

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Molekulare Ernährungsmedizin

**Metabolische Phänotypisierung von Mausmutantenlinien  
mit einer Störung in der Körpertemperatur- und  
Gewichtsregulation**

Monja Willershäuser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

2. Univ.-Prof. Dr. M. Hrabě de Angelis

Die Dissertation wurde am 25.07.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.02.2013 angenommen.

"So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach der Zeit und den Umständen das Möglichste getan hat."

*Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Zusammenfassung/Summary</b> .....	X
<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Krankheiten auf der Spur: Die Maus als Modellorganismus.....	1
1.2 Energiehaushalt und Thermogenese .....	2
1.3 Schilddrüsenhormone .....	5
1.3.1 Schilddrüsenhormone: Synthese und Regulierung .....	5
1.3.2 Transport von Schilddrüsenhormonen in das Zielgewebe .....	6
1.3.3 Monocarboxylattransporter 8 (Mct8), ein spezifischer Transporter für Schilddrüsenhormone.....	6
1.3.4 Klinische Relevanz von MCT8.....	7
1.3.5 Schilddrüsenhormone und Energiehomöostase.....	7
1.3.6 <i>Knockout</i> Mausmodelle für Mct8 zur Identifizierung molekularer Mechanismen.....	8
1.4 Histondeacetylasen .....	8
1.4.1 Epigenetik und die Regulation der Transkription.....	8
1.4.2 Die Histondeacetylase 2.....	9
1.4.3 <i>Knockout</i> -Mausmodelle für Hdac2: Funktion <i>in vivo</i> .....	10
1.4.4 Klinische Relevanz von Histondeacetylasen .....	11
1.5 Glykosphingolipide .....	11
1.5.1 Sphingolipide und Glykosphingolipide.....	11
1.5.2 Glykosphingolipidsynthese .....	12
1.5.3 Klinische Relevanz von Sphingolipiden und Glykosphingolipiden.....	13
1.5.4 Mausmodelle .....	13
1.6 Ziele der Promotion .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	16
2.1 Haltungsbedingungen .....	16
2.1.1 Diäten .....	16
2.2 Mausmutantenlinien im Primärscreen .....	17
2.3 Mausmutantenlinien im Sekundärscreen .....	17
2.3.1 Die Mausmutantenlinie Hdac2.....	17
2.3.1.1 <i>Experimente</i> .....	18
2.3.2 Die Mausmutantenlinie Mct8 .....	18
2.3.2.1 <i>Zucht und Genotypisierung</i> .....	18
2.3.2.2 <i>Experimente</i> .....	21
2.3.3 Die Mausmutantenlinie Ugcg.....	22

2.3.3.1 <i>Induktion des Knockouts</i> .....	22
2.3.3.2 <i>Experimente</i> .....	23
2.4 Bestimmung der Energieaufnahme bei <i>ad libitum</i> Fütterung .....	24
2.4.1 <i>Haltungsbedingungen</i> .....	24
2.4.2 Bestimmung von Körpergewicht, rektaler Körpertemperatur, Futteraufnahme und Kotproduktion .....	25
2.4.3 Bombenkalorimetrie.....	26
2.4.3.1 <i>Probenaufbereitung und Kalibrierung des Aufschlussgefäßes</i> .....	26
2.4.3.2 <i>Bestimmung des Energiegehalts</i> .....	26
2.4.3.3 <i>Metabolisierbare Energie und Assimilationskoeffizient</i> .....	27
2.4.3.4 <i>Berechnung der metabolischen Parameter</i> .....	27
2.5 Analyse des Energieumsatzes mittels indirekter Kalorimetrie.....	27
2.5.1 <i>Obligatorische und fakultative Thermogenese</i> .....	28
2.5.2 <i>Torpor</i> .....	28
2.6 Analyse des Energieumsatzes im Primärscreen.....	29
2.6.1 <i>Aufbau der Messanlage</i> .....	29
2.6.2 <i>Kalibrierung der Analysatoren</i> .....	31
2.6.3 <i>Datenerfassung und Aufbereitung</i> .....	31
2.6.4 <i>Versuchsdurchführung</i> .....	32
2.6.5 <i>Evaluierung des Energieumsatzes</i> .....	32
2.7 Analyse des Energieumsatzes im Sekundärscreen .....	33
2.7.1 <i>Aufbau der Messanlage</i> .....	33
2.7.2 <i>Kalibrierung der Analysatoren</i> .....	35
2.7.3 <i>Datenerfassung und Aufbereitung</i> .....	35
2.7.4 <i>Bestimmung des täglichen Energieumsatzes</i> .....	36
2.7.4.1 <i>Versuchsdurchführung</i> .....	36
2.7.4.2 <i>Evaluierung des Energieumsatzes und der respiratorischen Austauschrate</i> .	36
2.7.5 <i>Bestimmung des Energieumsatzes unter zweitägigem Futterentzug</i> .....	37
2.7.5.1 <i>Versuchsdurchführung</i> .....	37
2.7.5.2 <i>Bestimmung der Torporlänge und Energieeinsparung</i> .....	37
2.7.6 <i>Bestimmung des Energieumsatzes in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition</i> .....	38
2.7.6.1 <i>Versuchsdurchführung</i> .....	38
2.7.6.2 <i>Evaluierung des Energieumsatzes und der respiratorischen Austauschrate</i> .	38
2.7.6.3 <i>Kalkulation der Wärmedurchgangszahl</i> .....	39
2.7.7 <i>Kalkulation der Energiebilanz</i> .....	39
2.8 Normalisierung von Energieaufnahme und Energieumsatz auf das Körpergewicht ....	40

2.9 Analyse der Körperzusammensetzung .....	40
2.9.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Technologie: Gesamtkörperanalyse .....	40
2.9.1.1 Versuchsdurchführung und Datenerhebung .....	41
2.9.2 Micro Computer Tomographie (Micro-CT): Fettdepotanalyse .....	41
2.9.2.1 Versuchsdurchführung und Datenerhebung .....	41
2.10 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT) .....	42
2.10.1 Versuchsdurchführung .....	42
2.11 Intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT) .....	43
2.11.1 Versuchsdurchführung .....	43
2.12 Bestimmung der spontanen lokomotorischen Aktivität .....	43
2.12.1 Versuchsaufbau .....	43
2.12.2 Versuchsdurchführung und Versuchstiere .....	43
2.13 Klinische Chemie der MML Hdac2 .....	44
2.13.1 Versuchsdurchführung .....	44
2.13.2 Analyisierte Parameter .....	44
2.14 Bestimmung der Schilddrüsenhormonspiegel, der Deiodase 1 Aktivität und des Ucp1- Gehalts der MML Mct8 .....	45
2.14.1 Analyse von T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> .....	46
2.14.2 Aktivität der Deiodase 1 in Leber .....	46
2.14.3 Immunologische Detektion von Ucp1 im iBAT .....	46
2.15 Statistik .....	50
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
3.1 Evaluierung der metabolischen Phänotypisierung von Mausmutantenlinien im Primärscreen .....	52
3.1.1 Das Körpergewicht .....	52
3.1.2 Die Körpertemperatur .....	53
3.1.3 Der Energieumsatz .....	53
3.1.3.1 Mittlerer Energieumsatz .....	55
3.1.3.2 Minimaler Energieumsatz .....	57
3.1.4 Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur-, Körpergewichts- und Energieumsatzdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen .....	59
3.1.4.1 Körpertemperatur- und Körpergewichtsdifferenz .....	59
3.1.4.2 Körpertemperatur- und mittlere Energieumsatzdifferenz .....	62
3.1.4.3 Körpergewichts- und mittlere Energieumsatzdifferenz .....	64
3.1.5 Zusammenhang zwischen Körpertemperatur, Körpergewicht und Energieumsatz .....	66
3.1.5.1 Körpertemperatur und Körpergewicht .....	66

3.1.5.2 Körpertemperatur und Energieumsatz .....	66
3.1.5.3 Energieumsatz und Körpergewicht.....	66
3.1.6 Zusammenfassung .....	69
3.2 Futterentzug zur Detektierung von Genen, die an der Thermoregulation beteiligt sind	70
3.3 Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Mct8.....	72
3.3.1 Analyse unter Standardhaltungsbedingungen.....	72
3.3.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur .....	72
3.3.1.2 Der tägliche Energieumsatz .....	73
3.3.1.3 Die respiratorische Austauschrate.....	77
3.3.1.4 Zusammenfassung .....	79
3.3.2 Analyse unter Futterentzug .....	80
3.3.2.1 Körpergewicht, Körpertemperatur und Körperzusammensetzung .....	80
3.3.2.2 Der Sauerstoffverbrauch .....	83
3.3.2.3 Die respiratorische Austauschrate.....	89
3.3.2.4 Torporlänge und Energieeinsparung durch Torpor .....	91
3.3.2.5 Zusammenfassung .....	92
3.3.3 Analyse in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition .....	93
3.3.3.1 Körpergewicht und Körpertemperatur .....	93
3.3.3.2 Der Energieumsatz in Thermoneutralität und Kälte.....	94
3.3.3.3 Die respiratorische Austauschrate.....	98
3.3.3.4 Zusammenfassung .....	100
3.3.4 Schilddrüsenhormonspiegel bei <i>ad libitum</i> Fütterung und Futterentzug .....	101
3.3.5 Dejodase1 Aktivität in der Leber bei <i>ad libitum</i> Fütterung und Futterentzug.....	104
3.3.6 Ucp1-Gehalt im iBAT.....	105
3.4 Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Hdac2 .....	106
3.4.1 Analyse unter Standardhaltungsbedingungen.....	106
3.4.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur .....	106
3.4.1.2 Der tägliche Energieumsatz .....	107
3.4.1.3 Die respiratorische Austauschrate.....	111
3.4.1.4 Zusammenfassung .....	113
3.4.2 Analyse unter Futterentzug .....	114
3.4.2.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur .....	114
3.4.2.2 Der Sauerstoffverbrauch .....	117
3.4.2.3 Die respiratorische Austauschrate.....	123
3.4.2.4 Zusammenfassung .....	125
3.4.3 Analyse in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition .....	125
3.4.3.1 Körpergewicht und Körpertemperatur .....	125

3.4.3.2 <i>Der Energieumsatz in Thermoneutralität und Kälte</i> .....	126
3.4.3.3 <i>Die respiratorische Austauschrate</i> .....	130
3.4.3.4 <i>Veränderte klinische Parameter nach akuter Kälteexposition</i> .....	132
3.4.3.5 <i>Zusammenfassung</i> .....	132
3.5 <i>Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Ugcg</i> .....	134
3.5.1 <i>Körpergewicht, Körpertemperatur und Körperzusammensetzung</i> .....	134
3.5.2 <i>Energiehaushalt: Energieaufnahme und Energieumsatz</i> .....	139
3.5.2.1 <i>Energieumsatz in der 2. Woche p.i. (Tag 11-14)</i> .....	139
3.5.2.2 <i>Energieaufnahme in der 3. Woche p.i. (Tag 18-22)</i> .....	140
3.5.2.3 <i>Energieumsatz in der 5. Woche p.i. (Tag 34-36)</i> .....	141
3.5.2.4 <i>Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i. (Tag 39-47)</i> .....	144
3.5.2.5 <i>Energieumsatz in der 9. Woche p.i. (Tag 63-66)</i> .....	145
3.5.2.6 <i>Bestimmung des kalorischen Beitrags, der zur Gewichtszunahme geführt hat</i> .....	147
3.5.3 <i>Lokomotorische Aktivität</i> .....	148
3.5.4 <i>Glukose- und Insulintoleranz</i> .....	149
3.5.5. <i>Zusammenfassung</i> .....	151
<b>4 Diskussion</b> .....	152
4.1 <i>Identifizierte Phänotypen im Primärscreen</i> .....	152
4.1.1 <i>Das Körpergewicht</i> .....	152
4.1.2 <i>Die Körpertemperatur</i> .....	153
4.1.3 <i>Der Energieumsatz</i> .....	153
4.1.4 <i>Zusammenfassung</i> .....	155
4.2 <i>Zusammenhang zwischen Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz</i> ....	156
4.2.1 <i>Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Körpertemperatur und dem Körpergewicht</i> .....	157
4.2.2 <i>Einfluss des Körpergewichts auf den Energieumsatz</i> .....	158
4.2.3 <i>Einfluss der Körpertemperatur auf den Energieumsatz</i> .....	159
4.2.4 <i>Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht</i> .....	159
4.2.5 <i>Zusammenfassung und Ausblick</i> .....	162
4.3 <i>Gene die im Zusammenhang mit einer veränderten Körpertemperaturregulation stehen</i> .....	163
4.4 <i>Einfluss von Mct8 auf den Energiehaushalt</i> .....	164
4.4.1 <i>Veränderte zirkulierende Schilddrüsenhormonspiegel</i> .....	165
4.4.2 <i>Niedrigeres Körpergewicht</i> .....	165
4.4.3 <i>Tendenzieller Hypermetabolismus bei Raumtemperatur</i> .....	166

4.4.4 Geringe Verschiebung der Substratnutzung bei <i>ad libitum</i> Fütterung und in thermoneutraler Umgebung.....	167
4.4.5 Mct8 <sup>-y</sup> / Mct8 <sup>-/-</sup> Mäuse sind kältetolerant .....	168
4.4.6 Verringerter Ucp1-Gehalt bei Mct8 <sup>-/-</sup> Weibchen.....	169
4.4.7 Mct8 <sup>-/-</sup> Weibchen wurden unter Futterentzug torpid.....	171
4.4.8 Wieso werden Mct8 <sup>-/-</sup> Mäuse torpid? .....	174
4.4.9 Zusammenfassung und Ausblick: Bekanntes und Neues .....	179
4.5 Einfluss von Hdac2 auf den Energiehaushalt.....	181
4.5.1 Niedrigeres Körpergewicht .....	181
4.5.2 Normaler Energieumsatz bei Raumtemperatur und in Thermoneutralität.....	182
4.5.3 Normale Substratnutzung bei <i>ad libitum</i> Fütterung und in thermoneutraler Umgebung .....	183
4.5.4 Hdac2 <sup>-/-</sup> Mäuse sind in Kälte hypermetabol.....	183
4.5.5 Hdac2 <sup>-/-</sup> Mäuse werden unter Futterentzug hypometbol und hypotherm .....	184
4.5.6 Wieso haben Hdac2 <sup>-/-</sup> Mäuse ein Kompensationsproblem?.....	185
4.5.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	186
4.6 Die MML Mct8 und Hdac2: Phänotypischer Vergleich unter Futterentzug.....	187
4.7 Einfluss von Ugcg auf den Energiehaushalt.....	188
4.7.1 Ugcg <sup>-/-</sup> Mäuse waren in der 2. Woche nach Induktion phänotypisch unauffällig .	189
4.7.2 Zeitliche Dissoziation zwischen Gewichtszunahme und Hypothermie .....	189
4.7.3 Vermehrte Fettspeicherung und beeinträchtigte Glukosetoleranz .....	193
4.7.4 Verschiebung der Substratnutzung .....	194
4.7.5 Die Fütterung einer HFD führt zur Verstärkung des Gewichtsphänotyps.....	195
4.7.6 Reproduzierbarkeit des Phänotyps .....	195
4.7.7 Zusammenfassung und Ausblick.....	196
<b>5 Supplement</b> .....	198
5.1 Primärscreen .....	199
5.2 Mausmutantenlinie Mct8 .....	207
5.3 Mausmutantenlinie Hdac2.....	210
5.4 Mausmutantenlinie Ugcg.....	212
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	218
<b>7 Publikationen</b> .....	233
<b>8 Danksagung</b> .....	235

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse ( <i><u>a</u>nalysis <u>o</u>f <u>v</u>ariance</i> )
Agp	<i><u>a</u>gouti-<u>r</u>elated <u>p</u>eptide</i>
AHDS	Allan-Herndon-Dudley-Syndrom
BAT	Braunes Fettgewebe ( <i><u>b</u>rown <u>a</u>dipose <u>t</u>issue</i> )
bp	Basenpaare
C	Wärmedurchgangszahl ( <i><u>C</u>onductance</i> )
CD	Kontrolldiät ( <i><u>c</u>ontrol <u>d</u>iet</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoxIV	Cytochrom-c-OxidaseIV ( <i><u>c</u>ytochrome-<u>c</u>-<u>o</u>xidase<u>I</u>V</i> )
Cre	<i><u>c</u>auses <u>r</u>ecombination</i>
d	Tag
dd	Doppelt destilliert
DEE	Täglicher Energieumsatz ( <i><u>d</u>aily <u>e</u>nergy <u>e</u>xpenditure</i> )
Dio	Dejodase ( <i><u>d</u>eio<u>d</u>inase</i> )
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i><u>d</u>esoxyribo<u>n</u>ucleic <u>a</u>cid</i> )
ENU	N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff ( <i><u>N</u>-<u>e</u>thyl-<u>N</u>-<u>n</u>itroso<u>u</u>rea</i> )
ER <sup>T2</sup>	Östrogenrezeptor <sup>T2</sup> ( <i><u>e</u>strogen <u>r</u>ecceptor<sup><u>T</u>2</sup></i> )
EUMODIC	<i>European mouse disease clinic</i>
f	Flox ( <i><u>f</u>lox</i> )
g	Gramm
GMC	Deutsche Mauslinik ( <i><u>G</u>erman <u>M</u>ouse <u>C</u>linic</i> )
h	Stunde
Hdac2	Histondeacetylase 2 ( <i><u>h</u>istone <u>d</u>e<u>a</u>cetylase <u>2</u></i> )
HFD	Hochkalorische Diät ( <i><u>h</u>igh <u>f</u>at <u>d</u>iet</i> )
HP	Energieumsatz, Wärmeproduktion ( <i><u>h</u>eat <u>p</u>roduction</i> )
HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse ( <i><u>h</u>ypothalamus-<u>p</u>ituitary-<u>t</u>hyroid-axis</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser
iBAT	interskapuläres braunes Fettgewebe ( <i><u>i</u>nterscapular <u>b</u>rown <u>a</u>dipose <u>t</u>issue</i> )
i.p.	Intraperitoneal ( <i><u>i</u>ntraperitoneal</i> )
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kcal	Kilokalorie

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
l	Liter
Lat2	System-L-Aminosäuretransporter ( <i>L</i> -type <i>a</i> mino <i>a</i> cid <i>t</i> ransporter)
LM	Lineares Regressionsmodell ( <i>l</i> inear <i>r</i> egression <i>m</i> odel)
Mct8	Monocarboxylattransporter 8 ( <i>m</i> ono <i>c</i> arboxylate <i>t</i> ransporter 8, auch Slc16a2, <i>s</i> olute <i>c</i> arrier 16a2)
MEZ	Mitteuropäische Zeit
min	Minute
ml	Milliliter
MML	Mausmutantenlinie ( <i>m</i> ouse <i>m</i> utant <i>l</i> ine)
mRNA	Boten-RNA ( <i>m</i> essenger <i>r</i> ibonucleic <i>a</i> cid)
mW	Milliwatt
$\alpha$ -MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon ( $\alpha$ - <i>m</i> elanocyte <i>s</i> timulating <i>h</i> ormone)
ng	Nanogramm
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>n</i> uclear <i>m</i> agnetic <i>r</i> esonance)
Npy	Neuropeptid Y ( <i>n</i> europeptide <i>y</i> )
N <sub>2</sub>	Stickstoff
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p.i.	Nach Induktion ( <i>p</i> ost <i>i</i> nduction)
Pomc	Proopiomelanocortin ( <i>p</i> ro- <i>o</i> piomelanocortin)
PTU	6-n-Propyl-2-thiouracil
RER	Respiratorische Austauschrate ( <i>r</i> espiratory <i>e</i> xchange <i>r</i> atio)
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>r</i> ibonucleic <i>a</i> cid)
rT <sub>3</sub>	Reverses Trijodthyronin
S	Supplement
Sec	Sekunde
TSH	Thyreoidea-Stimulierenden Hormons ( <i>t</i> hyroid <i>s</i> timulating <i>h</i> ormone)
TRH	Thyreoliberin ( <i>t</i> hyreotropin- <i>r</i> eleasing- <i>h</i> ormone)
TR $\alpha$	Schilddrüsenhormonrezeptor $\alpha$ ( <i>t</i> hyroid <i>h</i> ormone <i>r</i> eceptor $\alpha$ )
TR $\beta$	Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta$ ( <i>t</i> hyroid <i>h</i> ormone <i>r</i> eceptor $\beta$ )
T <sub>1</sub> AM	Thyronamin
T <sub>2</sub>	Dijodthyronin
T <sub>3</sub>	Trijodthyronin
T <sub>4</sub>	Tetraiodthyronin
Ucp1	Entkopplerprotein 1 ( <i>u</i> ncoupling <i>p</i> rotein 1)

UDP	Uridindiphosphat
Ugcg	<i>UDP-Glukose-Ceramid-Glukosyltransferase (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase)</i>
VCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidproduktion
VO <sub>2</sub>	Sauerstoffverbrauch
W	Watt
WAT	Weißes Fettgewebe ( <i>white adipose tissue</i> )
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## Zusammenfassung/Summary

Die Regulation der Energiehomöostase ist ein fein abgestimmter Prozess. Bereits ein geringes Ungleichgewicht zwischen der Energieaufnahme einerseits und der Partitionierung der metabolisierten Energie auf die verschiedenen Komponenten der Energieausgaben auf der anderen Seite kann langfristig in schweren metabolischen Erkrankungen wie Kachexie, Anorexie oder Adipositas resultieren. Die Energiekosten zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur werden immer wieder in Zusammenhang mit der Entstehung von Übergewicht diskutiert, weil sie einen beträchtlichen Anteil am Energieumsatz haben können. Die Absenkung der Körpertemperatur führt zu einer Abnahme des Gradienten zwischen Körpertemperatur und Umgebungstemperatur. Die damit einhergehende verringerte Wärmeabgabe könnte zur Energieeinsparung führen und in einer positiven Energiebilanz resultieren, die zur Entstehung von Übergewicht und Adipositas beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde in Mausmodellen untersucht, welchen Beitrag die Thermogenese und somit die Körpertemperatur an der Energiehomöostase hat.

Bei *ad libitum* Fütterung und Haltung in moderater Kälte (24 °C), die mit Thermogenesekosten verbunden ist, konnte kein genereller Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Körpergewicht gezeigt werden: Die Analyse von rund 60 Mausmutantenlinien (MML) ergab ein Ungleichgewicht in der Anzahl von MML, bei denen die Mutanten ein im Vergleich zu den Kontrollen höheres Körpergewicht und eine niedrigere Körpertemperatur aufwiesen. Auch anhand eines direkten visuellen Vergleichs der Differenzen im Körpergewicht und der Körpertemperatur zwischen Mutanten und Kontrollen bestand kein genereller Zusammenhang. Die detaillierte Analyse auf Einzeltierebene (1145 Mäuse) mittels linearen Regressionsmodellen ergab ebenfalls keinen biologisch relevanten Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht. Daraus kann geschlossen werden, dass der Einfluss der Körpertemperatur auf die Energieausgaben unter Standardhaltungsbedingungen gering ist.

Werden die Haltungsbedingungen verändert und die Mäuse der *Challenge* Futterentzug unterzogen, trägt die Körpertemperatur hingegen zur Regulation der Energiehomöostase bei. Dies zeigte die Analyse der konstitutiven *Knockout*-MML *Mct8* (spezifischer Schilddrüsenhormontransporter) und *Hdac2* (Histondeacetylase). Die Mutanten beider MML konnten unter Futterentzug weder ihre Körpertemperatur, noch den Energieumsatz aufrechterhalten. Dies zeigt ein Kompensationsproblem durch das über den Futterentzug herbeigeführte Energiedefizit und der daraus resultierenden negativen Energiebilanz. Die Mäuse senkten ihre Körpertemperatur und den Energieumsatz im Vergleich zu den Kontrollmäusen stärker ab und zeigten häufigere und längere Torporereignisse. Es konnte gezeigt werden, dass die Absenkung von Körpertemperatur und Energieumsatz während

des Futterentzugs zu einer Energieeinsparung von rund 34 % bezogen auf den regulären täglichen Energieumsatz führen kann. Während einer akuten Kälteexposition (5 °C) waren beide MML jedoch in der Lage ihren Energieumsatz aufrecht zu halten, was auf eine nicht beeinträchtigte Rekrutierung der Thermogenese hinweist. Unter Standardhaltungsbedingungen waren beide MML, abgesehen von einem niedrigeren Körpergewicht, phänotypisch hingegen weitgehend unauffällig.

Die MML *Ugcg*, welche die Induktion eines neuronenspezifischen Gangliosidmangels im Vorderhirn erlaubte, wurde unter Standardhaltungsbedingungen übergewichtig und zeigte eine Absenkung der Körpertemperatur. Die Induktion des *Knockouts* ermöglichte die Analyse der Entwicklung des Körpergewichts- und Temperaturphänotyps im zeitlichen Verlauf. Es konnte gezeigt werden, dass eine zeitliche Dissoziation zwischen der primären Gewichtszunahme und der erst zwei Wochen später auftretenden Absenkung der Körpertemperatur bestand, die somit sekundär zum Gewichtsphänotyp war. Die initiale Gewichtszunahme der Mutanten basierte maßgeblich auf einer Hyperphagie der Mäuse sowie einem leichten Hypometabolismus, wodurch sich die Mäuse in einer positiven Energiebilanz befanden. Anhand von Kalkulationen konnte geschätzt werden, dass die Absenkung der Körpertemperatur um ~ 1°C zu einer Energieeinsparung von rund 2 kJ d<sup>-1</sup> führen kann. Dies zeigt, dass die Körpertemperatur potentiell einen Beitrag haben kann, der unter Standardbedingungen jedoch in der Regel gering und messtechnisch schwer zu erfassen ist. Neben einem geeigneten Modell zur Untersuchung der Körpergewichts- und Körpertemperaturentwicklung lassen die Ergebnisse auf eine Beteiligung der Ganglioside in der zentralnervösen Regulation der Energiehomöostase schließen.

The regulation of energy homeostasis is a complex process. Already minor alterations in the fine tuned balance of energy consumption and partitioning of metabolized energy to the different components of energy expenditure can result in the development of severe metabolic disorders such as cachexia, anorexia or obesity. Thermogenesis, a process required for the maintenance of body temperature, represents one major fraction of energy expenditure and contributes considerably to energy expenditure. Thus, variations in body temperature have been discussed in the context of obesity development. A reduction of body temperature results in a decrease in the difference of body temperature and ambient temperature leading to reduced heat loss. This could result in conservation of energy which, in turn, would lead to a positive energy balance and could ultimately contribute to body weight gain and development of obesity. In the present thesis the contribution of body temperature regulation and thermogenesis to the maintenance of energy homeostasis was studied in mouse models.

Under *ad libitum feeding* and moderate cold exposure (24 °C) associated with an increase in thermogenic demand no correlation between body temperature and body weight was found: The analysis of ~60 mouse mutant lines (MML) revealed a mismatch in the number of MML with increased body weight and decreased body temperature when compared to control mice. Visual inspection comparing genotype specific differences in body weight and body temperature did not identify a correlation. A detailed analysis of individual mice (n=1145) via linear regression models failed to demonstrate a biologically relevant effect of body temperature on body weight. It can be concluded that the extent to which thermogenesis contributes to energy expenditure under standard housing conditions is negligible.

When housing conditions change and mice are challenged by food deprivation, an effect of body temperature variations on the regulation of energy homeostasis becomes evident as shown by the analysis of the constitutive *knockout* MML *Mct8* (specific thyroid hormone transporter) and *Hdac2* (histone deacetylase). During food deprivation mutants of both mouse lines could neither maintain their body temperature nor their metabolic rate and thus showed a problem to compensate for the energy deficit. These mice decreased their body temperature and energy expenditure significantly stronger than control mice and exhibited more frequent and longer torpor bouts. The results reveal that the decrease in body temperature and energy expenditure during food deprivation results in a 34 % reduction of regular daily energy expenditure. During an acute cold exposure (5 °C) both mutant lines were able to maintain their energy expenditure at normal levels which points to a non-compromised thermogenic capacity. Apart from a decrease in body weight, both MML did not show any phenotypic alterations at standard housing conditions.

The MML *Ugcg*, which exhibits a neuron specific inducible *knockout* of gangliosides in the forebrain, became obese and decreased body temperature at standard housing conditions.

The inducibility of the *knockout* allowed for the analysis of body weight and body temperature in a time dependent manner. A temporal dissociation of initial body weight gain and a delayed onset of body temperature reduction was found. Thus, the initial body weight gain was not associated with changes in body temperature, but rather due to hyperphagia and a slight hypometabolic state of the mice, which led to a positive energy budget. Calculations estimating savings revealed that a decrease of body temperature by  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  results in an energy conservation of approximately  $2\text{ kJ d}^{-1}$ . This demonstrates the potential effect of body temperature variations on the energy budget which, under standard conditions, however is rather low and difficult to detect. It can be concluded that the MML *Ugcg* is an adequate model for the study of body weight and body temperature regulation. Furthermore, the present metabolic phenotyping of this MML has elucidated the evident role of gangliosides in the central nervous regulation of energy homeostasis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krankheiten auf der Spur: Die Maus als Modellorganismus

Die Maus (*Mus musculus*) ist der am häufigsten genutzte Modellorganismus zur Untersuchung menschlicher Krankheiten (Moore 1999, O'Brien und Woychik 2003, Rosenthal und Brown 2007, Hancock et al. 2009). Dies liegt zum einen an der hohen Reproduktionsrate, verhältnismäßig einfachen und kostengünstigen Haltung (Moore 1999, Rosenthal und Brown 2007), zum anderen an der hohen Übereinstimmung des Mausgenoms mit dem menschlichen Genom, für das in bis zu 99 % der Mausgene Homologien gefunden wurden (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002). Die Generierung von Mausmutanten mittels N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU)-Mutagenese war einer der erste Schritte in der systematischen Analyse von Genfunktionen (Hrabě de Angelis und Balling 1998, Soewarto et al. 2000). Die Entschlüsselung des Mausgenoms im Jahr 2002 legte die Basis für die gezielte Manipulation jedes Gens durch ein breites Methodenspektrum, um dessen Auswirkung auf den Organismus zu studieren und geeignete Modelle für humane Krankheiten zu identifizieren (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002, Brown et al. 2009, Beckers et al. 2009). Im letzten Jahrzehnt entstanden eine Reihe internationaler Projekte, um *Knockout*-Modelle für alle proteincodierenden Mausgene zu generieren. Diese Anstrengungen sind zum Beispiel in Form des *International Knockout Mouse Consortium* (IKMC, <http://www.knockoutmouse.org/>) zusammengeschlossen (International Mouse Knockout Consortium et al. 2007, Collins et al. 2007, Ringwald et al. 2011). Die systemische und systematische Phänotypisierung im Hochdurchsatzverfahren stellt die nächste große Herausforderung dar (Brown et al. 2006, Beckers et al. 2009, Morgan et al. 2010, Wurst und Hrabě de Angelis 2010). Dabei sind eine standardisierte Maushaltung und Durchführung der Experimente (Champy et al. 2004, Brown et al. 2006), wie auch die Wahl eines geeigneten genetischen Hintergrunds von Bedeutung (Erickson 1996, Montagutelli 2000).

Die Deutsche Mauslinik (GMC, <http://www.mouseclinic.de/>) ist eine Phänotypisierungsplattform in der Mausmutantenlinien (MML) eine umfangreiche systemische Phänotypisierung durchlaufen. Basierend auf standardisierten Protokollen werden rund 320 Parameter, verteilt auf 14 Screens, analysiert (Gailus-Durner et al. 2005, Gailus-Durner et al. 2009, Fuchs et al. 2009, Fuchs et al. 2011). Dies ermöglicht die umfassende Analyse von MML, was bei der Suche nach geeigneten Krankheitsmodellen aufgrund der pleiotropen Effekte vieler Gene essentiell ist (Beckers et al. 2009). Zudem ist die GMC Teil der internationalen Phänotypisierungskonsortien *European Mouse Disease*

*Clinic* (EUMODIC, <http://www.eumodic.org>) und *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC, <http://www.mousephenotype.org>).

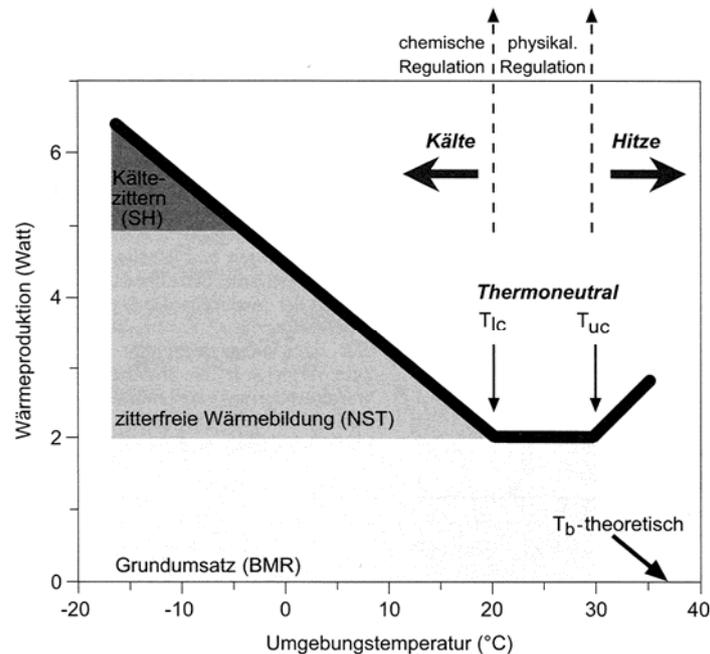
Ziel des metabolischen Screens der GMC ist die Aufklärung physiologischer Mechanismen, die an der Regulation des Energiehaushalts und somit an der Aufrechterhaltung einer ausgeglichenen Energiebilanz beteiligt sind. Die MML werden neben basalen Variablen wie Körpergewicht und Körpertemperatur auch in Bezug auf die Energieaufnahme und die Energieausgaben untersucht. Zusätzlich zur Analyse unter Standardhaltungsbedingungen werden *Challenge*-Experimente als Werkzeug für die Identifizierung von Genen durchgeführt, die an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem Veränderungen der Umgebungstemperatur wie eine akute *Kältechallenge* (5 °C), Futterentzug oder die Fütterung hochkalorischer Diäten. Das Einbeziehen von Umweltfaktoren in die Analyse ist wichtig, weil diese oft die Entstehung eines neuen Phänotyps auslösen, wobei der Begriff des *Envirotyps* geprägt wurde (Beckers et al. 2009). So ist z.B. das Auftreten von Adipositas beim Menschen eine Kombination aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren (Spiegelman und Flier 2001, Tremblay et al. 2004). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Analyse komplexer Zusammenhänge zwischen genetischen und umweltbedingten Faktoren.

## 1.2 Energiehaushalt und Thermogenese

Die Regulation des Energiehaushalts basiert auf einem komplexen Netzwerk neuroendokriner Signale, die ihrerseits Einfluss auf physiologische Signalwege nehmen (Spiegelman und Flier 2001, Williams et al. 2001, Morton et al. 2006). Bei einem ausgeglichenen Energiehaushalt steht die Energieaufnahme über die Nahrung in einem balancierten Verhältnis den Energieausgaben gegenüber, die für den Basalstoffwechsel, diätinduzierte Thermogenese, Wachstum, Aktivität und Thermoregulation aufgewendet werden. Bereits geringe Verschiebungen in dem Verhältnis zwischen der über die Nahrung aufgenommenen Energie und deren Allokation auf die verschiedenen Komponenten der Energieausgaben können einen Einfluss auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung haben und so zu metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes oder dem metabolischen Syndrom führen.

Ein Parameter, der einen Einfluss auf die Allokation der Energie hat, ist die Thermogenese zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur. Die Körpertemperatur ist nicht nur ein Resultat der Abwärme von Stoffwechselprozessen, sondern es handelt sich um eine regulierte Größe, wodurch sie die Ausgabenbudgetierung des Energiehaushalts beeinflusst. Die Thermogenese zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ist eng mit der

Umgebungstemperatur verknüpft (Scholander et al. 1950, Cannon und Nedergaard 2011, Abb.1).



**Abb.1: Scholander-Modell der Thermoregulation.** Innerhalb der Thermoneutralzone, die durch die obere ( $T_{uc}$ , *upper critical temperature*) und untere ( $T_{ic}$ , *lower critical temperature*) kritische Temperatur gekennzeichnet ist, kann die Körpertemperatur durch Verhaltensänderungen, die zu veränderten physikalischen Bedingungen führen, aufrecht gehalten werden. Außerhalb der Thermoneutralzone ist eine zusätzliche chemische Wärmebildung notwendig (z. B. durch Kältezittern, zitterfreie Wärmebildung, Schwitzen). Unterhalb der Thermoneutralzone ist ein linearer Anstieg mit sinkender Umgebungstemperatur zu beobachten. Die Steigung der Wärmeproduktion in Kälte extrapoliert auf die theoretische Körpertemperatur ( $T_b$ -theoretisch). Abbildung aus Heldmaier und Neuweiler, Vergleichende Tierphysiologie Band 2.

Innerhalb der Thermoneutralzone ist die durch den Basalstoffwechsel entstehende Wärmebildung ausreichend, um die Körpertemperatur einzig durch physikalische Regulation (Vasokonstriktion, Körperhaltung, Wärmeisolierung) normotherm zu halten. Unterhalb der Thermoneutralzone sind Kleinsäuger wie die Maus auf zusätzliche Mechanismen der Wärmebildung (Zittern und zitterfreie Wärmebildung) angewiesen. Dabei steigt die Wärmebildung mit sinkender Umgebungstemperatur linear an, um den Wärmeverlust an die Umgebung zu kompensieren und die Körpertemperatur stabil zu halten (Cannon und Nedergaard 2011). Ende der 70er Jahre konnten Foster und Frydman bei Versuchen mit Ratten zeigen, dass die zitterfreie Wärmebildung im adulten Tier im braunen Fettgewebe (BAT) stattfindet (Foster und Frydman 1978, Foster und Frydman 1979). Dabei wird die Wärmebildung über das in den Mitochondrien der braunen Fettzellen lokalisierte Entkopplerprotein 1 (Ucp1) vermittelt. Ucp1 entkoppelt den durch die Atmungskette über der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten Protonengradient von der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese, indem es die innere Mitochondrienmembran für die Protonen durchlässig macht (Cannon und Nedergaard 2004). Die im Protonengradienten enthaltene Energie wird so als Wärme freigesetzt (Nicholls und Locke 1984).

Die Regulation der zitterfreien Wärmebildung wird über das sympathische Nervensystem und Schilddrüsenhormone vermittelt (Cannon und Nedergaard 2004, Silva 2006). Außerhalb der Thermoneutralzone ist die BAT vermittelte Thermogenese die Hauptquelle zur Aufrechterhaltung einer normothermen Körpertemperatur, wobei die Heizleistung bis zu  $300 \text{ W kg}^{-1}$  betragen kann (Cannon und Nedergaard 2004).

Erkenntnisse aus Diätexperimenten bei Ratten, die durch Fütterung einer Cafeteria-Diät hyperphag waren, lieferten erste Hinweise auf die Beteiligung des BAT an der diätinduzierten Thermogenese (Rothwell und Stock 1979). Zudem wurde in dem adipösen Mausmodell Lep<sup>ob</sup> mit Mutation im Leptin-Gen eine Beeinträchtigung der BAT-Aktivität beschrieben (Himms-Hagen und Desautels 1978). Diese Erkenntnisse rückten die BAT-vermittelte Thermogenese als potentiellen Mechanismus zur Verbrennung überschüssiger Energie in den Fokus des Interesses (Himms-Hagen 1979, Trayhurn et al. 1982, Blaza 1983). Seit kurzem wird die Existenz jedoch kontrovers diskutiert (Kozak 2010, Fromme und Klingenspor 2011).

Trotz der nicht einheitlichen Interpretation in Bezug auf die diätinduzierte Thermogenese sind das BAT und der Beitrag der Thermogenese am Energiehaushalt nach wie vor ein attraktives Ziel im Kampf gegen Adipositas und metabolische Krankheiten (Ravussin und Kozak 2009, Nedergaard und Cannon 2010). So könnte beispielsweise eine Erhöhung der Thermogenesekosten zum Abbau überschüssiger Energie beitragen und der Entstehung von Adipositas entgegenwirken.

Beim Menschen ist das BAT bei Neugeborenen und Kleinkindern in vielen Bereichen des Körpers lokalisiert, wo es aktiv an der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur beteiligt ist (Heaton 1972, Blaza 1983, Lean 1989). Jahrelang wurde weithin angenommen, dass es im Laufe des Lebens zu einer kontinuierlichen Abnahme des BAT kommt und es daher keine Relevanz für thermoregulatorische Prozesse hat (Heaton 1972). Hinweise auf funktionelles BAT bei Erwachsenen (Rothwell und Stock 1979) wurden weitestgehend ignoriert. Mit modernen Methoden konnte das Vorkommen von metabolisch aktivem BAT im adulten Menschen, besonders im Bereich des Halses und der oberen Thoraxregion, durch Aufnahme von radioaktiv markierter Fluordesoxyglucose (2-[<sup>18</sup>F]-Fluor-2-desoxy-Glukose) in Kombination mit Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie in mehreren Studien nachgewiesen werden (Nedergaard et al. 2007). Auch das für das BAT charakteristische UCP1 wurde im adulten Menschen auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen (Nedergaard et al. 2007, Virtanen et al. 2009, Zingaretti et al. 2009, Svensson et al. 2011). Wie bei Kleinsäugetieren konnte eine Aktivierung des BAT durch Kälteexposition gezeigt werden (Nedergaard et al. 2007, Saito et al. 2009, van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Virtanen et al. 2009, Yoneshiro et al. 2011, Ouellet et al. 2012), die ebenfalls über das sympathische Nervensystem erfolgt (Söderlund et al. 2007).

Es erscheint offensichtlich, dass der Energieumsatz als wärmeproduzierender Prozess mit der Körpertemperatur verknüpft ist. In der Tat wird dies anhand verschiedener physiologischer Zustände deutlich. Ein Beispiel ist der bei Kleinsäugetieren auftretende tägliche Torpor, bei dem die Absenkung des Energieumsatzes eine Absenkung der Körpertemperatur zur Folge hat (Heldmaier und Ruf 1992, Heldmaier et al. 1999). Auf der anderen Seite geht Fieber mit einem leicht erhöhten Energieumsatz einher (Cannon und Nedergaard 2004). Dennoch können die Körpertemperatur und der Energieumsatz unabhängig voneinander reguliert werden. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass die Körpertemperatur z.B. bei starker Aktivität innerhalb gewisser physiologischer Grenzen gehalten wird.

Die Thermogenese zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei Raumtemperatur (18-22 °C) macht bei der Labormaus rund 30 % der täglichen Energieausgaben aus (rund 1.5-fach höher als in Thermoneutralität, Cannon und Nedergaard 2011). Beim ruhenden Menschen gibt es grobe Schätzungen, dass rund 50 % des Energieumsatzes für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur benötigt werden, bei einem normal aktiven Menschen beläuft sich dies auf rund 37 % (Landsberg et al. 2009a, Landsberg et al. 2009b). Kombiniert mit der Erkenntnis von funktionsfähigem BAT im adulten Menschen lassen diese Angaben vermuten, dass Veränderungen in der Thermogenese, bzw. Körpertemperatur einen Einfluss auf das Körpergewicht haben. Es stellt sich daher die Frage des Beitrags der Thermogenese an der Energiehomöostase und in wieweit dieser durch andere Komponenten, die zu den Energieausgaben beitragen, kompensiert werden kann.

## **1.3 Schilddrüsenhormone**

### **1.3.1 Schilddrüsenhormone: Synthese und Regulierung**

Die von der Schilddrüse sezernierten Hormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Tetrajodthyronin ( $T_4$ ) haben eine essentielle Funktion in der Regulation des Energiehaushalts. Ihre Freisetzung wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse) gesteuert (Yen 2001). Die Synthese und Speicherung der Schilddrüsenhormone erfolgt in den Follikelzellen der Schilddrüse, aus der vorwiegend  $T_4$  freigesetzt wird, dessen zirkulierende Konzentration deutlich über der von  $T_3$  liegt (Yen 2001). Im Blut erfolgt die Bindung der Schilddrüsenhormone an Transportproteine, wodurch nur ein kleiner Teil in freier Form vorliegt (Yen 2001). Ungebundenes  $T_3$  kann als biologisch aktive Form an die Schilddrüsenhormonrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  binden ( $TR\alpha$  und  $TR\beta$ ) und im Nukleus die Expression verschiedener Gene regulieren (Yen 2001, Cheng et al. 2010). Neben der

Kontrolle der Genexpression konnte für Schilddrüsenhormone auch eine Beteiligung an genomunabhängigen Prozessen gezeigt werden (Davis und Davis 1996, Cheng et al. 2010). Das Vorhandensein von Schilddrüsenhormonen wird in den Zielgeweben durch Selenoproteine, die Dejodasen (Dio), reguliert, die durch ihre lokale Verfügbarkeit einen Einfluss auf den Energiehaushalt haben (Köhrle 2000, Bianco und Kim 2006, Gereben et al. 2008, Schweizer et al. 2008). Es gibt 3 Dejodasen (Dio 1-3), die sich in ihrer Gewebespezifischen Expression und dem bevorzugten Substrat der Dejodierung unterscheiden (Larsen und Berry 1995, St. Germain und Galton 1997, Köhrle 2000, Bianco et al. 2002, Köhrle 2002, Kuiper et al. 2005).

### 1.3.2 Transport von Schilddrüsenhormonen in das Zielgewebe

Über viele Jahre hinweg bestand die Auffassung, dass Schilddrüsenhormone aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften Zellmembranen passiv über Diffusion passieren können (Hennemann et al. 2001). Heute weiß man, dass die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in Zellen ein aktiver und somit energieabhängiger und sättigbarer Prozess ist, für den spezielle Transporter benötigt werden (Rao et al. 1976, Krenning et al. 1978). Bisher wurden verschiedene Transporter identifiziert, die am Schilddrüsenhormontransport in die Gewebe beteiligt sind (Hennemann et al. 2001, Abe et al. 2002, Jansen et al. 2005, Suzuki und Abe 2008, Braun et al. 2010, Visser et al. 2011). Zu ihnen gehören  $\text{Na}^{2+}$ -abhängige organische Anionentransporter, System-L-Aminosäuretransporter, Monocarboxylattransporter und das  *$\text{Na}^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide*.

### 1.3.3 Monocarboxylattransporter 8 (Mct8), ein spezifischer Transporter für Schilddrüsenhormone

Im Jahr 2003 wurde der Monocarboxylattransporter 8 (Mct8, auch Slc16a2, *solute carrier 16a2*) als spezifischer Schilddrüsenhormontransporter beschrieben (Friesema et al. 2003). Durch Expression von Mct8 der Ratte in Oocyten von Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) konnte gezeigt werden, dass Mct8  $\text{T}_4$ ,  $\text{T}_3$ ,  $\text{rT}_3$  (reverses Trijodthyronin) und  $\text{T}_2$  (Dijodthyronin) transportiert (Friesema et al. 2003).

Mct8 gehört zur Genfamilie Slc16, die für 14 Proteine codiert (Halestrap und Meredith 2004, Visser et al. 2007, Meredith und Christian 2008). Das für MCT8 codierende Gen (damals noch *X-linked PEST-containing transporter*) befindet sich auf dem X-Chromosom. Es wurde erstmalig 1994 beim Menschen geklont, wo es sich auf Chromosom Xq13.2 befindet und für ein 67 kDa großes Protein codiert (Lafrenière et al. 1994). Es konnte eine starke Expression in der Leber und eine geringe Expression in der Niere, Herz, Lunge, Gehirn, Lunge, Skelettmuskel und Plazenta nachgewiesen werden (Lafrenière et al. 1994). In der Maus

wurde Mct8 im Jahr 1998 genauer charakterisiert. Es hat eine Masse von 59 kDa, ist dem menschlichen Gen auf Nukleotidebene zu 85% identisch und besteht aus 12 hydrophoben transmembranen Domänen (Debrand et al. 1998). Mct8 wird bei der Maus in Leber, Niere, Lunge, Herz und Gehirn exprimiert (Debrand et al. 1998, Friesema et al. 2003). Kürzlich wurde zudem die Expression in der basolateralen Membran der Schilddrüsenthyreozyten gezeigt (Di Cosmo et al. 2010, Wirth et al. 2011). Die Expression von MCT8 im Gehirn ist aufgrund der klinischen Relevanz beim Menschen besonders intensiv untersucht worden und konnte im Mausmodell bereits während der Gehirnentwicklung in Neuronen nachgewiesen werden (Heuer et al. 2005, Wirth et al. 2009).

### **1.3.4 Klinische Relevanz von MCT8**

Bereits 2004 wurden die ersten Patienten identifiziert, deren Krankheitsbild auf verschiedene Mutationen im MCT8 Gen zurückzuführen ist (Friesema et al. 2004, Dimitrescu et al. 2004). Eine Reihe weiterer Studien folgten (Schwartz et al. 2005, Biebermann et al. 2005, Schwartz und Stevenson 2007). Der Funktionsverlust von MCT8 führt bei den männlichen Patienten zu einer schweren psychomotorischen Retardierung und endokrinologischem Phänotyp. Sie haben stark erhöhte T<sub>3</sub>-Spiegel, niedrigere rT<sub>3</sub> (reverses Trijodthyronin)-Spiegel sowie geringere T<sub>4</sub>-Spiegel, wobei die Spiegel des Thyreoidea-Stimulierenden Hormons (TSH) normal bis leicht erhöht sind (Friesema et al. 2004, Dimitrescu et al. 2004, Biebermann et al. 2005). Heterozygote weibliche Patienten zeigen in der Regel einen abgeschwächten Schilddrüsenhormonphänotyp und keine neurologischen Beeinträchtigungen (Dimitrescu et al. 2004). Es wurde jedoch eine Patientin mit Verlust der MCT8 Expression beschrieben, was in den typischen von männlichen Patienten bekannten Symptomen resultierte (Frints et al. 2008). Heute ist die Krankheit als Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (AHDS) bekannt, eine X-chromosomal gekoppelte Erkrankung, deren Symptome erstmalig 1944 beschrieben wurden (Allan et al. 1944). Bisher wurden mehr als 45 Familien mit Mutationen im MCT8 Gen beschrieben, die zu verschiedenen starken Ausprägungen des Krankheitsbildes führen (Friesema et al. 2010).

### **1.3.5 Schilddrüsenhormone und Energiehomöostase**

Ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonen und Energiehomöostase wurde bereits 1895 beschrieben (Magnus-Levy 1895). Durch ihre Wirkung auf den Metabolismus sind Schilddrüsenhormone unter anderem an der Regulation der Thermogenese und des Körpergewichts beteiligt (Silva 1995, Hulbert 2000, Krotkiewski 2002, Herwig et al. 2008, Amin et al. 2011). Dabei haben sie eine stimulierende Wirkung auf den Energieumsatz (bzw.

Sauerstoffverbrauch) und führen zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme sowie Gewichtsabnahme (Hulbert 2000, Krotkiewski 2002).

In den letzten Jahren wurden Thyronamine als Metabolite von Schilddrüsenhormonen wiederentdeckt (Scanlan et al. 2004, Scanlan 2009, Piehl et al. 2011). Im Gegensatz zu dem stimulierenden Einfluss der Schilddrüsenhormone auf den Metabolismus haben Thyronamine eine hemmende Wirkung. Bei pharmakologischer Dosierung führen sie zu einer Absenkung von Sauerstoffverbrauch (Hypometabolie), Körpertemperatur (Hypothermie) und Herzschlag (Bradykardie) (Scanlan et al. 2004, Braulke et al. 2008).

