neuropeptide, weiß unterlegt: anabolisch wirkende Neuropeptide (modifiziert nach Woods et al., 2003 und Berthoud, 2002).

Vermutung beruht auf der Fettlöslichkeit dieser Hormone. Hervey ging davon aus, dass eine größere Fettmasse mehr Glucocorticoide aus dem Blut aufnehmen kann und die damit verbundene Verminderung der Glucocorticoidkonzentration als Signal zur Hemmung der Energieaufnahme führt (Hervey, 1969).

Die Freisetzung der Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde wird durch die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde-Achse (HPA-Achse) reguliert. Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem paraventriculären Kern (PVN) des Hypothalamus stimuliert die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus den corticotropen Zellen der Hypophyse. ACTH führt in der Nebennierenrinde zur Synthese und Freisetzung der Glucocorticoide, die über einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf die Freisetzung von CRH und ACTH einwirken. CRH vermindert aber außerdem die Nahrungsaufnahme, erhöht den Energieumsatz und führt zu einer negativen Energiebilanz (Rohner-Jeanrenaud et al., 1989; Rothwell, 1990; Cabanac, 2001). Diese Erkenntnis führte in Anlehnung an Hervey's Hypothese zu der Vermutung, dass die hypothalamische

Konzentration an CRH dem ponderostatischen Signal entspricht (Cabanac, 2001). Hypothalamisches CRH führt, vermittelt über die von der Fettmasse abhängige Glucocorticoidkonzentration (hemmt CRH-Wirkung) und Leptinkonzentration (stimuliert CRH-Wirkung), zu Änderungen in der Körpermasse (Cabanac, 2001; Cabanac und Richard, 1996).

*Glukostatische Theorie.* Dieser Theorie liegen Beobachtungen zugrunde, wonach Nervenzellen Glukose als wichtigsten Energielieferanten für ihren Stoffwechsel benötigen. Schwankungen in der Verfügbarkeit von Blutglukose in Abhängigkeit von der Nahrungszufuhr bzw. vom Nährstoffverbrauch können durch bestimmte Nervenzellen (Glukose-responsive Neuronen) registriert und durch die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme ausgeglichen werden (Mayer, 1955; Peters *et al.*, 2002; Seeley und Woods, 2003). Die glukostatische Theorie dient deshalb eher zur Erklärung der akuten, aber nicht der langfristigen Regulation der Energieaufnahme bzw. der Energiebilanz (Mayer, 1955). Zudem wird der Einfluss der Glukosekonzentration im ZNS auf Änderungen in der Nahrungsaufnahme als marginal betrachtet (Seeley und Woods, 2003). Daher ist die glukostatische Theorie für die Definition des Ponderostats nicht geeignet.

### 1.3.3 Alternative Hypothesen zur Körpermasseregulation

*Settling points.* Wirtshafter und Davis (1977) postulierten, dass der Sollwert der Körpermasse im Lebenslauf eines Menschen oder Tieres Änderungen unterworfen ist und mittel- bis langfristig sogenannte *settling points* annimmt. Danach resultieren Änderungen in der Körpermasse insbesondere durch Änderung in der Energieaufnahme *per se* und werden durch das Angebot und die Schmackhaftigkeit der Nahrung moduliert. Entsprechend dieses Regulationsmodells hängt der *settling point* von sensorischen Stimuli, von Mechanismen zur Erhöhung der Körpermasse (z. B. durch Regulation der Nahrungsaufnahme) sowie von einem die Fettmasse regulierenden Rückkopplungsmechanismus ab. Allerdings erklärt das Modell nicht, welche Signale zu Veränderungen z. B. in der Nahrungsaufnahme und der Regulation der Fettmasse und somit zu neuen *settling points* führen. Cabanac interpretierte die Regulation der Körpermasse anhand dieses Modells als bloße Folge eines Gleichgewichts oder Ungleichgewichts zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch (Cabanac, 2003).

*Regulation der Energiehomöostase.* Jüngere Hypothesen diskutieren eine viel komplexere Verarbeitung von Signalen sowohl aus den Energiespeichern des Körpers als auch aus der Energie der Nährstoffe in der zugeführten Nahrung. Die Regulation der

Körpermasse wird dabei durch zentral und peripher vermittelte, redundante und miteinander agierende Mechanismen und Signale beeinflusst (Harris, 1990; Berthoud, 2002; Seeley und Woods, 2003). Es wird davon ausgegangen, dass nicht die Körpermasse *per se*, sondern die Energiehomöostase reguliert wird (Berthoud, 2002; Macdonald, 2003). Diese Regulation erfüllt wahrscheinlich drei Hauptfunktionen (Macdonald, 2003):

- die Entwicklung und Erhaltung der fettfreien Masse,
- die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Versorgung des ZNS mit Kohlenhydraten und
- die Sicherung eines für Reproduktion und Wachstum erforderlichen Ernährungsstatus.

Entsprechend dieser Hypothese existiert nicht eine regulierte *Set-point*-Körpermasse, sondern eine optimale Körpermasse bzw. eine optimale energetische Versorgung des Organismus, bei der die genannten Funktionen erfüllt werden (Macdonald, 2003). Eine langfristig stabile Körpermasse ist demnach das Resultat einer präzisen Regulation der Energiebilanz.

Eine derart komplexe Regulation der Energiehomöostase widerspricht der Annahme, dass ein einzelnes Signal zu Änderungen in der Körpermasse führt. Die Körpermasse gilt vielmehr als das Resultat einer ausgeglichenen Regulation von Energieaufnahme und Energieabgabe. Abhängig von exogenen und endogenen Bedingungen (z. B. durch zirkadiane und zirkannuale Rhythmen, Alterung, Schwangerschaft, Stillzeit etc.) werden dabei unterschiedliche Gleichgewichtszustände erreicht und verteidigt (Berthoud, 2002). Diese Hypothese geht in ihrer Grundidee scheinbar auf die Postulierung der *settling points* zurück (Wirtshafter und Davis, 1977), schließt aber aktive Regulationsmechanismen abhängig vom energetischen Versorgungszustand des Organismus sowie von der Substratversorgung in den Zellen ein.

## 1.4 Der Unterschied zwischen den Geschlechtern

Genetische und hormonelle Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Organismen lassen auch Unterschiede in der Körperzusammensetzung und im Energiestoffwechsel vermuten.

### 1.4.1 Die genetische und hormonelle Ausstattung der Geschlechter

*Geschlechtschromosomen.* Männliche und weibliche Zellen sind durch die

Ausstattung mit den Geschlechtschromosomen XY bzw. XX gekennzeichnet. Die damit verbundene unterschiedliche Genpaarung zwischen beiden Chromosomen führt vermutlich unabhängig von der hormonellen Umgebung zu endogenen Unterschieden in den Zellen (Arnold und Burgoyne, 2004). Der genetische Einfluss ist aber unabhängig vom hormonellen Einfluss nur schwer zu untersuchen, da insbesondere männliche Geschlechtshormone (Androgene) schon sehr früh in der embryonalen Entwicklung auf die Maskulinisierung von Körper und Gehirn einwirken (Birbaumer und Jänig, 2000).

*Geschlechtshormone.* In den Gonaden werden die weiblichen (Östrogene, Gestagene) und männlichen Geschlechtshormone (Androgene) synthetisiert und freigesetzt. Das wichtigste Androgen beim Mann ist das Testosteron, das wichtigste Östrogen bei der Frau ist das  $17\beta$ -Östradiol. Die Rolle dieser beiden Sexualhormone in der Regulation der Körpermasse ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass sie eher modulierende als essentielle Funktionen zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase haben (Mystkowski und Schwartz, 2000). Im Allgemeinen können durch Östradiol vermittelte metabolische Effekte als katabolisch, durch Testosteron vermittelte Effekte als anabolisch betrachtet werden. Dabei wirkt Testosteron vor allem auf die fettfreie Masse. Die Wirkungen von Östradiol auf die Energieaufnahme, den Energieumsatz und die Körpermasse wurden als leptinähnlich beschrieben. Es gibt einige Hinweise darauf, dass Leptin und Östradiol auch ähnliche Regulationsmechanismen nutzen (Mystkowski und Schwartz, 2000). Offensichtlich spielen NPY, MCH und CRH zumindest bei der akuten Östradiolwirkung eine Rolle. Es gibt Hinweise, dass NPY und CRH außerdem Testosteron vermittelte Wirkung haben (Mystkowski und Schwartz, 2000).

#### 1.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Körpermasseregulation

Frauen haben im Vergleich zu Männern eine höhere relative Fettmasse (Van Gaal *et al.*, 1999). Zudem ist das Verhältnis von subkutanem zu viszeralem Fettgewebe sowie der Plasma-Leptinspiegel bei Frauen höher als bei Männern (Rosenbaum *et al.*, 2001; Van Gaal *et al.*, 1999; Havel, 2000; Ahima und Flier, 2000). Östradiol induzierte *in vitro* die Sekretion von Leptin in weißen Fettzellen von Ratten (Machinal *et al.*, 1999). Allerdings konnte das erhöhte Leptin/Fettmasse-Verhältnis bei Frauen bisher weder auf eine durch Östradiol stimulierte Leptinsekretion im subkutanen Fettgewebe noch auf die höhere relative Fettmasse im Vergleich zu Männern zurückgeführt werden (Ahima und Flier, 2000; Rosenbaum *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die geschlechtsspezifischen Leptinspiegel durch den hemmenden Einfluss von Testosteron auf die Leptinsekretion und die Leptin-Genexpression hervorgerufen werden (Van Gaal *et al.*, 1999; Rosenbaum *et al.*, 2001).

Bedingungen, die eine negative Energiebilanz provozieren (z. B. Nahrungsentzug, gesteigerte körperliche Aktivität), führen zu geschlechtsspezifischen Änderungen in der Energiehomöostase. Weibliche Säugetiere zeigen unter solchen energiefordernden Bedingungen eine effizientere Energieverwertung mit geringeren Änderungen in der Körpermasse im Vergleich zu männlichen Tieren (Cortright und Koves, 2000). Unter Nahrungsentzug nutzen weibliche Ratten eher Energie aus dem Abbau von Körperfett als von Protein. Sie schützen damit ihre fettfreie Masse stärker als die Männchen, die unter diesen Bedingungen ihre Energie vor allem aus dem Proteinabbau gewinnen (Cortright und Koves, 2000). Das führt außerdem zu einer geringeren Körpermasseabnahme im Vergleich zu männlichen Ratten, da der massenspezifische Energiegehalt von Fett höher ist als der von Protein. In Untersuchungen am Menschen führte eine akute Erhöhung der Aktivität bei Frauen zu einem niedrigeren respiratorischen Quotienten, der ebenfalls auf eine verstärkte Verstoffwechslung von Fett zur Energiegewinnung und damit auf eine Schonung der Glycogenreserven hinweist (Cortright und Koves, 2000; Tate und Holtz, 1998). Männer nutzten dagegen vor allem die Energie aus den Glycogen- und Proteinreserven (Cortright und Koves, 2000). Östrogen trägt wahrscheinlich signifikant zur Einsparung von Glycogen bei Frauen unter körperlicher Aktivität bei (Tate und Holtz, 1998).

### 1.5 Zielstellung

Die oben diskutierten Modelle zur Körpermasseregulation berücksichtigen vor allem hormonelle und substratspezifische Faktoren (Verfügbarkeit von Lipiden und Glukose). Der direkte Einfluss des Körpergewichts *per se* auf diese Regulation ist aber bisher kaum untersucht worden. Es gibt jedoch Beobachtungen, die den Einfluss einer akut erhöhten Körpermasse auf die Regulation des Körpergewichts vermuten lassen:

- Die Implantation von Telemetrie-Transpondern zur Bestimmung der Körperkerntemperatur führte bei Hamstern zu einer dem Gewicht des Transponders entsprechenden Körpermasseabnahme (Adams *et al.*, 2001).
- Die durch konstante Zentrifugation erzielte Schwerkrafterhöhung (>1G) führt zu einer Vervielfachung der Körpermasselast auf den Organismus. Unter erhöhter Schwerkraft kommt es akut zur Reduktion der Energieaufnahme und der Körpermasse sowie zur Erhöhung des Energieumsatzes. Langfristig werden Energieaufnahme und Wachstumsrate wieder normalisiert, aber die Körpermasse wird nicht auf das Niveau von Kontrolltieren (Haltung unter normaler Schwerkraft von 1G) regeneriert (Warren *et al.*, 1997).



Die akute Erhöhung der Körpermasse durch die Transmitterimplantation und durch die Zentrifugation ist nicht mit akuten Änderungen in einem bestimmten Körpermassekompartiment (z. B. Erhöhung in der Fettmasse) verbunden. Es scheint daher, dass die Erhöhung der Körpermasse selbst ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts haben könnte. Diese Vermutung geht auf die klassische *Set-point*-Theorie und die Konstanthaltung der Körpermasse als solche und nicht als Folge einer lipostatischen Regulation zurück.

Zur Untersuchung dieses Einflusses ist es notwendig, die Körpermasse künstlich zu verändern. Um die Körpermasse jedoch unabhängig von der Veränderung metabolischer Parameter zu manipulieren, die mit Änderungen in der Körperzusammensetzung einhergehen, kommt eine diätinduzierte Erhöhung der Körpermasse oder eine durch Fettmasseentnahme herbeigeführte Verminderung der Körpermasse nicht in Betracht. Die Belastung der Körpermasse mittels erhöhter Schwerkraft ist zwar nicht invasiv, hat aber aufgrund der Zentrifugalkraft einen nachteiligen Einfluss auf die Verteilung der Körperflüssigkeiten. Ein unterschiedlicher Hydratisierungsgrad kann abhängig vom Zelltyp zu intrazellulären Veränderungen in der Genexpression und damit zu Veränderungen im gesamten Stoffwechsel führen (Schliess und Haussinger, 2000; Weiergraber und Haussinger, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewichte mit einer definierten Masse implantiert (ähnlich der vorn beschriebenen Transponderimplantation). Das ermöglichte die Erhöhung der Körpermasse *per se* unabhängig von der Erhöhung stoffwechselaktiver Masse.

Um alle Versuchstiere verhältnismäßig der gleichen Belastung auszusetzen, wurde jeweils ein Gewicht von 10% der aktuellen Körpermasse in die Bauchhöhle implantiert. Die akute Erhöhung der Körpermasse durch die Implantation dieses zusätzlichen Gewichtes sollte entsprechend der *Set-point*-Theorie (vergl. Abb. 1-2) zu einer 10%igen Verminderung der biologischen Körpermasse (BKM) führen, um die Gesamt-Körpermasse (BKM+ implantierte Masse) auf das Niveau der Ausgangsmasse zu regenerieren.

Dieses Versuchsmodell diente bei der Maus zur Untersuchung folgender Hypothesen:

1. Eine künstliche Erhöhung der Körpermasse *per se* wird durch Reduktion der BKM bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmasse kompensiert.
2. Aufgrund der effizienteren Energieverwertung zur Aufrechterhaltung der Körpermasse unter negativer Energiebilanz ist die Regulation der Körpermasse entsprechend eines gewichtsspezifischen *Set-points* bei weiblichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei männlichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiermodell und Haltung

*Zucht und Haltung.* Männliche und weibliche Mäuse vom Stamm FVB (FVB/NTac@Bom) wurden im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung gezüchtet (*inbred*). Ein Teil der im Kurzzeitversuch (s. Kap. 2.2) verwendeten Tiere stammte aus der Tierzuchanstalt M&B A/S Ry in Dänemark. Alle Mäuse wurden unter Standardbedingungen gehalten (s.Tab. 2-1 und Tab. 2-2).

*Auswahlkriterien.* Mäuse stellen ein gebräuchliches Tiermodell zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen am Gesamtorganismus dar. Sie sind zudem hinsichtlich Zucht- und Haltungsbedingungen für die Durchführung von Tierversuchen geeignet, die eine höhere Anzahl von Individuen erfordern. Mäuse waren insbesondere für diesen Versuch geeignet, weil die Körpergröße der Mäuse das Design von Implantaten mit einem geeigneten Masse-Volumen-Verhältnis (Masse von ca. 2-4g bei einer Größe von ca. l=1,4cm, d=0,8cm) ermöglichte.

### 2.2 Versuchsdesign

In zwei Teilversuchen wurden chronische Effekte (Langzeitversuch, LZV) und akute Effekte (Kurzzeitversuch, KZV) auf die Energiebilanz infolge einer künstlichen Erhöhung der Körpermasse untersucht. Abbildung 2-1 zeigt eine schematische Übersicht der beiden Teilversuche. Der LZV umfasste den Zeitraum von 14 Wochen, der darauffolgende KZV den Zeitraum von zwei Wochen nach der Implantation. In den Teilversuchen wurden folgende Parameter bestimmt:

Tab. 2-1: **Haltungsbedingungen der Mäuse.**

<i>Haltungsbedingungen</i>	
Licht-Dunkel-Regime	12:12 (Licht 6-18 Uhr)
Lufttemperatur	25 °C
Luftfeuchte	50-60%
Standardfutter/Wasser	<i>ad libitum</i>
Haltung	
Männchen	einzeln
Weibchen	- zu zweit/einzeln (LZV) - einzeln (KZV)

LZV=Langzeitversuch, KZV=Kurzzeitversuch (s. Kap. 2.2)

**Tab. 2-2: Zusammensetzung des Standardfutters Altromin 1324 (*pellets*) lt. Herstellerangaben ([www.altromin.de](http://www.altromin.de)).**

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>Gehalt im Futter Altromin 1324 (% w/w)</i>
Rohprotein	19,0
Rohfett	4,0
Rohfaser	6,0
Rohasche	7,0
N-freie Extraktstoffe	50,0
Wasser	13,5

Das Futter war zusätzlich bedarfsgerecht mit Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen supplementiert.

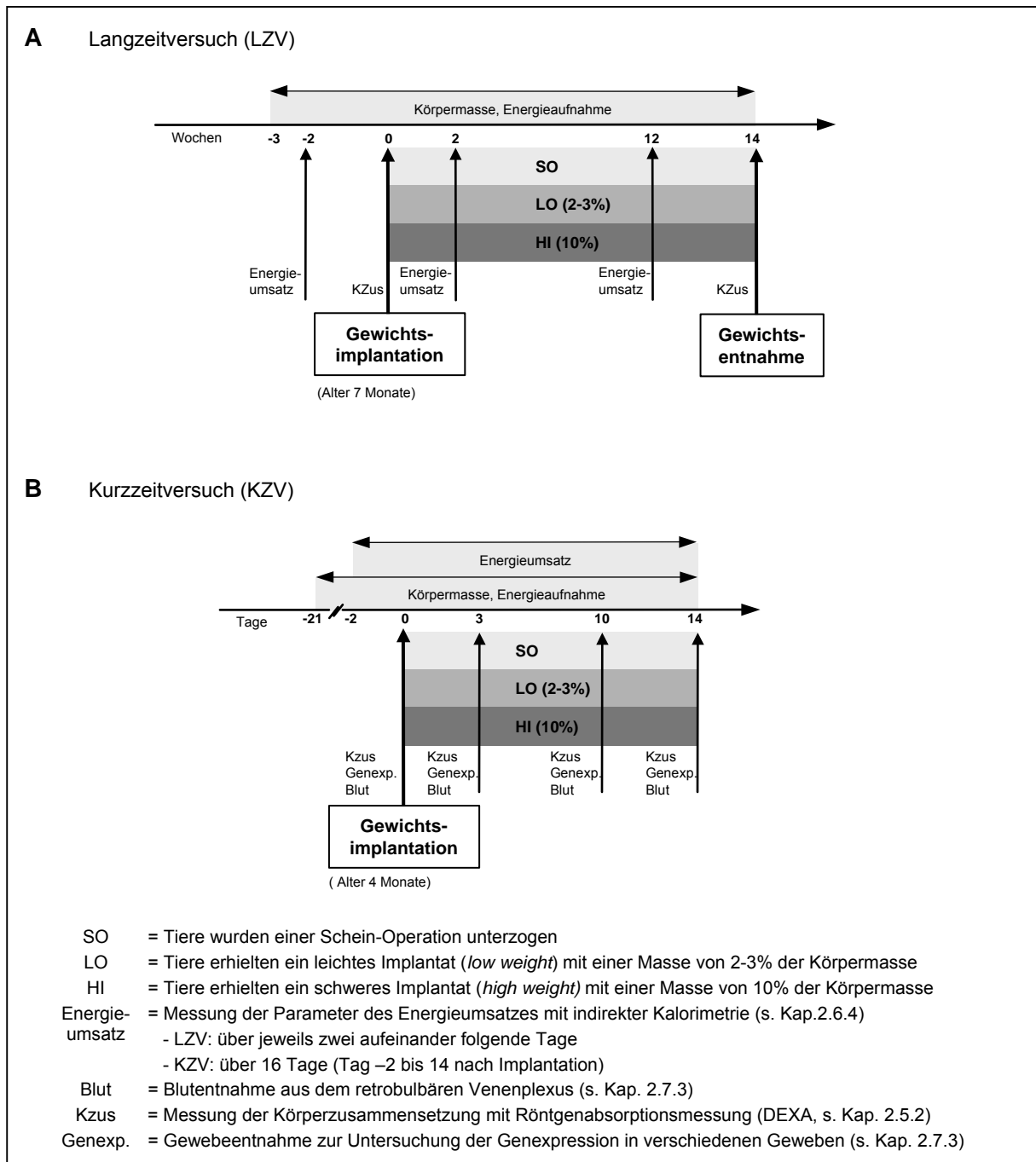
- Körpermasse und Energieaufnahme (s. Kap. 2.4),
- Körperzusammensetzung mittels Röntgenabsorptionsmessung (s. Kap. 2.5),
- Parameter des Energieumsatzes (Gesamt-Energieumsatz, Ruheumsatz, *physical activity level*, respiratorischer Quotient) mittels indirekter Kalorimetrie (s. Kap. 2.6),
- Serum- und Plasmakonzentrationen von Leptin und Corticosteron (s. Kap. 2.7.3 und 2.8),
- Genexpression von Leptin und der Entkopplerproteine UCP1 und UCP3 (s. Kap. 2.7.3 und 2.9)

Beide Teilversuche begannen mit einer dreiwöchigen Vorlaufphase zur physiologischen Charakterisierung der Versuchstiere unter basalen Bedingungen.

Die Implantation der Gewichte erfolgte zum Zeitpunkt 0 (Alter der Mäuse: LZV - 7 Monate, KZV - 4 Monate). Am Implantationstag wurden die Mäuse zufallsartig drei Versuchsgruppen zugeordnet und einer Operation unterzogen:

- Schein-Operation (SO), keine Implantation, Operation unter gleichen Bedingungen wie bei der Implantation (zur Kontrolle von Einflüssen durch die Operation),
- leichte Implantate (LO, *low weight*), Implantation eines Gewichtes mit einer Masse von 2-3% der Körpermasse von gleicher Größe wie das schwere Implantat (zur Kontrolle von Einflüssen durch das zusätzliche Volumen des Implantats),
- schwere Implantate (HI, *high weight*), Implantation eines Gewichtes mit einer Masse von ca. 10% der Körpermasse von gleicher Größe wie das LO.

**Langzeitversuch.** Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Gewichtsimplantation sieben Monate alt. Nach der Implantation erfolgten zwei- bis dreimal wöchentlich Messungen von Körpermasse und Futteraufnahme. Jeweils nach zwei und 12 Wochen wurde der Energieumsatz bei 4-6 Männchen und Weibchen pro Gruppe an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Zum Zeitpunkt der Implantation und 14 Wochen danach erfolgte die



**Abb. 2-1:** Schematische Übersicht der durchgeführten Tierversuche im Langzeitversuch (A) und im Kurzzeitversuch (B).

Bestimmung der Körperzusammensetzung. Danach wurden alle Tiere mit Kohlendioxid getötet und entsorgt.

*Kurzzeitversuch.* Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Gewichtsimplantation vier Monate alt. Nach der Implantation wurden täglich Körpermasse und Energieaufnahme gemessen. Jeweils 9-10 Männchen und Weibchen pro Gruppe wurden zum Implantationszeitpunkt (Tag 0) bzw. drei, zehn und 14 Tagen danach getötet. Vor jeder Implantation und Tötung wurde bei jedem Tier die Körperzusammensetzung bestimmt. Von den am Tag 14 getöteten Mäusen wurden jeweils sechs Männchen und Weibchen pro Gruppe für den gesamten Versuchszeitraum von 2 Wochen nach der Implantation in der indirekten Kalorimetrie gehalten (Bestimmung des Energieumsatzes). Am Versuchsende wurden alle Mäuse unter Narkose entblutet (Gewinnung von Plasma und Serum), durch Dekapitierung getötet, und es wurden verschiedene Gewebe zur Untersuchung der Genexpression entnommen (s. Kap. 2.7.3).

### 2.3 Gewichtsimplantate

Die Implantate bestanden aus einem zylindrischen Kernstück mit einer Abmessung von 1,4 cm Länge und 0,8 cm Durchmesser, das von einer Wachshülle (Elvax Wax, Minimiter Co., Sunriver, OR, USA) umgeben war. Das Kernstück der leichten Implantate bestand aus einem Stück Plastikschauch. Das Kernstück der schweren Implantate bestand aus einem



**Abb. 2-2:** Gewichtsimplantat mit einer narkotisierten Maus zum Größenvergleich.

kurzen Metallzylinder mit unterschiedlich starker Ausbohrung, um verschiedene Massen zu erhalten. Die Kernstücke wurden mit Watte gefüllt und nummeriert, sodass die Zahlen durch das Wachs noch sichtbar waren. Die Nummerierung war erforderlich, um später bei der Implantation schnell ein passendes Gewichtsimplantat für die entsprechende Körpermasse der Tiere zu ermitteln. Die so vorbereiteten Kernstücke wurden kurz in erwärmtes Wachs getaucht und nach dem Erkalten so bearbeitet, dass die Oberfläche geschlossen und glatt war. Abbildung 2-2 zeigt ein Implantat zum Größenvergleich mit einer narkostisierten Maus.

## 2.4 Körpermasse und Energieaufnahme

Körpermasse und Futtermittelaufnahme wurden regelmäßig durch Wiegen bestimmt (Waage BP 2100, Sartorius AG,  $d=0,1g$ ). Vor der Implantation erfolgte die Messung ein- bis zweimal wöchentlich, danach zwei- bis dreimal wöchentlich immer vormittags zwischen 8 und 11 Uhr. Tiere und Futter wurden in einer auf der Waage befindlichen Schale gewogen. Zum Wiegen der Tiere wurde eine Sonderfunktion der Waage benutzt, die aus zehn hintereinander gemessenen Werten einen Mittelwert ermittelt. Das ermöglichte eine sehr genaue Bestimmung der Körpermasse auch dann, wenn sich das Tier bewegte.

Die tägliche Futtermittelaufnahme wurde durch Differenzwägung bestimmt. Die Differenz der Futtereinwaage zweier aufeinanderfolgender Messungen ( $m_{\text{Futter1}}$ ,  $m_{\text{Futter2}}$ ), geteilt durch die Anzahl der Tage zwischen den beiden Messungen, ergab die tägliche Futtermittelaufnahme (g/Tier/d, s. Gl. 2-1 und 2-2). Zur Berechnung der Energieaufnahme wurde die Menge des aufgenommenen Futters mit dem Energiegehalt des Futters ( $E_{\text{Futter}}$ ) multipliziert (Gl. 2-3), der vorher mittels Bombenkalorimetrie bestimmt wurde (s. Kap. 2.4.2, Energiegehalt s. Tab. 2-3).

$$\text{Futtermittelaufnahme (g/Tier/d)} = \frac{m_{\text{Futter1}} - m_{\text{Futter2}} \text{ (g)}}{\text{Anzahl d. Tage (Futter 1 - Futter 2)}} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

(Kalkulation für einzeln gehaltene Männchen und Weibchen)

$$\text{Futtermittelaufnahme (g/Tier/d)} = \frac{m_{\text{Futter1}} - m_{\text{Futter2}} \text{ (g)}}{\text{Anzahl d. Tage (Futter 1 - Futter 2)} * 2} \quad (\text{Gl. 2-2})$$

(Kalkulation für Weibchen, die zu zweit gehalten wurden.)

$$\text{Energieaufnahme (kJ/Tier/d)} = \text{Futtermittelaufnahme (g/Tier/d)} * E_{\text{Futter}} \text{ (kJ/g)} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

### 2.4.1 Energieaufnahme während der Energieumsatzmessungen

*Langzeitversuch.* Im Respirationskäfig wurde das Futter als gekochtes Schrotfutter angeboten, das die gleiche Zusammensetzung wie das Pellet-Futter hatte. Um eine breiige Konsistenz des Futters zu erreichen, wurde das Schrot im Verhältnis 1:3 mit Leitungswasser gekocht (Feuchtfutter). Nach jedem Messtag wurde nicht verzehrtes Futter aus dem Käfig gesammelt und zurückgewogen. Die Differenz aus Futtereinwaage ( $m_{\text{Futter1}}$ ) und Futterrückwaage ( $m_{\text{Futter2}}$ ) am nächsten Tag ergab die Aufnahmemenge des gekochten Schrotfutters für einen Tag (Futteraufnahme<sub>Feuchtfutter</sub> in g/Tier/d) entsprechend Gl. 2-1 und 2-2. Um die Futteraufnahme im Respirationskäfig (Futteraufnahme<sub>Feuchtfutter</sub>) mit der im Standardkäfig (Futteraufnahme<sub>Trockenfutter</sub>) vergleichen zu können, musste zur Berechnung der entsprechenden Aufnahme von Trockenfutter das Mischungsverhältnis mit Wasser berücksichtigt werden:

$$\text{Futteraufnahme}_{\text{Trockenfutter}} \text{ (g/Tier/d)} = \frac{\text{Futteraufnahme}_{\text{Feuchtfutter}} \text{ (g/Tier/d)}}{3} \quad (\text{Gl. 2-4})$$

Die Berechnung der aufgenommenen Energie erfolgte entsprechend Gl. 2-3.

*Kurzzeitversuch.* Alle Mäuse wurden einzeln in Standardkäfigen gehalten, die in die Anlage der indirekten Kalorimetrie integriert waren. Diese Käfige waren mit einer Futterraufe ausgestattet, in der normales Pellet-Futter angeboten werden konnte. Die Berechnung der aufgenommenen Energie erfolgte entsprechend Gleichungen 2-1 und 2-3.

### 2.4.2 Bestimmung des Energiegehaltes im Futter (Bombenkalorimetrie)

*Messprinzip.* Die zu messende Substanz wird unter reinem Sauerstoff quantitativ verbrannt. Die dabei frei werdende Wärme wird an das die Bombe (Druck- und Aufschlussgefäß) umgebende Wasser abgegeben und als Erhöhung der Wassertemperatur gemessen. Für die Messung stand ein Kalorimeter (Modell C5003 adiabatic, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik) mit adiabatischem Messprinzip zur Verfügung. Dies gewährleistet, dass die gesamte Wärme nur auf das Wasser und nicht auf dessen Umgebung übergeht, indem die das Wasser umgebenden Isolierschichten auf die momentane Wassertemperatur erwärmt werden.

*Durchführung.* Für jede Messung wurde ca. 1 g der Futterproben in einen Quarztiigel eingewogen, in die kalorimetrische Bombe platziert und automatisch gezündet. Die Temperaturerhöhung des Wassers ( $\Delta T$ ) diente der Berechnung des Brennwertes  $H_0$  (Energiegehalt) der untersuchten Substanz in J/g:

$$H_0 \text{ (J/g)} = \frac{C \text{ (J/K)} * \Delta T \text{ (K)} - Q_F \text{ (J)}}{m \text{ (g)}} \quad \text{(Gl. 2-5)}$$

- C = Wärmekapazität des Kalorimetersystems (erforderliche Wärmemenge, um die Temperatur des Meßsystems um 1K zu erhöhen)  
 $\Delta T$  = gemessene Temperaturerhöhung des Kalorimetersystems  
 $Q_F$  = Summe aller Fremdenergien (Brennwerte der Zündhilfsmittel Draht und Wollfaden, chemische Reaktionen)  
m = Einwaage der zu bestimmenden Substanz

**Tab. 2-3: Energiegehalt der Futterproben (Vierfachbestimmung, Bombenkalorimetrie).**

<i>Futterprobe</i>	<i>Energiegehalt (kJ/g)</i>
<i>pellett-Futter</i>	17,51
Schrotfutter (Kalorimetrie im LZV)	17,53

## 2.5 Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung wurde mittels Röntgenabsorptionsmessung (DEXA, *dual-energy x-ray absorptiometry*) untersucht. Mit DEXA können Knochendichte, fettfreie Masse und Fettmasse gemessen werden. Die Röntgenabsorptionsmessung wird sowohl für die Untersuchung am Menschen als auch an Versuchstieren genutzt. Der Vorteil besteht in der wiederholten Anwendbarkeit dieser nicht invasiven Messung aufgrund der Unschädlichkeit der sehr geringen Röntgenstrahlung. So ist im Vergleich zur klassischen chemischen Analyse der Körperzusammensetzung (s. Kap. 2.5.3.1) keine Tötung von Versuchstieren notwendig. Damit ist sie für die Durchführung von Langzeitstudien geeignet. Für die Messungen stand ein speziell für die Analyse von Mäusen bzw. Kleinsäugetern entwickeltes Gerät zur Verfügung (Lunar PIXImus, Lunar Corporation, Madison, WI, USA).

### 2.5.1 Messprinzip

Röntgenstrahlung wird in Abhängigkeit von der durchdrungenen Körpersubstanz unterschiedlich stark absorbiert. Knochengewebe absorbiert stark, knochenfreie Masse schwächer. Diese Eigenschaft wird bei der Bestimmung der Körperzusammensetzung nach der DEXA-Methode ausgenutzt. Während der Messung wird das Tier von Röntgenstrahlung zweier unterschiedlicher Energieniveaus durchdrungen (kegelförmiges Strahlenbündel, < 250mR/Messung), und die nicht absorbierte Strahlung wird durch einen stationären



Strahlendetektor unterhalb des Tieres gemessen. Mit Hilfe mathematischer Algorithmen werden Menge und Art der Körpersubstanz in jedem aufgenommenen Pixel berechnet, wobei die knochenfreie Masse außerdem in Fettmasse und fettfreie Masse unterteilt wird (Grier *et al.*, 1996; Jebb *et al.*, 1996).

Zur Kalibrierung des Gerätes dient ein etwa mausgroßes, sogenanntes Phantom. Es besteht aus unterschiedlich dicken Aluminiumschichten (Simulierung der Knochenmasse) und unterschiedlichen Anteilen von Acryl und Aluminiumsulfid (Simulierung der knochenfreien Masse).

Die Software des PIXImus berechnet folgende Parameter: Knochendichte (BMD: *bone mineral density*; g/cm<sup>2</sup>), Masse der Knochenminerale (BMC: *bone mineral content*; g), Knochenoberfläche (*area*; cm<sup>2</sup>), Körpermasse (g), fettfreie Masse (FFM; g) und Fettmasse (FM; g, %). Für die dargestellten Versuche wurden Messwerte der fettfreien Masse und der Fettmasse berücksichtigt.

### 2.5.2 Durchführung der Messungen

Während der vierminütigen Messung lagen die Tiere auf einer speziell gekennzeichneten Unterlage, sodass der ganze Körper von den Röntgenstrahlen erfasst werden konnte. Zur Ruhigstellung war eine Narkose (Ketamin/Rompun bzw. Chloralhydrat) notwendig (s. Kap. 2.7.1). Sie wurde stets so dosiert, dass sie für nachfolgende Behandlungen (Implantation bzw. Blutentnahme) noch wirksam war.

Das Messgerät war so programmiert, dass pro Tier jeweils vier Messungen erfolgten, die am Ende gemittelt und gemeinsam mit einem Röntgenbild am Bildschirm ausgegeben wurden. Die Software des PIXImus ermöglichte die Nachbearbeitung der Messergebnisse, indem bestimmte Körperregionen für die Berechnung ein- oder ausgeschlossen werden konnten. Da viele Tiere länger waren, als es das Messfenster erlaubte, wurde der Schädel aus der Messung für alle Tiere ausgeschlossen (Nagy und Clair, 2000).

### 2.5.3 Versuche zur Validierung der Messungen

Messungen zur Fettbestimmung mit dem PIXImus wurden in einem zusätzlichen Versuch mit Werten aus der als Gold-Standard angesehenen Fettextraktion verglichen (Helrich, 1990). In diese Untersuchungen wurden männliche (n=29) und weibliche (n=17) Mäuse (FVB/NTac@Bom) einbezogen. Nach Bestimmung der Körpermasse (KM) wurden die Tiere

mit Ketamin/Rompun (s. Kap. 2.7.1) narkotisiert und mit dem PIXImus gemessen (s. Kap. 2.5.2). Danach wurden sie mit Kohlendioxid getötet und bis zur weiteren Ganzkörperanalyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  separat gelagert.

### 2.5.3.1 Chemische Analyse der Fettmasse

*Prinzip.* Aus trockenem Tierhomogenat (Karkass) wird das Fett extrahiert. Anhand der Massedifferenz des Homogenats vor und nach Fettextraktion kann der Fettgehalt des Tieres berechnet werden.