### **1.3.6 *Knockout* Mausmodelle für Mct8 zur Identifizierung molekularer Mechanismen**

Um die molekularen Grundlagen zu studieren wurden Mausmodelle mit einem *Knockout* für Mct8 generiert. Mct8-defiziente Männchen replizieren den menschlichen Schilddrüsenhormonphänotyp, mit erhöhten  $T_3$ - und niedrigeren  $T_4$ - sowie  $rT_3$ -Spiegeln, weisen interessanterweise jedoch keine offensichtlichen neurologischen Abnormalitäten auf (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007). In gezielten Verhaltensexperimenten konnte jedoch ein verringertes Angstverhalten der Mutanten gezeigt werden (Wirth et al. 2009). Das Mausmodell bietet trotz des fehlenden neurologischen Phänotyps die Möglichkeit zur Aufklärung molekularer Mechanismen, die zur Veränderung des Schilddrüsenhormonspiegels führen.

In früheren Untersuchungen konnte bereits eine starke Absenkung der Körpertemperatur der Mutanten gegenüber den Kontrollen nach zweitägigem Futterentzug gezeigt werden (Kap.3.2). Zur detaillierten Analyse des thermoregulatorischen Phänotyps und der Auswirkung der Mct8-Defizienz auf den Energiemetabolismus wurden die Mäuse im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer umfangreichen metabolischen Phänotypisierung unterzogen. Dies geschah sowohl unter Standard- als auch unter *Challenge*-Bedingungen (akute Kälteexposition und Futterentzug). Diese Analysen könnten zu einem weiteren Verständnis der Regulation des Energiehaushalts beitragen.

## **1.4 Histondeacetylasen**

### **1.4.1 Epigenetik und die Regulation der Transkription**

Der Begriff der Epigenetik wurde erstmals in den 1940er Jahren durch C.H. Waddington geprägt (Waddington 1942). Die moderne Epigenetik beschäftigt sich mit von der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz unabhängigen Zelleigenschaften, die auf Tochterzellen vererbt werden. Epigenetische Mechanismen haben keinen Einfluss auf die

DNA-Sequenz, es kommt jedoch zur chemischen Modifikation des Chromatins. Dies hat einen regulierenden Einfluss auf die Genaktivität. Epigenetische Mechanismen, die zu Erkrankungen beim Menschen führen, sind von besonderem Interesse für die Forschung, da sie potentielle Ziele für eine therapeutische Interventionen darstellen (Krämer et al. 2001, Egger et al. 2004, Minucci und Pelicci 2006, Feinberg 2007, Haberland et al. 2009a). Prominente, durch epigenetische Mechanismen entstehende Krankheiten sind unter anderem Krebs (Lund und van Lohuizen 2004, Esteller 2008) und neurodegenerative Erkrankungen (Abel und Zukin 2008, Sananbenesi und Fischer 2009).

Bei Eukaryoten liegt die DNA in der Zelle kondensiert als Chromatin vor. Die kleinste Einheit des Chromatins, das Nukleosom, besteht aus jeweils 8 Histonen, um die 146 bp DNA gewunden sind (Kronberg und Lorch 1999). Histonmodifikationen haben einen regulierenden Einfluss auf die Transkription, wobei mindestens 8 Klassen der Histonmodifikation bekannt sind (Kouzarides 2007). Einer der am intensivsten untersuchten Mechanismen ist die posttranslationale Modifikation von Histonproteinen durch Acetylierung und Deacetylierung. Dabei führt der reversible Vorgang der Acetylierung von Lysinresten am N-terminalen Ende eines Histons durch Histonacetyltransferasen zu einer erhöhten Transkription, während die Deacetylierung durch Histondeacetylasen (Hdac) zu einer Repression der Transkription führt (Pazin und Kadonaga 1997, Kuo und Allis 1998, Shahbazian und Grunstein 2007, Haberland 2009a). Die Deacetylierung von nicht-Histon-Proteinen ist ebenfalls beschrieben (Glozak et al. 2005, Das und Kundu 2005).

Hdacs können in der Regel nicht direkt an die DNA binden, sondern sind Teil von Multiproteinkomplexen, wodurch ihre Substratpräferenz beeinflusst werden kann (Pazin und Kadonaga 1997, de Ruijter et al. 2003, Shahbazian und Grunstein 2007). Bei Säugetieren sind Hdacs in vier Klassen (I-IV) untergliedert, die sich in Struktur, enzymatischer Funktion, subzellulärer Lokalisation und Expressionsmuster unterscheiden (de Ruijter et al. 2003, Gregoretti et al. 2004, Haberland et al. 2009a).

#### **1.4.2 Die Histondeacetylase 2**

Die Histondeacetylase 2 (Hdac2) der Säugetiere wurde 1996 als Bindungsprotein des Transkriptionsfaktors YY1 identifiziert (Yang et al. 1996). Hdac2 wird neben Hdac1, Hdac3 und Hdac8 aufgrund der Homologie zu der Histondeacetylase *reduced potassium dependency 3* (Rpd3) der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zu den Klasse I Hdacs gezählt, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden (Rundlett et al. 1996, Kurdistani und Grunstein 2003, de Ruijter et al. 2003, Haberland et al. 2009a). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz der HDAC2 von Maus und Menschen zu 58 % mit dem Transkriptionsfaktor Rpd3 der Hefe identisch ist (Yang et al. 1996). Hdac2 ist im Nukleus lokalisiert (Johnstone 2002) und wird ubiquitär exprimiert (Yang et al. 1997). Bei der

Maus ist Hdac2 mit einer Größe von 36 kbp, bestehend aus 14 Exons und 13 Introns, auf Chromosom 10B1 lokalisiert (Zeng et al. 1998).

### 1.4.3 *Knockout*-Mausmodelle für Hdac2: Funktion *in vivo*

Für die Deletion der Hdac2 sind Unterschiede in Bezug auf die Lebensfähigkeit beschrieben. Diese reichen von einer Letalität innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Geburt (Montgomery et al. 2007), bis zur Überlebensfähigkeit, die jedoch sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in den ersten Wochen nach der Geburt mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergeht (Trivedi et al. 2007, Zimmermann et al. 2007). Die unterschiedlichen Befunde könnten auf die Generierung des *Knockouts* sowie auf die verschiedenen genetischen Hintergründe zurückzuführen sein (Montgomery et al. 2007, Haberland et al. 2009a). Die Deletion der anderen Klasse I Hdacs ist während der Embryonalentwicklung oder kurz nach der Geburt aufgrund von Proliferationsdefekten (Hdac1), Gastrulationsdefekten (Hdac3) und Ossifikationsdefekten des Schädels (Hdac8) letal, wodurch ihnen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung zugeschrieben werden konnte (Lagger et al. 2002, Montgomery et al. 2007, Montgomery et al. 2008, Brunmeir et al. 2009, Haberland et al. 2009a, Haberland et al. 2009b).

Anhand von Mausmodellen mit einer Deletion von Hdac2 konnte die Beteiligung an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen gezeigt werden. Dazu gehören die Entwicklung des Herzens, des Gehirns sowie des Axialskeletts und Darms (Montgomery et al. 2007, Trivedi et al. 2007, Zimmermann et al. 2007, Montgomery et al. 2009). Zudem spielt Hdac2 eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung (Zimmermann et al. 2007): Die Verpaarung Hdac2-defizienter Mäuse mit APC<sup>min</sup> Mäusen, die intestinale Tumore entwickeln, führte abhängig von Geschlecht und Darmabschnitt zu einer Verringerung der Tumorraten von 10-100 %. Eine Beteiligung von Hdac2 am Erinnerungsvermögen und Lernen konnte ebenfalls gezeigt werden (Guan et al. 2009). Zudem sind Hdac2-defiziente Mäuse kleiner als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister (Zimmermann et al. 2007), wobei der Unterschied von Trivedi et al. nur während der ersten Lebensmonate beschrieben wird (Trivedi et al. 2007).

Interessanterweise ist die konditionale Deletion von Hdac2 oder von Hdac1 (Aminosäuresequenz zu annähernd 84 % identisch, Bartl et al. 1997) unter anderem im Herzmuskel, zentralem Nervensystem, Skelettmuskel und glattem Muskel nicht letal, während Doppelmutanten mit simultaner Deletion von Hdac2 und Hdac1 im zentralen Nervensystem oder Herzen innerhalb der ersten 7, bzw. 14 Tage postnatal sterben (Montgomery et al. 2007, Montgomery et al. 2009).

#### 1.4.4 Klinische Relevanz von Histondeacetylasen

Neben zahlreichen *in vitro* Studien konnten Hdac Inhibitoren in *in vivo* Experimenten an Nagetiermodellen erfolgreich gegen die Krebsbildung in verschiedenen Organen (Krämer et al. 2001, Marks et al. 2001, Somech et al. 2004) sowie unter anderem zur Behandlung von Asthma oder Hypertrophy des Herzens eingesetzt werden (Haberland et al. 2009a). Im klinischen Bereich werden in den letzten Jahren verstärkt HDAC Inhibitoren an Patienten mit Krebserkrankungen getestet (Krämer et al. 2001, Johnstone 2002, Somech et al. 2004, Minucci und Pelicci 2006, Haberland et al. 2009a). Auch die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen mittels HDAC Inhibitoren wird intensiv erforscht (Abel und Zukin 2008, Kazantsev und Thompson 2008). Kürzlich wurde Sphingosine-1-Phosphat, ein Sphingolipid, das an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Zellwachstum oder Angiogenese beteiligt ist (Strub et al. 2010) als neuer Inhibitor für HDAC1 und HDAC2 identifiziert (Hait et al. 2009). Dadurch können sich neue therapeutische Ansätze ergeben.

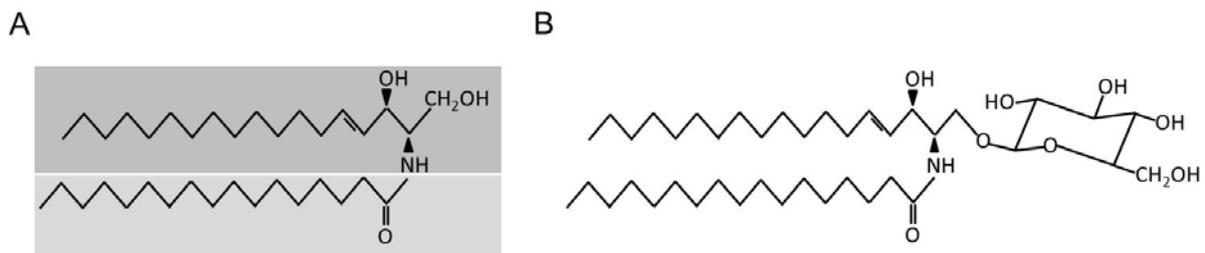
Die MML Hdac2 fiel, ebenso wie die MML Mct8, bei früheren Untersuchungen im metabolischen Screen durch eine starke Absenkung der Körpertemperatur der Mutanten gegenüber den Kontrollen nach zweitägigem Futterentzug auf (Kap.3.2). Aufgrund des thermoregulatorischen Phänotyps und weil die Auswirkung der Hdac2 Deletion auf den Energiehaushalt bisher nicht untersucht worden ist, wurden Hdac2-defiziente Mäuse in der vorliegenden Arbeit einer umfassend metabolischen Phänotypisierung, sowohl unter Standard- als auch unter *Challenge*-Bedingungen unterzogen.

### 1.5 Glykosphingolipide

#### 1.5.1 Sphingolipide und Glykosphingolipide

Sphingolipide bilden eine Klasse von Lipiden, die Bestandteile von Zellmembranen sind und ubiquitär vorkommen. Sie lassen sich in Ceramide, Sphingomyeline und Glykosphingolipide (GSL) unterteilen. Die Synthese der amphiphilen Sphingolipide erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat aus Ceramid, dem einfachsten Sphingolipid, das aus Sphingosin und einer über eine Amidbindung gebundenen Fettsäure besteht (Futerman und Hannun 2004, Lahiri und Futerman 2007, Abb.2A). Sphingolipide sind nicht nur Membranbestandteile. Für einige konnte zudem eine wichtige Rolle als Signalmoleküle gezeigt werden, wobei sie unter anderem am Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind (Hannun und Obeid 2008, Bartke und Hannun 2009).

Glykosphingolipide bestehen aus dem hydrophoben Ceramid, an das glykosidisch eine Vielzahl von Kohlenhydratresten gebunden sein kann (Futerman und Hannun 2004, Lahiri und Futerman 2007, Abb.2B). GSL werden in Cerebroside und Ganglioside unterteilt, wobei Ganglioside die Mehrheit aller GSL bilden und deutlich komplexer aufgebaut sein können. Die Synthese der GSL erfolgt an der cytosolischen Seite des Golgi-Apparats, oder an der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (Ichikawa und Hirabayashi 1998). GSL befinden sich hauptsächlich in der äußeren Plasmamembran, wobei der lipophile Ceramidanteil in dieser verankert ist und die Kohlenhydratreste in den extrazellulären Raum reichen. Daher wird ihnen unter anderem eine Rolle in der Zelladhäsion (Hidari et al. 1996), Zellerkennung (Hakomori und Igarashi 1995), als Signalmolekül (Hakomori 1990) und der Zelldifferenzierung (Hakomori 1981) zugeschrieben. Zudem gibt es Hinweise, dass GSL Bestandteile von sogenannten *Lipid Rafts* sind, für die eine Beteiligung an der Signaltransduktion diskutiert wird (Brown und London 2000, Simons und Toomre 2000). Intrazellulär konnte eine Beteiligung an der Proteinsortierung gezeigt werden (Sprong et al. 2001).



**Abb.2: Ceramid und Glukosylceramid.** Ceramid (A) besteht aus Sphingosin (dunkelgrau hinterlegt), an das eine Fettsäure (hellgrau hinterlegt) über eine Amidbindung gebunden ist. Glukosylceramid (B) ist ein Glykosphingolipid, das aus Ceramid und einer glykosidisch gebundenen Glukose besteht. Es bildet die Basis für die Synthese komplexerer Glykosphingolipide (siehe auch Kap.1.5.2).

### 1.5.2 Glykosphingolipidsynthese

Ganglioside sind saure Glykosphingolipide, die ein oder mehrere Sialinsäurereste enthalten (Kolter et al. 2002). In besonders hoher Konzentration sind sie in Neuronen und Gliazellen zu finden (Ledeen et al. 1998, Marconi et al. 2005, Silajdžić et al. 2009). Das Schlüsselenzym der Gangliosidsynthese ist die UDP-Glukose-Ceramid-Glukosyltransferase (Ugcg), die erstmalig 1968 im Gehirn von Hühnern beschrieben wurde (Basu et al. 1968). Sie wird ubiquitär exprimiert und befindet sich auf der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates, wo sie den ersten Schritt der GSL-Synthese katalysiert (Futerman und Pagano 1991, Jeckel et al. 1992). Dabei wird die Glukose von UDP-Glukose auf Ceramid übertragen, wobei Glukosylceramid und Uridindiphosphat (UDP) entstehen (Basu et al. 1968). Glukosylceramid bildet die Basis für eine Vielzahl von GSL, die durch Anfügen weiterer Monosaccharide durch Glykosyltransferasen, in der Regel im Lumen des Golgi-Apparates, entstehen (Kolter et al.

2002, Sandhoff und Kolter 2003). Ugcg befindet sich bei der Maus auf Chromosom 4 (Ichikawa et al. 1998a, Ichikawa et al. 1998b). Die Proteingröße beträgt etwa 45 kDa, wobei die Aminosäuresequenz der Maus zu 98 % mit der humanen identisch ist (Ichikawa et al. 1996, Ichikawa et al. 1998c).

Cerebroside als zweite Gruppe der Glykosphingolipide findet man als Bestandteile der die Oligodendrocyten umgebenden Myelinschicht und Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems. Im Gegensatz zur Gangliosidsynthese erfolgt der erste Schritt der Cerebroside synthese an der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums über die UDP-Galaktose-Ceramid-Galaktosyltransferase (Schulte und Stoffel 1993, Sprong et al. 1998). Diese überträgt die an UDP gebundene Galaktose auf Ceramid, wodurch Galaktosylceramid und UDP entstehen (Morell und Radin 1969). Die Synthese der Cerebroside erfolgt somit unabhängig von der Ugcg.

### **1.5.3 Klinische Relevanz von Sphingolipiden und Glykosphingolipiden**

Sphingolipide und im speziellen Glykosphingolipide konnten bisher mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Bei einem gestörten Katabolismus von Sphingolipiden, z.B. aufgrund von Enzymdefekten, kann es zu einer Anreicherung in verschiedenen Geweben und schweren bis tödlichen Erkrankungen kommen (Neufeld 1991, Futerman und van Meer 2004, Kolter und Sandhoff 2006). Der Funktionsverlust der GM3 Synthase, die an der Synthese komplexer Ganglioside beteiligt ist, führt bei Betroffenen beginnend im frühkindlichen Alter zu einem symptomatischen Epilepsie-Syndrom mit eingeschränkter Entwicklung und Blindheit (Simpson et al. 2004). Interessanterweise zeigen GM3 Synthase defiziente Mäuse keinem auffälligen neurologischen Phänotyp, aber eine erhöhte Insulinsensitivität (Yamashita et al. 2003). Ganglioside werden auch mit Alzheimer in Verbindung gebracht (Ariga et al. 2008). Bei Alzheimerpatienten konnte zudem eine veränderte Ugcg-Expression gezeigt werden (Marks et al. 2008). Weitere Erkrankungen, denen eine Beteiligung von Sphingolipiden und Glykosphingolipiden zugeschrieben wird, sind unter anderem Krebs und Diabetes (Lahiri und Futerman 2007).

### **1.5.4 Mausmodelle**

Die konstitutive Deletion von Ugcg ist bereits während der Embryonalentwicklung zwischen Embryonaltag 7.5 und 9.5 aufgrund einer verstärkten Apoptose letal (Yamashita et al. 1999). Dies unterstreicht die Rolle von GSL während der Embryonalentwicklung. Die zellspezifische Deletion von Ugcg in Neuronen durch Expression eines Cre-Transgens unter Kontrolle des Nestin-Promotors führt innerhalb von 11-24 Tagen nach der Geburt zu schweren

neurologische Störungen und zum Tod (Jennemann et al. 2005). GSL sind somit nicht nur für die Embryogenese, sondern auch nach der Geburt für eine regelgerechte Entwicklung des Gehirns essentiell. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Transferasen, die spätere Schritte der Glykosphingolipidsynthese katalysieren, nicht letal sind, aber dennoch in einem deutlichen neurologischen Phänotyp resultieren (Takamiya et al. 1996, Sheikh et al. 1999, Chivegatto et al. 2000, Proia 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Mausmutantenlinie (MML)  $Ugcg^{ff/CamKCreErt2}$  (im Folgenden abgekürzt als *Ugcg*) bietet den Vorteil eines durch Tamoxifen induzierbaren und Cre-vermittelten *Knockouts*, unter Kontrolle des neuronenspezifischen  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases *Ila* (CaMKII $\alpha$ )-Promotors, der im Vorderhirn der Mäuse exprimiert wird (Erdmann et al. 2007). Die Induktion des *Knockouts* zu einem beliebigen Zeitpunkt ermöglicht es, in der juvenilen oder adulten Maus die Auswirkungen der Geninaktivierung auf den Energiehaushalt zu untersuchen, ohne zuvor Einfluss auf die Entwicklung der Maus zu nehmen. In einer Voruntersuchung konnte sowohl ein höheres Körpergewicht als auch eine niedrigere Körpertemperatur der Mutanten gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Absenkung der Körpertemperatur zur Energieeinsparung führen und somit zu dem erhöhten Körpergewicht beitragen könnte. Dazu wurde sowohl das Energiebudget als auch die Entwicklung des Körpergewichts, der Körpertemperatur und Körperzusammensetzung im zeitlichen Verlauf nach Induktion des *Knockouts* untersucht.

## 1.6 Ziele der Promotion

Im Rahmen der vorliegenden Promotion wurde ein Komplettsystem für Energieumsatzmessungen mittels indirekter Kalorimetrie für den Einsatz im Primärscreen des metabolischen Labors etabliert. Ein Ziel ist die Evaluierung der erhobenen Phänotypisierungsdaten für Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz, um den Einsatz der Methode für die Identifizierung metabolischer Phänotypen im Hochdurchsatz zu bewerten. Des Weiteren sollen basierend auf den Phänotypisierungsdaten grundlegende Zusammenhänge zwischen Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz analysiert werden.

In vorhergehenden Versuchen wurden unter Futterentzug zwei Gene identifiziert (*Mct8* und *Hdac2*), die mit einer starken Veränderung der Körpertemperatur einhergingen. In einem weiteren Ansatz wurde daher der Einfluss des konditionalen Gen*knockouts* bei beiden MML auf den Energieumsatz bei *ad libitum* Fütterung sowie unter *Challenge*-Bedingungen (Futterentzug und akute Kälteexposition) weiterführend untersucht. Des Weiteren wurde die MML *Ugcg*, die bei *ad libitum* Fütterung ein erhöhtes Körpergewicht und eine niedrigere

Körpertemperatur aufwies, einer umfassenden Analyse des Energiehaushalts (Energieaufnahme und Energieumsatz) unterzogen. Die Induzierbarkeit des *Knockouts* ermöglichte die zeitliche Analyse der Körpergewichts- und Temperaturentwicklung sowie weiterer Variablen, die an der Gewichtszunahme beteiligt sein könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Haltungsbedingungen

In der Deutschen Mauslinik (GMC) erfolgte die Haltung der Mäuse (*Mus musculus*) in einzelbelüfteten Käfigen (IVC), unter Bedingungen der Sicherheitsstufe S1 und einem spezifisch pathogenfreien Hygienestatus, basierend auf den von der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) definierten Richtlinien. Die Temperatur in den Haltungsräumen betrug  $24 \pm 1$  °C, mit einer Luftfeuchtigkeit von etwa  $45 \pm 10$  %. Die tägliche Photoperiode bestand aus einer 12 h Licht- und 12 h Dunkelphase, wobei um 6:00 MEZ das Licht angeschaltet wurde.

Mausmutantenlinien (MML), die den Primarscreen der GMC durchliefen, wurden in IVC-Racks der Firma BioZone (Ventiracks Bioscreen™, BioZone, UK) in Makrolonkäfigen des Typs II (20.7 \* 14.0 \* 26.5 cm; B \* H \* T) mit Metalldeckel in Gruppen von bis zu 4 Mäusen gehalten. Die Haltung der MML, die im Rahmen eines Sekundärscreens einer detaillierten metabolischen Phänotypisierung unterzogen wurden, erfolgte in IVC-Racks der Firma Tecniplast (Green Line, Sealsafe®PLUS Maus mit Super-TouchSLIMPlus™- Gebläseeinheit, Tecniplast Deutschland GmbH, Deutschland). Die zu dem System gehörigen Sealsafe-Käfige aus Polyphenylsulfon entsprachen in ihrer Abmessung Typ II lang-Käfigen (20.7 \* 14.0 \* 36.5 cm; B \* H \* T), in denen bis zu 5 Tiere gehalten wurden.

Alle Käfige waren mit Einstreu aus Sägespänen (Abedd® - Lab & Vet Service GmbH, Österreich) und im Fall der Einzelhaltung zusätzlich mit einem weichen Papier zum Nestbau (Kimtech Science Labortücher 7216, Kimberly-Clark Professional\*, Deutschland) ausgestattet. Für die Zucht wurde den Mäusen zusätzlich ein Maus-Iglu (Mouse Igloo red, Plexx, Niederlande) als Rückzugsmöglichkeit angeboten. Futter und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Während der Experimente wurden die Tiere zur Erfassung der metabolischen Parameter einzeln gehalten. Wurde den Mäusen in einem Versuch Futter entzogen ist dies in der entsprechenden Versuchsbeschreibung wiedergegeben.

#### 2.1.1 Diäten

Als Standardfutter erhielten die Mäuse Altromin 1314 (Total Pathogenfreies Zucht- und Haltungsfutter, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Deutschland). Ausnahme bildete die die MML  $Ugcg^{f/f//CaMKCreERT2}$  (im Folgenden als Ugcg abgekürzt) aus dem DKFZ Heidelberg. Dort erhielten die Mäuse das Haltungsfutter #3437 von Provimi Kliba (Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten, Provimi Kliba SA, Schweiz), das auch während der Haltung in der GMC

verwendet wurde. In einem fortführenden Experiment wurde der MML Ugcg eine hochkalorische Diät mit 60 kJ % Fett gefüttert (E15741-347, 60 kJ % Fett, ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland).

## **2.2 Mausmutantenlinien im Primärscreen**

Die metabolische Phänotypisierung erfolgte basierend auf einem standardisierten Protokoll (Kap.2.6.4). Die MML durchliefen den metabolischen Screen in der Regel in einem Alter von 12 Wochen und stammten aus verschiedenen Quellen:

Wissenschaftler können unter Einhaltung der Kollaborationsbedingungen einen Antrag zur Phänotypisierung ihrer MML in der GMC stellen. Dies führt zu einer großen Diversität von genetischen Hintergründen der Mäuse als auch der Methoden, die zur Generierung der Mutation eingesetzt wurden. So hatten die MML folgende genetische Hintergründe: BALB/cByJ, C3HeB/FeJ, C57BL/6J, C57BL/6N, C57BL/6xCBA, C57BL/6JXC57BL/6-Tyrc-Brd und 129P2/OlaHsd. Das Genom der Mäuse wurde unter anderem durch folgende Methoden verändert: N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU)- Mutagenese, *Genetrap*, *Knockin*, *Knockout* und Transgen. Die Analyse der Mutanten erfolgte mit Wildtyp- oder heterozygoten Wurfgeschwistern als Kontrollen.

Als Mitglied der *European Mouse Disease Clinic* (EUMODIC, <http://eumodic.org/>) wurden zudem MML des Konsortiums, die in der Regel den genetischen Hintergrund C57BL/6N hatten, primär phänotypisiert. Da für einige der MML keine Wurfgeschwister als Kontrollen zur Verfügung standen, wurden Wildtyp-Mäuse des gleichen genetischen Hintergrunds analysiert und für die Evaluierung verwendet.

## **2.3 Mausmutantenlinien im Sekundärscreen**

Drei Mausmutantenlinien (MML) wurden einer detaillierteren metabolischen Phänotypisierung unterzogen. Zwei der MML (Mct8 und Hdac2) wurden aufgrund ihres metabolischen Phänotyps nach einer primären Phänotypisierung ausgewählt, bei der sie im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeres Körpergewicht sowie eine signifikant niedrigere rektale Körpertemperatur nach zweitägigem Futterentzug zeigten. Die dritte MML Ugcg durchlief keine primäre Phänotypisierung in der GMC. Sie wurde aufgrund eines von den Kooperationspartnern beschriebenen erhöhten Körpergewichts der Mutanten untersucht.

### **2.3.1 Die Mausmutantenlinie Hdac2**

Die Mäuse stammten von Herrn Prof. M. Göttlicher, aus dem Institut für Toxikologie des Helmholtz Zentrum München (Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Deutschland). Die

Zucht sowie die Genotypisierung der Mäuse wurden von dem Kooperationspartner übernommen. Die Mutation wurde mittels *Genetrap* erzeugt (Zimmermann et al. 2007). Die Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C56BL/6J.

### **2.3.1.1 Experimente**

Die metabolische Phänotypisierung der MML umfasste folgende Experimente:

- Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.2.7.4)
- Zweitägiger Futterentzug unter Analyse des Energieumsatzes (Kap.2.7.5)
- Analyse des thermoregulatorischen Verhaltens in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C) (Kap.2.7.6)
- Analyse der Körperzusammensetzung (Fett- und Magermasse) mittels Kernspinresonanzspektroskopie (Kap.2.9.1)

### **2.3.2 Die Mausmutantenlinie Mct8**

Die MML stammte von Herrn Prof. J. Köhrle und PD. Dr. U. Schweizer, aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie der Berliner Charité (Charité- Universitätsmedizin Berlin, Deutschland). Die Mäuse wurden von der Firma Deltagen (San Mateo, USA) generiert. Das Mct8 Gen der Mutanten ist durch Einfügen einer lacZ/Neomycin Kasette in Exon 2 mittels homologer Rekombination inaktiviert worden (Trajkovic et al. 2007). Die Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C57/BL6J.

#### **2.3.2.1 Zucht und Genotypisierung**

##### **Zucht**

Für die Etablierung einer Zuchtkolonie in der GMC wurden Mäuse von Herrn Prof. J. Köhrle und Hr. Dr. U. Schweizer aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie der Berliner Charité zur Verfügung gestellt. Hemizygot *Knockout* Männchen (Mct8<sup>-y</sup>) wurden mit heterozygoten Weibchen (Mct8<sup>+/-</sup>) verpaart. Basierend auf den Genotypen der Eltern gingen aus den Verpaarungen folgende Genotypen hervor: Männchen konnten hemizygot Wildtyp (Mct8<sup>+y</sup>) oder hemizygot *Knockout* (Mct8<sup>-y</sup>) für das Mct8-Allel sein, die Weibchen heterozygot (Mct8<sup>+/-</sup>) oder homozygot *Knockout* (Mct8<sup>-/-</sup>). Gezüchtet wurde bei Raumtemperatur (24 °C ± 1.0 °C) in IVC- Racks der Firma Tecniplast (Kap.2.1). Die Jungtiere verblieben bis zu einem Alter von 21 Tagen beider Mutter. Dann wurden sie abgesetzt und durch Ausstanzen eines Gewebestücks aus dem Ohr, mittels einer Ohrlochzange (Fischer Scientific GmbH, Deutschland), markiert. Die weitere Haltung erfolgte in Gruppen gleichen Geschlechts mit bis zu 5 Mäusen in Typ II-lang Käfigen.

## **Genotypisierung**

Die Mäuse wurden von der Firma Deltagen (San Mateo, Kalifornien, USA) generiert. Das Mct8 Gen ist durch Einfügen einer lacZ/Neo-Kassette in Exon 2 mittels homologer Rekombination inaktiviert worden (Trajkovic et al., 2007). Die Isolierung genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA), gekoppelt mit einer anschließenden Vervielfältigung über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente ermöglichte die Bestimmung der verschiedenen Genotypen. Als Grundlage diente ein in der Arbeitsgruppe von Hr. Dr. Schweizer verwendetes Protokoll.

Zur Gewinnung der genomischen DNA wurden die Ohrgewebestücke einzeln in 1.5 ml Eppendorfcups gegeben, jeweils mit 200 µl Tail-Puffer nach Laird und 1 µl Proteinase K ( $20 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ) versetzt und 60-90 min bis zum vollständigen Verdau bei 55 °C im Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Deutschland) geschüttelt (350 rpm). Anschließend wurden die Proben kurz gevortext (IKA MS3 basic, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland), für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert (Biofugepico, Heraeus, Deutschland) und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt, das 170 µl Isopropanol enthielt. Durch leichtes Schütteln mit der Hand wurde gemischt, bis eine DNA-Flocke sichtbar war. Es folgten weitere 10 min Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) überschichtet und durch leichtes Schütteln im Alkohol gereinigt. Anschließend wurde für 5 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das DNA-Pellet in 20 µl Desoxyribonuclease freiem Wasser aufgenommen werden, dass für 60 min unter Schütteln (350 rpm) im Heizblock bei 55 °C gelöst wurde. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C, sofern sie nicht gleich weiter bearbeitet wurden.

## **Puffer, Enzyme und Reagenzien**

Tail-Puffer nach Laird:	100 mM Tris-HCl, pH 8.5
	5 mM EDTA, pH 8.0
	200 mM NaCl
	0.2 % SDS
Proteinase K	20 µg µl <sup>-1</sup> (Fermentas GmbH, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	70 %
Desoxyribonuclease freies Wasser	

Die genomische DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Für jede Probe wurden zunächst 10 µl ImmoMix, 5 µl doppelt destilliertes Wasser, je 1 µl der Sequenzierprimer 3195 und 58603

sowie 2 µl des Sequenzierprimers 58604 in einem PCR-Cup vorgelegt. Dazu wurde 1 µl der aufgereinigten genomischen DNA-Lösung pipettiert (Gesamtvolumen: 20 µl pro Probe). Eine Leerprobe, die anstelle der DNA 1 µl doppelt destilliertes Wasser enthielt wurde mitgeführt, um potentielle Verunreinigungen ausschließen zu können. Die PCR erfolgte mit einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) nach folgendem Programm:

1. 95 °C – 7 min (Initiale Denaturierung)
2. 95 °C – 10 sec (Denaturierung)
3. 63 °C – 50 sec (Primerhybridisierung)
4. 72 °C – 1 min (Verlängerung)

35 Zyklen Schritt 2-4

5. 72 °C – 3 min (Finale Verlängerung)
6. 8 °C – Lagerung

Bei Bedarf konnte das fertige PCR-Produkt bei -20°C gelagert werden.

### **Reagenzien und Primer**

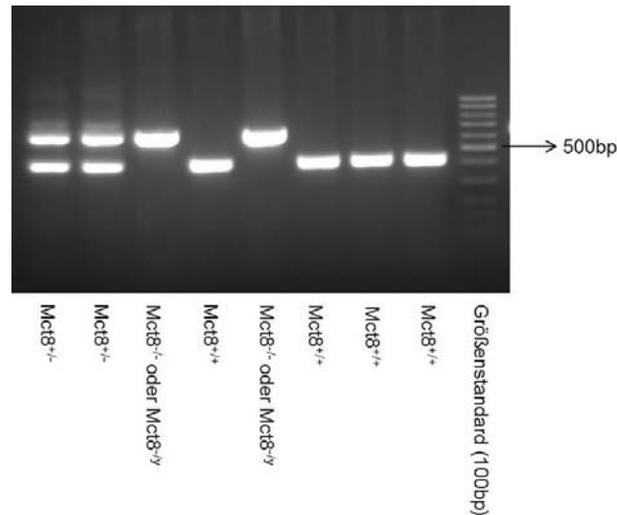
ImmoMix (Bioline GmbH, Deutschland)

Doppelt destilliertes Wasser

Primer (Eurofins MWG Operon, Deutschland)

Primer 1	3195:	GGGCCAGCTCATTCTCCCACTCAT
Primer 2	58603:	TGTGAGTATATTCAGTACCGTTTG
Primer 3	58604:	CAATTCAATGGTCAAAGCAGGACTG

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1.5 %igen Agarosegel, dem 3 µl Ethidiumbromid zugesetzt wurden. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurden 20 µl des PCR-Produkts mit 4 µl Ladebuffer (6 x) versetzt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1 x TAE Puffer überschichtet und mit den Proben sowie 4 µl eines Größenstandards (100 bp DNA Ladder, 500 µg ml<sup>-1</sup>) beladen. Bei einer Spannung von 120 Volt betrug die Elektrophoresedauer ca. 70 min. Unter langwelligem UV-Licht (366 nm) wurden die aufgetrennten DNA Fragmente sichtbar (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Deutschland). Die Größe des PCR-Produktes bei Wildtypen (Mct8<sup>+y</sup>) betrug 411 bp, bei Mutanten (Mct8<sup>-y</sup>, Mct8<sup>-/-</sup>) 639 bp. Bei den heterozygoten Mäusen (Mct8<sup>+/-</sup>) entstanden Produkte beider Größen (Abb.3).



**Abb.3: Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA nach ihrer Größe.** Das PCR-Produkt der männlichen Wildtypen ( $Mct8^{+/y}$ ) war 411 bp lang, das der männlichen oder weiblichen Mutanten ( $Mct8^{-/y}$ ,  $Mct8^{-/-}$ ) 639 bp, bei den heterozygoten Weibchen ( $Mct8^{+/-}$ ) entstanden beide Produkte.

### Puffer, Reagenzien und Größenstandards

1.5 % Agarosegel (100 ml):	1.5 g Agarose
	98.5 ml 1 xTAE Puffer
3 $\mu$ l Ethidiumbromid	10 mg ml <sup>-1</sup> (Carl Roth GmbH+Co. KG, Deutschland)
50 x TAE Puffer (1 L):	242.0 g Tris-BASE
	57.1 ml Eisessig
	100 ml EDTA (0.5 M)
Ladepuffer (6 x)	10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
	0.2 % OrangeG
	60 % Glycerol
	60 mM EDTA
DNA Größenstandard (100 bp)	500 $\mu$ g ml <sup>-1</sup> (New England Biolabs GmbH, Deutschland)

### 2.3.2.2 Experimente

Die metabolische Charakterisierung der MML umfasste folgende Experimente:

- Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.2.7.4)
- Zweitägiger Futterentzug unter Analyse des Energieumsatzes (Kap.2.7.5)
- Analyse des thermoregulatorischen Verhaltens in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C) (Kap.2.7.6)
- Eintägiger Futterentzug für die Analyse der Schilddrüsenhormone im Serum und Organentnahme für die Analyse der Dejodase1 Aktivität in der Leber (Kap.2.14)

- Analyse der Körperzusammensetzung (Fett- und Magermasse) mittels Kernspinresonanzspektroskopie (Kap.2.9.1)

Für die Analyse des täglichen Energieumsatzes und bei zweitägigem Futterentzug wurden die Kohorten vom Kooperationspartner gezüchtet und genotypisiert. Die Kohorte zur Messung des Energieumsatzes in Thermoneutralität und Kälte sowie zur Analyse metabolismusrelevanter Parameter wurde unter Bereitstellung von Zuchtpaaren in der GMC herangezogen und genotypisiert (Kap.2.3.2.1). Resultierend aus dem Zuchtschema wurden bei den Weibchen heterozygote ( $Mct8^{+/-}$ ) mit homozygot *Knockout* ( $Mct8^{-/-}$ ) Weibchen verglichen, bei den Männchen hemizygot Wildtyp ( $Mct8^{+/y}$ ) mit hemizygoten *Knockout* ( $Mct8^{-/y}$ ) Männchen.

### **2.3.3 Die Mausmutantenlinie Ugcg**

Die Mäuse kamen von Herrn Prof. H.-J. Gröne und Dr. R. Jennemann aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg, Deutschland). Die Besonderheit der Linie liegt in dem neuronenspezifischen, durch Tamoxifen induzierbaren, *Knockout* des Ugcg Gens im Vorderhirn der Mäuse (Erdmann et al. 2007). Die Induktion des *Knockouts* zu einem beliebigen Zeitpunkt ermöglicht es, in der juvenilen oder adulten Maus die Auswirkungen der Geninaktivierung auf den Energiehaushalt zu untersuchen, ohne zuvor Einfluss auf die Entwicklung der Maus zu nehmen. Die Mäuse hatten den genetischen Hintergrund C57BL/6J. Die Analyse beschränkte sich auf weibliche Mäuse.

#### **2.3.3.1 Induktion des *Knockouts***

Zucht, Genotypisierung und Induktion des *Knockouts* wurden am DKFZ Heidelberg durchgeführt. Die Altersspanne bei Induktion betrug 6-8 Wochen. Sowohl den Mutanten ( $Ugcg^{f/f/CaMKCreErt2}$ ) als auch den als Kontrollen ( $Ugcg^{f/f}$ ) dienenden Wurfgeschwistern wurde zweimal täglich 1 mg Tamoxifen ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$  in Sonnenblumenöl und 10 % Ethanol, Sigma Aldrich, Deutschland) über einen Zeitraum von 5 Tagen intraperitoneal injiziert, um den *Knockout* zu induzieren. Vor der Injektion wurde das Tamoxifen zunächst im Ultraschallbad für 5 min bei 37 °C in Ethanol gelöst (Bandelin, Deutschland) und im Anschluss mit dem Sonnenblumenöl verdünnt. Tag 1 nach der letzten Tamoxifeninjektion entspricht Tag 1 nach Induktion (p.i.). Die Weibchen wurden in der ersten Woche p.i. in die GMC importiert.

### 2.3.3.2 Experimente

Die metabolische Phänotypisierung umfasste folgende Experimente:

- Bestimmung der Energieaufnahme (Kap.2.7.4)
- Bestimmung des Energieumsatzes nach dem EUMODIC- Protokoll in einer 21-stündigen Messung (Kap.2.6.4)
- Kalkulation der Energiebilanz (Kap.2.7.7)
- Glukosetoleranztest (Kap.2.10)
- Insulintoleranztest (Kap.2.11)
- Bestimmung der spontanen lokomotorischen Aktivität (Kap.2.12)
- Micro-CT Analyse der Körperzusammensetzung (Kap.2.9.2)
- Fütterung einer hochkalorischen Diät (s.u.)

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Experimente, die bei den jeweiligen Kohorten durchgeführt wurden sowie den Versuchszeitpunkt nach Induktion des *Knockouts*. Zusätzlich zu den gelisteten Experimenten wurden ein- bis zweimal wöchentlich das Gewicht, die rektale Körpertemperatur und die Körperzusammensetzung mittels Kernspinresonanzspektroskopie (Kap.2.9.1) bestimmt.

#### **Fütterung einer hochkalorischen Diät**

Die Mäuse der Kohorte 3 bekamen nach ihrer Ankunft in der GMC zunächst das Haltungsfutter # 3437 von Provimi Kliba (Alleinfuttermittel für Mäuse und Ratten, Provimi Kliba SA, Kaiseraugst, Schweiz). Ab der dritten Woche nach Induktion des *Knockouts* wurden die Mutanten-Mäuse randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine der Gruppen erhielt eine hochkalorische Diät mit 60 kJ % Fett (E15741-347, 60 kJ % Fett, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), während die andere Gruppe auf der Haltungsdiät von Provimi Kliba verblieb.

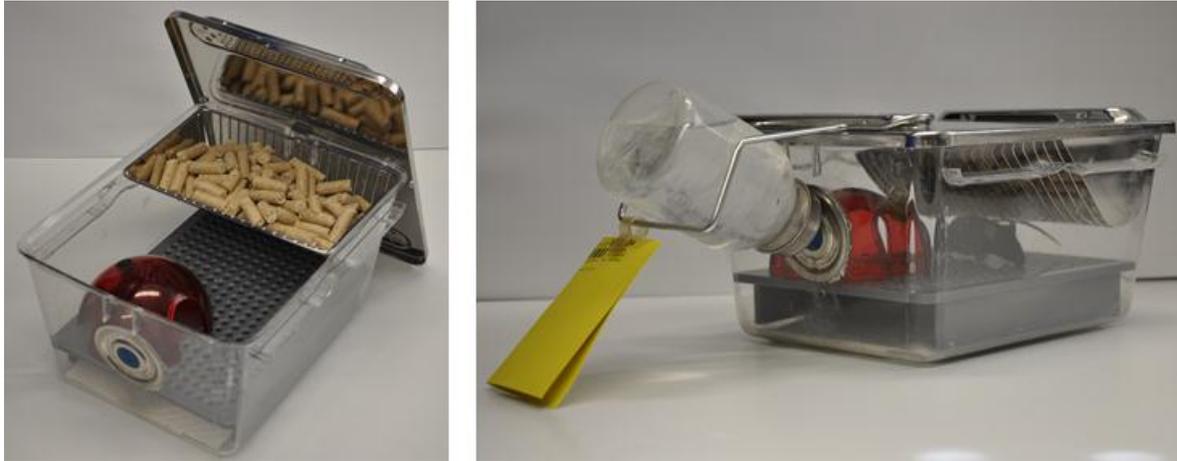
**Tab.1: Experimentüberblick der analysierten Kohorten.** Die Kohorten wurden in der ersten Woche nach Induktion des *Knockouts* in die GMC importiert. Nach einer Eingewöhnungsphase konnte in der zweiten Woche nach Induktion mit den Experimenten begonnen werden.

Woche nach Induktion	Kohorte 1	Kohorte 2	Kohorte 3
	<b>Experimente</b>		
2		Spontane lokomotorische Aktivität	Energieumsatz-I
3	Energieaufnahme-I		Ab hier: Fütterung einer hochkalorischen Diät (60 kJ %)
4		Spontane lokomotorische Aktivität	
5	Energieumsatz-II		
6	Energieaufnahme-II	Spontane lokomotorische Aktivität	
8		Spontane lokomotorische Aktivität	
9	Energieumsatz-III		
10		Insulintoleranztest	
12	Glukosetoleranztest		
13	Micro-CT Analyse der Körperzusammensetzung		

## 2.4 Bestimmung der Energieaufnahme bei *ad libitum* Fütterung

### 2.4.1 Haltungsbedingungen

Zur Bestimmung der Energieaufnahme wurden die Mäuse einzeln in Makrolonkäfigen des Typs II gehalten. Der Boden der Käfige war mit einer Schicht saugfähiger Küchenrolle (Tork Premiun, SCA Hygiene Products AFH Sales GmbH, Deutschland) und einer speziell angefertigten Lochplatte (16.7 \* 2 \* 22.5 cm, B \* H \* T, Feinmechanik Werkstatt der Philipps Universität Marburg) ausgestattet. Die Löcher der Platte hatten einen Durchmesser von 0.5 cm. Ein Bereich von etwa 8 \* 9 cm wurde von den Löchern als Rückzugsmöglichkeit ausgespart und mit einem Maus-Iglu versehen (Abb.4). Papier und Lochplatte wurden anstelle von Einstreu verwendet, um den Kot sowie das von den Mäusen geraspelte Futter nach Versuchende besser sammeln zu können, und überschüssige Flüssigkeit wie Urin aufzusaugen. Während des Versuchs stand den Mäusen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Nach Versuchsende wurden die Mäuse wieder in ihre Standard-Haltungskäfige überführt.



**Abb.4: Käfigausstattung zur Bestimmung der Energieaufnahme.** Zu sehen ist ein Typ II Käfig, der am Boden mit einem saugfähigen Papier und einer Lochplatte sowie einem Maus-Iglu als Rückzugsmöglichkeit ausgestattet ist.

#### 2.4.2 Bestimmung von Körpergewicht, rektaler Körpertemperatur, Futteraufnahme und Kotproduktion

In einem Versuchsvorlauf über 3 Tage konnten sich die Mäuse an die unbekanntes Lochplatten gewöhnen. Zum Start des Experiments wurden sie in neue, saubere Käfige überführt. In der folgenden Experimentdauer, von in der Regel 5 Tagen, wurde täglich zwischen 8:00 und 9:00 MEZ das Körpergewicht und die Futteraufnahme ermittelt. Die rektale Körpertemperatur wurde zweimal wöchentlich zwischen 8:00 und 9:00 MEZ bestimmt. Bei einer Experimentdauer von 9 Tagen wurden Körpergewicht, Futteraufnahme und rektale Körpertemperatur zu 3 Zeitpunkten ermittelt. Das Gewicht wurde auf einer Waage (440-47N, Kern & Sohn GmbH, Deutschland) mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.1$  g und die rektale Körpertemperatur über einen Rektalfühler (Temperaturmessgerät ALMEMO 2390-1 mit Fühlertyp N856-1, Ahlborn, Deutschland) mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.01$  °C bestimmt. Zur Analyse der Futteraufnahme wurden die Futterraufen täglich gewogen ( $\pm 0.1$  g) und die Differenz zum Vortag berechnet. Nach Abschluss des Experiments wurden der Kot und das geraspelte Futter der Mäuse in eine Petrischale überführt und für mindestens 72 h bei 60 °C im Umluft-Trockenschrank (ULM 400, Memmert GmbH + Co.KG, Deutschland) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach wurden Kot und Futter mittels Pinzette voneinander separiert und im Anschluss gewogen ( $\pm 0.1$  g). Die Menge an geraspeltem Futter wurde zur Korrektur der täglichen Futteraufnahme verwendet und im Anschluss verworfen, der getrocknete Kot für die Bestimmung des Energiegehalts mittels Bombenkalorimetrie aufbereitet (Kap.2.4.3.1).

### **2.4.3 Bombenkalorimetrie**

Die Bombenkalorimetrie ist eine Methode zur Bestimmung des kalorischen Wertes (Brennwertes) von oxidierbaren Stoffen. Zur Bestimmung des Energiegehalts der Kot- und Futterproben wurde ein System der Firma IKA verwendet (C7000, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland).

#### **2.4.3.1 Probenaufbereitung und Kalibrierung des Aufschlussgefäßes**

Der getrocknete Kot wurde mit einer Kaffeemühle (KM 3871, Severin, Deutschland) zerkleinert. Auf einer Feinwaage (CP123S, Sartorius AG, Deutschland) wurde 1 g des zermahlenden Kots abgewogen und mit einer Brikettierpresse (C21) zu einer Tablette gepresst. Zur Bestimmung des Brennwertes der Diät wurde diese, genau wie der Kot, zu einer Tablette aufbereitet. Bis zur Analyse des kalorischen Wertes wurden die Tabletten im Umluft-Trockenschrank bei 60 °C aufbewahrt.

Die Kalibrierung des Aufschlussgefäßes (C7010) erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels Benzoessäure (Parr Instrument GmbH, Deutschland). Dazu wurden 5 etwa 1 g schwere Benzoessäuretablets mit bekanntem Energiegehalt (26.454 MJ kg<sup>-1</sup>) verbrannt und der mittlere Brennwert als Kalibrierwert der Bombe in das Kalorimeter eingegeben.

#### **2.4.3.2 Bestimmung des Energiegehalts**

Der Energiegehalt wurde mittels Bombenkalorimeter (C7000) nach dem trockenen Verfahren bestimmt. Vor der Messung wurde das Gewicht der Tablette ( $\pm 0.001$  g) bestimmt und zur Verrechnung in das Bombenkalorimeter eingegeben. Für die Analyse wurde die Probe in den Quarztiegel (C4) gelegt und mit einem Baumwollfaden (C 710.4, Brennwert: 50 J) die Verbindung zwischen der Probe und dem Platin-Zünddraht des Aufschlussgefäßes hergestellt. Die Bombe wurde mit einem Überdruck von 30 bar reinen Sauerstoff befüllt (C48) und in die Messzelle des Bombenkalorimeters gestellt. Die bei der Verbrennung entstehende Temperaturerhöhung ist proportional zum Brennwert der Probe, der sich aus dem Gewicht der Probe (P), der Temperaturerhöhung ( $\Delta T$ ) und der Wärmekapazität (C) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Brennwert (J g}^{-1}\text{)} = C \text{ (J K}^{-1}\text{)} * \Delta T \text{ (K)} * P^{-1} \text{ (g)}$$

### **2.4.3.3 Metabolisierbare Energie und Assimilationskoeffizient**

Als metabolisierbare Energie bezeichnet man den für den Organismus zur Verfügung stehenden Energiebetrag, der nach Abzug der nicht nutzbaren Energie, die über den Kot und Urin verloren geht, von der über die Nahrung aufgenommenen Energiemenge übrig bleibt.

Der Assimilationskoeffizient beschreibt die Effizienz mit der Energie aus der Nahrung gewonnen wird.

### **2.4.3.4 Berechnung der metabolischen Parameter**

Durch Multiplikation der täglichen Futterraufnahme ( $F_{up}$ ) mit dem Brennwert des Futters ( $E_{food}$ ) konnte die tägliche Energieaufnahme ( $E_{up}$ ) berechnet werden:

$$E_{up} \text{ (kJ d}^{-1}\text{)} = F_{up} \text{ (g d}^{-1}\text{)} * E_{food} \text{ (kJ g}^{-1}\text{)}$$

Für die Berechnung der metabolisierbaren Energie ( $E_{met}$ ) wurde die über Kot ( $E_{fec}$ ) und Urin (2 % von  $E_{up}$ , Drozd 1975) ausgeschiedene Energiemenge von der täglichen Energieaufnahme ( $E_{up}$ ) subtrahiert:

$$E_{met} \text{ (kJ d}^{-1}\text{)} = (E_{up} \text{ [kJ d}^{-1}\text{]} * 0.98) - (E_{fec} \text{ [kJ g}^{-1}\text{]} * \text{Kot [g d}^{-1}\text{]})$$

Der Assimilationskoeffizient ergibt sich aus dem Verhältnis von metabolisierbarer Energie ( $E_{met}$ ) und Energieaufnahme ( $E_{up}$ ):

$$F_{ass} \text{ (\%)} = E_{met} \text{ (kJ d}^{-1}\text{)} * 100 * E_{up}^{-1} \text{ (kJ d}^{-1}\text{)}$$

## **2.5 Analyse des Energieumsatzes mittels indirekter Kalorimetrie**

Energieumsatz ist der Vorgang, bei dem durch den Abbau von Nährstoffen Energie für den Betrieb der Lebensprozesse gewonnen wird. Beim aeroben Stoffwechsel werden Nährstoffe unter Sauerstoffverbrauch zu Kohlendioxid, Wasser und Energie umgesetzt. Mittels indirekter Kalorimetrie kann der Energieumsatz eines Organismus aus dem Gaswechsel (Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion) über das kalorische Äquivalent, das dem Energiegewinn pro Liter verbrauchten Sauerstoff entspricht, bestimmt werden. Abhängig vom oxidierten Substrat (Fette, Proteine oder Kohlenhydrate) beträgt das kalorische Äquivalent etwa 19-21 kJ l O<sub>2</sub><sup>-1</sup>. Die zeitgleiche Analyse von Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion ermöglicht zudem die Bestimmung der respiratorischen Austauschrate (RER), die sich aus dem Verhältnis von Kohlendioxidproduktion zu

Sauerstoffverbrauch ( $\text{Vol \% VCO}_2 / \text{Vol \% VO}_2$ ) berechnet und eine Aussage über das zur Energiegewinnung oxidierte Substrat ermöglicht. Bei einer reinen Kohlenhydratoxidation entspricht die Menge des verbrauchten Sauerstoffs der Kohlendioxidproduktion, wodurch sich eine RER von 1.0 ergibt (Heldmaier und Neuweiler 2004). Werden vermehrt Proteine oxidiert, ändert sich das Verhältnis aufgrund einer erhöhten Kohlendioxidproduktion gegenüber dem verbrauchten Sauerstoff, wodurch sich die RER auf etwa 0.84 erniedrigt. Lipidverbrennung liegt mit einer RER von ungefähr 0.7 nochmals deutlich unter der von Proteinen.