*Karkassierung.* Die gefrorenen Tiere wurden aufgetaut und nach Zusatz von 10-15 ml 5%iger Salzsäure für 3 Stunden bei  $121^{\circ}\text{C}$  autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde der Karkass gewogen ( $m_{\text{Kark}}$ ) und homogenisiert (Ultra-Turrax T25, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik). Das Homogenat wurde erneut eingewogen ( $m_{\text{Hom-nass}}$ ) und über 2-3 Tage lyophilisiert (Modulyo 4K, Edwards). Das trockene Homogenat ( $m_{\text{Hom-trock}}$ ) wurde dann bis zur weiteren Analyse luftdicht verschlossen aufbewahrt. Die absolute Trockenmasse eines Tieres ( $TM_{\text{Tier}}$ ) wurde nach Gleichung 2-6 bestimmt.

$$TM_{\text{Tier}} (\text{g}) = m_{\text{Kark}} (\text{g}) * \frac{m_{\text{Hom-trock}} (\text{g})}{m_{\text{Hom-nass}} (\text{g})} \quad (\text{Gl. 2-6})$$

*Fettextraktion.* Mittels Soxhlet-Apparatur und Petroleumether (Benzin 40-60, Carl Roth GmbH & Co) als Extraktionsmittel wurde das in den Proben enthaltene Fett extrahiert. Dazu wurden jeweils 2 g einer Karkassprobe in getrocknete (4 h,  $110^{\circ}\text{C}$ , Hereaus T6060, Kendro Laboratory Products, Hanau) Faltenfilter eingewogen und bis zur Gewichtskonstanz (ca. 4 h,  $110^{\circ}\text{C}$ ) getrocknet ( $TM_{\text{Karkass}}$ ). Danach erfolgte die Fettextraktion über 6 Stunden bei ca.  $60 - 70^{\circ}\text{C}$ . Währenddessen löste sich das Fett aus der Probe heraus und reicherte sich im Extraktionsmittel an. Die so entfettete Probe ( $TM_{\text{Karkass entf.}}$ ) wurde erneut bis zur Gewichtskonstanz (ca. 4h,  $110^{\circ}\text{C}$ ) getrocknet. Die Massendifferenz der eingewogenen Karkassprobe vor und nach der Extraktion entspricht der Fettmasse in der Karkassprobe ( $FM_{\text{Karkass}}$ , s. Gl. 2-7)

$$FM_{\text{Karkass}} (\text{g}) = TM_{\text{Karkass}} (\text{g}) - TM_{\text{Karkass entf.}} (\text{g}) \quad (\text{Gl. 2-7})$$

Die Fettmasse des Tieres ( $FM_{\text{Tier}}$ ) errechnete sich nach Gleichungen 2-8 und 2-9.

$$FM_{\text{Tier}} (\text{g}) = TM_{\text{Tier}} (\text{g}) * \frac{FM_{\text{Karkass}} (\text{g})}{TM_{\text{Karkass}} (\text{g})} \quad (\text{Gl. 2-8})$$

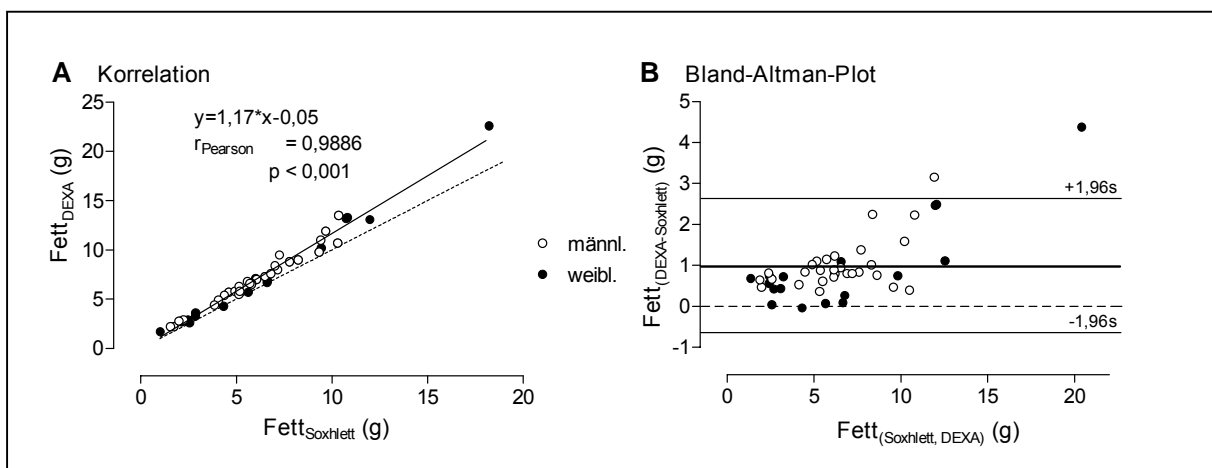
$$FM_{\text{Tier}}(\%) = \frac{FM_{\text{Tier}}(\text{g}) * 100}{KM(\text{g})} \quad (\text{Gl. 2-9})$$

### 2.5.3.2 Ergebnisse der Validierung

Die chemische Körperfettbestimmung mittels Petroletherextraktion und die Bestimmung der Körperfettmasse mittels DEXA wurden durch zwei statistische Verfahren miteinander verglichen:

- mittels Korrelation zur Einschätzung der Validität der beiden Methoden.
- mittels Bland-Altman-Plot, um die Aussage über quantitative Unterschiede der Messmethoden zu ermöglichen (Bland und Altman, 1999).

Abbildung 2-3A zeigt, dass die mit beiden Methoden gemessenen Messwerte für die Fettmasse sehr gut miteinander korrelieren ( $r_{\text{Pearson}}=0,9886$ ,  $p<0,001$ ). Das bedeutet, dass Unterschiede im Fettgehalt zwischen den Tieren mit beiden Methoden gleich genau erfasst werden. Im Bland-Altman-Plot (Abb. 2-3B) ist die Differenz aus der Fettbestimmung mittels Soxhlet und mittels DEXA (y-Achse) gegen den mittleren Fettgehalt aus beiden Messmethoden (x-Achse) aufgetragen. Der mittlere Fettgehalt dient als geschätzter Richtwert für den wahren Fettgehalt, der wahrscheinlich zwischen den Einzelmesswerten der beiden Methoden liegt. Anhand der Punkteverteilung kann bei einem bestimmten Fettgehalt



**Abb. 2-3:** Methodenvergleich zur Bestimmung der Fettmasse mittels Korrelation (A) und Bland-Altman-Plot (B). Daten von Männchen und Weibchen sind unterschiedlich markiert, wurden aber gemeinsam in die Berechnungen einbezogen. In (A) ist zum Vergleich die Regressionsgerade für die Übereinstimmung der beiden Methoden dargestellt ( $y=x$ , gestrichelte Linie). Der Bland-Altman-Plot zeigt die mittlere Fettmassedifferenz zwischen beiden Methoden (fette Linie), die Begrenzung des Übereinstimmungsintervalls (dünne Linien) sowie zum Vergleich die Nulllinie (gestrichelte Linie), die einer Übereinstimmung des Fettgehalts aus beiden Methoden entspräche. Nähere Erläuterungen s. Text.

die Differenz zwischen beiden Methoden an der y-Achse abgelesen werden. Der Mittelwert der Differenz ist durch eine fette Linie gekennzeichnet und liegt bei 0,99 g. Dementsprechend wird durch die Fettbestimmung mit dem PIXImus der Fettgehalt im Vergleich zur Fettextraktion im Mittel um ca. 1 g überschätzt. Die dünnen Linien bezeichnen den Bereich des sogenannten Übereinstimmungsintervalls, in dem 95% der Differenzen aus beiden Methoden liegen (Bland und Altman, 1999). Es umspannt einen Bereich von -0,66 g bis 2,64 g und ist damit relativ groß. Das liegt daran, dass einige wenige Werte stärker um die mittlere Differenz der Fettmasse aus beiden Messmethoden streuen. Anhand der Form der Punktwolke im Bland-Altman-Plot wird ersichtlich, dass es sich bei diesen Werten im wesentlichen um Werte von Tieren mit einer hohen Fettmasse handelt. Offensichtlich verschlechtert sich die Korrelation der beiden Methoden mit höherer Fettmasse, da die mit dem PIXImus gemessene Fettmasse noch stärker überschätzt wird. Die im LZV und KZV untersuchten Mäuse hatten mit dem PIXImus gemessene Fettmassen von 2,1 - 10,7 g bei den Männchen und 1,5 - 7,9 g bei den Weibchen. Diese Fettmassen liegen im Bland-Altman-Plot in dem Bereich, der eine geringere Wertestreuung um die mittlere Differenz der Fettmasse aus beiden Messmethoden aufweist, und in dem der gemessene Unterschied in der Fettmasse zwischen DEXA und chemischer Analyse immer annähernd gleich groß ist.

Eine Überschätzung des Fettgehalts durch die Messung mittels DEXA im Vergleich zur chemischen Analyse ist mehrfach berichtet worden (Jebb *et al.*, 1996; Nagy und Clair, 2000; Rose *et al.*, 1998). Das hat mehrere Ursachen. Zum einen werden durch Petrolether vor allem Triglyzeride nicht aber andere polare Lipide (z. B. Phospholipide, Sphingolipide) extrahiert (Nagy und Clair, 2000). Triglyzeride machen jedoch den Großteil der Fettmasse von ca. 83% aus (Comizio *et al.*, 1998) und sind deshalb ein geeigneter Parameter, den Körperfettgehalt zu bestimmen. Zum anderen liegt der Messung mittels DEXA ein grundsätzlich anderes Messprinzip zugrunde, was mehrere Annahmen einschließt. Zum einen kann das Messsystem nur zwischen zwei Komponenten pro Pixel unterscheiden, zwischen Fettmasse oder fettfreier Masse in knochenmasserefreien Bereichen oder zwischen Knochenmasse und knochenfreier Masse. Dementsprechend muss die Zusammensetzung der knochenfreien Masse in Bereichen mit Knochen berechnet werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Strahlenabsorption der über und unter den Knochen befindlichen Masse der knochenfreien Masse neben dem Knochen entspricht. Die über und unter den Knochen befindliche knochenfreie Masse wird so interpoliert (persönliche Kommunikation mit Lunar Corporation). Zum anderen könnte die Kalibrierung des Gerätes einen Einfluss auf die Fettbestimmung haben. Das zur Kalibrierung des PIXImus-Gerätes genutzte Phantom besteht aus Materialien, deren Zusammensetzung durch Kalibrierungsstudien erstellt wurde. Daraus könnten systematische Fehler bei der Fettmassebestimmung resultieren (Nagy und

Clair, 2000).

Aus diesen Untersuchungen wird ersichtlich, dass die Messung mittels DEXA die Fettmasse im Mittel um ca. 1 g gegenüber der Bestimmung mittels Petroletherextraktion überschätzt. Dieser Unterschied ist jedoch in einem Bereich von ca. 0-10 g Fett pro Tier (s. Abb. 2-3B) relativ konstant. Für die durchgeführte Studie war es wichtig, Änderungen nach der Gewichtsimplantation immer am gleichen Tier untersuchen zu können. Da die Fettmasse der Versuchstiere nicht über dem genannten Bereich lagen, war es mit dem genutzten DEXA-Gerät möglich, Änderungen in der Fettmasse im Verlauf der Gewichtsimplantation zu bestimmen. Für die Messung der absoluten Fettmasse ist die DEXA-Methode jedoch nicht geeignet (Rose *et al.*, 1998).

## 2.6 Energieumsatzmessungen

### 2.6.1 Grundlagen

Der Energieumsatz wurde mit der indirekten Kalorimetrie im offenen System bestimmt. Dabei wird die vom Körper abgegebene Energie nicht direkt in Form von Wärme (direkte Kalorimetrie), sondern indirekt über den Sauerstoffverbrauch und die Anreicherung von Kohlendioxid in der ausgeatmeten Luft gemessen. Das ist möglich, weil die Körperzellen ihre Energie unter Normalbedingungen vorrangig aus dem oxidativen Abbau der Nährstoffe aus der Nahrung bzw. der gespeicherten Energie (Kohlenhydrate bzw. Glycogen, Fette, Proteine) gewinnen und zu Kohlendioxid, Wasser, Wärme und mechanischer Arbeit umsetzen (Grote, 2000; Noack, 1995). Durch Einspeisung der Abbauprodukte der Makronährstoffe in den Zitratzyklus und die Atmungskette produzieren die Mitochondrien beim Prozess der oxidativen Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP), den wichtigsten Energielieferanten für sämtliche Stoffwechselforgänge. Da das energiereiche ATP hauptsächlich durch den oxidativen Abbau der Nährstoffe gebildet wird und die Speicherkapazität des Körpers für Sauerstoff sehr gering ist, korreliert die Menge des verbrauchten Sauerstoffs sehr gut mit der Energie- bzw. Wärmeproduktion (Schutz, 1995).

Die indirekte Kalorimetrie ermöglicht aus der Messung von verbrauchtem Sauerstoff ( $VO_2$ ) und dem bei der Oxidation der Nährstoffe produzierten Kohlendioxid ( $VCO_2$ ) und Harnstickstoff ( $N_{ex}$ ) die Berechnung der produzierten Energie- bzw. Wärmemenge. Die Grundlage der Berechnung des Energieumsatzes (EU) bildet die Gleichung von Weir (1949):

$$EU(kJ) = a * VO_2 (l) + b * VCO_2 (l) - c * N_{ex} (g) \quad (Gl. 2-10)$$

Die Koeffizienten dieser Gleichung unterscheiden sich geringfügig zwischen verschiedenen

Autoren je nach Versuchsobjekt (Mensch oder Tier) und Verwendung unterschiedlicher Bezugssubstanzen für die Oxidation der drei Hauptnährstoffe (Frenz, 1999; Jequier und Felber, 1987; Schutz, 1995). Die Weir-Gleichung ist nur bei Annahme bestimmter Voraussetzungen gültig. Dazu zählen u. a. ausgeglichene Bicarbonat-Speicher, stabile hämodynamische und metabolische Bedingungen und ausreichend lange Messzeiträume, um verlässliche Werte für  $VO_2$ ,  $VCO_2$  und  $N_{ex}$  zu erhalten (Schutz, 1995). Außerdem gelten sämtliche Formeln, die gemessene Volumina von  $O_2$  und  $CO_2$  einbeziehen nur für Gase unter Normalbedingungen (Temperatur: 273K, Luftdruck: 760 Torr, Luftfeuchte: 0%), sodass die gemessenen Volumina vor dem Einsetzen in die Gleichungen auf Normalbedingungen umgerechnet werden müssen (Lentner, 1981).

Für die hier beschriebenen Messungen wurde die Gleichung von Frenz (1995) zur Berechnung des Energieumsatzes genutzt, deren Koeffizienten für die Messung von Ratten ermittelt wurden, aber auch für andere Tierspezies anwendbar ist (Hoffmann und Schiemann, 1980) (Gl. 2-11):

$$EU(kJ) = 16,17 * VO_2(l) + 5,03 * VCO_2(l) - 5,98 * N_{ex}(g) \quad (\text{Gl. 2-11})$$

Das Verhältnis von  $CO_2$ -Abgabe und  $O_2$ -Aufnahme wird als respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet (Gl. 2-12). Er ist abhängig von der Art der oxidierten Nährstoffe und dient zur Abschätzung ihres Anteils am Energieumsatz.

$$RQ = \frac{VCO_2}{VO_2} \quad (\text{Gl. 2-12})$$

Bei reiner Kohlenhydratverbrennung beträgt der RQ 1,00, bei reiner Fettverbrennung 0,70 bei reiner Eiweißverbrennung 0,81. Nur unter bestimmten Bedingungen wird der normale Bereich des RQ von 0,70 bis 1,00 unterschritten (vermehrter Fett- und Proteinabbau durch verminderten Glukose-Stoffwechsel bei Diabetes oder Fasten) bzw. überschritten (Kohlenhydratmast, akute Hyperventilation) (Ulmer, 2000).

Die Messung des verbrauchten Sauerstoffs hat den größten Einfluss auf den Energieumsatz (73 - 80%; Frenz, 1999; Schutz, 1995) und muss deshalb so genau wie möglich erfolgen. Der Sauerstoffverbrauch  $VO_2$  setzt sich aus zwei Größen zusammen:

$$VO_2 = (VO_{2in} - VO_{2aus}) + \Delta VO_2 / \Delta t \quad (\text{Gl. 2-13})$$

Dabei entspricht  $(VO_{2in} - VO_{2aus})$  dem Sauerstoffverbrauch (Differenz aus dem Volumen des in den Respirationskäfig hinein strömenden Sauerstoffs,  $VO_{2in}$ , und dem Volumen des Sauerstoffs in der abgesaugten Luft,  $VO_{2aus}$ ). Der Term  $\Delta VO_2 / \Delta t$  beschreibt die Änderung des Sauerstoffgehalts im Käfig in der Zeit  $\Delta t$ . Für die exakte Berechnung des verbrauchten

Volumens an Sauerstoff muss berücksichtigt werden, dass das Volumen der einströmenden Luft meist größer als das Volumen der ausströmenden Luft ist. Das resultiert aus der normalerweise geringeren Produktion von CO<sub>2</sub> im Vergleich zum O<sub>2</sub>-Verbrauch bei RQ < 1 (Ausnahme: reine Glukoseoxidation, wenn VO<sub>2</sub> = VCO<sub>2</sub>). Aus diesem Grund und zur Berücksichtigung der Stärke des Gasflusses muss VO<sub>2</sub> mit Hilfe der Gleichung von Haldane korrigiert werden (Jequier und Felber, 1987).

Die Anwendung der Gleichung von Haldane (Jequier und Felber, 1987) auf die Messung mit der genutzten Anlage führte zu folgender Formel für die Volumenkorrektur von VO<sub>2</sub>:

$$VO_2 \text{ (l/h)} = F \text{ (l/h)} * \frac{\left( \frac{\Delta FO_2 \text{ (Vol\%)}}{100} - \frac{\Delta FCO_2 \text{ (Vol\%)}}{100} * \frac{F_{in} O_2 \text{ (Vol\%)}}{100} \right)}{1 - \frac{F_{in} O_2 \text{ (Vol\%)}}{100}} \quad (\text{Gl. 2-14})$$

- F = gemessene Flussrate
- ΔFO<sub>2</sub> = O<sub>2</sub>-Fraktion in einströmender Luft minus O<sub>2</sub>-Fraktion in abgasaugter Luft
- ΔFCO<sub>2</sub> = CO<sub>2</sub>-Fraktion in abgasaugter Luft minus CO<sub>2</sub>-Fraktion in einströmender Luft
- F<sub>in</sub>O<sub>2</sub> = 20.94 Vol% (entspricht Sauerstoffgehalt der Luft, der als konstant angenommen wird)

Die Menge des produzierten Kohlendioxids wurde nach Gleichung 2-15 berechnet:

$$VCO_2 \text{ (l/h)} = F \text{ (l/h)} * \frac{\Delta FCO_2 \text{ (Vol\%)}}{100} \quad (\text{Gl. 2-15})$$

Die Messung von VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub> und ausgeschiedenem Harnstickstoff (N<sub>ex</sub>) ermöglicht außerdem die Bestimmung der Oxidationsrate für die einzelnen Nährstoffe (Frenz, 1995; Frenz, 1999; Jequier und Felber, 1987; Schutz, 1995). Diesen Formeln liegen wiederum bestimmte Annahmen für deren Gültigkeit zugrunde (Frenz, 1999; Schutz, 1995). Da in dieser Arbeit das Ausmaß der Substratoxidation anhand des RQ abgeschätzt wurde (s. o.), wird hier nicht näher auf die Herleitung dieser Formeln eingegangen.

### 2.6.2 Berechnung von Gesamt-Energieumsatz, Ruheumsatz und Abschätzung der Bewegungsaktivität

**Gesamt-Energieumsatz.** Der Gesamt-Energieumsatz (kJ/d) wurde als Mittelwert aus allen Einzelwerten eines Tages berechnet (Gesamt-Energieumsatz<sub>kJ/d</sub>). Der Energieumsatz und der Ruheumsatz hängen am stärksten von der fettfreien Masse ab (Bogardus et al., 1986). Deshalb wird der Energieumsatz zur Abschätzung von Unterschieden zwischen unterschiedlich schweren Versuchstieren oft mit der fettfreien Masse normalisiert (kJ/g FFM).

An jungen Ratten wurde gezeigt, dass der Energieumsatz mit der fettfreien Masse und der absoluten Körpermasse gleich gut korrelierte (Wiedmer et al., 2002). Deshalb wurde der Gesamt-Energieumsatz zur Abschätzung des Einflusses unterschiedlicher Körpermassen zwischen Männchen und Weibchen zusätzlich mit der Körpermasse der Mäuse an dem entsprechenden Tag normalisiert (Gesamt-Energieumsatz<sub>kJ/d/g</sub>).

*Ruheumsatz.* Zur Erfassung des Ruheumsatz (kJ/d) diene jeweils das Mittel der zehn niedrigsten Messwerte für den Energieumsatz an einem Versuchstag (Klaus et al., 1998). Auch der Ruheumsatz wurde analog zum Gesamt-Energieumsatz sowohl absolut (Ruheumsatz<sub>kJ/d</sub>) als auch mit der Körpermasse normalisiert (Ruheumsatz<sub>kJ/d/g</sub>) berechnet.

*Bewegungsaktivität.* Zur Abschätzung der Bewegungsaktivität wurde der *physical activity level* (PAL) berechnet. Er entspricht dem Quotienten aus Gesamt-Energieumsatz und Ruheumsatz (s. Gl. 2-16). Je höher der PAL ist, desto höher ist auch der Unterschied zwischen Ruheumsatz und Gesamt-Energieumsatz, was unter normalen Laborbedingungen vor allem durch eine erhöhte Bewegungsaktivität herbeigeführt wird.

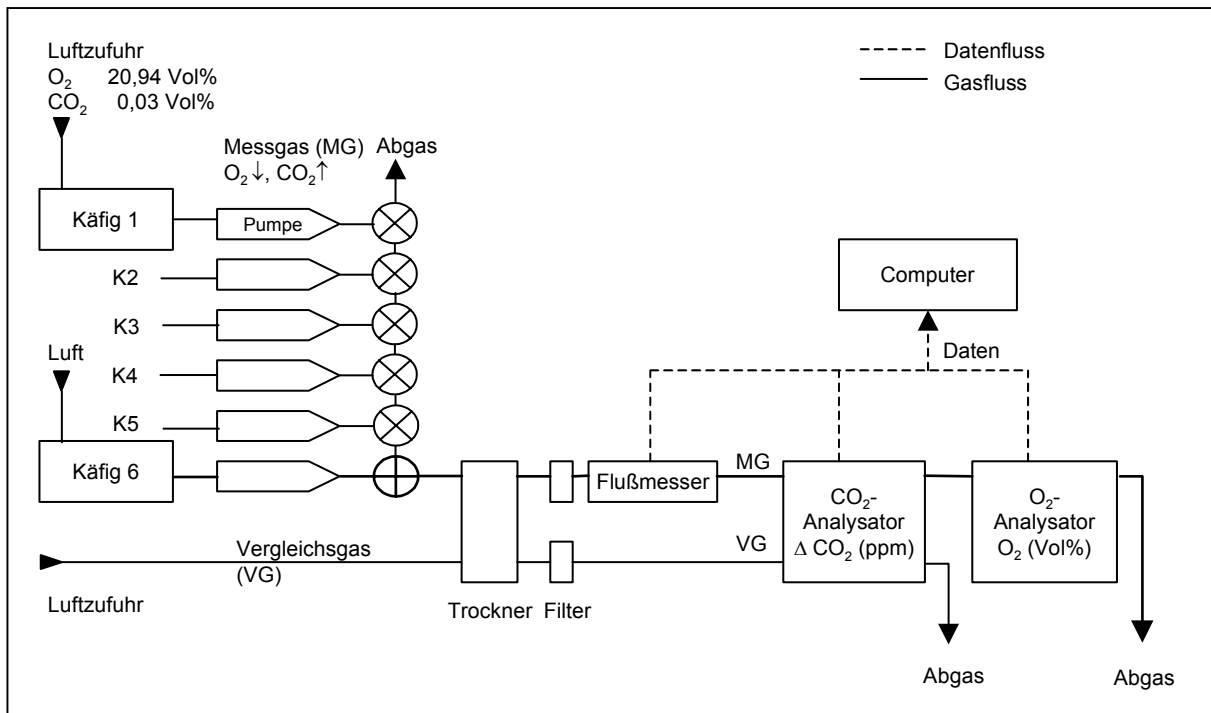
$$\text{PAL} = \frac{\text{Gesamt - Energieumsatz (kJ/d)}}{\text{Ruheumsatz (kJ/d)}} \quad (\text{Gl. 2-16})$$

### 2.6.3 Aufbau der Respirationsanlage

Die Anlage bestand aus sechs Respirationskäfigen, einer Analyse-Einheit und einem Computer zur Datenerfassung (schematischer Aufbau s. Abb. 2-4).

Die Respirationskäfige wurden mittels Membranpumpen kontinuierlich mit Luft aus der Klimaanlage versorgt (O<sub>2</sub>: 20,94 Vol%, CO<sub>2</sub>: 0,03 Vol%, N<sub>2</sub>: 78,16 Vol%). Die Flussrate dieser Pumpen wurde so eingestellt, dass die Gaskonzentration in den Tierkäfigen möglichst in der Mitte des Messbereiches der Gasanalysatoren (s. u.) lag und betrug ca. 32 l/h. Mit Hilfe von Magnetventilen wurden die Käfige nacheinander für jeweils eine Minute zur Analyse-Einheit freigeschaltet, sodass alle sechs Minuten eine Messung pro Käfig erfolgte. Vor dem Einstrom in die Gas-Analysatoren wurde die Luft getrocknet (Peltier-Gas-Kühler, Hartmann & Braun, Frankfurt/Main) und gefiltert. Der Luftstrom gelangte dann in den CO<sub>2</sub>-Analysator (Uras 14, Hartmann & Braun, Frankfurt/Main), dessen Messprinzip auf der Absorption von Infrarot-Licht durch das CO<sub>2</sub>-Molekül beruht. Dieser Analysator verglich die gemessene CO<sub>2</sub>-Konzentration in der aus dem Käfig strömenden Luft mit der eines Vergleichsgases, das der einströmenden Luft entsprach (Zwei-Kanal-Gerät). Es liefert somit direkt die CO<sub>2</sub>-Zunahme in der Ausatemluft ( $\Delta\text{VCO}_2$ ) und besitzt einen Messbereich von 0-10000ppm (10000ppm = 1 Vol%) Danach gelangte der Luftstrom in den O<sub>2</sub>-Analysator





**Abb. 2-4:** Schematischer Aufbau der Respirationsanlage. Käfig sechs ist beispielhaft zur Gasanalyse freigeschaltet.

(Magnos 16, Hartmann & Braun, Frankfurt/Main), dessen Messprinzip auf den paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffmoleküls beruht. Dieses Gerät liefert die absolute Sauerstoffkonzentration in der Ausatemluft und besitzt einen Messbereich von 20 - 21 Vol% (Ein-Kanal-Gerät). Daher wurde  $\Delta VO_2$  unter Annahme eines konstanten  $O_2$ -Gehalts von 20,94 Vol% in der zugeführten Luft berechnet. Die Gasanalysatoren wurden täglich vor Messbeginn gegen die in die Käfige einströmende Luft geeicht. Außer der Konzentration an  $O_2$  und  $CO_2$  in der durchströmenden Luft wurde zusätzlich die Flussrate mit Hilfe eines Massenflussmessers (Tylan FM3910, Millipore) gemessen. Alle Daten wurden kontinuierlich erfasst und gespeichert.

#### 2.6.4 Durchführung der Energieumsatzmessungen

Die Messung erfolgte jeweils über 23 Stunden (von 9.00 Uhr bis 8.00 Uhr des folgenden Tages), sodass täglich eine Stunde zum Wiegen der Tiere, des Futters und zum Sammeln des Harns verblieb. Standardfutter und Wasser wurden *ad libitum* angeboten (Berechnung der Energieaufnahme s. Kap. 2.4.1). Im LZV wurden Glaskäfige mit einem Innenvolumen von ca. 10 Litern eingesetzt, die mit Separatoren zur groben Trennung von Fäzes und Harn ausgestattet waren. Dadurch war die Analyse des täglich ausgeschiedenen Stickstoffs im

Harn mit Hilfe der Bestimmung nach Kjeldahl (Proll et al., 1998; Helrich, 1990) möglich. Während des KZV wurden normale Standardkäfige mit einem luftdicht verschließbaren Deckel eingesetzt. Da hier keine Stickstoffbestimmung erfolgen konnte, wurden für die Berechnung des Energieumsatzes Mittelwerte aus dem LZV genutzt (entsprechende Stickstoffwerte s. Tab 2-4). Für die Basalmessung über zwei Tage vor Implantation wurde die mittlere Stickstoffausscheidung aller gemessenen Tiere eines Geschlechts eingesetzt. Sie entsprach für die Männchen  $0,098 \pm 0,007$  g/d und für die Weibchen  $0,063 \pm 0,005$  g/d. Für die Berechnung des Energieumsatzes vom Implantationstag bis zum Tag 14 nach Implantation wurde die mittlere Stickstoffausscheidung in den einzelnen Gruppen zum Zeitpunkt +2 Wochen eingesetzt (s. Tab. 2-4).

**Tab. 2-4: Stickstoffausscheidung (g/d) im Harn von männlichen und weiblichen Mäusen während der Energieumsatzmessung im LZV.**

Wochen	Stickstoff (g/d)					
	Männchen (N)			Weibchen (N)		
	SO (6)	LO (6)	HI (5)	SO (4)	LO (4)	HI (4)
-2	0,091 ± 0,013	0,101 ± 0,011	0,099 ± 0,011	0,058 ± 0,010	0,061 ± 0,005	0,071 ± 0,008
+2	<b>0,100 ± 0,011</b>	<b>0,112 ± 0,009</b>	<b>0,120 ± 0,007</b>	<b>0,069 ± 0,008</b>	<b>0,084 ± 0,004</b>	<b>0,064 ± 0,006</b>
+12	0,082 ± 0,105	0,097 ± 0,008	0,103 ± 0,009	0,077 ± 0,015	0,084 ± 0,014	0,080 ± 0,012

Die Zeitpunkte -2, +2, +12 beziehen sich auf zwei Wochen vor sowie zwei und 12 Wochen nach Implantation. Die Analyse erfolgte entsprechend der Methode nach Kjeldahl (Proll et al., 1998; Helrich, 1990). Zur Berechnung des Energieumsatzes im KZV für die Zeit vom Implantationstag bis 14 Tage danach wurden die fett markierten Werte entsprechend Gl. 2-11 für die unterschiedlichen Versuchsgruppen eingesetzt. Mittelwerte ± Standardfehler.

## 2.7 Implantation der Gewichte und Entnahme von Blut und Geweben

### 2.7.1 Narkose

Die Operationen (Implantation der Gewichte) fanden jeweils morgens zwischen 8.00 und 11.00 Uhr statt, um den Einfluss der Tageszeit auf die Folgen der Implantation für alle Mäuse zu synchronisieren und da Narkosemittel in diesem Zeitraum eine bessere Wirkung zeigen (Ruhephase der Mäuse). Zuerst wurde das Körpergewicht der Tiere ermittelt. Das war notwendig, um ein entsprechendes Implantat auszuwählen (2-3% bzw. 10% der gemessenen Körpermasse) und um die Narkose zu dosieren. Zur Narkose diente eine Kombination von Ketamin (1 µl/g, Ketamin Gräub, A. Albrecht, Aulendorf) und Xylazinhydrochlorid (0,1 µl/g, Rompun, Bayer Vital, Leverkusen). Ketamin wirkt vor allem als Narkotikum, und Rompun, das auch anästhetische Wirkung besitzt, wirkte zusätzlich als Muskelrelaxanz. Für beide Narkotika wurde eine akute Erhöhung der

Blutglukosekonzentration nach der Applikation beschrieben, die auf einer schnellen Freisetzung aus den Speichern und auf einer Hemmung der Insulinsekretion beruht (Abdel el Motal und Sharp, 1985; Goldfine und Arieff, 1979; Illera *et al.*, 2000). Um den Einfluss dieser Stoffwechsellage auf spätere Blut- und Gewebeanalysen zu verhindern, wurde im KZV zum Zeitpunkt der Blutentnahme und Tötung Chloralhydrat (Atarost GmbH&Co., Twistringen) als Narkotikum verwendet. Die Narkoselösung (0,2mg/µl) wurde vor jedem Versuchstag aus kristallinem Chloralhydrat und steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl, Merck) hergestellt und in einer Dosis von 0,4 mg/g Körpermasse appliziert.

### 2.7.2 Implantation der Gewichte

Für die Operationen wurde über Nacht sterilisiertes Besteck verwendet, das am OP-Tag für jedes Tier erneut mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit 70%igem Alkohol desinfiziert wurde. Um Infektionen der Wunde mit Tierhaar zu verhindern, wurde zuerst das Fell des narkotisierten Tieres in der Bauchregion rasiert und mit 70%igem Alkohol eingesprüht. In der Bauchmitte wurde durch einen Längsschnitt von ca. 2 cm Länge erst die Haut, mit einem zweiten Schnitt entlang der linea alba die Bauchhöhle geöffnet. Die linea alba besteht aus dem sehnigen Anteil der Bauchmuskelfasern. Aufgrund ihrer schlechten Durchblutung kommt es deshalb bei der Öffnung der Bauchhöhle zu keinem Blutverlust.

Es wurde darauf geachtet, dass an jedem Versuchstag Tiere aus allen Gruppen und beiden Geschlechtern operiert wurden. Das Gewichtsimplantat wurde zur Implantation in 70%igem Alkohol desinfiziert, in autoklavierter, physiologischer Kochsalzlösung (s.o.) geschwenkt und dann in die Bauchhöhle geschoben. Die Bauchhöhle wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial zugenäht (PGA Resorba, Resorba, Nürnberg). Die Haut wurde mit Wundklammern verschlossen (Becton Dickinson), die nach 7 Tagen wieder entfernt wurden. Die am Versuchende entnommenen Gewichte wurden mit Wasser von Bindegewebe- und Blutresten gesäubert, in 70%igem Alkohol desinfiziert und dann trocken bis zur Wiederverwendung gelagert.

### 2.7.3 Blut- und Gewebeentnahme

*Blutentnahme.* Das Blut wurde aus dem retrobulbären Venenplexus mit Hilfe einer heparinisierten (Na-Heparin) Kapillare gewonnen (Haematokrit-Kapillaren, Hirschmann® Laborgeräte) und in Plastikgefäßen aufgefangen, die entweder mit EDTA oder Li-Heparin (Microvette®200, Sarstedt AG & Co.) zur Gewinnung von Plasma ausgekleidet waren. Im

Tab. 2-5: Übersicht der im KZV entnommenen Gewebe.

Gewebe	Entnommenes Gewebestück
<b>Weißes Fettgewebe</b>	
<u>Subkutanes Fettgewebe</u> (SAT), inguinal	Seitliche Fettdepots zwischen Ansatz am Gesäßmuskel und der seitlicher Bauchdecke (jeweils linke und rechte Seite gepoolt)
<u>Viszerales Fettgewebe</u> - Omentales Fettgewebe (OAT)	die Eierstöcke umgebendes Fettdepot
- Epididymales Fettgewebe (EAT)	die Hoden umgebendes Fettdepot
<b>Braunes Fettgewebe</b> (BAT)	zwischen den Schulterblättern, möglichst sauber vom weißen Fettgewebe befreit
<b>Skelettmuskulatur</b> (Muskel)	jeweils linker und rechter Oberschenkelmuskel, gepoolt

KZV wurde von jedem Tier neben Li-Heparin-Plasma auch Serum gewonnen, indem das Blut in einem einfachen Plastikgefäß aufgefangen wurde. Plasma- und Serumproben verblieben dann für mindestens 20 min auf Eis bis die festen Blutbestandteile durch Zentrifugation (Biofuge fresco, Heraeus Instruments) abgetrennt wurden (Plasma: 4 °C, 300g, 10 min; Serum: 4 °C, 5000g, 15 min).

Der Überstand wurde in ein neues Plastikgefäß überführt, und das so gewonnene Plasma bzw. Serum wurde bis zur Analyse bei –20 °C gelagert.

**Gewebeentnahme.** Nach der Blutentnahme und der Tötung der Tiere (Dekapitierung) wurden im KZV die in Tabelle 2-5 genannten Gewebe entnommen, gewogen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse der Genexpression bei –80 °C gelagert.

## 2.8 Bestimmung der Corticosteron- und Leptinkonzentration

**Leptin.** Leptin wurde im Serum mit einem mausspezifischen *Sandwich*-ELISA bestimmt (Quantikine® M Mouse Leptin Immunoassay, R&D Systems). Dieser Test beruht auf der Bindung von Leptin aus der Blutprobe an einen Maus-spezifischen Antikörper, der auf einer 96-well-Platte fixiert ist. An das Leptin bindet dann ein weiterer mit Peroxidase konjugierter, leptinspezifischer Antikörper. Danach zugegebenes Substrat wird entsprechend der Menge an vorhandener Peroxidase in eine fluoreszierende Verbindung umgesetzt. Die

photometrisch bestimmte Intensität der Farbe ist dem Leptingehalt in der Probe direkt proportional. Der Test besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von 3,3 - 4,3 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von 5,0 - 7,6 % (Angaben des Herstellers).

*Corticosteron.* Die Corticosteronkonzentration wurde im heparinisierten Plasma untersucht. Dazu diente ein rattenspezifischer kompetitiver EIA (*enzyme immuno-assay*) (Active® Rat Corticosterone EIA, DSL). Er beruht auf der Konkurrenz von unmarkiertem (Corticosteron aus der Probe) und Peroxidase-konjugiertem Corticosteron um die Bindungsstellen am rattenspezifischen Corticosteron-Antikörper, der auf einer 96-*well*-Platte fixiert ist. Das danach zugegebene Substrat wird durch die Peroxidase in einen fluoreszierenden Metaboliten umgesetzt, dessen Fluoreszenz photometrisch bestimmt wurde. Die Intensität der Farbreaktion ist dem Corticosterongehalt in der Probe umgekehrt proportional. Der Test besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von 4,0 - 5,0 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von 5,3 - 8,0 % (Angaben des Herstellers).

## 2.9 Untersuchung der Genexpression in verschiedenen Geweben

### 2.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

*Prinzip.* Die RNA-Isolierung erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion aus verschiedenen Geweben von SO- und HI-Mäusen entsprechend Tabelle 2-6. Die Methode basiert auf der Inaktivierung endogener RNAsen mit Guanidinthiocyanat, nachfolgender Abtrennung von DNA und Proteinen in saurem Phenol und anschließender alkoholischer Fällung der RNA (Modifikation nach Chomczynski und Sacchi, 1987).

*Bedingungen.* Für alle Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNA-Degradierung Handschuhe getragen. Glaswaren, Mörser, Spatel, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße

Tab. 2-6: Auswahl der Tiere und Gewebe zur Untersuchung der Genexpression durch Northern Blot im KZV.

Geschlecht	Gruppe	Anzahl der Tiere vom Tag			Gewebe
		0	3	14	
männlich	Kontrolle	5			SAT OAT EAT BAT Muskel
	SO		5	5	
	HI		5	5	
weiblich	Kontrolle	5			SAT OAT EAT BAT Muskel
	SO		5	5	
	HI		5	5	

wurden vor dem Gebrauch sterilisiert (vierstündige Heißsterilisierung im Trockenschrank bei 180°C bzw. Wasserdampfsterilisierung bei 120°C für 20 min im Autoklav). Für das Ansetzen von Lösungen wurde nur doppelt destilliertes, autoklaviertes Wasser verwendet. Alle Lösungen wurden vor dem Gebrauch wenn möglich autoklaviert, sonst sterilfiltriert. Die Arbeitsfläche, Pipette und Handschuhe wurden zwischen den Arbeitsschritten mit einem RNase-Hemmer (RNase Erase, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA) behandelt. Während der Isolierung wurden die Proben auf Eis gelagert.

*Protokoll.* Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde jeweils die komplette Gewebeprobe eingesetzt. Das Muskelgewebe musste vorher unter flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerrieben werden. Danach wurde die Gewebeprobe in 4 ml Lösung D (4M Guanidinthiocyanat, 25mM Natriumcitrat pH 7, 0,5% Lauroylsarkosin, 0,1M Mercaptoethanol) bei Raumtemperatur für ca. 30s homogenisiert (Ultra-Turrax® T25 basic, IKA-Labortechnik). Die folgende Zentrifugation (5 min, 2500g, 4 °C; Centrifuge 5403, Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH) diente zur Abtrennung der Lipide vor allem bei den Fettgewebeproben, da sie die alkoholische Fällung beeinträchtigen würden. Der wässrige, fettfreie Überstand wurde mit 0,4 ml 2M Natriumacetat (pH4), 4 ml Phenol (gesättigt mit destilliertem Wasser, pH 4-5) und 0,8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (1:49) versetzt, gründlich vermischt und zentrifugiert (40 min, 3200g, 4 °C). Die im wässrigen Überstand enthaltene RNA wurde in 4 ml Isopropanol gefällt (40 min, 3200g, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde in 0,6 ml Lösung D gelöst und wieder mit 0,6 ml Isopropanol gefällt (20 min, 18400g, 4 °C; Z 233MK, Hermle-Labortechnik). Das RNA-Pellet wurde dann in 1ml Ethanol (100%) gelöst, um verbliebenes Isopropanol zu entfernen (3 min, 18400g, 4 °C). Die RNA wurde für einige Minuten an der Luft getrocknet und in 50 - 70 µl DEPC-behandeltes Wasser (Diethylpyrocarbonat zur Zerstörung der RNAsen, ICN) gelöst (10 min, 65°C).

*Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten RNA.* Hierfür wurde die Extinktion von 0,5 ml der 250fach verdünnten RNA-Lösung bei 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) und 280 nm ( $A_{280\text{nm}}$ ) bestimmt (Spektrophotometer Uvikon 932, Kontron Instruments). Die Extinktion von  $A_{260\text{nm}} = 1$  entspricht einer RNA-Menge von 40 µg/ml. Liegt das Verhältnis aus  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  zwischen 1,9 und 2,0 handelt es sich um eine reine RNA-Lösung.

*Test auf Degradierung.* Um die RNA auf mögliche Degradierung zu prüfen, wurde das Volumenäquivalent von 1 µg RNA in 5 µl Puffer (1X MOPS, 6,5% Formaldehyd, 50% Formamid) für 15 min bei 65°C im Heizblock denaturiert und in einem 1%igen Agarosegel (1X MOPS, 1,2% Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftrag in das Gel wurde den Proben 1 µl eines Farbpuffers (50% Glycerol, 1X MOPS, 1 mg Bromphenolblau) zur Kontrolle des Elektrophorese-Verlaufs und 1 µl Ethidiumbromidlösung (0,5 mg/ml, Merck)

zur späteren Sichtbarmachung der RNA bei UV-Licht zugesetzt (Eagle Eye<sup>TM</sup>II, Stratagene). Intakte RNA-Proben sind durch die deutliche Sichtbarkeit von 28S- und 18S-RNA-Banden gekennzeichnet.

### 2.9.2 Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Northern Blot)

*Prinzip.* Der Northern Blot diente zur Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene für Leptin (in weißem Fettgewebe), UCP1 (in braunem Fettgewebe) und UCP3 (in braunem Fettgewebe und im Skelettmuskel) (s. a. Tab. 2-7). Dafür wurde eine definierte Menge an Gesamt-RNA unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (Blotten). Die zu bestimmende mRNA wurde dann durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA lokalisiert und autoradiographisch quantifiziert.

*Protokoll.* Das Volumenäquivalent von 10 µg Gesamt-RNA wurde in 10 µl Puffer (1X MOPS, 6,5% Formaldehyd, 50% Formamid) bei 65 °C für 15 min im Heizblock denaturiert. Dann wurden die Proben mit 3 µl Farbpuffer und 2 µl Ethidiumbromidlösung (s.o.) in einem 1%igen Agarosegel (1X MOPS, 1,2% Formaldehyd) elektrophoretisch bei 80 - 90V im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Übertragung der so fraktionierten RNA auf die Nylonmembran wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf Gel-Blotting-Papier (Schleicher&Schuell) gelegt, welches an beiden Seiten in ein Reservoir mit 20X SSC (175,3 g/l NaCl, 88,4 g/l Na-Citrat, pH 7) tauchte und vorher darin getränkt wurde. Auf das Gel wurden erst die Nylonmembran (Hybond N, Amersham) und darauf weitere fünf Schichten des Gel-Blotting-Papiers platziert. Der Transfer der RNA beruht auf Kapillarkräften, die zwischen der Lösung und dem saugfähigen Filterpapier wirken, wodurch die RNA-Moleküle auf die Membran getragen werden. Deshalb mussten insbesondere die unteren Schichten luftblasenfrei übereinandergelegt werden. Um die Kapillarkraft zu erhöhen wurden mehrere Lagen trockene Papiertücher darüber gelegt und der Aufbau mit einem Gewicht beschwert. Nach ca. 21 Stunden wurde das Blotten beendet. Zur Immobilisierung der RNA auf der Membran wurde deren Oberseite mit 0,120 J/cm<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt (UV-Transiluminator, Biometra). Die Membran wurde dann bis zur Hybridisierung luftdicht in Folie verschlossen bei 4 °C gelagert.

### 2.9.3 Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierter Sonde

#### 2.9.3.1 Herstellung der Sonden-DNA

*Amplifizierung der Sonden.* Es wurden sequenzspezifische Sonden für UCP1 und Leptin hergestellt. Für die Bestimmung der UCP3-Genexpression wurde eine bereits vorhandene Sonde genutzt.

RNA aus weißem (Leptin) und braunem Fettgewebe (UCP1) wurde wie unter Kap. 2.9.1 beschrieben isoliert und in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (reverse Transkription, First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV), Roche). Aufgrund der Verwendung eines Oligo-p(dT)<sub>15</sub>-Primers wurde dabei nur mRNA transkribiert. Aus der so entstandenen cDNA wurden dann mit sequenzspezifischen Primern (Fa. Biotex, Berlin) die Sonden durch PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert (PTC-200 DNA Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc.). Dabei wurden pro Reaktionsansatz (50 µl) 1 µl cDNA als *Template*, jeweils 1µM *forward*- und *reverse*-Primer, 1X PCR-Puffer (Fa. Biotherm), 0,2 mM dNTP's (Fa. Clontech), 5,2% DMSO (Fa. ICN), 1U Taq-Polymerase (Fa. Biotherm) pipettiert. Tabelle 2-7 zeigt die sondenspezifischen Primer mit den entsprechenden Reaktionsbedingungen zur Sonden-Amplifizierung durch PCR. Im Anschluss wurden die DNA-Produkte von überschüssigen Nukleotiden, Polynukleotiden und dem Enzym gereinigt (Quick-Spin™ Columns, Boehringer Mannheim).

*Radioaktive Markierung der Sonden.* Die Sonden wurden mit radioaktivem Phosphor durch den Einbau von [<sup>32</sup>P]dCTP markiert (rediprime™II random prime labelling system, Amersham). Diese Methode beruht auf der Vervielfältigung von DNA durch bakterielle DNA-Polymerase I in Anwesenheit von Random-Hexanukleotid-Primern und Nukleotiden, von denen dCTP radioaktiv markiert ist. Zur Markierung wurden 25 ng der cDNA für 5 min bei 95 °C denaturiert und dann mit dem Reaktionsgemisch (Polymerase, *random*-Primer, dATP, dGTP, dTTP) und 20 µCi α-[<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol ICN) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2M EDTA gestoppt. Die radioaktiv markierte Sonde wurde über Quick-Spin™ Columns (Boehringer Mannheim) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt und dann sofort für die Hybridisierung eingesetzt.

#### 2.9.3.2 Hybridisierung der RNA auf der Nylonmembran

*Prinzip.* Komplementäre Basenpaare eines DNA-Doppelstrangs können bei 100°C dissoziieren und Einzelstränge bilden (DNA-Denaturierung), die bei 65 °C leicht wieder zu Doppelsträngen renaturieren (Hybridisierung). Diese Eigenschaft wird bei der



**Tab. 2-7: Primer und Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Hybridisierungs-Sonden für die Bestimmung der Genexpression in den entsprechenden Geweben (in Klammern).**

<i>Sonde</i>	<i>Primersequenz (5'→3')</i>	<i>Reaktionsbedingungen</i>
<b>Maus-UCP1 (BAT)</b>		
217 bp	f CCGAAGTCGCGGGTTTCGTG r GGCAGTGTCCAGCGGGAAGG	1. 94°C 5' 2. 94°C 30" 3. 60°C 40" 4. 72°C 40" 5. + 34 Zyklen 2-4 6. 72°C 5' 7. 4°C
	Acc.No. BC012701	
<b>Maus-Leptin (SAT, EAT, OAT)</b>		
244 bp	f CCTGTGGCTTTGGTCCTATCTG r AGGCAAGCTGGTGAGGATCTG	1. 94°C 2' 2. 94°C 40" 3. 54°C 40" 4. 72°C 30" 5. + 39 Zyklen 2-4 6. 72°C 5' 7. 4°C
	Acc.No. D49653	
	Primer sind spezifisch für Rattensequenz f-Primer identisch mit Mausequenz, r-Primer in 2 Basen unterschiedlich zur Mausequenz, zur Sondenamplifizierung cDNA aus Maus-SAT genutzt	
<b>Ratten-UCP3 (BAT, Muskel)</b>		
305 bp	f GTCCGATTTCAAGCCATGAT r CGGGTCTTTACCACATCCC	1. 94°C 2' 2. 94°C 40" 3. 62°C 40" 4. 72°C 1' 30" 5. + 35 Zyklen 2-4 6. 72°C 5' 7. 4°C
	Acc.No. AB006614	
	zur Sondenamplifizierung cDNA aus Rattengewebe (Mischung Plazenta/Fötus) genutzt (95% Homologie zur Mausequenz)	

Acc.No.: *accession number* (Entrez Nucleotide Database, NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)),  
entsprechende Gensequenz diente zur Auswahl der Primer-Sequenzen

bp: *base pairs*, f: *forward*, r: *reverse*

Northern Blot-Analyse ausgenutzt, indem die denaturierte, radioaktiv markierte Sonden-DNA an komplementäre Sequenzen der einzelsträngigen RNA auf der Nylonmembran bindet. Durch Messung der Radioaktivität auf der Membran kann die Genexpression quantifiziert werden.

*Protokoll.* Um unspezifische Bindungen der Sonden zu vermeiden, wurde die Nylonmembran mit der RNA für mindestens 2 Stunden bei 63 °C in 15 ml Hybridisierungspuffer (0,5M NaP, 1mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA) prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten (s.o.), denaturierten Sonde (2 min. 100 °C) erfolgte die

Hybridisierung bei 63 °C über Nacht (ca. 20 Stunden). Durch stringentes Waschen (zweimal: 2X SSC, 0,1% SDS, danach zweimal: 0,1X SSC, 0,1% SDS; Stammlösung 20X SSC: 175,3 g/l NaCl, 88,4 g/l Na-Citrat, pH 7,5) bei 42 °C wurden locker gebundene Sondenmoleküle von der Membran entfernt. Gegebenenfalls war ein zusätzlicher Waschvorgang bei 63 °C notwendig (0,1X SSC, 0,1% SDS). Die Radioaktivität der gebundenen Sonde wurde durch Autoradiographie (InstantImager™ Packard Instrument Company, USA) in CPM/mm<sup>2</sup> (*counts per minute*) ermittelt.

*Auswertung.* Die Genexpression wurde durch das Verhältnis von banden-spezifischer Radioaktivität (CPM) zur Intensität der 28S-RNA-Bande auf der Nylonmembran (Anzahl der Pixel pro Bande, Bestimmung vor der Hybridisierung) ermittelt. Da die RNA des Muskels mehrere Banden in der Nähe der 28S-RNA aufwies, war oft eine eindeutige Differenzierung der 28S-RNA-Bande nicht gegeben. Deshalb wurde bei der Muskel-RNA die Intensität aller RNA-Banden einer Probe zur Normalisierung genutzt. Zum Vergleich der unterschiedlichen Gruppen und Zeitpunkte, wurde der Median der Genexpression (CPM/Pixel der 28S-RNA bzw. CPM/Pixel der Gesamt-RNA) vor Implantation (Tag 0) als 1 gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu ausgedrückt. Für den Vergleich zwischen den Geschlechtern vor Implantation wurde der Median der Genexpression der Männchen als 1 gesetzt und die Einzelwerte für Männchen und Weibchen relativ dazu berechnet.

## 2.10 Statistische Auswertung

Sämtliche Berechnung erfolgten mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation). Die Statistische Analyse wurde mit SPSS 8.0 (SPSS Inc.) durchgeführt.

Vor der Implantation wurden die Basaldaten aus folgenden Messungen ermittelt:

- Körpermasse (g): mittlere Körpermasse in der Woche vor Implantation;
- Energieaufnahme (kJ/d): mittlere Energieaufnahme während drei Wochen vor Implantation;
- Energieumsatz (kJ/d): mittlerer Energieumsatz aus zwei Tagesmessungen (LZV: zwei Wochen vor der Implantation, KZV: direkt vor der Implantation);
- Hormonspiegel (ng/ml): im Blut von Mäusen, deren Blut durch Tötung zum Zeitpunkt der Implantation gewonnen wurde;
- Genexpression: aus Geweben von Mäusen, die durch Tötung zum Zeitpunkt der Implantation gewonnen wurden.

Die im Folgenden dargestellte Körpermasse entspricht der biologischen Masse (BKM, mittels Wägung ermittelte Masse abzüglich der Masse des Implantats). Körpermasse, Energieaufnahme, Energieumsatz und Hormonkonzentration wurden relativ zu den entsprechenden Basalwerten ausgedrückt, die vor der Implantation ermittelt und als 100% definiert wurden. Beim Vergleich der Hormonkonzentrationen und der Genexpression im Kurzzeitversuch handelte es sich nicht um verbundene Stichproben. Deshalb wurde bei der Berechnung der relativen Änderungen von Corticosteron- und Leptinkonzentration der Mittelwert der Tiere, die zum Zeitpunkt der Implantation getötet wurden, als 100% definiert. Für die Bestimmung von Änderungen in der Genexpression nach der Implantation wurden alle Werte relativ zum Median der Genexpression von Männchen und Weibchen von Tag 0 ausgedrückt (definiert als 1). Zum Vergleich der basalen Genexpression galt der Median der Männchen als Bezug.

Zur Bestimmung der anzuwendenden statistischen Tests wurde jede Stichprobe mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test (bei  $n > 50$ ) bzw. mit dem Shapirow-Wilk-Test (bei  $n < 50$ ) auf Normalverteilung getestet (Janssen und Laatz, 1999). Bei Ablehnung der Normalverteilung wurden die Daten logarithmisch transformiert und erneut getestet. Lag Normalverteilung ohne oder nach Transformation der Daten vor, wurden für die weitere statistische Analyse parametrische Tests ausgewählt.

Mittels t-Test für unabhängige Stichproben wurden alle Basalwerte vor Implantation zwischen Männchen und Weibchen (siehe Tabelle 3-1) verglichen. Zur Bewertung von Unterschieden, die durch das Geschlecht und die Masse des Implantats beeinflusst wurden, diente die Varianzanalyse (ANOVA). Der Levene-Test wurde zur Prüfung der Varianzhomogenität in den einzelnen Versuchsgruppen herangezogen, die eine Voraussetzung zur Anwendung der ANOVA darstellt. Ggf. wurden die Daten logarithmisch transformiert, um Varianzhomogenität zu erreichen.

*Berechnungen mit parametrischen Tests.* Unterschiede in der Entwicklung der Körpermasse, der Energieaufnahme und bei Parametern des Energieumsatzes wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung (Einfluss von Geschlecht und Implantat und Interaktion der beiden Faktoren) charakterisiert. Um akute Effekte infolge des Operationsstressses auszuschließen, wurden bei der Entwicklung der Körpermasse und Energieaufnahme nur Werte ab der zweiten Woche (LZV) bzw. ab dem zweiten Tag nach der Implantation (KZV) einbezogen. Bei Parametern des Energieumsatzes erfolgte diese Einschränkung nur im KZV. Dabei wurden nur Werte ab dem zweiten Tag nach Implantation einbezogen.

Unterschiede zu einem bestimmten Messzeitpunkt wurden mittels zweifaktorieller ANOVA

untersucht. Es wurden das Geschlecht, die Masse des Implantats und die Interaktion dieser beiden Faktoren in das Testmodell einbezogen. Die einfaktorielle ANOVA diente der Bestimmung von Unterschieden, die durch die Masse des Implantats bei Männchen oder Weibchen hervorgerufen wurden. Multiple Vergleiche zwischen den Versuchsgruppen eines Geschlechts wurden mit dem Post-hoc Test nach Scheffé durchgeführt. Dieser Test fasst die verglichenen Versuchsgruppen in neue Gruppen zusammen, deren Mittelwerte sich auf dem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  nicht voneinander unterscheiden (homogene Gruppen). Sie werden jeweils mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet, wobei die homogene Gruppe mit den niedrigsten Werten entsprechend des Alphabets mit a, die Gruppe mit höheren Werten mit b, c usw. gekennzeichnet wird.

*Berechnungen mit nicht-parametrischen Tests.* Waren Normalverteilung und Varianzhomogenität auch nach erfolgter Transformation der Daten nicht gegeben oder lagen sehr kleine Stichproben vor (z. B. für Daten zur Bestimmung der Genexpression) wurden nicht-parametrische Tests angewandt. Dabei diente der Kruskal-Wallis H-Test zur Bestimmung von Unterschieden, die durch die Masse des Implantats beeinflusst wurden. Multiple Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem U-Test durchgeführt. Der U-Test diente ebenfalls zur Bewertung von geschlechtsspezifischen Unterschieden unabhängig vom Implantatsgewicht. Die Untersuchung des gemeinsamen Einflusses vom Geschlecht und der Masse des Implantats (Interaktion) war mit den nicht-parametrischen Testmodellen nicht möglich.

Die in der Arbeit berechneten Korrelationen beruhten auf normalverteilten Daten und wurden deshalb mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r_{\text{Pearson}}$ ) bewertet. Da jeweils eine positive Korrelation erwartet wurde, erfolgte die Anwendung eines einseitigen Signifikanz-Tests. Die Berechnung des mathematischen Zusammenhangs und des Bestimmtheitsmaßes  $r^2$  erfolgte mittels linearer Regression. Es wurde jeweils das korrigierte Bestimmtheitsmaß angegeben, das die Anzahl der Beobachtungen berücksichtigt.

Alle Daten, die auf normalverteilten Stichproben beruhten, wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Bei Ablehnung der Normalverteilung erfolgte in den Abbildungen die Darstellung der Einzelwerte mit Kennzeichnung des Medians. In Tabellen wurde in diesem Fall der Median mit dem Interquartilsbereich (25. und 75. Perzentil, bei höherem n) bzw. mit der Spannweite (bei niedrigem n) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypische Charakterisierung vor Implantation

Männchen zeigten in beiden Teilversuchen eine höhere Körpermasse, fettfreie Masse und Fettmasse sowie einen niedrigeren gewichtsspezifischen Gesamt-Energieumsatz (kJ/d/g) als die Weibchen (jeweils  $p < 0,01$ ) (Tabelle 3-1). Die Qualität der Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen war für den Gesamt-Energieumsatz (kJ/d) und den Ruheumsatz (kJ/d, kJ/d/g) teilweise verschieden zwischen LZV und KZV (Tabelle 3-1). Weibchen zeigten in beiden Teilversuchen einen höheren PAL als die Männchen (LZV:  $p = 0,001$ ; KZV:  $p = 0,035$ ).

Die Hormonkonzentrationen wurden nur im KZV gemessen. Die Leptinkonzentration war bei beiden Geschlechtern gleich. Die Konzentration an Plasma-Corticosteron war bei den Weibchen ca. 2,5mal höher als bei den Männchen ( $p < 0,001$ ).

Die Mäuse stammten hinsichtlich der Körpermasse und der Energieaufnahme zum Zeitpunkt der Implantation aus homogenen Gruppen (Tab. 3-2 und 3-3).

Im Folgenden sind die Versuchsergebnisse entsprechend der chronologischen Reihenfolge der durchgeführten Teilversuche dargestellt.

#### 3.2 Chronische Effekte der Gewichtsimplantation

##### 3.2.1 Änderungen in Körpermasse und Energieaufnahme

*Körpermasse.* In der ersten Woche nach der Implantation kam es bei beiden Geschlechtern zu einer akuten Abnahme der Körpermasse (Abb. 3-1A, Tab. 3-4). Die Masse des implantierten Gewichtes hatte einen Einfluss auf die Höhe der Körpermasseabnahme ( $p > 0,001$ ), das Geschlecht hatte darauf keinen Einfluss ( $p = 0,306$ ). Die relative Körpermasse in der ersten Woche nach Implantation war bei den HI-Männchen signifikant niedriger im Vergleich zu SO- und LO-Männchen (Tab. 3-4). Weibchen mit leichten und schweren Implantaten senkten ihre Körpermasse jedoch in gleichem Maße und stärker im Vergleich zu SO-Weibchen ab (jeweils  $p < 0,01$  vs. SO, Tab. 3-4).

Tab. 3-1: Physiologische Basalwerte vor Implantation der Gewichte im LZV und KZV.

	<i>Langzeitversuch (Alter 7 Monate)</i>					<i>Kurzzeitversuch (Alter 4 Monate)</i>				
	<i>männl.</i>	<i>n</i>	<i>weibl.</i>	<i>n</i>	<i>p</i>	<i>männl.</i>	<i>n</i>	<i>weibl.</i>	<i>n</i>	<i>p</i>
Körpermasse (g)	35,3 ± 0,4	34	26,0 ± 0,3	33	< 0,001	31,2 ± 0,3	93	23,5 ± 0,3	93	< 0,001
Energieaufnahme (kJ/d)	76,7 ± 1,8	34	69,7 ± 1,7	33	0,005	71,6 ± 1,1	93	77,5 ± 2,0	93	0,040
<i>Körperzusammensetzung (DEXA):</i>										
Fettfreie Masse (g)	27,9 ± 0,3	23	20,8 ± 0,4	20	< 0,001	24,9 ± 0,2	91	19,5 ± 0,2	90	< 0,001
Fettfreie Masse (%)	78,5 ± 0,7	23	83,6 ± 0,8	20	< 0,001	82,7 ± 0,5	91	88,4 ± 0,7	90	< 0,001
Fettmasse (g)	7,5 ± 0,3	23	4,1 ± 0,3	20	< 0,001	5,4 ± 0,2	91	2,8 ± 0,1	90	< 0,001
Fettmasse (%)	21,5 ± 0,7	23	16,3 ± 0,5	20	< 0,001	17,4 ± 0,4	91	12,2 ± 0,4	90	< 0,001
<i>Energieumsatz (ITK):</i>										
Gesamt-Energieumsatz (kJ/d)	55,7 ± 1,0	17	46,6 ± 1,5	12	< 0,001	41,0 ± 1,2	18	40,5 ± 1,3	18	0,768
Gesamt-Energieumsatz (kJ/d/g)	1,60 ± 0,04	17	1,86 ± 0,08	12	0,004	1,32 ± 0,03	18	1,75 ± 0,06	18	< 0,001
Ruheumsatz (kJ/d)	38,9 ± 0,9	17	27,7 ± 1,4	12	< 0,001	28,2 ± 1,2	18	26,3 ± 1,2	18	0,263
Ruheumsatz (kJ/d/g)	1,12 ± 0,03	17	1,08 ± 0,06	12	0,450	0,91 ± 0,03	18	1,13 ± 0,05	18	< 0,001
Respiratorischer Quotient (RQ)	0,98 ± 0,01	17	0,97 ± 0,02	12	0,587	0,96 ± 0,02	18	0,97 ± 0,02	18	0,705
<i>physical activity level (PAL)</i>	1,44 ± 0,03	17	1,76 ± 0,07	12	0,001	1,42 ± 0,05	18	1,58 ± 0,04	18	0,035
Serum-Leptin (ng/ml)	n.b.		n.b.			11,4 ± 2,0	9	7,7 ± 1,5	8	0,158
Serum-Leptin (ng/g Fettmasse)	n.b.		n.b.			1,9 ± 0,2	8	1,7 ± 0,3	7	0,574
Plasma-Corticosteron (ng/ml)	n.b.		n.b.			284,1 ± 31,2	9	710,9 ± 62,3	9	< 0,001

Mittelwerte ± Standardfehler, Geschlechtsspezifische Unterschiede mittels t-Test ermittelt. n.b.= nicht bestimmt.

**Tab. 3-2: Körpermasse und Energieaufnahme in den Versuchsgruppen vor der Implantation im LZV.**

		SO	n	LO	n	HI	n	p
Körpermasse (g)	männl.	35,9 ± 0,7	12	34,9 ± 0,6	12	35,1 ± 0,8	10	0,546
	weibl.	25,5 ± 0,8	11	26,6 ± 0,6	12	26,0 ± 0,6	14	0,474
Energieaufnahme (kJ/d)	männl.	77,8 ± 2,6	12	74,3 ± 3,3	12	78,3 ± 3,7	10	0,622
	weibl.	73,0 ± 2,7	11	69,3 ± 4,0	12	62,5 ± 4,5	14	0,173

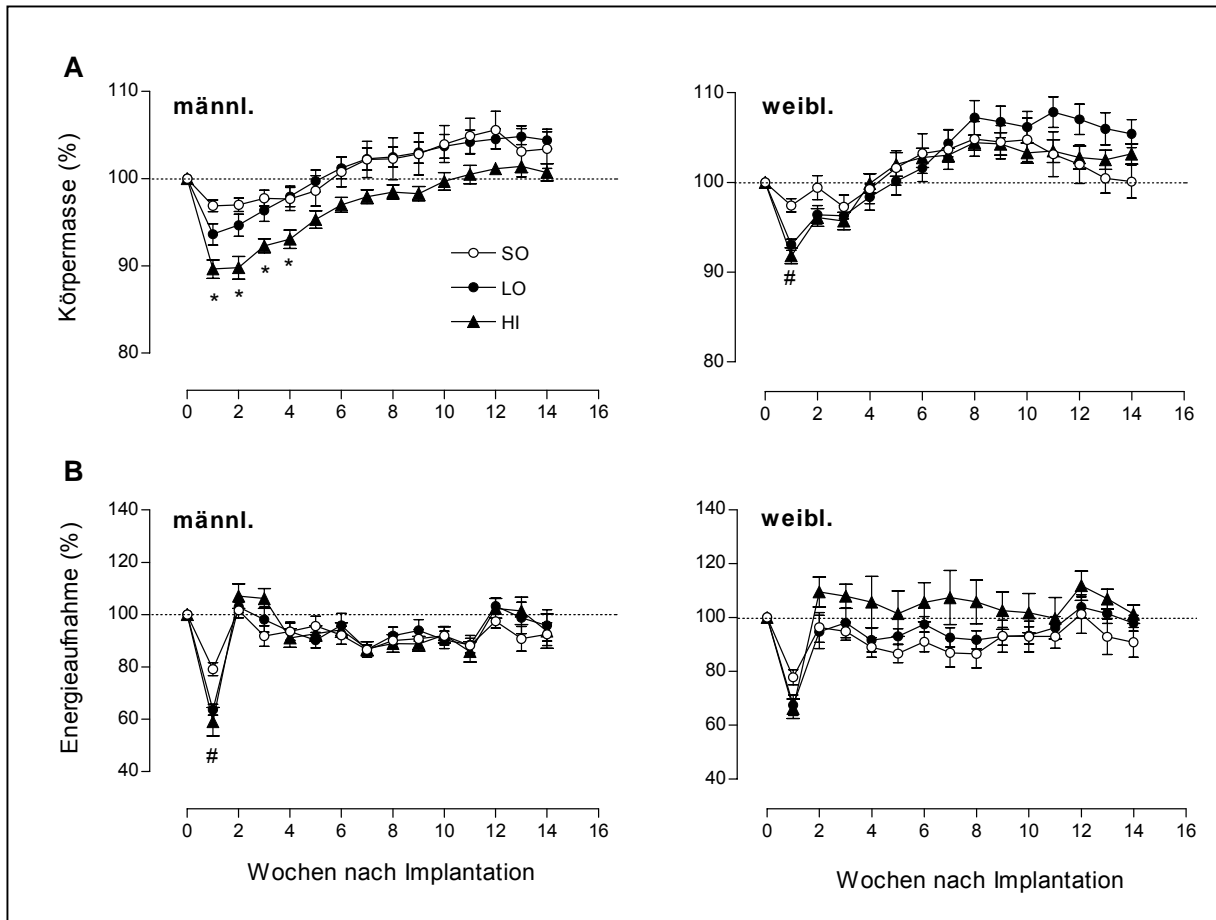
Mittelwerte ± Standardfehler. Unterschiede mittels einfaktorieller ANOVA (Faktor: Implantat) getestet.

**Tab. 3-3: Körpermasse und Energieaufnahme in den Versuchsgruppen entsprechend des Tötungstages und des implantierten Gewichtes vor der Implantation im KZV.**

		Tag	SO	n	LO	n	HI	n	$p_{\text{Tag}}$ $p_{\text{Implantat}}$
Körpermasse	männl.	0	29,9 ± 1,0					9	0,945 0,816
		3	32,0 ± 1,0	9	30,8 ± 0,9	9	31,7 ± 0,9	9	
		10	30,4 ± 1,0	9	31,8 ± 1,2	9	31,9 ± 0,5	9	
		14	31,5 ± 0,7	10	31,0 ± 0,7	10	31,4 ± 0,8	10	
weibl.	0	24,4 ± 0,8					9	0,308 0,558	
	3	22,6 ± 1,0	9	23,4 ± 0,6	9	23,2 ± 0,6	9		
	10	25,5 ± 1,7	9	23,4 ± 1,0	9	22,9 ± 0,5	9		
	14	23,1 ± 0,8	10	22,2 ± 0,2	10	23,4 ± 0,7	10		
Energie- aufnahme (kJ/d)	männl.	0	69,6 ± 2,7					9	0,217 0,538
		3	74,2 ± 4,5	9	72,1 ± 4,1	9	75,3 ± 6,1	9	
		10	70,0 ± 2,2	9	75,8 ± 2,8	9	72,6 ± 2,4	9	
		14	66,1 ± 2,9	10	69,3 ± 3,2	10	71,6 ± 3,3	10	
weibl.	0	71,7 ± 5,6					9	0,077 0,870	
	3	83,3 ± 5,8	9	80,0 ± 5,5	9	86,9 ± 6,3	9		
	10	80,2 ± 8,8	9	83,2 ± 6,9	9	75,5 ± 6,9	9		
	14	74,6 ± 7,1	10	73,6 ± 4,8	10	68,1 ± 3,6	10		

Mittelwerte ± Standardfehler. Unterschiede mittels zweifaktorieller ANOVA (Faktoren: Tag der Tötung, Implantat) getestet.

Ab der zweiten Woche nach Implantation stieg die Körpermasse wieder in allen Gruppen an. Die weitere Entwicklung der Körpermasse wurde sowohl durch die Masse des Implantats als auch durch das Geschlecht beeinflusst ( $p=0,004$  bzw.  $p<0,001$ ). Bis zur vierten Woche zeigten HI-Männchen eine signifikant niedrigere Körpermasse im Vergleich zu SO- und LO-Männchen (jeweils  $p<0,05$  vs. SO und vs. LO). Bis zum Ende der Studie lag die



**Abb. 3-1:** Körpermasse (A) und Energieaufnahme (B) im LZV für männliche und weibliche Mäuse bis zur 14. Woche nach Implantation. Die Daten sind relativ zu Basalwerten vor Implantation (definiert als 100%) dargestellt. Der Implantationszeitpunkt ist definiert als 0. Die Körpermasse entspricht der BKM. n (männl./weibl.): SO (12/11), LO (12/12), HI (10/14). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$  vs. SO und vs. LO, #  $p < 0,01$  vs. SO (Post-hoc Scheffé-Test).

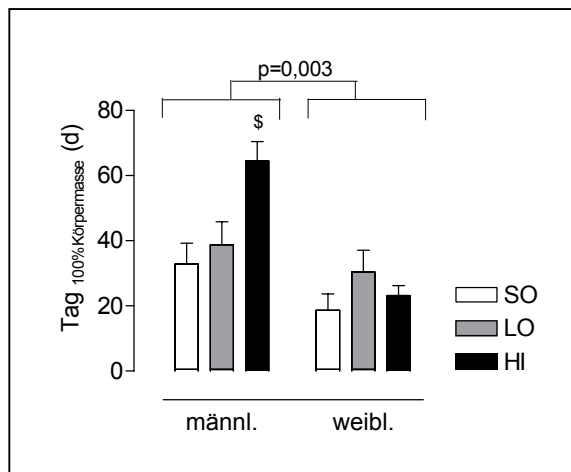
**Tab. 3-4:** Mittlere Körpermasse und Energieaufnahme eine Woche nach Implantation der Gewichte relativ zu mittleren Basalwerten (entsprechend 100%).

		SO	n	LO	n	HI	n
Körpermasse (%)	männl.	96,9 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	12	93,6 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	12	89,6 $\pm$ 1,0 <sup>a,§,§</sup>	10
	weibl.	97,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	11	93,1 $\pm$ 0,6 <sup>a,*</sup>	12	91,8 $\pm$ 0,9 <sup>a,§</sup>	14
Energieaufnahme (%)	männl.	80,1 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	12	61,5 $\pm$ 1,7 <sup>a,§</sup>	12	54,5 $\pm$ 3,1 <sup>a,§</sup>	10
	weibl.	77,8 $\pm$ 2,8	11	67,4 $\pm$ 3,8	12	66,1 $\pm$ 3,6 <sup>#</sup>	14

Die Körpermasse entspricht der BKM. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Einfluss des Implantats bei Männchen und Weibchen mittels einfaktorieller ANOVA und Post-hoc Scheffé-Test getestet, (a und b entsprechen homogenen Gruppen). §  $p < 0,001$  vs. SO, \*  $p = 0,003$  vs. SO, §  $p = 0,025$  vs. LO, #  $p = 0,072$  vs. SO.

Körpermasse der HI-Männchen weiterhin tendenziell unter der von SO- und LO-Männchen (um ca. 3-5%). Bei den Weibchen gab es ab der zweiten Woche nach Implantation keine Unterschiede mehr in der Körpermasse.





**Abb. 3-2:** Zeitpunkt des Wiedererreichens der ursprünglichen Körpermasse (100%) nach Implantation der Gewichte bei männlichen und weiblichen Mäusen. Die mittlere Körpermasse eine Woche vor Implantation wurde als 100% definiert. n (männl./weibl.): SO (12/11), LO (12/12), HI (10/14). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Geschlechtsspezifischer Unterschied mittels zweifaktorieller ANOVA, Einfluss des Implantats mittels einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc Scheffé-Test für Männchen und Weibchen separat getestet, \$  $p=0,083$  vs. SO.