Für die Bestimmung des Energieumsatzes wurden zwei unterschiedliche Messsysteme genutzt: Ein Komplettsystem der Firma Sable Systems (SM-MARS-8A, USA), für die simultane Analyse von bis zu 7 Mäusen bei Raumtemperatur, wurde für die Hochdurchsatzanalyse im Primärscreen verwendet (Kap.2.6). Für die detaillierte Analyse ausgewählter Mausmutantenlinien wurde ein Messsystem genutzt, das eine parallele Analyse von maximal 4 Mäusen ermöglichte. Bei dieser Anlage befanden sich die Stoffwechselkäfige in einem Klimaprüfschrank, wodurch die Umgebungstemperatur bei Bedarf verändert werden konnte (Kap.2.7).

### **2.5.1 Obligatorische und fakultative Thermogenese**

Als obligatorische Thermogenese bezeichnet man den Grundumsatz eines ruhenden, postabsorptiven und normothermen Tieres. Bei thermoneutraler Umgebungstemperatur (Thermoneutralzone) entspricht die obligatorische Thermogenese dem Basalstoffwechsel. Innerhalb der Thermoneutralzone ist die durch den Basalstoffwechsel entstehende Wärmebildung ausreichend, um die Körpertemperatur einzig durch physikalische Regulation (Vasokonstriktion, Körperhaltung, Wärmeisolierung) normotherm zu halten. Außerhalb der Thermoneutralzone spricht man von dem Ruhestoffwechsel, der sich aus dem Basalstoffwechsel und der thermoregulatorischen Wärmebildung zusammensetzt.

Außerhalb der Thermoneutralzone kann eine normotherme Körpertemperatur nur durch zusätzliche Wärmebildung aufrechterhalten werden, was als adaptive (fakultative) Thermogenese bezeichnet wird. Unterhalb der Thermoneutralzone geschieht dies u.a. durch Kältezittern, zitterfreie Wärmebildung und Aktivität, wobei der Bedarf an zusätzlicher Wärmebildung entsprechend dem Scholander Modell der Thermoregulation mit sinkender Umgebungstemperatur zunimmt (Scholander et al 1950).

### **2.5.2 Torpor**

Torpor (auch täglicher Torpor) ist eine adaptive Reaktion auf Nahrungsmangel und dient der Energieeinsparung zur Regulierung des Energiehaushalts. Während des Torpors senkt ein

Tier seinen Energieumsatz über mehrere Stunden unterhalb des Grundumsatzes ab. In Folge kommt es zu einer starken Absenkung der Körpertemperatur, die jedoch auch während des Torporereignisses aktiv reguliert werden kann. Der Torporeintritt (Einschlafphase) ist durch ein kontinuierliches Absenken des Energieumsatzes gekennzeichnet, der Austritt (Aufwachphase) durch eine schnelle Steigerung innerhalb weniger Minuten.

## **2.6 Analyse des Energieumsatzes im Primärscreen**

Die Analyse des Energieumsatzes erfolgte mittels indirekter Kalorimetrie in einem offenen respirometrischen System der Firma Sable Systems (SM-MARS-8A, USA), basierend auf einem für das *European Mouse Disease Clinic* (EUMODIC, <http://.eumodic.org/>)-Konsortium entwickelten standardisierten Phänotypisierungsprotokoll.

### **2.6.1 Aufbau der Messanlage**

Die Energieumsatzmessungen erfolgten in Typ I-Lang Stoffwechselküvetten (17.0 \* 14.3 \* 36.4 cm, B \* H \* T), die sich in einem modifizierten Serverschrank befanden (Abb.5, Abb.6). In diesen wurde kontinuierlich ein leichter Überdruck an Pressluft geleitet, um die Luftzusammensetzung während der Messung so konstant wie möglich zu halten. Über Einheiten, bestehend aus Massenflussmesser und Pumpe (MFS2-Einheit), wurde das Gasgemisch mit einer konstanten Flussrate (900 ml min<sup>-1</sup>) über zwei mit Löchern versehene Metallstäbe, die etwa 2 cm über dem Käfigboden verliefen, aus den Käfigen abgesaugt. An der Außenseite der Käfige gelangte es zur Weiterleitung in gas- und wasserundurchlässige Schläuche (Bev-A-Line, Saint Gobain Performance Plastics). Ein Spalt zwischen der Stoffwechselküvette und dem aufgesetzten Deckel diente dem Nachströmen von Umgebungsluft. Nach Passage der MFS2-Einheiten gelangte das zu analysierende Gasgemisch in den Multiplexer (RM-8), der über elektrisch gesteuerte Magnetventile ein beliebiges Umschalten zwischen den einzelnen Käfigen ermöglichte. Über eine computergesteuerte Software konnte festgelegt werden, welches Gasgemisch (welcher Stoffwechselküvette) der Gasanalyse zugeführt wird. Das nicht analysierte Gasgemisch der übrigen Küvetten gelangte an die Umgebung. Nach Passage des Multiplexers wurde über die ND2-Einheit eine Teilprobe (~ 450 ml h<sup>-1</sup>) genommen, die zunächst durch den RH-300, einer Einheit zur Bestimmung des Wasserdampfdrucks (kPa) und anschließend zur Gasanalyse durch den Sauerstoffanalysator (FC-10a) und den Kohlendioxidanalysator (CA-10a) gepumpt wurde. Für eventuell auftretende Schwankungen der Luftzusammensetzung wurde immer eine leere Stoffwechselküvette (ebenfalls mit Futter, Wasser und Tuch ausgestattet) mitgeführt, deren Gaszusammensetzung ebenfalls analysiert

und als Nullreferenz zur Korrektur der Tierküvetten diene. Der Messaufbau ermöglicht die parallele Messung von bis zu 7 Mäusen.

Alle Daten (Sauerstoffgehalt [%], Kohlendioxidgehalt [%], Flussrate [ $\text{ml h}^{-1}$ ], Wasserdampfdruck [kPa]) wurden letztendlich über ein Interface (UI-2) an einen Computer weitergeleitet.



Abb.5: Komplettsystems für Energieumsatzmessungen im Primärscreen und Stoffwechselküvetten. Während der Messung stand den Mäusen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

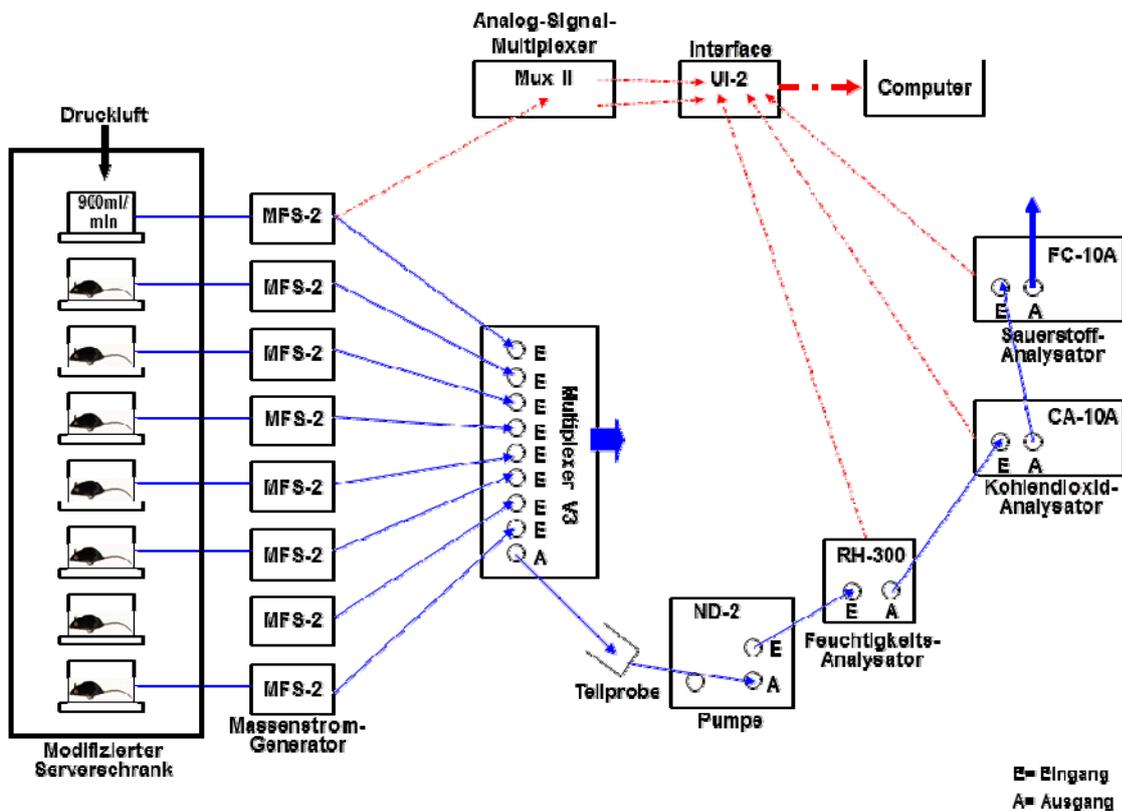


Abb.6: Schematische Darstellung des Komplettsystems für Energieumsatzmessungen im Primärscreen. Der Aufbau ermöglicht die zeitgleiche Analyse des Energieumsatzes von bis zu 7 Mäusen und einer Referenzküvette bei Raumtemperatur ( $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). In Blau ist der Gasweg, in Rot der Weg der Datenübertragung dargestellt.

## **2.6.2 Kalibrierung der Analysatoren**

Zur Kalibrierung des Sauerstoff- und Kohlendioxidanalysators wurde das entsprechende Eichgas in die MFS-2 Einheit von Stoffwechselküvette 1 geleitet (Grundeinstellung des Multiplexers) und durchlief so das gesamte Messsystem bis hin zu den Analysatoren. Es wurde mit der gleichen Flussrate ( $900 \text{ ml h}^{-1}$ ) geeicht, mit der während der Messung aus den Stoffwechselküvetten abgesaugt wurde.

Der Sauerstoffanalysator wurde mittels Einpunktmessung vor jedem Messtag durch Pressluft (Sauerstoffkonzentration  $\sim 20.95 \%$ ) kalibriert, der Nullpunkt ein bis zweimal jährlich über Stickstoff (Reinheit 4.5, Linde AG, Deutschland). Der Kohlendioxidanalysator wurde vor jedem zweiten Messtag über eine Zweipunktmessung kalibriert. Für den Nullpunkt wurde Stickstoff (Reinheit 4.5, Linde AG, Deutschland) verwendet, der zweite Kalibrierpunkt wurde durch ein Gasgemisch mit  $0.500 \%$   $\text{CO}_2$  ( $0.500 \%$   $\text{CO}_2$  in  $\text{N}_2$ , Linde AG, Deutschland) festgelegt.

Der Nullpunkt des RH-300 zur Bestimmung des Wasserdampfdrucks wurde alle 3-4 Wochen kalibriert. Dazu wurde eine mit Magnesiumperchlorat (Fischer Scientific GmbH, Deutschland) gefüllte Plastikröhre in den Gasweg zwischen Multiplexer und RH-300 eingebaut. Nach einer Einleitungsdauer von etwa 30 min und konstantem Messwert wurde der Nullpunkt am RH-300 neu eingestellt.

## **2.6.3 Datenerfassung und Aufbereitung**

Die Datenerfassung erfolgte über das Softwareprogramm ExpeData (Version 1.1.22, Sable Systems, USA), dessen flexible Gestaltung eine bedarfsorientierte Datenerhebung und Auswertung ermöglichte. Das Messintervall pro Küvette betrug 73 sec. Die Aufzeichnung von Sauerstoffverbrauch (%), Kohlendioxidproduktion (%), Wasserdampfdruck (kPa) und Flussrate ( $\text{ml h}^{-1}$ ) erfolgte im 1 sec Intervall. Um den stündlichen Messzyklus von 3600 sec abzuschließen wurde die Leerküvette am Ende des letzten Messzyklus für 96 sec gemessen. Bei zeitgleicher Messung von 8 Stoffwechselküvetten (7 Tierküvetten plus Leerküvette) wurde eine Auflösung von 6 Messwerten pro Küvette und Stunde erreicht. Für die Auswertung wurden die letzten 15 sec jedes 73 sec Messintervalls einer Küvette, in denen stabile Messwerte registriert wurden, verwendet.

Für die Aufbereitung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Sable Systems ein Makro erarbeitet, das aus den während der Messung erhobenen Rohdaten für Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt (%) des Atemgases unter Berücksichtigung des Wasserdampfdrucks (kPa) und der Flussrate ( $\text{ml h}^{-1}$ ) den Sauerstoffverbrauch ( $\text{VO}_2$  [ $\text{ml h}^{-1}$ ]) und die Kohlendioxidproduktion ( $\text{VCO}_2$  [ $\text{ml h}^{-1}$ ]) der Mäuse kalkulierte. Die respiratorische

Austauschrate und der Energieumsatz (mW) wurden automatisch nach den in Kapitel 2.7.3 angegebenen Formeln berechnet.

## 2.6.4 Versuchsdurchführung

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur ( $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durchgeführt. Die Phänotypisierung basierte auf einem für das EUMODIC-Konsortium entwickelten, standardisierten Protokoll. Die Messdauer betrug 21 Stunden, wobei die Messung 5 Stunden vor Beginn der Dunkelphase gestartet (13:00 MEZ) und am nächsten Vormittag 4 Stunden nach Beginn der Lichtphase beendet wurde (10:00 MEZ, Abb.7). Als Einstreuersatz in den Stoffwechselküvetten diente ein kleines Stück Einmalhandtuch (11 \* 11 cm, Kleenex Ultra 6772, Kimberly-Clark Professional\*, Deutschland). Etwa 15 Minuten vor Messbeginn wurden die Mäuse in die Küvetten gesetzt und in den modifizierten Serverschrank überführt. Den Mäusen stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Das Körpergewicht ( $\pm 0.1 \text{ g}$ ) wurde vor und nach der Messung bestimmt, wobei das mittlere Körpergewicht für die Auswertungen verwendet wurde. Die Analyse der Körpertemperatur erfolgte nach der Messung mittels Rektalfühler ( $\pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ , Temperaturmessgerät ALMEMO 2390-1 mit Fühlertyp N856-1, Ahlborn, Deutschland).

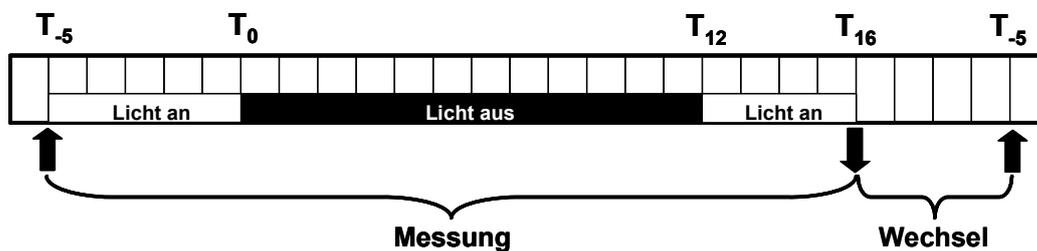


Abb.7: Überblick über den täglichen Arbeitsablauf zur Analyse des Energieumsatzes bei Raumtemperatur. Der Energieumsatz der Mäuse wurde in einer 21 Stunden Messung bestimmt, die 5 Stunden vor Licht aus gestartet und 4 Stunden nach Licht an am folgenden Vormittag beendet wurde. Das Körpergewicht der Mäuse wurde vor und nach der Messung bestimmt, die rektale Körpertemperatur nach der Messung. Den Mäusen standen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

## 2.6.5 Evaluierung des Energieumsatzes

Alle MML, die zum Zeitpunkt der Messung ein Alter von 10-14 Wochen hatten, sind in die Auswertung einbezogen worden. Für die Evaluierung der erhobenen Stoffwechseldaten wurden verschiedene Parameter definiert: Der Energieumsatz wurde als Mittelwerte der 126 Messwerte über den 21 Stunden Messzeitraum berechnet. Der minimale Energieumsatz entspricht dem niedrigsten der 126 ermittelten Messwerte und spiegelt daher eine Annäherung an den Ruhestoffwechsel wieder.

## 2.7 Analyse des Energieumsatzes im Sekundärscreen

Der Energieumsatz der MML Mct8 und Hdac2 wurde mittels indirekter Kalorimetrie in einem offenen respirometrischen System unter verschiedenen Bedingungen (Futter *ad libitum*, Futterentzug, variierende Umgebungstemperaturen) analysiert. Auch der Energieumsatz der MML Ugcg wurde im Rahmen des Sekundärscreens analysiert, jedoch unter Verwendung des in Kapitel 2.6 beschriebenen Setups.

### 2.7.1 Aufbau der Messanlage

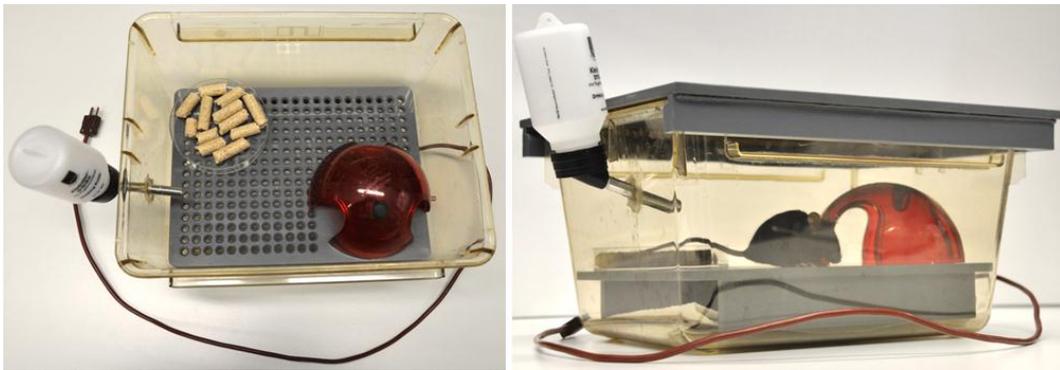
Die Stoffwechselküvetten befanden sich in einem Klimaprüfschrank (WK111-180, Weiss Umwelttechnik GmbH, Deutschland), in dem die Lufttemperatur mit einer Genauigkeit von  $\pm 1.0$  °C reguliert werden konnte. Die Beleuchtung erfolgte von außen in der Photoperiode der Haltungsräume (Licht an 6:00 MEZ, Licht aus 18:00 MEZ). Während der Messung strömte kontinuierlich Pressluft in den Klimaprüfschrank, die über einen Ventilator gleichmäßig verteilt wurde. Bei den Stoffwechselküvetten handelte es sich um modifizierte Makrolonkäfige vom Typ II. Diese waren mit einem Stück Küchenrolle, einer Lochplatte und Mausiglu sowie einer Petrischale mit Futter ausgestattet (Abb.8). Von außen waren eine Trinkflasche mit Kugelverschluss (50 ml, Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Deutschland) sowie ein Absaugstutzen aus Metall angebracht. Als Abdeckung diente ein speziell angepasster Schiebedeckel aus PVC (Anfertigung in der Zentralwerkstatt des Helmholtz Zentrum München). Die Aufzeichnung der Küvetteninnentemperatur ( $T_k$ ) erfolgte mittels Thermoelement mit einer Genauigkeit von  $\pm 0.01$  °C.

Durch den Absaugstutzen in der Küvette wurde das Gasgemisch mit einer Flussrate von  $50 \text{ l h}^{-1}$  über einen gasdichten Schlauch (Tygon R3603, Saint Gobain Performance Plastics, USA) mit einer Membranpumpe (TR S, Schego, Schemel & Goetz GmbH & Co.KG, Deutschland) druckfrei abgesaugt (Abb.9). Über einen Spalt zwischen Küvette und Deckel an der dem Absaugstutzen gegenüberliegenden Seite strömte Umgebungsluft nach, wodurch die Küvette kontinuierlich mit Luft durchströmt wurde. Das abgesaugte Gasgemisch wurde durch elektronische Kühlfallen (ECP-1000, M&C Products Analysentechnik GmbH, Deutschland) getrocknet. Über vom Computer gesteuerte Magnetventile (Typ 312, Bürkert, Jakob Fischer GmbH, Deutschland), die ein Umschalten zwischen den einzelnen Kanälen ermöglichten, gelangte das Gasgemisch durch einen thermoelektronischen Massenflussmesser (Millipore Typ FC 260, Millipore-Tylan Corporation, USA), bevor es dem Kohlendioxydanalysator (Uras14, Advance Optima, ABB, Deutschland) und Sauerstoffanalysator (Magnos 106, Advance Optima, ABB, Deutschland) zugeführt wurde. Parallel zum Messgas der Tierküvetten wurde den Analysatoren ein Vergleichsgas aus dem

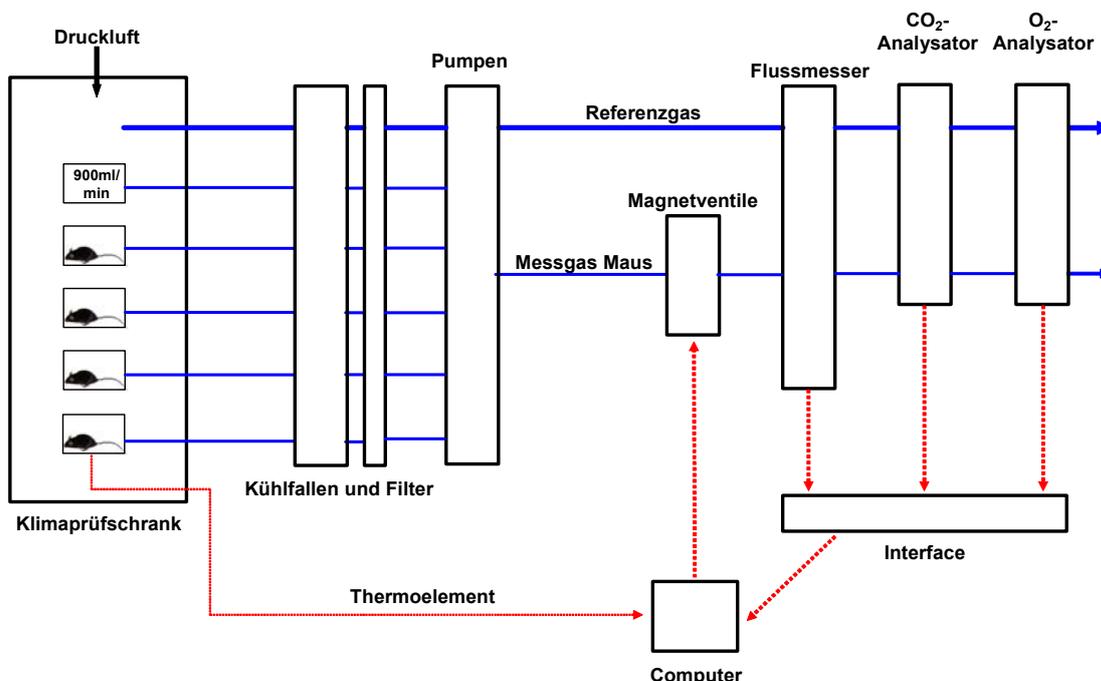
Innenraum des Klimaprüfschranks zugeführt und mit dem analysierten Messgas der Tierküvetten verrechnet.

Die Gaszusammensetzung einer leeren Stoffwechselküvette (Nullreferenz) diente der Korrektur der Tierküvetten für eventuell auftretende Schwankungen der Luftzusammensetzung. Der Aufbau der Messanlage ermöglichte die parallele Messung von bis zu 4 Mäusen plus Leerküvette (Nullreferenz).

Alle Daten (Sauerstoffgehalt [ $\Delta$  Vol %], Kohlendioxidgehalt [ $\Delta$  Vol %], Flussrate [ $\text{ml h}^{-1}$ ], Küvetten Innentemperatur  $T_k$  [ $^{\circ}\text{C}$ ]) wurden letztendlich über ein Interface (Typ Almemo 5590, Ahlborn, Deutschland) an einen Computer weitergeleitet.



**Abb.8: Stoffwechselküvette für Energieumsatzmessungen im Sekundärscreen.** Den Mäusen standen Wasser *ad libitum* sowie ein Mausiglu als Rückzugsmöglichkeit zur Verfügung. Bei Analyse des täglichen Energieumsatzes erhielten die Mäuse Futter *ad libitum* in einer Petrischale.



**Abb.9: Schematische Darstellung des Aufbaus für Energieumsatzmessungen im Sekundärscreen.** Der Aufbau ermöglicht die zeitgleiche Analyse des Energieumsatzes von bis zu 4 Mäusen und einer Referenzküvette bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. In Blau ist der Gasweg, in Rot der Weg der Datenübertragung dargestellt.

### 2.7.2 Kalibrierung der Analysatoren

Die Kalibrierung des Sauerstoff- und Kohlendioxidanalysators erfolgte vor jeder Messung. Beide Analysatoren wurden über eine Zweipunkteichung kalibriert. Dazu wurde das entsprechende Gasgemisch vor der Kühlfalle eingeleitet und durchlief so den gesamten Gasweg. Der Nullpunkt des Sauerstoffanalysators wurde mittels 20.12 % Sauerstoff kalibriert, das über eine Gasmischpumpe (Typ 5KA27/7, Wösthoff Messtechnik GmbH, Deutschland) aus Pressluft (20.95 % O<sub>2</sub>) und 4 % Stickstoff (Reinheit 4.5, Linde AG, Deutschland) hergestellt wurde. Als zweiter Kalibrierpunkt diente Pressluft (20.95 % O<sub>2</sub>). Die Kalibrierung des Nullpunkts am Kohlendioxidanalysators erfolgte über Stickstoff (Reinheit 4.5, Linde AG, Deutschland), der zweite Kalibrierpunkt wurde über interne Kalibrierküvetten eingestellt.

### 2.7.3 Datenerfassung und Aufbereitung

Zur Erfassung der Daten wurde das Softwareprogramm AMR Wincontrol Messwerterfassung (Akrobit Software GmbH, Deutschland) verwendet. Über ein Zeitintervall von 60 sec wurde alternierend aus jeder Küvette das Gasgemisch abgesaugt und der Gasanalyse zugeführt. Vom dem Softwareprogramm wurden nur der Messwert der letzten Sekunde eines jeden Messintervalls aufgezeichnet. Bei paralleler Messung von 5 Küvetten entsprach dies einer Auflösung von 12 Messwerten pro Küvette und Stunde. Folgende Parameter wurden pro Messintervall von dem Softwareprogramm aufgezeichnet: Die Zeit (min), Küvetten Innentemperatur (°C), Flussrate (l h<sup>-1</sup>) sowie die Gas-Differenzen Δ O<sub>2</sub> (Vol %) und Δ CO<sub>2</sub> (Vol %).

Anhand der Unterschiede in der Gaszusammensetzung (Δ Vol %) und der Flussrate (l h<sup>-1</sup>) war eine Berechnung verschiedener Variablen nach folgenden Gleichungen möglich (Heldmaier 1975, Heldmaier und Ruf 1992):

Sauerstoffverbrauch VO<sub>2</sub> (ml h<sup>-1</sup>) und Kohlendioxidproduktion VCO<sub>2</sub> (ml h<sup>-1</sup>) einer Maus wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$VO_2 (\text{ml h}^{-1}) = \Delta \% O_2 * \text{Luftfluss (l h}^{-1}) * 10$$

$$VCO_2 (\text{ml h}^{-1}) = \Delta \% CO_2 * \text{Luftfluss (l h}^{-1}) * 10$$

Die respiratorische Austauschrate (RER) und der Energieumsatz HP (mW) wurden durch folgende Gleichungen kalkuliert:

$$\text{RER} = \text{VCO}_2(\text{ml h}^{-1})/\text{VO}_2(\text{ml h}^{-1})$$

$$\text{HP (mW)} = (4.44 + 1.43 * \text{RER}) * \text{VO}_2$$

## 2.7.4 Bestimmung des täglichen Energieumsatzes

### 2.7.4.1 Versuchsdurchführung

Die Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (DEE) wurde bei Haltungstemperatur ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) durchgeführt. Der Versuch gliederte sich in eine Vorlaufphase von 15 Stunden, in der die Mäuse ausreichend Zeit hatten, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen, die eigentliche Auswertungsphase von 24 Stunden, die eine komplette Licht- und eine Dunkelphase von jeweils 12 Stunden umfasste sowie einen kurzen Nachlauf von etwa 2 Stunden. Für die Messung wurden die Mäuse einzeln in die Stoffwechselküvetten gesetzt und um 15:00 MEZ in den Klimaprüfschrank überführt. Zur Bestimmung des täglichen Energieumsatzes wurde das Intervall, beginnend am nächsten Morgen mit Licht an um 6:00 MEZ bis zum Beginn der nächsten Lichtphase genutzt. Der Versuch wurde um 8:00 MEZ beendet.

Während des gesamten Messzeitraums stand den Mäusen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Körpergewicht ( $\pm 0.1 \text{ g}$ ) wurde vor und nach der Messung bestimmt und der Mittelwerte für die Evaluierung verwendet. Die rektale Körpertemperatur ( $\pm 0.01^\circ\text{C}$ ) wurde nach der Messung bestimmt.

### 2.7.4.2 Evaluierung des Energieumsatzes und der respiratorischen Austauschrate

#### Der tägliche Energieumsatz

Der tägliche Energieumsatz (mW) wurde als Mittelwert aller in dem 24 Stunden Intervall registrierten 288 Messwerte bestimmt.

#### Energieumsatz in der Licht- und Dunkelphase

Der Energieumsatz in der Licht- (mW) und Dunkelphase (mW) wurde als Mittelwert des jeweiligen 12-stündigen Zeitintervalls (jeweils 144 Messwerte) berechnet.

#### Der Ruhestoffwechsel

Der Ruhestoffwechsel (mW) entspricht dem Mittelwert über ein 15-minütiges Messintervall (3 Messwerte), in dem die Mäuse einen stabilen, niedrigen Energieumsatz aufwiesen. Dieser wurde als Ruhephase interpretiert.

## **Die respiratorische Austauschrate**

Die respiratorische Austauschrate wurde, genau wie der tägliche Energieumsatz, als Mittelwert aller in dem 24 Stunden Intervall registrierten 288 Messwerte bestimmt sowie als Mittelwert getrennt für die Licht- und Dunkelphasen, die in dem 12-stündigen Zeitintervall aus jeweils 144 Messwerten bestanden.

## **2.7.5 Bestimmung des Energieumsatzes unter zweitägigem Futterentzug**

### **2.7.5.1 Versuchsdurchführung**

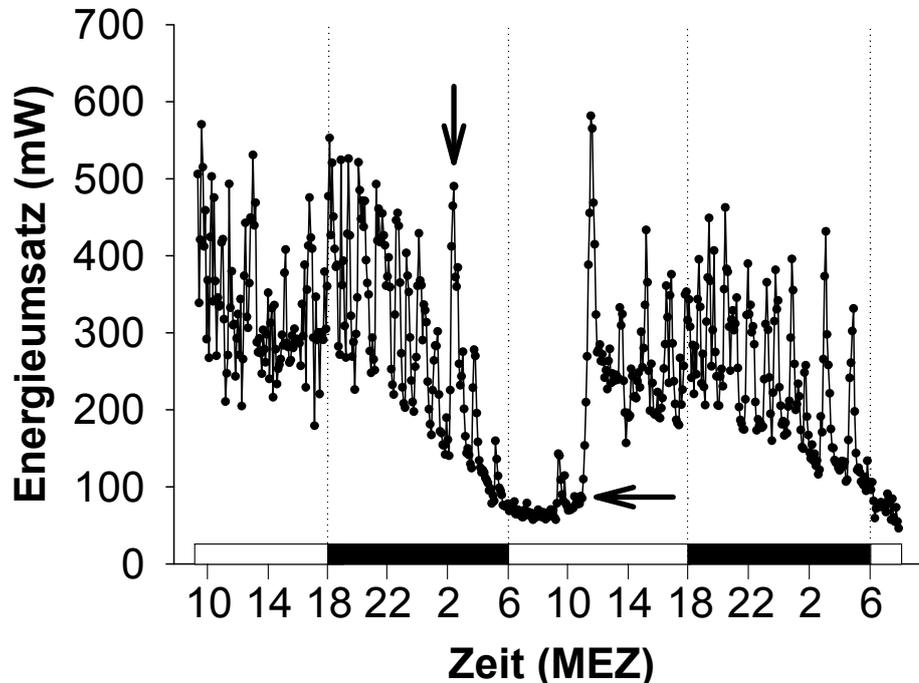
Der Versuch fand bei Raumtemperatur ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) statt. Den Mäusen wurde das Futter um 8:00 MEZ entzogen und die Registrierung des Energieumsatzes gegen 9:00 MEZ gestartet. Während der Messung stand den Mäusen Wasser *ad libitum* sowie ein Mausiglu als Rückzugsmöglichkeit zur Verfügung. Das Gewicht der Mäuse ( $\pm 0.1$  g) sowie die rektale Körpertemperatur ( $\pm 0.01^\circ\text{C}$ ) wurden vor und nach der Messung bestimmt. Nach der Messung wurden den Mäusen in ihren Haltungskäfige neben dem Standard-Haltungsfutter auch Breifutter (in Wasser aufgeweichtes Futter) angeboten.

### **2.7.5.2 Bestimmung der Torporlänge und Energieeinsparung**

Für die Bestimmung der individuellen Torporlänge der *Mct8<sup>-/-</sup>* Weibchen wurde das Zeitintervall, beginnend mit dem höchsten Energieumsatz vor der Absenkung (Eintrittszeitpunkt), bis zu dem letzten registrierten niedrigsten Energieumsatz vor der Aufwachphase (Austrittszeitpunkt), gewählt (Abb.10). Der Energieumsatz während des Torpors entspricht dem Mittelwert der in diesem Zeitraum registrierten Messwerte. Da die RER während des Torpors starken Schwankungen unterlag, wurde während der individuellen Torporphasen der Mäuse eine RER von 0.78 zur Berechnung des Energieumsatzes verwendet. Diese entsprach der mittleren RER der *Mct8<sup>-/-</sup>* Mäuse vom Start der Messung bis zum Beginn der ersten Torporphase eines der *Mct8<sup>-/-</sup>* Weibchen (Mittelwert über 223 Messwerte).

Die Energieeinsparung während des Torpors entspricht der Differenz des mittleren Energieumsatzes im Torpor zum mittleren Energieumsatz in dem entsprechenden Zeitraum bei *ad libitum* Fütterung, der während der Messung des täglichen Energieumsatzes (DEE) erhoben wurde (Kap.2.7.4). Die Bestimmung des DEE gliederte sich in eine Vorlaufphase von 15 Stunden und die eigentliche Auswertungsphase von 6:00 MEZ bis 6:00 MEZ am folgenden Tag, die eine 12-stündige Licht- und Dunkelphase umfasste. Die Torporereignisse begannen, wie am exemplarischen Verlauf eines *Mct8*-defizienten Weibchens in Abb.10

gezeigt, bereits im Verlauf der Dunkelphase und somit vor dem eigentlichen Auswertungszeitraum des DEE um 6:00 MEZ. Deshalb wurde der Energieumsatz, der im Verlauf des DEE gemessen wurde, in die Berechnung der Energieeinsparung mit einbezogen.



**Abb.10: Auswertung der Torporphasen.** Dargestellt ist der Energieumsatz eines  $Mct8^{-/-}$  Weibchens unter zweitägigem Futterentzug. Für die Bestimmung der Torporlänge wurde der höchste Energieumsatz als Eintrittszeitpunkt und der niedrigste Energieumsatz vor der Aufwachphase als Endpunkt des Torpors gewählt (Pfeile).

## 2.7.6 Bestimmung des Energieumsatzes in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition

### 2.7.6.1 Versuchsdurchführung

Die Mäuse wurden um 8:15 MEZ bei thermoneutraler Umgebungstemperatur (30 °C) in den Klimaprüfschrank eingesetzt. Um 10:30 MEZ wurde mit der Absenkung der Umgebungstemperatur begonnen. Aufgrund der Kühlfähigkeit des Klimaprüfschranks wurde die angestrebte Temperatur von 5 °C um ca. 12:00 MEZ erreicht. Die Kälteexposition der Mäuse betrug 5 Stunden, mit Versuchsende um 17:05 MEZ. Das Gewicht ( $\pm 0.1$  g) und die rektale Körpertemperatur ( $\pm 0.01$  °C) wurden vor und nach dem Experiment ermittelt.

### 2.7.6.2 Evaluierung des Energieumsatzes und der respiratorischen Austauschrate

Für die Auswertung des Energieumsatzes wurde sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte ein Messbereich ausgewählt, in dem der Energieumsatz der Mäuse aller Gruppen

vergleichbar stabil war. Für den Energieumsatz in Thermoneutralität wurde ein Mittelwert über die letzten 15 Messwerte berechnet (9:20 - 10:30 MEZ), in Kälte über die letzten 59 Messwerte (12:15 - 17:05 MEZ). Die gleichen Messzeiträume wurden für die Bestimmung der mittleren respiratorischen Austauschrate verwendet.

### **2.7.6.3 Kalkulation der Wärmedurchgangszahl**

Die Wärmedurchgangszahl oder auch *Conductance* (C) ist ein Maß für den Wärmeverlust eines Tieres, in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur. Sie lässt sich aus der Wärmeproduktion HP (mW), der Körpertemperatur  $T_b$  (°C) sowie der Umgebungstemperatur  $T_a$  (°C) nach folgender Formel berechnen (Meyer et al. 2010):

$$C \text{ (mW } ^\circ\text{C}^{-1}) = \text{HP (mW)} (T_b - T_a)^{-1}$$

Der Energieumsatz entsprach den gemittelten letzten 59 Messwerten (12:15 - 17:05 MEZ) der Kälteexposition. Auch die Umgebungstemperatur wurde über diesen Zeitraum gemittelt. Da keine kontinuierliche Aufzeichnung der Körpertemperatur vorlag, wurde die rektale Körpertemperatur am Ende der Kälteexposition verwendet. Auf diese Weise konnte die Wärmedurchgangszahl der MML Hdac2 berechnet werden.

### **2.7.7 Kalkulation der Energiebilanz**

Die Energiebilanz wurde anhand der Energieaufnahme in der 3. Woche nach Induktion (p.i.) und der Energieausgaben in der 5. Woche p.i. der MML Ugcg kalkuliert. Da die Analyse von Energieaufnahme (Kap.2.4) und Energieausgaben (Kap.2.6) nicht zeitgleich durchgeführt werden konnte, handelt es sich um eine Abschätzung. Die metabolisierbare Energie wurde auf Tagesbasis berechnet ( $\text{kJ d}^{-1}$ ), der Energieumsatz (mW) jedoch nur in einer 21 Stunden Messung bestimmt. Um für eine Analyse der Energiehomöostase eine Annäherung des Energieumsatzes auf einer täglichen Basis zu erhalten, wurde dieser zunächst pro Stunde berechnet und dann mit 24 multipliziert.

Die Körpergewichtsveränderung wurde während der Analyse der Energieaufnahme über den Versuchszeitraum von 4 Tagen bestimmt (Montag-Freitag). Sowohl die metabolisierbare Energie als auch der Energieumsatz wurden durch Multiplikation ebenfalls für 4 Tage berechnet. Die Differenz zwischen metabolisierbarer Energie ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) und dem Energieumsatz ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) spiegelt den Energieüberschuss ( $\text{kJ d}^{-1}$ ) wieder, der sowohl auf Tagesbasis als auch für den viertägigen Versuchszeitraum ( $\text{kJ 4d}^{-1}$ ) kalkuliert wurde.

In gleicher Weise wurde mit der Kalkulation der Energiebilanz für die Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i. und den Energieausgaben in der 9. Woche p.i. vorgegangen.

## **2.8 Normalisierung von Energieaufnahme und Energieumsatz auf das Körpergewicht**

Eine schwere Maus metabolisiert in der Regel mehr Energie als eine leichte Maus (Ehrhardt 2008). Um Körpergewichtsunterschiede zu berücksichtigen wurde die metabolisierbare Energie jeder Maus gegen ihr Körpergewicht in einem Streudiagramm (*Scatterplot*) aufgetragen. Dies ermöglicht eine visuelle Überprüfung auf Unterschiede zwischen den Genotypen. Gleiches gilt für die Futtermittelaufnahme.

Auch der Energieumsatz wird maßgeblich vom Körpergewicht beeinflusst, wobei er mit steigendem Körpergewicht zunimmt. Zur Identifizierung genotypspezifischer Unterschiede wurde der Energieumsatz der Mäuse gegen ihr Körpergewicht aufgetragen (Kaiyala et al. 2010, Tschöp et al. 2011).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels linearen Regressionsmodellen (Kap.2.15).

Bei den MML *Mct8* und *Hdac2* korrelierten sowohl der Energieumsatz (tägliches Energieumsatz, Energieumsatz in der Licht- und Dunkelphase) als auch die Ruhestoffwechselraten nicht oder nur unzureichend mit dem Körpergewicht. Dies war auf die Anzahl gemessener Mäuse, die geringe Körpergewichtsspanne sowie die Variabilität des Energieumsatzes innerhalb der Genotypen eines Geschlechts zurückzuführen. Daher werden die erhobenen Daten nur als Absolutwerte  $\pm$  Standardabweichung besprochen und nicht auf das Körpergewicht normalisiert.

## **2.9 Analyse der Körperzusammensetzung**

### **2.9.1 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Technologie: Gesamtkörperanalyse**

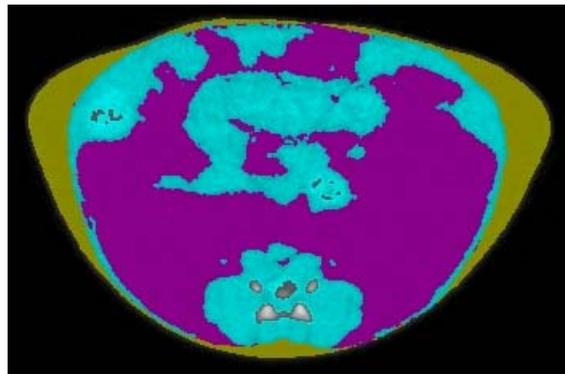
Die Körperzusammensetzung (Fettmasse und Magermasse) der Mäuse wurde mittels *time domain* (TD)-NMR Analysator bestimmt (MQ 7.5 NMR, Minispec, Bruker Optic GmbH, Deutschland). Die Methode hat den Vorteil, dass die Körperzusammensetzung in 2:46 min nicht invasiv bestimmt werden kann. Dies ermöglicht die Analyse der Körperzusammensetzung auch über einen längeren Zeitraum.

### **2.9.1.1 Versuchsdurchführung und Datenerhebung**

Vor jeder Analyse wurden die Mäuse gewogen ( $\pm 0.1$  g). Die Datenaufzeichnung und Verarbeitung erfolgte über die Software MinispecPlus (Bruker Optic GmbH) und OPUS (OPUS Version 5.0, Bruker Optic GmbH). Die Software lieferte folgende Daten: Fettmasse (g) und Magermasse (g).

### **2.9.2 Micro Computer Tomographie (Micro-CT): Fettdepotanalyse**

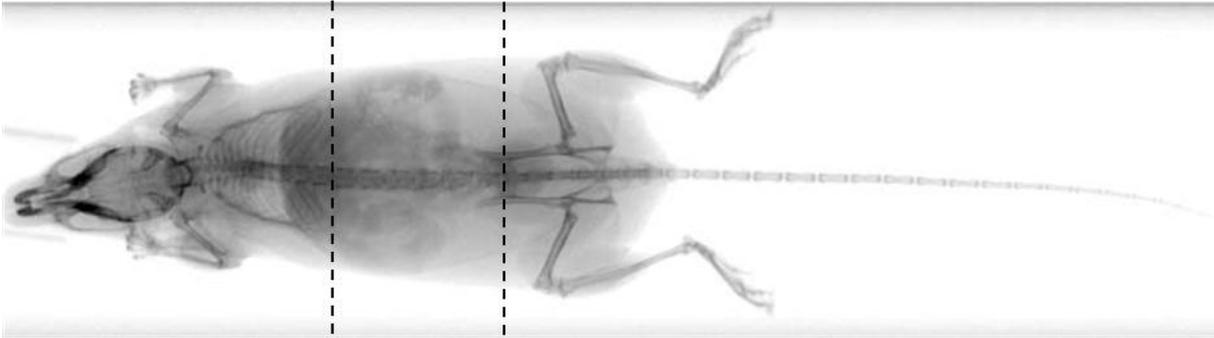
Das Micro-CT (LaTheta™ LCT-100, Aloka Inc., bezogen über Zinsser Analytic GmbH, Deutschland) wurde zur Bestimmung der subkutanen und viszeralen Fettmasse im Bereich der Lendenwirbel 1-6 eingesetzt. Die Unterscheidung zwischen beiden Fettdepots erfolgte mittels Software (LaTheta V 2.10, ©Aloka Co. LTD) über den Abdominalmuskel, der sich zwischen dem subkutanen und viszeralen Fett befindet (Abb.11).



**Abb.11: Verteilung von subkutanen und viszeralen Fettgewebe.** Dargestellt ist sind das subkutane (gelb) und viszerale (rosa) Fett sowie der Magermasse (blau) und Knochen (weiß) in einem Schnittbild aus dem Bereich der Lendenwirbel einer Maus.

#### **2.9.2.1 Versuchsdurchführung und Datenerhebung**

Vor der Messung wurde mittels Standard-Phantom geeicht. Für die Fettdepotanalyse wurden die Mäuse zunächst durch eine Inhalationsnarkose mit 4 % (v/v) Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Deutschland) über einen Perfusor (Sigma Delta Vaporizer, Penlon, UK) anästhesiert und mit der dorsalen Seite in den Tierhalter (Innendurchmesser 4.1 cm) des Micro-CTs gelegt. Nach einem Übersichtsscan wurde der eigentliche Scanbereich für die Analyse (Lendenwirbel 1-6) ausgewählt (Abb.12). Im Anschluss wurde mit einer Schrittweite von 1 mm gescannt, wodurch sich je nach Länge der Maus 20-23 Schnittbilder ergaben. Während der gesamten Messdauer wurden die Mäuse mit 2-4 Vol % Isofluran betäubt. Die Kalkulation von subkutanen und viszeralen Fett (g) erfolgte über einen Rechenalgorithmus der Software.



**Abb.12: CT-Übersichtsscan.** Gezeigt ist der Übersichtsscan einer Maus sowie die Auswahl (gestrichelte Linien) des für die Auswertung zu scannenden Bereichs der Lendenwirbel 1-6.

## 2.10 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (ipGTT)

Der intraperitoneale (i.p.) Glukosetoleranztest dient dem Nachweis einer gestörten Glukoseverwertung nach Verabreichung einer definierten Glukosemenge. Nach Injektion der Glukose wird in festgelegten Zeitabständen die Glukosekonzentration im Blut analysiert. Eine verlangsamte Glukoseabnahme über die Zeit kann ein Anzeichen für eine mögliche Insulinresistenz sein.

### 2.10.1 Versuchsdurchführung

Vor der Durchführung des ipGTT wurden die Mäuse zunächst für einen Zeitraum von etwa 15 Stunden über Nacht gefastet (Futterentzug: 17:00 MEZ), um die Glykogenspeicher zu leeren. Am nächsten Morgen um 8:00 MEZ wurde der basale Blutglukosespiegel bestimmt, bevor den Mäusen  $2 \text{ g kg}^{-1}$  Glukose (Glukose 20%, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) i.p. injiziert wurden. Eine weitere Bestimmung der Blutglukosespiegel erfolgte 15, 30, 60 und 120 min nach erfolgter Glukoseinjektion. Für die Berechnung der zu injizierenden Glukosemenge wurden die Mäuse direkt nach der Fastenperiode gewogen ( $\pm 0.1 \text{ g}$ ).

Zu jedem Analysezeitpunkt wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen, der Blutglukosespiegel ( $\text{mg dl}^{-1}$ ) mit einem Handmessgerät (Accu Check Aviva, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Deutschland) bestimmt und für die Darstellung in  $\text{mmol l}^{-1}$  umgerechnet ( $\text{mmol l}^{-1} = \text{mg dl}^{-1} \cdot 0.0555$ ).

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{AUC (mmol l}^{-1}\text{)} = ((T_0 + T_{15})/2) \cdot 15 + ((T_{15} + T_{30})/2) \cdot 15 + ((T_{30} + T_{60})/2) \cdot 30 + ((T_{60} + T_{120})/2) \cdot 60.$$

$T_0 - T_{120}$  stehen für die Glukosekonzentrationen ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

## **2.11 Intraperitonealer Insulintoleranztest (ipITT)**

Der intraperitoneale (i.p.) Insulintoleranztest dient dem Nachweis der Insulinsensitivität. Dazu wird eine definierte Menge Insulin verabreicht und die Blutglukosekonzentration in festgelegten Abständen nach Injektion bestimmt. Ein verlangsamter Glukoseabbau lässt auf eine verringerte Insulinsensitivität schließen.

### **2.11.1 Versuchsdurchführung**

Vor der Durchführung des ipITT wurden die Mäuse zunächst für etwa 4 Stunden gefastet (Futterentzug: 9:30 MEZ). Im Anschluss wurde der basale Blutglukosespiegel bestimmt, bevor den Mäusen 0.75 Einheiten  $\text{kg}^{-1}$  Humaninsulin (100 I.E.  $\text{ml}^{-1}$  Lilly Deutschland GmbH, Deutschland) verdünnt in Mausplasma i.p. injiziert wurden. Eine weitere Bestimmung der Blutglukosespiegel erfolgte 15, 30, 60 und 90 min nach erfolgter Insulininjektion.

Der Blutglukosespiegel wurde zu jedem Analysezeitpunkt wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben analysiert. Die zu injizierenden Insulinmenge wurden durch Wiegen der Mäuse nach dem Fasten ermittelt ( $\pm 0.1$  g).

## **2.12 Bestimmung der spontanen lokomotorischen Aktivität**

Um eventuelle Verhaltensunterschiede aufzudecken wurde die Aktivität der Mäuse in einer neuen Umgebung untersucht.

### **2.12.1 Versuchsaufbau**

Die spontane lokomotorische Aktivität wurde mit dem ActiMot2-System der Firma TSE Systems (TSE Systems GmbH, Deutschland) analysiert. Bei dem System sind Typ II Käfige von Rahmen in zwei Ebenen umgeben, die über eingelassene Infrarotlichtschranken die Aktivität der Mäuse in drei Dimensionen (X, Y, Z) registrieren.