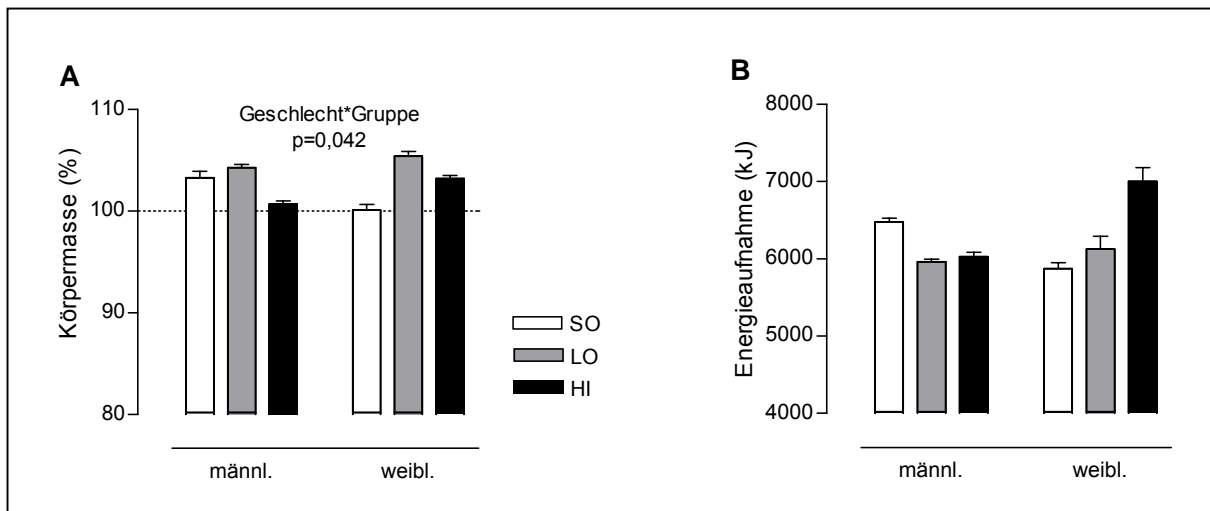
Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten sich in der Dynamik der Körpermasseentwicklung, die durch den Zeitpunkt des Wiederreichens der ursprünglichen Körpermasse nach Implantation charakterisiert wurde (Abb. 3-2). Die Dauer bis zur Regenerierung der ursprünglichen Masse infolge des akuten Körpermasseverlustes wurde signifikant durch das Geschlecht und durch die Masse des implantierten Gewichtes beeinflusst ( $p=0,003$  bzw.  $p=0,025$ ). Weibchen benötigten signifikant weniger Zeit als die Männchen und zeigten auch keine Gruppenunterschiede. Die Männchen mit den schweren Implantaten benötigten tendenziell mehr Zeit zur Regenerierung

der ursprünglichen Körpermasse als die Männchen der SO-Gruppe ( $p=0,083$ ).

Ähnlich der Körpermasse war auch die Energieaufnahme in der ersten Woche nach der Implantation in allen Gruppen akut vermindert (Abb. 3-1B, Tab. 3-4). Dabei hatte sowohl das Geschlecht als auch die Masse des Implantats einen signifikanten Einfluss auf die mittlere Energieaufnahme in der ersten Woche nach Implantation ( $p<0,001$  bzw.  $p=0,026$ ) (Tab. 3-4). Männchen reduzierten ihre Energieaufnahme stärker als die Weibchen. Dabei war die Reduktion der Energieaufnahme bei den LO- und HI-Männchen signifikant stärker als bei den SO-Männchen (jeweils  $p<0,001$ ). Bei den Weibchen hatte die Masse des implantierten Gewichtes keinen Einfluss auf die akute Reduktion der Energieaufnahme.

Ab der zweiten Woche nach Implantation war die Energieaufnahme in allen Gruppen wieder auf das Basalniveau oder leicht darüber hinaus angestiegen (Abb. 3-1B). Weibchen erhöhten ihre Energieaufnahme bis zum Versuchsende stärker als die Männchen ( $p=0,042$ ). Männchen und Weibchen zeigten zwischen den Versuchsgruppen jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Energieaufnahme, die ca. 90-100% der basalen Energieaufnahme entsprach. Die mittlere, relative Energieaufnahme lag bei den HI-Weibchen um ca. 5% über der Energieaufnahme der SO- und LO-Weibchen (nicht signifikant).

Die relative Körpermasse in der 14. Woche nach Implantation wurde unterschiedlich durch das Geschlecht und die Masse des Implantats beeinflusst (signifikante Interaktion,  $p=0,042$ ,



**Abb. 3-3:** Körpermasse relativ zur Masse vor Implantation (entsprechend 100%) (A) und kumulative Energieaufnahme (B) 14 Wochen nach Implantation der Gewichte. Die Körpermasse entspricht der BKM. n (männl./weibl.): SO (12/11), LO (12/12), HI (10/14). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die relative Körpermasse wurde vom Geschlecht und der Masse des Implantats unterschiedlich beeinflusst (Interaktion  $p=0,042$ , zweifaktorielle ANOVA).

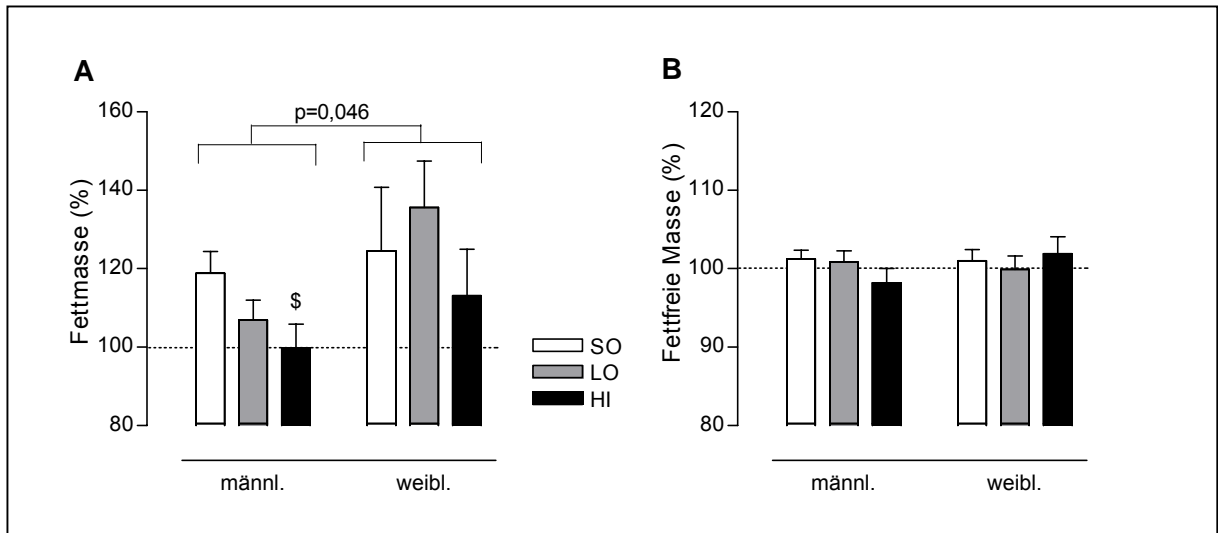
Abb. 3-3). Die kumulative Energieaufnahme war zu diesem Zeitpunkt bei allen Mäusen gleich.

### 3.2.2 Änderungen in der Körperzusammensetzung

Die Zunahme in der Fettmasse war stärker bei den Weibchen ausgeprägt als bei den Männchen ( $p=0,046$ ), war in beiden Geschlechtern aber unabhängig von der implantierten Masse (Abb. 3-4). HI-Männchen zeigten nur tendenziell eine verminderte Fettmassezunahme ( $p=0,087$  vs. SO). Die fettfreie Masse wurde weder durch das Geschlecht noch durch die Masse des Implantats beeinflusst und entsprach in allen Gruppen der basalen fettfreien Masse.

### 3.2.3 Änderungen im Energieumsatz

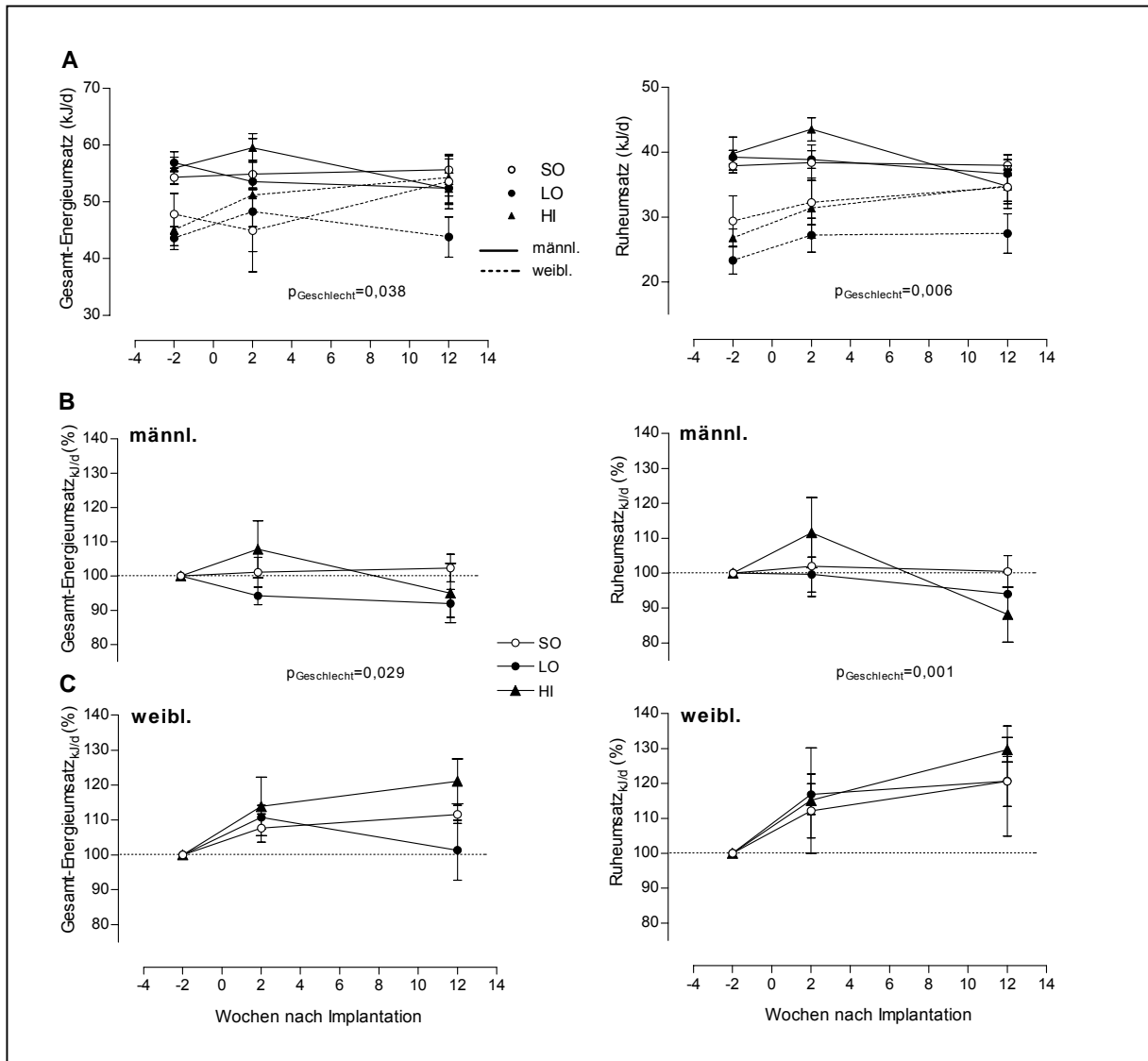
Der Gesamt-Energieumsatz und der Ruheumsatz waren bei den Männchen signifikant höher als bei den Weibchen ( $p=0,038$  bzw.  $p=0,006$ ) (Abb. 3-5A). Relative Änderungen im Gesamt-Energieumsatz und im Ruheumsatz (Abb. 3-5 B und C) wurden nicht durch die implantierte Masse, aber signifikant durch das Geschlecht beeinflusst (Gesamt-Energieumsatz:  $p=0,029$ ; Ruheumsatz:  $p=0,001$ ). Weibchen erhöhten den Gesamt-Energieumsatz und Ruheumsatz stärker infolge der Implantation bzw. Schein-Operation im Vergleich zu den Männchen. HI-Männchen zeigten zwei Wochen nach der Implantation einen eher erhöhten, nach 12



**Abb. 3-4:** Änderung in der Körperzusammensetzung 14 Wochen nach Implantation. Die Fettmasse (A) und die fettfreie Masse (B) wurden aus den absoluten Massen (g) dieser Kompartimente zum entsprechenden Messzeitpunkt relativ zum Implantationszeitpunkt berechnet. n (männl./weibl.): SO (7/5), LO (9/7), HI (7/7). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Der Geschlechtsunterschied wurde mittels zweifaktorieller ANOVA ermittelt, der Einfluss des Implantats mittels einfaktorieller ANOVA für Männchen und Weibchen separat getestet. \$  $p=0,087$  vs. SO (Post-hoc Scheffé-Test).

Wochen einen eher verminderten Gesamt-Energie- und Ruheumsatz im Vergleich zur Basalmessung. HI-Weibchen zeigten eher einen permanent erhöhten Gesamt-Energie- und Ruheumsatz im Vergleich zu vor der Implantation.

Gesamt-Energieumsatz und Ruheumsatz zeigten einen ähnlichen Verlauf. Änderungen im Gesamt-Energieumsatz wurden offensichtlich vor allem durch Änderungen im Ruheumsatz hervorgerufen. RQ und PAL wurden durch die Implantation nicht beeinflusst (Tab. 3-5). Der PAL war analog zur Basalmessung bei den Weibchen auch nach der Gewichtsimplantation höher im Vergleich zu den Männchen ( $p=0,041$ ).



**Abb. 3-5:** Absoluter Gesamt-Energieumsatz und Ruheumsatz (A) sowie relativer Gesamt-Energieumsatz und relativer Ruheumsatz von Männchen (B) und Weibchen (C) zwei Wochen vor und zwei und 12 Wochen nach Implantation der Gewichte. Der relative Energieumsatz wurde aus dem absoluten Umsatz in kJ/d relativ zum basalen Umsatz 2 Wochen vor der Implantation (definiert als 100%) berechnet.  $n$  (männl./weibl.): SO (6/4), LO (6/4), HI (5/4). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung.

### 3.3 Akute Effekte der Gewichtsimplantation

#### 3.3.1 Änderungen in Körpermasse und Energieaufnahme

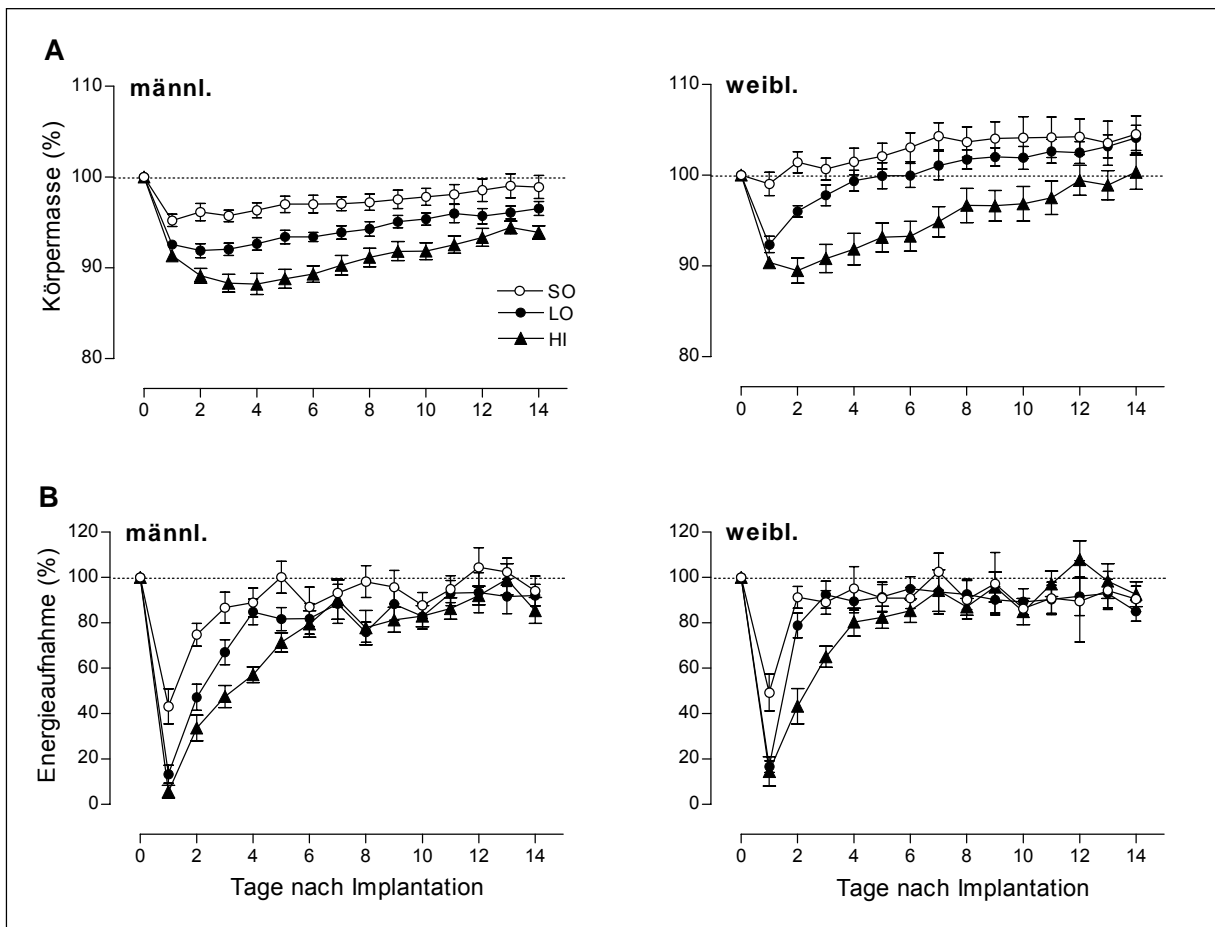
Die Körpermasse war wie im LZV nach der Implantation bei Männchen und Weibchen akut vermindert (Abb. 3-6A, Tab. 3-6). Die relative Körpermasse wurde am ersten Tag nach der Implantation signifikant durch das Geschlecht und die Masse des zusätzlichen Gewichtes beeinflusst ( $p=0,009$  bzw.  $p<0,001$ ) (Tab. 3-6). Mäuse mit schwerem Implantat zeigten am ersten Tag nach der Implantation eine niedrigere Körpermasse im Vergleich zu SO- und LO-Mäusen.

**Tab. 3-5: RQ und PAL zwei Wochen vor Implantation (-2) sowie zwei und 12 Wochen nach Implantation des zusätzlichen Gewichtes (+2 bzw. +12).**

	Gruppe (n) Wochen	Männchen			Weibchen		
		SO (6)	LO (6)	HI (5)	SO (4)	LO (4)	HI (4)
RQ	-2	0.97 ± 0.01	0.99 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.98 ± 0.02	0.96 ± 0.03	0.97 ± 0.05
	+2	0.98 ± 0.01	1.02 ± 0.01	1.03 ± 0.03	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.03	0.92 ± 0.03
	+12	0.97 ± 0.01	1.03 ± 0.03	1.00 ± 0.04	0.98 ± 0.04	1,00 ± 0.05	0.97 ± 0.05
p	Zeit	0,459					
	Zeit*Implantat	0,394					
	Zeit*Geschlecht	0,128					
PAL	-2	1.44 ± 0.03	1.46 ± 0.07	1.41 ± 0.03	1.69 ± 0.16	1.90 ± 0.12	1.69 ± 0.08
	+2	1.45 ± 0.08	1.38 ± 0.03	1.37 ± 0.01	1.62 ± 0.11	1.80 ± 0.12	1.72 ± 0.18
	+12	1.47 ± 0.03	1.44 ± 0.06	1.53 ± 0.08	1.55 ± 0.02	1.62 ± 0.10	1.56 ± 0.02
p	Zeit	0,209					
	Zeit*Implantat	0,640					
	Zeit*Geschlecht	<b>0,041</b>					

Mittelwerte ± Standardfehler. Der Einfluss der Masse des Implantats und des Geschlechts wurde mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung getestet.

Abbildung 3-6A zeigt Änderungen in der Körpermasse von männlichen und weiblichen Mäusen, die am 14. Tag nach der Implantation getötet wurden relativ zur basalen Körpermasse (n=10). Nach der akuten Abnahme am ersten Tag nach der Implantation stieg die Körpermasse ab dem zweiten Tag wieder langsam (SO-, LO-Männchen, HI-Weibchen) bzw. deutlich (SO- und LO-Weibchen) an. HI-Männchen verloren noch bis zum vierten Tag leicht an Gewicht und nahmen dann langsam wieder zu. Die Entwicklung der relativen Körpermasse vom zweiten bis zum 14. Tag nach der Implantation wurde signifikant vom Geschlecht und der implantierten Masse beeinflusst (p=0,001 bzw. p<0,001). Ab dem 11. Tag nach der Implantation war die relative Körpermasse zwischen LO- und HI-Männchen gleich; der Unterschied zu SO-Männchen war aber bis zum 14. Tag signifikant (SO: 98,9±1,3%, LO: 96,5±0,8%, HI: 93,9±0,7%; p=0,001 SO vs. HI, s. a. Abb. 3-7). Bei den Weibchen gab es ab dem 12. Tag nach der Implantation keine Unterschiede mehr in der Körpermasse zwischen den Gruppen. Alle Weibchen regenerierten bis zum 14. Tag nach der Implantation ihre ursprüngliche Körpermasse (SO: 104,5±2,0%, LO: 104,1±1,4%, HI: 100,3±1,9%; p=0,168).



**Abb. 3-6:** Körpermasse (A) und Energieaufnahme (B) im KZV für männliche und weibliche Mäuse bis zum Tag 14 nach Implantation (n=10). Die Daten sind relativ zu Basalwerten vor Implantation (definiert als 100%) dargestellt. Der Implantationszeitpunkt ist definiert als 0. Die Körpermasse entspricht der BKM. Mittelwerte ± Standardfehler.

**Tab. 3-6:** Mittlere Körpermasse und Energieaufnahme am ersten Tag nach Implantation der Gewichte relativ zu mittleren Basalwerten im KZV (entsprechend 100%).

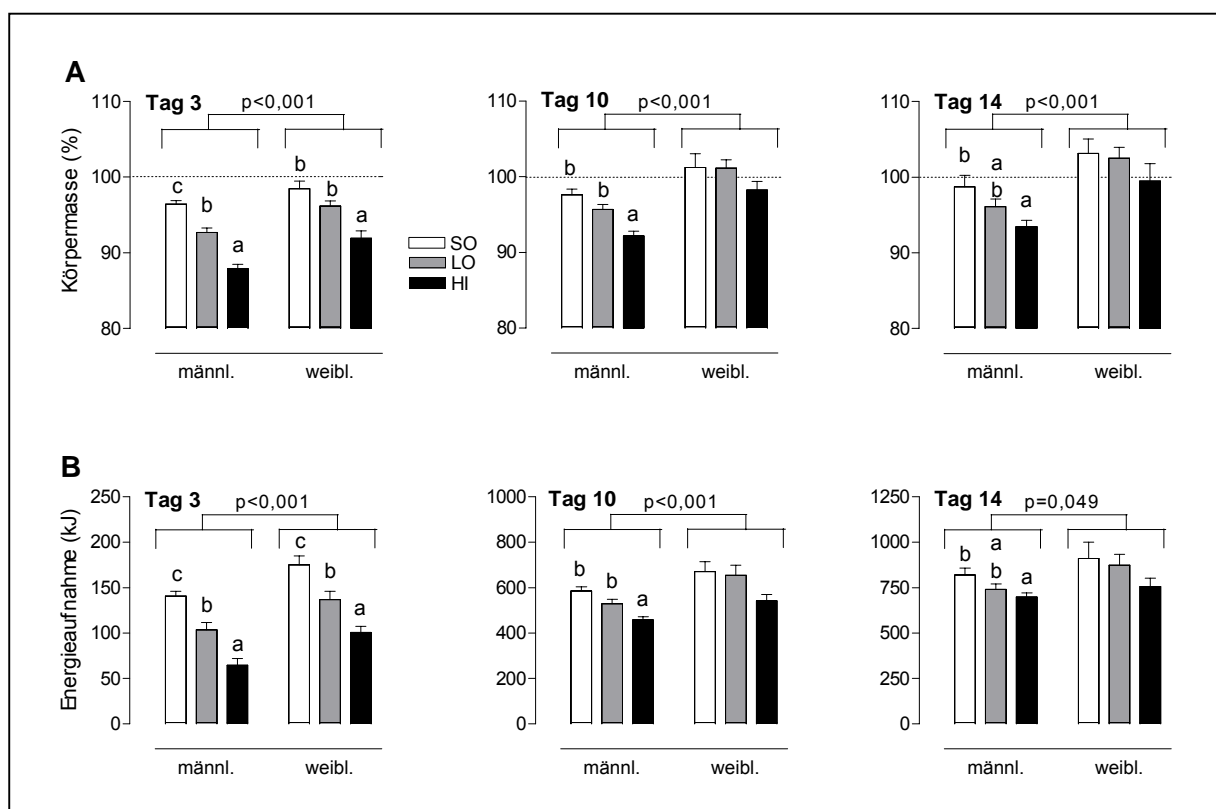
		SO	LO	HI
Körpermasse (%)	männl.	96,4 (95,2; 98,6)	93,1 (91,9; 94,4)*	91,6 (90,9; 92,8)*, #
	weibl.	98,2 (95,7; 100,5)	91,8 (90,3; 93,4)*	90,2 (89,0; 91,5)*, #
Energieaufnahme (%)	männl.	46,1 (35,3; 63,1)	18,0 (2,5; 34,6)*	5,12 (0; 17,3)*, \$
	weibl.	53,5 (41,1; 66,1)	14,6 (8,6; 24,7)*	4,9 (0; 26,6)*

Die Körpermasse entspricht der BKM. Daten beziehen sich auf Tiere die nach jeweils drei, zehn und 14 Tagen getötet wurden (n=28). Da die Daten nicht der Normalverteilung entsprachen, wurden Unterschiede mittels Kruskal-Wallis-H-Test und nachfolgendem U-Test ermittelt. Mediane (Interquartilsbereich: 25. Perzentil; 75. Perzentil). \* p<0,001 vs. SO, # p=0,004 vs. LO, \$ p=0,046 vs. LO.

Die Energieaufnahme war am ersten Tag nach der Implantation bei Männchen und Weibchen ähnlich der Körpermasse stark vermindert (Abb. 3-6B, Tab. 3-6). Die relative Energieaufnahme der LO- und HI-Mäuse war zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger im

Vergleich zu den SO-Mäusen. Nach der akuten Reduktion infolge der Implantation erfolgte ein rascher Anstieg der Energieaufnahme (Abb. 3-6 B). Die Masse des Implantats hatte einen signifikanten Einfluss auf die weitere Energieaufnahme, der Einfluss des Geschlechts war nur tendenziell vorhanden ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,053$ ). Alle Weibchen zeigten einen progressiveren Anstieg in der Energieaufnahme am zweiten und dritten Tag nach der Implantation im Vergleich zu den Männchen. Die relative Energieaufnahme war bei den Weibchen schon ab dem vierten Tag nach der Implantation in allen Gruppen gleich, bei den Männchen erst ab dem sechsten Tag.

Weibchen hatten nach jeweils drei, zehn und 14 Tagen weniger an Körpermasse verloren als Männchen (jeweils  $p < 0,001$ ) (Abb. 3-7A). Bei den Männchen hatte die implantierte Masse zu allen drei Zeitpunkten einen signifikanten Einfluss auf die relative Körpermasse. Bei den Weibchen war dieser Einfluss nur am dritten Tag nach der Implantation signifikant ( $p < 0,001$  SO vs. HI;  $p = 0,012$  HI vs. LO).

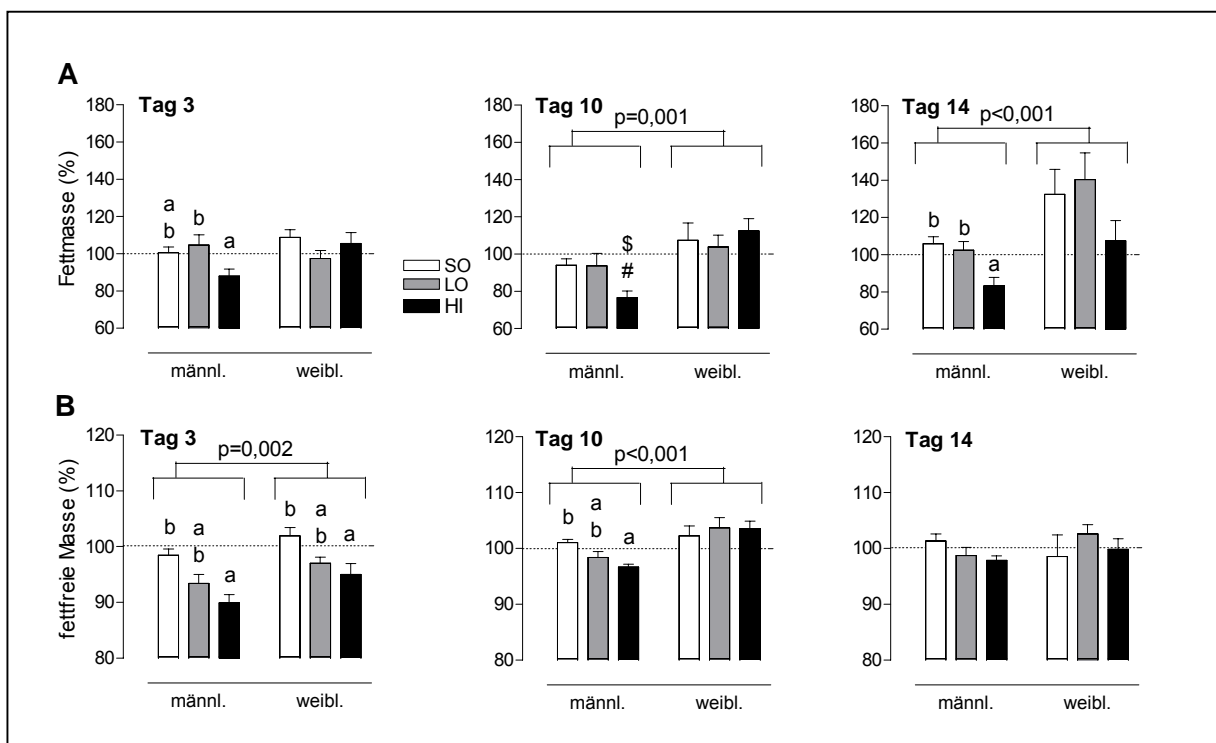


**Abb. 3-7:** Relative Körpermasse (A) und kumulative Energieaufnahme (B) an den Tagen drei ( $n=28$ ), zehn ( $n=19$ ) und vierzehn ( $n=10$ ) nach der Implantation. Die Körpermasse entspricht der BKM. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Geschlechtsspezifischer Unterschied mittels zweifaktorieller ANOVA; Einfluss des Implantats bei Männchen und Weibchen mittels einfaktorieller ANOVA und Post-hoc Scheffé-Test ermittelt (a, b, c bezeichnen homogene Gruppen).

Unterschiede in der kumulativen Energieaufnahme (Abb. 3-7B) nach drei, zehn und 14 Tagen entsprechen denen der Körpermasse. Männchen aller Gruppen nahmen bis zum dritten, zehnten und 14. Tag weniger Energie auf als die Weibchen (jeweils  $p < 0,05$ ). Die Implantation eines Gewichtes führte bei den Weibchen nur bis zum Tag drei zu einer verminderten Energieaufnahme im Vergleich zu SO-Weibchen ( $p = 0,01$  LO vs. SO;  $p < 0,001$  HI vs. SO;  $p = 0,016$  HI vs. LO). Bei den Männchen war der Unterschied in der Energieaufnahme zwischen SO- und LO-Männchen bis zum Tag 14 signifikant (Tag drei:  $p = 0,001$  LO vs. SO;  $p < 0,001$  HI vs. SO;  $p = 0,001$  HI vs. LO; Tag zehn:  $p = 0,030$  LO vs. SO;  $p < 0,001$  HI vs. SO; Tag 14:  $p = 0,031$  HI vs. SO).

### 3.3.2 Änderungen in der Körperzusammensetzung

Weibchen zeigten am zehnten und vierzehnten Tag nach der Implantation eine stärkere Zunahme in der Fettmasse als die Männchen ( $p = 0,001$  bzw.  $p < 0,001$ ) (Abb. 3-8A). Die Masse des Implantats hatte bei den Weibchen keinen Einfluss auf Änderungen in der



**Abb. 3-8:** Fettmasse (A) und fettfreie Masse (B) bei männlichen und weiblichen Mäusen nach drei ( $n=9$ ), zehn ( $n=9$ ) und vierzehn Tagen nach Implantation ( $n=9-10$ ) relativ zur Körperzusammensetzung zum Zeitpunkt der Implantation (entsprechend 100%). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Geschlechtsunterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA, der Einfluss des Implantats bei Männchen und Weibchen mittels einfaktorieller ANOVA und Post-hoc Scheffé-Test (a, b entsprechen homogenen Gruppen) ermittelt. \$  $p = 0,080$  vs. SO, #  $p = 0,062$  vs. LO.



Fettmasse. Bei den Männchen führte die Implantation eines schweren Gewichtes nach drei und 14 Tagen zu einer Verminderung der Fettmasse im Vergleich zu LO- bzw. SO-Männchen (Tag drei:  $p=0,038$  HI vs. LO; Tag 14:  $p=0,005$  HI vs. SO).

Männchen und Weibchen zeigten am dritten Tag nach der Implantation eines schweren Gewichtes eine signifikante Abnahme in der fettfreien Masse im Vergleich zu SO-Mäusen (männl.:  $p=0,001$  bzw. weibl.:  $p=0,017$  HI vs. SO) (Abb. 3-8B). Dieser Unterschied war bei den Männchen auch noch am zehnten Tag nach der Implantation vorhanden ( $p=0,005$  HI vs. SO). Die Verminderung der fettfreien Masse infolge der Implantation war am dritten und zehnten Tag bei den Männchen stärker ausgeprägt als bei den Weibchen ( $p=0,002$  bzw.  $p<0,001$ ). HI-Weibchen reduzierten nur am dritten Tag ihre fettfreie Masse. Am Tag 14 entsprach die fettfreie Masse bei allen Mäusen der basalen fettfreien Masse.

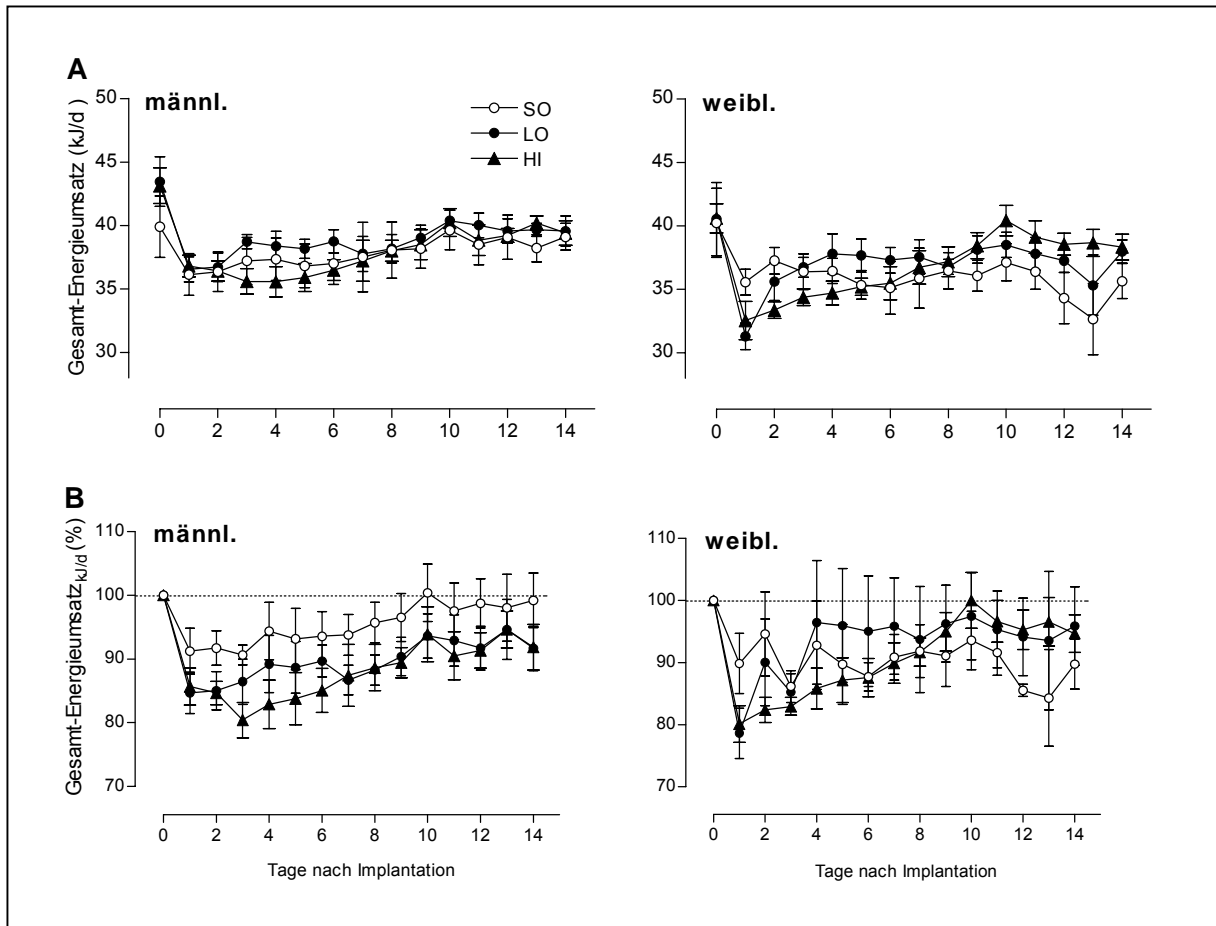
### 3.3.3 Änderungen im Energieumsatz

Der Energieumsatz wurde im KZV vom Zeitpunkt der Implantation an für zwei Wochen kontinuierlich mittels indirekter Kalorimetrie gemessen.

Der Gesamt-Energieumsatz war ähnlich der Energieaufnahme (vergl. Abb. 3-6B) von einem akuten Abfall nach der Implantation gekennzeichnet (Abb. 3-9). Der relative Gesamt-Energieumsatz war am ersten Tag nach der Implantation in beiden Geschlechtern ähnlich (männl.: SO:  $91,3\pm 3,6\%$ , LO:  $84,7\pm 3,3\%$ , HI:  $85,7\pm 2,9\%$ ; weibl.: SO:  $89,9\pm 4,9\%$ , LO:  $78,6\pm 4,1\%$ , HI:  $80,1\pm 3,0\%$ ;  $p=0,160$  männl. vs. weibl.) und in LO- und HI-Mäusen stärker vermindert als in SO-Mäusen (Einfluss des Implantats:  $p=0,045$ ). Änderungen im Energieumsatz vom zweiten bis zum 14. Tag nach der Implantation waren zwischen den Gruppen und bei Männchen und Weibchen gleich.

Der Ruheumsatz änderte sich im Gegensatz zum Gesamt-Energieumsatz bis zum zweiten Tag nach der Implantation nur wenig im Vergleich zu vor Implantation (Abb. 3-10). Auch im weiteren Verlauf gab es keine signifikanten geschlechts- oder gruppenspezifische Unterschiede.

Gesamt-Energieumsatz und Ruheumsatz zeigten etwa ab der zweiten Woche nach der Implantation ein ähnliches Verlaufsmuster. In der ersten Woche nach Implantation ähnelte der Verlauf des Gesamt-Energieumsatzes eher dem des relativen PAL (Abb. 3-11). Der PAL war am ersten Tag nach der Implantation vermindert, aber relativ zur Basalmessung zwischen Männchen und Weibchen sehr ähnlich (männl.: SO:  $94,9\pm 5,9\%$ , LO:  $90,1\pm 5,2\%$ , HI:  $87,3\pm 4,5\%$ ;  $p=0,589$ ; weibl.: SO:  $90,5\pm 3,2\%$ , LO:  $81,2\pm 4,8\%$ , HI:  $88,9\pm 5,1\%$ ;  $p=0,303$ ;

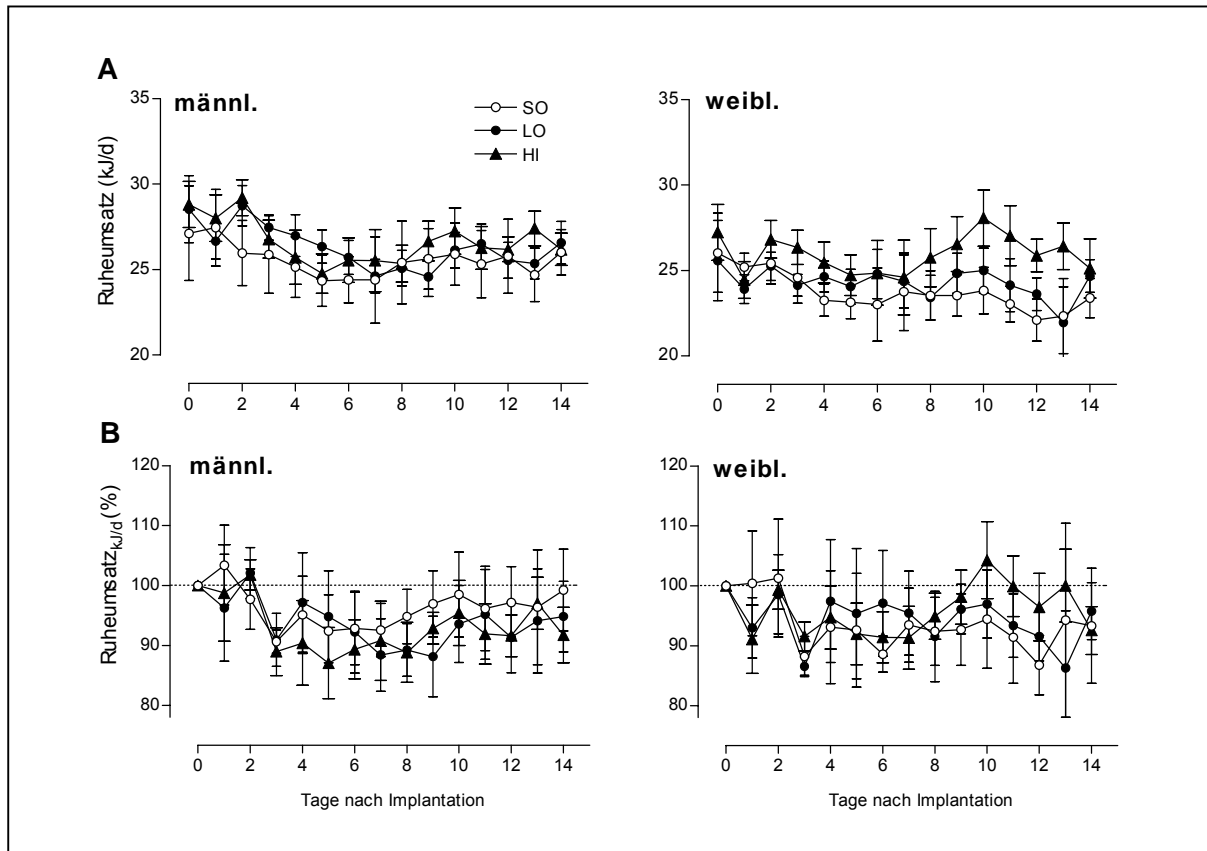


**Abb. 3-9:** Gesamt-Energieumsatz, absolut (A) und relativ zur Basalmessung vor der Implantation (definiert als 100%) (B) über 14 Tage nach der Implantation. n=6 (aufgrund von Systemausfällen der Respirationsanlage liegen für die Tage 3, 7 und 13 jeweils n=5 Werte vor). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

p=0,329 männl. vs. weibl.). Der PAL war infolge der Implantation bei allen Mäusen bis ca. Tag zwei vermindert, stieg bis zum Ende der ersten Woche wieder auf das Ausgangsniveau an und blieb danach unverändert. Dabei zeigten sich keine geschlechtsspezifischen (p=0,428) oder implantatsspezifischen Unterschiede (p=0,499).

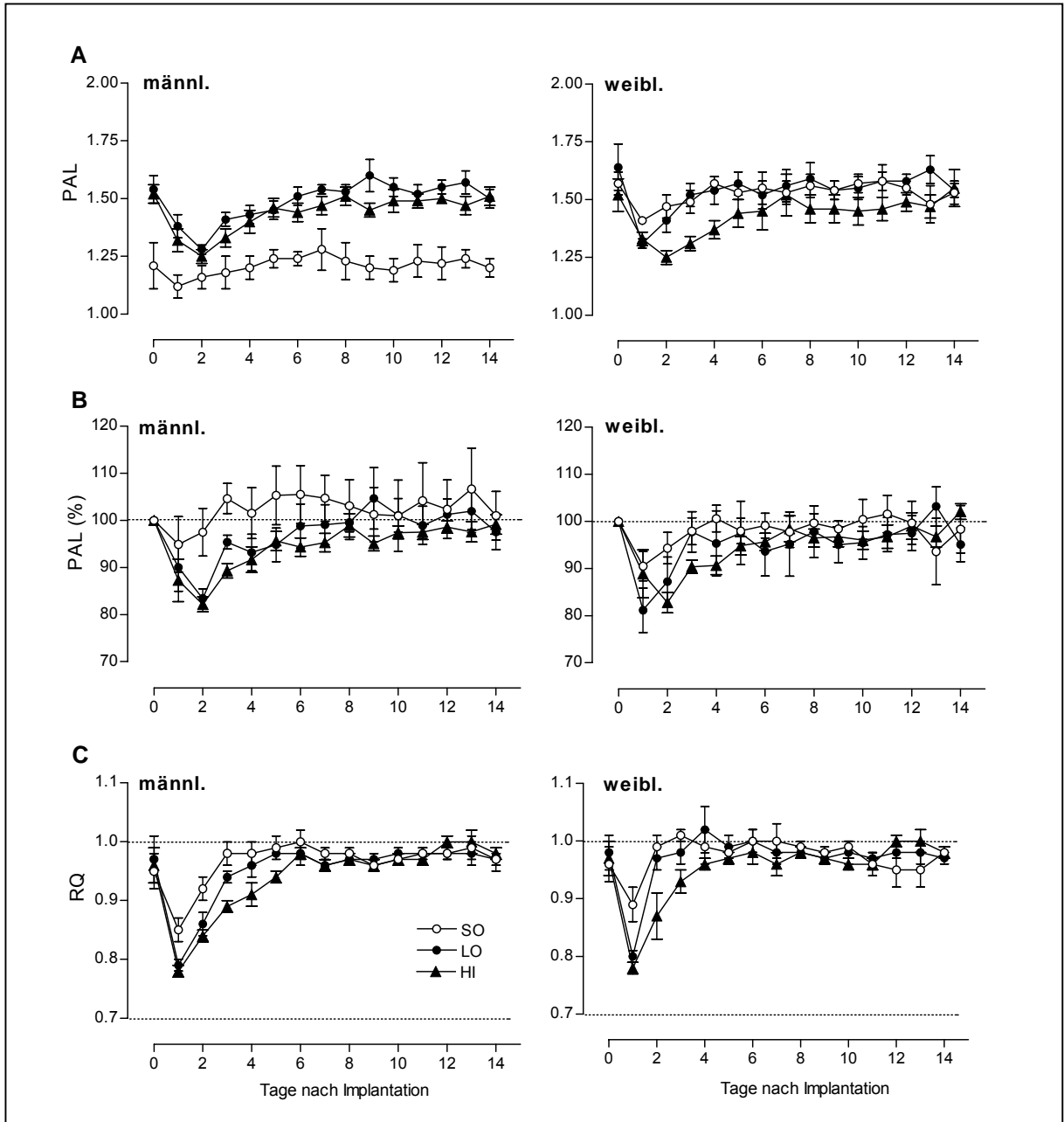
Der RQ war am ersten Tag nach der Implantation in allen Mäusen deutlich abgesunken (männl.: SO:  $0,85 \pm 0,02$ , LO:  $0,79 \pm 0,01$ , HI:  $0,78 \pm 0,01$ ; p=0,044 LO vs. SO; p=0,018 HI vs. SO; weibl.: SO:  $0,89 \pm 0,03$ , LO:  $0,80 \pm 0,01$ , HI:  $0,78 \pm 0,01$ ; p=0,019 LO vs. SO; p=0,005 HI vs. SO). Danach stieg der RQ kontinuierlich bis zum Ausgangsniveau an. Alle Männchen und Weibchen regenerierten ab dem sechsten bzw. ab dem vierten Tag nach der Implantation den basalen RQ. SO- und LO-Mäuse erreichten den basalen RQ früher als HI-Mäuse.

Die Entwicklung der Körpermasse und der Energieaufnahme während der Messung in der indirekten Kalorimetrie entsprach im wesentlichen dem in Abb. 3-6 dargestellten Verlauf für alle Tiere, die am Tag 14 getötet wurden (Daten nicht gezeigt).

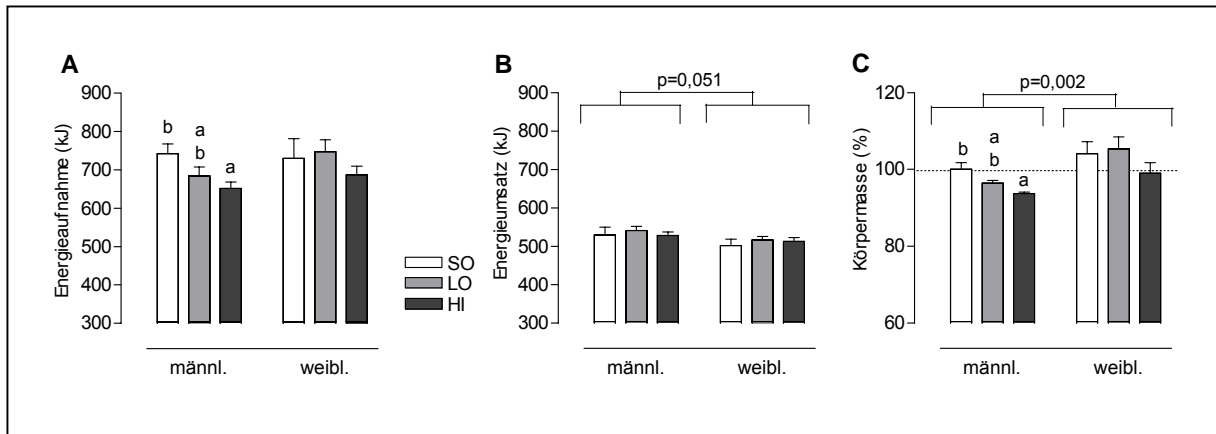


**Abb. 3-10:** Ruheumsatz, absolut (A) und relativ zur Basalmessung vor der Implantation (definiert als 100%) (B) über 14 Tage nach der Implantation.  $n=6$  (aufgrund von Systemausfällen der Respiationsanlage liegen für die Tage 3, 7 und 13 jeweils  $n=5$  Werte vor). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

Der kumulative Energieumsatz war am 14. Tag nach der Implantation zwischen allen Versuchsgruppen gleich (Abb. 3-12). Änderungen in der Körpermasse bis zum 14. Tag nach der Implantation entsprachen im wesentlichen den Änderungen in der Energieaufnahme. HI-Männchen zeigten eine niedrigere kumulative Energieaufnahme (SO:  $742,1 \pm 25,1$  kJ, LO:  $683,8 \pm 23,1$  kJ, HI:  $650,8 \pm 16,8$  kJ;  $p=0,033$  HI vs. SO) und eine niedrigere relative Körpermasse (SO:  $100,0 \pm 1,8\%$ , LO:  $96,4 \pm 0,8\%$ , HI:  $93,7 \pm 0,4\%$ ;  $p=0,005$  HI vs. SO) als die SO-Männchen. Bei den Weibchen waren die kumulative Energieaufnahme (SO:  $729,7 \pm 51,2$  kJ, LO:  $746,8 \pm 31,3$  kJ, HI:  $687,0 \pm 22,3$  kJ;  $p=0,514$ ) und relative Körpermasse (SO:  $104,1 \pm 3,2\%$ , LO:  $105,4 \pm 3,1\%$ , HI:  $99,0 \pm 2,7\%$ ;  $p=0,312$ ) zwischen allen Gruppen gleich.



**Abb. 3-11:** *Physical activity level*, PAL, absolut (A) und relativ zum PAL vor der Implantation (definiert als 100%) (B) und respiratorischer Quotient, RQ (C), über 14 Tage nach der Implantation. n=6 (aufgrund von Systemausfällen der Respirationsanlage liegen für die Tage 3, 7 und 13 jeweils n=5 Werte vor). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

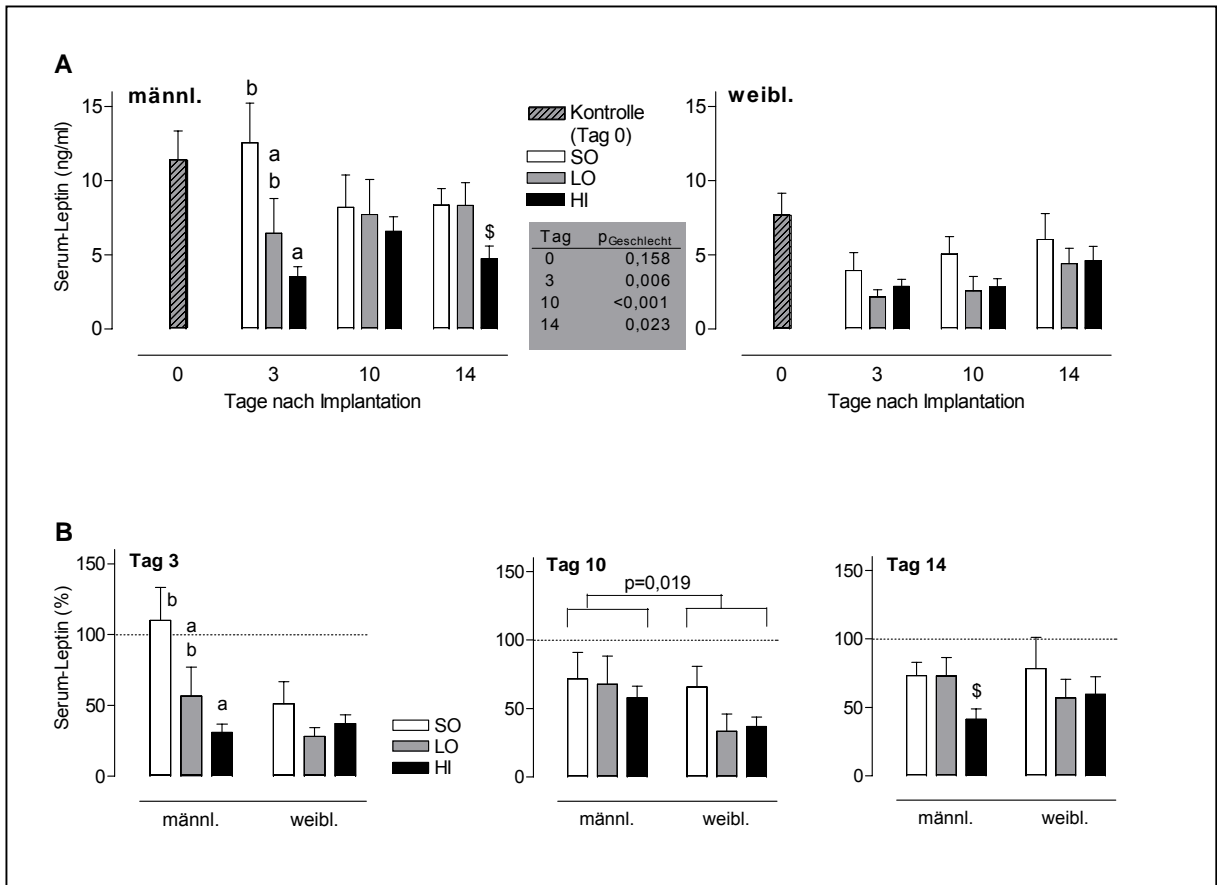


**Abb. 3-12:** Kumulative Energieaufnahme (A), kumulativer Energieumsatz (B) und relative Körpermasse (C) am 14. Tag nach der Implantation von Mäusen, deren Energieumsatz in der Respirationsanlage bestimmt wurde ( $n=6$ ). Die Körpermasse entspricht der BKM. Als Bezug dienten die Mittelwerte aus der zweitägigen Basalmessung. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA, der Einfluss des Implantats bei Männchen und Weibchen mittels einfaktorieller ANOVA mit Post-hoc Scheffé-Test (a, b entsprechen homogenen Gruppen) getestet.

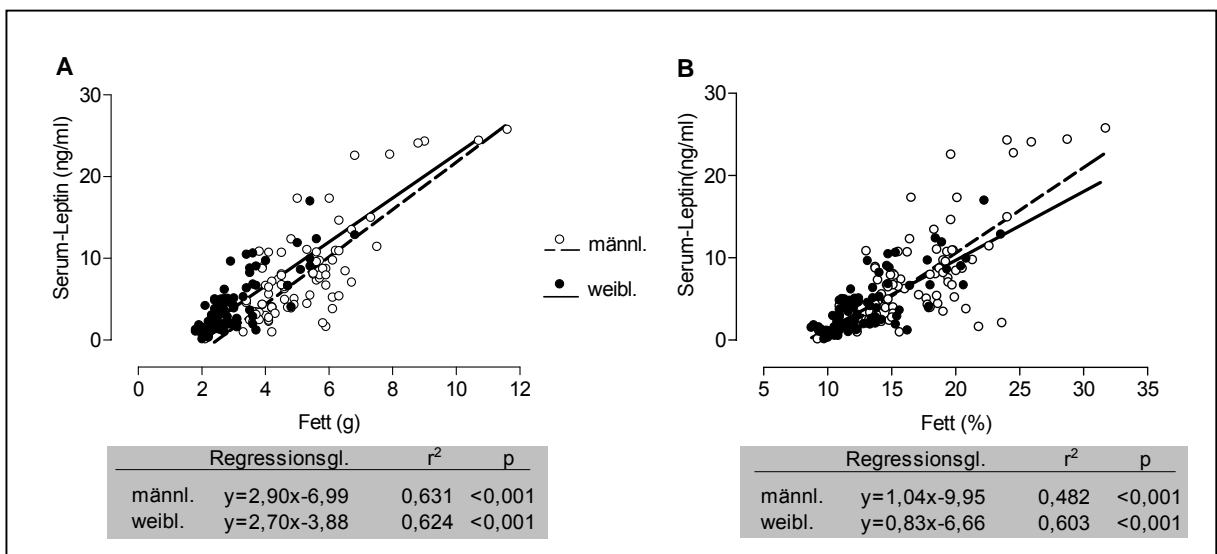
### 3.3.4 Hormonelle Änderungen

#### 3.3.4.1 Leptin

Die basale Konzentration von Serum-Leptin war bei Männchen und Weibchen gleich (Tab. 3-1, Abb. 3-13). Am dritten Tag nach der Implantation war die Leptinkonzentration mit Ausnahme der männlichen SO-Tiere bei allen Mäusen deutlich niedriger im Vergleich zur basal gemessenen Konzentration (Abb. 3-13). HI-Männchen hatten signifikant niedrigere Leptinspiegel als SO-Männchen (SO:  $12,6 \pm 2,7$  ng/ml, LO:  $6,5 \pm 2,3$  ng/ml, HI:  $3,5 \pm 0,7$  ng/ml;  $p=0,026$  HI vs. SO). Bei den Weibchen gab es keine Unterschiede (SO:  $3,9 \pm 1,2$  ng/ml, LO:  $2,2 \pm 0,5$  ng/ml, HI:  $2,9 \pm 0,5$  ng/ml;  $p=0,533$ ). Am zehnten und vierzehnten Tag waren weder bei den Weibchen noch bei den Männchen signifikante Gruppenunterschiede nachweisbar. Weibchen hatten zu allen drei Zeitpunkten nach Implantation niedrigere Leptinspiegel als die Männchen (jeweils  $p < 0,05$ , vergl. Abb. 3-13)



**Abb. 3-13:** Absolute Leptinkonzentration (ng/ml) (A) und Änderungen in der Leptinkonzentration (%) (B) relativ zur basalen Konzentration (definiert als 100%) drei, zehn und 14 Tage nach Implantation der Gewichte. n=9-10. Mittelwerte ± Standardfehler. Geschlechtsspezifische Unterschiede mittels zweifaktorieller ANOVA, Einfluss des Implantats geschlechtsspezifisch mittels einfaktorieller ANOVA und Post-hoc Scheffé-Test getestet (a, b entsprechen homogenen Gruppen). \$ p=0,087 vs. SO.



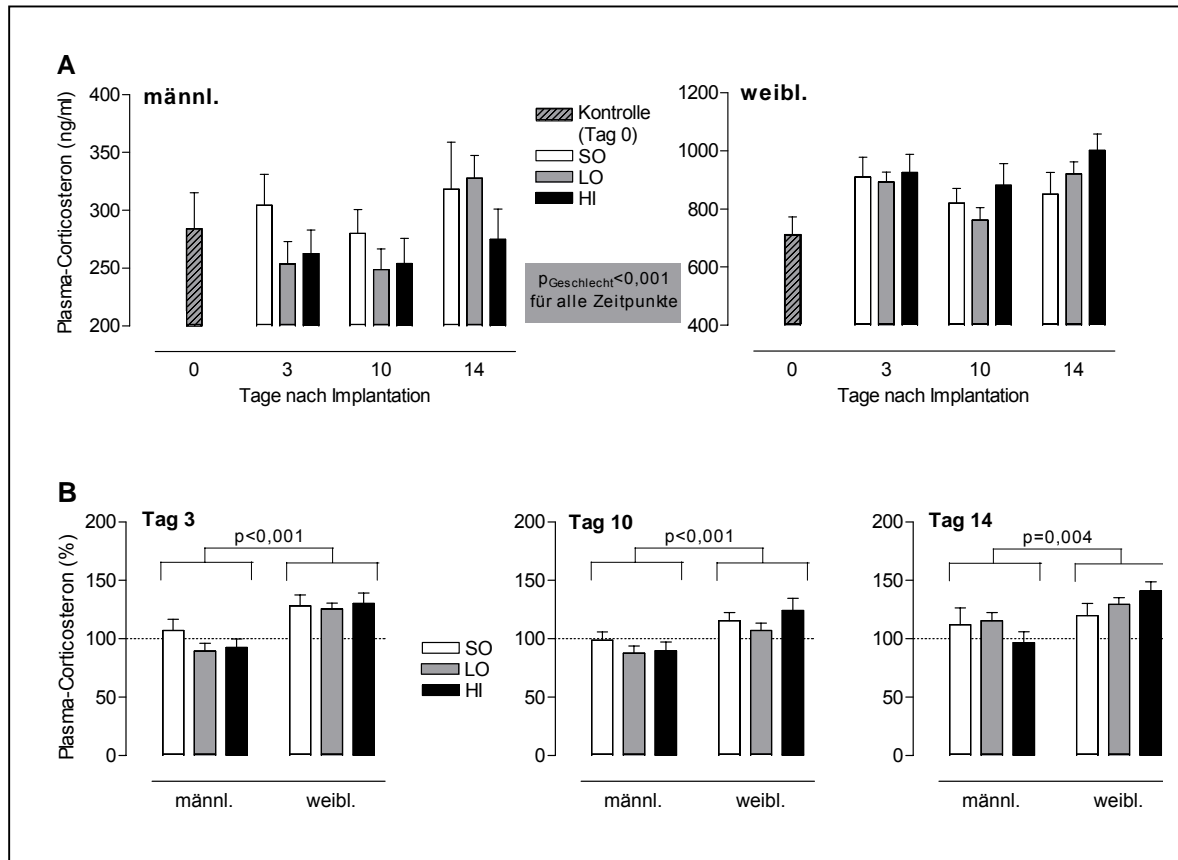
**Abb. 3-14:** Korrelation zwischen Serum-Leptinkonzentration (ng/ml) und mittels DEXA bestimmtem Körperfettgehalt in g (A) bzw. in % der Körpermasse (B). Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte mittels linearer Regression, Korrelationskoeffizienten nach Pearson in A: männl. r=0,797, weibl. r=0,793; in B: männl. r=0,699, weibl. r=0,780. n (männl./weibl.): 83/88.

Die Serum-Leptinspiegel korrelierten bei Männchen und Weibchen unabhängig von der Intervention signifikant mit der absoluten Fettmasse (Fett<sub>g</sub>) bzw. mit der relativen Fettmasse (Fett<sub>%</sub>) (Abb. 3-14). Dabei war die Korrelation mit der absoluten Fettmasse als unabhängige Variable etwas stärker als mit der relativen Fettmasse (Fett<sub>g</sub>:  $r_{\text{männl.}}=0,797$ ;  $r_{\text{weibl.}}=0,793$ ; Fett<sub>%</sub>:  $r_{\text{männl.}}=0,699$ ;  $r_{\text{weibl.}}=0,780$ ).

Beim Vergleich der gemessenen Leptinspiegel (Abb. 3-13) mit der Änderung in der Körperfettmasse (Abb. 3-8 A) zeigte sich für den dritten Tag nach der Implantation eine gute Übereinstimmung des Gruppenmusters, nicht aber des Ausmaßes von Fettmasse- und Leptinreduktion. Die Fettmasse war bei den HI-Männchen nicht signifikant ( $p=0,139$ ), die Leptinkonzentration aber signifikant reduziert im Vergleich zu SO-Männchen ( $p=0,026$ ). Bei den Weibchen gab es in der Fettmasse und der Leptinkonzentration keine Unterschiede durch die Implantation. Am zehnten Tag nach der Implantation waren die Fettmasse und die Leptinkonzentration bei Männchen und Weibchen nicht durch die Implantation beeinflusst. Bei signifikant niedrigeren relativen Leptinspiegeln ( $p<0,001$ ) wiesen die Weibchen im Vergleich zu den Männchen aber eine stärkere Erhöhung in der Fettmasse ( $p=0,001$ ) auf. Am 14. Tag nach der Implantation zeigten die Männchen mit schweren Implantaten bei signifikant reduzierter Fettmasse (SO:  $105,9\pm 3,9\%$ ; LO:  $102,5\pm 4,7\%$ ; HI:  $83,4\pm 4,3\%$ ;  $p=0,005$  HI vs. SO;  $p=0,014$  HI vs. LO) jedoch eine ähnliche Leptinkonzentration wie SO- und LO-Männchen. Die Weibchen zeigten im Vergleich zu den Männchen eine deutliche Zunahme in der Fettmasse (SO:  $132,4\pm 13,5\%$ ; LO:  $140,4\pm 14,3\%$ ; HI:  $107,4\pm 11,1\%$ ;  $p<0,001$  männl. vs. weibl.), aber noch immer niedrigere Leptinspiegel ( $p=0,023$  männl. vs. weibl.).

#### 3.3.4.2 Corticosteron

Männchen und Weibchen zeigten starke Unterschiede in der basalen Corticosteronkonzentration (Tab. 3-1, Abb. 3-15A). Der Corticosteronspiegel der Weibchen entsprach etwa dem 2,5fachen der Männchen. Zu allen drei Zeitpunkten zeigten Weibchen eine stärkere Erhöhung in der Corticosteronkonzentration als die Männchen (jeweils  $p<0,01$ ) (Abb. 3-15B). Das Implantat hatte keinen Einfluss auf Änderungen in der Corticosteronkonzentration.



**Abb. 3-15:** Absolute Corticosteronkonzentration (ng/ml) (A) und Änderungen in der Corticosteronkonzentration (%) relativ zur basalen Konzentration (definiert als 100%) (B) drei, zehn und vierzehn Tage nach Implantation der Gewichte.  $n=8-10$ . Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Geschlechtsspezifische Unterschiede mittels zweifaktorieller ANOVA getestet.

### 3.3.5 Änderungen der mRNA-Spiegel von Leptin, UCP1 und UCP3

Die basalen mRNA-Spiegel für Leptin im EAT, OAT und SAT sowie von UCP1 und UCP3 im BAT waren für Männchen und Weibchen gleich (Tab. 3-7). Die UCP3-Genexpression im Skelettmuskel war bei den Weibchen signifikant höher im Vergleich zu den Männchen ( $p=0,032$ ). Der Northern Blot zur Bestimmung von Änderungen in der UCP1-mRNA-Expression bei Männchen und Weibchen infolge der Implantation ist beispielhaft für alle Northern-Blot-Analysen in Abb. 3-16 dargestellt.

Der mRNA-Spiegel von Leptin im epidydimalen Fettgewebe war bei den HI-Männchen analog zum Serum-Leptin nach drei und 14 Tagen im Vergleich zu SO-Männchen signifikant vermindert (jeweils  $p=0,008$  HI vs. SO) (Abb. 3-17). Dieser Unterschied war für den Leptinspiegel auch im subkutanen Fettgewebe vorhanden, aber weniger stark ausgeprägt.

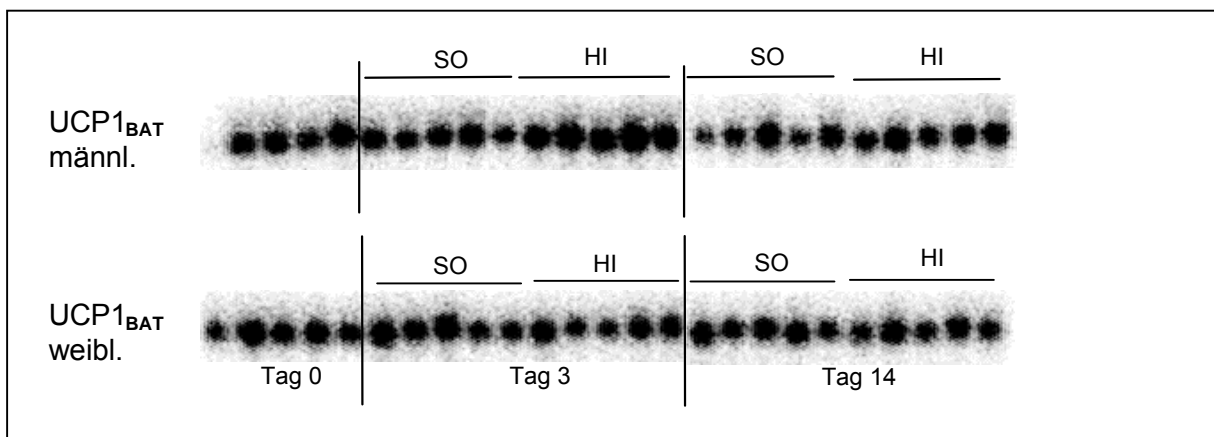
Im omentalen Fettgewebe zeigte sich bei den Weibchen nach drei und vierzehn Tagen sowohl nach Schein-Operation als auch nach Implantation eines schweren Gewichtes ein Abfall der Leptin-mRNA-Spiegel. Dieser Abfall war aber nur für die HI-Weibchen signifikant



Tab. 3-7: Basale mRNA-Expression von UCP1, UCP3 und Leptin (Tag 0).

	<i>UCP1</i> BAT	<i>UCP3</i> BAT	<i>UCP3</i> Muskel	<i>Leptin</i> SAT	<i>Leptin</i> E/OAT
männl.	1,00 (1,21)	1,00 (0,76)	1,00 (0,43)	1,00 (0,66)	1,00 (0,68)
weibl.	1,02 (0,32)	1,04 (0,43)	1,43* (0,63)	0,65 <sup>#</sup> (1,08)	0,81 (0,85)

Die Genexpression wurde mittels Northern Blot und radioaktiver Hybridisierung bestimmt. Daten sind relativ zum Median der Männchen dargestellt, der als 1 definiert wurde. Alle Einzelwerte wurden relativ dazu berechnet. Median (Spannweite), n=5. Statistische Analyse mittels U-Test \*p=0,032 vs. männl., <sup>#</sup>p=0,056 vs. männl.



**Abb. 3-16:** Northern Blot für UCP1-mRNA im BAT von Männchen und Weibchen als Beispiel für die durchgeführten Hybridisierungen. Die RNA von Männchen und Weibchen (vergl. Tab. 2-6) wurden auf getrennten Blots untersucht. Jeweils 10µg Gesamt-RNA von fünf Mäusen pro Gruppe wurden hintereinander im Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiv markierten Sonde (217bp, s. Tab. 2-7) hybridisiert. Die UCP1-Blots wurden für 20min autoradiographisch exponiert. Die Quantifizierung der mRNA-Spiegel der untersuchten Peptide erfolgte entsprechend Kap. 2.9.3.2. Das fehlende Signal der ersten RNA-Probe für Tag 0 bei den Männchen wurde in einem Wiederholungsversuch bestätigt.

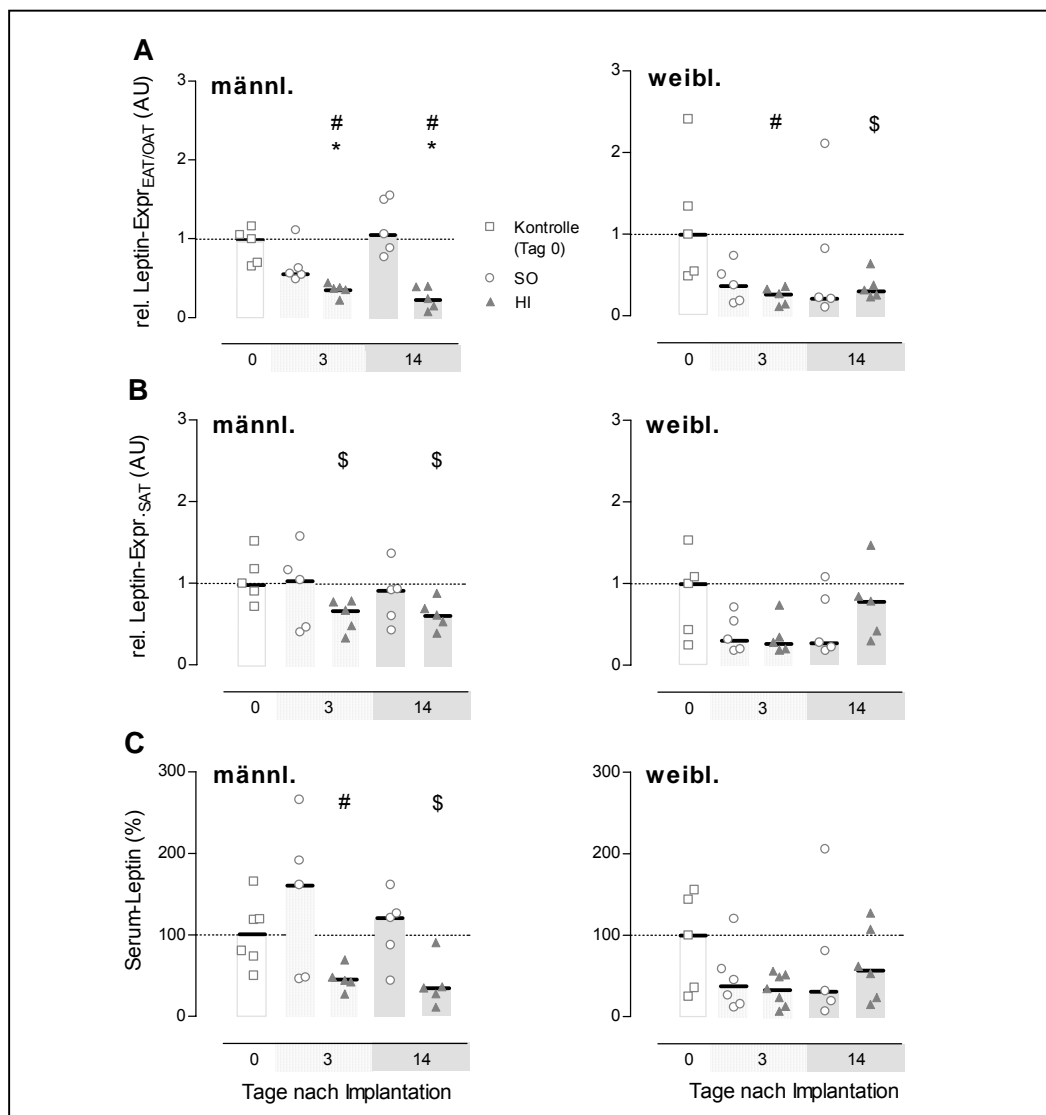
(Tag drei: p=0,008; Tag 14: p=0,032 vs. Tag 0). Im subkutanen Fettgewebe war die Leptin-Genexpression für SO- und HI-Weibchen nach drei Tagen sowie für die SO- Weibchen nach 14 Tagen leicht, aber aufgrund individueller Unterschiede nicht signifikant vermindert.