### **2.12.2 Versuchsdurchführung und Versuchstiere**

Zur Bestimmung der spontanen lokomotorischen Aktivität wurden die Mäuse in die Käfige überführt, in denen sich weder Futter, Wasser oder Einstreu befand. Die kumulative Aktivität der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 60 min registriert, beginnend zwischen 13:00 und 14:00 MEZ. Da keine Normalverteilung der Daten vorlag wurde für die statistische Auswertung ein Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt und in der Abbildung der Median sowie die Einzelwerte dargestellt.

## 2.13 Klinische Chemie der MML Hdac2

In Kooperation mit dem Screen Klinische Chemie der GMC (Prof. Eckhardt Wolf, Dr. Birgit Rathkolb) wurden metabolismusrelevante Blutparameter der MML Hdac2 nach einer akuten *Kältechallenge* (Kap.2.7.6) bestimmt.

### 2.13.1 Versuchsdurchführung

Für die Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Deutschland) über einen Perfusor (Sigma DeltaVaporizer, Penlon, UK) mit 4 % (v/v) Isofluran anästhesiert. Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels nicht heparinisierter Glaskapillaren (1.0 mm Durchmesser, Neolab, Deutschland) konnte Blut gewonnen werden. Um die Koagulation des Blutes zu verhindern wurde es nach Passage der Kapillare direkt in einem mit Lithium- Heparin beschichtetes Röhrchen (Li.-Heparin, Li 1000-A Standrand, Kabe Labortechnik GmbH, Deutschland) aufgefangen und auf Nasseis überführt. Zur Gewinnung des Plasmas erfolgte nach 45 min eine Zentrifugation der Proben bei 8 °C für 10 min und 10000 rpm (Heraeus Fresco 21, Heraeus Holding GmbH, Deutschland). Das Plasma wurde in ein 1.5 ml Eppendorf-Cup überführt und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

### 2.13.2 Analytierte Parameter

Folgende Parameter wurden mittels klinischem Analyzer (Olympus AU 400, Olympus Deutschland GmbH, Deutschland) bestimmt (Tab.2):

**Tab.2: Klinisch-chemische Parameter.** Analytierte Parameter, Systemreagenz und benötigtes Probenvolumen.

Parameter	Systemreagenz	Benötigtes Probenvolumen für die Analyse
Glycerol	GY 105 + Gy 1369 (Randox Laboratories GmbH, Wülfrath, Deutschland)	6.0 µl
Nichtveresterte Fettsäuren	NEFA HR (WakoChemikals GmbH, Neuss, Deutschland)	8.0 µl
Triglyceride	OSR 6133 (Olympus, Hamburg, Deutschland)	3.0 µl

Für die Analyse wurden 100 µl Plasma im Verhältnis 1:2 mit deionisiertem Wasser versetzt und durch kurzes Vortexen (Vortexgenie, Scientific Industries, USA) durchmischt.

## 2.14 Bestimmung der Schilddrüsenhormonspiegel, der Dejodase 1 Aktivität und des Ucp1-Gehalts der MML Mct8

Die Schilddrüsenhormonspiegel im Serum ( $T_3$  und  $T_4$ ), die Dejodase 1 (Dio1) Aktivität in der Leber sowie der Gehalt des Entkopplerproteins 1 (Ucp1) im interskapulären braunen Fettgewebe (iBAT) der Mäuse wurde nach rund 23-24.5 Stunden Futterentzug bestimmt. Der Zeitraum wurde gewählt, da für Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen gezeigt werden konnte, dass sie nach rund 24 Stunden Futterentzug torpid sind (Kap.3.3.2.2). So konnte analysiert werden, welchen Einfluss der Futterentzug auf die Parameter hat und ob sie speziell bei den torpiden Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen verändert sind. Nach dem Futterentzug wurde die rektale Körpertemperatur bei beiden Geschlechtern und Genotypen bestimmt. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen mit einer Körpertemperatur unter 31 °C wurden als torpid eingestuft und in die Analyse einbezogen. Um vergleichbare Bedingungen wie unter dem zweitägigen Futterentzug zu schaffen (Kap.2.7.5) wurden die Mäuse einzeln in metabolische Küvetten überführt, in denen ihnen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung stand und um 15:00 MEZ in den Klimaprüfschrank mit einer Umgebungstemperatur von  $24 \pm 1$  °C eingesetzt. Nach einer Eingewöhnungsphase von 17 Stunden wurden die Mäuse um 8:00 MEZ in neue Küvetten überführt, in denen ihnen Wasser *ad libitum* zur Verfügung stand. Nach etwa 23-24.5 Stunden (zwischen 7:00 MEZ und 8:30 MEZ) wurden sie durch Ether (Diethylether zur Analyse Emsure®, Merck, Deutschland) betäubt. Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels nicht heparinisierten Glaskapillaren (1.0 mm Durchmesser, Neolab, München, Deutschland) wurde Blut gewonnen, das in 1.5 ml Eppendorfcups aufgefangen wurde. Nach 45 min auf Nasseis konnte das Blut bei Raumtemperatur für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert werden. Das Serum wurde abpipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Im Anschluss an die Blutentnahme wurden die Mäuse durch Ether getötet. Die Leber sowie das iBAT wurden entnommen, in 1.6 ml Cryoröhren (CryoPureGefäß, Sarstedt AG&Co, Deutschland) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C. Nicht gefastete Mäuse dienten als Kontrollen und wurden im gleichen Zeitfenster wie die gefasteten Mäuse getötet. Sie befanden sich bis zum Zeitpunkt der Tötung in ihrem Haltungskäfig.

Die Schilddrüsenhormonspiegel wurden bei beiden Geschlechtern und Genotypen bestimmt, die Dio1-Aktivität der Leber bei den Weibchen beider Genotypen und der Ucp1-Gehalt im iBAT der Kontrollen beider Genotypen.

### **2.14.1 Analyse von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>**

Die Analyse der Gesamt T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Serumspiegel erfolgte am Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy in Straßbourg, Frankreich in der Arbeitsgruppe von R. Sapin über die Kooperation mit der Arbeitsgruppe U. Schweizer an der Berliner Charite.

Sowohl der T<sub>3</sub>- als auch der T<sub>4</sub>-Serumspiegel wurden mittels kompetitivem Radioimmunoassay bestimmt (Gesamt-T<sub>3</sub>: RIA kit CA-1541, DiaSorin, Rom, Italien; Gesamt-T<sub>4</sub>: RIA kit CA-1535M, DiaSorin, Rom, Italien). Die Durchführung ist in Schomburg et al. beschrieben (Schomburg et al. 2006).

### **2.14.2 Aktivität der Dejodase 1 in Leber**

Die Aktivitätsbestimmung der Dio1 erfolgte mit der Arbeitsgruppe U. Schweizer an der Berliner Charite, zusammen mit Dr. Kostja Renko nach einem von ihm etablierten Protokoll. Die Aktivität der Dio1 wurde über ein nicht radioaktives Jodid-Freisetzungssassay bestimmt. Um zwischen der Aktivität der Dio1 und Dio2 unterscheiden zu können wurde eine Analyse unter Zugabe des Dio1 Inhibitors 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) und eine weitere ohne durchgeführt. Die Methodik und Durchführung ist in Renko et al. 2012 beschrieben. Für das Dio-Assay wurden 40 µg Protein eingesetzt (Gesamtvolumen der Reaktion: 100 µl, zusammengesetzt aus 20 µl Probenvolumen, 30 µl Wasser oder PTU und 50 µl Substratmischung zum Start der Reaktion. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Die Verdünnung für die Sandell-Kolthoff Reaktion war 1:2.

### **2.14.3 Immunologische Detektion von Ucp1 im iBAT**

#### **Gesamtproteinextraktion**

Das Gewicht des tiefgefrorenen iBAT wurde mittels Feinwaage ( $\pm 0.1$  mg) bestimmt. Zu jeder Probe wurde die 8-10 fache Menge ( $\mu$ l) an RIPA-Puffer gegeben, dem zuvor Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (je 1:1000) zugefügt wurden. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit dem Ultra-Turrax (Ultra-Turrax T8, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Deutschland). Im Anschluss wurde für 15 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Deutschland) und der Überstand ohne die Fettschicht abgenommen. Es wurde auf Nasseis gearbeitet.

#### **Quantifizierung des Gesamtproteingehalts**

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels Bicinchononsäure (BCA)-Assay. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ein Proteinstandard aus bovinem Serumalbumin (BSA)- verwendet (0; 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2 mg ml<sup>-1</sup>), indem die entsprechende Menge BSA in *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer verdünnt wurde. Vor der

Quantifizierung wurden die Proben 1:10 in RIPA -Puffer verdünnt, damit sich die Gesamtproteinkonzentration innerhalb der Standardreihe befindet. Für die Quantifizierung wurden 200 µl des BCA- Reagenz in einer 96 Well Mikrotiter-Platte vorgelegt und 10 µl des Standards oder der verdünnten Probe pipettiert. Als Blindwert dienten anstelle der Probe 10 µl RIPA-Puffer. Im Anschluss erfolgte die Inkubation im Brutschrank für 30 min bei 37 °C. Die Extinktion wurde mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)-Reader (Tecan Infinite® M200, Tecan Group Ltd, Schweiz) bei 562 nm bestimmt.

### **Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-PAGE. Von jeder Probe wurden 30 µg Gesamtprotein aufgetragen, wobei das entsprechende Probenvolumen zuvor mit 2-fach Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C im Heizblock (Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Deutschland) denaturiert wurde. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 12.5 % Trenngel und 5 % Sammelgel in einer Minigelanlage (Mini-Protean II, Biorad, Deutschland) die mit 1-fach konzentriertem Kammerpuffer befüllt wurde. Als Größenstandard wurden 5 µl eines Proteinmarkers (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas GmbH, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Nach Beendigung wurde das Sammelgel verworfen.

### **Western Blot**

Mittels Elektrobplot wurden die im Trenngel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (LI-COR Odyssey® Nitrocellulose Membrane) übertragen. Dazu wurden die Nitrocellulosemembran sowie 2 Filterpapiere (Extra Thick Blot Paper, Biorad, Deutschland) auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Nitrocellulosemembran wurde kurz in doppelt destilliertem Wasser geschwenkt und im Anschluss für 10 min in Transferpuffer gelegt. Auch die 2 Filterpapiere wurden vor Gebrauch kurz im Transferpuffer getränkt. In die *Semidry*-Kammer (Trans-Blot SD, BIORAD, Deutschland) wurde 1 Filterpapier auf die Anode gelegt, darauf die Nitrocellulosemembran, gefolgt von dem Trenngel und dem zweiten Filterpapier. Als Kathode fungierte der Deckel der Kammer. Bei konstanten 40 mA (1 mA pro cm<sup>2</sup> Fläche) wurde für 60 min geblottet.

### **Immunologische Detektion von Ucp1, β-Aktin und CoxIV**

Neben der Detektion von Ucp1 erfolgte ebenfalls eine Detektion von β-Aktin und der Cytochrom-c-OxidaseIV (CoxIV), um den Ucp1-Gehalt für die Zellzahl (β-Aktin) und die Anzahl der Mitochondrien (CoxIV) normalisieren zu können. Die immunologische Detektion erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern. Nach dem Blotten wurde

die Nitrocellulosemembran kurz (1-2 min) in TBS gewaschen und im Anschluss mit 15 ml *Blocking*-Puffer über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C geblockt. Die Membran wurde mit *Tris-buffered-Saline* (TBS) abgespült und zunächst mit dem Ucp1 spezifischen Primärantikörpers (1:10000 in *Tris-buffered-Saline and Tween20*, TBST) für 1.5 h inkubiert. Es folgte ein Waschschrift für 30 min mit TBST. Im Anschluss wurde die Membran zeitgleich mit den Primärantikörpern für  $\beta$ -Aktin (1:5000 in TBST) und CoxIV (1:2500 in TBST) für 1.5 Stunden inkubiert, bevor sie erneut für 30 min in TBST gewaschen wurde. Es folgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern, bei denen es sich um mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte lichtempfindliche Antikörper handelte (IRDye, LI-COR Biosciences, USA), weshalb das Inkubationsgefäß abgedeckt wurde. Der Antikörper IRDye 800CW diente der Detektion des Ucp1 und CoxIV Antikörpers und wurde bei der späteren Auswertung in grün dargestellt, der Antikörper IRDye 680LT, der später in Rot dargestellt wurde, der Detektion von  $\beta$ -Aktin. Die Antikörper wurden je 1:20000 in TBST verdünnt und für 1.5 h mit der Membran inkubiert. Als letzter Schritt wurde für 30 min in TBTS gewaschen. Im Anschluss konnte die Membran mittels Odyssey-Scanner (Odyssey, LI-COR Biosciences, USA) über die Software Odyssey V3.0.21 (LI-COR Biosciences, USA) eingescannt und für die weitere Auswertung abgespeichert werden.

### **Auswertung und Normalisierung des Ucp1-Signals**

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software Odyssey V3.0.21. Da die Proben aus Platzgründen nicht auf einem Blot aufgetragen werden konnten wurde für eine Normalisierung der Blots zunächst das Ucp1-Signal aller Proben innerhalb eines Blots gemittelt. Im Anschluss wurde das Ucp1-Signal jeder Probe durch das mittlere Ucp1 Signal dividiert. Mit dem  $\beta$ -Aktin- und CoxIV-Signal wurde ebenso verfahren. Zur Normalisierung für  $\beta$ -Aktin- und CoxIV wurde das Ucp1-Signal jeder Probe durch das entsprechende  $\beta$ -Aktin- bzw. CoxIV-Signal dividiert.

### **Puffer, Reagenzien und Antikörper**

RIPA-Puffer:            50 mM Tris-HCl, pH 7.5  
                             150 mM NaCl  
                             1 % Nonidet-P40  
                             0.25 % Na-desoxycholat  
                             1 mM EDTA+Na  
                             mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, bei 4 °C lagern.

Vor dem Gebrauch wurde dem RIPA-Puffer ein Proteaseinhibitor (P8340, Sigma-Aldrich, Deutschland) und Phosphataseinhibitor (P5726, Sigma-Aldrich, Deutschland) im Verhältnis 1:1000 zugeben.

BCA-Assay: BCA-Protein Assay Kit (Pierce)

2-fach Probenpuffer:           0.125 M Tris-HCl, pH 6.8  
                                  4 % SDS  
                                  5 Vol. % 2-Mercaptoethanol  
                                  20 % Glycerin  
                                  0.2 % Bromphenolblau

12.5 % Trenngel (10 ml):   4.17 ml Acrylamid Stammlösung (ROTH)  
                                  1.25 ml 8-fach Trenngelpuffer  
                                  4.43 ml dd H<sub>2</sub>O  
                                  100 µl SDS (10 %)  
                                  50 µl AMPS (10 %)  
                                  5 µl TEMED

5 % Sammelgel (5 ml):      0.8 ml Acrylamid Stammlösung (ROTH)  
                                  1.25 ml 4-fach Sammelgelpuffer  
                                  2.86 ml dd H<sub>2</sub>O  
                                  50 µl SDS (10 %)  
                                  30 µl AMPS (10 %)  
                                  10 µl TEMED

8-fach Trenngelpuffer:      3 M TRIS-base (M<sub>r</sub>:121.1), pH 8.8 mit HCL einstellen  
4-fach Sammelgelpuffer:    0.5 M Tris-base (M<sub>r</sub>:121.1), pH 6.8 mit HCL einstellen  
10-fach Kammerpuffer:      0.25 M Tris-base (M<sub>r</sub>:121.1), pH 8.3 mit Glycin einstellen  
                                  2.5 M Glycin  
                                  1 % SDS

Transferpuffer (1 L):       48 mM Tris-HCl  
                                  1.3 mM SDS  
                                  mit Glycin auf pH 9.2 einstellen  
                                  20 % Methanol zum Auffüllen

10-fach TBS (1 L)	24.2 g Tris-base 80.8 g NaCl Mit HCl auf pH 7.6 einstellen
1-fach TBST	1-fach TBS 0.1 % Tween 20
Blocking-Puffer	1-fach TBST 3 % BSA
Primärantikörper UCP1	OTTO 3, eigene Herstellung, Spezies: Kaninchen
Primärantikörper $\beta$ -Aktin	MAB1051, Millipore, Spezies: Maus
Primärantikörper CoxIV	#4844S, Cell Signaling, Spezies: Kaninchen
Sekundärantikörper 800CW	926-32211, IRDye 800CW, Ziege gegen Kaninchen, LI-COR Biosciences, USA
Sekundärantikörper 680LT	926-68022, IRDye 680LT, Esel gegen Maus, LI-COR Biosciences, USA

## **2.15 Statistik**

Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0.05$  festgelegt, wobei auch weitere Abstufungen von  $p < 0.01$  und  $p < 0.001$  verwendet wurden.

Die Abhängigkeit, bzw. Korrelation zweier Variablen wurde mittels Regression ermittelt und als Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) wiedergegeben.

Für die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Einweg-ANOVA), zweifaktorieller Varianzanalyse (Zweiweg-ANOVA), Mann-Whitney Rank Sum Test sowie Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde die Software SigmaStat 3.5 (Systat, Software GmbH, Deutschland) verwendet. Für lineare Regressionsmodelle und lineare gemischte Modelle die Software S+ (Version 8.1 für Windows, TIBCO Software inc., USA).

### **Primärscreen**

Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Geschlechter und Genotypen angegeben. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Zweiweg-ANOVA, mit Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht (Genotyp \* Geschlecht) und anschließendem *post hoc* Test (Holm-Sidak) für multiples Testen, zur getrennten Betrachtung der Geschlechter. Wurde nur ein Geschlecht gemessen erfolgte der statistische Gruppenvergleich mittels Einweg-ANOVA.

Die Normalisierung auf das Körpergewicht wurde für die Geschlechter getrennt, über ein lineares Regressionsmodell (Geschlecht + Körpergewicht), durchgeführt.

Für die Körpergewichtsabnahme während der Energieumsatzmessung wurde ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für das Gewicht vor und nach der Messung angewendet.

### **Sekundärscreen: MML Mct8 und Hdac2**

Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Geschlechter und Genotypen angegeben. Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels Zweiweg-ANOVA, mit Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht (Genotyp \* Geschlecht). Bei signifikanter Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht wurde ein *post hoc* Test (Holm-Sidak) für multiples Testen durchgeführt. Wurde nur ein Geschlecht analysiert erfolgte der statistische Vergleich der Genotypen mittels Einweg-ANOVA.

Die Normalisierung auf das Körpergewicht wurde über ein lineares Regressionsmodell mit Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht (Genotyp \* Geschlecht + Körpergewicht) durchgeführt.

Bei der MML Mct8 wurde die Aktivität der Dio1 (Kap.2.14) nur bei den Mct8-defizienten Weibchen bei *ad libitum* Fütterung und Futterentzug gemessen, weshalb die statistische Gruppenanalyse über Interaktion zwischen Genotyp und der Behandlung (Futterentzug oder *ad libitum* Fütterung, Genotyp \* Behandlung) erfolgte. Auch die Analyse der Veränderungen der Schilddrüsenhormonspiegel unter Futterentzug im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung, erfolgte zwischen den Mutanten und Kontrollen eines Geschlechts über Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung. Die Analyse der Schilddrüsenhormonspiegel bei *ad libitum* Fütterung und Futterentzug erfolgte hingegen mittels Zweiweg-ANOVA, mit Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht. Bei signifikanter Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung, wurde ein *post hoc* Test (Holm-Sidak) durchgeführt.

### **Sekundärscreen: MML Ugcg**

Es wurden nur Weibchen analysiert. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für die Genotypen angegeben. Der statistische Vergleich erfolgte mittels Einweg-ANOVA. Für die Normalisierung auf das Körpergewicht wurde ein lineares Regressionsmodell (Genotyp + Körpergewicht) verwendet.

Um zu bewerten, ob es im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Genotypen in der Variablen von Interesse (Körpergewicht, Körpertemperatur, Fettmasse und Magermasse) gab, wurde ein lineares gemischtes Modell (Genotyp\*Tag nach Induktion) gerechnet.

Die Aktivitätsdaten war nicht normalverteilt, weshalb ein Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt wurde und die Daten als Median angegeben wurden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Evaluierung der metabolischen Phänotypisierung von Mausmutantenlinien im Primärscreen

Im Primärscreen der GMC wurden Mausmutantenlinien (MML) im Hinblick auf genotypspezifische Unterschiede im Körpergewicht, der Körpertemperatur und dem Energieumsatz metabolisch phänotypisiert. Die Untersuchung der MML erfolgte unter Standardhaltungsbedingungen und ohne vorherige Kenntnis eines potentiellen metabolischen Phänotyps. In einem der Forschungsansätze wurde die Frage verfolgt, ob die Körpertemperatur einen direkten Einfluss auf das Körpergewicht hat. Von Interesse war insbesondere, ob Abweichungen in der Körpertemperatur zwischen Kontroll- und Mutantenmäusen im Zusammenhang mit genotypspezifischen Unterschieden im Körpergewicht und der Energieregulation stehen. Diese Zusammenhänge wurden schließlich auf Einzeltierebene mit Hilfe linearer Regressionsmodelle weiter vertieft. Aufgrund von signifikanten Interaktionen zwischen den Geschlechtern einzelner MML, die bei der Auswertung mittels Zweiweg-ANOVA gefunden wurden, erfolgte eine getrennte Betrachtung der Geschlechter mittels anschließenden *post hoc* Tests. Auch in den linearen Regressionsmodellen wurden die Männchen und Weibchen getrennt analysiert.

#### 3.1.1 Das Körpergewicht

Jede Maus wurde vor und nach der Energieumsatzmessung gewogen. Das aus diesen Daten berechnete mittlere Körpergewicht jeder Maus ging als Variable in die statistische Auswertung ein. Im Verlauf der indirekten Kalorimetrie nahmen die Mäuse durchschnittlich  $-0.3 \pm 0.6$  g ab. Obwohl die Gewichtsabnahme statistisch signifikant war ( $p < 0.001$ , Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test), ist sie absolut gesehen gering und basiert wahrscheinlich auf der Ausscheidung von Fäzes.

In 10 von 56 MML, bei denen Männchen und Weibchen analysiert wurden, war das Körpergewicht in beiden Geschlechtern signifikant verschieden (Tab.3). Die Mutanten in 6 MML waren im Vergleich zu den Kontrollen leichter und in 2 MML schwerer. Bei 2 der 10 MML bestand ein entgegengesetzter Unterschied im Körpergewicht zwischen den Geschlechtern: Weibliche Mutanten waren schwerer und männliche Mutanten leichter als die Kontrollen.

In 8 MML konnte nur ein Geschlecht untersucht werden. Bei 5 MML waren nur Männchen und bei 3 MML nur Weibchen verfügbar. Von allen MML, in denen Männchen analysiert wurden (61 MML), konnte in 26 MML (42.6 %) ein signifikanter genotypspezifischer

Unterschied identifiziert werden (Tab.4, Abb.S1). Dabei hatten die Mutanten von 23 MML ein niedrigeres Körpergewicht als die Kontrollen, während ein höheres Gewicht nur bei 3 MML ermittelt wurde. Von den 59 MML der Weibchen bestand in 14 MML (23.7 %) ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied (Tab.4, Abb.S2). In 10 MML waren die Mutanten leichter und in 4 MML schwerer als die zugehörigen Kontrollen.

Bei beiden Geschlechtern wurden somit deutlich mehr MML mit einem im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigerem als erhöhtem Körpergewicht der Mutanten gefunden. Dabei war der Anteil von untergewichtigen MML bei den Männchen mit rund 38 % höher als bei den Weibchen mit rund 17 %. Der Anteil von übergewichtigen MML war hingegen bei beiden Geschlechtern mit rund 5-7 % vergleichbar.

### **3.1.2 Die Körpertemperatur**

Die Körpertemperatur der Mäuse wurde nach Beendigung der Energieumsatzmessung mit einem Rektalfühler bestimmt.

Eine Analyse beider Geschlechter erfolgte in 52 MML (Tab.3), wobei ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied in 2 MML gefunden wurde. In einer MML hatten die Männchen und Weibchen eine gegenüber den Kontrollen niedrigere Körpertemperatur, in einer weiteren MML eine höhere.

Zusätzlich konnte die Körpertemperatur in 8 MML bei nur einem Geschlecht bestimmt werden (Männchen: 5 MML, Weibchen: 3 MML). Folglich wurden bei den Männchen insgesamt 57 MML untersucht, von denen 8 MML (14.0 %) einen signifikanten genotypspezifischen Unterschied zeigten (Tab.4, Abb.S3). Die Mutanten einer MML hatten eine niedrigere und in 7 MML eine höhere Körpertemperatur als die Kontrollen. Bei den 58 MML der Weibchen bestand ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied in 8 MML (13.8 %). In 3 MML war die Körpertemperatur der Mutanten niedriger und in 5 MML höher (Tab.4, Abb.S4).

Bei beiden Geschlechtern bestand somit ein leichter Trend zu einer, im Vergleich zu den Kontrollen, erhöhten Körpertemperatur der Mutanten.

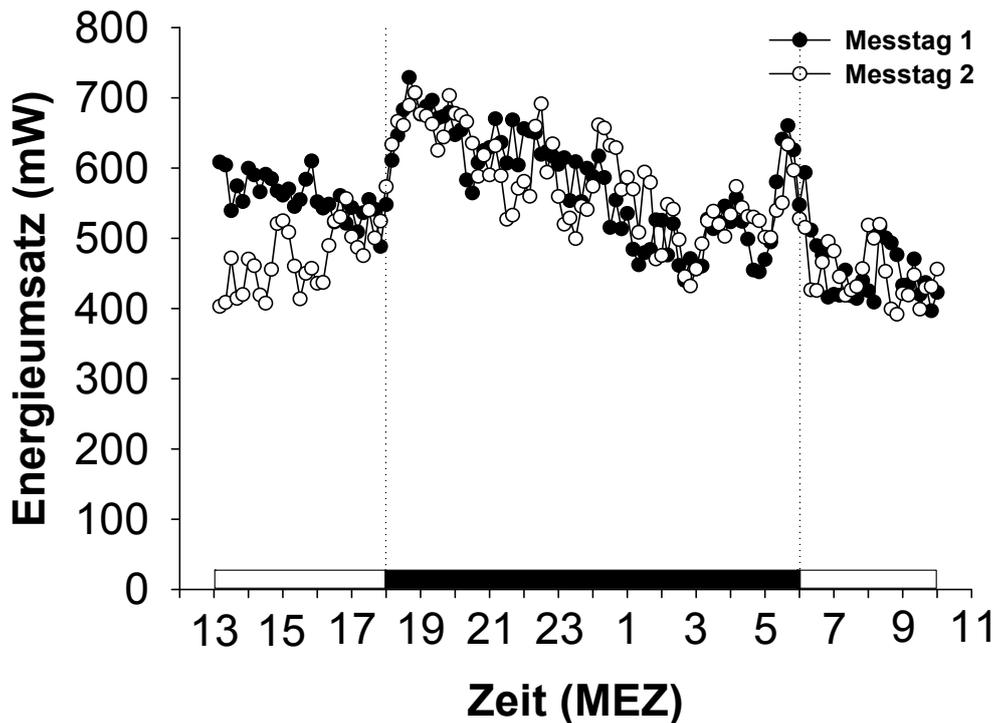
### **3.1.3 Der Energieumsatz**

Für die Messung des Energieumsatzes zur metabolischen Phänotypisierung werden oft Messungen mit einer Dauer von 24 Stunden und mehr durchgeführt (inklusive einer Eingewöhnungsphase an den Kalorimetrieaufbau), um die täglichen Energieausgaben zu bestimmen. Der GMC Primärscreen ist ein auf Hochdurchsatz ausgelegter Phänotypisierungsscreen. Daher bestand eine der Aufgaben darin, eine 21-stündige Versuchsdauer für Energieumsatzmessungen zu etablieren und zu validieren. Der

Energieumsatz wurde folglich in einer 21 Stunden Messung erfasst, basierend auf der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion in einem rotierenden Multiplexsystem. Der Gaswechsel jeder Maus wurde sechsmal pro Stunde erfasst, resultierend in insgesamt 126 Messwerten.

Zur Validierung des Testprotokolls wurde ein separater Versuch durchgeführt, um die Wiederholbarkeit, bzw. die Robustheit der Energieumsatzmessung zu prüfen. Dazu durchliefen 7 männliche Mäuse des Stamms C57BL/6NTac im Alter von 12 Wochen das Testprotokoll. Messtag 1 zeigt den mittleren Energieumsatz, mit dem typischen Verlauf in den Lichtphasen und der Dunkelphase, der in der Regel auch bei der Analyse der verschiedenen MML gefunden wurde (Abb.13). In den ersten 5 Stunden der Messung bis Licht aus (13:00-18:00 MEZ) senkten die Mäuse ihren Energieumsatz stetig ab. Mit Beginn der Dunkelphase um 18:00 MEZ steigerten sie ihren Energieumsatz deutlich, wodurch dieser in der ersten Hälfte der Dunkelphase über dem der Lichtphase lag. In der zweiten Hälfte der Dunkelphase senkten die Mäuse ihren Energieumsatz ab, bevor es etwa 70 Minuten vor Beginn der Lichtphase noch einmal zu einem antizipatorischen Anstieg kam. Mit Beginn der Lichtphase um 6:00 MEZ kam es zu einer erneuten Absenkung, wobei die Mäuse in dem Zeitraum zwischen 6:00-10:00 MEZ den niedrigsten Energieumsatz zeigten.

Diese Messung wurde nicht wie üblich um 10:00 MEZ beendet, sondern der Energieumsatz der Mäuse für weitere 24 Stunden aufgezeichnet und für einen direkten Vergleich beider Messtage über den 21 Stunden Messzeitraum (13:00-10:00 MEZ) dargestellt (Abb.13, Messtag 2). Der Energieumsatz in der Dunkelphase sowie am folgenden Morgen war zwischen dem ersten und zweiten Messtag vergleichbar. Unterschiedlich war der Energieumsatz zu Beginn der Messung, der am zweiten Tag deutlich niedriger war, in den letzten 1.5 Stunden vor der Dunkelphase jedoch das Niveau des ersten Messtags erreichte. Der Unterschied resultierte aus der erhöhten exploratorischen Aktivität der Mäuse am Messtag 1, die erst kurz vor der Messung in die Messküvetten überführt wurden und sich im Verlauf der ersten Stunden an die neue Umgebung adaptieren, während die Mäuse am Messtag 2 bereits eingewöhnt waren. Trägt man den mittleren Energieumsatz jeder Maus von Messtag 1 gegen Messtag 2 in einem Streudiagramm (*Scatterplot*) auf, erhält man ein Bestimmtheitsmaß von  $r^2 = 0.905$ , was die hohe intraindividuelle Wiederholbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Messung stützt.



**Abb.13: Robustheit des Testprotokolls für die Bestimmung des Energieumsatzes während einer 21 Stunden Messung.** Dargestellt ist der Verlauf des mittleren Energieumsatzes während der 21 Stunden Messung (Messtag 1) sowie der Vergleich mit dem Energieumsatz im selben Messzeitraum des zweiten Messtags (Messtag 2). Mit Beginn der Dunkelphase kommt es zu einem deutlichen Anstieg im Energieumsatz, der im Verlauf der ersten Hälfte der Dunkelphase über der Lichtphase liegt. In der zweiten Hälfte der Dunkelphase wird der Energieumsatz abgesenkt und kurz vor Beginn der folgenden Lichtphase noch einmal gesteigert. In der Lichtphase des folgenden Morgens zeigen die Mäuse ihren niedrigsten Energieumsatz. Der Verlauf des Energieumsatzes in der Dunkel- und der folgenden Lichtphase ist robust reproduzierbar, während der Energieumsatz in der ersten Lichtphase im Verlauf des ersten Messtags aufgrund der Eingewöhnung an die neue Umgebung erhöht ist. Die Messung wurde mit männlichen Mäusen des Stamms C57BL/6NTac durchgeführt.  $n = 7$ .

### 3.1.3.1 Mittlerer Energieumsatz

Der mittlere Energieumsatz einer Maus wurde als Mittelwert der 126 Messwerte berechnet, die während des 21-stündigen Testprotokolls erfasst wurden. Für die weitere Bewertung wurden die Mittelwerte der individuellen Umsatzraten getrennt nach Geschlechtern und Genotypen kalkuliert und verglichen.

In 6 der 43 MML, bei denen der Energieumsatz von Männchen und Weibchen analysiert wurde, bestand in beiden Geschlechtern ein signifikanter Unterschied (Tab.3). Die Mutanten in 4 MML hatten einen niedrigeren Energieumsatz, ein erhöhter Energieumsatz wurde nur in einer MML gemessen. Bei einer weiteren MML war der Unterschied im Energieumsatz in beiden Geschlechtern entgegengesetzt, wobei er bei den Mutanten der Weibchen erhöht und bei den Männchen niedriger war.

In 6 MML konnten nur Männchen untersucht werden. Von den damit insgesamt 49 MML wurde in 13 MML (26.5 %) ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied gefunden

(Tab.4, Abb.S5). In 9 MML hatten die Mutanten einen niedrigeren Energieumsatz, in 4 MML einen erhöhten.

Bei 10 (23.3 %) der 43 MML mit Daten von Weibchen konnte ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied gezeigt werden (Tab.4, Abb.S6). Dabei hatten die Mutanten in 5 MML einen gegenüber den Kontrollen niedrigeren und in 5 MML einen höheren Energieumsatz.

Die gut belegte Abhängigkeit des Energieumsatzes vom Körpergewicht erfordert eine sinnvolle Adjustierung der Stoffwechselfdaten auf das Körpergewicht, sofern Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen bestehen. Andernfalls wären scheinbare Unterschiede im absoluten Energieumsatz eine Fehleinschätzung und nur sekundär zum Körpergewichtsunterschied. Um Körpergewichtsunterschiede zu berücksichtigen und Verschiebungen im Energieumsatz zu visualisieren, wurde der Energieumsatz jeder Maus gegen ihr Körpergewicht aufgetragen. Die statistische Auswertung erfolgte nach Geschlechtern getrennt mittels linearem Regressionsmodell (Energieumsatz ~ Genotyp + Gewicht).

Nach dieser Normalisierung wiesen die Mutanten beider Geschlechter in 3 von 43 MML einen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhten Energieumsatz auf, ein signifikant niedrigerer Energieumsatz wurde nicht gefunden (Tab.3). Bei den Männchen wurden 2 MML mit einem signifikant niedrigeren Energieumsatz der Mutanten und 5 MML mit einem gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhten Energieumsatz identifiziert (Tab.4, Abb.S5). Bei den Weibchen zeigten die Mutanten von 4 MML einen signifikant niedrigeren und in 5 MML einen signifikant erhöhten Energieumsatz (Tab.4, Abb.S6).

Zusammenfassend bestand bei den Männchen ein Trend zu einem niedrigeren Energieumsatz der Mutanten (18.4 % der Linien gegenüber 8.2 % mit erhöhtem Energieumsatz), während die Anzahl der auffälligen Linien mit niedrigerem oder höherem Energieumsatz bei den Weibchen ausgeglichen war (jeweils 11.6 %). Nach Berücksichtigung des Körpergewichts wurden bei den Männchen deutlich weniger MML mit signifikant niedrigerem Energieumsatz identifiziert. Bei den männlichen MML mit erhöhtem Energieumsatz und den Weibchen ergaben sich hingegen nur geringe Veränderungen in der Anzahl identifizierter MML. Bei beiden Geschlechtern führte die Normalisierung auf das Körpergewicht zur Identifizierung neuer MML mit signifikanten genotypspezifischen Unterschieden, die bei der Analyse der Absolutwerte keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Männchen: 4 neue MML, Weibchen: 5 neue MML).

### **3.1.3.2 Minimaler Energieumsatz**

Der minimale Energieumsatz repräsentiert den niedrigsten der 126 Messwerte, die während der Messung erhoben wurden, und spiegelt daher eine Annäherung an den Ruhestoffwechsel wider. Um auszuschließen, dass es sich bei dem niedrigsten Messwert um einen Fehlwert handelt, wurden die Daten einer visuellen Kontrolle unterzogen.

Der minimale Energieumsatz von Männchen und Weibchen wurde in 43 MML gemessen, wobei in keiner MML ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied bei beiden Geschlechtern gefunden wurde (Tab.3).

Bei den Männchen bestand in 2 MML (4.0 %) von insgesamt 49 MML ein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und Kontrollen (Tab.4, Abb.S7). Die Mutanten einer MML hatten einen im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeren minimalen Energieumsatz, in einer weiteren Linie war er erhöht. Bei den 43 MML der Weibchen bestand ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied in insgesamt 6 MML (14.0 %, Tab.4, Abb.S8). In 2 MML hatten die Mutanten einen niedrigeren und in 4 MML einen höheren minimalen Energieumsatz.

Nach Normalisierung auf das Körpergewicht wurde in keiner der analysierten MML ein signifikanter Unterschied in beiden Geschlechtern gefunden (Tab.3). Innerhalb der 49 MML der Männchen wurden 2 MML mit signifikant niedrigerem minimalem Energieumsatz der Mutanten und eine MML mit einer signifikanten Erhöhung identifiziert (Tab.4, Abb.S7). Von den analysierten 43 MML der Weibchen zeigten die Mutanten in jeweils 2 MML einen signifikant niedrigeren, bzw. erhöhten minimalen Energieumsatz (Tab.4, Abb.S8).

Im Vergleich zum mittleren Energieumsatz wurden für den minimalen Energieumsatz deutlich weniger MML mit signifikantem genotypspezifischen Unterschied gefunden.

Die Analyse führte jedoch sowohl für den absoluten (Männchen: 1 MML, Weibchen 2 MML) als auch auf das Körpergewicht normalisierten minimalen Energieumsatz (Männchen: 2 MML, Weibchen: 1 MML) zur Identifizierung neuer MML mit signifikantem genotypspezifischen Unterschied, die bei Analyse des mittleren Energieumsatzes nicht auffällig waren.

**Tab.3: Übersicht über die Phänotypenverteilung der analysierten MML im Primärscreen beider Geschlechter.** Für jede Variable ist die Anzahl der insgesamt analysierten MML sowie die Anzahl der Linien, bei denen ein signifikanter ( $p < 0.05$ ) Unterschied zwischen den Mutanten und Kontrollen einer MML bei beiden Geschlechtern gefunden wurde. Die Variable Energieumsatz wurde sowohl absolut als auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht analysiert. Für die statistische Analyse der Absolutwerte wurde eine Zweiweg-ANOVA mit anschließendem *post hoc* Test zur Einzelbetrachtung der Geschlechter durchgeführt. LM nach Geschlechtern getrennt für den auf das Körpergewicht normalisierten Energieumsatz.

Variable	Beide Geschlechter				
	Niedriger	Höher	Entgegengesetzt	Unverändert	MML
<b>Gewicht</b>	6 (10.7%)	2 (3.6%)	2 (3.6%)	46 (82.1%)	<b>56</b> <b>(100%)</b>
<b>Körpertemperatur</b>	1 (1.9%)	1 (1.9%)	0 (0.0%)	50 (96.2%)	<b>52</b> <b>(100%)</b>
<b>Mittlerer Energieumsatz</b>	4 (9.3%)	1 (2.3%)	1 (2.3%)	37 (86.1%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Minimaler Energieumsatz</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	43 (100.0%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Mittlerer Energieumsatz normalisiert</b>	0 (0.0%)	3 (7.0%)	0 (0.0%)	40 (93.0%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Minimaler Energieumsatz normalisiert</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	43 (100.0%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>

**Tab.4: Übersicht über die Phänotypenverteilung der analysierten MML im Primärscreen nach Geschlechtern getrennt.** Für jede Variable ist die Anzahl der analysierten MML beider Geschlechter aufgeführt sowie die Anzahl der Linien, bei denen ein signifikanter ( $p < 0.05$ ) Unterschied zwischen den Mutanten und Kontrollen einer MML gefunden wurde. Die Variable Energieumsatz wurde sowohl absolut als auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht analysiert. Statistischer Gruppenvergleich mittels Zweiweg-ANOVA und anschließendem *post hoc* Test zur Einzelbetrachtung der Geschlechter. Einweg-ANOVA bei MML mit nur einem analysierten Geschlecht. LM nach Geschlechtern getrennt für den auf das Körpergewicht normalisierten Energieumsatz.

Variable	Männchen				Weibchen			
	Niedriger	Höher	Unverändert	MML	Niedriger	Höher	Unverändert	MML
<b>Gewicht</b>	23 (37.7%)	3 (4.9%)	35 (57.4%)	<b>61</b> <b>(100%)</b>	10 (16.9%)	4 (6.8%)	45 (76.3%)	<b>59</b> <b>(100%)</b>
<b>Körpertemperatur</b>	1 (1.7%)	7 (12.3%)	49 (86.0%)	<b>57</b> <b>(100%)</b>	3 (5.2%)	5 (8.6%)	50 (86.2%)	<b>58</b> <b>(100%)</b>
<b>Mittlerer Energieumsatz</b>	9 (18.4%)	4 (8.2%)	36 (73.4%)	<b>49</b> <b>(100%)</b>	5 (11.6%)	5 (11.6%)	33 (76.8%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Minimaler Energieumsatz</b>	1 (2.0%)	1 (2.0%)	47 (96.0%)	<b>49</b> <b>(100%)</b>	2 (4.7%)	4 (9.3%)	37 (86.0%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Mittlerer Energieumsatz normalisiert</b>	2 (4.1%)	5 (10.2%)	42 (85.7%)	<b>49</b> <b>(100%)</b>	4 (9.3%)	5 (11.5%)	34 (79.1%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>
<b>Minimaler Energieumsatz normalisiert</b>	2 (4.1%)	1 (2.0%)	46 (93.9%)	<b>49</b> <b>(100%)</b>	2 (4.7%)	2 (4.7%)	39 (90.6%)	<b>43</b> <b>(100%)</b>

### **3.1.4 Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur-, Körpergewichts- und Energieumsatzdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen**

Im Folgenden wird anhand der Differenz zwischen Mutanten und Kontrollen im jeweiligen Parameter untersucht, ob eine veränderte Körpertemperatur mit einem veränderten Körpergewicht oder Energieumsatz einhergeht. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Energieumsatz betrachtet. Um einen direkten Vergleich innerhalb einer MML zu ermöglichen wurden diese für die jeweils zu vergleichenden Variablen in der gleichen Reihenfolge angeordnet. Waren die Körpertemperatur, das Körpergewicht oder der Energieumsatz der Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen niedriger ist dies als negative Differenzen gezeigt, ein höherer Wert als positive Differenz. Die Anzahl der analysierten MML beim Vergleich der Variablen variiert leicht, weil nicht von jeder Linie alle Variablen gemessen wurden.

Die Differenzen in der Körpertemperatur zwischen Mutanten und Kontrollen lagen bei den Männchen zwischen  $-1.06\text{ °C}$  und  $1.02\text{ °C}$  und bei den Weibchen vergleichbar zwischen  $-1.20\text{ °C}$  und  $1.09\text{ °C}$  (Abb.14A+C, Abb.15A+C). Der Bereich der Körpergewichtsdifferenzen der Männchen war mit  $-7.0\text{ g}$  bis  $5.5\text{ g}$  höher als bei den Weibchen mit  $-4.1\text{ g}$  bis  $3.5\text{ g}$  (Abb.14B+D, Abb.16A+C). Die Spannbreite der Differenzen im Energieumsatz lag bei den Männchen zwischen  $-83.65\text{ mW}$  und  $65.54\text{ mW}$  und bei den Weibchen in einem vergleichbaren Bereich zwischen  $-80.32\text{ mW}$  und  $55.04\text{ mW}$  (Abb.15B+D, Abb.16B+D).

#### **3.1.4.1 Körpertemperatur- und Körpergewichtsdifferenz**

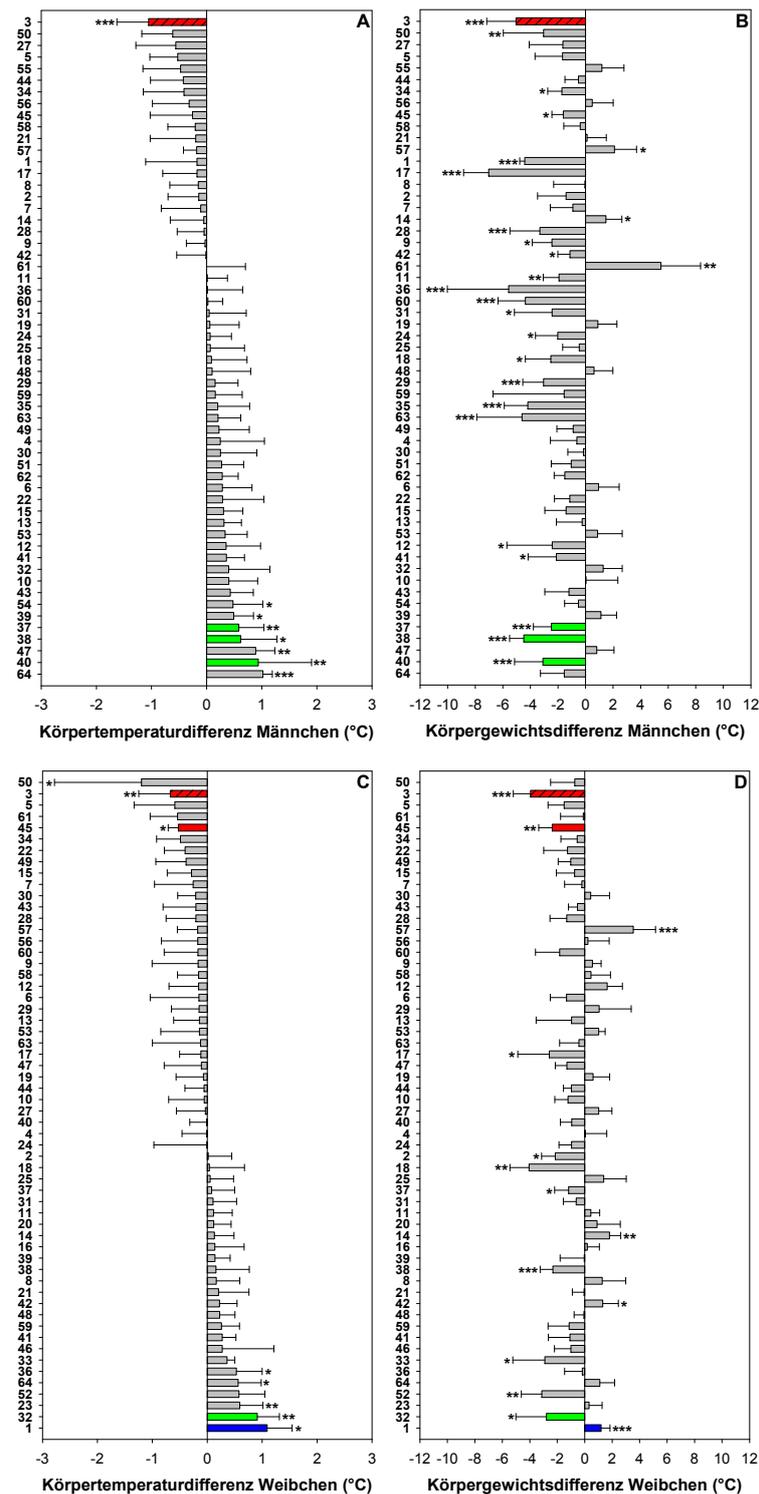
Für die visuelle Überprüfung eines generellen Zusammenhangs von Unterschieden in der Körpertemperatur und dem Körpergewicht zwischen Mutanten und Kontrollen wurden die Unterschiede in der Körpertemperatur anhand der Effektgröße sortiert und für das Körpergewicht in der gleichen Reihenfolge angeordnet (Abb.14A-D).

Auf dieser Betrachtungsebene war bei den Männchen der untersuchten 57 MML kein genereller Zusammenhang zwischen Körpertemperatur- und Körpergewichtseffektgrößen erkennbar (Abb.14A+B). So zeigten viele MML, bei denen eine signifikante Körpergewichtsdifferenz bestand, nur eine geringe Differenz in der Körpertemperatur. Es wurden jedoch 4 MML identifiziert, in denen beide Variablen signifikant verschieden waren. In einer MML waren die Körpertemperatur und das Körpergewicht der Mutanten niedriger, bei 3 MML ging eine erhöhte Körpertemperatur mit einem niedrigeren Körpergewicht einher. Analog zu den Männchen bestand auch bei den 58 MML, die bei den Weibchen analysiert wurden, kein genereller Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Körpergewicht (Abb.14C+D). Signifikante Unterschiede in beiden Variablen wurden in 4 MML

gemessen. Bei 2 MML waren die Körpertemperatur und das Körpergewicht der Mutanten niedriger. Bei einer MML waren beide Variablen erhöht und bei einer weiteren MML ging eine niedrigere Körpertemperatur mit einem niedrigeren Körpergewicht einher.

Eine der MML mit signifikant niedrigerer Körpertemperatur und niedrigerem Körpergewicht der Mutanten war bei beiden Geschlechtern auffällig.

Zusammenfassend konnte beim Vergleich zwischen den Mutantenlinien kein genereller Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Körpergewicht gezeigt werden. Eine MML, die eine niedrigere Körpertemperatur aufweist, hat somit nicht zwangsläufig ein erhöhtes Körpergewicht und umgekehrt. In wenigen MML konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen einer signifikant erhöhten Körpertemperatur und einem signifikant niedrigerem Körpergewicht gezeigt werden. Andererseits wurden auch MML identifiziert, bei denen eine signifikant niedrigere Körpertemperatur mit einem signifikant niedrigerem Körpergewicht einherging und umgekehrt.



**Abb.14: Vergleich der Körpertemperatur- mit der Körpergewichtsdifferenz.** Dargestellt sind die Körpertemperaturdifferenz (A) und Körpergewichtsdifferenz (B) der Männchen von 57 MML sowie die Körpertemperaturdifferenz (C) und Körpergewichtsdifferenz (D) der Weibchen von 58 MML. Um den direkten Vergleich zwischen beiden Variablen einer MML zu ermöglichen wurden die MML für die Körpergewichtsdifferenz in der Reihenfolge der Körpertemperaturdifferenz aufgeführt. Ein genereller Zusammenhang beider Variablen war nicht erkennbar. Rote Balken: Beide Variablen signifikant niedriger, blaue Balken: Beide Variablen signifikant erhöht, grüne Balken: Beide Variablen in entgegengesetzter Richtung signifikant verschieden, schraffierte Balken: Beide Variablen bei beiden Geschlechtern signifikant verändert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.1.4.2 Körpertemperatur- und mittlere Energieumsatzdifferenz**

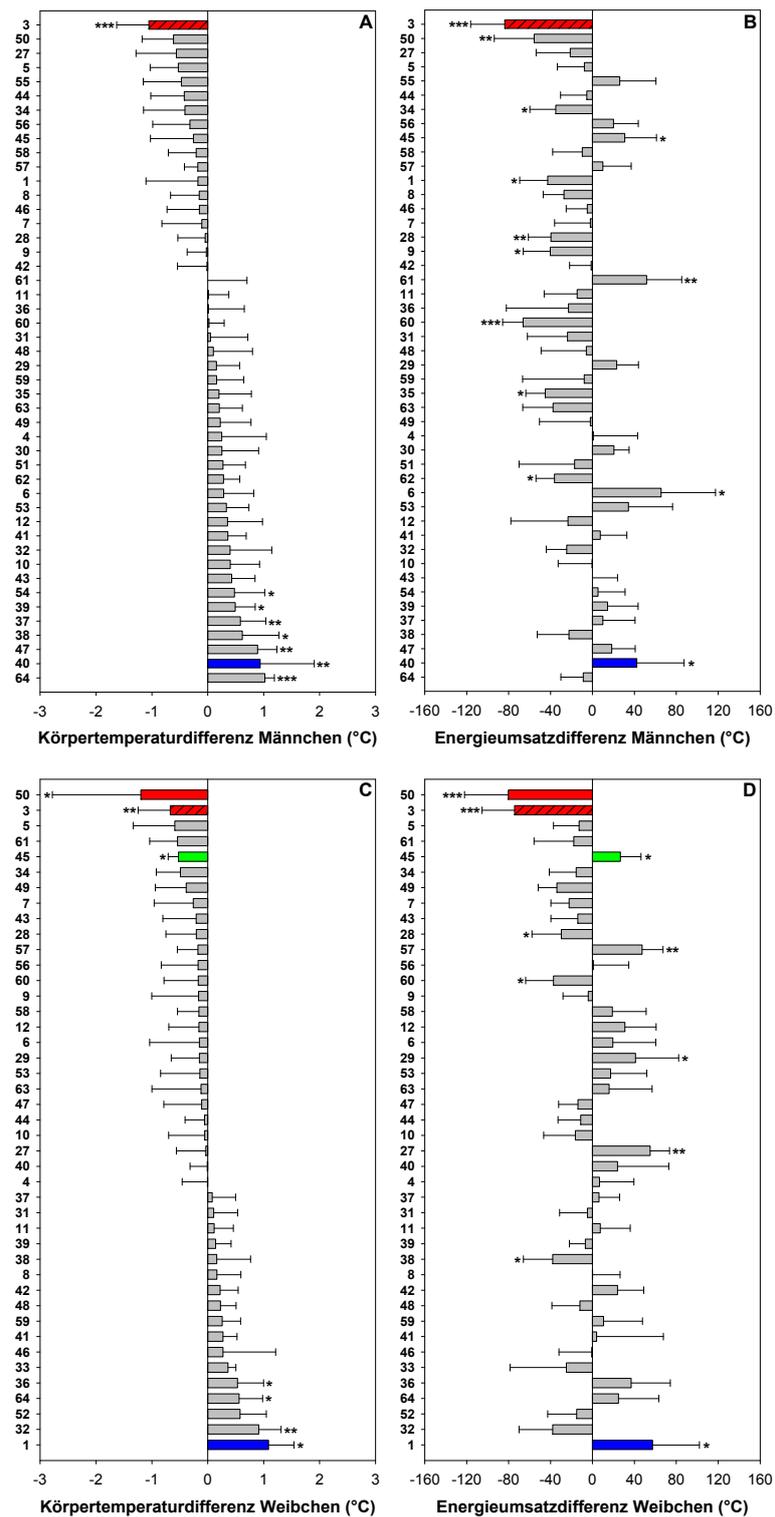
Für den direkten Vergleich wurden die MML für die Körpertemperaturdifferenzen sortiert und für den Energieumsatz in der gleichen Reihenfolge angeordnet (Abb.15A-D).