Der Vergleich mit der Serum-Leptinkonzentration zeigt, dass bei Männchen und Weibchen das Muster der Leptin-Genexpression im weißen Fettgewebe gut mit dem Muster der Serumkonzentration übereinstimmte.

Abbildung 3-18 zeigt zum Vergleich die Änderungen in der Fettmasse und die kumulative Energieaufnahme infolge der Gewichtsimplantation für die zur Untersuchung der Genexpression genutzten Mäuse. Analog zur Leptin-Genexpression im EAT und SAT nach drei und vierzehn Tagen waren bei den HI-Männchen die Fettmasse (p=0,008 bzw. p=0,016 vs. SO) und die Energieaufnahme (p=0,016 bzw. p=0,032 vs. SO) signifikant vermindert. Bei den HI-Weibchen zeigte sich jedoch bei verringerter Leptin-Genexpression im OAT nach drei

und 14 Tagen eine unveränderte Fettmasse und Energieaufnahme im Vergleich zu SO-Weibchen.

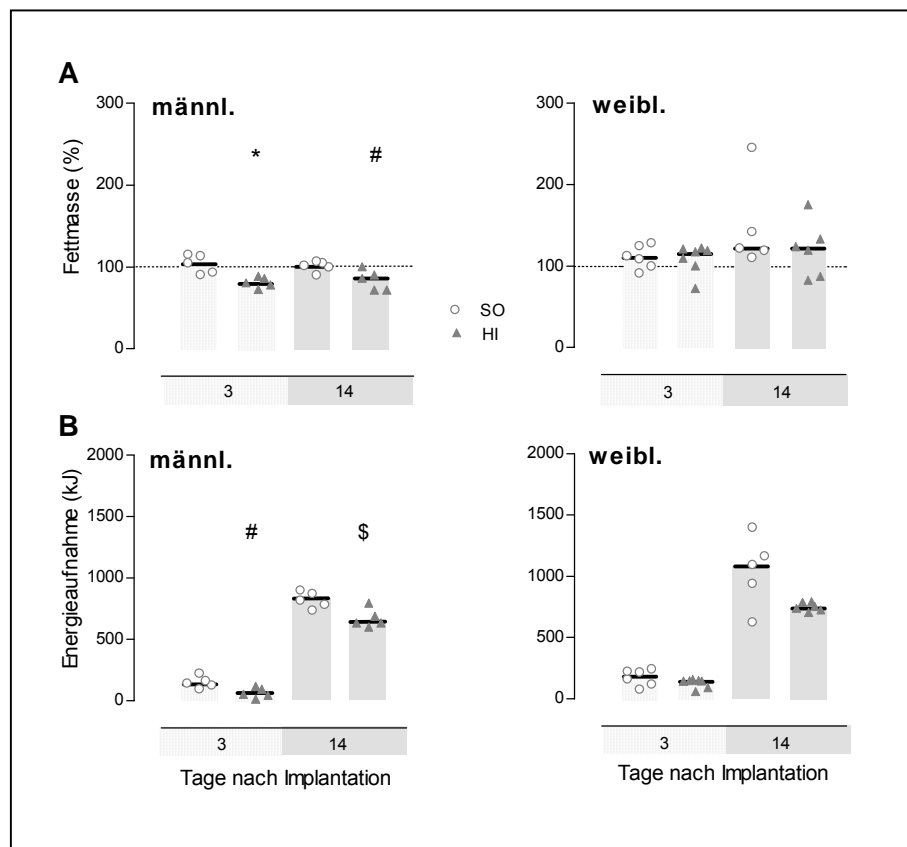
Die Untersuchungen im braunen Fettgewebe zeigten bei den HI-Männchen am dritten Tag nach der Implantation einen Anstieg der mRNA-Spiegel von UCP1 verglichen mit der basalen mRNA-Expression und den SO-Männchen ( $p=0,008$  vs. Tag ;  $p=0,016$  vs. SO) (Abb. 3-19). Nach 14 Tagen entsprach die UCP1-mRNA-Expression der HI-Männchen dem Basalniveau. Bei den Weibchen führte die Implantation des schweren Implantats nach drei



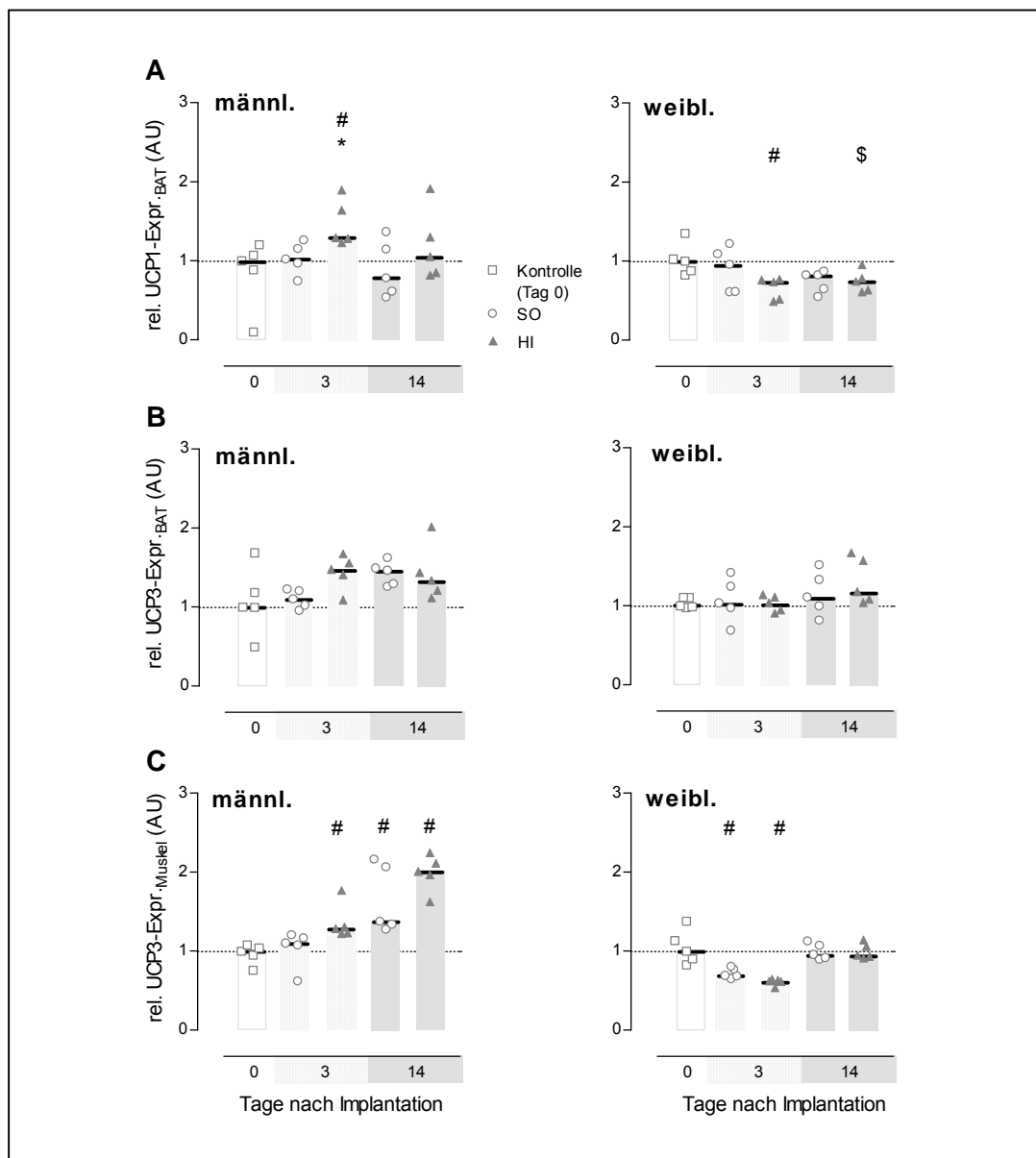
**Abb. 3-17:** Relative Leptin-Genexpression im epididymalen bzw. omentalen Fettgewebe (A) und im subkutanen Fettgewebe (B) (jeweils  $n=5$ ). Die Genexpression wurde mittels Northern Blot und radioaktiver Hybridisierung bestimmt. Zum Vergleich ist die relative Leptin-Serumkonzentration dieser für die Genexpression untersuchten Mäuse dargestellt (C). Höhere  $n$ -Zahlen ( $n=5-7$ ) in (C) ergaben sich dadurch, da für Serum-Leptin alle bei der Genexpression untersuchten Mäuse einbezogen wurden (zur Untersuchung der Genexpression in EAT/OAT und SAT teilweise verschiedene Mäuse genutzt). Genexpression und Serum-Leptinkonzentration wurden relativ zum Median der Kontrollgruppe (Tag 0) dargestellt. Gezeigt sind die Einzelwerte mit dem Median. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-H-Test und U-Test innerhalb einer Gruppe und eines Geschlechts zum Vergleich mit Tag 0 sowie mittels U-Test zum Vergleich der Gruppen zu einem Zeitpunkt. \*  $p=0,008$  vs. SO, #  $p<0,001$  vs. Tag 0, \$  $p<0,05$  vs. Tag 0.

und vierzehn Tagen zu einer verminderten UCP1-mRNA-Expression ( $p=0,008$  bzw.  $p=0,032$  vs. Tag 0). Die mRNA-Spiegel von UCP3 im braunen Fettgewebe wurden bei allen Mäusen nicht durch die Gewichtsimplantation beeinflusst.

Die mRNA-Expression von UCP3 im Skelettmuskel war für HI-Männchen nach drei und 14 Tagen, für die SO-Männchen nur nach 14 Tagen gegenüber der basalen Expression erhöht (jeweils  $p=0,008$  vs. Tag 0). SO- und HI- Weibchen zeigten im Gegensatz dazu verminderte UCP3-mRNA-Spiegel im Skelettmuskel nach drei Tagen (jeweils  $p=0,008$  vs. Tag 0). Nach 14 Tagen entsprach die UCP3-mRNA-Expression dem basalen Niveau. Zwischen SO- und HI-Mäusen gab es aber keine Unterschiede.



**Abb. 3-18:** Fettmasse relativ zum Zeitpunkt der Implantation (A) und kumulative Energieaufnahme (B) am dritten und 14. Tag nach Implantation der Gewichte von Männchen und Weibchen, die in die Untersuchung der Leptin-Genexpression ( $n=5$ ) einbezogen wurden. Höhere  $n$ -Zahlen ( $n=5-7$ ) ergaben sich dadurch, da alle bei der Genexpression untersuchten Mäuse einbezogen wurden (zur Untersuchung der Genexpression in EAT/OAT und SAT teilweise verschiedene Tiere genutzt). Die Fettmasse wurde relativ zur Messungen am Tag der Implantation berechnet (entsprechend 100%). Gezeigt sind die Einzelwerte mit dem Median. Die statistische Analyse erfolgte mittels U-Test zum Vergleich der Gruppen zu einem Zeitpunkt. \*  $p=0,008$  vs. SO, #  $p=0,016$  vs. SO, \$  $p=0,032$  vs. SO.



**Abb. 3-19:** Relative Genexpression von UCP1 im braunen Fettgewebe (A) und von UCP3 im braunen Fettgewebe (B) sowie im Skelettmuskel (C) für jeweils fünf Männchen und Weibchen. Die Genexpression wurde mittels Northern Blot und radioaktiver Hybridisierung bestimmt. Daten sind relativ zum Median der Kontrollgruppe (Tag 0) dargestellt. Gezeigt sind die Einzelwerte mit dem Median. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-H-Test und U-Test innerhalb einer Gruppe und eines Geschlechts zum Vergleich mit Tag 0 sowie mit dem U-Test zum Vergleich der Gruppen zu einem Zeitpunkt. #  $p=0,008$  vs. Tag 0, \$  $p=0,032$  vs. Tag 0, \*  $p=0,016$  vs. SO.

## 4 Diskussion

Ziel der Studie war die Überprüfung der Hypothese, dass eine künstliche Erhöhung der Körpermasse durch Reduktion der biologischen Körpermasse bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmasse kompensiert wird. Dafür wurde die Körpermasse von Mäusen akut durch die Implantation eines Gewichtes in die Bauchhöhle um 10% erhöht. Die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen waren:

1. Männchen zeigten infolge der künstlichen Erhöhung der Körpermasse eine partielle Reduktion in der biologischen Körpermasse. Weibchen zeigten diese Kompensation jedoch nicht.
2. Die Reduktion der biologischen Körpermasse erfolgte ausschließlich auf Kosten der Fettmasse. Die fettfreie Masse wurde in beiden Geschlechtern nicht durch die zusätzlich implantierte Masse beeinflusst.
3. Änderungen in der Körpermasse wurden kurz- bis mittelfristig eher durch Änderungen in der Energieaufnahme als im Energieumsatz verursacht.
4. Die künstliche Erhöhung der Körpermasse führte zu geschlechtsspezifischen Änderungen im Leptin- und im Corticosteronspiegel sowie in der Genexpression von UCP1 und UCP3.

### 4.1 Einfluss der Gewichtsimplantation auf die Energiebilanz

#### 4.1.1 Änderungen in der Körpermasse, der Körperzusammensetzung und der Energieaufnahme

Langfristige Änderungen in der Körpermasse und der Körperzusammensetzung waren schon am Ende der zweiten Woche nach Implantation manifest. Die Körpermasse war am 14. Tag nach der Implantation bei den HI-Männchen signifikant niedriger im Vergleich zu SO-Männchen und blieb auch bis zur 14. Woche nach der Implantation tendenziell um ca. 3-5% niedriger im Vergleich zu SO- und LO-Männchen (signifikanter Unterschied zu SO- und LO-Männchen bis zur 4. Woche). Die Reduktion in der Körpermasse beruhte auf einer verminderten Fettmasse und entsprach etwa der Hälfte der implantierten Masse von 10%. Bei den Weibchen hatte die implantierte Masse nach jeweils 14 Tagen und 14 Wochen keinen Einfluss auf die Körpermasse. Im Vergleich zu den Männchen war aber unabhängig vom Implantat eine stärkere Fettmassezunahme schon ab Tag zehn nach Implantation nachweisbar. Im Gegensatz zur Fettmasse wurde die fettfreie Masse mittel- und langfristig

weder durch die Implantation noch durch das Geschlecht beeinflusst und blieb bei allen Mäusen schon ab der zweiten Woche persistent auf dem ursprünglichen Niveau.

Akut wurde die Körpermasse durch eine stark verminderte Energieaufnahme am ersten Tag nach der Implantation in allen Gruppen reduziert (Ausnahme SO-Weibchen), die offensichtlich Folge des post-operativen Stresses war. Nach der Implantation von miniosmotischen Pumpen wurde ebenfalls ein leichter Körpermasseabfall berichtet (Velkoska *et al.*, 2003). Die implantierten Gewichte waren aber zum Teil schwerer als die miniosmotischen Pumpen, und die Implantation in den Bauchraum bedeutete eine etwas höhere Belastung für den Körper als die Implantation unter die Haut, was den stärkeren Körpermasseabfall nach Gewichtsimplantation erklären könnte.

Weibchen zeigten infolge der akuten Körpermassereduktion in beiden Teilversuchen eine progressivere Entwicklung in der Körpermasse als die Männchen. Die schnelle Regenerierung der BKM bei den HI-Weibchen war nicht von einer kompensatorischen Erhöhung der ursprünglichen Energieaufnahme begleitet, denn ab der zweiten Woche nach Implantation war die Energieaufnahme bei allen Mäusen wieder auf das Ausgangsniveau angestiegen und blieb danach unverändert. Die schnellere Körpermasseregeneration der Weibchen basierte daher eher auf einer im Vergleich zu den HI-Männchen früheren und schnelleren Erhöhung der Energieaufnahme auf das Ausgangsniveau (vergl. Abb. 3-6), was zu einer höheren, kumulativen Energieaufnahme bis zur zweiten Woche nach Implantation führte. Der Einfluss der Energieaufnahme auf die Körpermasseentwicklung wurde dadurch deutlich, dass Unterschiede in der Körpermasse im wesentlichen denen der kumulativen Energieaufnahme nach drei, zehn und 14 Tagen nach der Implantation entsprachen (vergl. Abb. 3-7 und 3-12).

Die Verminderung der BKM wurde am dritten Tag nach der Implantation bei den HI-Männchen durch eine Verminderung der fettfreien und der Fettmasse herbeigeführt. Bei den HI-Weibchen erfolgte die akute Körpermasseabnahme nur durch eine Verminderung in der fettfreien Masse, während die Fettmasse durch das schwere Implantat nicht verändert wurde. Die akute Reduktion (Tag drei) der fettfreien Masse war bei den HI-Männchen mehr als doppelt so hoch wie bei den HI-Weibchen ( $-2,6 \pm 0,4\text{g}$  bzw.  $-1,0 \pm 0,4\text{g}$  vs. Tag 0). Für männliche Wistar-Ratten wurde ebenfalls eine stärkere Abnahme der Proteinmasse nach einer sechstägigen Fastenperiode im Vergleich zu Weibchen berichtet (Cortright und Koves, 2000). Es wurde vermutet, dass Weibchen die fettfreie Masse unter Bedingungen negativer Energiebilanz stärker schützen als die Fettmasse, was zu einem geringeren Körpermasseverlust führen würde, da der massenspezifische Energiegehalt von Fett höher ist als der von Protein (Cortright und Koves, 2000). Eine Abnahme in der Fettmasse konnte

für die HI-Weibchen am dritten Tag nach der Implantation jedoch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war eine Abnahme in der Fettmasse vor dem dritten Tag nach der Implantation bei den HI-Weibchen eingetreten, aber aufgrund effektiver Regenerationsmechanismen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr messbar. Nach zehn und 14 Tagen entsprach die Körperzusammensetzung bei den Weibchen wieder dem Ausgangsniveau; bei den HI-Männchen war die Fettmasse bis zum 14. Tag nach der Implantation noch immer reduziert ( $p=0,005$  vs. SO). Neben einer progressiveren Energieaufnahme könnte daher auch eine effizientere Energieverwertung bei den Weibchen zur verminderten Körpermasseabnahme im Vergleich zu den Männchen geführt haben (Cortright und Koves, 2000). Die erhöhte Energieeffizienz wurde möglicherweise durch den akuten Nahrungsmangel infolge der Gewichtsimplantation hervorgerufen.

In einer neuen Betrachtung des sogenannten Minnesota-Experiments, in dem 12 Männer einer 24-wöchigen Nahrungsrestriktion mit darauf folgender kontrollierter Steigerung der Nahrungsaufnahme (12 Wochen) und *ad libitum* Nahrungsaufnahme (acht Wochen) ausgesetzt waren, wurde ebenfalls eine Regenerierung der fettfreien Masse auf das Niveau von vor der Nahrungsrestriktion berichtet (Dulloo *et al.*, 1997). Die vollständige Wiederherstellung der fettfreien Masse war jedoch erst durch eine stark erhöhte Nahrungsaufnahme in der *ad libitum*-Phase möglich, die von einer erhöhten Fettmassezunahme begleitet war. Die Implantation der Gewichte in die FVB-Mäuse führte zu einer starken aber nur kurzfristigen Nahrungsrestriktion, die auch ohne nachfolgende Erhöhung der Nahrungsaufnahme über das ursprüngliche Maß hinaus zu einer schnellen Regenerierung der fettfreien Masse führte. Die bei weiblichen Mäusen unabhängig vom implantierten Gewicht am Tag zehn und vierzehn nach der Implantation wiederhergestellte fettfreie Masse war mit einer stärkeren Zunahme in der Fettmasse und einer höheren kumulativen Energieaufnahme im Vergleich zu den Männchen begleitet. Nach 14 Wochen war die erhöhte Fettmasse der Weibchen jedoch nicht mit einer signifikant höheren kumulativen Energieaufnahme verbunden. Akute geschlechtsspezifische Änderungen in der Energieaufnahme hatten offensichtlich einen großen Einfluss auf die geschlechtsspezifische Regenerierung der biologischen Körpermasse nach Überwindung des post-operativen Stresses.

Eine den HI-Männchen ähnliche Körpermasseentwicklung und Energieaufnahme wurde in Untersuchungen an männlichen Wildmäusen (*Peromyscus maniculatus*) beobachtet. Adams *et al.* (2001) zeigten eine kompensatorische Körpermassereduktion entsprechend der Implantation von Gewichten mit einer Masse von 1-3 g. Die Autoren postulierten daher die Existenz eines Körpermasse-*Set-points*, der bei einer erhöhten Beladung des muskuloskeletalen Systems in der neuralen Regulation der Körpermasse eine Rolle spielt.

Fünf Wochen nach der Gewichtsimplantation betrug die Reduktion der biologischen Körpermasse in der Gruppe mit dem schwersten Implantat (3 g) ca. 1,5 g, was ebenfalls einer Kompensation der Hälfte der implantierten Masse entspricht. Diese Reduktion der Körpermasse war mit einer verminderten kumulativen Energieaufnahme bis zur fünften Woche nach der Gewichtsimplantation in der Gruppe mit dem schwersten Implantat verbunden (Adams *et al.*, 2001). Aus dieser Studie ging jedoch nicht eindeutig hervor, ob die Energieaufnahme kontinuierlich über den gesamten Zeitraum nach der Implantation reduziert war, oder ob ein akuter Abfall ähnlich wie bei der Untersuchung an den FVB-Mäusen von einer Regenerierung der Energieaufnahme gefolgt war, aber fünf Wochen nicht ausreichten, um den Energieverlust zu kompensieren. Eine unzureichende Energieaufnahme der Mäuse mit dem 3 g-Implantat bei Adams *et al.* (2001) könnte daher die Ursache der reduzierten Körpermasse und nicht die Folge einer metabolischen Rückkopplung innerhalb der Körpermasse-*Set-point*-Regulation sein. Weibliche Mäuse wurden in der erwähnten Studie nicht untersucht.

Ratten und Mäuse werden durch kontinuierliche Zentrifugation (Bedingung erhöhter Schwerkraft) einer Vervielfachung ihrer Körpermasselast ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen zeigten die Versuchstiere ebenfalls eine Reduktion der Körpermasse ähnlich den HI-Männchen (Warren *et al.*, 1997). Dabei wurden eine akute Abnahme und spätere Normalisierung in der Energieaufnahme und eine Körpermasseabnahme beobachtet, die durch Reduktion der Fettmasse herbeigeführt wurde (Warren *et al.*, 1997). Diese Effekte konnten auf eine Erhöhung im Energieumsatz zurückgeführt werden, die vor allem einer Steigerung des Ruheumsatzes, z. B. durch einen erhöhten Substratumsatz im Skelettmuskel, entsprach (Wade *et al.*, 2002). Ein erhöhter Energieumsatz konnte bei den HI-Männchen jedoch nicht als Ursache der leicht verminderten Fettmasse nachgewiesen werden (s. Kap. 4.1.2).

#### 4.1.2 Änderungen im Energieumsatz

Infolge der Implantation schwerer Gewichte wurde ein höherer Energieumsatz erwartet, da akut mehr Energie zur Bewegung mit der zusätzlichen Masse aufgewendet werden muss. Der kumulative Energieumsatz über zwei Wochen nach der Implantation wurde jedoch nicht durch das implantierte Gewicht beeinflusst (vergl. Abb. 3-12). Akute Änderungen in der Körpermasse nach der Implantation wurden daher hauptsächlich durch Änderungen in der Energieaufnahme, nicht aber durch einen veränderten Energieumsatz hervorgerufen.

Der Zeitverlauf des Energieumsatzes zeigte analog der Entwicklung von Körpermasse und



Energieaufnahme eine akute Abnahme und einen darauf folgenden Anstieg. Die zeitgleiche Abnahme von Energieaufnahme, Gesamt-Energieumsatz und PAL-Werten sowie ein weitgehend unveränderter Ruheumsatz bei allen Mäusen bis zum zweiten Tag nach der Implantation lassen vermuten, dass der Gesamt-Energieumsatz akut hauptsächlich durch eine verminderte Bewegungsaktivität und eine verminderte Nahrungsaufnahme nicht aber durch den Ruheumsatz beeinflusst wurde. Die durch Narkose und Operation verursachte verminderte Bewegungsfähigkeit führte vermutlich zu einer erschwerten Nahrungsaufnahme. Sowohl in der Ratte (Griggio *et al.*, 1992) als auch am Menschen (Weinsier *et al.*, 2000; Weinsier, 2001) ist gezeigt worden, dass der Energieumsatz unter Nahrungsentzug und restriktiver Nahrungsaufnahme sinkt, da der Anteil der nahrungsinduzierten Thermogenese vollständig bzw. teilweise wegfällt. Eine verstärkte Aktivierung vorhandener Energiespeicher aufgrund der niedrigeren Nahrungsaufnahme nach der Implantation lässt sich anhand des ebenfalls akut verminderten respiratorischen Quotienten nachweisen (Abb. 3-11 C).

Mit zunehmender Energieaufnahme stieg auch der Energieumsatz am Ende der ersten Woche nach Implantation wieder an, und RQ und PAL-Werte wurden entsprechend der basalen Messung regeneriert. Die anhand der PAL-Werte abgeschätzte Bewegungsaktivität wurde daher mittel- und langfristig nicht durch die Implantation beeinflusst. Sie entsprach ab der zweiten Woche nach der Implantation wieder der basalen Aktivität.

Der Gesamt-Energieumsatz wurde ab der zweiten Woche nach Implantation durch die Normalisierung der Futteraufnahme und der Bewegungsaktivität hauptsächlich vom Ruheumsatz bestimmt. Der Ruheumsatz wurde langfristig nicht signifikant durch die zusätzliche Masse verändert. Der tendenziell verminderte Ruheumsatz der HI-Männchen im Vergleich zu SO-Männchen in der 12. Woche nach der Implantation ist wahrscheinlich durch die langfristig tendenziell verminderte BKM der HI-Männchen erklärbar.

Der Einfluss zusätzlicher Lasten auf Änderungen im Energieumsatz wurde bisher vor allem in Humanstudien untersucht. Während einer Gewichtsreduktion bei adipösen Männern wurde die diätetisch reduzierte Körpermasse (-20%) simultan durch zusätzliche Gewichte (entsprechend der KM vor der Diät) ersetzt, wodurch es zu Änderungen in der körperlichen Aktivität, aber nicht im Ruheumsatz kam (Weigle und Brunzell, 1990). In einer Studie an Frauen zweier ostafrikanischer Volksstämme, die regelmäßig Lasten bis zu 70% ihrer eigenen Körpermasse auf dem Kopf tragen, führten zusätzliche Lasten mit einer Masse von bis zu 20% der eigenen Körpermasse nicht zu einer messbaren Erhöhung der metabolischen Kosten (Maloiy *et al.*, 1986). Anhand einer ähnlichen Studie bei Frauen eines Gambischen Volksstammes wurde vermutet, dass die Schwelle zur Erhöhung des Energieumsatzes beim Tragen von Lasten nicht durch die Körpermasse, sondern durch den Anteil an fettfreier Masse bestimmt wird (Jones *et al.*, 1987). Erst ab einer Erhöhung der Last um 40% in Bezug

auf die fettfreie Masse kam es zu einer kompensatorischen Erhöhung des Energieumsatzes. Dabei war es unerheblich, ob diese Last durch die Fettmasse oder/und durch ein externes Gewicht hervorgerufen wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch zusätzliche Lasten erst eine bestimmte Massenschwelle erreicht werden muss, um Änderungen im Energieumsatz zu Bewegung dieser Last hervorzurufen.

Möglicherweise war durch die Implantation eines Gewichtes von 10% der Körpermasse diese Schwelle bei den FVB-Mäusen noch nicht erreicht, was das Ausbleiben der Erhöhung des Energieumsatzes begründen könnte. Hinzu kommt, dass die Änderung des Energieumsatzes durch eine zusätzliche Last auch davon beeinflusst wird, an welchem Körperteil die Last getragen wird. So führte bei Männern das Tragen von Gewichten auf dem Kopf oder am Oberkörper (nah am Torso) zu einem geringeren Energieaufwand als das Tragen an den Beinen (entfernt vom Torso) (Soule und Goldman, 1969). Das zusätzliche Gewicht in der Bauchhöhle führte daher bei den HI-Mäusen vermutlich durch die ökonomische Art des Tragens (Integration in den Oberkörper) zu keinem erhöhten Energiebedarf für die Bewegung mit dem Implantat.

Weibchen zeigten im Langzeitversuch nach zwei und 12 Wochen unabhängig vom Implantat eine stärkere Erhöhung des Energieumsatzes als die Männchen. Dennoch konnten sie ihre BKM trotz der zusätzlich implantierten Masse aufrechterhalten und nahmen sogar ähnlich stark wie SO- und LO-Weibchen an Fettmasse zu. Das unterstützt die Vermutung einer effizienteren Energieverwertung bei den Weibchen, die zu einer stärkeren Konservierung der Körpermasse führt.

Die effizientere Energieverwertung bei weiblichen Versuchstieren wurde in Studien beschrieben, die unter energiefordernden Bedingungen (erhöhte Schwerkraft, erhöhte körperliche Aktivität) durchgeführt wurden. Bei weiblichen Ratten, die unter höherer Schwerkraft (2,5G) geboren und aufgezogen wurden, beobachtete man eine gegenüber Männchen weniger starke Reduktion in der Körpermasse im Vergleich zu Ratten, die unter normaler Gravitation (1G) aufwuchsen (Wubbels und de Jong, 2000). Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Energieverwertung wurden auch an Ratten gezeigt, die durch eine Erhöhung der Bewegungsaktivität im Laufrad einem erhöhten Energieumsatz ausgesetzt waren. Weibchen konnten bei höherer Bewegungsaktivität ihre Körpermasse im Vergleich zu den Männchen trotz negativerer Energiebilanz aufrechterhalten (Cortright *et al.*, 1997) und zeigten dabei eine kompensatorische Erhöhung in der Energieaufnahme (Nance *et al.*, 1977). Untersuchungen von Stubbs (Stubbs *et al.*, 2002a; Stubbs *et al.*, 2002b) zeigten ähnliche Tendenzen auch beim Menschen. Die Energiebilanz von Männern war durch ein einwöchiges Aerobic-Training unterschiedlicher Intensität (keine, mittlere, lange Trainingsdauer pro Tag) negativer bei der höchsten

Trainingsintensität und die absolute Körpermasseabnahme höher im Vergleich zu den Frauen. Frauen kompensierten zumindest teilweise den erhöhten Energiebedarf mit einer höheren Energieaufnahme (+30%).

Infolge der Implantation war der Energieumsatz bei den HI-Männchen und HI-Weibchen nicht im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen erhöht. Offensichtlich bewirkte die Gewichtsimplantation aber ähnlich einer erhöhten Schwerkraft oder erhöhten Aktivität eine negative Energiebilanz, die zu den geschlechtsspezifischen Veränderungen in der Körpermasse führte. Die negative Energiebilanz wurde durch die akute Abnahme der Nahrungsaufnahme verursacht und löste möglicherweise geschlechtsspezifische Mechanismen zur Kompensation der negativen Energiebilanz aus. Bei der Aktivierung der kompensierenden Mechanismen spielt vermutlich weniger die Ursache des Energiemangels (Gewichtsimplantation) als der Mangel selbst eine Rolle.

*Fazit.* Die Ergebnisse weisen auf einen partiellen Körpermasseverlust bei den HI-Männchen infolge der künstlichen Erhöhung der Körpermasse hin, was die Fähigkeit zur Wahrnehmung der Körpermasse *per se* vermuten lässt. Dagegen wurde die biologische Körpermasse der HI-Weibchen langfristig nicht durch die zusätzliche Masse verändert. Im Vergleich zu den Männchen wiesen die Weibchen zumindest mittelfristig eine Erhöhung der kumulativen Energieaufnahme auf, was möglicherweise zur Erhaltung der biologischen Körpermasse beigetragen hat. Der Energieumsatz hatte vermutlich keinen Einfluss auf die geschlechtsspezifische Regulation der biologischen Körpermasse infolge der Gewichtsimplantation. Da langfristige Veränderungen in der Körpermasse und Körperzusammensetzung schon nach 14 Tagen infolge der Implantation manifest waren, scheinen dafür akut eingetretene, geschlechtsspezifische Mechanismen verantwortlich zu sein, die zu einer effizienteren Regenerierung der biologischen Körpermasse bei den HI-Weibchen im Vergleich zu den HI-Männchen führten.

## **4.2 Hormonelle Änderungen infolge der Gewichtsimplantation**

### **4.2.1 Änderungen im Plasma- und mRNA-Spiegel von Leptin**

Die basale Leptinkonzentration war bei Männchen und Weibchen auch bei Normalisierung mit der Fettmasse gleich (vergl. Tab. 3-1 und Abb. 3-13). Für Frauen wurde dagegen eine höhere Leptinkonzentration pro kg Fettmasse im Vergleich zu Männern nachgewiesen (Rosenbaum *et al.*, 1997; Saad *et al.*, 1997; Havel, 2000; Ahima und Flier, 2000; Rosenbaum *et al.*, 2001). Bei Nagern ist dieser Zusammenhang jedoch umstritten (Woods *et al.*, 2003; Havel, 2000; Landt *et al.*, 1998) und möglicherweise abhängig vom verwendeten

Tierstamm. Langfristig korreliert die Leptinkonzentration im Serum mit der Körperfettmasse (Havel, 2000, Ahima und Flier, 2000). Eine signifikante Korrelation zwischen Serum-Leptin und absoluter sowie relativer Fettmasse war bei Einbeziehung aller untersuchten FVB-Mäuse im KZV nachweisbar und für Männchen und Weibchen gleich.

Die Leptinkonzentration verminderte sich nach Implantation des schweren Gewichtes bei den Männchen eher implantatabhängig, bei den Weibchen eher implantatunabhängig. In Übereinstimmung mit einer Korrelation zur Fettmasse zeigten HI-Männchen am dritten und am 14. Tag nach der Implantation bei signifikant verminderter Fettmasse auch verminderte Leptinspiegel und eine verminderte Leptin-Genexpression im Vergleich zu SO-Männchen und Kontroll-Männchen (Tag 0) (vergl. Abb. 3-16 und 3-17). Im Gegensatz dazu reduzierten SO- und HI-Weibchen die Serumkonzentration und Genexpression (v. a. im OAT) von Leptin in gleichem Maße aber bei unveränderter Fettmasse nach drei und 14 Tagen im Vergleich zu Kontroll-Weibchen (Tag 0). Dieser Effekt hatte jedoch keinen Einfluss auf die Korrelation zur Fettmasse, eine Beobachtung, die auch in einer Humanstudie während einer Körpermassereduktion berichtet wurde (Rosenbaum *et al.*, 1997).

Langfristig wird die Leptinkonzentration und –Genexpression vor allem durch die Größe der Fettspeicher bestimmt und entsprechend der Fettzellgröße reguliert (Zhang *et al.*, 2002). Kurzfristig wird Leptin unabhängig von Änderungen in der Fettmasse durch Fasten bzw. Nahrungsrestriktion vermindert (Ahima, 2000). Bei Nagern kommt es dabei zu einem schnellen Abfall der Leptin-mRNA um 50-80% und der Plasmakonzentration um 50% (Ahima, 2000). Es wird angenommen, dass Leptin die metabolische Anpassung an den Nahrungsentzug vermittelt (Ahima und Flier, 2000). Dabei spielen wahrscheinlich sinkende Insulinspiegel in Verbindung mit einem verminderten Glukosestoffwechsel in der Fettzelle eine Rolle (Ahima, 2000; Havel, 2000). Die stark gesunkene Energieaufnahme am ersten Tag nach der Implantation besonders bei den Mäusen mit leichtem und schweren Gewicht (vergl. Abb. 3-6B) könnte demnach zu einer reduzierten Verfügbarkeit von Glukose in den Fettzellen und damit zu einer verminderten Leptinsekretion geführt haben. Die stärkere Reduktion der Leptinkonzentration bei den HI-Männchen am dritten Tag nach der Implantation im Vergleich zu SO-Männchen lässt jedoch vermuten, dass das schwere Implantat auch unabhängig von der verminderten Energieaufnahme einen Einfluss auf die Leptinkonzentration hatte. Da SO-, LO- und HI-Weibchen die Serumkonzentration an Leptin akut ähnlich stark reduzierten, war der Einfluss der verminderten Energieaufnahme bei ihnen offensichtlich stärker als der Einfluss des Implantats.