Bei den 47 MML der Männchen, die für den Vergleich herangezogen wurden, war kein genereller Zusammenhang zwischen Körpertemperatur und Energieumsatz erkennbar (Abb.15A+B). Lediglich in 2 der 47 MML konnte ein signifikanter gleichgerichteter Unterschied in beiden Variablen gezeigt werden: In einer MML hatten die Mutanten eine niedrigere Körpertemperatur mit geringeren Energieumsatz, bei einer weiteren Linie waren beide Variablen erhöht.

Unter den 43 MML der Weibchen konnte, genau wie bei den Männchen, kein genereller Zusammenhang beider Variablen gezeigt werden (Abb.15C+D). Signifikante genotypspezifische Unterschiede in beiden Variablen wurden in 4 MML gefunden. Bei 2 MML waren sowohl die Körpertemperatur als auch der Energieumsatz niedriger, bei einer MML waren beide Variablen erhöht und in einer weiteren MML ging eine geringere Körpertemperatur mit einem erhöhten Energieumsatz einher.

In einer MML zeigten die Mutanten beider Geschlechter eine signifikant niedrigere Körpertemperatur und einen signifikant niedrigeren Energieumsatz.

Wie bereits für den Zusammenhang zwischen Körpertemperatur und Körpergewicht beschrieben, ist bei Betrachtung aller MML ebenfalls kein genereller Zusammenhang zwischen Körpertemperatur und Energieumsatz erkennbar, auch wenn bei wenigen MML beide Variablen signifikant verändert waren.



**Abb.15: Vergleich der Körpertemperatur- mit der Energieumsatzdifferenz.** Dargestellt sind die Körpertemperaturdifferenz (A) und Energieumsatzdifferenz (B) der Männchen von 47 MML sowie die Körpertemperaturdifferenz (C) und Energieumsatzdifferenz (D) der Weibchen von 43 MML. Um den direkten Vergleich zwischen beiden Variablen einer MML zu ermöglichen wurden die MML für die Energieumsatzdifferenz in der Reihenfolge der Körpertemperaturdifferenz aufgeführt. Ein genereller Zusammenhang beider Variablen was nicht erkennbar. Rote Balken: Beide Variablen signifikant niedriger, blaue Balken: Beide Variablen signifikant erhöht, grüne Balken: Beide Variablen in entgegengesetzter Richtung signifikant verschieden, schraffierte Balken: Beide Variablen bei beiden Geschlechtern signifikant verändert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.1.4.3 Körpergewichts- und mittlere Energieumsatzdifferenz**

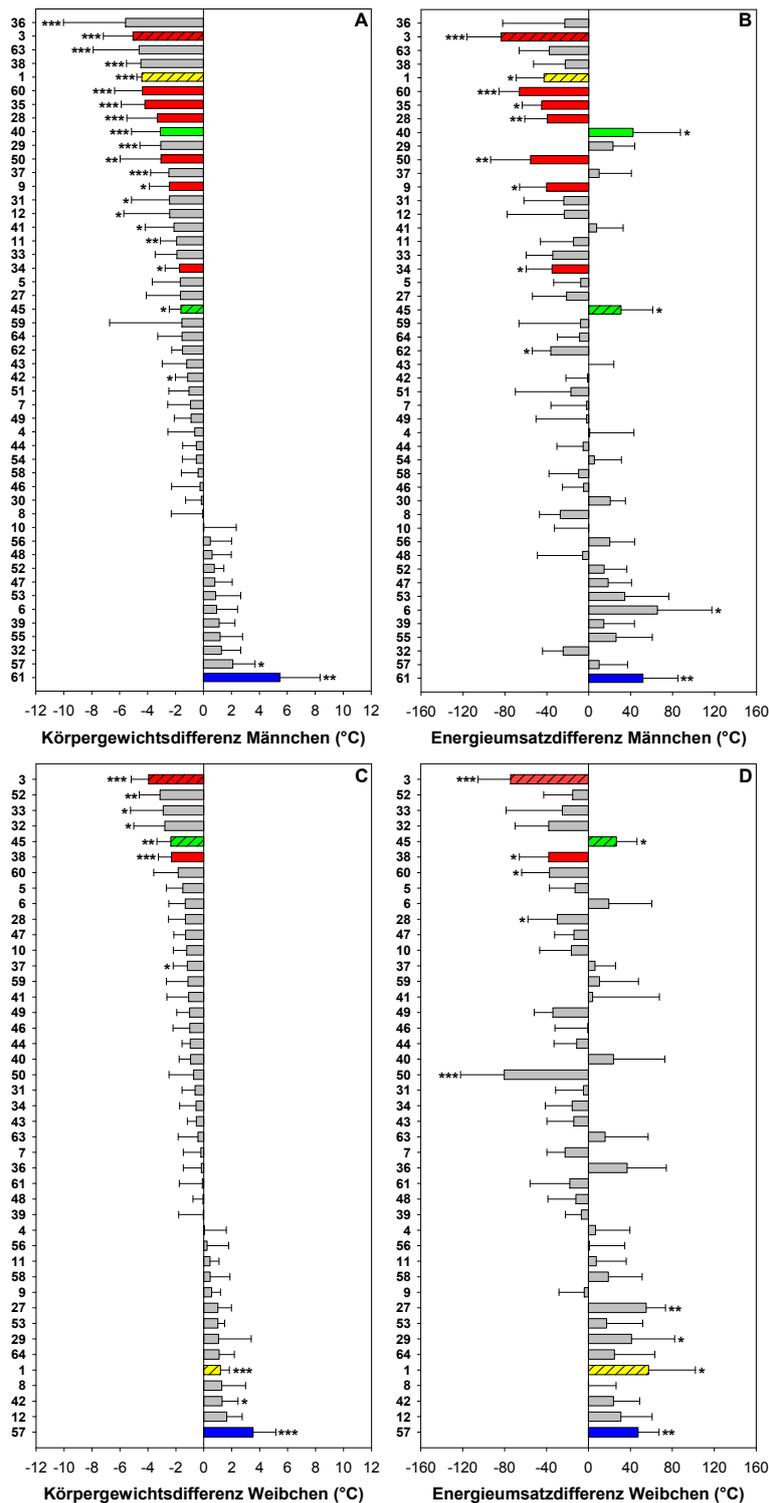
Für die Analyse wurden die MML für das Körpergewicht anhand der Differenzen sortiert und für die Energieumsatzdifferenz in der gleichen Reihenfolge angeordnet (Abb.16A-D).

Bei den 49 MML, die bei den Männchen untersucht wurden, war ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und Energieumsatz erkennbar (Abb.16A+B). So hatten MML mit negativer Körpergewichtsdifferenz tendenziell auch eine negative Energieumsatzdifferenz und umgekehrt. In 11 der 49 MML wurde in beiden Variablen ein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und Kontrollen gefunden. In 8 MML waren sowohl das Körpergewicht als auch der Energieumsatz geringer, in einer weiteren MML waren beide Variablen erhöht. Bei 2 MML wurde ein entgegengesetzter Befund mit niedrigerem Körpergewicht auf der einen und erhöhtem Energieumsatz auf der anderen Seite gefunden.

Auch bei den Weibchen mit 43 analysierten MML konnte ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Energieumsatz gezeigt werden (Abb.16C+D). Wie bei den Männchen ging eine negative Körpergewichtsdifferenz in der Regel mit einer negativen Energieumsatzdifferenz einher und umgekehrt. Beide Variablen waren in insgesamt 5 MML signifikant verschieden. In 2 MML waren das Körpergewicht und der Energieumsatz niedriger, während 2 MML eine Erhöhung beider Variablen zeigten. Ein entgegengesetzter Befund mit niedrigerem Körpergewicht und erhöhtem Energieumsatz wurde in einer MML gefunden.

In einer MML wiesen die Mutanten beider Geschlechter eine signifikant niedrigere Körpertemperatur und einen signifikant niedrigeren Energieumsatz auf. In einer weiteren MML bestand ein entgegengesetzter geschlechtsspezifischer Unterschied mit negativer Differenz der Mutanten in beiden Variablen bei den Männchen und erhöhter bei den Weibchen.

Basierend auf den Ergebnissen lässt sich ein klarer Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Energieumsatz erkennen. So hatten die Mutanten mit einem im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeren Körpergewicht überwiegend ebenfalls einen niedrigeren Energieumsatz und Mutanten mit einem im Vergleich zu den Kontrollen erhöhten Körpergewicht einen höheren Energieumsatz.



**Abb.16: Vergleich der Körpergewichts- mit der Energieumsatzdifferenz.** Dargestellt sind die Körpergewichtsdifferenz (A) und Energieumsatzdifferenz (B) der Männchen von 49 MML sowie die Körpergewichtsdifferenz (C) und Energieumsatzdifferenz (D) der Weibchen von 43 MML. Um den direkten Vergleich zwischen beiden Variablen einer MML zu ermöglichen wurden die MML für die Energieumsatzdifferenz in der Reihenfolge der Körpertemperaturdifferenz aufgeführt. Es bestand ein klarer Zusammenhang zwischen beiden Variablen. So ging ein erhöhtes Körpergewicht der Mutanten gegenüber den Kontrollen in der Regel mit einem erhöhten Energieumsatz einher und umgekehrt. Rote Balken: Beide Variablen signifikant niedriger, blaue Balken: Beide Variablen signifikant erhöht, grüne Balken: Beide Variablen in entgegengesetzter Richtung signifikant verschieden, schraffierte Balken: Beide Variablen bei beiden Geschlechtern signifikant verändert, gelbe Balken: Geschlechtsspezifischer Unterschied. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.1.5 Zusammenhang zwischen Körpertemperatur, Körpergewicht und Energieumsatz**

Im vorherigen Abschnitt wurde der Zusammenhang zwischen Körpertemperatur, Körpergewicht und Energieumsatz anhand der Differenz in der jeweiligen Variablen zwischen Mutanten und Kontrollen betrachtet. Im Folgenden wird der Zusammenhang anhand der Einzelwerte von 1145 Mäusen (615 Männchen: 285 Kontrollen, 330 Mutanten, 49 MML und 530 Weibchen: 236 Kontrollen, 294 Mutanten, 43 MML), von denen alle Variablen bestimmt wurden, evaluiert.

Die Analyse von Körpertemperatur und Körpergewicht ergab geschlechtsspezifische Unterschiede. Weibchen hatten eine um im Mittel  $0.37\text{ °C}$  höhere Körpertemperatur als Männchen (Männchen:  $36.45 \pm 0.61\text{ °C}$ , Weibchen:  $36.82 \pm 0.55\text{ °C}$ ,  $p < 0.001$ ) und waren im Durchschnitt  $5.9\text{ g}$  leichter (Männchen:  $26.5 \pm 2.7\text{ g}$ , Weibchen:  $20.6 \pm 2.3\text{ g}$ ,  $p < 0.001$ ).

#### **3.1.5.1 Körpertemperatur und Körpergewicht**

Bei den Männchen korreliert das mittlere Körpergewicht mit der Körpertemperatur ( $p < 0.01$ ,  $r^2 = 0.013$ ), bei den Weibchen hingegen nicht ( $p = 0.375$ ,  $r^2 = 0.002$ , Abb.17A+B). Entgegen der Erwartung hatten Männchen mit einer tendenziell höheren Körpertemperatur ebenfalls ein höheres Körpergewicht. Der geringe Erklärungsanteil des Modells an dem Zusammenhang zwischen Körpertemperatur und Körpergewicht lässt jedoch vermuten, dass die biologische Bedeutung gering ist. So erklärt die Körpertemperatur bei den Männchen lediglich  $1\%$  der Körpergewichtsvariation, bei den Weibchen gibt es den Zusammenhang garnicht.

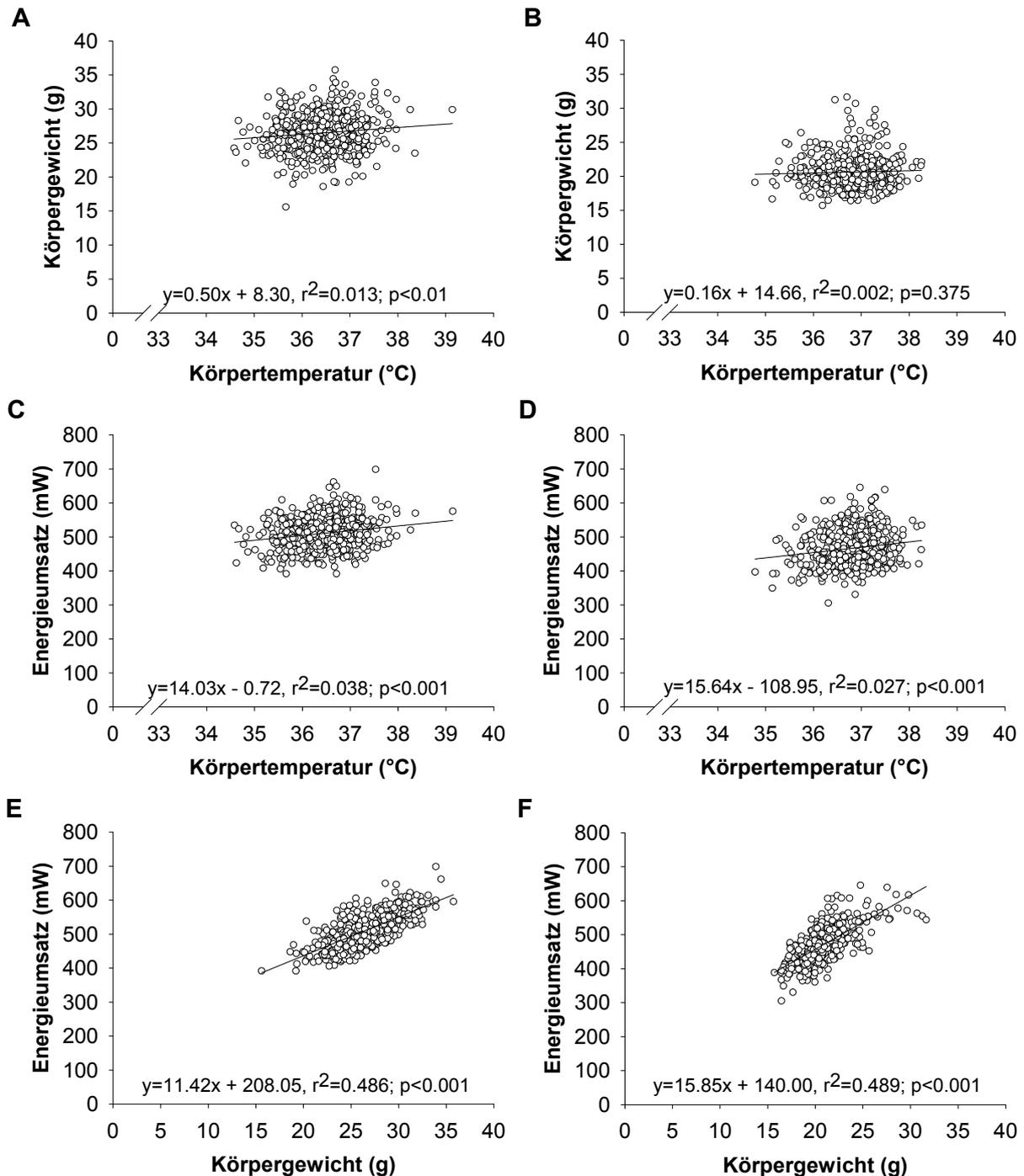
#### **3.1.5.2 Körpertemperatur und Energieumsatz**

Zwischen dem Energieumsatz und der Körpertemperatur konnte bei beiden Geschlechtern eine signifikante Korrelation gezeigt werden (jeweils  $p < 0.001$ , Abb.17C+D). Genau wie bei dem Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht ist der Erklärungsanteil des Modells an der Gesamtvarianz zwischen beiden Variablen sehr gering. So erklärt die Körpertemperatur bei beiden Geschlechtern lediglich  $3\text{-}4\%$  der Variation im Energieumsatz (Männchen:  $r^2 = 0.038$ , Weibchen  $r^2 = 0.027$ ).

#### **3.1.5.3 Energieumsatz und Körpergewicht**

Wie erwartet korrelierte der Energieumsatz signifikant mit dem mittleren Körpergewicht (Männchen:  $r^2 = 0.486$ , Weibchen  $r^2 = 0.489$ , beide Geschlechter jeweils  $p < 0.001$ , Abb.17E+F). Rund  $49\%$  des Energieumsatzes werden somit durch das Körpergewicht

erklärt. Weibchen zeigen zudem mit steigendem Körpergewicht einen im Vergleich zu den Männchen stärkeren Anstieg des Energieumsatzes. So führt eine Zunahme des Körpergewichts von 1 g bei den Weibchen zu einem theoretischen Anstieg im Energieumsatz um 15.85 mW, während bei den Männchen eine entsprechende Gewichtszunahme zu einem Anstieg von 11.42 mW führen würde. Weibchen haben somit einen im Vergleich zu den Männchen höheren Energieumsatz als man für ihr niedrigeres Körpergewicht erwartet.



**Abb.17: Zusammenhang zwischen Körpertemperatur, Körpergewicht und Energieumsatz.** Dargestellt ist das Körpergewicht aufgetragen gegen die Körpertemperatur für Männchen (A) und Weibchen (B), der Energieumsatz aufgetragen gegen die Körpertemperatur für Männchen (C) und Weibchen (D) sowie der Energieumsatz aufgetragen gegen das mittlere Körpergewicht für Männchen (E) und Weibchen (F). Wie anhand des Bestimmtheitsmaßes ( $r^2$ ) ersichtlich ist, konnte kein biologisch relevanter Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht und den Energieumsatz gezeigt werden. Das Körpergewicht erklärt hingegen rund 50 % der gezeigten Variabilität im Energieumsatz. Männchen:  $n = 615$ , Weibchen:  $n = 530$ .

### **3.1.6 Zusammenfassung**

Bei den Männchen waren die Mutanten in 37.7 % und bei den Weibchen in 16.9 % der analysierten MML leichter. In lediglich 4.9 %, bzw. 6.8 % der gemessenen MML waren die Mutanten schwerer. Im geringeren Umfang als für das Körpergewicht konnten auch MML identifiziert werden, in denen die Mutanten eine im Vergleich zu den Kontrollen veränderte Körpertemperatur oder einen veränderten Energieumsatz aufwiesen. Ein Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht konnte anhand der identifizierten MML nicht gezeigt werden, da sich das Ungleichgewicht der MML mit Unter- oder Übergewicht nicht in der Verteilung der MML mit niedrigerer oder höherer Körpertemperatur widerspiegelte (Kap.3.1.3.2, Tab.4).

Anhand des Differenzvergleichs zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML konnte ebenfalls kein genereller Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Körpergewicht sowie Körpertemperatur und Energieumsatz gezeigt werden. Mutanten die im Vergleich zu den Kontrollen leichter waren hatten jedoch in der Regel einen niedrigeren Energieumsatz und umgekehrt.

Die Analyse der Korrelation zwischen den Variablen anhand der Einzelwerte der Mäuse in einem linearen Regressionsmodell ergab ebenfalls keinen biologisch relevanten Einfluss der punktuellen Messung der Körpertemperatur auf das Körpergewicht und den Energieumsatz. Die starke Korrelation zwischen Körpergewicht und Energieumsatz konnte jedoch bestätigt werden. So hatten leichte Mäuse einen geringeren Energieumsatz als schwere Mäuse und umgekehrt.

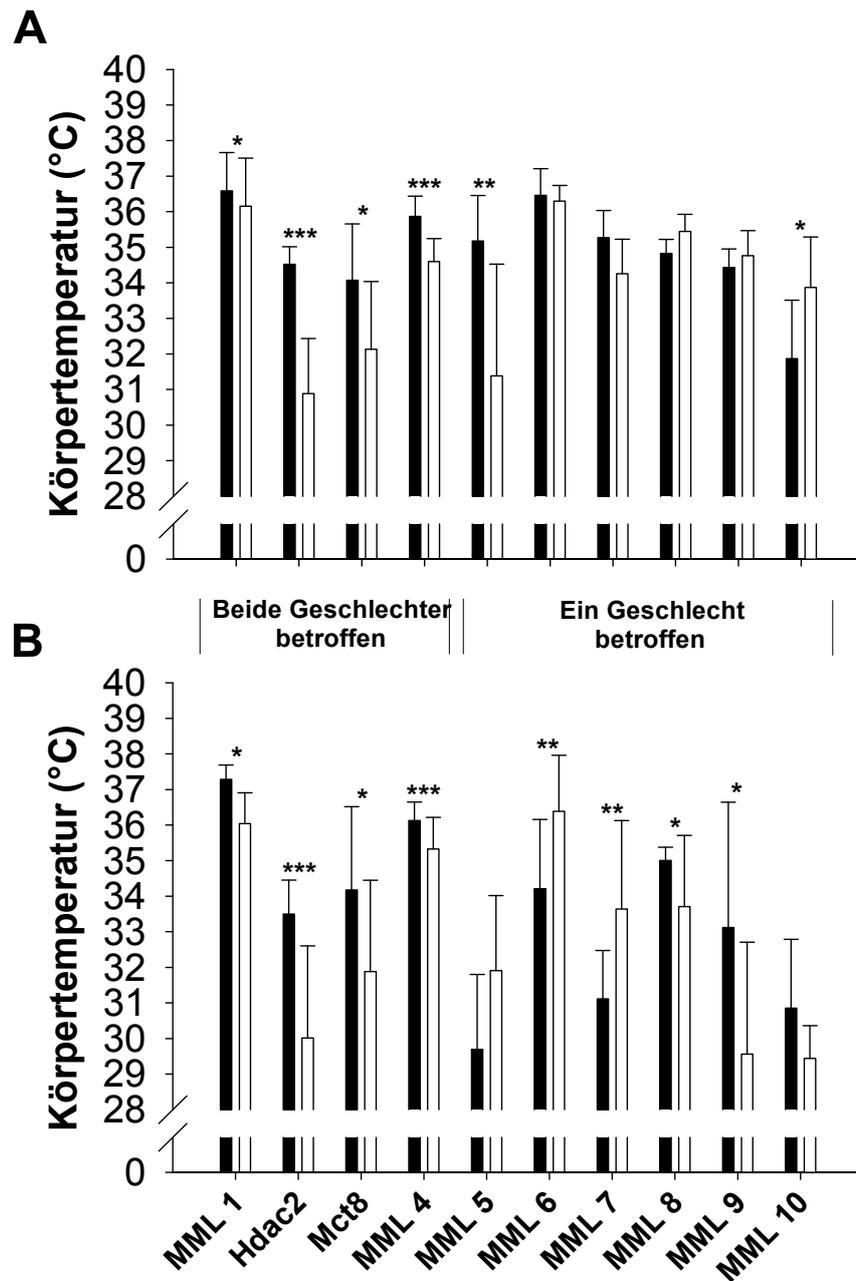
Zusammengefasst konnte unter Standardbedingungen kein Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht oder den Energieumsatz gezeigt werden.

### 3.2 Futterentzug zur Detektierung von Genen, die an der Thermoregulation beteiligt sind

Viele MML zeigen bei *ad libitum* Fütterung keinen auffälligen Phänotyp. Futterentzug über einen definierten Zeitraum kann als *Challenge* verwendet werden, um Gene zu identifizieren, die an der Regulation des Energiehaushalts und speziell der Körpertemperaturregulation während des durch den Futterentzug hervorgerufenen Energiedefizits beteiligt sind. 31 MML (Alter: 16-18 Wochen) wurde für einen Zeitraum von jeweils 48 Stunden das Futter entzogen (Beginn ca. 7:30 MEZ) und die rektale Körpertemperatur an beiden Tagen morgens zwischen 7:00 und 8:30 MEZ bestimmt (Ehrhardt 2008, Willershäuser et al. 2012). Zur Evaluierung wurde die Körpertemperatur am zweiten Morgen des Futterentzugs verwendet.

In 10 MML wurde nach dem zweitägigen Futterentzug eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant veränderte Körpertemperatur gefunden (Willershäuser et al. 2012, Abb.18). In 4 der 10 MML zeigten beide Geschlechter eine signifikante Absenkung der Körpertemperatur. In 6 MML hatten die Mutanten nur eines Geschlechts eine im Vergleich zu den Kontrollen veränderte Körpertemperatur: In 3 MML zeigten die Mutanten eine geringere (1 Männchen, 2 Weibchen) und in 3 MML eine stärkere Absenkung (1 Männchen, 2 Weibchen). Für einige der identifizierten Gene, die aufgrund der bestehenden Kooperationsverträge zum Teil nicht genannt werden dürfen, konnten Krankheiten beim Menschen gezeigt werden. Diese wurden bisher jedoch nicht im Zusammenhang mit einer veränderten Körpertemperatur beschrieben. Insgesamt wurden 7 Gene identifiziert, die unter zweitägigem Futterentzug zu einer signifikanten Absenkung der Körpertemperatur führten.

Die Körpertemperatur der MML *Mct8* und *Hdac2* lag bei beiden Geschlechtern im Mittel unter 32 °C, zudem zeigten sie im Vergleich zu den Kontrollen die stärkste Absenkung (Abb.18). Die Mutanten beider MML waren in früheren Untersuchungen zudem leichter (Ehrhardt 2008). Aufgrund des identifizierten thermoregulatorischen Phänotyps wurden sie einer umfangreichen metabolischen Phänotypisierung unterzogen (Kap.3.3, Kap.3.4). Diese umfasste die Analyse des täglichen Energieumsatzes, einen zweitägigen Futterentzug mit simultaner Aufzeichnung des Energieumsatzes sowie die Analyse des Energieumsatzes in Thermoneutralität (30 °C) und unter akuter Kälteexposition (5 °C) im Rahmen einer sogenannten *Kältechallenge*.



**Abb.18: MML mit Veränderung der Körpertemperatur nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist die Körpertemperatur der Männchen (A) und Weibchen (B) von 10 MML nach zweitägigem Futterentzug. Bei 4 MML zeigten die Mutanten beider Geschlechter eine im Vergleich zu den Kontrollen stärkere Körpertemperaturabsenkung. Die Mutanten der MML Hdac2 und Mct8 zeigten bei beiden Geschlechtern die niedrigste Körpertemperatur. Bei den restlichen 6 MML war nur eines der beiden Geschlechter betroffen, wobei auch MML identifiziert wurden, in denen die Mutanten eine im Vergleich zu den Kontrollen höhere Körpertemperatur zeigten. Schwarze Balken Kontrollen, weiße Balken Mutanten. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.3 Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Mct8

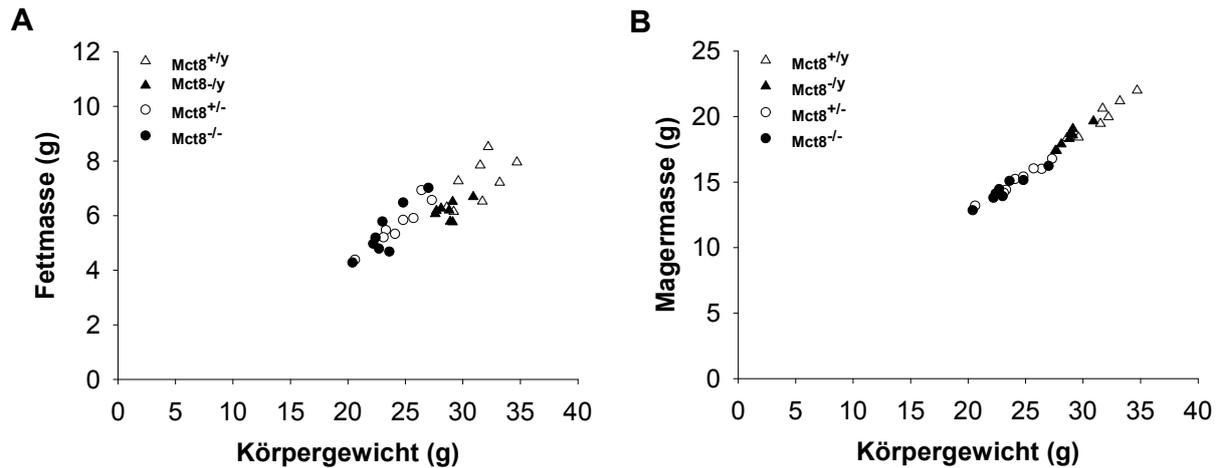
#### 3.3.1 Analyse unter Standardhaltungsbedingungen

Der Energieumsatz wurde für Mutanten (Männchen: Mct8<sup>-y</sup>; Weibchen: Mct8<sup>-/-</sup>) und Kontrollen (Männchen: Mct8<sup>+y</sup>; Weibchen: Mct8<sup>+/-</sup>) bei *ad libitum* Fütterung und Raumtemperatur (24 °C) bestimmt. Die Mäuse hatten eine Altersspanne von 27-33 Wochen. Eine Tabelle (Tab.5) mit den Daten der im Folgenden erhobenen Variablen findet sich in Kapitel 3.3.1.4 am Ende der Zusammenfassung.

##### 3.3.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur

Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren im Mittel 1.9 g leichter ( $p < 0.01$ ). Die Weibchen wogen durchschnittlich 6.8 g weniger als die Männchen ( $p < 0.001$ ). Für die Körpertemperatur konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen ( $p = 0.199$ ) und Geschlechtern ( $p = 0.458$ ) gezeigt werden.

Die Körperzusammensetzung wurde in einer unabhängigen Kohorte mit einem mittleren Alter von 17 Wochen bestimmt (Tab.S1). Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren auch zu diesem Alterszeitpunkt bereits signifikant leichter ( $p < 0.01$ ). Dies war auf eine niedrigere Fett- ( $p < 0.05$ ) und Magermasse ( $p < 0.01$ ) zurückzuführen. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht hatten Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch die Menge an Fett- ( $p = 0.760$ ) und Magermasse ( $p = 0.751$ ), die man für ihr geringeres Körpergewicht erwartet (Abb.19A+B). Die Weibchen hatten signifikant weniger Fett- ( $p < 0.001$ ) und Magermasse ( $p < 0.001$ ) als die Männchen. Unter Berücksichtigung des Körpergewichts war die Fettmasse der Weibchen signifikant erhöht ( $p < 0.01$ , Abb.19A), während die Magermasse leicht, aber dennoch statistisch signifikant geringer war ( $p < 0.01$ , Abb.19B).



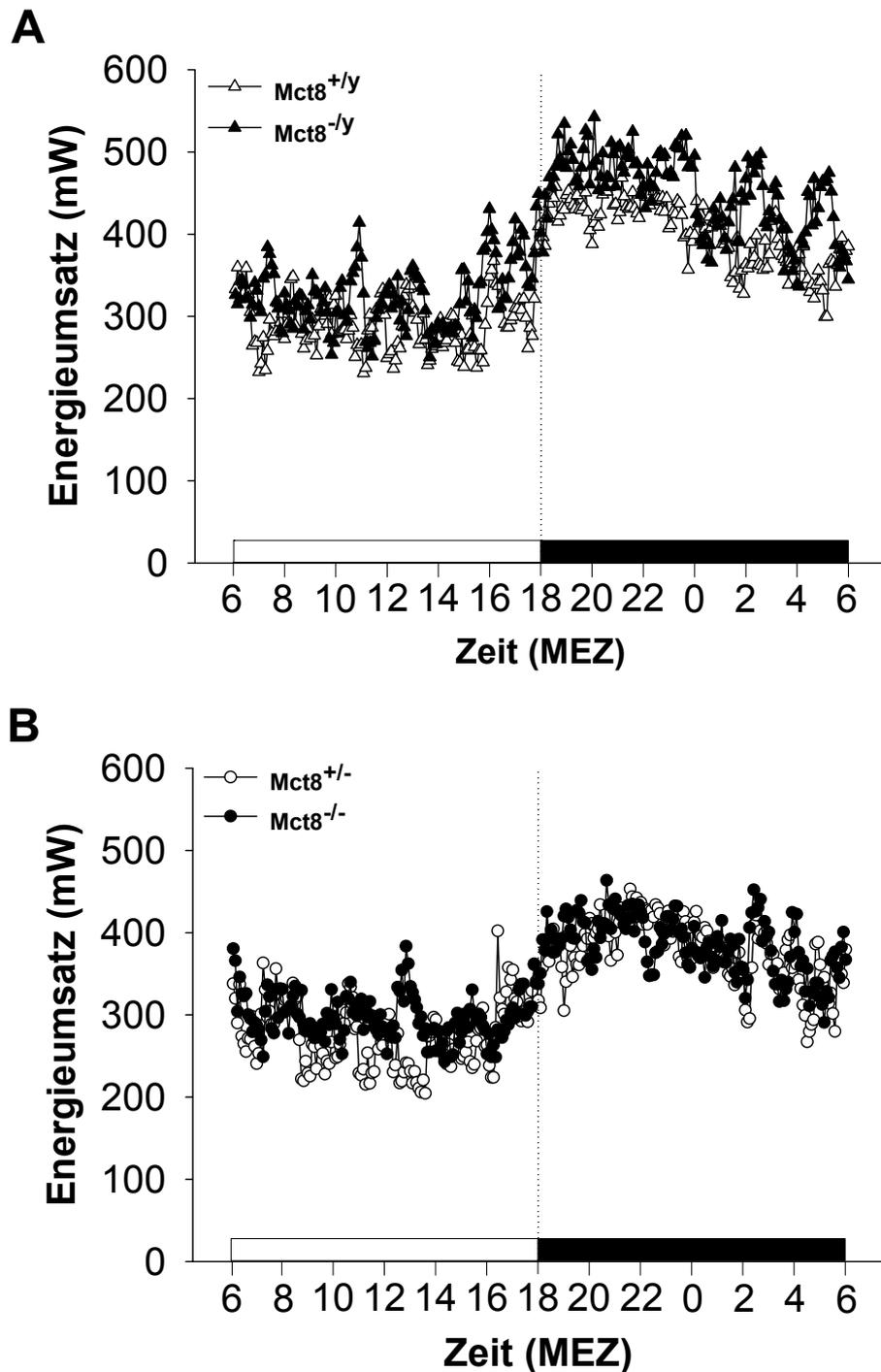
**Abb.19: Körperzusammensetzung in Abhängigkeit des Körpergewichts.** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht normalisierte Fettmasse (A) und Magermasse (B) von 17 Wochen alten Mäusen. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fett- ( $p < 0.001$ ) und Magermasse ( $p < 0.001$ ) mit dem Körpergewicht. Eine Verschiebung der Körperzusammensetzung zwischen beiden Genotypen konnte nicht gezeigt werden, Weibchen hatten jedoch eine im Vergleich zu den Männchen signifikant höhere Fettmasse ( $p < 0.01$ ) und geringere Magermasse ( $p < 0.01$ ).

### 3.3.1.2 Der tägliche Energieumsatz

In der Lichtphase hatten Mct8<sup>-/y</sup> Männchen einen leicht höheren Energieumsatz als Mct8<sup>+/y</sup> Männchen (Abb. 20A). Mit Beginn der Dunkelphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg im Energieumsatz, der bei den Mct8<sup>-/y</sup> Männchen stärker war. Dadurch lag ihr Energieumsatz in der Dunkelphase deutlich über dem der Mct8<sup>+/y</sup> Männchen. Sowohl Mct8<sup>-/y</sup> als auch Mct8<sup>+/y</sup> Männchen zeigten im Verlauf der zweiten Hälfte der Dunkelphase eine starke ultradiane Rhythmik. Diese war bei den Mct8<sup>-/y</sup> Männchen ausgeprägter und führte in den drei aufeinander folgenden ultradianen Phasen zu einem deutlich erhöhten Energieumsatz gegenüber den Mct8<sup>+/y</sup> Männchen. Im Vergleich zur Lichtphase war der Energieumsatz beider Genotypen in der Dunkelphase deutlich höher.

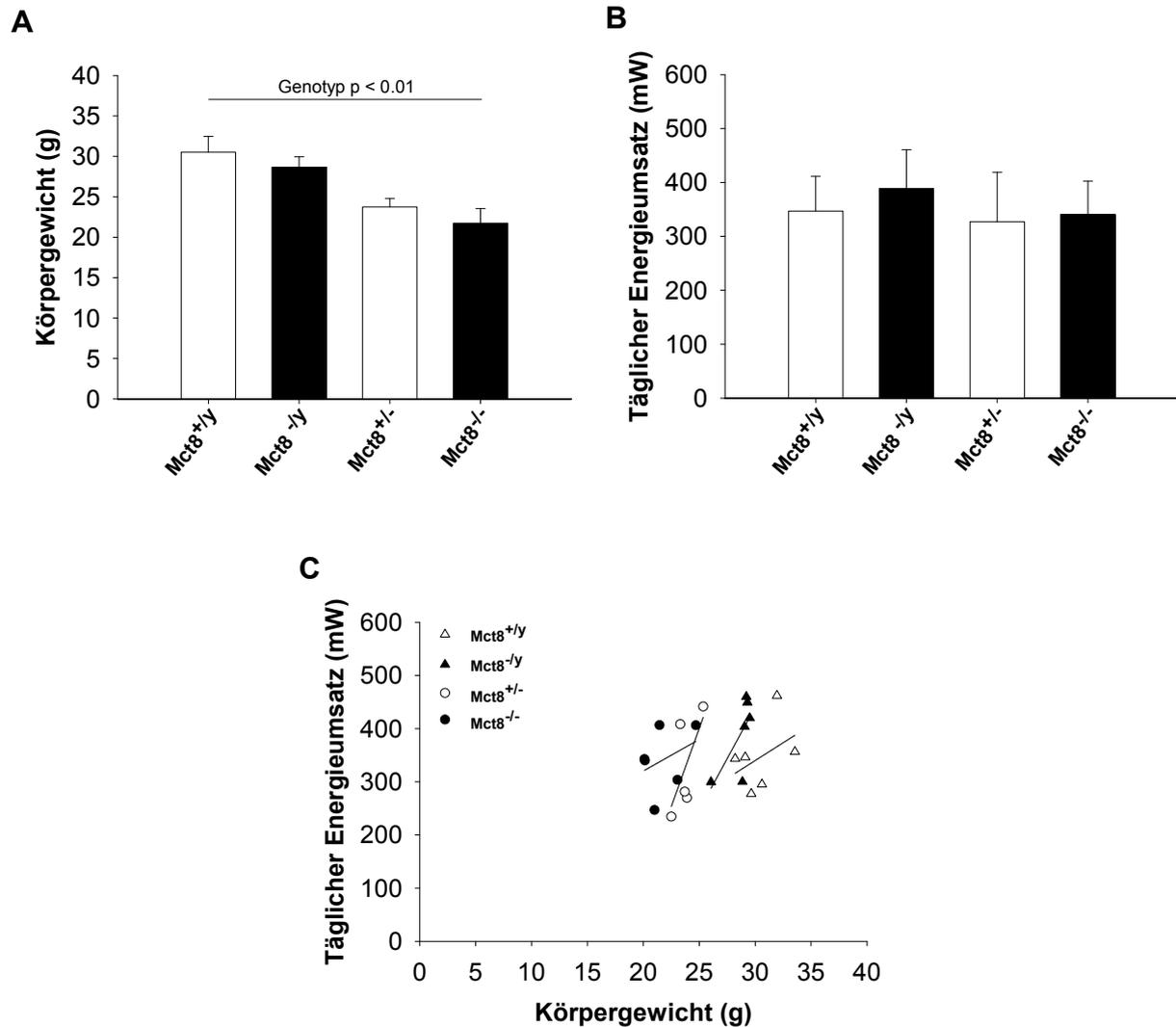
Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten in der Lichtphase einen leicht höheren Energieumsatz als die Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen (Abb.20B). Mit Beginn der Dunkelphase steigerten beide Genotypen ihren Energieumsatz vergleichbar. Im gesamten Verlauf der Dunkelphase bestand kein Unterschied zwischen beiden Genotypen. Wie bei den Männchen zeigten auch die Weibchen in den letzten Stunden der Dunkelphase eine ausgeprägte ultradiane Rhythmik, mit starken Schwankungen im Energieumsatz. In der Dunkelphase lag der Energieumsatz deutlich über dem der Lichtphase.

Trotz der gezeigten genotypspezifischen Unterschiede im Verlauf bestand weder für den mittleren Energieumsatz in der Licht- ( $p = 0.305$ ), noch in der Dunkelphase ( $p = 0.431$ ) ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied (Tab.5).



**Abb.20: Vergleich des täglichen Energieumsatzes zwischen Mct8<sup>+/y</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> und Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäusen.** Abbildung A zeigt den mittleren Energieumsatz der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B den der Weibchen. Mct8<sup>-/y</sup> Männchen hatten sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase einen im Vergleich zu Mct8<sup>+/y</sup> Männchen erhöhten Energieumsatz. Dabei war der genotypspezifische Unterschied in der Dunkelphase aufgrund eines stärkeren Anstiegs im Energieumsatz mit Beginn der Dunkelphase und einer stärker ausgeprägten ultradianen Rhythmik in der zweiten Hälfte der Dunkelphase größer. Bei den Weibchen war der Energieumsatz der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen während der Lichtphase ebenfalls erhöht, in der Dunkelphase bestand kein Unterschied. Genau wie die Männchen zeigten auch die Weibchen in den letzten Stunden der Dunkelphase eine ausgeprägte ultradiane Rhythmik. Der Energieumsatz beider Geschlechter und Genotypen war in der Dunkelphase im Vergleich zur Lichtphase deutlich erhöht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 5, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6.

Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter ( $p < 0.01$ , Abb.21A). Der tägliche Energieumsatz (DEE) war weder zwischen den Genotypen ( $p = 0.367$ ), noch Geschlechtern ( $p = 0.278$ ) signifikant verschieden. Mct8<sup>-y</sup> Männchen hatten jedoch einen tendenziell höheren DEE als Mct8<sup>+y</sup> Männchen, während er bei den Weibchen vergleichbar war (Abb.21B). Basierend auf dem niedrigeren Körpergewicht kann daher ein Trend zu einem leicht erhöhten Energieumsatz der Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse angenommen werden, der jedoch statistisch nicht bestätigt werden konnte. Ein weiterer Hinweis auf einen leichten Hypometabolismus der Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse sind die Ruhestoffwechselraten, die bei beiden Geschlechtern sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase tendenziell erhöht waren, wenn auch nicht signifikant (Lichtphase:  $p = 0.140$ , Dunkelphase:  $p = 0.265$ , Abb.S9A+B). Aufgrund der geringen Gewichtsspanne und Variabilität des Energieumsatzes innerhalb beider Geschlechter und Genotypen, korrelierte der DEE nur unzureichend mit dem Körpergewicht (Abb.21C), weshalb die Daten nicht in einem linearen Regressionsmodell betrachtet wurden. Gleiches gilt für die Ruhestoffwechselraten und den mittleren Energieumsatz der Licht- und Dunkelphase.



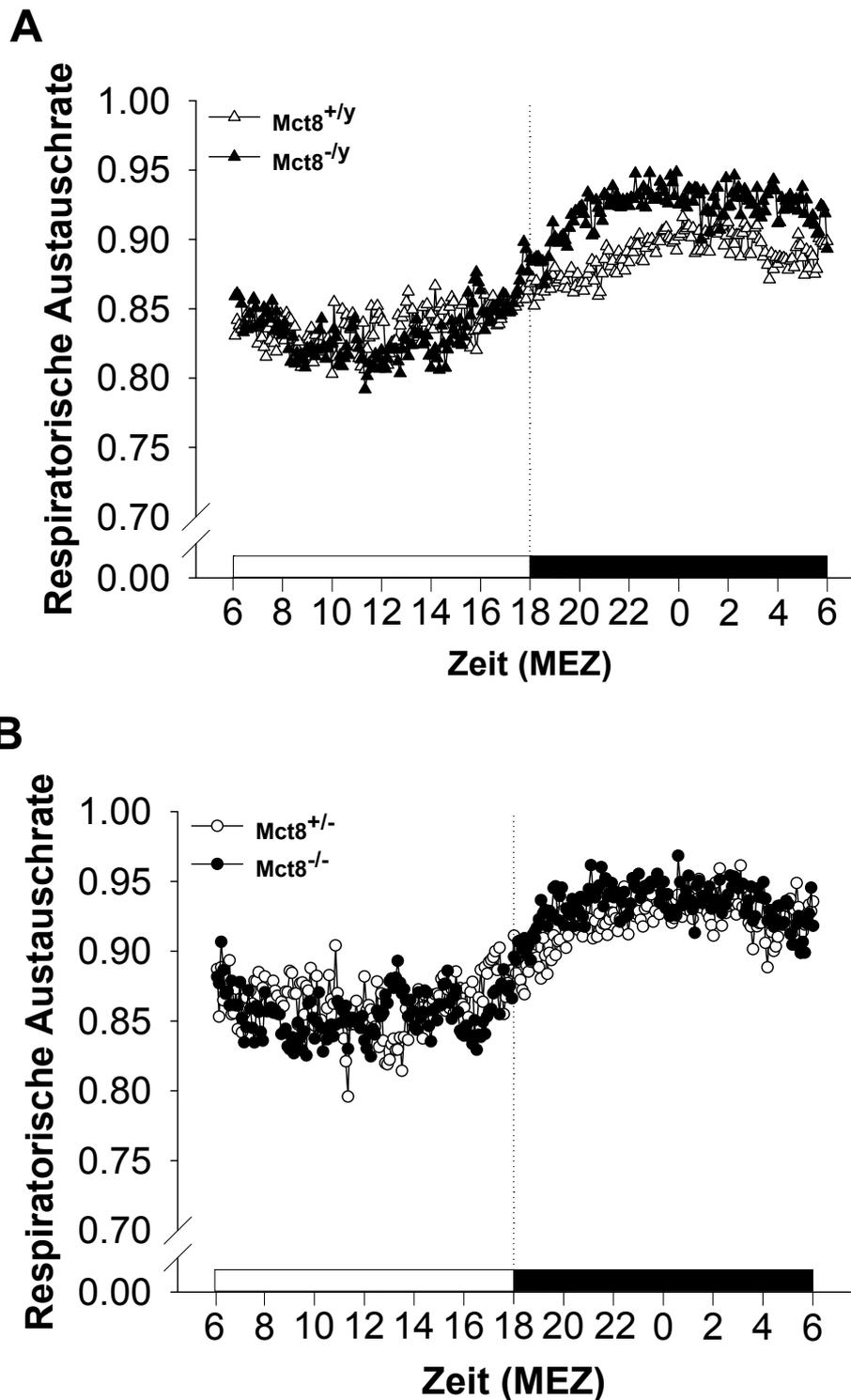
**Abb.21: Körpergewicht sowie absoluter und gegen das Körpergewicht aufgetragener täglicher Energieumsatz.** Dargestellt sind das Körpergewicht (A) sowie der absolute (B) und auf das Körpergewicht normalisierte DEE (C). Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter. Mct8<sup>-/y</sup> Männchen hatten einen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/y</sup> Männchen tendenziell höheren absoluten DEE, während er bei den Weibchen beider Genotypen vergleichbar war. Aufgrund des geringeren Körpergewichts kann ein Trend zu einem leicht erhöhten DEE der Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse angenommen werden. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand ein unzureichender Zusammenhang zwischen Energieumsatz und Körpergewicht. Abb.A+B: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 5, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6.

### 3.3.1.3 Die respiratorische Austauschrate

Die respiratorische Austauschrate (RER) ermöglicht eine Aussage über das verstoffwechselte Substrat. In der Lichtphase war die RER der  $Mct8^{-/y}$  und  $Mct8^{+/y}$  Männchen vergleichbar (Abb.22A). Mit Beginn der Dunkelphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg der RER. Dieser war bei den  $Mct8^{-/y}$  Männchen stärker, wodurch die RER in der Dunkelphase im Vergleich zu den  $Mct8^{+/y}$  Männchen erhöht war. Während der gesamten Dunkelphase lag die RER beider Genotypen über der RER in der Lichtphase.

Die RER der Weibchen war sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase vergleichbar (Abb.22B). Mit Beginn der Dunkelphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg der RER, die in der Dunkelphase deutlich höher war als in der Lichtphase.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren RER der gesamten DEE-Messung zwischen  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  und  $Mct8^{+/y} / Mct8^{+/-}$  Mäusen gezeigt werden ( $p = 0.495$ ). In der Lichtphase war die mittlere RER zwischen den Genotypen nicht signifikant verschieden ( $p = 0.599$ ). In der Dunkelphase bestand ein Trend zu einer erhöhten RER der  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse ( $p = 0.092$ ). Dieser war jedoch statistisch nicht signifikant und basierte maßgeblich auf dem genotypspezifischen Unterschied innerhalb der Männchen, die in der Dunkelphase eine um im Durchschnitt 0.03 höhere RER als  $Mct8^{+/y}$  Männchen hatten.



**Abb.22: Respiratorische Austauschrate während der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes.** Dargestellt ist die RER während der DEE-Messung. Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. In der Lichtphase war die RER zwischen den Genotypen bei beiden Geschlechtern vergleichbar. Mit Beginn Dunkelphase zeigten die Genotypen beider Geschlechter einen Anstieg der RER. Mct8<sup>-/-</sup> und Mct8<sup>+/y</sup> Weibchen hatten in der Dunkelphase eine vergleichbare RER, während Mct8<sup>-/y</sup> Männchen eine höhere RER als Mct8<sup>+/y</sup> Männchen zeigten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 5, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6.