Weibchen zeigten nach drei, zehn und 14 Tagen eine signifikant höhere kumulative Energieaufnahme (vergl. Abb. 3-7) aber eine stärkere Reduktion des Serum-Leptins im Vergleich zu den Männchen (vergl. Abb. 3-13). Offensichtlich tritt eine Reduktion der

Genexpression und der Serumkonzentration von Leptin bei Weibchen bei höherer Energieaufnahme ein als bei den Männchen. Die Reduktion der Leptin-Genexpression und -Serumkonzentration provoziert bei den Weibchen möglicherweise Mechanismen zum Schutz vor dem Verlust an Körpermasse, die nicht mit der Regenerierung der Fettmasse wieder außer Kraft gesetzt werden, sondern längerfristig wirksam sind. Die bei allen Weibchen beobachtete rasche Regenerierung der Fett- und Körpermasse könnte zudem auf eine höhere Sensitivität der Weibchen auf veränderte Leptinspiegel hindeuten. In diesem Zusammenhang ist eine höhere Sensitivität weiblicher Ratten für die katabolische Aktivität von zentral appliziertem Leptin im Vergleich zu männlichen Ratten berichtet worden (Clegg *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003). Leptin wird jedoch als Signal aufgefasst, das eher Energieverlusten vorbeugt, als einem Energieüberschuss entgegenwirkt (Rosenbaum *et al.*, 1997; Wade, 2004; Flier, 2004). In diesem Kontext ist eine erhöhte Sensitivität für niedrigere zentrale Leptinspiegel bei Weibchen durchaus denkbar. Da es im Prinzip keine zentrale Leptinproduktion gibt und der Transport peripheren Leptins über die Blut-Hirn-Schranke über einen sättigbaren Mechanismus erfolgt, sollte die im Fastenzustand vorherrschende zentrale Leptinkonzentration die periphere Blutkonzentration gut widerspiegeln. Entsprechend Abb. 1-3 werden durch niedrige Leptinspiegel anabolische Mechanismen im Hypothalamus aktiviert, die zu einer Stimulation der Nahrungsaufnahme und damit zur Regeneration der BKM führen können.

Auch nach der Wiederherstellung der ursprünglichen Fettmasse nach 14 Tagen und nach normalisierter Nahrungsaufnahme war die Leptinkonzentration bei den Weibchen niedriger im Vergleich zu den Männchen. Das deutet auf die Wirkung weiterer Faktoren hin, die möglicherweise durch eine Leptinreduktion beeinflusst werden und einer Erhöhung der Leptinsekretion entgegen wirken oder unabhängig von Leptin durch eine akute Verminderung der Nahrungsaufnahme oder veränderte Substratoxidation im Energiestoffwechsel induziert werden. Bei Ratten konnte eine leptinunabhängige Regenerierung der Körpermasse nach einer 14tägigen Fastenperiode nachgewiesen werden (Velkoska *et al.*, 2003). Eine kontinuierliche Applikation physiologischer Leptinkonzentrationen vom Ende der Fastenperiode beginnend für die folgenden 12 Tage unbegrenzter Nahrungsaufnahme führte nicht zu einer veränderten Körpermassezunahme im Vergleich zu *saline*-applizierten Ratten. Daher wurde vermutet, dass die momentane Leptinkonzentration im Plasma keine Schlüsselfunktion bei der Körpermassezunahme nach einer Gewichtsreduktion hat. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Untersuchung der Leptinkonzentration von normal- und übergewichtigen Männern und Frauen unter kontrollierten Änderungen in der Körpermasse (Rosenbaum *et al.*, 1997). In der Erhaltungsphase der reduzierten Körpermasse (-10%) zeigten Frauen eine niedrigere Leptinkonzentration im Vergleich zum Ausgangsgewicht, während es bei den Männern

keinen Unterschied gab. Im Gegensatz dazu hatten Männer bei einer erhöhten Körpermasse (+10%) erhöhte Leptinspiegel im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Änderungen in der Leptinkonzentration korrelierten während der Körpermasseänderungen nicht mit dem Energieumsatz, und trotz der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Leptinkonzentration bei verminderter und erhöhter Körpermasse waren auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Energieumsatz nachweisbar. Daher wurde vermutet, dass Leptin nicht das primäre Signal für Änderungen in der Energiebilanz darstellt (Rosenbaum *et al.*, 1997).

Bei der geschlechtsspezifischen Regenerierung der Körpermasse infolge der Gewichtsimplantation spielen möglicherweise veränderte Konzentrationen an Geschlechtshormonen eine Rolle. Durch 48stündiges Fasten in Mäusen kam es aufgrund gesunkener Leptinspiegel zu einer signifikanten Reduktion der Testosteron- und Östradiolkonzentration (Ahima, 2000). Eine Verabreichung von Leptin während des Fastens führte zu einer partiellen Regenerierung der ursprünglichen Spiegel an Testosteron und Östradiol. Die Reduktion der Geschlechtshormone durch gesunkene Leptinspiegel unter Fastenbedingungen entspricht der Rolle Leptins als Regulator der Reproduktionsfähigkeit nur unter Bedingungen ausreichender Energiereserven bzw. ausreichender Verfügbarkeit von Nahrung (Chan *et al.*, 2003).

Verminderte oder fehlende Östrogenspiegel (z. B. nach Ovariectomie) führen zu einer erhöhten Energieaufnahme bei Nagern (Mystkowski und Schwartz, 2000; Ainslie *et al.*, 2001), niedrige Testosteronspiegel haben kurzfristig keinen Einfluss und bewirken langfristig eine niedrigere Energieaufnahme (Mystkowski und Schwartz, 2000). Veränderte Konzentrationen der Geschlechtshormone infolge der Gewichtsimplantation könnten Änderungen in der Energiebilanz mit verursacht haben. Ihre Konzentration wurde jedoch in der durchgeführten Studie nicht gemessen.

*Fazit.* Die Leptinkonzentration wurde infolge der Gewichtsimplantation geschlechtsspezifisch beeinflusst. Die akute Verminderung der Leptinkonzentration beruhte wahrscheinlich auf der akut reduzierten Energieaufnahme nach der Implantation. Weibchen hatten niedrigere Spiegel an Serum-Leptin als Männchen. HI-Männchen zeigten eine signifikante Leptinreduktion im Vergleich zu SO-Männchen nach drei und tendenziell nach 14 Tagen, die mit einer Reduktion in der Fettmasse übereinstimmte. Weibchen zeigten hingegen eine implantatunabhängige Reduktion des Serumleptins, die aber im Vergleich zu den Männchen einer deutlich stärkeren Fettmasseregenerierung in allen Gruppen gegenüberstand. Die stärker verminderten Leptinspiegel könnten im Vergleich zu den Männchen zu einer stärkeren anabolischen Reaktion (erhöhte Effizienz der

Energieverwertung) bei den Weibchen geführt haben.

#### 4.2.2 Änderungen im Corticosteronspiegel

Die Corticosteronausschüttung wird über die HPA-Achse reguliert und unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit hohen Konzentrationen am Beginn der Wachphase (bei nachtaktiven Nagern vor Beginn der Dunkelphase) und mit niedrigen Konzentrationen am Beginn der Ruhephase (bei nachtaktiven Nagern vor Beginn der Lichtphase) (Wuttke, 2000; Reinboth, 1980). Die Zeitspanne, in der die Mäuse in der vorliegenden Arbeit getötet wurden (morgens zwischen 8 und 12 Uhr), entsprach damit einem Intervall niedrigerer Corticosteronspiegel. Die basalen Corticosteronspiegel waren bei den Weibchen etwa doppelt so hoch wie bei den Männchen, was auch in anderen Studien an FVB-Mäusen gezeigt wurde (Hamann *et al.*, 1995; Hamann *et al.*, 1996).

Die Corticosteronkonzentration wurde im KZV nicht durch die Masse des Implantats beeinflusst, unterlag aber geschlechtsspezifischen Änderungen. Weibchen zeigten leicht erhöhte Corticosteronspiegel (um 10 - 40%) infolge der Gewichtserhöhung. HI- und LO-Männchen zeigten dagegen nach drei und zehn Tagen eher eine leichte Reduktion von ca. 10% im Vergleich zu SO-Männchen. Am 14. Tag nach der Implantation wiesen SO- und LO-Männchen leicht erhöhte Corticosteronspiegel um ca. 15% auf.

Corticosteron dient üblicherweise als Stressmarker, dessen Konzentration unter psychologischem und körperlichem Stress erhöht ist (Li *et al.*, 2000; Girard und Garland, 2002). In der Stressantwort agiert es unter anderem als Gegenspieler des Insulins, indem es hauptsächlich die Glukosefreisetzung aktiviert (v. a. zur Energiebereitstellung für glukoseabhängige Gewebe wie das Gehirn) sowie auf die Gluconeogenese in der Leber und auf die Nahrungsaufnahme einwirkt. Bei männlichen Mäusen wurde nach 24stündigem Nahrungsentzug ein Corticosteronanstieg auf fast 400% beobachtet (Ahima, 2000). Es spielt daher in der Regulation der Körpermasse eine modulierende Rolle (Solano und Jacobson, 1999, Jeanrenaud und Rohner-Jeanrenaud, 2000).

Die fehlende starke Erhöhung der Corticosteronspiegel in Folge der Implantation lassen vermuten, dass die Implantation *per se* zu keiner ausgeprägten Stressantwort führte. Deshalb scheint bei den Weibchen die leichte und vom Implantat unabhängige Erhöhung des Plasma-Corticosterons im KZV eher Ausdruck der akut verminderten Nahrungsaufnahme und damit verbundener Mechanismen zur effizienteren Energiebereitstellung zu sein. Die leichte Erhöhung der Corticosteronspiegel bei den Weibchen steht möglicherweise im Zusammenhang mit einer raschen Wiederaufnahme von

Nahrung und mit der Regenerierung der Körpermasse. Die Sensitivität für Corticosteron bzw. für Faktoren, die an der Corticosteronregulation beteiligt sind, könnte bei Männchen und Weibchen unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Darüber ist bisher jedoch wenig bekannt. Für den Einfluss von CRH wurde berichtet, dass eine tägliche intracerebroventrikuläre Applikation von CRH in Ratten über 14 Tage zu einer verminderten Energieaufnahme und reduzierter Körpermasse bei Männchen, aber nicht bei Weibchen führte (Rivest *et al.*, 1989). Die CRH-Sekretion wird unter physiologischen Bedingungen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch Corticosteron gehemmt. Die im Vergleich zu den Männchen relativ stärkere Erhöhung der Corticosteronkonzentration bei den weiblichen Mäusen am dritten, zehnten und 14. Tag nach der Implantation könnte zu einer zumindest partiellen Hemmung der CRH-Sekretion und damit zu einer Verminderung der anorektischen Wirkung des CRH geführt haben. Diese Vermutung wird durch die erhöhte kumulative Energieaufnahme nach drei, zehn und 14 Tagen im Vergleich zu den Männchen unterstützt.

Aber auch die verminderten Leptinspiegel infolge der Implantation könnten die Corticosteronspiegel beeinflusst haben. Leptin wirkt unter physiologischen Bedingungen hemmend auf die HPA-Achse sowohl auf hypothalamischer Ebene (Hemmung der Produktion von CRH-mRNA) als auch auf adrener Ebene (Hemmung der Corticosteron-Produktion) (Leal-Cerro *et al.*, 2001). Pathologisch und durchs Fasten bedingte niedrige Leptinspiegel sind daher mit erhöhten Glucocorticoidspiegeln verbunden (Ahima, 2000). Versuche an adrenaletomierten männlichen Mäusen und Ratten unter simultaner Behandlung mit Leptin und unterschiedlichen Corticosteronkonzentrationen zeigten, dass Corticosteron die hemmende Wirkung von Leptin auf die Energieaufnahme und die Körper- und Fettmasse aufheben konnte (Solano und Jacobson, 1999, Jeanrenaud und Rohner-Jeanrenaud, 2000). Dieser Effekt trat trotz leptininduzierter Reduktion im Plasma-Insulin und Verminderung der hypothalamischen NPY-Genexpression auf. Daher wurde vermutet, dass Corticosteron unter Normalbedingungen einen stärkeren Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat als Leptin (Solano und Jacobson, 1999). Der erhöhte Corticosteronspiegel bei den Weibchen könnte daher eine Folge der verminderten Hemmung der Corticosteronproduktion aufgrund niedrigerer Leptinspiegel im Vergleich zu den Männchen sein. Die verminderten Leptinspiegel bei den HI-Männchen führten aber offensichtlich nicht zu einer Erhöhung des Corticosterons. Möglicherweise spielt dabei die geschlechtsspezifische Sensitivität für das Leptinsignal eine Rolle (Clegg *et al.*, 2003).

Die lipostatische Theorie der Körpermasse nach Hervey nimmt an, dass eine niedrige Fettmasse mit einem höheren Corticosteronspiegel assoziiert ist, der über einen Rückkopplungsmechanismus zur Wiederherstellung der ursprünglichen Fettmasse führt (Hervey, 1969). Diese Vermutung impliziert, dass der Corticosteronspiegel negativ mit der



Fettmasse korreliert. Diese Korrelation konnte jedoch in der durchgeführten Studie nicht bestätigt werden ( $r_{\text{männl.}} = 0,066$ ;  $r_{\text{weibl.}} = 0,192$ , jeweils  $p > 0,05$ , Daten nicht gezeigt). Daher war der Einfluss von Corticosteron auf die Körpermasse unabhängig von der Fettmasse und wurde vermutlich eher durch Änderungen in der Nahrungsaufnahme modifiziert.

*Fazit.* Änderungen in der Corticosteronkonzentration wurden nur durch das Geschlecht, nicht aber durch die implantierte Masse beeinflusst. Die erhöhten Corticosteronspiegel nach drei, zehn und vierzehn Tagen könnten zu einer effizienteren Regenerierung der biologischen Körpermasse bei den Weibchen beigetragen haben.

### **4.3 Änderungen im mRNA-Spiegel von UCP1 und UCP3 infolge der Gewichtsimplantation**

Die Entkopplerproteine (UCP) sind Proteine der inneren Mitochondrienmembran, deren Aktivität zur Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Produktion führt. UCP1 wird fast ausschließlich im braunen Fettgewebe (BAT) (Klaus, 2001), UCP3 vorwiegend im BAT und im Skelettmuskel exprimiert (Schrauwen *et al.*, 1999). Durch seine entkoppelnde Aktivität bewirkt UCP1 im BAT die Abgabe der dabei frei werdenden Energie als Wärme (Thermogenese), was zu messbaren Änderungen im Energiestoffwechsel führt. Die entkoppelnde Funktion von UCP3 im Skelettmuskel liegt vermutlich in der Kontrolle der ATP-Synthese und des mit der Atmungskette verbundenen Protonengradienten, wodurch die Regulation des Substratstoffwechsels beeinflusst wird (Ricquier und Bouillaud, 2000). Um den Anteil einer veränderten UCP1- bzw. UCP3-Genexpression an Änderungen im Energie- und Substratstoffwechsel infolge der Gewichtsimplantation abzuschätzen, wurde die mRNA-Menge von UCP1 und UCP3 im braunen Fettgewebe und von UCP3 im Skelettmuskel untersucht.

Die Genexpression von UCP1 und UCP3 im BAT war vor der Implantation bei Männchen und Weibchen gleich (vergl. Tab. 3-7). Die basale UCP3-Genexpression im Skelettmuskel war jedoch bei den weiblichen Mäusen höher als bei den Männchen. Die geschlechtsspezifische Expression der Entkopplerproteine ist bisher wenig untersucht worden, und vorhandene Daten stützen sich vor allem auf Untersuchungen an Ratten. An männlichen und weiblichen Wistar-Ratten wurden unter Standardbedingungen ebenfalls gleiche UCP1-mRNA-Spiegel im BAT (Rodriguez *et al.*, 2001) und eine erhöhte UCP3-Genexpression im Skelettmuskel der Weibchen beobachtet (Rodriguez *et al.*, 2003). Die UCP3-Genexpression im BAT war bei weiblichen Wistar-Ratten im Vergleich zu den Männchen jedoch vermindert (Rodriguez *et al.*, 2001).

#### 4.3.1 Einfluss der Gewichtsimplantation auf die UCP1-Genexpression

Nach Implantation der schweren Gewichte war die UCP1-Genexpression im BAT bei den Männchen akut (Tag 3) im Vergleich zum Tag 0 erhöht, bei den Weibchen jedoch bis zum Tag 14 gegenüber Tag 0 reduziert. UCP1 spielt im BAT bei Nagern die wichtigste Rolle bei der Regulation der adaptiven Thermogenese. Die Aktivität der Thermogenese im BAT wird primär durch das sympathische Nervensystem (SNS) und seinen Neurotransmitter Noradrenalin stimuliert (Klaus, 2001). Die Stimulierung der UCP1-Aktivität durch das SNS erfolgt durch Wechselwirkung von Noradrenalin am  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptor, wodurch die Lipolyse in der braunen Fettzelle aktiviert wird und Fettsäuren freigesetzt werden. Freie Fettsäuren aktivieren die UCP1-Aktivität und führen zu erhöhter Thermogenese (Klaus, 2001). Da UCP1 hauptsächlich der Regulation durch das SNS unterliegt, weist die akut erhöhte UCP1-Genexpression bei den HI-Männchen auf eine Aktivierung des SNS hin. Die verminderte BAT-Masse der HI-Männchen im Vergleich zu SO- und LO-Männchen am dritten Tag nach der Implantation (Daten nicht gezeigt) wurde daher wahrscheinlich durch eine mit der erhöhten SNS-Aktivität assoziierte Lipolyse im BAT herbeigeführt. In einer Untersuchung an BAT-Primärzellkulturen von männlichen NMRI-Mäusen wurde gezeigt, dass Testosteron die Noradrenalin-stimulierte UCP1-Genexpression hemmte (Rodriguez *et al.*, 2002). Die induzierte UCP1-Genexpression bei den HI-Männchen am Tag 3 nach der Implantation könnte möglicherweise durch einen verminderten Testosteronspiegel hervorgerufen worden sein (möglicherweise verursacht durch verminderte Leptinspiegel), der zur Enthemmung der sympathischen Aktivierung des BAT führte.

Die UCP1-Genexpression ist normalerweise bei hochkalorischer Nahrung erhöht (Klaus, 2001) und unter Fastenbedingungen vermindert (Ricquier und Bouillaud, 2000; Dulloo und Samec, 2001). Die verminderte UCP1-Genexpression im BAT bei den Weibchen mit schweren Implantaten gegenüber unbehandelten Weibchen weist daher auf eine verminderte Aktivität des SNS hin, die möglicherweise durch die akut verminderte Nahrungsaufnahme infolge der Implantation herbeigeführt wurde. Die damit im Zusammenhang stehende Verminderung der Thermogenese korrespondiert mit einem unter Fastenbedingungen erwarteten Spareffekt zum Schutz der endogenen Energiespeicher vor zu raschem Verbrauch. So ist eine verminderte Aktivität des SNS auch beim Menschen mit einem verminderten Energieumsatz und einer erhöhten Fettmasse in Verbindung gebracht worden (Webber und Macdonald, 2000). Allerdings kann die noch immer nachweisbare Reduktion der UCP1-Genexpression am Tag 14 nach der Implantation nicht mit einem Nahrungsentzug erklärt werden, da die Energieaufnahme der HI-Weibchen schon ab ca. Tag 5-6 nach der Implantation wieder normalisiert war. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen unbekanntem Einfluss der zusätzlich implantierten Masse, der zur effizienteren

Energieverwertung bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen beiträgt, um die Energieressourcen zu regenerieren bzw. zu erhalten. Eine schon ab dem zehnten Tag wiederhergestellte Körper- und Fettmasse entspricht vermutlich dieser effektiven Regulation der Energiereserven bei den Weibchen.

Der geschlechtsspezifische Unterschied in der UCP1-Genexpression infolge der Implantation schwerer Gewichte ist anhand der vorliegenden Daten und der verfügbaren Literatur nicht eindeutig zu erklären. Der Einfluss des Geschlechts auf die Aktivität des SNS und von UCP1 ist bisher nur wenig untersucht worden. Da die UCP1-Expression auch hormonell (Triiodthyronin, Leptin) reguliert wird (Ricquier und Bouillaud, 2000), könnte die geschlechtsspezifische Regulation oder Sensitivität dieser Hormone ebenfalls zu den beobachteten Änderungen in der UCP1-Genexpression geführt haben.

#### 4.3.2 Einfluss der Gewichtsimplantation auf die UCP3-Genexpression

Die Genexpression von UCP3 im BAT unterliegt generell den gleichen Regulationsmechanismen wie UCP1 (Ricquier und Bouillaud, 2000). Sie wurde aber weder durch die Gewichtsimplantation noch durch das Geschlecht beeinflusst. Hingegen zeigte die UCP3-Genexpression im Skelettmuskel v. a. geschlechtsspezifische Unterschiede, die implantierte Masse war von marginalem Einfluss. Die Expression war bei den HI Männchen nach drei und vierzehn Tagen sowie bei den SO-Männchen nach 14 Tagen im Vergleich zum Tag 0 erhöht, bei den Weibchen unabhängig vom Implantat am dritten Tag nach der Operation im Vergleich zum Tag 0 reduziert.

Die UCP3-Genexpression im Skelettmuskel ist im Gegensatz zum BAT unter Nahrungsmangel induziert (Dulloo und Samec, 2001; Schrauwen und Hesselink, 2002; Rodriguez *et al.*, 2003). Unter physiologischen Bedingungen ist eine erhöhte Expression von UCP3 jedoch nicht mit einer erhöhten entkoppelnden Aktivität bzw. erhöhter Thermogenese verbunden (Ricquier und Bouillaud, 2000; Dulloo und Samec, 2001). Es wird angenommen, dass die Bedeutung von UCP3 eher in der Regulation des intramuskulären Stoffwechsels von Glukose und Fettsäuren durch Kontrolle des mit der Entkopplung verbundenen Protonengradienten und der ATP-Synthese liegt (Ricquier und Bouillaud, 2000; Dulloo und Samec, 2001; Schrauwen und Hesselink, 2002). Der Einfluss einer erhöhten UCP3-Genexpression auf den Glukose- und Fettsäurestoffwechsel steht außerdem im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression des Glukosetransporters GLUT4 im Skelettmuskel und mit einem vermehrten Transport von Fettsäure-Anionen aus dem Mitochondrium in das Cytosol, um eine Fettakkumulation in der Mitochondrienmatrix bei

vermehrtem Fettsäureangebot zu verhindern (Schrauwen und Hesselink, 2002). Entsprechend der Bedeutung von UCP3 für den Substratstoffwechsel der Muskelzelle ist die Expression in Situationen induziert, die mit einer erhöhten Freisetzung von Fettsäuren assoziiert sind (z. B. bei Fasten, unter Hochfettdiät oder unter akuter körperlicher Belastung) (Schrauwen und Hesselink, 2002). Die erhöhten mRNA-Spiegel von UCP3 bei den HI-Männchen am dritten Tag stehen daher in Übereinstimmung mit einer bei Kohlenhydratmangel vermehrten Energiebereitstellung aus Lipiden, die vermutlich durch den akuten Nahrungsentzug infolge des Operationsstress hervorgerufen wurde. Die stark erhöhte Expression nach 14 Tagen war jedoch unerwartet. Zwar wiesen HI-Männchen zu diesem Zeitpunkt eine signifikant reduzierte Fettmasse auf, die Nahrungsaufnahme war zu diesem Zeitpunkt aber wieder normal und kann nicht als Ursache herangezogen werden.

Eine geschlechtsspezifische Regulation von UCP3 im Skelettmuskel ist auch in anderen Studien gezeigt worden. Männliche Ratten, die für 14 Wochen mit einer Cafeteria-Diät überernährt wurden und danach Standardfutter erhielten, zeigten im Skelettmuskel ebenfalls eine Induktion der UCP3-Genexpression, die Weibchen zeigten dagegen eine unveränderte Genexpression (Rodriguez *et al.*, 2003). Auch nach einem 24stündigen Fasten war die UCP3-Genexpression bei den Männchen stärker induziert als bei den Weibchen. Die Autoren vermuteten, dass die mangelnde Induzierbarkeit der UCP3-Genexpression bei den Weibchen zu einer verstärkten Fetteinlagerung bei unbegrenztem Nahrungszugang führte (Rodriguez *et al.*, 2003).

Ein Absinken der UCP3-Genexpression unter das Basalniveau wurde bei Wiederaufnahme fettarmer Nahrung nach einer Fastensituation berichtet (Dulloo und Samec, 2001). Dieser Mechanismus dient vermutlich der Begrenzung der Lipolyse zur Energiebereitstellung und ermöglicht eine effiziente Fetteinlagerung nach der durchs Fasten hervorgerufenen Fettmasseabnahme (Dulloo und Samec, 2001). Die verminderte UCP3-Genexpression im Skelettmuskel der Weibchen im Zusammenhang mit einer normalen Fettmasse am dritten Tag nach der Implantation stimmt mit einer effizienten Regenerierung der Fettspeicher überein. Eine akut reduzierte Aktivität von UCP3 könnte demnach zur effizienten Regenerierung der Fett- und Körpermasse bei den Weibchen beigetragen haben.

Diese Vermutung wird durch Studien am Menschen und an der Ratte unterstützt. Adipöse Frauen, die resistent gegenüber einem langfristig kontrollierten Diätprogramm waren, zeigten im Skelettmuskel eine niedrigere UCP3-Genexpression und eine verminderte Entkopplungsaktivität in den Mitochondrien im Vergleich zu Frauen, die unter den gleichen Bedingungen 43% an Masse verloren (Harper *et al.*, 2002). Männliche Ratten, die resistent für eine Körpermasseszunahme unter moderater Fettdiät (31% Fett) waren, zeigten nach zwei Wochen unter Fettdiät eine um das Dreifache höhere UCP3-Genexpression im

Skelettmuskel im Vergleich zu Ratten, die empfänglich für die Fettdiät waren. Dieser Effekt trat trotz vergleichbarer Energieaufnahme auf, führte aber nur bei den Fettdiät-empfindlichen Ratten zu einer Fettmassezunahme (Weigle und Levin, 2000). Diese Studien zeigen, dass eine verminderte UCP3-Aktivität im Skelettmuskel vermutlich mit einer verminderten Lipidoxidation und mit einer erhöhten Fetteinlagerung verbunden ist.

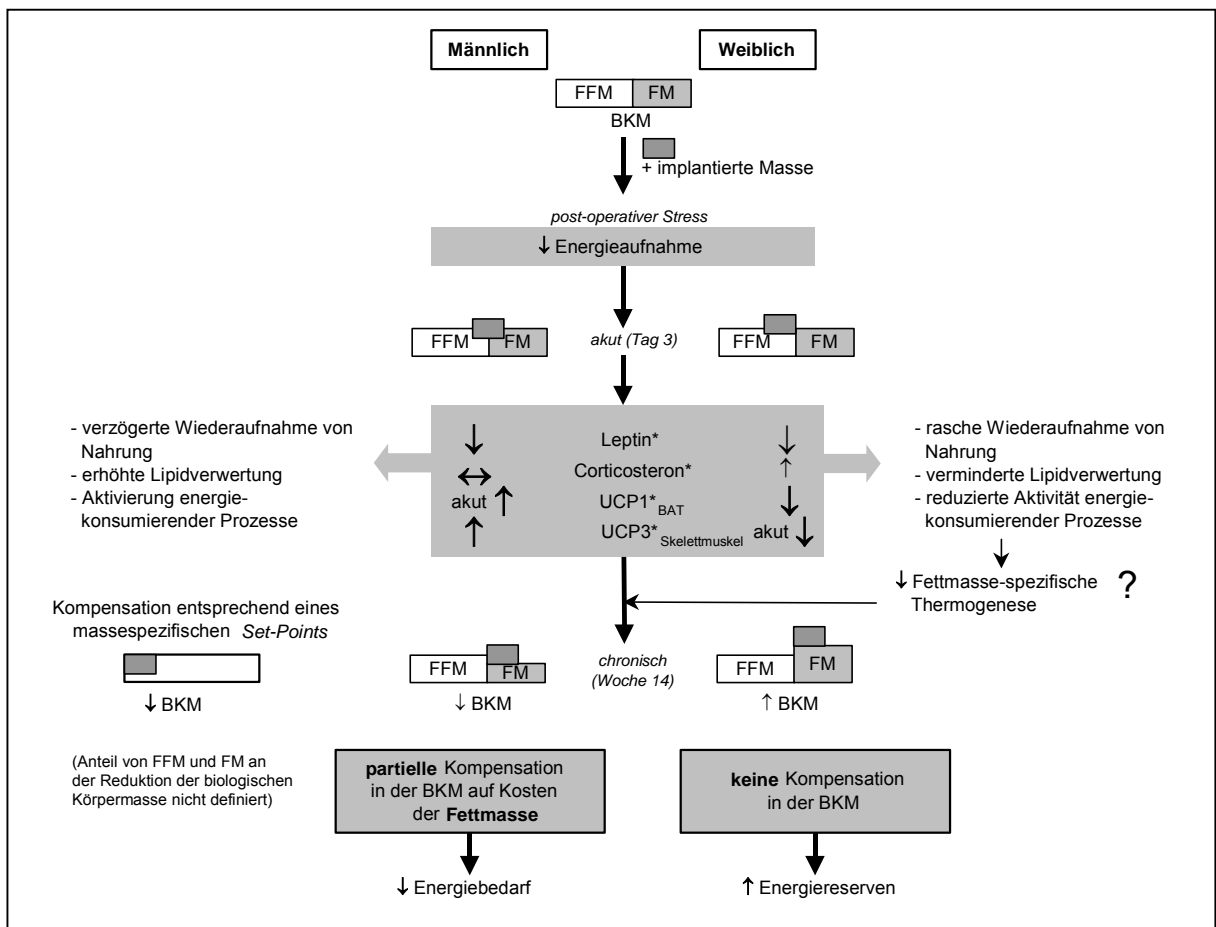
*Fazit.* Änderungen in der Genexpression von UCP1 im BAT waren abhängig von der implantierten Masse, der Effekt auf UCP3 im Skelettmuskel jedoch implantatunabhängig (vergl. Abb. 3-19). Beide Parameter wurden ausserdem geschlechtsspezifisch reguliert. Die bei den Weibchen reduzierte Genexpression von UCP1 im BAT und von UCP3 im Skelettmuskel weist auf eine verminderte Thermogenese und eine verminderte Energiebereitstellung aus Lipiden zugunsten einer effizienten Regenerierung der Körper- und Fettmasse hin. Bei den Männchen weist die akut erhöhte Genexpression von UCP1 im BAT und von UCP3 im Sklettmuskel auf eine erhöhte Thermogenese und eine vermehrte Energiebereitstellung aus Lipiden hin, die offensichtlich akut zur Abnahme der Fettmasse beitragen. Die Rolle der verminderten Nahrungsaufnahme bei akuten Änderungen in der UCP1- und UCP3-Genexpression am dritten Tag nach der Implantation kann mit dem genutzten Versuchsdesign nicht eindeutig vom Effekt der implantierten Masse getrennt werden. Da die Nahrungsaufnahme aber nach 14 Tagen wieder normalisiert war, ist zu vermuten, dass die zu diesem Zeitpunkt noch immer reduzierte UCP1-Genexpression im BAT der HI-Weibchen auf einen Einfluss der zusätzlichen Masse zurückzuführen ist.

#### **4.4 Änderungen in der Körpermasse infolge der Gewichtsimplantation erfolgten geschlechtsspezifisch**

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Regulation der biologischen Körpermasse infolge der Implantation von Gewichten geschlechtsspezifisch erfolgte. Männchen mit schweren Implantaten kompensierten die künstlich erhöhte Körpermasse durch eine Reduktion der Fettmasse im Vergleich zu SO-Männchen. Dieser Unterschied war bereits nach 14 Tagen ausgeprägt und blieb tendenziell auch bis zur 14. Woche nach der Gewichtsimplantation persistent. Die kompensatorische Verminderung der Körpermasse erfolgte allerdings nur partiell und entsprach in etwa der Hälfte der implantierten Masse. Weibchen kompensierten die Implantation des schweren Gewichtes jedoch nicht mit einer Reduktion der biologischen Körpermasse und zeigten nach Überwindung des postoperativen Stresses eine unveränderte Körperzusammensetzung im Vergleich zu SO- und LO-Weibchen. Eine Regulation der Körpermasse entsprechend eines massespezifischen *Set-points* konnte daher eher bei den Männchen als bei den Weibchen

und nur partiell gezeigt werden.

Von der kompensatorischen Reduktion der BKM war nur die Fettmasse betroffen. Die fettfreie Masse wurde bei allen Mäusen nach Überwindung des postoperativen Stresses auf das Ausgangsniveau regeneriert und entsprach auch nach 14 Wochen der ursprünglichen fettfreien Masse. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die fettfreie Masse in beiden Geschlechtern einer strikten Kontrolle unterliegt und Änderungen in der fettfreien Masse durch effiziente Regulationsmechanismen schnell wieder kompensiert werden. Die Fettmasse war hingegen variabler und insbesondere bei den Weibchen unabhängig von der implantierten Masse sowohl kurzfristig (ab Tag zehn) als auch langfristig (nach 14 Wochen) stärker erhöht als bei den Männchen. Die Regenerierung der fettfreien Masse bei gleichzeitiger Erhöhung der Fettmasse wurde auch nach kontrolliertem Fasten und kontrollierter Wiederaufnahme von Nahrung bei Männern während des Minnesota-Experiments beobachtet (Dulloo *et al.*, 1997). Im Vergleich dazu war die Nahrungsrestriktion



**Abb. 4-1:** Mögliche Mechanismen, die zur geschlechtsspezifischen Entwicklung der biologischen Körpermasse und der Körperzusammensetzung infolge der Implantation zusätzlicher Gewichte führten. Zum Vergleich ist die entsprechend einer ponderostatischen Regulation erwartete Verminderung der Körpermasse modellhaft dargestellt. BKM = biologische Körpermasse, FFM = fettfreie Masse, FM = Fettmasse, ↑ deutliche Erhöhung, ↑ leichte Erhöhung, ↓ deutliche Reduktion, ↓ leichte Reduktion, ↔ keine Änderung. \* beobachtete Effekte könnten auch durch die akut verminderte Energieaufnahme mitbewirkt worden sein. Einzelheiten s. Text.

nach der Gewichtsimplantation während des post-operativen Stresses relativ kurz. Jedoch war die Nahrungsaufnahme besonders am ersten Tag bei den Mäusen mit LO- und HI-Implantat drastisch reduziert und könnte zur geschlechtsspezifischen Aktivierung von Regenerationsmechanismen geführt haben.

Dabei könnten die geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Leptin- und Corticosteronspiegeln sowie in der Genexpression von UCP1 im BAT (UCP1<sub>BAT</sub>) und von UCP3 im Skelettmuskel (UCP3<sub>Skelettmuskel</sub>) eine Rolle gespielt haben (s. Abb. 4-1). HI-Männchen zeigten akut infolge der Implantation eine reduzierte Leptinkonzentration, unveränderte Corticosteronspiegel sowie eine induzierte Genexpression von UCP1<sub>BAT</sub> und UCP3<sub>Skelettmuskel</sub>. Eine erhöhte Aktivität dieser Entkopplerproteine ließe auf eine Aktivierung energiekonsumierender Prozesse sowie auf eine verstärkte Lipidverwertung zur Substratbereitstellung hindeuten. Diese Vermutung gemeinsam mit der im Vergleich zu HI-Weibchen verzögerten Nahrungsaufnahme infolge des post-operativen Stresses könnte die reduzierte Fettmasse der HI-Männchen zumindest bis zum Tag 14 nach der Implantation erklären.

Im Vergleich dazu zeigten HI-Weibchen akut infolge der Implantation ebenfalls reduzierte Leptinspiegel, aber leicht erhöhte Corticosteronspiegel und eine verminderte Genexpression von UCP1<sub>BAT</sub> und UCP3<sub>Skelettmuskel</sub>. Diese Veränderungen waren jedoch nicht zwischen den Gruppen sondern nur im Vergleich zur basalen Messung bzw. zu den Männchen unterschiedlich. Das bedeutet, dass die implantierte Masse bei den Weibchen einen geringeren Einfluss auf diese Veränderungen hatte als bei den Männchen. Eine verminderte Aktivität von UCP1<sub>BAT</sub> und UCP3<sub>Skelettmuskel</sub> ließe auf eher energiekonservierende Mechanismen und auf eine gedrosselte Lipidverwertung zur Substratbereitstellung schließen. Möglicherweise hat die leicht erhöhte Corticosteronkonzentration mit zu einer raschen Wiederaufnahme von Nahrung infolge der operationsbedingten, akut reduzierten Nahrungsaufnahme beigetragen. Diese Mechanismen könnten zu der schon nach 10 Tagen infolge der Gewichtsimplantation regenerierten Körpermasse und Körperzusammensetzung bei den HI-Weibchen geführt haben.