### 3.3.1.4 Zusammenfassung

Mct8<sup>-/-</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter als Mct8<sup>+/-</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse, eine genotypspezifische Verschiebung in der Körperzusammensetzung bestand aber nicht. Der tägliche Energieumsatz der Mct8<sup>-/-</sup> Männchen war im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Männchen aufgrund eines leicht erhöhten Energieumsatzes in der Licht- und Dunkelphase tendenziell erhöht. Zwischen Mct8<sup>-/-</sup> und Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen war er hingegen vergleichbar. Weil Mct8<sup>-/-</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse leichter waren, kann bei *ad libitum* Fütterung und Haltung bei Raumtemperatur (24 °C), die moderater Kälte entspricht, ein tendenziell erhöhter Energieumsatz angenommen werden. Dies konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden. Unterstrichen wird der Befund durch die Ruhestoffwechselraten der Mct8<sup>-/-</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse, die bei beiden Geschlechtern sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase tendenziell erhöht waren. Die Körpertemperatur beider Genotypen war nicht signifikant verschieden. Ein signifikanter Unterschied in der RER während der DEE-Messung konnte nicht gezeigt werden, Mct8<sup>-/-</sup> Männchen hatten in der Dunkelphase jedoch eine gegenüber den Mct8<sup>+/-</sup> Männchen tendenziell höhere RER.

Tab.5: Ermittelte Variablen während der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes. Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht)		
	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 6	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 6	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 5	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 6	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion
Mittleres Körpergewicht (g)	30.5 ± 2.0	28.7 ± 1.3	23.8 ± 1.0	21.7 ± 1.8	<b>0.009</b>	<b>0.000</b>	0.907
Körpertemperatur nach Messung (°C)	37.16 ± 1.15	37.03 ± 0.44	36.85 ± 0.72	37.81 ± 0.36	0.199	0.458	0.097
Täglicher Energieumsatz (mW)	346.78 ± 64.64	388.76 ± 71.77	327.10 ± 91.70	341.00 ± 61.39	0.367	0.278	0.647
Mittlerer Energieumsatz Lichtphase (mW)	291.49 ± 69.24	326.65 ± 61.38	276.64 ± 74.35	297.63 ± 49.15	0.305	0.420	0.793
Mittlerer Energieumsatz Dunkelphase (mW)	402.07 ± 61.02	450.87 ± 83.21	377.55 ± 110.02	384.37 ± 75.01	0.431	0.204	0.551
Ruhestoffwechsel Lichtphase (mW)	220.48 ± 60.14	246.42 ± 50.45	194.71 ± 64.13	238.13 ± 39.55	0.140	0.459	0.702
Ruhestoffwechsel Dunkelphase (mW)	277.98 ± 82.49	298.21 ± 48.99	214.72 ± 54.30	251.25 ± 41.35	0.265	<b>0.038</b>	0.745
Mittlere Respiratorische Austauschrate	0.86 ± 0.03	0.88 ± 0.03	0.89 ± 0.02	0.89 ± 0.03	0.495	0.065	0.612
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase	0.84 ± 0.03	0.83 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.599	0.059	0.917
Mittlere Respiratorische Austauschrate Dunkelphase	0.89 ± 0.03	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.02	0.93 ± 0.03	0.092	0.096	0.405

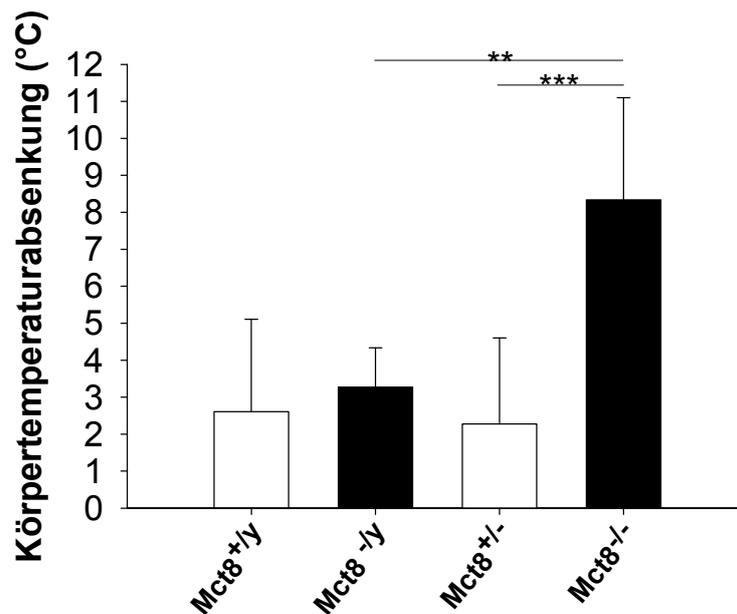
### 3.3.2 Analyse unter Futterentzug

Direkt im Anschluss an die Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.3.3.1) wurden der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion unter zweitägigem Futterentzug bestimmt. Im Folgenden ist nicht der Energieumsatz, sondern der Sauerstoffverbrauch dargestellt, weil die respiratorische Austauschrate in den hypometabolen Phasen der Mäuse während des Futterentzugs starken Schwankungen von im Mittel 0.71-0.85 unterlag.

#### 3.3.2.1 Körpergewicht, Körpertemperatur und Körperzusammensetzung

Vor dem Futterentzug waren  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse im Mittel 1.7 g leichter ( $p < 0.05$ ). Die Weibchen wogen durchschnittlich 6.4 g weniger als die Männchen ( $p < 0.001$ ).  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse verloren signifikant weniger Gewicht als  $Mct8^{+/y}$  /  $Mct8^{+/-}$  Mäuse ( $p < 0.05$ ). Dies beruhte jedoch maßgeblich auf einem geringeren Gewichtsverlust der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen, während die Gewichtsabnahme der Männchen vergleichbar war. In der Regel hat eine schwere Maus einen höheren Gewichtsverlust als eine leichte Maus (Ehrhardt, 2008). Auch nach Berücksichtigung des geringeren Körpergewichts bestand noch immer ein Trend zu einem geringeren Gewichtsverlust der  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse ( $p = 0.053$ ), insbesondere bei den Weibchen. Nach dem Futterentzug waren  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse im Mittel 1.1 g leichter ( $p = 0.094$ ).

Vor der Messung war die Körpertemperatur weder zwischen den Genotypen ( $p = 0.199$ ) noch Geschlechtern ( $p = 0.458$ ) signifikant verschieden. In Folge des Futterentzugs senkten die Mäuse beider Genotypen und Geschlechter ihre Körpertemperatur ab (Abb.23). Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp in der Körpertemperaturabsenkung ( $p < 0.05$ ) und Körpertemperatur nach der Messung ( $p < 0.05$ ).  $Mct8^{-/y}$  Männchen senkten ihre Körpertemperatur mit im Mittel  $-3.28$  °C nur gering stärker ab als  $Mct8^{+/y}$  Männchen mit durchschnittlich  $-2.61$  °C ( $p = 0.614$ , *post hoc* Test).  $Mct8^{-/-}$  Weibchen zeigten mit im Mittel  $-8.34$  °C hingegen eine signifikant stärker Absenkung als  $Mct8^{+/-}$  Weibchen mit im Durchschnitt  $-2.28$  °C ( $p < 0.001$ , *post hoc* Test). Vergleicht man die Geschlechter senkten  $Mct8^{-/-}$  Weibchen ihre Körpertemperatur somit signifikant stärker ab als  $Mct8^{-/y}$  Männchen ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test). Entsprechend der Absenkung war die Körpertemperatur innerhalb der Männchen nach dem Futterentzug nicht signifikant verschieden ( $p = 0.547$ , *post hoc* Test), bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen war sie im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen signifikant niedriger ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test). Während  $Mct8^{+/y}$  und  $Mct8^{-/y}$  Männchen sowie  $Mct8^{+/-}$  Weibchen nach dem Futterentzug eine Körpertemperatur von durchschnittlich über 33 °C hatten, lag die Körpertemperatur der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen aufgrund der stärksten Absenkung unter 30 °C. Eine Zusammenfassung der Variablen findet sich in Tab.6.



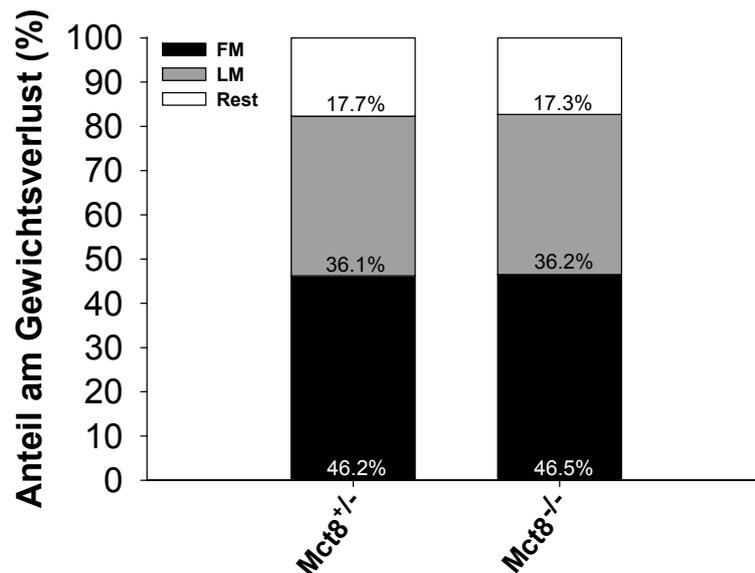
**Abb.23: Vergleich der Körpertemperaturabsenkung nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist die Temperaturabsenkung beider Geschlechter und Genotypen nach einem Futterentzug von 48 Stunden. Alle Gruppen zeigten eine Absenkung der Körpertemperatur. Zwischen den Mct8<sup>-/y</sup> und Mct8<sup>+/y</sup> Männchen bestand kein signifikanter Unterschied, während Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen eine im Vergleich zu Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen signifikant stärkere Absenkung zeigten. Zudem war die Temperaturabsenkung der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen signifikant höher als die der Mct8<sup>-/y</sup> Männchen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Statistik basierend auf *post hoc* Test. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 6, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 5, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6. \*\* p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

**Tab.6: Körpergewicht und Körpertemperatur bei zweitägigem Futterentzug.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Mct8 <sup>+/y</sup> n = 6	Mct8 <sup>-/y</sup> n = 6	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 5	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 6	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Körpergewicht vor Messung (g)	29.7 $\pm$ 2.1	28.3 $\pm$ 0.9	23.6 $\pm$ 0.9	21.7 $\pm$ 1.8	<b>0.019</b>	<b>0.000</b>	0.755	
Körpergewicht nach Messung (g)	23.8 $\pm$ 2.0	22.7 $\pm$ 1.0	18.0 $\pm$ 1.0	17.1 $\pm$ 1.5	0.094	<b>0.000</b>	0.895	
Körpergewichtsverlust (g)	-5.9 $\pm$ 0.5	-5.6 $\pm$ 0.5	-5.5 $\pm$ 0.3	-4.6 $\pm$ 0.6	<b>0.010</b> 0.053	<b>0.003</b> 0.769	0.189 0.208	0.091
Körpertemperatur vor Messung (°C)	37.16 $\pm$ 1.15	37.03 $\pm$ 0.44	36.85 $\pm$ 0.72	37.81 $\pm$ 0.36	0.199	0.458	0.097	
Körpertemperatur nach Messung (°C)	34.55 $\pm$ 2.50	33.76 $\pm$ 0.80	34.58 $\pm$ 1.97	29.47 $\pm$ 3.05	<b>0.005</b>	<b>0.035</b>	<b>0.034</b>	
Körpertemperatur-Absenkung (°C)	-2.61 $\pm$ 2.50	-3.28 $\pm$ 1.06	-2.28 $\pm$ 2.33	-8.34 $\pm$ 2.76	<b>0.002</b>	<b>0.021</b>	<b>0.010</b>	

In einem weiteren Schritt wurde der Gewichtsverlust jeder Maus gegen ihre Körpertemperaturabsenkung aufgetragen. Dies diente der Überprüfung, ob eine niedrigere Körpertemperatur mit einer Energieeinsparung und somit geringeren Gewichtsabnahme einhergeht oder das Aufrechterhalten der Körpertemperatur mit erhöhten Kosten und einer gesteigerten Gewichtsabnahme verbunden ist. Bei Betrachtung der Einzeldaten über beide Geschlechter und Genotypen bestand ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 0.01$ , Abb.S10A). Mäuse mit stärkerer Temperaturabsenkung zeigten eine geringere Gewichtsabnahme. Rund 28 % des Gewichtsverlustes konnte durch die Variation der Körpertemperatur erklärt werden ( $r^2 = 0.275$ ). Der Zusammenhang wurde jedoch maßgeblich durch die starke Temperaturabsenkung der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen beeinflusst. Bei der Analyse ohne  $Mct8^{-/-}$  Weibchen bestand kein signifikanter Zusammenhang mehr ( $p = 0.803$ ,  $r^2 = 0.004$ , Abb.S10B). Dementsprechend war der Zusammenhang bei Einzelbetrachtung der Geschlechter innerhalb der Weibchen noch signifikant ( $p = 0.050$ ,  $r^2 = 0.363$ ), jedoch nicht bei den Männchen ( $p = 0.818$ ,  $r^2 = 0.006$ ).

Die Veränderung der Körperzusammensetzung unter zweitägigem Futterentzug wurde in einer unabhängigen Kohorte bei weiblichen Mäusen mit einem mittleren Alter von 27 Wochen bestimmt (Tab.S2). Vor dem Futterentzug waren  $Mct8^{-/-}$  Weibchen durchschnittlich 3.4 g leichter ( $p < 0.05$ ). In Abb.24 ist der Anteil der Fett- und Magermasse am Gewichtsverlust dargestellt. Bei beiden Genotypen machte die Abnahme an Fettmasse rund 46 % des Gewichtsverlusts aus, rund 36 % waren Magermasse (Fettmasse:  $Mct8^{+/-}$ :  $46.2 \pm 11.5$  %,  $Mct8^{-/-}$ :  $46.5 \pm 4.6$  %,  $p = 0.955$ ; Magermasse:  $Mct8^{+/-}$ :  $36.1 \pm 7.8$  %,  $Mct8^{-/-}$ :  $36.2 \pm 6.8$  %,  $p = 0.967$ ). Die restlichen etwa 17 % stellen die Differenz zum Gewichtsverlust dar, wobei es sich wahrscheinlich um Flüssigkeit und Darminhalt handelt ( $Mct8^{+/-}$ :  $17.7 \pm 7.5$  %,  $Mct8^{-/-}$ :  $17.3 \pm 3.5$  %,  $p = 0.891$ ). Das Ergebnis zeigt, dass  $Mct8^{-/-}$  Weibchen keine Probleme mit der Mobilisierung ihrer Energiereserven während des Futterentzugs hatten und keine unterschiedliche Mobilisierung stattgefunden hat.



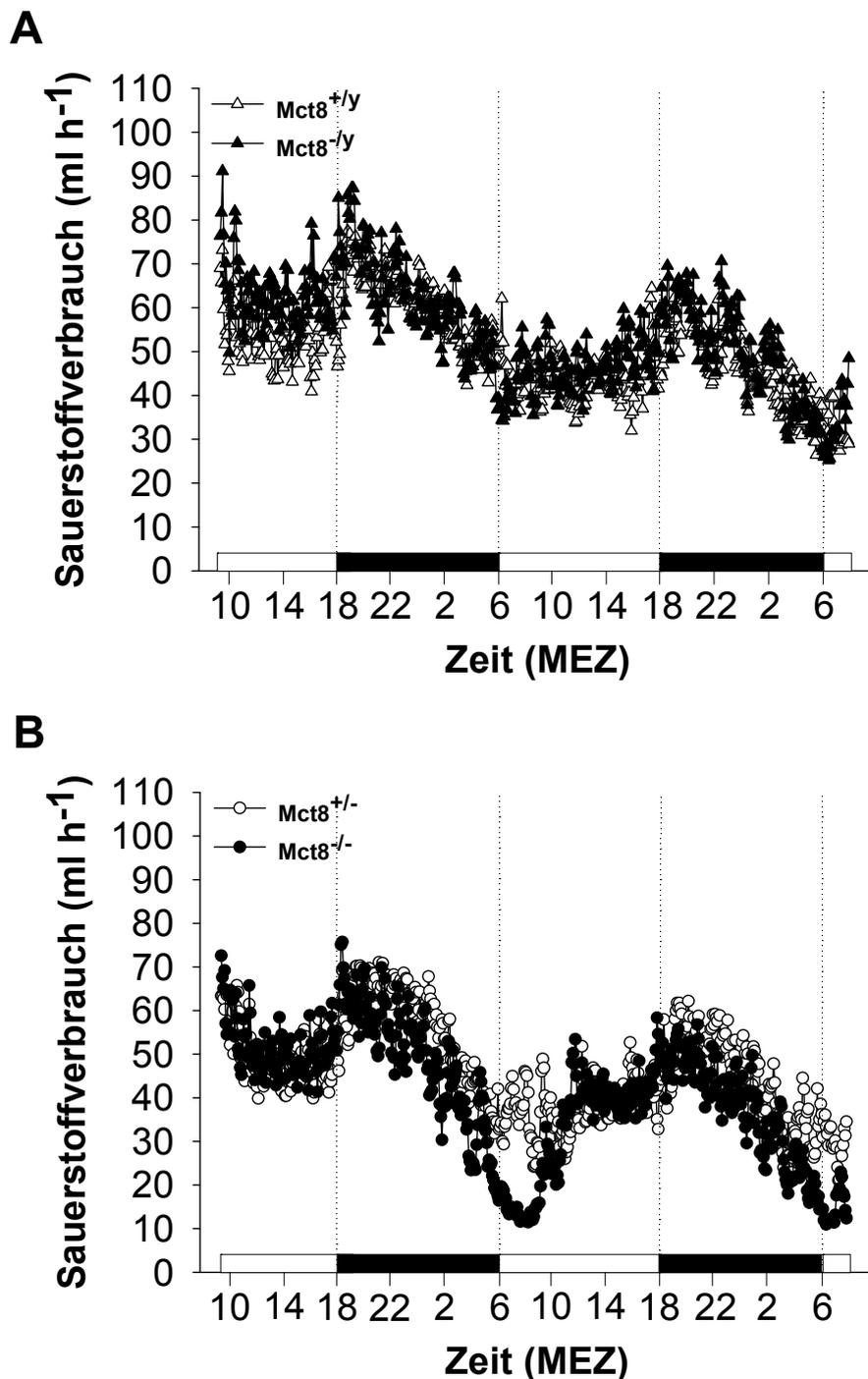
**Abb.24: Anteile der Körperzusammensetzung am Gewichtsverlust nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Anteil der Fettmasse (FM), Magermasse (LM) und des restlichen Anteils (Rest), bei dem es sich wahrscheinlich um Flüssigkeit und Darminhalt handelt, am Gewichtsverlust. Es bestand kein Unterschied zwischen Mct8<sup>+/-</sup> und Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen. Dies zeigt eine vergleichbare Nutzung der Körperreserven. Mittelwerte. Mct8<sup>+/-</sup>: n = 7, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 7.

### 3.3.2.2 Der Sauerstoffverbrauch

In der ersten Lichtphase hatten Mct8<sup>-/-</sup> Männchen einen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Männchen leicht erhöhten Sauerstoffverbrauch, während er im weiteren Verlauf des Futterentzugs zwischen beiden Genotypen vergleichbar war (Abb.25A). Mit Beginn der ersten Dunkelphase steigerten beide Genotypen ihren Sauerstoffverbrauch. Es folgte eine kontinuierliche Absenkung im weiteren Verlauf der Dunkelphase, wodurch der Sauerstoffverbrauch in der zweiten Lichtphase zunächst unter dem der ersten lag. In den letzten Stunden steigerten die Mäuse ihren Sauerstoffverbrauch erneut, wobei aber nicht mehr das Niveau zu Beginn der ersten Dunkelphase erreicht wurde. Im Verlauf der zweiten Dunkelphase wurde der Sauerstoffverbrauch erneut kontinuierlich abgesenkt, wodurch die Mäuse gegen Ende der Dunkelphase ihren geringsten Sauerstoffverbrauch hatten.

Der Sauerstoffverbrauch der Weibchen war in der ersten Lichtphase vergleichbar, im weiteren Verlauf konnten jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen gezeigt werden (Abb.25B). Mit Beginn der Dunkelphase steigerten beide Genotypen ihren Sauerstoffverbrauch. Während Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen bereits nach wenigen Minuten eine kontinuierliche Absenkung zeigten, wurde dies bei den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen erst in der zweiten Hälfte der Dunkelphase beobachtet, wodurch Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen einen deutlich niedrigeren Sauerstoffverbrauch hatten. Beginnend etwa 1.5 h vor Ende der Dunkelphase gegen 4:30 MEZ bis in die folgende Lichtphase gegen 10:30 MEZ zeigten Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen eine ausgeprägte hypometabole Phase. Diese wies die Charakteristika eines Torporbouts auf, mit

einer starken Absenkung des Sauerstoffverbrauchs beim Eintritt sowie einer schnellen Steigerung beim Austritt. In der hypometabolen Phase senkten Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen ihren Sauerstoffverbrauch von durchschnittlich 46 ml O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> zu Beginn des Eintritts um etwa 33 ml O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> bis auf im Mittel 13 ml O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> ab. Nach dem Austritt steigerten sie ihren Sauerstoffverbrauch wieder auf das Niveau der Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen, wodurch in der zweiten Hälfte der Lichtphase kein Unterschied zwischen beiden Genotypen bestand. Im Gegensatz zu den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen zeigte der mittlere Sauerstoffverbrauch der Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen keine vergleichbar stark ausgeprägte hypometabole Phase. Mit Beginn der zweiten Dunkelphase steigerten beide Genotypen ihren Sauerstoffverbrauch noch einmal deutlich, wobei der Anstieg bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen geringer ausfiel. Wie in der ersten Dunkelphase zeigten Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen eine stärkere Absenkung im Sauerstoffverbrauch, der erneut in einer hypermetabolen Phase endete und so deutlich unter dem der Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse lag. Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten ebenfalls eine Absenkung des Sauerstoffverbrauchs, aber keine hypometabole Phase.



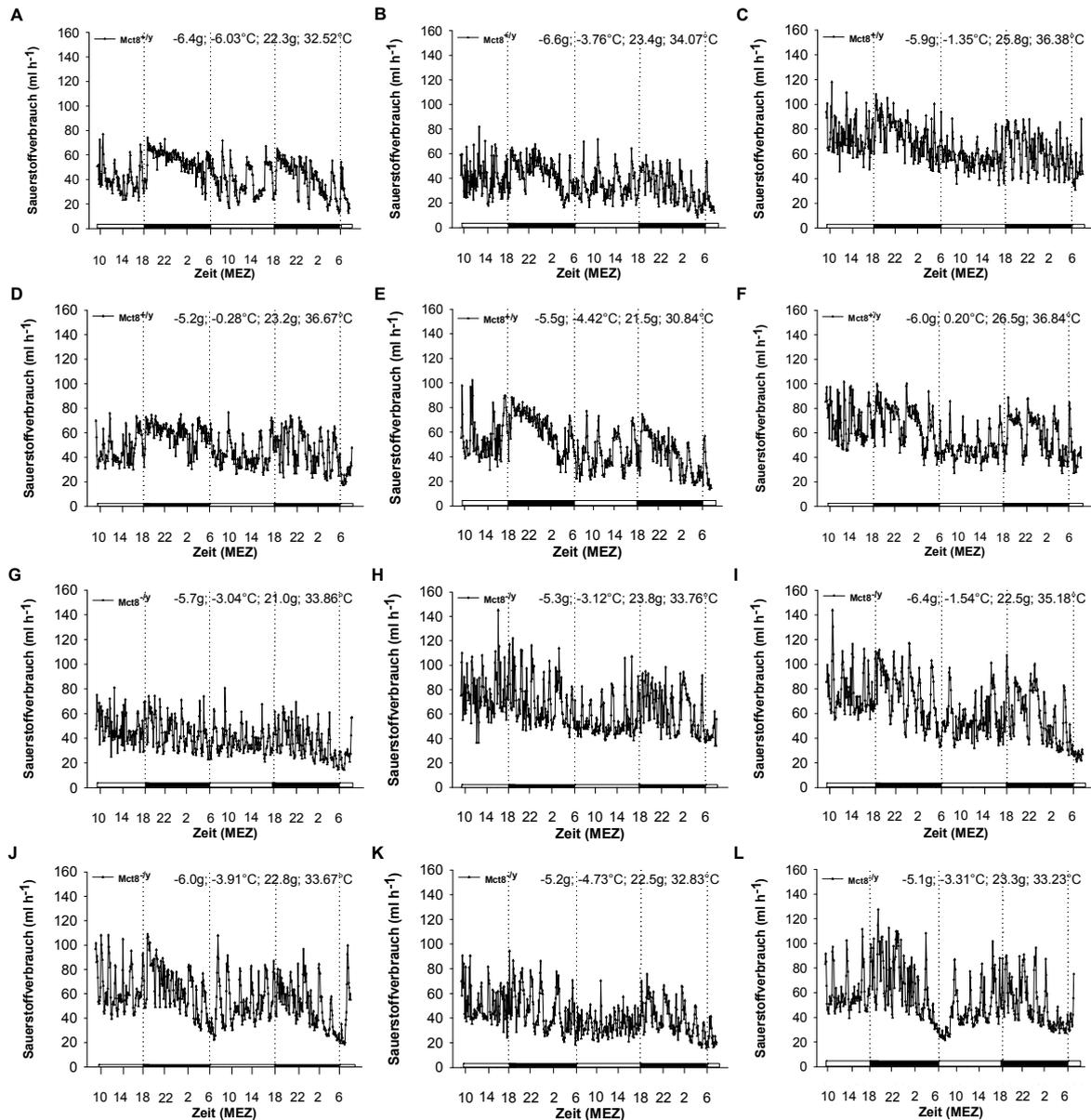
**Abb.25: Sauerstoffverbrauch unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch während des Futterentzugs. Abbildung A zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B den der Weibchen. In der ersten Lichtphase des Futterentzugs war der Sauerstoffverbrauch der  $\text{Mct8}^{-/y}$  Männchen im Vergleich zu den  $\text{Mct8}^{+/y}$  Männchen erhöht, während er im weiteren Verlauf vergleichbar war. Beide Genotypen senkten ihren Sauerstoffverbrauch als Reaktion auf den Futterentzug während der Dunkelphasen ab und steigerten ihn im Verlauf der Lichtphasen. Weibchen zeigten ebenfalls eine Absenkung des Sauerstoffverbrauchs während der Dunkelphasen und einen Anstieg im Verlauf der Lichtphasen. Es bestanden jedoch deutliche genotypspezifische Unterschiede: So zeigten  $\text{Mct8}^{-/-}$  Weibchen eine ausgeprägte hypometabole Phase beginnend am Ende der ersten Dunkelphase, die erst in der folgenden Lichtphase endete. Auch am Ende der zweiten Dunkelphase wurden sie erneut hypometabol. Dadurch lag der Sauerstoffverbrauch der  $\text{Mct8}^{-/-}$  Weibchen deutlich unter dem der  $\text{Mct8}^{+/-}$  Weibchen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet.  $\text{Mct8}^{+/y}$ : n = 6,  $\text{Mct8}^{-/y}$ : n = 6,  $\text{Mct8}^{+/-}$ : n = 5,  $\text{Mct8}^{-/-}$ : n = 6.

Die Betrachtung der Einzelverläufe des Sauerstoffverbrauchs während des zweitägigen Futterentzugs zeigt, dass die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen individuell sehr unterschiedlich reagierten (Abb.26 und Abb.27). Dies betrifft sowohl die Variabilität im Sauerstoffverbrauch als auch das Auftreten und die Länge der hypometabolen Phasen.

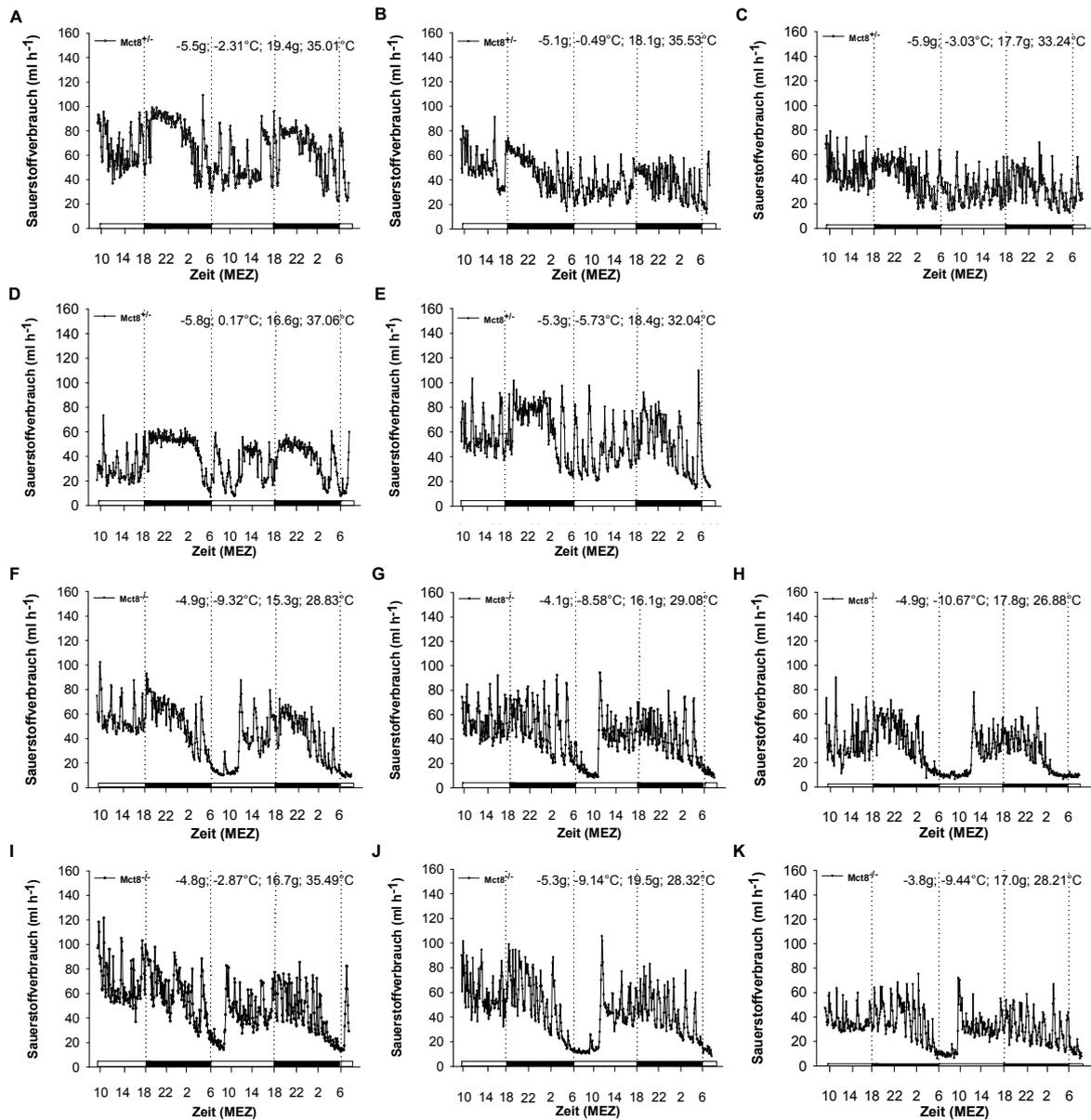
Alle  $Mct8^{-/-}$  Weibchen (6/6) wurden innerhalb des ersten Tages des Futterentzugs torpid (Abb.27F-K), was sich auch im mittleren Verlauf des Sauerstoffverbrauchs als hypometabole Phase widerspiegelte (Abb.25B). Das Torporereignis begann bei allen Mäusen am Ende der ersten Dunkelphase und endete nach individuell verschiedener Länge im Verlauf der folgenden Lichtphase. Beim Austritt aus dem Torpor, der je nach Maus etwa 15-40 min dauerte, zeigten alle Tiere einen deutlichen Anstieg im Sauerstoffverbrauch, der in dem maximal registrierten Sauerstoffverbrauch des Tages endete (1 Messwert) und im Anschluss wieder abgesenkt wurde. Auch im Verlauf der zweiten Dunkelphase traten alle  $Mct8^{-/-}$  Weibchen erneut in eine hypometabole Phase ein. Im Gegensatz dazu zeigte nur eines der analysierten  $Mct8^{+/-}$  Weibchen (1/5) eine kurze hypometabole Phase, beginnend am Ende der ersten Dunkelphase (Abb.27D). Diese war jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen. Der Sauerstoffverbrauch der übrigen  $Mct8^{+/-}$  Weibchen war in diesem Zeitraum durch starke Schwankungen gekennzeichnet.

Unter den  $Mct8^{-/y}$  Männchen wurde lediglich eine Maus (1/6) in den letzten Stunden der ersten Dunkelphase hypometabol (Abb.26L). Keines der analysierten  $Mct8^{+/y}$  Männchen (0/6) zeigte im Verlauf des Futterentzugs ausgeprägte hypometabole Phasen (Abb.26A-F).

Am Ende des Futterentzugs war die rektale Körpertemperatur der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen deutlich abgesenkt und lag in der Regel unter  $30^{\circ}\text{C}$  (Abb.27F+G+H+J+K). Lediglich ein  $Mct8^{-/-}$  Weibchen hatte am Ende der Messung durch den Austritt aus der hypometabolen Phase einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, der mit einer erhöhten rektalen Körpertemperatur einherging (Abb.27I). Im Gegensatz dazu hatten  $Mct8^{+/-}$  Weibchen sowie die Männchen beider Genotypen am Ende der Messung einen höheren Sauerstoffverbrauch und eine höhere rektale Körpertemperatur (Abb.26A-L, Abb.27A-E).



**Abb.26: Individueller Sauerstoffverbrauch männlicher  $Mct8^{+/y}$  und  $Mct8^{-/y}$  Mäuse unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch der  $Mct8^{+/y}$  (A-F) und  $Mct8^{-/y}$  (G-L) Männchen, der Gewichtsverlust, die Veränderung der Körpertemperatur sowie das Gewicht und die rektale Körpertemperatur nach dem Futterentzug. Die Mäuse reagierten individuell verschieden auf den Futterentzug. Nur eines der  $Mct8^{-/y}$  Männchen zeigte eine hypometabole Phase, beginnend in der Dunkelphase des ersten Tages des Futterentzugs (L). Bei allen anderen analysierten  $Mct8^{-/y}$  Männchen und  $Mct8^{+/y}$  Männchen wurde in diesem Zeitraum keine entsprechende hypometabole Phase gefunden.



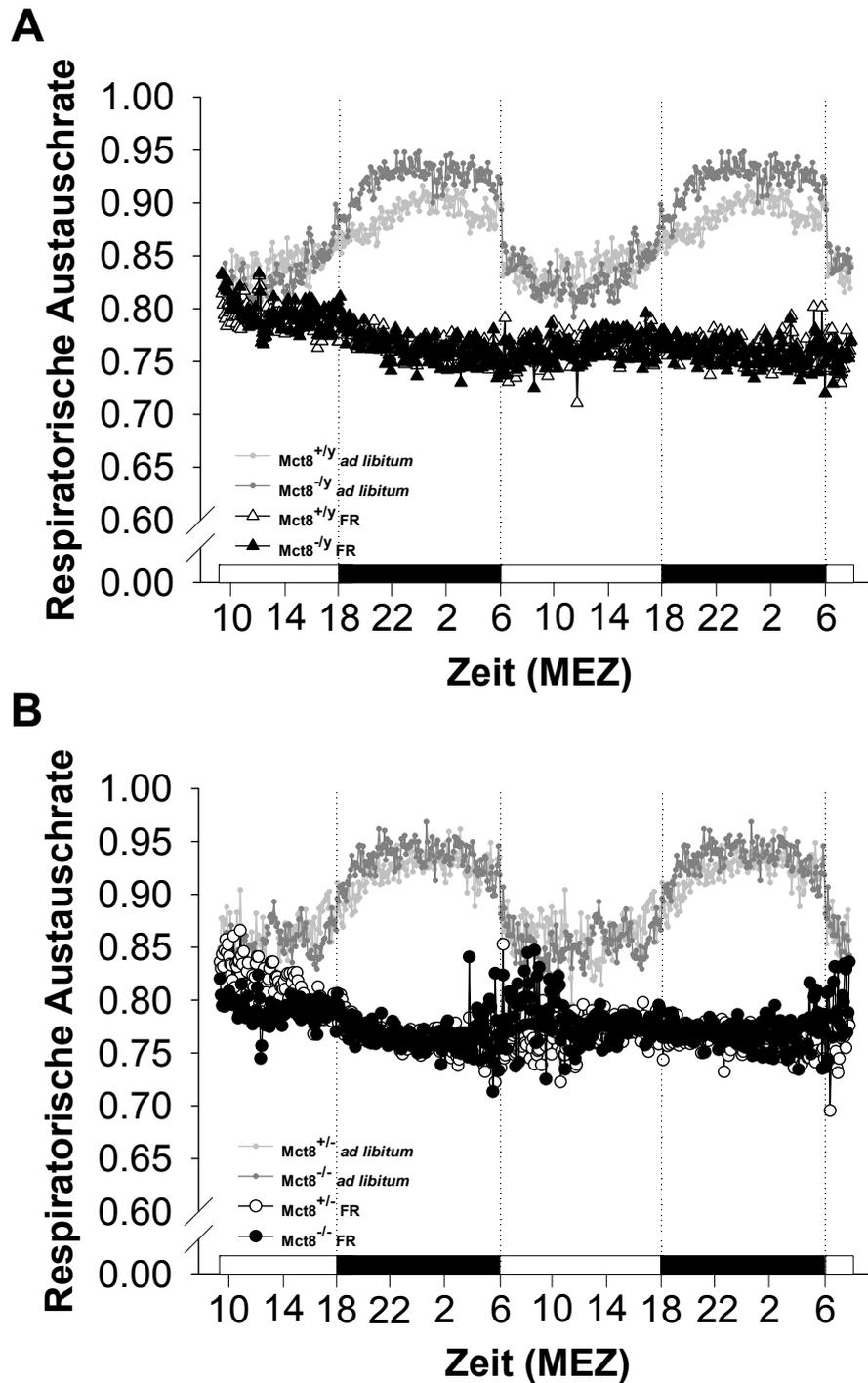
**Abb.27: Individueller Sauerstoffverbrauch weiblicher Mct8<sup>+/-</sup> und Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch der Mct8<sup>+/-</sup> (A-E) und Mct8<sup>-/-</sup> (F-K) Weibchen, der Gewichtsverlust, die Veränderung der Körpertemperatur sowie das Gewicht und die rektale Körpertemperatur nach dem Futterentzug. Die Mäuse reagierten individuell verschieden auf den Futterentzug. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen wurden bereits innerhalb des ersten Tages des Futterentzugs für mehrere Stunden torpid, mit individuell verschiedener Länge des Torproereignisses. Am Ende des zweiten Tages des Futterentzugs traten sie erneut in eine hypometabole Phasen ein. Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen zeigten, mit einer Ausnahme (D), keine vergleichbar ausgeprägten hypometabolen Phasen.

### 3.3.2.3 Die respiratorische Austauschrate

Unter Futterentzug war die respiratorische Austauschrate (RER) beider Geschlechter und Genotypen im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung deutlich niedriger, was eine vermehrte Nutzung von Proteinen und Lipiden zur Energiegewinnung zeigt (Abb.28A+B).

Mct8<sup>+/-</sup> und Mct8<sup>-/-</sup> Männchen hatten im Verlauf der Messung eine vergleichbare RER (Abb.28A). In der ersten Lichtphase pendelte die RER um 0.80, bevor es im Verlauf der folgenden Dunkelphase zu einer Absenkung auf etwa 0.76 kam, die auch im weiteren Verlauf der Messung beibehalten wurde.

Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten zunächst eine im Vergleich zu Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen geringere RER, die am Ende der ersten Lichtphase durch eine kontinuierliche Absenkung bei den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen jedoch zwischen beiden Genotypen vergleichbar war und um 0.79 pendelte (Abb.28B). Wie bei den Männchen zeigten beide Genotypen in der folgenden Dunkelphase eine Absenkung der RER auf etwa 0.76, die auch im weiteren Verlauf der Messung weitgehend zwischen beiden Genotypen vergleichbar war und um 0.76-0.77 pendelte. Auffällig sind die starken Schwankungen der RER während der Torporereignisse der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen gegen Ende der ersten Dunkelphase, die bis in die folgende Lichtphase hinein registriert wurden. Auch am Ende der zweiten Dunkelphase, beim erneuten Eintritt in die hypometabole Phase, sind die Schwankungen zu erkennen.



**Abb.28: Respiratorische Austauschrate unter zweitägigem Futterentzug und *ad libitum* Fütterung.** Dargestellt ist die respiratorische Austauschrate während des Futterentzugs, im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung. Die RER bei *ad libitum* Fütterung stammt aus der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.3.3.1.3) und wurde für die entsprechenden Zeiträume eingefügt. Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. Beide Geschlechter und Genotypen hatten unter Futterentzug eine im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung deutlich niedrigere RER. Bei den Männchen war die RER beider Genotypen während des Futterentzugs vergleichbar. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten zu Beginn der ersten Lichtphase eine tendenziell niedrigere RER als Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen, im weiteren Verlauf des Futterentzugs war sie jedoch vergleichbar. Auffällig ist die stark schwankende RER, die während der Torporereignisse und gegen Ende der Messung in den erneuten hypometabolen Phasen der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen gefunden wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Mct8<sup>+/-</sup>: n = 6, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 5, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6.

### 3.3.2.4 Torporlänge und Energieeinsparung durch Torpor

Torpor tritt als adaptive Reaktion bei Nahrungsmangel zur Energieeinsparung auf. Während des Torpors senkt ein Tier seinen Energieumsatz über mehrere Stunden unterhalb des Grundumsatzes ab. Der Torporeintritt ist durch ein kontinuierliches Absenken des Energieumsatzes gekennzeichnet, der Austritt durch eine schnelle Steigerung innerhalb weniger Minuten. Als Folge des niedrigeren Energieumsatzes kommt es während des Torpors zu einer starken Absenkung der Körpertemperatur. Dennoch kann die Körpertemperatur während des torpors aktiv reguliert werden.

Um die Energieeinsparung durch Torpor zu analysieren wurde zunächst die Torporlänge jedes Mct8<sup>-/-</sup> Weibchens bestimmt. Die dem Versuch vorausgehende Messung des Energieumsatzes bei *ad libitum* Fütterung (Kap. 2.7.4 und 3.3.1.2) ermöglichte, über den Vergleich mit dem Energieumsatz während des Torporereignisses, eine direkte Bestimmung der Energieersparnis. Da die RER, die zur Berechnung des Energieumsatzes benötigt wird (Kap.2.7.3), während des Torpors nicht stabil war, wurde zur Berechnung in dieser Phase eine RER von 0.78 verwendet. Dies entsprach der mittleren RER der Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse vor Beginn der Torporereignisse.

In Tabelle 7 ist der für jede Mct8<sup>-/-</sup> Maus ermittelte Zeitpunkt des Torporeintritts und Austritts sowie die dazugehörige Torpordauer aufgelistet. Der Torporeintritt lag je nach Maus zwischen 03:01 MEZ und 4:46 MEZ in der ersten Dunkelphase des Futterentzugs und endete im Verlauf der folgenden Lichtphase zwischen 08:41 MEZ und 11:56 MEZ. Die individuelle Torporlänge reichte von 4.00 bis 8.92 Stunden.

**Tab.7: Charakteristika der Torporbouts.** Gezeigt ist der individuelle Zeitpunkt des Torporeintritts und Austritts sowie die Torpordauer der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen.

Maus/ Abbildung	Eintritt Torpor (MEZ)	Austritt Torpor (MEZ)	Dauer Torpor (h)
1/27F	04:21	11:06	6.75
2/27G	04:36	10:21	5.75
3/27H	03:01	11:56	8.92
4/27I	04:41	08:41	4.00
5/27J	03:41	10:51	7.17
6/27K	04:46	09:16	4.50
<b>Mittelwert</b>	<b>04:11</b>	<b>10:21</b>	<b>6.18</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>00:41</b>	<b>01:12</b>	<b>1.82</b>

Der mittlere Energieumsatz im Torpor betrug  $99.08 \pm 35.04$  mW (Tab.8). Der Energieumsatz der Mäuse im gleichen Zeitraum bei *ad libitum* Fütterung lag im Durchschnitt bei  $321.27 \pm 53.78$  mW. Daraus ergab sich während des Torporbouts eine mittlere Energieeinsparung von  $69.81 \pm 6.43$  % (entspricht  $222.28 \pm 28.54$  mW). Ein Zusammenhang

zwischen dem Ausgangsgewicht und der Energieeinsparung ( $p = 0.447$ ,  $r^2 = 0.151$ ) sowie dem Ausgangsgewicht und der Torporlänge ( $p = 0.354$ ,  $r^2 = 0.215$ ) konnte nicht gezeigt werden.

**Tab.8: Energieeinsparung durch Torpor.** Gezeigt sind die Torpordauer, der mittlere Energieumsatz während des Torpors sowie im entsprechenden Zeitraum bei *ad libitum* Fütterung, die durch Torpor resultierende Energieeinsparung und das Gewicht vor dem Futterentzug (Ausgangskörpergewicht) der torpiden  $Mct8^{-/-}$  Weibchen.

Maus/ Abbildung	Genotyp	Dauer Torpor (h)	Energieumsatz Torpor (mW)	Energieumsatz <i>ad libitum</i> (mW)	Energie- einsparung (%)	Ausgangs Körpergewicht (g)
1/27F	$Mct8^{-/-}$	6.75	107.43	336.95	68.12	20.2
2/27G	$Mct8^{-/-}$	5.75	114.477	365.39	68.59	20.2
3/27H	$Mct8^{-/-}$	8.92	66.92	266.23	74.86	22.7
4/27I	$Mct8^{-/-}$	4.00	156.39	374.77	58.27	21.5
5/27J	$Mct8^{-/-}$	7.17	86.59	340.53	74.57	24.8
6/27K	$Mct8^{-/-}$	4.50	62.36	243.77	74.42	20.8
<b>Mittelwert</b>		<b>6.18</b>	<b>99.08</b>	<b>321.27</b>	<b>69.81</b>	<b>21.7</b>
<b>Standardabweichung</b>		<b>1.82</b>	<b>35.04</b>	<b>53.78</b>	<b>6.43</b>	<b>1.8</b>

Eine direkte Analyse der Energieeinsparung durch Torpor auf täglicher Basis ist schwierig, da sich die Torporbouts von der Dunkelphase bis in die folgende Lichtphase erstrecken und somit über den vergleichbaren 24 Stunden Zeitraum bei *ad libitum* Fütterung hinausgingen (Abb.25B). Daher wurde der tägliche Energieumsatz der Mäuse (Kap.3.3.1.2) mit dem Energieumsatz der ersten Dunkelphase und folgenden Lichtphase des Futterentzugs, die den Torporbout umfassten, verglichen. Die tägliche Energieersparnis der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen betrug im Mittel  $34.24 \pm 6.89$  % (entspricht  $117.64 \pm 34.68$  mW). Prozentual gesehen lag die Energieersparnis in diesem Zeitraum somit unter der Energieersparnis während des Torporereignisses.

### 3.3.2.5 Zusammenfassung

Die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen senkten ihre Körpertemperatur unter Futterentzug ab, wobei  $Mct8^{-/-}$  Weibchen die stärkste Absenkung zeigten. Nach zweitägigem Futterentzug hatten  $Mct8^{+/-}$  Weibchen und die Männchen beider Genotypen eine Körpertemperatur von durchschnittlich  $33.8$ - $34.6$  °C, während sie bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen mit im Mittel  $29.5$  °C deutlich niedriger war.  $Mct8^{-/-}$  Weibchen hatten durch das über den Futterentzug herbeigeführte Energiedefizit ein Kompensationsproblem, weil sie bereits beginnend in den ersten 24 Stunden einen mehrstündigen Torporbout zeigten. Dieser begann bei allen Mäusen am Ende der ersten Dunkelphase und endete im Verlauf der folgenden Lichtphase. Die mittlere Torpordauer betrug  $6.18 \pm 1.82$  Stunden, die durchschnittliche Energieersparnis während des Torpors (im Vergleich zu *ad libitum* Bedingungen) lag bei  $70.38 \pm 6.89$  %. Die Energieeinsparung durch Torpor steht im Einklang

mit dem geringeren Gewichtsverlust, der für die Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen gezeigt wurde. Am Ende der zweiten Dunkelphase wurden die Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen erneut hypometabol. Im Gegensatz zu den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen deutlich weniger Torporereignisse. Bei den Männchen beider Genotypen konnten keine ausgeprägten Torporbouts gezeigt werden. Die RER war innerhalb der Genotypen eines Geschlechts vergleichbar. Dies zeigt, dass Mct8<sup>-/-</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse in der Lage sind von einer vorwiegenden Kohlenhydratoxidation, wie man sie bei *ad libitum* Fütterung findet, auf eine vermehrte Protein- und Lipidoxidation zu wechseln. Eine Beeinträchtigung in der Mobilisierung der Fettreserven lag somit nicht vor. Zudem ergab die Analyse der Körperzusammensetzung während des zweitägigen Futterentzugs zwischen Mct8<sup>+/-</sup> und Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen, bezogen auf den Gewichtsverlust, eine vergleichbare Abnahme an Fett- und Magermasse. Dies zeigt eine vergleichbare Nutzung der Energiereserven.

### 3.3.3 Analyse in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition

Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse wurden unter zweitägigem Futterentzug torpid und zeigten eine starke Absenkung der Körpertemperatur (Kap.3.3.2, Abb.23+25B+27). Zur weiteren Untersuchung des thermoregulatorischen Phänotyps wurde der Energieumsatz der Mäuse in Thermoneutralität (30°C) und unter akuter Kälteexposition (5 °C) analysiert. Die Altersspanne der Mäuse betrug 22-24 Wochen. Eine Tabelle (Tab.9) der im Folgenden besprochenen Daten findet sich in Kapitel 3.3.3.4 am Ende der Zusammenfassung.

#### 3.3.3.1 Körpergewicht und Körpertemperatur

Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp in Bezug auf das Körpergewicht ( $p < 0.05$ ). Mct8<sup>-/-</sup> Männchen waren im Mittel 3.0 g leichter als Mct8<sup>+/-</sup> Männchen ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test), während das Gewicht der Weibchen nicht signifikant verschieden war ( $p = 0.708$ , *post hoc* Test). Der Gewichtsverlust während der Messung war auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht nicht verschieden (Genotyp:  $p = 0.784$ , Geschlecht:  $p = 0.960$ ).

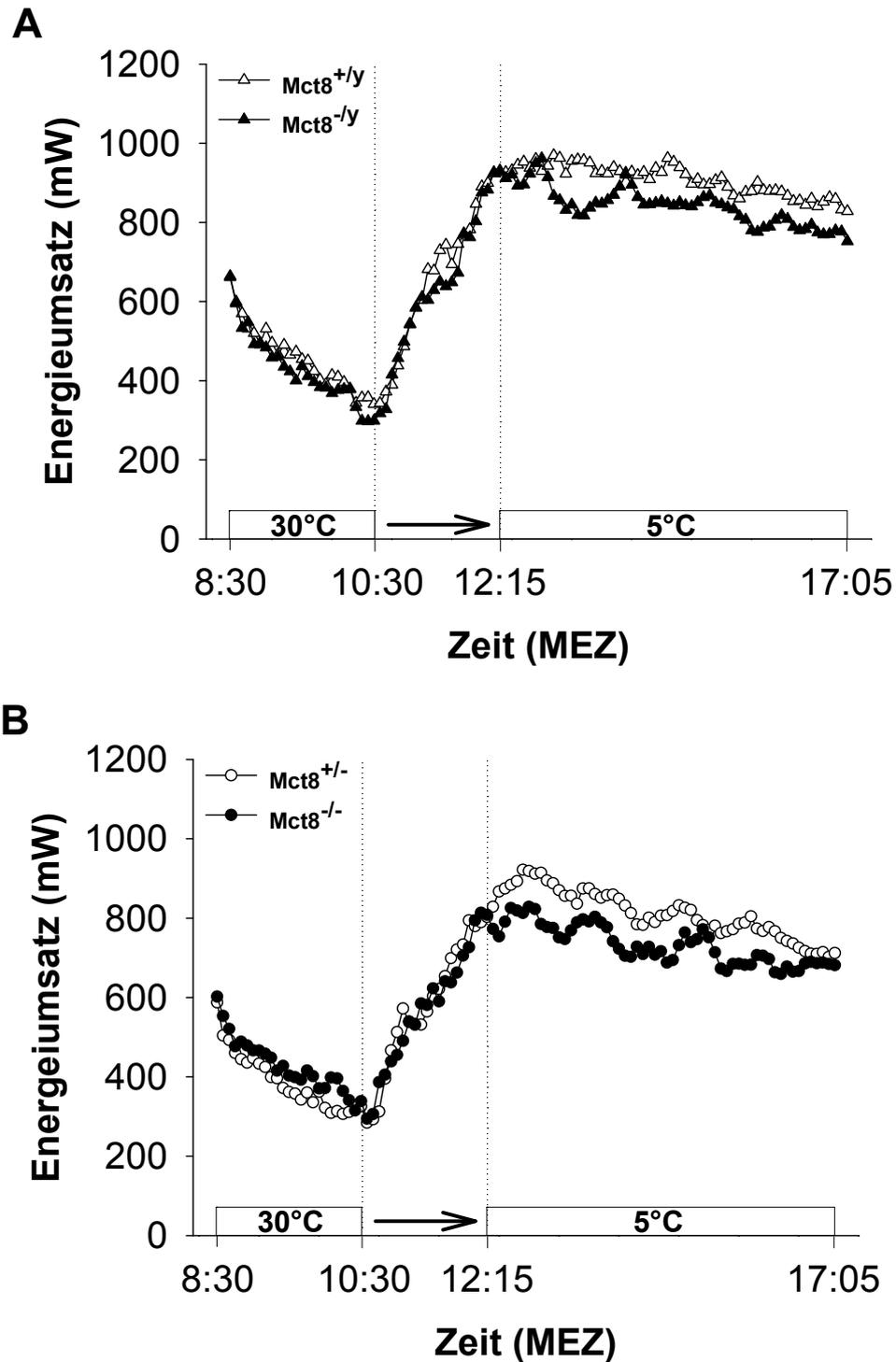
Vor der Messung war die rektale Körpertemperatur der Genotypen vergleichbar ( $p = 0.905$ ). Durch die akute Kälteexposition senkten die Mäuse ihre Körpertemperatur ab, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ( $p = 0.329$ ) oder Geschlechtern ( $p = 0.256$ ) bestand. Folgend war die Körpertemperatur auch nach der Messung nicht signifikant verschieden (Genotyp:  $p = 0.259$ , Geschlecht:  $p = 0.251$ ).

### 3.3.3.2 Der Energieumsatz in Thermoneutralität und Kälte

Mct8<sup>-/y</sup> Männchen hatten in thermoneutraler Umgebung (30 °C) einen gering niedrigeren Energieumsatz als Mct8<sup>+/y</sup> Männchen, der bei beiden Genotypen im Verlauf absank (Abb.29A). Die Absenkung kann auf die Adaption der Mäuse an die neue Umgebung zurückgeführt werden. Etwa 5-10 Minuten nach Beginn der Umgebungstemperaturabsenkung zeigten beide Genotypen bis zum Erreichen der 5°C eine kontinuierliche Steigerung im Energieumsatz, wobei kein Unterschied zwischen Mct8<sup>+/y</sup> und Mct8<sup>-/y</sup> Männchen bestand (Steigerung rund 590 mW). Nach 40 Minuten in Kälte (5°C), in denen der Energieumsatz beider Genotypen vergleichbar war, senkten Mct8<sup>-/y</sup> Männchen ihren Energieumsatz unter den der Mct8<sup>+/y</sup> Männchen ab. Im Verlauf der Kälteexposition zeigten beide Genotypen eine leichte Absenkung des Energieumsatzes.

Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten in Thermoneutralität einen tendenziell höheren Energieumsatz als Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen, der, wie bei den Männchen, im Verlauf stetig absank (Abb.29B). Beide Genotypen steigerten ihren Energieumsatz beginnend 10-15 Minuten nach dem Start der Temperaturabsenkung bis zum Erreichen der 5 °C kontinuierlich und vergleichbar (Steigerung rund 500 mW). Im Verlauf der Kälteexposition hatten Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen einen niedrigeren Energieumsatz als Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen. Durch die im Verlauf etwas stärkere Absenkung des Energieumsatzes bei den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen bestand am Ende der Kälteexposition nur noch ein leichter Unterschied zwischen beiden Genotypen.

In Kälte lag der Energieumsatz der Mäuse beider Geschlechter und Genotypen deutlich über dem in thermoneutraler Umgebung. Trotz geringerem Energieumsatz während der akuten Kälteexposition waren Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse in der Lage ihren Energieumsatz aufrecht zu halten und somit kältetolerant.



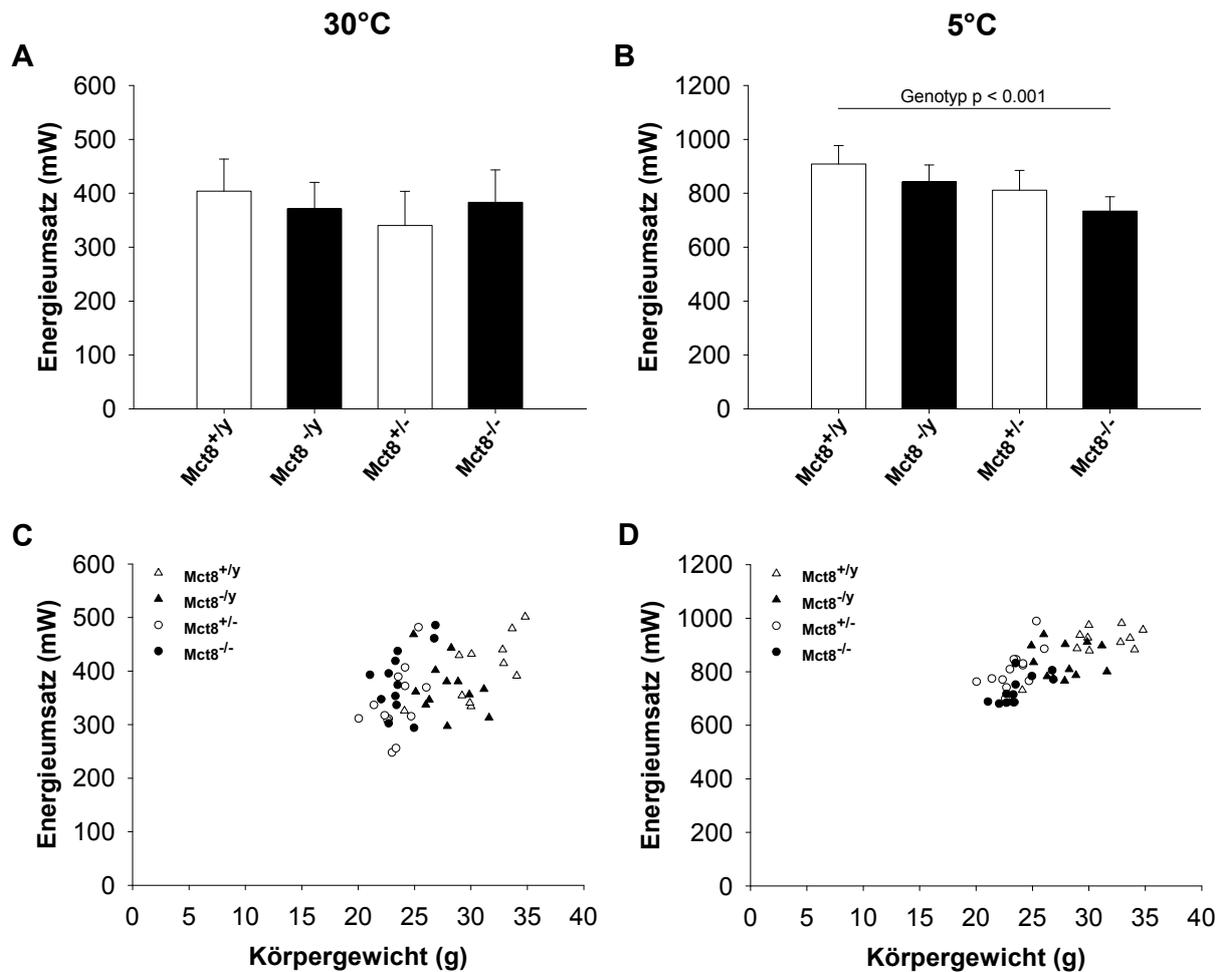
**Abb.29: Energieumsatz in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Abbildung A zeigt den mittleren Energieumsatz der Männchen beider Genotypen im zeitlichen Verlauf, Abbildung B den der Weibchen. In Thermoneutralität hatten Mct8<sup>-/y</sup> Männchen einen im Vergleich zu Mct8<sup>+/y</sup> Männchen tendenziell niedrigeren Energieumsatz, während er bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen leicht erhöht war. Mit Absenkung der Umgebungstemperatur steigerten beide Geschlechter ihren Energieumsatz deutlich, wobei der Anstieg zwischen den Genotypen vergleichbar war. Während der Kälteexposition lag der Energieumsatz der Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse unter dem der Mct8<sup>+/y</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 11, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 12, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 13; Mct8<sup>-/-</sup>: n = 12.

Für die weiterführende Auswertung wurde sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte ein Messbereich ausgewählt, in dem der Energieumsatz der Mäuse aller Gruppen vergleichbar stabil war. In Thermoneutralität wurden die letzten 15 Messwerte verwendet (9:20 - 10:30 MEZ), in Kälte die letzten 59 Messwerte (12:15 - 17:05 MEZ).

### **Mittlerer Energieumsatz**

Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen dem Geschlecht und Genotyp in Thermoneutralität ( $p < 0.05$ ).  $Mct8^{-/y}$  Männchen hatten in thermoneutraler Umgebung einen im Vergleich zu  $Mct8^{+/y}$  Männchen tendenziell niedrigeren Energieumsatz ( $p = 0.184$ , *post hoc* Test), während  $Mct8^{-/-}$  Weibchen im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen einen tendenziell erhöhten Energieumsatz zeigten ( $p = 0.073$ , *post hoc* Test, Abb.30A). Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht war der Energieumsatz zwischen  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  und  $Mct8^{+/y} / Mct8^{+/-}$  Mäusen nicht verschieden ( $p = 0.895$ , Abb.30C). Der Energieumsatz der Weibchen war im Vergleich zu den Männchen jedoch erhöht ( $p = 0.061$ ).

$Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse hatten in Kälte einen signifikant niedrigeren Energieumsatz als  $Mct8^{+/y} / Mct8^{+/-}$  Mäuse ( $p < 0.001$ , Abb.30B). Die Weibchen hatten einen niedrigeren Energieumsatz als die Männchen ( $p < 0.001$ ). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand noch immer ein Trend zu einem niedrigeren Energieumsatz der  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse, der jedoch statistisch nicht bestätigt werden konnte ( $p = 0.398$ , Abb.30D). Dabei war der genotypspezifische Unterschied innerhalb der Weibchen, die ein vergleichbares Körpergewicht, aber einen absolut gesehen signifikant niedrigeren Energieumsatz zeigten, stärker ausgeprägt.



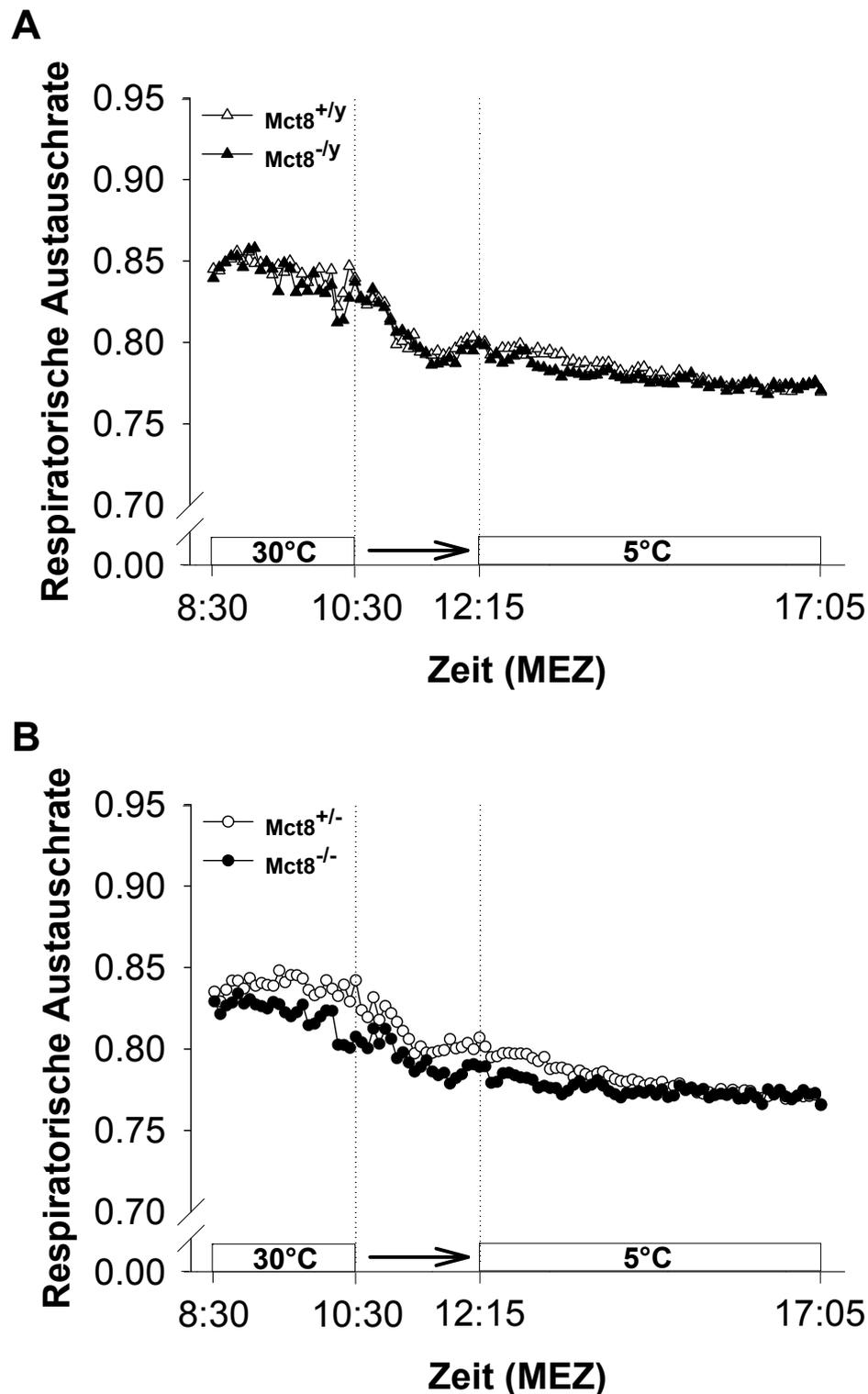
**Abb.30: Absoluter und gegen das Körpergewicht aufgetragener mittlerer Energieumsatz in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Dargestellt sind der absolute mittlere Energieumsatz eines definierten Messzeitraums in Thermoneutralität (A) und Kälte (B) sowie der auf das Körpergewicht normalisierte Energieumsatz in Thermoneutralität (C) und Kälte (D). In Thermoneutralität hatten Mct8<sup>-/y</sup> Männchen einen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/y</sup> Männchen tendenziell niedrigeren Energieumsatz, während er bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen tendenziell erhöht war. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht gab es keinen signifikanten genotypspezifischen Unterschied. In Kälte hatten Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse absolut gesehen einen signifikant niedrigeren Energieumsatz ( $p < 0.001$ ). Auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht war der Energieumsatz der Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse tendenziell, wenn auch nicht signifikant, niedriger. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und dem Energieumsatz in Thermoneutralität und Kälte (jeweils  $p < 0.01$ ). Aufgrund einer geringen Korrelation zwischen Energieumsatz und Körpergewicht innerhalb der Mct8<sup>-/y</sup> Männchen wurde auf die Darstellung der Regressionen verzichtet. Abb.A+B: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Mct8<sup>+/y</sup>:  $n = 11$ , Mct8<sup>-/y</sup>:  $n = 12$ , Mct8<sup>+/-</sup>:  $n = 13$ , Mct8<sup>-/-</sup>:  $n = 12$ .

### 3.3.3.3 Die respiratorische Austauschrate

Sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte war die respiratorische Austauschrate (RER) zwischen  $Mct8^{-/y}$  und  $Mct8^{+/y}$  Männchen vergleichbar (Abb.31A). In Thermoneutralität lag die RER bei rund 0.84. Etwa 30 Minuten nach Beginn der Umgebungstemperaturabsenkung zeigten beide Genotypen eine deutliche und vergleichbare Absenkung der RER, wodurch diese im Verlauf der Kälteexposition mit rund 0.78 deutlich und stabil unter der.

Bei den Weibchen war die RER der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen sowohl in thermoneutraler Umgebung als auch während der Absenkung der Umgebungstemperatur und in den ersten Stunden der Kälteexposition niedriger (Abb.31B). Wie die Männchen senkten auch die Weibchen beider Genotypen ihre RER mit Beginn der Umgebungstemperaturabsenkung ab, so dass diese in Kälte mit rund 0.78 bei den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen und 0.77 bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen deutlich unter der in thermoneutraler Umgebung mit 0.84, bzw. 0.80 lag. Während die RER der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen in Kälte stabil war, zeigten  $Mct8^{+/-}$  Weibchen eine leichte aber stetige Absenkung. In den letzten zwei Stunden bestand kein Unterschied mehr zwischen den Genotypen.

In Thermoneutraler Umgebung war die mittlere RER der  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse signifikant niedriger ( $p < 0.05$ ). Dies ist auf den genotypspezifischen Unterschied innerhalb der Weibchen zurückzuführen. In Kälte zeigten beide Genotypen und Geschlechter eine deutlichen Absenkung der RER zwischen 0.05 und 0.06, wobei die mittlere RER der  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse tendenziell niedriger war ( $p = 0.059$ ). Dies beruhte erneut auf einen deutlicheren genotypspezifischen Unterschied innerhalb der Weibchen. Wie bereits während des zweitägigen Futterentzugs gezeigt (Kap.3.3.2.3) haben  $Mct8^{-/y}$  /  $Mct8^{-/-}$  Mäuse keine Probleme von einer vorwiegenden Proteinoxidation auf eine vermehrte Lipidoxidation zu wechseln.



**Abb.31: Respiratorische Austauschrate in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im zeitlichen Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. Die RER der Männchen war sowohl in Thermoneutralität als auch während der akuten Kälteexposition vergleichbar. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten in thermoneutraler Umgebung bis etwa zur Mitte der Kälteexposition eine im Vergleich zu Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen geringere RER. Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren in der Lage ihre RER in Kälte abzusenken und somit von einer vorwiegenden Proteinoxidation in Thermoneutralität auf eine vermehrte Lipidoxidation in Kälte zu wechseln. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 11, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 12, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 13, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 12.

### 3.3.3.4 Zusammenfassung

Mct8<sup>-y</sup> Männchen waren signifikant leichter als Mct8<sup>+y</sup> Männchen, während das Gewicht der Weibchen vergleichbar war. In Thermoneutralität konnte kein signifikanter Unterschied im Energieumsatz zwischen den Genotypen gezeigt werden. Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren in der Lage ihren Energieumsatz mit Absenkung der Umgebungstemperatur im gleichen Maße wie Mct8<sup>+y</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse zu steigern, hatten in Kälte jedoch einen signifikant niedrigeren Energieumsatz. Auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand ein Trend zum Hypometabolismus, auch wenn dieser statistisch nicht belegt werden konnte. Trotz des geringeren Energieumsatzes waren Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse kältetolerant, weil sie ihren Energieumsatz über den gesamten Messzeitraum aufrecht halten konnten. Zudem waren weder die Absenkung der Körpertemperatur während der akuten Kälteexposition, noch die Körpertemperatur nach der Messung signifikant verschieden. Alle Mäuse, unabhängig von Geschlecht und Genotyp, senkten ihre RER mit Beginn der Temperaturabsenkung von 30 °C auf 5 °C ab, wodurch sie während der akuten Kälteexposition deutlich unter der in Thermoneutralität lag. Mct8<sup>-y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren somit genau wie Mct8<sup>+y</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse in der Lage auf ihre Energiereserven zurückzugreifen.

Tab.9: Ermittelte Variablen während der Bestimmung des Energieumsatzes in Thermoneutralität (30 °C) und akuter Kälteexposition (5 °C). Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp + Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Mct8 <sup>+y</sup> n = 11	Mct8 <sup>-y</sup> n = 12	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 13	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 12	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Körpergewicht vor Messung (g)	32.6 ± 3.2	29.7 ± 2.3	24.9 ± 1.8	25.3 ± 1.7	0.060	<b>0.000</b>	<b>0.016</b>	
Körpergewicht nach Messung (g)	29.2 ± 3.0	26.1 ± 2.2	21.8 ± 1.5	22.1 ± 1.7	<b>0.024</b>	<b>0.000</b>	<b>0.008</b>	
Mittleres Körpergewicht (g)	30.9 ± 3.1	27.9 ± 2.2	23.3 ± 1.6	23.7 ± 1.7	<b>0.038</b>	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	
Körpergewichtsverlust (g)	-3.4 ± 0.5	-3.6 ± 0.7	-3.1 ± 0.7	-3.2 ± 0.4	0.343 0.784	<b>0.036</b> 0.960	0.702 0.200	<b>0.013</b>
Körpertemperatur vor Messung (°C)	37.03 ± 1.02	37.29 ± 0.82	37.28 ± 0.56	36.97 ± 0.62	0.905	0.876	0.205	
Körpertemperatur nach Messung (°C)	34.52 ± 1.23	33.94 ± 1.54	34.84 ± 1.45	34.53 ± 1.16	0.259	0.251	0.729	
Körpertemperatur-Absenkung (°C)	-2.50 ± 1.36	-3.35 ± 1.94	-2.43 ± 1.43	-2.43 ± 1.05	0.329	0.256	0.330	
Mittlere Energieumsatz 30°C (mW)	403.85 ± 59.73	370.88 ± 49.34	340.18 ± 63.37	383.23 ± 60.27	0.767 0.895	0.136 0.061	<b>0.030</b> 0.215	<b>0.014</b>
Mittlerer Energieumsatz 5°C (mW)	908.48 ± 68.38	842.16 ± 63.10	811.39 ± 73.56	733.55 ± 53.61	<b>0.000</b> 0.398	<b>0.000</b> 0.097	0.761 0.108	<b>0.001</b>
Mittlere Respiratorische Austauschrate 30°C	0.84 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.84 ± 0.04	0.82 ± 0.01	<b>0.044</b>	0.224	0.317	
Mittlere Respiratorische Austauschrate 5°C	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.059	0.249	0.630	

### 3.3.4 Schilddrüsenhormonspiegel bei *ad libitum* Fütterung und Futterentzug

Die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Tetrajodthyronin ( $T_4$ ) spielen eine zentrale Rolle in der Regulation des Energiehaushalts. Dabei hat die biologisch aktive Form  $T_3$  eine stimulierende Wirkung auf den Energieumsatz. Der Einfluss des Fastens auf die Schilddrüsenhormonspiegel wurde untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Schilddrüsenhormonspiegeln und dem nur bei  $Mct8^{-/-}$  Weibchen unter Futterentzug auftretenden Torpor zu identifizieren (Kap.3.3.2.2). Dazu wurden die Serum-Schilddrüsenhormonspiegel von etwa 23-24,5 Stunden gefasteten Mäusen beider Geschlechter und Genotypen analysiert. Als Kontrollen dienten *ad libitum* gefütterte Mäuse. Die Tiere wurden zu einem Zeitpunkt getötet, für den bereits gezeigt werden konnte, dass  $Mct8^{-/-}$  Weibchen torpid sind (Kap.3.3.2.2). Zum Zeitpunkt der Messung hatten die Mäuse eine Altersspanne von 26-28 Wochen. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die ermittelten Parameter.

Genau wie nach zweitägigem Futterentzug bestand eine signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp für die Körpertemperatur nach dem Futterentzug.  $Mct8^{-/y}$  Männchen hatten eine signifikant niedrigere Körpertemperatur als  $Mct8^{+/y}$  Männchen ( $Mct8^{-/y}$ :  $33.95 \pm 1.03$  °C,  $Mct8^{+/y}$ :  $36.10 \pm 0.67$  °C;  $p < 0.001$ , *post hoc* Test) und  $Mct8^{-/-}$  Weibchen eine signifikant niedrigere Körpertemperatur als  $Mct8^{+/-}$  Weibchen ( $Mct8^{-/-}$ :  $28.61 \pm 1.15$  °C,  $Mct8^{+/-}$ :  $34.93 \pm 1.10$  °C;  $p < 0.001$ , *post hoc* Test).

Es bestand eine signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp in Bezug auf den  $T_4$ -Spiegel bei *ad libitum* Fütterung ( $p < 0.01$ ) und fasten ( $p < 0.05$ ). Daher erfolgte nicht nur die statistische Auswertung der  $T_4$ -Spiegel, sondern auch der  $T_3$ -Spiegel mittels *post hoc* Test. Bei *ad libitum* Fütterung war der  $T_3$ -Spiegel der  $Mct8^{-/y}$  Männchen im Vergleich zu den  $Mct8^{+/y}$  Männchen signifikant erhöht ( $p < 0.05$ , *post hoc* Test, Abb.32A). Ebenso zeigten  $Mct8^{-/-}$  Weibchen einen signifikant höheren  $T_3$ -Spiegel als  $Mct8^{+/-}$  Weibchen ( $p < 0.001$ , *post hoc* Test, Abb.32B). Im Gegensatz zum  $T_3$ -Spiegel war der  $T_4$ -Spiegel der  $Mct8^{-/y}$  Männchen signifikant niedriger ( $p < 0.001$ , *post hoc* Test, Abb.32C), während bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen kein Unterschied bestand ( $p = 0.250$ , *post hoc* Test, Abb.32D).

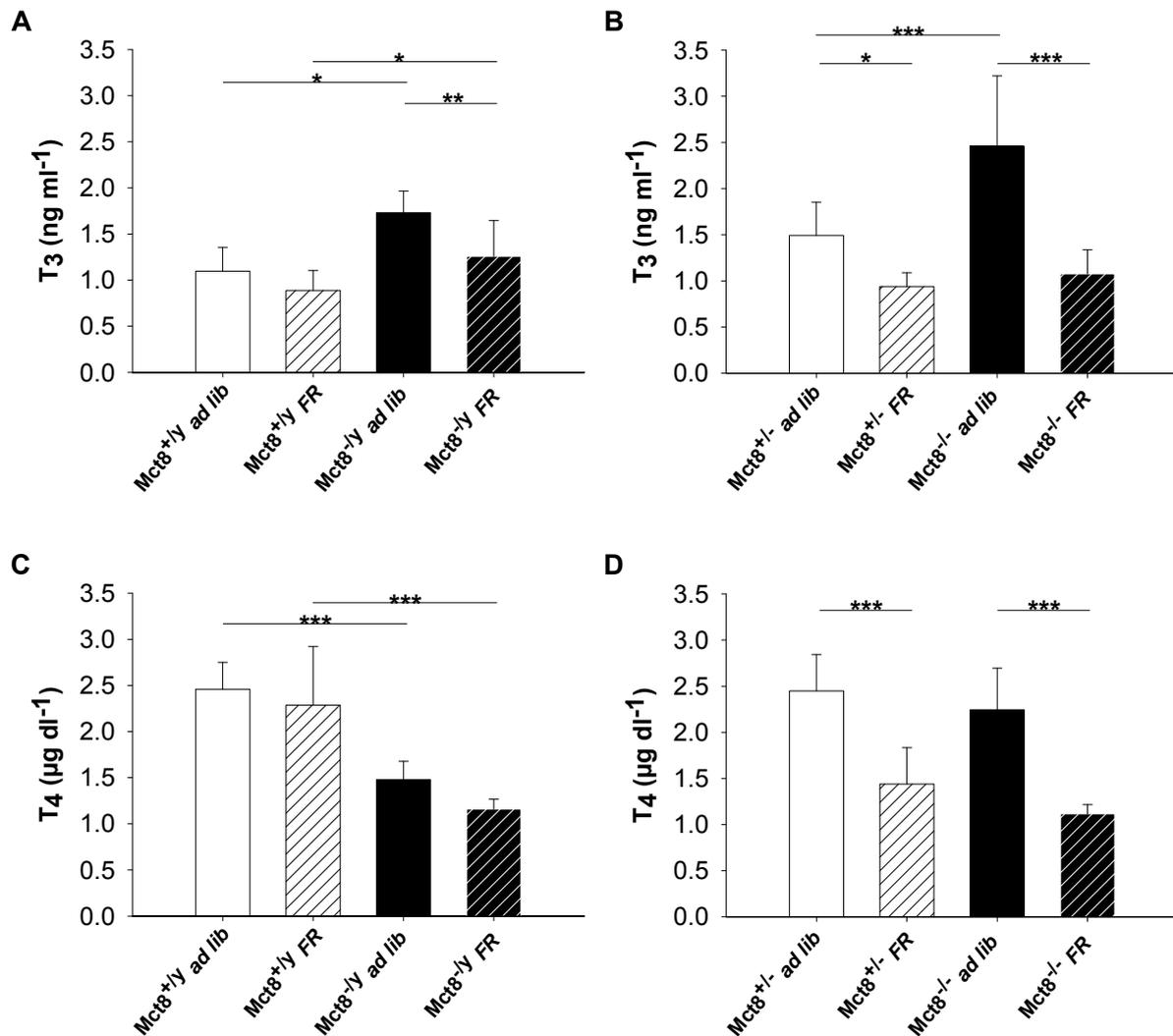
$Mct8^{-/y}$  Männchen zeigten unter Futterentzug eine signifikante Absenkung des  $T_3$ -Spiegels um im Mittel  $0.47 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test, Genotyp \* Behandlung), während  $Mct8^{+/y}$  Männchen eine geringere Absenkung von durchschnittlich  $0.21 \text{ ng ml}^{-1}$  aufwiesen ( $p = 0.151$ , *post hoc* Test, Abb. 32A). Auch für den  $T_4$ -Spiegel wurde eine stärkere Absenkung bei den  $Mct8^{-/y}$  Männchen (im Mittel  $0.32 \text{ } \mu\text{g dl}^{-1}$ ,  $p = 0.159$ , *post hoc* Test) im Vergleich zu den  $Mct8^{+/y}$  Männchen (im Mittel  $0.17 \text{ } \mu\text{g dl}^{-1}$ ,  $p = 0.377$ , *post hoc* Test,

Abb.32C) gefunden, wobei die Veränderungen jedoch nicht signifikant waren. Der T<sub>3</sub>-Spiegel der Mct8<sup>-y</sup> Männchen war im Vergleich zu den Mct8<sup>+y</sup> Männchen nach dem Futterentzug signifikant erhöht ( $p < 0.05$ , *post hoc* Test), während der T<sub>4</sub>-Spiegel beim genotypspezifischen Vergleich signifikant niedriger war ( $p < 0.001$ , *post hoc* Test).

Bei den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen führte der Futterentzug zu einer signifikanten Absenkung des T<sub>3</sub>-Spiegels um im Mittel 1.38 ng ml<sup>-1</sup> ( $p < 0.001$ , *post hoc* Test), während Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen mit durchschnittlich 0.55 ng ml<sup>-1</sup> eine deutlich geringere, aber ebenfalls signifikante, Absenkung zeigten ( $p < 0.05$ , *post hoc* Test, Abb.32B). Neben dem T<sub>3</sub>- konnte auch für den T<sub>4</sub>-Spiegel eine signifikante Absenkung bei beiden Genotypen gezeigt werden (Abb.32D). Die Absenkung des T<sub>4</sub>- Spiegels war bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen mit durchschnittlich 1.13 µg dl<sup>-1</sup> zu 1.01 µg dl<sup>-1</sup> bei den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen nur gering höher (jeweils  $p < 0.001$ , *post hoc* Test). Im Gegensatz zu den Männchen waren der T<sub>3</sub>-Spiegel ( $p = 0.313$ , *post hoc* Test) und der T<sub>4</sub>-Spiegel ( $p = 0.162$ , *post hoc* Test) der Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen nach dem Futterentzug vergleichbar.

**Tab.10: Schilddrüsenhormonspiegel bei *ad libitum* Fütterung und nach 24 stündigem Futterentzug.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die Serum T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Spiegel bei *ad libitum* Fütterung und nach 24 stündigem Futterentzug. Bei einigen der Mäuse war keine Analyse beider Serumparameter möglich, wodurch sich eine verringerte Anzahl gemessener Mäuse ergibt. Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Analyse der Schilddrüsenhormonspiegel erfolgte in Kooperation mit der AG Schweizer, Charité Berlin und der AG Sapin, CHU Nancy, Straßburg.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht)		
	Mct8 <sup>+y</sup> n = 8	Mct8 <sup>-y</sup> n = 8	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 8	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion
T <sub>3</sub> <i>ad libitum</i> (ng ml <sup>-1</sup> )	1.10 ± 0.26	1.73 ± 0.23	1.49 ± 0.36 n = 7	2.46 ± 0.76	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	0.325
T <sub>3</sub> fasten (ng ml <sup>-1</sup> )	0.89 ± 0.22	1.26 ± 0.39	0.94 ± 0.15	1.08 ± 0.26	<b>0.012</b>	0.495	0.230
T <sub>4</sub> <i>ad libitum</i> (µg dl <sup>-1</sup> )	2.46 ± 0.29	1.48 ± 0.20	2.45 ± 0.39	2.24 ± 0.45	<b>0.000</b>	<b>0.005</b>	<b>0.004</b>
T <sub>4</sub> fasten (µg dl <sup>-1</sup> )	2.29 ± 0.63	1.16 ± 0.11 n = 5	1.44 ± 0.39	1.11 ± 0.10 n = 6	<b>0.000</b>	<b>0.012</b>	<b>0.023</b>

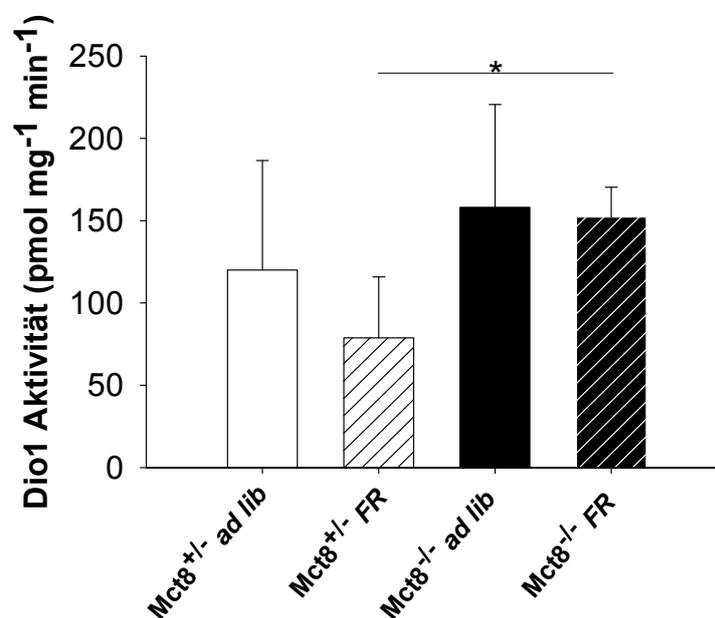


**Abb.32: Schilddrüsenhormonspiegel bei *ad libitum* Fütterung und nach 24 stündigem Futterentzug.** Abbildung A zeigt die Serum T<sub>3</sub>-Spiegel und Abbildung C die Serum T<sub>4</sub>-Spiegel der Männchen, Abbildung B die Serum T<sub>3</sub>-Spiegel und Abbildung D die Serum T<sub>4</sub>-Spiegel der Weibchen. Bei *ad libitum* (*ad lib*) Fütterung hatten Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant erhöhte T<sub>3</sub>-Spiegel. Die T<sub>4</sub>-Spiegel waren bei den Mct8<sup>-/y</sup> Männchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/y</sup> Männchen signifikant niedriger. Bei den Weibchen bestand kein Unterschied. Der Futterentzug (FR) hatte nur geringen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonspiegel der Mct8<sup>+/y</sup> Männchen, während es bei den Mct8<sup>-/y</sup> Männchen und Mct8<sup>+/-</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen zu einer deutlichen Absenkung der T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>- Spiegel kam. Nach dem Futterentzug war der T<sub>3</sub>-Spiegel der Mct8<sup>-/y</sup> Männchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/y</sup> Männchen signifikant erhöht, während der T<sub>4</sub>-Spiegel signifikant niedriger war. Im Gegensatz dazu hatten Mct8<sup>-/-</sup> und Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen vergleichbare T<sub>3</sub>-Spiegel, während der T<sub>4</sub>-Spiegel der Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich niedriger war. Mittelwerte ± Standardabweichung. Statistik basierend auf *post hoc* Tests. Mct8<sup>+/y</sup>: n = 8, Mct8<sup>-/y</sup>: n = 5-8, Mct8<sup>+/-</sup>: n = 7-8, Mct8<sup>-/-</sup>: n = 6-8. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. Die Analyse der Schilddrüsenhormonspiegel erfolgte in Kooperation mit der AG Schweizer, Charité Berlin und der AG Sapin, CHU Nancy, Straßburg.

### 3.3.5 Dejodase1 Aktivität in der Leber bei *ad libitum* Fütterung und Futterentzug

Die Dejodase1 (Dio1) dejodiert das Pro-Hormon  $T_4$  in das stoffwechselphysiologisch aktivere  $T_3$ . Auf der anderen Seite kann es  $T_4$  in reverses Trijodthyronin ( $rT_3$ ) und über eine weitere Dejodierung weiter zu Dijodthyronin ( $T_2$ ) abbauen. Die Aktivität von Dio1 in der Leber wurde, genau wie die Schilddrüsenhormonspiegel, bei den rund 23-24.5 Stunden gefasteten Weibchen beider Genotypen analysiert.  $Mct8^{-/-}$  Weibchen waren unter Futterentzug zum Zeitpunkt der Organentnahme torpid. Als Kontrollen wurden *ad libitum* gefütterte Mäuse analysiert.

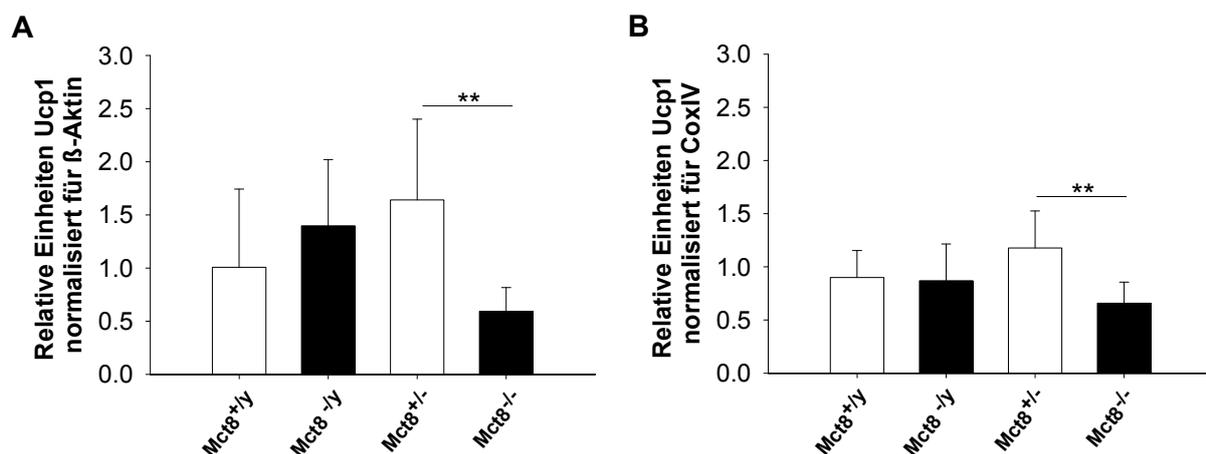
Bei *ad libitum* Fütterung war die Aktivität der Dio1 bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen tendenziell erhöht ( $p = 0.202$ , *post hoc* Test, Abb.33, Tab.S3). Unter Futterentzug zeigten  $Mct8^{-/-}$  Weibchen keine Absenkung der Dio1 Aktivität ( $p = 0.841$ , *post hoc* Test), während  $Mct8^{+/-}$  Weibchen eine im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung deutlich niedrigere Aktivität aufwiesen. Aufgrund der hohen Standardabweichung war der Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p = 0.169$ , *post hoc* Test). Entsprechend war die Dio1 Aktivität der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen nach 24-stündigem Futterentzug signifikant erhöht ( $p < 0.05$ , *post hoc* Test).



**Abb.33: Dejodase 1 Aktivität in der Leber bei *ad libitum* Fütterung und nach 24 stündigem Futterentzug.** Dargestellt ist die Dio1 Aktivität von Weibchen beider Genotypen bei *ad libitum* Fütterung (*ad lib*) sowie nach 24 Stunden Futterentzug (FR). Bei *ad libitum* Fütterung war die Dio1 Aktivität der  $Mct8^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Mäusen erhöht, wenn auch nicht signifikant.  $Mct8^{-/-}$  Weibchen zeigten nach dem Futterentzug keine Absenkung der Dio1 Aktivität, während  $Mct8^{+/-}$  Weibchen eine deutliche, wenn auch nicht signifikant niedrigere Aktivität im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung aufwiesen. Folgend war die Dio1 Aktivität der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen unter Futterentzug im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen signifikant erhöht. Statistik basierend auf *post hoc* Test. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.  $Mct8^{+/-}$ :  $n = 6$ ,  $Mct8^{-/-}$ :  $n = 6$ . \* $p < 0.05$ . Die Analyse der Dio1 Aktivität erfolgte in Kooperation mit der AG Schweizer, Charité Berlin.

### 3.3.6 Ucp1-Gehalt im iBAT

Das Entkopplerprotein1 (Ucp1) ist essentiell für die zitterfreie Wärmebildung im braunen Fettgewebe (BAT) und leistet einen wichtigen Beitrag zu der Regulation der Körpertemperatur bei Umgebungstemperaturen unterhalb der Thermoneutralzone. Die milde Kälteexposition bei Haltungstemperatur von rund 24 °C führt zur Rekrutierung von BAT und Ucp1. Um zu überprüfen ob die Deletion von Mct8 einen Einfluss auf die Ucp1 Expression hat, wurde der Ucp1-Gehalt mittels Western Blot im interskapulären BAT (iBAT) von *ad libitum* gefütterten Mäusen bestimmt (Abb.S11). Normalisiert wurde für den *Housekeeper*  $\beta$ -Aktin und die Cytochrom-c-OxidaseIV (CoxIV), was den Ucp1-Gehalt pro Zelle, bzw. pro Mitochondrium anzeigt. Die Normalisierung des Ucp1-Signals ergab eine signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp für  $\beta$ -Aktin Normalisierung ( $p < 0.05$ ) und fast signifikante Interaktion für die CoxIV Normalisierung ( $p = 0.054$ , Tab.S4). Nach Normalisierung für  $\beta$ -Aktin hatten Mct8<sup>-y</sup> Männchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+y</sup> Männchen einen endenziell erhöhten Ucp1-Gehalt im iBAT ( $p = 0.292$ , *post hoc* Test), während er bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen signifikant niedriger war ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test, Abb.34A). Die Normalisierung für CoxIV ergab einen vergleichbaren Ucp1-Gehalt der Männchen beider Genotypen ( $p = 0.863$ , *post hoc* Test). Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten erneut einen im Vergleich zu Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen signifikant niedrigeren Ucp1-Gehalt ( $p < 0.01$ , *post hoc* Test, Abb.34B). Der Ucp1-Gehalt der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen ist somit nicht nur pro Zelle, sondern auch pro Mitochondrium signifikant niedriger.



**Abb.34: Ucp1-Gehalt im BAT normalisiert für  $\beta$ -Aktin und CoxIV.** Dargestellt sind die relativen Einheiten von Ucp1 im interskapulären braunen Fettgewebe normalisiert für  $\beta$ -Aktin (A) und CoxIV (B). Sowohl nach Normalisierung für  $\beta$ -Aktin als auch für CoxIV bestand kein signifikanter Unterschied im Ucp1-Gehalt zwischen Mct8<sup>+y</sup> und Mct8<sup>-y</sup> Männchen. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen hatten im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen sowohl nach Normalisierung für  $\beta$ -Aktin als auch für CoxIV einen signifikant niedrigeren Ucp1-Gehalt. Statistik basieren auf *post hoc* Test. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Mct8<sup>+y</sup> n = 6; Mct8<sup>-y</sup> n = 5-6, Mct8<sup>+/-</sup> n = 6; Mct8<sup>-/-</sup> n = 5-6. \*\* $p < 0.01$ .

## 3.4 Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Hdac2

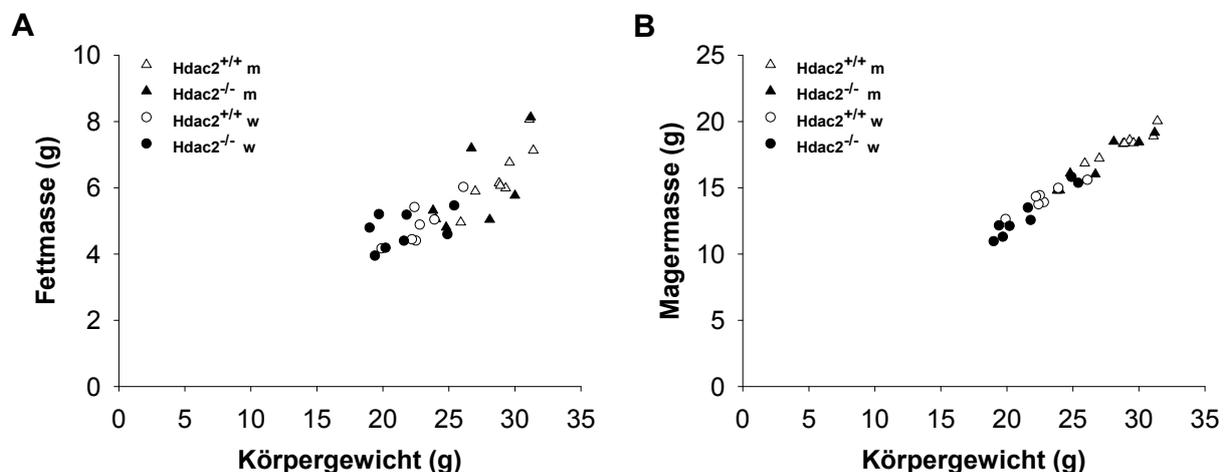
### 3.4.1 Analyse unter Standardhaltungsbedingungen

Der Energieumsatz wurde unter Standardhaltungsbedingungen (*ad libitum* Fütterung und Raumtemperatur von 24 °C) bei Kontrollen (Hdac2<sup>+/+</sup>) und Mutanten (Hdac2<sup>-/-</sup>) untersucht. Die Altersspanne der Mäuse betrug 18-21 Wochen. Eine Tabelle (Tab.11) mit den Daten der im Folgenden beschriebenen Variablen findet sich in Kapitel 3.4.1.4 am Ende der Zusammenfassung.

#### 3.4.1.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren im Mittel 2.1 g leichter ( $p < 0.05$ ). Es bestand kein signifikanter genotypspezifischer Unterschied in der absoluten Fettmasse ( $p = 0.315$ ). Die Magermasse der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse war jedoch im Mittel 1.3 g niedriger ( $p < 0.05$ ) und trug so zu dem gefundenen Körpergewichtsunterschied bei. Die Normalisierung der Körperzusammensetzung auf das Körpergewicht ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Fettmasse:  $p = 0.683$ , Magermasse:  $p = 0.071$ , Abb.35).

Die rektale Körpertemperatur war nicht verschieden ( $p = 0.939$ ), Weibchen hatten jedoch eine im Vergleich zu den Männchen signifikant höhere Körpertemperatur ( $p < 0.05$ ).

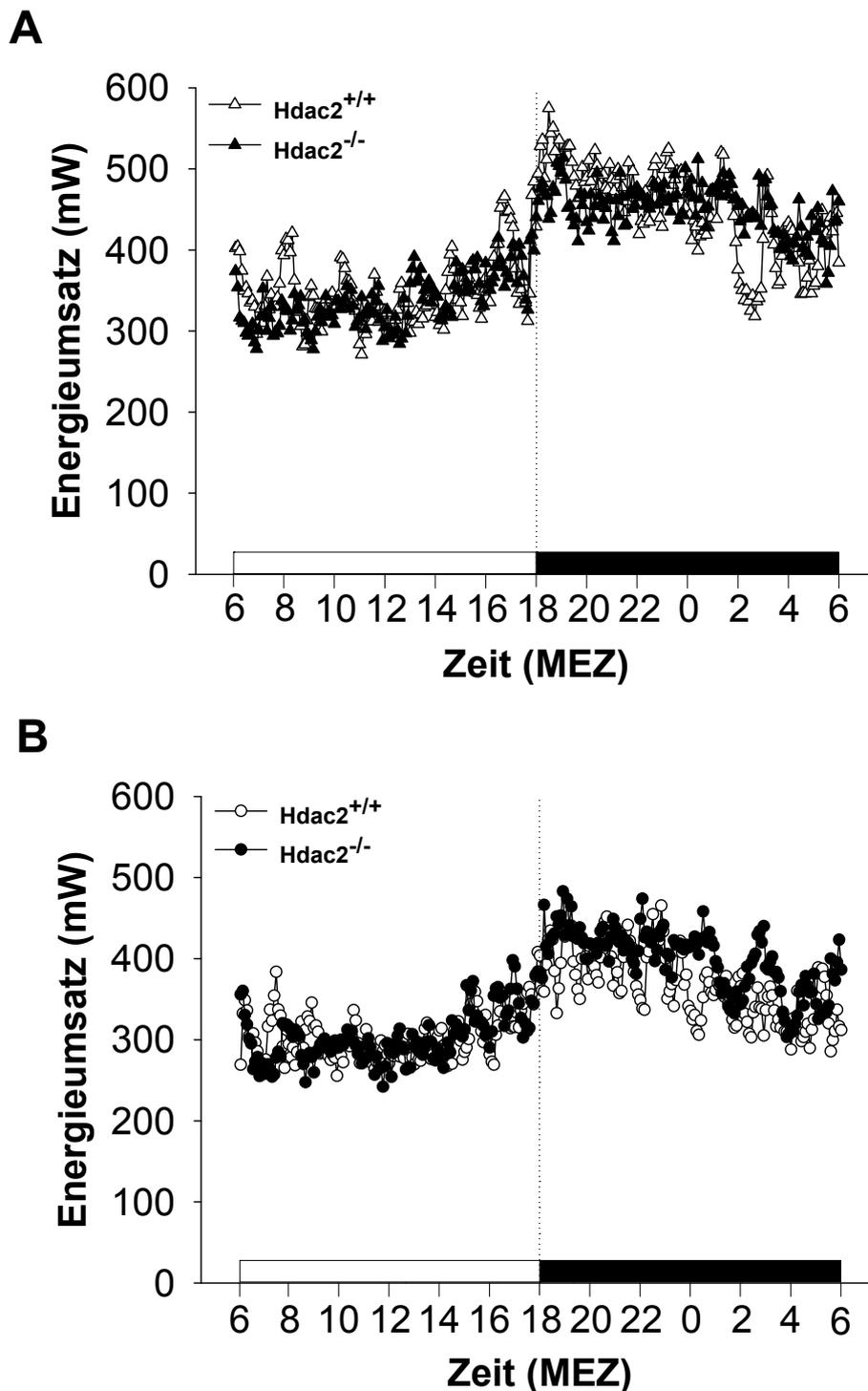


**Abb.35: Körperzusammensetzung in Abhängigkeit des Körpergewichts.** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht nach der Messung normalisierte Fettmasse (A) und Magermasse (B). Sowohl für die Fett- als auch für die Magermasse bestand ein signifikanter Zusammenhang mit dem Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Eine signifikante genotyp- oder geschlechtsspezifische Verschiebung der Körperzusammensetzung konnte nicht gezeigt werden. m: Männchen, w: Weibchen.