Sowohl Leptin als auch Corticosteron und die Entkopplerproteine werden stark durch Fasten bzw. durch restriktive Nahrungsaufnahme reguliert. Die hier diskutierten Änderungen dieser Parameter infolge der Gewichtsimplantation könnten daher allein auf die mit dem post-operativen Stress verbundene Reduktion in der Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden. Jedoch kam es auch zu implantatabhängigen Änderungen in der Leptinkonzentration und der UCP1<sub>BAT</sub>-Genexpression. Inwieweit die genannten Parameter jedoch unabhängig von der akuten Nahrungsrestriktion die langfristige Entwicklung der Körpermasse und der Körperzusammensetzung bei den Mäusen beeinflussten, kann anhand der hier dargestellten

Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden.

Die erwartete Erhöhung des Gesamt-Energieumsatzes infolge eines höheren Energieaufwandes für die Bewegungsaktivität durch das zusätzliche Gewicht konnte nicht nachgewiesen werden. Offensichtlich entsprach die resultierende Körpermasse nach Anhebung der biologischen Körpermasse um 10% einem so geringen Ausmaß, dass die Bewegung keinen erhöhten Energieaufwand erforderte. Die Implantation der Gewichte in die Bauchhöhle entsprach daher durch ihre Integration in den Oberkörper einer ökonomischen Art des Tragens der zusätzlichen Masse (Soule und Goldman, 1969), sodass kein oder nur ein geringfügiger zusätzlicher Energiebedarf entstand.

Das Muster (regenerierte fettfreie Masse, eher erhöhte Fettmasse) und die Effektivität der Regeneration der Körperzusammensetzung der Weibchen infolge der akuten Körpermassereduktion nach Implantation der Gewichte ähnelt Beobachtungen, die mehrfach durch Dulloo und Jacquet im Zusammenhang mit einer verminderten Fettmasse-spezifischen Thermogenese sowohl am Menschen als auch an der Ratte beschrieben wurde (Dulloo und Jacquet, 2001; Dulloo *et al.*, 2002). Die fettmassespezifische Thermogenese unterliegt im Gegensatz zur unspezifischen Thermogenese nicht dem Einfluss des sympathischen Nervensystems, wird unter Nahrungsentzug langsam und entsprechend der Abnahme an Fettmasse reduziert und steigt bei Wiederaufnahme von Nahrung auch nur langsam wieder an. Der so reduzierte Energieverbrauch dient bei beginnender Nahrungsaufnahme nach der Nahrungsrestriktion offensichtlich einzig dem Zweck der effizienten Wiederauffüllung verlorengegangener Fettspeicher und meist über das ursprüngliche Maß hinaus (Dulloo und Jacquet, 2001). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass dieser Mechanismus, der bisher v. a. an männlichen Individuen untersucht wurde, bei Weibchen möglicherweise stärker ausgeprägt ist und sensibler reagiert (auf kürzer andauernde Nahrungsrestriktion). Im Vergleich zu den Untersuchungen von Dulloo und Jacquet (Dulloo und Jacquet, 2001), die nach kontrolliertem zweiwöchigen Fasten an Ratten durchgeführt wurden, war die durch die Gewichtsimplantation hervorgerufene Nahrungsrestriktion kurzfristiger und individuell unterschiedlich stark. Die signifikant stärkere Fettzunahme der Weibchen könnte jedoch auf die Wirksamkeit einer verminderten Fettmasse-spezifischen Thermogenese hindeuten.

Die geschlechtsspezifische Entwicklung der Körpermasse infolge der Gewichtsimplantation zeigte, dass Weibchen ihre biologische Körpermasse bzw. ihre Energiereserven effizienter vor einer Reduktion schützen bzw. nach einer Reduktion regenerieren als Männchen. Offensichtlich führt eine effizientere Energieverwertung bei Frauen und weiblichen Versuchstieren unter Bedingungen, die eine negative Energiebilanz provozieren (Fasten, körperliche Aktivität), zu einer stärkeren Erhaltung der Energiespeicher (Cortright und Koves, 2000; Tate und Holtz, 1998). Aufgrund der Rolle des weiblichen Organismus zum Austragen



und Aufziehen von Nachkommen, die stark Energie konsumierende Prozesse darstellen, ist eine stärkere Kontrolle der Energiereserven sinnvoll (Cortright und Koves, 2000). Es wird vermutet, dass Weibchen während der Evolution aufgrund ihrer Verantwortung für die Nachkommenschaft einem höheren Selektionsdruck ausgesetzt waren und deshalb effiziente Mechanismen zur Sicherung von Energiereserven entwickelt haben (Cortright und Koves, 2000). Ausreichende Energiereserven der Weibchen sind deshalb für das Fortbestehen der Arten von existenzieller Bedeutung. Für die Männchen bedeutet eine verminderte Körpermasse bzw. eine verminderte Fettmasse demnach keinen Selektionsnachteil. Eine geringere Körpermasse könnte sogar von Vorteil sein, da sie zu einem geringeren Energiebedarf führt und in Zeiten verminderten Nahrungszugangs eine höhere Überlebenschance bietet. Diese geschlechtsspezifischen Mechanismen sind auch von medizinischer Bedeutung, da Frauen unter heute herrschender aktivitätsarmer Lebensweise und energiereicher Ernährung häufiger und stärker von Adipositas und deren assoziierten Sekundärerkrankungen betroffen sind als Männer (Kopelman, 2000).

#### 4.5 Schlussfolgerungen

Die hier vorgestellten Untersuchungen dienen der Überprüfung folgender Hypothesen:

1. Eine künstliche Erhöhung der Körpermasse *per se* wird durch Reduktion der biologischen Körpermasse bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmasse kompensiert.
2. Aufgrund der effizienteren Energieverwertung zur Aufrechterhaltung der Körpermasse unter negativer Energiebilanz ist die Regulation der Körpermasse entsprechend eines massespezifischen *Set-points* bei weiblichen Mäusen stärker ausgeprägt als bei männlichen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen unterstützen die Hypothese der Kompensation einer erhöhten Körpermasse durch Reduktion der biologischen Körpermasse bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmasse nur partiell und nur für die Männchen. Das lässt vermuten, dass die Körpermasse *per se* zumindest bei den Männchen durch einen unbekanntem Mechanismus in die Regulation des Körpergewichts integriert ist. Im Gegensatz zur Körpermasse unterlag aber die fettfreie Masse infolge der akuten Körpermasseabnahme nach Implantation einer effizienten Regenerierung und blieb auch langfristig in beiden Geschlechtern unverändert. Ob daher ein *Set-point* eher auf die fettfreie Masse als auf die Körpermasse *per se* bezogen sein könnte, kann hier nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass offensichtlich eine minimal notwendige fettfreie Masse in beiden Geschlechtern verteidigt wird.

Entgegen Hypothese 2 regulierten die Weibchen ihre Körpermasse nicht entsprechend eines massespezifischen *Set-points*, sondern neigten eher dazu, ihre biologische Körpermasse zu erhalten bzw. sogar zu erhöhen. Dieser Mechanismus entspricht der wahrscheinlich evolutionär entstandenen effizienteren Kontrolle der Energiereserven bei weiblichen Individuen. Eine Kompensation der erhöhten Körpermasse in dem hier genutzten Modellsystem müsste unweigerlich mit einem Verlust an Energiereserven einhergehen (inertes Gewichtsimplantat verdrängt energiehaltige Körpersubstanz zur Erhaltung eines massespezifischen *Set-points*). Dieser Effekt konnte eher für die Männchen als für die Weibchen gezeigt werden, sodass Hypothese 2 nicht bestätigt werden konnte. Sie traf nicht für die Weibchen, sondern eher für die Männchen zu.

Diese Überlegungen zeigen, dass die Frage nach der Regulation der Körpermasse entsprechend eines massespezifischen *Set-points* durch die Versuchsergebnisse nicht endgültig beantwortet werden kann. Die Ergebnisse insbesondere für die Weibchen weisen darauf hin, dass ein *Set-point* eher auf die biologische Körpermasse aber nicht auf die Körpermasse *per se* bezogen sein könnte. Bei isolierter Betrachtung der BKM konnte in unserem Versuchsmodell gezeigt werden, dass sie nach einer Reduktion infolge des postoperativen Stresses bei den Weibchen sehr effizient regeneriert wurde, bei den Männchen jedoch weniger effektiv. Natürlicherweise sind Änderungen in der Körpermasse immer auch mit Änderungen in der BKM und damit auch mit Änderungen der dem Körper verfügbaren Energie verbunden. Für den Körper erscheint es daher sinnvoll und notwendig, die Körpermasse entsprechend der benötigten Energiereserven und angepasst an die momentane Lebenssituation zu regulieren. Diese Vorstellung entspricht der Hypothese, dass nicht die Körpermasse *per se*, sondern die Energiehomöostase reguliert wird (Berthoud, 2002; Macdonald, 2003). Die von Macdonald (Macdonald, 2003) postulierten Hauptfunktionen dieser Regulation (Entwicklung und Erhaltung der fettfreien Masse, Aufrechterhaltung einer ausreichenden Versorgung des ZNS mit Kohlenhydraten, Sicherung eines für Reproduktion und Wachstum erforderlichen Ernährungsstatus) können auch auf die hier diskutierten Ergebnisse projiziert werden. Offensichtlich ist die Sicherung eines für Reproduktion und Wachstum erforderlichen Ernährungsstatus bedingt durch evolutionäre Entwicklungsprozesse geschlechtsspezifisch reguliert. Weibchen sind daher programmiert, ihre Energiereserven stärker zu erhalten als Männchen, was den Unterschied in der Regenerierung der Fettmasse nach Implantation der schweren Gewichte erklären könnte.

Die Hypothese der Regulation der Energiehomöostase stellt eine Alternative zum Modell der *Set-point*-Theorie dar, weil damit Schwankungen in der Körpermasse besser erklärbar sind. Die klassische *Set-point*-Theorie muss möglicherweise in diesem Zusammenhang überdacht werden (Wade, 2004).

#### 4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigten erste Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Regulation der Körpermasse bezüglich eines massespezifischen *Set-points*. Zur Unterstützung und Präzisierung dieser Hinweise sind jedoch weitere Versuche nötig.

1. Die geschlechtsspezifische Entwicklung der Körpermasse und der Körperzusammensetzung und die akute geschlechtsspezifische Regulation der Hormonkonzentration (Leptin, Corticosteron) sowie der Genexpression (UCP1<sub>BAT</sub>, UCP3<sub>Skelettmuskel</sub>) lassen einen Einfluss der Geschlechtshormone vermuten. Da Östradiol eher katabolische und Testosteron eher anabolische Wirkungen hat, werden Energieaufnahme und Energieumsatz durch die Geschlechtshormone unterschiedlich beeinflusst (Mystkowski und Schwartz, 2000). Auch Progesteron hat einen deutlich Einfluss auf die Energieaufnahme (stimulierend) (Guyard *et al.*, 1991; Richard, 1986) und könnte im Versuchsmodell der Gewichtsimplantation einen Einfluss auf die rasche Erhöhung der Energieaufnahme im Zuge des post-operativen Stresses haben. Da Östradiol und Progesteron während des Östruszykluses unterschiedliche Konzentrationen annehmen, könnte der Zeitpunkt der Gewichtsimplantation während des Zyklus einen Einfluss auf darauf folgende Änderungen in der Körpermasse haben. Zur Klärung dieser Fragen sollte zuerst ein Profil der Konzentration der Geschlechtshormone vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Implantation erstellt werden. Für die Untersuchung des direkten Einflusses der Geschlechtshormone auf Änderungen in der Körpermasse und Körperzusammensetzung nach der Gewichtsimplantation sollten ovariectomierte (Modell für Östradiolmangel) bzw. kastrierte Versuchstiere (Modell für Testosteronmangel) der gleichen Behandlung unterzogen werden. Unter Annahme z. B. eines entscheidenden Einflusses von Östradiol auf die Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen, ist bei den ovariectomierten HI-Weibchen eine ähnliche Körpermasseentwicklung zu erwarten wie bei intakten HI-Männchen. Zukünftige Versuche mit Gewichtsimplantation sollten außerdem den Östruszyklus der Weibchen berücksichtigen und immer im gleichen Zyklusstadium erfolgen.
2. Im KZV wurden Änderungen in der Leptin- und Corticosteronkonzentration und im mRNA-Spiegel der Entkopplerproteine in der akuten Phase nach der Implantation beobachtet, die einen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Körpermasse haben könnten. Diese Parameter werden aber auch durch Fasten bzw. durch restriktive Nahrungsaufnahme reguliert. Zur Trennung des Einflusses der akuten

Nahrungsrestriktion in der post-operativen Phase vom Einfluss des Gewichtsimplantats auf diese Parameter sollte ein Versuch mit *pair-feeding*-Design durchgeführt werden. Dabei erhalten Mäuse gleichen Alters über zwei Wochen nach der Implantation die im KZV gemessene Energieaufnahme von SO-, LO- und HI-Mäusen. Nach drei, zehn und 14 Tagen werden Leptin- und Corticosteronkonzentration und die Expression der Entkopplerproteine im BAT und Skelettmuskel gemessen.

3. Akute Änderungen in der Körpermasse konnten vor allem auf Änderungen in der Energieaufnahme zurückgeführt werden. Sollte ein akuter Einfluss des Implantats auf die o. g. Hormonkonzentration mit Hilfe des *pair-feeding*-Experiments nachgewiesen werden, könnten z. B. über Leptin und Corticosteron vermittelte zentrale Mechanismen (v. a. im Hypothalamus) daran beteiligt sein (Woods *et al.*, 2003 ; Berthoud, 2002). Entsprechend Abb. 1-3 könnten dabei z. B. Neuropeptide der *first order* und *second order* Neurone beteiligt sein, deren Expression über quantitative PCR (*real time* PCR) oder Northern Blot-Analyse bestimmt werden können.
4. Im Erklärungsansatz zur Interpretation der gezeigten Ergebnisse wurde vermutet, dass die Verminderung der fettmassespezifischen Thermogenese bei Weibchen stärker ausgeprägt ist als bei Männchen. Diese Fragestellung ist bisher noch nicht untersucht worden. Eine Untersuchung dieser Hypothese sollte unabhängig vom Implantationsmodell an normalen männlichen und weiblichen Mäusen unter kontrollierten Fastenbedingungen und Wiederaufnahme von Nahrung mit *pair-feeding*-Design (Kontrolltiere mit gleicher Körpermasse) erfolgen (s. Dulloo und Jacquet, 2001).

## 5 Zusammenfassung

Die Set-point-Theorie der Körpermasse postuliert, dass die Körpermasse individuell festgelegt ist und über lange Lebensphasen hinweg stabil bleibt. Es wird davon ausgegangen, dass Änderungen in der Körpermasse vom Körper wahrgenommen werden können und diese Wahrnehmung zur Aktivierung kompensatorischer Rückkopplungsmechanismen führt, die Energieaufnahme und Energieumsatz beeinflussen und die individuelle *Set-point*-Körpermasse regenerieren. Der Einfluss der Körpermasse *per se* auf die Regulation der Körpermasse konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine künstliche Erhöhung der Körpermasse durch die Implantation eines zusätzlichen Gewichtes zu einer kompensatorischen Reduktion der biologischen Körpermasse (BKM, Körpermasse ohne Implantat) bis zum Wiedererreichen der Ausgangsmasse führt.

Männliche und weibliche FVB-Mäuse (*inbred*) wurden einer Schein-Operation (SO, kein Implantat) unterzogen oder erhielten entweder ein leichtes (LO, 2-3% der Körpermasse) oder ein schweres Gewicht (HI, 10% der Körpermasse) von gleichem Volumen in die Bauchhöhle implantiert. Änderungen in der Energiebilanz (u. a. indirekte Kalorimetrie) und der Körperzusammensetzung (DEXA) sowie hormoneller Parameter (Leptin, Corticosteron; ELISA) und der Genexpression (Leptin, UCP1, UCP3; Northern Blot) wurden chronisch (über 14 Wochen) und akut (über 14 Tage) infolge der Gewichtsimplantation untersucht.

Die Mäuse reagierten auf die künstlich erhöhte Körpermasse geschlechtsspezifisch. Männchen zeigten eine partielle Reduktion in der BKM. Weibchen zeigten diese Kompensation jedoch nicht. Die reduzierte BKM entsprach einer reduzierten Fettmasse. Die fettfreie Masse wurde in beiden Geschlechtern nicht durch die zusätzlich implantierte Masse beeinflusst. Änderungen in der Körpermasse wurden kurz- bis mittelfristig durch Änderungen in der Energieaufnahme hervorgerufen. Ein Einfluss des Energieumsatzes auf Änderungen in der Körpermasse konnte nicht nachgewiesen werden. Leptin- und Corticosteronspiegel sowie die Genexpression von UCP1 und UCP3 unterlagen akuten geschlechtsspezifischen Änderungen infolge der Gewichtsimplantation.

Die Regulation der Körpermasse entsprechend eines massespezifischen *Set-points* konnte partiell für die Männchen gezeigt werden. Das weist darauf hin, dass die Wahrnehmung der Körpermasse bei den Männchen in die Regulation der Körpermasse teilweise integriert sein könnte. Die Weibchen regulierten dagegen ihre Körpermasse eher entsprechend ihrer BKM. Dieser Mechanismus ermöglicht vermutlich die Bewahrung der Energiereserven und spricht eher für die Regulation der Energiehomöostase im Vergleich zur Körpermasse *per se*.

---

**Literaturverzeichnis**

- Abdel el Motal, S. M. und Sharp, G. W. (1985). Inhibition of glucose-induced insulin release by xylazine. *Endocrinology*, 116 (6), 2337-2340.
- Adams, C. S., Korytko, A. I. und Blank, J. L. (2001). A novel mechanism of body mass regulation. *J Exp Biol*, 204 (Pt 10), 1729-1734.
- Ahima, R. S. (2000). Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res*, 26, 42-56.
- Ahima, R. S. und Flier, J. S. (2000). Leptin. *Annu Rev Physiol*, 62, 413-437.
- Ainslie, D. A., Morris, M. J., Wittert, G., Turnbull, H., Proietto, J. und Thorburn, A. W. (2001). Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 (11), 1680-1688.
- Arnold, A. P. und Burgoyne, P. S. (2004). Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol Metab*, 15 (1), 6-11.
- Berthoud, H. R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (4), 393-428.
- Birbaumer, N. und Jänig, W. (2000). Motivation und Emotion. In R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.), *Physiologie des Menschen* (28 Aufl.). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Bland, J. M. und Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*, 8 (2), 135-160.
- Bogardus, C., Lillioja, S., Ravussin, E., Abbott, W., Zawadzki, J. K., Young, A., Knowler, W. C., Jacobowitz, R. und Moll, P. P. (1986). Familial dependence of the resting metabolic rate. *N Engl J Med*, 315 (2), 96-100.
- Bradley, P. (1978). The ponderostat and a physiological model of obesity. *Am J Clin Nutr*, 31 (11), 1975-1977.

- 
- Cabanac, M. (2001). Regulation and the ponderostat. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 Suppl 5, S7-12.
- Cabanac, M. (2003). Ponderostat: arguments in favour of a set-point. In G. Medeiros-Neto, A. Halpern und C. Bouchard (Hrsg.), *Progress in Obesity Research* (Bd. 9, S. 718-723). Montrouge, France: John Libbey Eurotext Ltd.
- Cabanac, M., Duclaux, R. und Spector, N. H. (1971). Sensory feedback in regulation of body weight: is there a ponderostat? *Nature*, 229 (5280), 125-127.
- Cabanac, M. und Gosselin, C. (1996). Ponderostat: hoarding behavior satisfies the condition for a lipostat in the rat. *Appetite*, 27 (3), 251-261.
- Cabanac, M. und Richard, D. (1996). The nature of the ponderostat: Hervey's hypothesis revived. *Appetite*, 26 (1), 45-54.
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D. und Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest*, 111 (9), 1409-1421.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1), 156-159.
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A., Benoit, S. C. und Woods, S. C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, 52 (3), 682-687.
- Comizio, R., Pietrobelli, A., Tan, Y. X., Wang, Z., Withers, R. T., Heymsfield, S. B. und Boozer, C. N. (1998). Total body lipid and triglyceride response to energy deficit: relevance to body composition models. *Am J Physiol*, 274 (5 Pt 1), E860-866.
- Cortright, R. N., Chandler, M. P., Lemon, P. W. und DiCarlo, S. E. (1997). Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. *Physiol Behav*, 62 (1), 105-111.
- Cortright, R. N. und Koves, T. R. (2000). Sex differences in substrate metabolism and energy homeostasis. *Can J Appl Physiol*, 25 (4), 288-311.

- Dulloo, A. G. und Jacquet, J. (2001). An adipose-specific control of thermogenesis in body weight regulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 Suppl 5, S22-29.
- Dulloo, A. G., Jacquet, J. und Girardier, L. (1997). Poststarvation hyperphagia and body fat overshooting in humans: a role for feedback signals from lean and fat tissues. *Am J Clin Nutr*, 65 (3), 717-723.
- Dulloo, A. G., Jacquet, J. und Montani, J. P. (2002). Pathways from weight fluctuations to metabolic diseases: focus on maladaptive thermogenesis during catch-up fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26 Suppl 2, S46-57.
- Dulloo, A. G. und Samec, S. (2001). Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. *Br J Nutr*, 86 (2), 123-139.
- Elmqvist, J. K. (2001). Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 Suppl 5, S78-82.
- Flier, J. S. (2004). Obesity wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116, 337-350.
- Frenz, U. (1995). *Bestimmung der Energie- und Makronährstoffverwertung bei Ratten unter Diäten mit leicht unterschiedlichen Aminosäuregehalten: neue optimierte Methoden der indirekten Kalorimetrie* (1. Aufl. Bd. 1). Berlin: Verlag Dr. Köster.
- Frenz, U. (1999). *Whole body calorimetry* (Bd. 4). Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Singapore Tokyo: Elsevier Science.
- Girard, I. und Garland, T., Jr. (2002). Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol*, 92 (4), 1553-1561.
- Goldfine, I. D. und Arieff, A. I. (1979). Rapid inhibition of basal and glucose-stimulated insulin release by xylazine. *Endocrinology*, 105 (4), 920-922.
- Grier, S. J., Turner, A. S. und Alvis, M. R. (1996). The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol*, 31 (1), 50-62.



- Griggio, M. A., Luz, J. und Carvalho, S. M. (1992). The effect of fasting and refeeding on oxygen consumption by rats. *Braz J Med Biol Res*, 25 (2), 205-208.
- Grote, J. (2000). Gewebeatmung. In R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.), *Physiologie des Menschen* (28. Aufl., S. 624-637). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Guyard, B., Fricker, J., Brigant, L., Betoulle, D. und Apfelbaum, M. (1991). Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism*, 40 (5), 529-533.
- Hamann, A., Benecke, H., Le Marchand-Brustel, Y., Susulic, V. S., Lowell, B. B. und Flier, J. S. (1995). Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. *Diabetes*, 44 (11), 1266-1273.
- Hamann, A., Flier, J. S. und Lowell, B. B. (1996). Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology*, 137 (1), 21-29.
- Harper, M. E., Dent, R., Monemdjou, S., Bezaire, V., Van Wyck, L., Wells, G., Kavaslar, G. N., Gauthier, A., Tesson, F. und McPherson, R. (2002). Decreased mitochondrial proton leak and reduced expression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obese diet-resistant women. *Diabetes*, 51 (8), 2459-2466.
- Harris, R. B. (1990). Role of set-point theory in regulation of body weight. *Faseb J*, 4 (15), 3310-3318.
- Havel, P. J. (2000). Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc*, 59 (3), 359-371.
- Helrich, K. (Hrsg.). (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (15. Edition Aufl.). Arlington, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Hervey, G. R. (1969). Regulation of energy balance. *Nature*, 222 (194), 629-631.
- Heymsfield, S. B., Gallagher, D., Kotler, D. P., Wang, Z., Allison, D. B. und Heshka, S. (2002). Body-size dependence of resting energy expenditure can be attributed to nonenergetic homogeneity of fat-free mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282 (1), E132-138.

- Hoffmann, L. und Schiemann, R. (1980). Von der Kalorie zum Joule: Neue Größenbezeichnungen bei Messungen des Energieumsatzes und bei der Berechnung von Kennzahlen der energetischen Futterbewertung. *Archiv Tierernährung*, 30, 733-742.
- Illera, J. C., Gonzalez Gil, A., Silvan, G. und Illera, M. (2000). The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits. *J Physiol Biochem*, 56 (4), 329-336.
- Janssen, L. und Laatz, W. (1999). *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows* (3. Aufl.). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Jeanrenaud, B. und Rohner-Jeanrenaud, F. (2000). CNS-periphery relationships and body weight homeostasis: influence of the glucocorticoid status. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 2, S74-76.
- Jebb, S. A., Garland, S. W., Jennings, G. und Elia, M. (1996). Dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of gross body composition in rats. *Br J Nutr*, 75 (6), 803-809.
- Jequier, E. und Felber, J. P. (1987). Indirect calorimetry. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1 (4), 911-935.
- Jequier, E. und Tappy, L. (1999). Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev*, 79 (2), 451-480.
- Jones, C. D., Jarjou, M. S., Whitehead, R. G. und Jequier, E. (1987). Fatness and the energy cost of carrying loads in African women. *Lancet*, 2 (8571), 1331-1332.
- Keesey, R. E. und Corbett, S. W. (1984). Metabolic defense of the body weight set-point. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 62, 87-96.
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 140 (901), 578-596.
- Klaus, S. (Hrsg.). (2001). *Adipose Tissues* (Bd. 27). Georgetown, Texas: Eurekah.com/Landes Bioscience.
- Klaus, S., Munzberg, H., Truloff, C. und Heldmaier, G. (1998). Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol*, 274 (2 Pt 2), R287-293.

- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404 (6778), 635-643.
- Landt, M., Gingerich, R. L., Havel, P. J., Mueller, W. M., Schoner, B., Hale, J. E. und Heiman, M. L. (1998). Radioimmunoassay of rat leptin: sexual dimorphism reversed from humans. *Clin Chem*, 44 (3), 565-570.
- Leal-Cerro, A., Soto, A., Martinez, M. A., Dieguez, C. und Casanueva, F. F. (2001). Influence of cortisol status on leptin secretion. *Pituitary*, 4 (1-2), 111-116.
- Leibel, R. L. (1990). Is obesity due to a heritable difference in 'set point' for adiposity? *West J Med*, 153 (4), 429-431.
- Leibel, R. L., Rosenbaum, M. und Hirsch, J. (1995). Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*, 332 (10), 621-628.
- Lentner, C. (1981). *CIBA-Geigy AG: Wissenschaftliche Tabellen Geigy* (8. Aufl. Bd. 1). Basel.
- Levin, B. E. und Keeseey, R. E. (1998). Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol*, 274 (2 Pt 2), R412-419.
- Li, K. S., Liege, S., Moze, E. und Neveu, P. J. (2000). Plasma corticosterone and immune reactivity in restrained female C3H mice. *Stress*, 3 (4), 285-298.
- Lowell, B. B. und Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404 (6778), 652-660.
- Macdonald, I. A. (2003). The body weight set-point - the case against. In G. Medeiros-Neto, A. Halpern und C. Bouchard (Hrsg.), *Progress in Obesity Research* (Bd. 9, S. 724-728). Montrouge, France: John Libbey Eurotext Ltd.
- Machinal, F., Dieudonne, M. N., Leneuve, M. C., Pecquery, R. und Giudicelli, Y. (1999). In vivo and in vitro ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. *Endocrinology*, 140 (4), 1567-1574.
- Maloiy, G. M., Heglund, N. C., Prager, L. M., Cavagna, G. A. und Taylor, C. R. (1986). Energetic cost of carrying loads: have African women discovered an economic way? *Nature*, 319 (6055), 668-669.

- Mayer, J. (1955). Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*, 63 (1), 15-43.
- Mystkowski, P. und Schwartz, M. W. (2000). Gonadal steroids and energy homeostasis in the leptin era. *Nutrition*, 16 (10), 937-946.
- Nagy, T. R. und Clair, A. L. (2000). Precision and accuracy of dual-energy X-ray absorptiometry for determining in vivo body composition of mice. *Obes Res*, 8 (5), 392-398.
- Nance, D. M., Bromley, B., Barnard, R. J. und Gorski, R. A. (1977). Sexually dimorphic effects of forced exercise on food intake and body weight in the rat. *Physiol Behav*, 19 (1), 155-158.
- Neel, J. V. (1999). The "thrifty genotype" in 1998. *Nutr Rev*, 57 (5 Pt 2), S2-9.
- Nisbett, R. E., Hanson, L. R., Jr., Harris, A. und Stair, A. (1973). Taste responsiveness, weight loss, and the ponderostat. *Physiol Behav*, 11 (5), 641-645.
- Noack, R. (1995). Energiehaushalt. In H.-K. Bisalski (Hrsg.), *Ernährungsmedizin* (S. 19-29). Stuttgart New York: Thieme-Verlag.
- Peters, A., Schweiger, U., Fruhwald-Schultes, B., Born, J. und Fehm, H. L. (2002). The neuroendocrine control of glucose allocation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 110 (5), 199-211.
- Proll, J., Petzke, K. J., Ezeagu, I. E. und Metges, C. C. (1998). Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. *J Nutr*, 128 (11), 2014-2022.
- Reinboth, R. (1980). *Vergleichende Endokrinologie*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
- Richard, D. (1986). Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol*, 250 (2 Pt 2), R245-249.
- Ricquier, D. und Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 345 Pt 2, 161-179.

- Rivest, S., Deshaies, Y. und Richard, D. (1989). Effects of corticotropin-releasing factor on energy balance in rats are sex dependent. *Am J Physiol*, 257 (6 Pt 2), R1417-1422.
- Rodriguez, A. M., Monjo, M., Roca, P. und Palou, A. (2002). Opposite actions of testosterone and progesterone on UCP1 mRNA expression in cultured brown adipocytes. *Cell Mol Life Sci*, 59 (10), 1714-1723.
- Rodriguez, A. M., Quevedo-Coli, S., Roca, P. und Palou, A. (2001). Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues. *Obes Res*, 9 (9), 579-588.
- Rodriguez, A. M., Roca, P., Bonet, M. L., Pico, C., Oliver, P. und Palou, A. (2003). Positive correlation of skeletal muscle UCP3 mRNA levels with overweight in male, but not in female, rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285 (4), R880-888.
- Rohner-Jeanrenaud, F., Walker, C. D., Greco-Perotto, R. und Jeanrenaud, B. (1989). Central corticotropin-releasing factor administration prevents the excessive body weight gain of genetically obese (*fa/fa*) rats. *Endocrinology*, 124 (2), 733-739.
- Rose, B. S., Flatt, W. P., Martin, R. J. und Lewis, R. D. (1998). Whole body composition of rats determined by dual energy X-ray absorptiometry is correlated with chemical analysis. *J Nutr*, 128 (2), 246-250.
- Rosenbaum, M., Nicolson, M., Hirsch, J., Murphy, E., Chu, F. und Leibel, R. L. (1997). Effects of weight change on plasma leptin concentrations and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (11), 3647-3654.
- Rosenbaum, M., Pietrobelli, A., Vasselli, J. R., Heymsfield, S. B. und Leibel, R. L. (2001). Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25 (9), 1365-1371.
- Rothwell, N. J. (1990). Central effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neurosci Biobehav Rev*, 14 (3), 263-271.
- Saad, M. F., Damani, S., Gingerich, R. L., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S. D., el-Tawil, K., Rude, R. K. und Kamdar, V. (1997). Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (2), 579-584.

- Schliess, F. und Haussinger, D. (2000). Cell hydration and insulin signalling. *Cell Physiol Biochem*, 10 (5-6), 403-408.
- Schrauwen, P. und Hesselink, M. (2002). UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol*, 205 (Pt 15), 2275-2285.
- Schrauwen, P., Walder, K. und Ravussin, E. (1999). Human uncoupling proteins and obesity. *Obes Res*, 7 (1), 97-105.
- Schutz, Y. (1995). The basis of direct and indirect calorimetry and their potentials. *Diabetes Metab Rev*, 11 (4), 383-408.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. und Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404 (6778), 661-671.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Seeley, R. J., Barsh, G. S., Baskin, D. G. und Leibel, R. L. (2003). Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes*, 52 (2), 232-238.
- Seeley, R. J. und Woods, S. C. (2003). Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci*, 4 (11), 901-909.
- Solano, J. M. und Jacobson, L. (1999). Glucocorticoids reverse leptin effects on food intake and body fat in mice without increasing NPY mRNA. *Am J Physiol*, 277 (4 Pt 1), E708-716.
- Soule, R. G. und Goldman, R. F. (1969). Energy cost of loads carried on the head, hands, or feet. *J Appl Physiol*, 27 (5), 687-690.
- Stubbs, R. J., Sepp, A., Hughes, D. A., Johnstone, A. M., Horgan, G. W., King, N. und Blundell, J. (2002a). The effect of graded levels of exercise on energy intake and balance in free-living men, consuming their normal diet. *Eur J Clin Nutr*, 56 (2), 129-140.
- Stubbs, R. J., Sepp, A., Hughes, D. A., Johnstone, A. M., King, N., Horgan, G. und Blundell, J. E. (2002b). The effect of graded levels of exercise on energy intake and balance in free-living women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26 (6), 866-869.
- Tate, C. A. und Holtz, R. W. (1998). Gender and fat metabolism during exercise: a review. *Can J Appl Physiol*, 23 (6), 570-582.

- Ulmer, H.-V. (2000). Energiehaushalt. In R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.), *Physiologie des Menschen* (28. Aufl., S. 641-648). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Van Gaal, L. F., Wauters, M. A., Mertens, I. L., Considine, R. V. und De Leeuw, I. H. (1999). Clinical endocrinology of human leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 Suppl 1, 29-36.
- Velkoska, E., Morris, M. J., Burns, P. und Weisinger, R. S. (2003). Leptin reduces food intake but does not alter weight regain following food deprivation in the rat. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27 (1), 48-54.
- Wabitsch, M. (2000). The acquisition of obesity: insights from cellular and genetic research. *Proc Nutr Soc*, 59 (2), 325-330.
- Wade, C. E., Moran, M. M. und Oyama, J. (2002). Resting energy expenditure of rats acclimated to hypergravity. *Aviat Space Environ Med*, 73 (9), 859-864.
- Wade, G. N. (2004). Regulation of body fat content? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286 (1), R14-15.
- Warren, L. E., Horwitz, B. A. und Fuller, C. A. (1997). Gravity and body mass regulation. *J Gravit Physiol*, 4 (2), P89-92.
- Webber, J. und Macdonald, I. A. (2000). Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *Proc Nutr Soc*, 59 (3), 397-404.
- Weiergraber, O. und Haussinger, D. (2000). Hepatocellular hydration: signal transduction and functional implications. *Cell Physiol Biochem*, 10 (5-6), 409-416.
- Weigle, D. S. und Brunzell, J. D. (1990). Assessment of energy expenditure in ambulatory reduced-obese subjects by the techniques of weight stabilization and exogenous weight replacement. *Int J Obes*, 14 Suppl 1, 69-77;discussion 77-81.
- Weigle, D. S. und Levin, B. E. (2000). Defective dietary induction of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obesity-prone rats. *Obes Res*, 8 (5), 385-391.
- Weinsier, R. L. (2001). Etiology of obesity: methodological examination of the set-point theory. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 25 (3), 103-110.

- Weinsier, R. L., Nagy, T. R., Hunter, G. R., Darnell, B. E., Hensrud, D. D. und Weiss, H. L. (2000). Do adaptive changes in metabolic rate favor weight regain in weight-reduced individuals? An examination of the set-point theory. *Am J Clin Nutr*, 72 (5), 1088-1094.
- Weir, J. B. (1949). New Methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol*, 109, 1-9.
- Wiedmer, P., Klaus, S. und Ortmann, S. (2002). Energy metabolism of young rats after early postnatal overnutrition. *Br J Nutr*, 88 (3), 301-306.
- Wilson, M. M. und Morley, J. E. (2003). Invited review: Aging and energy balance. *J Appl Physiol*, 95 (4), 1728-1736.
- Wirtshafter, D. und Davis, J. D. (1977). Set points, settling points, and the control of body weight. *Physiol Behav*, 19 (1), 75-78.
- Woods, S. C., Gotoh, K. und Clegg, D. J. (2003). Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 228 (10), 1175-1180.
- Wubbels, R. J. und de Jong, H. A. (2000). Vestibular-induced behaviour of rats born and raised in hypergravity. *Brain Res Bull*, 52 (5), 349-356.
- Wuttke, W. (2000). Endokrinologie. In R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.), *Physiologie des Menschen* (28. Aufl., S. 370-406). Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag.
- Zhang, Y., Guo, K. Y., Diaz, P. A., Heo, M. und Leibel, R. L. (2002). Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282 (1), R226-234.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. und Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (6505), 425-432.



## 6 Danksagung

Diese Arbeit ist mit der Hilfe und dem Rat vieler Kollegen und Freunde entstanden, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt.....

..... Frau Prof. Dr. Klaus für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie für die gemeinsame Diskussion der Versuchsergebnisse.

..... Dr. Michael Boschmann für seine vielen Denkanstöße und das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

.....Dr. Sylvia Ortmann und Andreas Subke für das Design und die Anfertigung der Metallkerne der Gewichtsimplantate, bei Sylvia Ortmann außerdem für die Diskussionen über die erste Rohfassung des Manuskripts.

.....bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Physiologie des Energiestoffwechsels für ihre unermüdliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit.

.... allen Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums für die zuverlässige Betreuung der Tiere und die Hilfe bei den Operationen.

.....allen Mitarbeitern des DIfE, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

.....meiner Familie und meinen Freunden für ihr grenzenloses Verständnis, ihre Unterstützung, Geduld und Motivation.