### 3.4.1.2 Der tägliche Energieumsatz

Während der Messung des täglichen Energieumsatzes (DEE) hatten Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase einen vergleichbaren Energieumsatz, der durch eine typische ultradiane Rhythmik gekennzeichnet war (Abb.36A). Mit Beginn der Dunkelphase steigerten beide Genotypen ihren Energieumsatz, wodurch er im Verlauf deutlich über dem Energieumsatz in der Lichtphase lag.

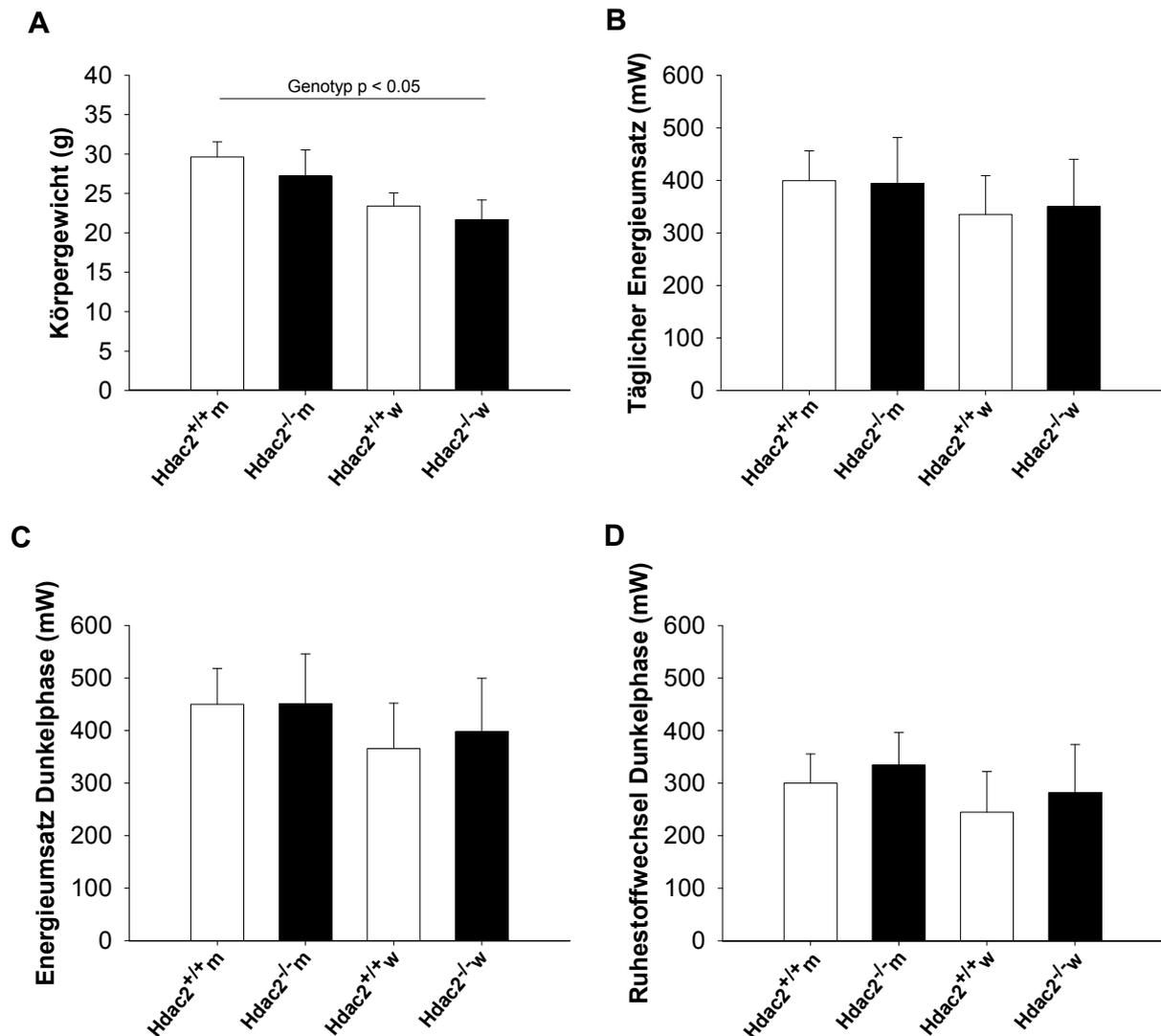
Auch bei den Weibchen war der Energieumsatz zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen in der Lichtphase vergleichbar (Abb.36B). Mit Beginn der Dunkelphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg im Energieumsatz, der bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen stärker war. Dadurch hatten sie im Verlauf der Dunkelphase einen im Vergleich zu Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen höheren Energieumsatz. Wie bei den Männchen war der Energieumsatz während der DEE-Messung durch eine typische ultradiane Rhythmik gekennzeichnet und in der Dunkelphase deutlich höher als in der Lichtphase. Weder in der Lichtphase ( $p = 0.791$ ), noch in der Dunkelphase ( $p = 0.608$ ) bestand zwischen den Genotypen ein signifikanter Unterschied im mittleren Energieumsatz.



**Abb.36: Vergleich des täglichen Energieumsatzes zwischen Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen in beiden Geschlechtern.** Abbildung A zeigt den mittleren Energieumsatz der Männchen beider Genotypen, Abbildung B den der Weibchen. Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen hatten sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase einen vergleichbaren Energieumsatz. In der Lichtphase hatten Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen einen vergleichbaren Energieumsatz, während Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen in der Dunkelphase einen höheren Energieumsatz als Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen aufwiesen. Mit Beginn der Dunkelphase zeigten die Genotypen beider Geschlechter einen Anstieg im Energieumsatz, der im Verlauf der Dunkelphase im Vergleich zur Lichtphase höher war. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 8, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 7; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 7; Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 8.

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter ( $p < 0.05$ , Abb.37A). Es wurde kein genotypspezifischer Unterschied im DEE gefunden ( $p = 0.862$ , Abb.37B). Weibchen hatten jedoch einen tendenziell niedrigeren DEE als die Männchen ( $p = 0.068$ ). Auch unter Berücksichtigung des Körpergewichtsunterschieds, der zwar signifikant, absolut gesehen jedoch gering war, kann kein genotypspezifischer Unterschied im DEE gezeigt werden. Die detailliertere Analyse des Energieumsatzes ergab nur geringe Unterschiede: So hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen in der Dunkelphase einen leicht erhöhten Energieumsatz (Abb.37C). Während der Ruhestoffwechsel in der Lichtphase nicht signifikant verschieden war ( $p = 0.886$ ), zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter in der Dunkelphase einen Trend zu einem erhöhten Ruhestoffwechsel ( $p = 0.191$ , Abb.37D). Unter Einbeziehung des niedrigeren Körpergewichts kann somit ein tendenziell erhöhter Ruhestoffwechsel der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse in der Dunkelphase sowie ein Trend zu einem erhöhten mittleren Energieumsatz der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen in der Dunkelphase angenommen werden, was jedoch statistisch nicht belegt werden konnte und sich nicht im DEE widerspiegelte.

Weil das Körpergewicht nicht mit dem DEE korrelierte ( $p = 0.113$ , Abb.S13), wurde nicht mittels linearem Regressionsmodell auf das Körpergewicht normalisiert. Die geringe Korrelation, die insbesondere innerhalb der Männchen bestand, kann auf die geringe Gewichtsspanne und die Variabilität des Energieumsatzes innerhalb der Genotypen zurückgeführt werden. Gleiches gilt für die Ruhestoffwechselraten und den mittleren Energieumsatz in der Dunkelphase.



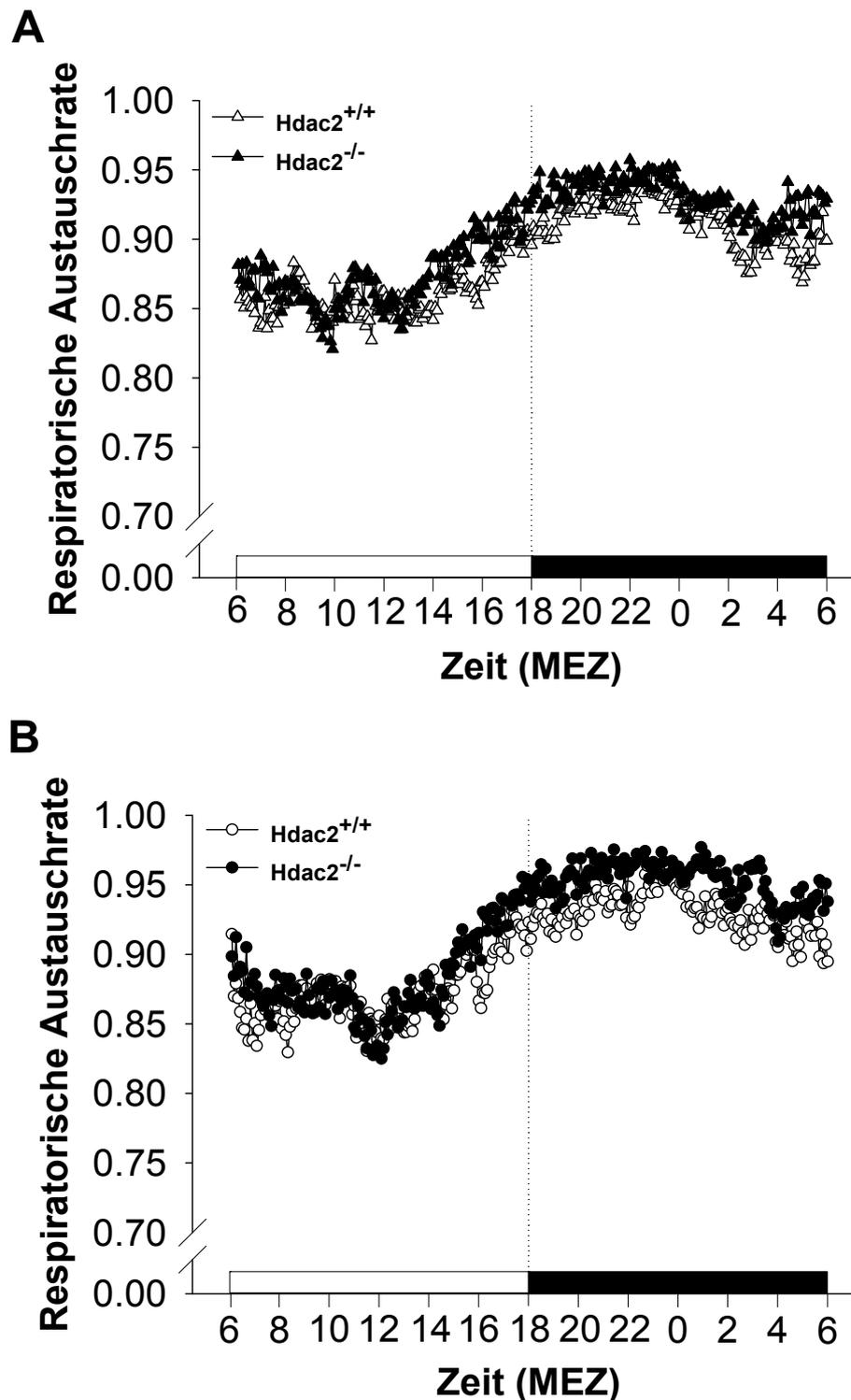
**Abb.37: Körpergewicht, täglicher Energieumsatz sowie Energieumsatz und Ruhestoffwechsel in der Dunkelphase.** Dargestellt sind das Körpergewicht (A), der tägliche Energieumsatz (B) sowie der Energieumsatz (C) und Ruhestoffwechsel (D) in der Dunkelphase. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter. Weder der tägliche Energieumsatz, noch der Energieumsatz und Ruhestoffwechsel in der Dunkelphase waren signifikant verschieden. Es bestand jedoch ein Trend zu einem leicht erhöhten Ruhestoffwechsel der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse in der Dunkelphase sowie zu einem tendenziell erhöhten Energieumsatz der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen in der Dunkelphase. Auch unter Einbeziehung des niedrigeren Körpergewichts besteht kein Unterschied im DEE, jedoch ein leicht erhöhter Ruhestoffwechsel in der Dunkelphase sowie ein tendenziell erhöhter Energieumsatz der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen in der Dunkelphase. Dies wirkte sich jedoch nicht auf den DEE aus. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 8; Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 7; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 7; Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 8. m: Männchen, w: Weibchen.

### **3.4.1.3 Die respiratorische Austauschrate**

Die respiratorische Austauschrate (RER) gibt einen Hinweis auf das verstoffwechselte Substrat. Bei den Männchen war die RER sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen weitgehend vergleichbar (Abb.38A). Dabei war sie in der Dunkelphase im Vergleich zur Lichtphase bei beiden Genotypen höher.

Auch bei den Weibchen war die RER der Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse in der Licht- und Dunkelphase weitgehend vergleichbar, mit höherer RER beider Genotypen in der Dunkelphase (Abb.38B).

Sowohl in der Licht- ( $p = 0.486$ ) als auch in der Dunkelphase ( $p = 0.177$ ) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen, weshalb auch die mittlere RER der DEE-Messung nicht verschieden war ( $p = 0.297$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern wurde nicht gefunden.



**Abb.38: Respiratorische Austauschrate während der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes beider Geschlechter.** Dargestellt ist die RER während der DEE-Messung. Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. Sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase war die RER zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen beider Geschlechter weitgehend vergleichbar. In der Dunkelphase lag die RER der Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse beider Geschlechter deutlich über der Lichtphase. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 8, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 7; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 7; Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 8.

### 3.4.1.4 Zusammenfassung

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren leichter als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse, eine signifikante genotypspezifische Verschiebung in der Körperzusammensetzung bestand jedoch nicht. Es konnte kein Unterschied im DEE unter Standardhaltungsbedingungen bei moderater Kälte (24 °C) gezeigt werden. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten jedoch einen tendenziell erhöhten Ruhestoffwechsel in der Dunkelphase. Bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen konnte in der Dunkelphase zudem ein leicht erhöhter mittlerer Energieumsatz im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen gezeigt werden, der jedoch statistisch nicht belegt werden konnte. Die leichten genotypspezifischen Unterschiede wirkten sich jedoch nicht auf den DEE aus. Die RER der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse war im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse nicht signifikant verschieden. Die rektale Körpertemperatur als eine Komponente der Energieausgaben war ebenfalls nicht signifikant verschieden.

**Tab.11: Ermittelte Variablen während der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 8	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 7	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 7	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	29.6 ± 1.9	27.2 ± 3.3	23.4 ± 1.7	21.6 ± 2.5	<b>0.027</b>	<b>0.000</b>	0.707	
Körpertemperatur nach Messung (°C)	36.00 ± 0.73	35.54 ± 0.65	36.34 ± 0.97	36.75 ± 0.67	0.939	<b>0.010</b>	0.132	
Fettmasse nach Messung (g)	6.4 ± 0.9	5.9 ± 1.3	4.9 ± 0.7	4.7 ± 0.5	0.315 0.683	<b>0.000</b> 0.675	0.663 0.841	<b>0.000</b>
Magermasse nach Messung (g)	18.3 ± 1.0	16.8 ± 1.8	14.2 ± 0.9	13.0 ± 1.8	<b>0.015</b> 0.071	<b>0.000</b> 0.071	0.821 0.592	<b>0.000</b>
Täglicher Energieumsatz (mW)	399.38 ± 56.68	394.27 ± 87.09	334.87 ± 73.70	350.12 ± 90.04	0.862	0.068	0.726	
Mittlerer Energieumsatz Lichtphase (mW)	348.69 ± 50.02	337.14 ± 81.42	304.34 ± 62.22	302.30 ± 79.64	0.791	0.131	0.853	
Mittlerer Energieumsatz Dunkelphase (mW)	450.06 ± 68.97	451.41 ± 94.61	365.71 ± 86.41	397.94 ± 101.64	0.608	<b>0.043</b>	0.637	
Ruhestoffwechsel Lichtphase (mW)	276.85 ± 30.25	282.31 ± 61.23	241.06 ± 56.03	241.75 ± 75.89	0.886	0.085	0.912	
Ruhestoffwechsel Dunkelphase (mW)	300.18 ± 55.56	334.83 ± 61.47	244.95 ± 77.20	282.09 ± 91.61	0.191	0.054	0.963	
Mittlere Respiratorische Austauschrate	0.89 ± 0.03	0.90 ± 0.04	0.90 ± 0.05	0.92 ± 0.05	0.297	0.331	0.958	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase	0.86 ± 0.03	0.87 ± 0.04	0.87 ± 0.05	0.88 ± 0.05	0.486	0.574	0.946	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Dunkelphase	0.91 ± 0.03	0.93 ± 0.05	0.93 ± 0.05	0.95 ± 0.04	0.177	0.178	0.859	

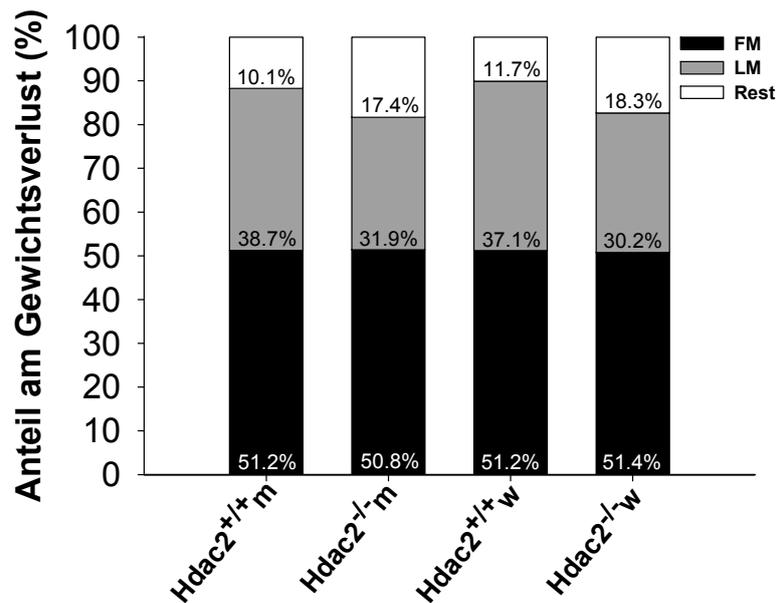
### 3.4.2 Analyse unter Futterentzug

Im Anschluss an die Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.3.4.1) wurden die Mäuse einem zweitägigen Futterentzug mit simultaner Aufzeichnung von Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion unterzogen. Im Folgenden ist aufgrund stärkerer Schwankungen der respiratorischen Austauschrate, die in den hypometabolen Phasen des Futterentzugs registriert wurden, der Sauerstoffverbrauch anstelle des Energieumsatzes dargestellt.

#### 3.4.2.1 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur

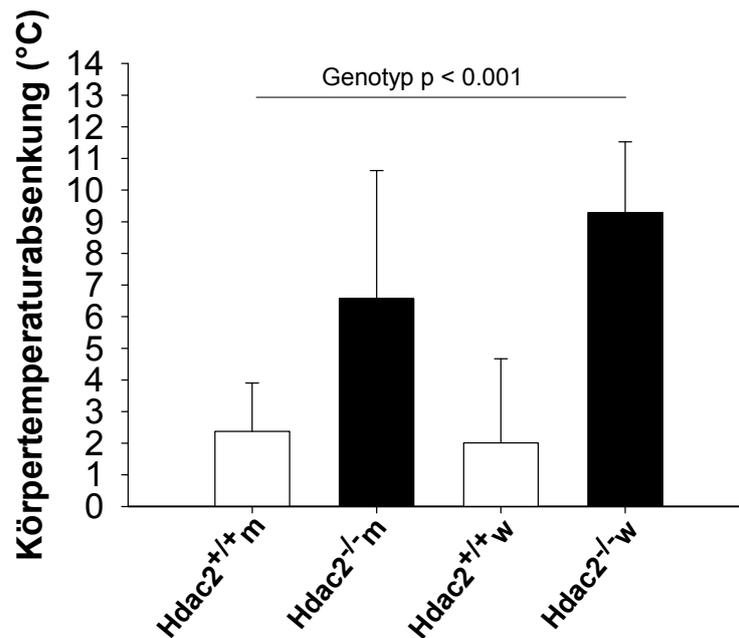
Vor dem Futterentzug waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse durchschnittlich 1.7 g leichter als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p = 0.057$ ). Nach Normalisierung auf das Ausgangsgewicht (Gewicht vor der Messung) verloren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant mehr Gewicht als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0.01$ ). Entsprechend waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse auch nach dem Futterentzug im Mittel 2.1 g leichter ( $p < 0.05$ ). Eine Zusammenfassung der Variablen findet sich in Tab.12.

In Abbildung 39 ist der Anteil der Fett- und Magermasse am Gewichtsverlust dargestellt. Die Abnahme der Fettmasse machte bei beiden Genotypen rund 50 % des Gewichtsverlusts aus (Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $51.2 \pm 8.8$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $50.8 \pm 7.6$ ; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $51.2 \pm 5.9$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $51.4 \pm 7.0$ ,  $p = 0.964$ ). Genotypspezifische Unterschiede wurden für den Anteil der Magermasse gefunden, der bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen mit etwa 30 % signifikant geringer war als bei den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen mit rund 37-39 % (Männchen: Hdac2<sup>-/-</sup>:  $31.9 \pm 6.6$ , Hdac2<sup>+/+</sup>:  $38.7 \pm 8.2$ , Weibchen: Hdac2<sup>-/-</sup>:  $30.2 \pm 8.6$ , Hdac2<sup>+/+</sup>:  $37.1 \pm 5.6$ ,  $p < 0.05$ ). Dementsprechend variierte auch der Anteil der Gewichtsabnahme, der nicht durch die Abnahme der Fett- und Magermasse erklärt werden kann, signifikant (Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $10.1 \pm 1.9$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $17.4 \pm 8.1$ ; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $11.7 \pm 3.8$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $18.3 \pm 3.0$ ,  $p < 0.001$ ). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Flüssigkeit und Darminhalt. Die Mobilisierung der Fettreserven scheint bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen nicht beeinträchtigt zu sein. Es bestand jedoch ein unterschiedlich starker Abbau der Magermasse. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern bestand nicht. Eine Zusammenfassung der ermittelten Variablen der Körperzusammensetzung findet sich in Tab.S5.



**Abb.39: Anteile der Körperzusammensetzung am Gewichtsverlust nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Anteil der Fettmasse (FM), Magermasse (LM) und des restlichen Anteils (Rest), bei dem es sich wahrscheinlich um Flüssigkeit und Darminhalt handelt, am Gewichtsverlust. Bei beiden Genotypen und Geschlechtern resultierten rund 50 % des Gewichtsverlusts aus der Abnahme der Fettmasse. Der Anteil der Magermasse am Gewichtsverlust lag bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen rund 7 % unter dem der Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse, wodurch sich ein größerer Anteil des Rests am Gewichtsverlust ergab. Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern bestand nicht. Mittelwerte. Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 8, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 7; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 7, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 8. m: Männchen, w: Weibchen.

Vor dem Futterentzug war die Körpertemperatur zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbar ( $p = 0.939$ , Tab.12), die Weibchen hatten jedoch eine um im Mittel  $0.78\text{ °C}$  höhere Temperatur als die Männchen ( $p < 0.05$ ). Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse senkten ihre Körpertemperatur unter Futterentzug signifikant stärker ab als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0.001$ , Abb.40). Während Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen ihre Temperatur um im Mittel  $-6.57 \pm 4.05\text{ °C}$  absenkten, war die Absenkung bei den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen mit durchschnittlich  $-2.38 \pm 1.52\text{ °C}$  geringer. Die ermittelte Temperaturabsenkung der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen war mit im Mittel  $-9.28 \pm 2.24\text{ °C}$  im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen mit durchschnittlich  $-2.01 \pm 2.66\text{ °C}$  nochmals höher. Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der Körpertemperaturabsenkung bestand jedoch nicht ( $p = 0.248$ ). Aufgrund der stärkeren Temperaturabsenkung war die Körpertemperatur der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse nach zweitägigem Futterentzug signifikant niedriger und lag im Mittel unter  $29\text{ °C}$ , während Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse eine Temperatur von durchschnittlich über  $33\text{ °C}$  hatten. Ein signifikanter Unterschied zwischen Männchen und Weibchen bestand nicht ( $p = 0.676$ ).



**Abb.40: Vergleich der Körpertemperaturabsenkung nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Temperaturverlust beider Geschlechter und Genotypen nach einem Futterentzug von 48 Stunden. Beide Geschlechter und Genotypen senkten ihre Körpertemperatur ab. Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse beider Geschlechter zeigten jedoch eine im Vergleich zu den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant höhere Absenkung. Diese war bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen nochmals stärker als bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen ( $p = 0.065$ , *post hoc* Test). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>  $n = 8$ ; Hdac2<sup>-/-</sup>  $n = 7$ , Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>  $n = 7$ ; Hdac2<sup>-/-</sup>  $n = 8$ . m: Männchen, w: Weibchen.

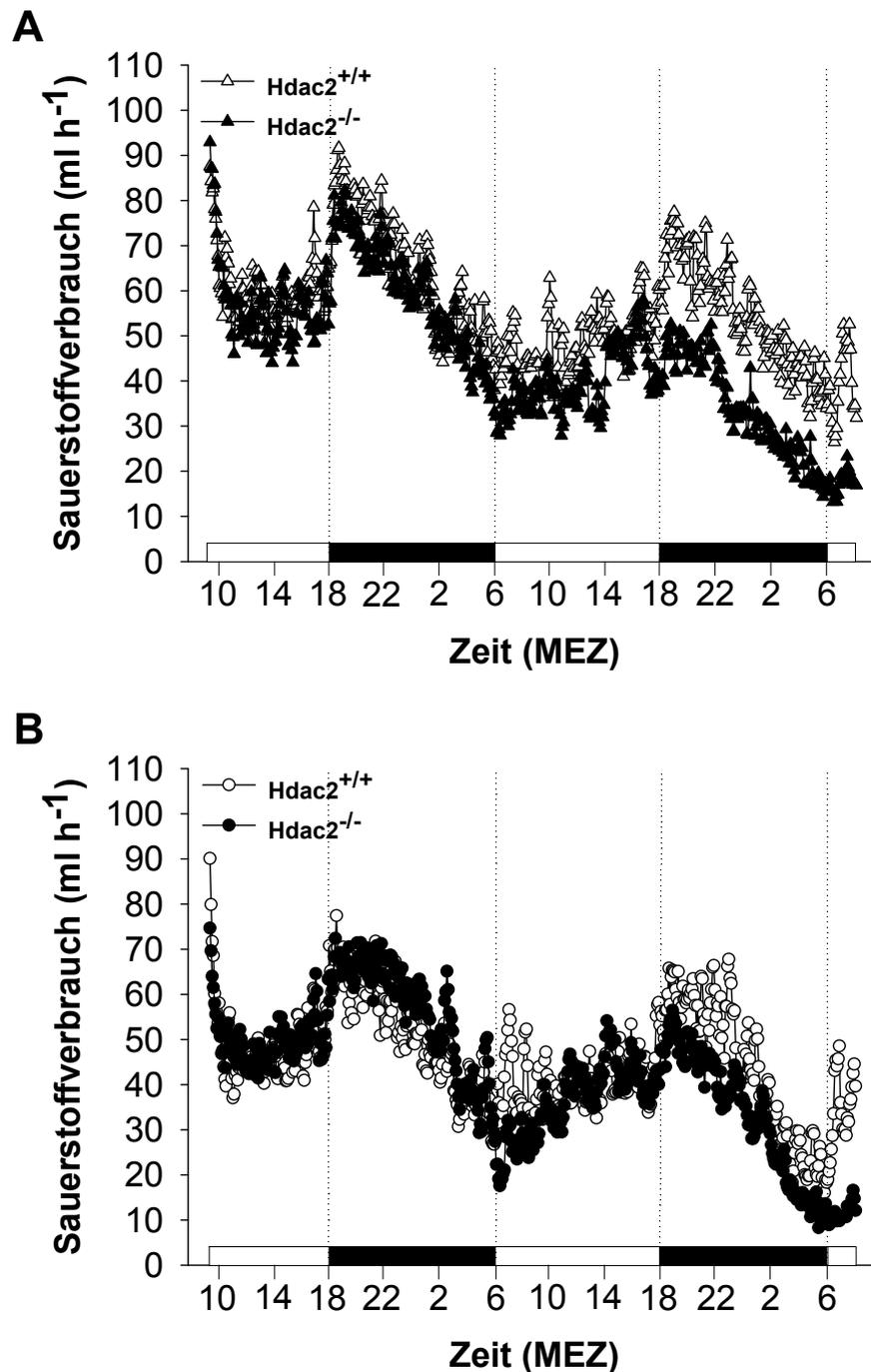
**Tab.12: Körpergewicht und Körpertemperatur bei zweitägigem Futterentzug.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 8	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 7	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 7	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Körpergewicht vor Messung (g)	29.0 $\pm$ 1.9	26.9 $\pm$ 2.9	22.8 $\pm$ 1.9	21.5 $\pm$ 2.5	0.057	<b>0.000</b>	0.671	
Körpergewicht nach Messung (g)	23.2 $\pm$ 1.9	21.2 $\pm$ 2.9	18.0 $\pm$ 1.3	15.8 $\pm$ 1.9	<b>0.010</b>	<b>0.000</b>	0.931	
Körpergewichtsverlust (g)	-5.8 $\pm$ 0.6	-5.8 $\pm$ 0.7	-4.8 $\pm$ 1.0	-5.7 $\pm$ 0.6	0.152 <b>0.008</b>	0.078 0.118	0.137 0.152	<b>0.012</b>
Körpertemperatur vor Messung (°C)	36.00 $\pm$ 0.73	35.54 $\pm$ 0.65	36.34 $\pm$ 0.97	36.75 $\pm$ 0.67	0.939	<b>0.010</b>	0.132	
Körpertemperatur nach Messung (°C)	33.62 $\pm$ 1.32	28.97 $\pm$ 3.70	34.32 $\pm$ 2.26	27.47 $\pm$ 2.65	<b>0.000</b>	0.676	0.254	
Körpertemperatur-Absenkung (°C)	-2.38 $\pm$ 1.52	-6.57 $\pm$ 4.05	-2.01 $\pm$ 2.66	-9.28 $\pm$ 2.24	<b>0.000</b>	0.248	0.134	

### 3.4.2.2 Der Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen war in der ersten Lichtphase und der folgenden Dunkelfase weitgehend vergleichbar (Abb.41A). Im Verlauf des zweiten Tages des Futterentzugs hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen jedoch einen geringeren Sauerstoffverbrauch. Mit Beginn der ersten Dunkelfase steigerten beide Genotypen ihren Sauerstoffverbrauch, gefolgt von einer kontinuierlichen Absenkung, bis dieser am Ende der Dunkelfase deutlich geringer als in der vorherigen Lichtphase war. Dabei lag der Sauerstoffverbrauch der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen leicht unter dem der Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen. In der folgenden Lichtphase zeigten beide Genotypen einen Anstieg, erreichten aber nicht mehr das Niveau gegen Ende der ersten Lichtphase. Dabei war der Sauerstoffverbrauch der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen im Verlauf geringer. Mit Beginn der folgenden Dunkelfase steigerten Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen ihren Sauerstoffverbrauch im Gegensatz zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen nicht weiter, so dass dieser in der gesamten Dunkelfase trotz ähnlicher Absenkung im Verlauf deutlich niedriger war. Am Ende der zweiten Dunkelfase zeigten die Mäuse beider Genotypen ihren niedrigsten Sauerstoffverbrauch. Mit Beginn der letzten Lichtphase konnten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse ihren Energieumsatz im Gegensatz zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen nicht mehr deutlich steigern.

Bei den Weibchen wurde ein den Männchen vergleichbarer Verlauf, mit einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs zu Beginn der Dunkelphasen, gefolgt von einer Absenkung im Verlauf und erneutem Anstieg während der Lichtphasen gefunden (Abb.41B). Dabei lag der Energieumsatz am Ende der zweiten Licht- und Dunkelfase deutlich unter dem der ersten. Sowohl in der ersten Lichtphase als auch in der folgenden Dunkel- und Lichtphase war der Sauerstoffverbrauch zwischen beiden Genotypen weitgehend vergleichbar. Erst mit Beginn der letzten Dunkelfase zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen einen geringeren Anstieg im Sauerstoffverbrauch, weshalb er im gesamten Verlauf der Dunkelfase im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen deutlich geringer war. Der genotypspezifische Unterschied war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den Männchen. Mit Beginn der letzten Lichtphase zeigten Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen eine deutliche Steigerung im Sauerstoffverbrauch, während der Anstieg bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen deutlich geringer ausfiel.



**Abb.41: Energieumsatz unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch während des Futterentzugs. Abbildung A zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B den der Weibchen. Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse beider Geschlechter senkten ihren Sauerstoffverbrauch als Reaktion auf den Futterentzug während der Dunkelphasen ab und zeigten eine erneute Steigerung im Verlauf der Lichtphasen. Bei den Männchen zeigten sich bereits in der ersten Dunkelphase leichte genotypspezifische Unterschiede, mit einem tendenziell niedrigeren Sauerstoffverbrauch der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen. Im weiteren Verlauf des Futterentzugs wurden die Unterschiede immer größer. Insbesondere in der letzten Dunkelphase war der Sauerstoffverbrauch der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen deutlich niedriger. Im Gegensatz zu den Männchen zeigten die Weibchen erst in der zweiten Dunkelphase des Futterentzugs einen genotypspezifischen Unterschied, mit einem geringeren Sauerstoffverbrauch der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 8, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 7; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 7, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 8.

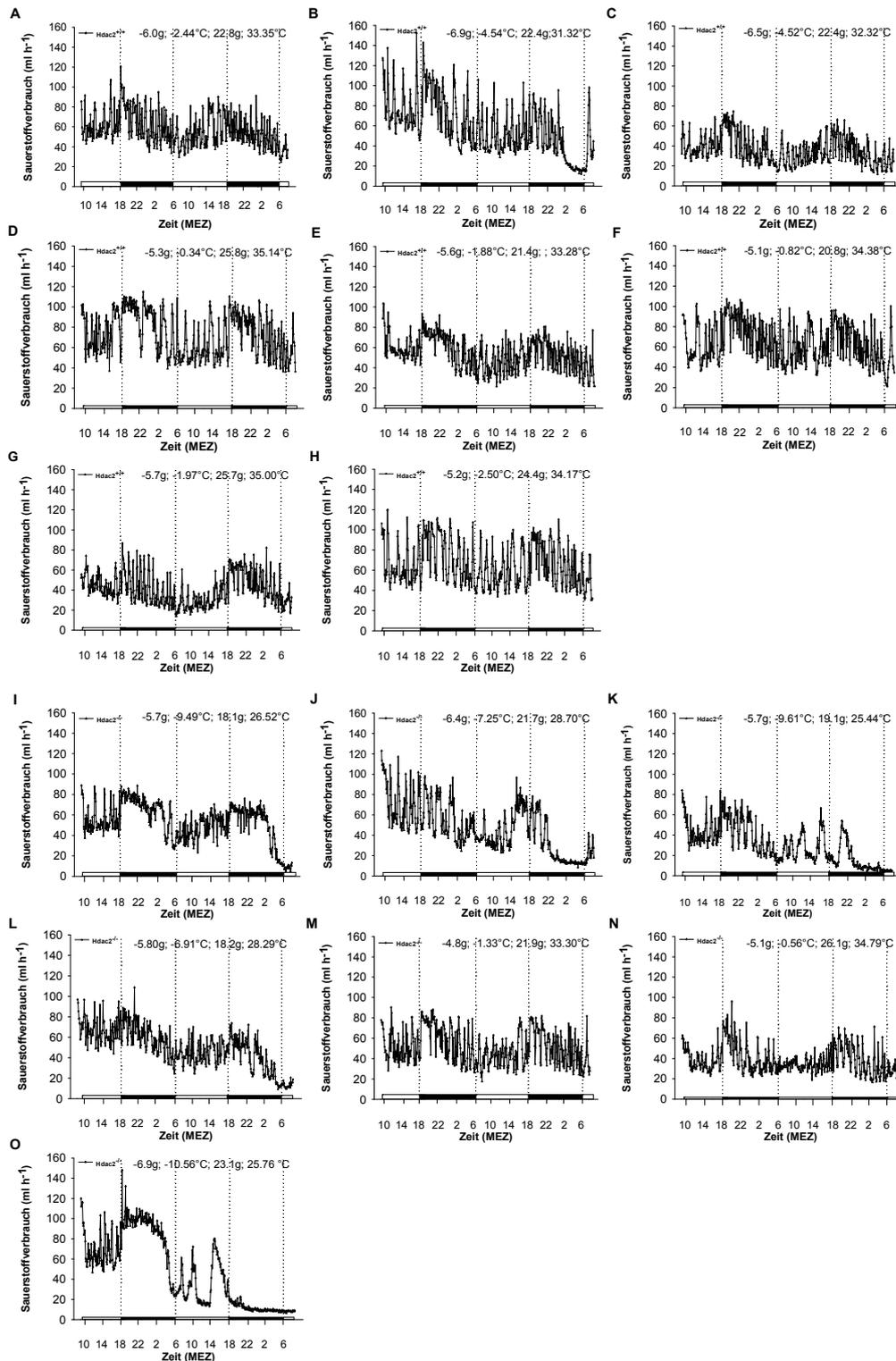
Die Einzelverläufe zeigen, dass die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen sehr unterschiedlich auf den Futterentzug reagierten (Abb.42, Abb.43).

Weder  $Hdac2^{+/+}$  (Abb. 42A-H) noch  $Hdac2^{-/-}$  (Abb. 42I-J) Männchen zeigten innerhalb des ersten Tages längere hypometabole Phasen. Am zweiten Tag des Futterentzugs wurde über die Hälfte der  $Hdac2^{-/-}$  Männchen (5/7) im Verlauf der Dunkelphase hypometabol (Abb.42I+J+K+L+O). Von den  $Hdac2^{+/+}$  Männchen wies lediglich eine Maus eine ausgeprägte hypometabole Phase mit den Charakteristika eines Torporbouts auf (1/8, Abb.42B, Kap.2.5.2). Zwei der  $Hdac2^{-/-}$  Männchen waren auffällig, weil sie bereits in der Lichtphase des zweiten Tages des Futterentzugs mehrere hypometabole Phasen aufwiesen (Abb.42K+O). Eines dieser Männchen zeigte eine besonders lange hypometabole Phase (Abb.42O). Es senkte seinen Sauerstoffverbrauch bereits gegen Ende der Lichtphase ab und blieb bis zum Ende der Aufzeichnung hypometabol. Auch das zweite Männchen war bis zum Ende der Messung deutlich hypometabol (Abb.42K). Beide  $Hdac2^{-/-}$  Männchen waren nicht mehr in der Lage ihren Sauerstoffverbrauch erneut zu steigern, was aus der Länge und Tiefe der hypometabolen Phase geschlossen werden kann. Nach Beendigung der Messung und Fütterung von Breifutter erholten sich die Mäuse innerhalb weniger Stunden wieder und zeigten ein normales Verhalten wie Fellpflege und Aktivität. Die ausgedehnten hypometabolen Phasen beider Mäuse wirken sich aufgrund ihrer Länge und Tiefe auf den mittleren Sauerstoffverbrauch aller  $Hdac2^{-/-}$  Männchen aus (Abb.41A). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Einzelbetrachtung der Mäuse.

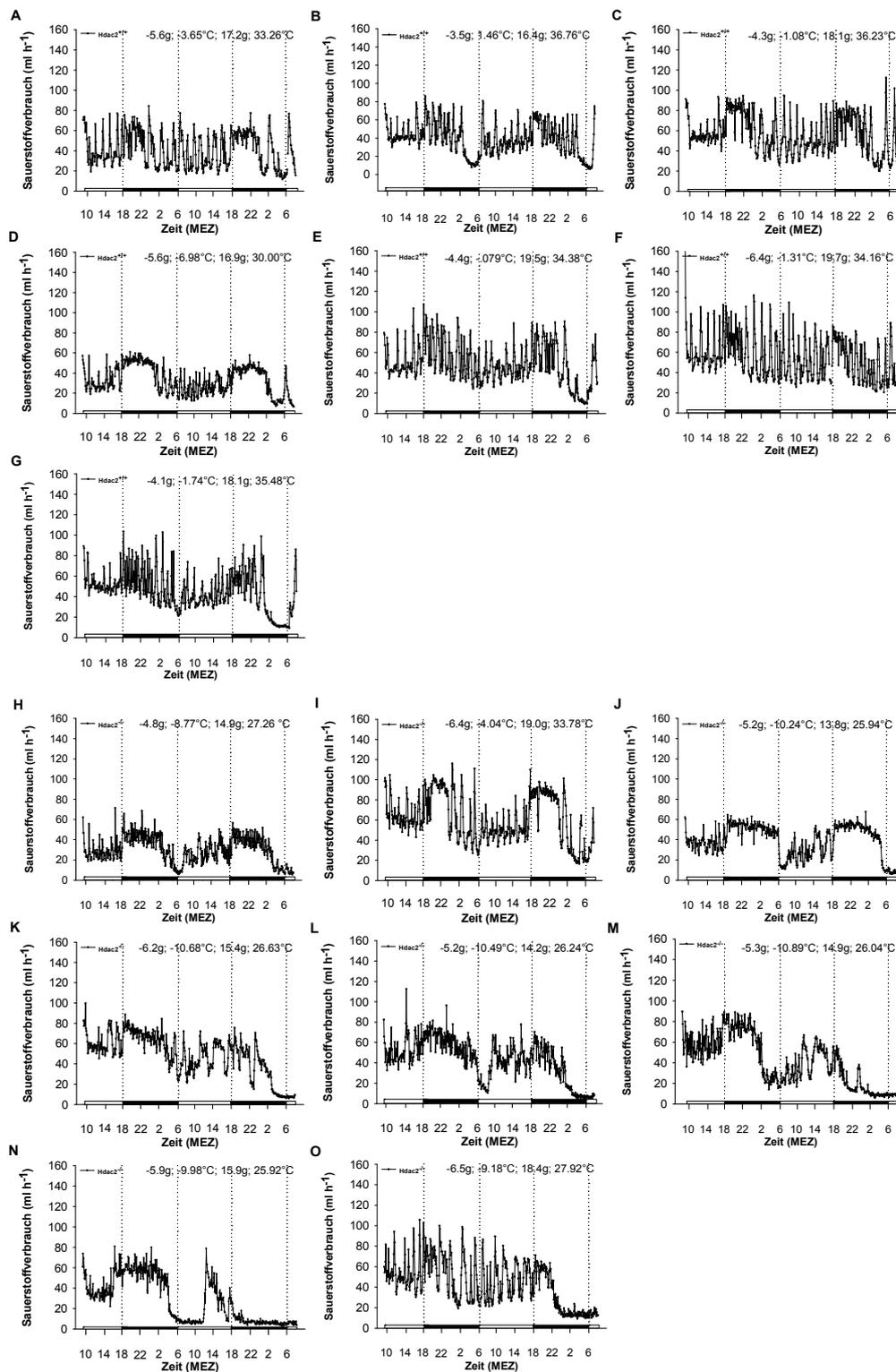
Die Hälfte der  $Hdac2^{-/-}$  Weibchen (4/8, Abb.43H-O) wurde bereits am ersten Tag des Futterentzugs im Verlauf der Dunkelphase torpid, mit Torporlängen zwischen 1.75 und 7.75 Stunden (Abb.43H+J+L+M+N). Im Gegensatz dazu zeigte von den  $Hdac2^{+/+}$  Weibchen (Abb. 43A-G) lediglich ein Weibchen Torpor (1/7, Abb. 43B). Im Verlauf der zweiten Dunkelphase des Futterentzugs wurden bei den  $Hdac2^{-/-}$  Weibchen bis auf eine Maus (Abb.43I) alle Tiere hypometabol. Wie bei den Männchen begannen die hypometabolen Phasen in der Regel im Verlauf der zweiten Dunkelphase des Futterentzugs. Eines der Weibchen senkte seinen Sauerstoffverbrauch bereits im Verlauf der Lichtphase ab (Abb.43N), was ebenfalls bei zwei der  $Hdac2^{-/-}$  Männchen beobachtet wurde (Abb.42K+O). Dieses Weibchen zeigte bereits am ersten Tag des Futterentzugs einen deutlich ausgeprägten Torporbout. Von den  $Hdac2^{+/+}$  Weibchen wurde über die Hälfte der Mäuse am Ende des Futterentzugs torpid (5/7, Abb.43A+B+D+E+G).

Aufgrund des Versuchsendes kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden ob die  $Hdac2^{-/-}$  Mäuse, die am Ende der der Messung hypometabol waren, ihren Sauerstoffverbrauch erneut hätten steigern können. Für Torpor spricht der Eintrittszeitpunkt im Verlauf der Dunkelphase. Einige der Mäuse zeigten am Ende der Messung auch einen tendenziellen Anstieg im Sauerstoffverbrauch. Andererseits konnten für einige der

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse starke kompensatorische Probleme gezeigt werden, weil sie ihren Sauerstoffverbrauch nicht mehr steigern konnten. Insbesondere bei den Weibchen wurde am Ende der Messung ein sehr geringer Sauerstoffverbrauch aufgezeichnet.



**Abb.42: Individueller Sauerstoffverbrauch männlicher Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch der analysierten Hdac2<sup>+/+</sup> (A-H) und Hdac2<sup>-/-</sup> (I-O) Männchen während des zweitägigen Futterentzugs. Sowohl die Variabilität im Sauerstoffverbrauch als auch die Lage der hypometabolen Phasen waren individuell verschieden. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten deutlich mehr hypometabole Phasen als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse.

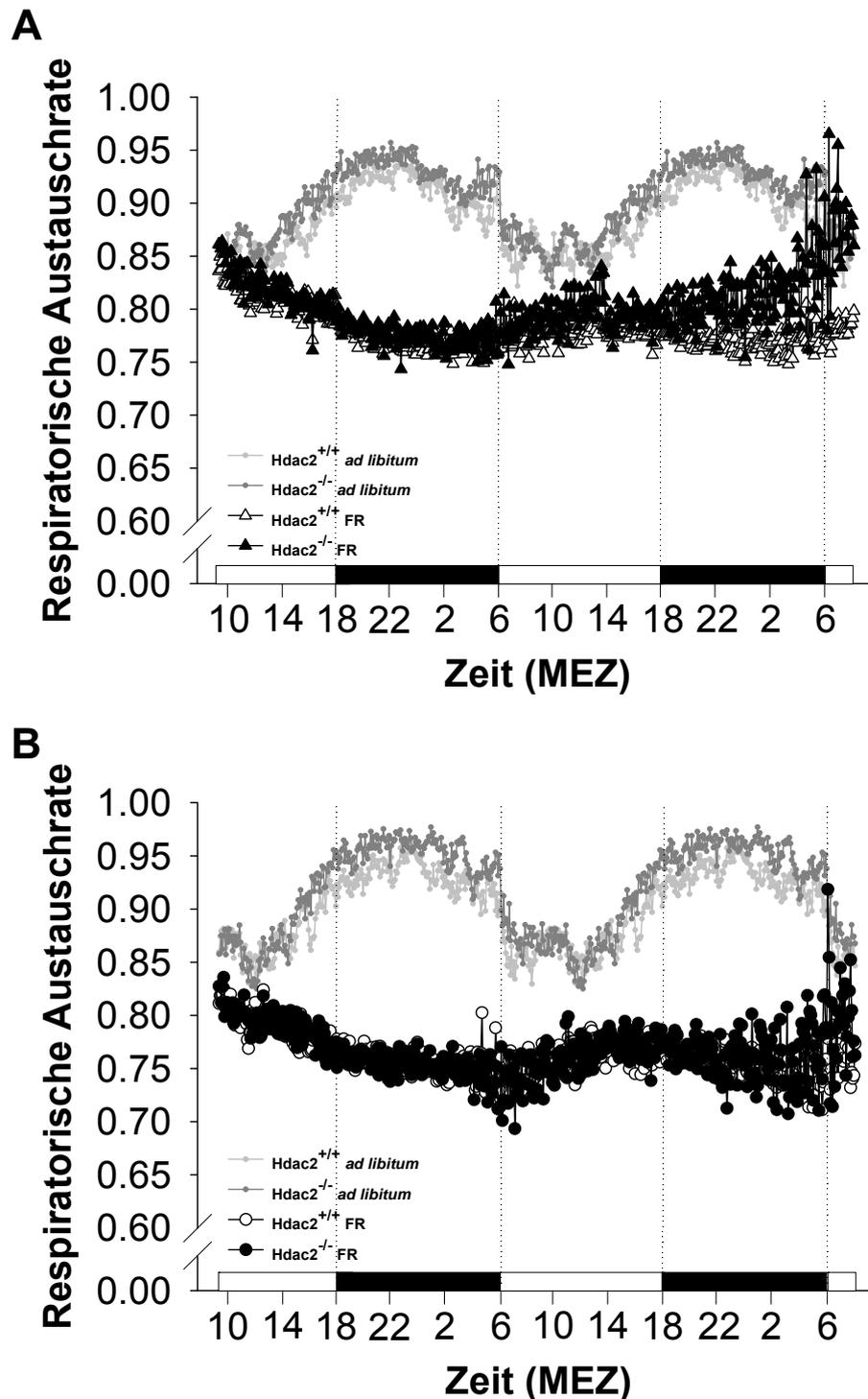


**Abb.43: Individueller Sauerstoffverbrauch weiblicher Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse unter zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Sauerstoffverbrauch der analysierten Hdca2<sup>+/+</sup> (A-G) und Hdac2<sup>-/-</sup> (H-O) Weibchen während des zweitägigen Futterentzugs. Sowohl die Variabilität im Sauerstoffverbrauch als auch die Lage der hypometabolen Phasen waren individuell verschieden. Fast alle Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse zeigten ausgeprägte hypometabole Phasen, beginnend in der zweiten Dunkelperiode des Futterentzugs. Lediglich ein Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen wurde bereits innerhalb der ersten 24 Stunden torpid. Im Gegensatz dazu wurde die Hälfte der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse bereits innerhalb des ersten Tages torpid. Bis auf eine Maus waren sie zudem am Ende der Messung hypometabol. Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten deutlich mehr hypometabole Phasen als Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen.

### 3.4.2.3 Die respiratorische Austauschrate

Unter Futterentzug hatten die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen eine im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung deutlich niedrigere respiratorische Austauschrate (RER, Abb.44A+B). Dies zeigt eine vermehrte Nutzung von Proteinen und Lipiden zur Energiegewinnung an. Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen senkten die RER im Verlauf der ersten Licht- und Dunkelphase des Futterentzugs kontinuierlich von etwa 0.85 auf 0.77 ab, wobei kein genotypspezifischer Unterschied bestand (Abb.44A). Im Verlauf des zweiten Tages war die RER in der Lichtphase vergleichbar. Für Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen wurde in der folgenden Dunkelphase ein deutlicher Anstieg der RER mit stärkeren Schwankungen registriert. Die RER erreichte gegen Ende der Messung ein Niveau, das auch bei *ad libitum* Fütterung gezeigt wurde. Der Anstieg deutet auf eine vermehrte Verstoffwechslung von Proteinen anstatt Lipiden hin. Die hohe Variabilität scheint auf dem Hypometabolismus der Mäuse zu basieren und wurde auch bei Mct8<sup>-/-</sup> Mäusen während des Torpors registriert (Kap.3.3.2.3).

Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten im Verlauf der ersten Licht- und Dunkelphase des Futterentzugs eine kontinuierliche Absenkung der RER von etwa 0.83 auf 0.75, ohne genotypspezifischen Unterschied (Abb.44B). Auch im Verlauf des zweiten Tags des Futterentzugs war die RER in der Lichtphase vergleichbar. In der Dunkelphase zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen, wie die Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen, einen Anstieg der RER, der durch starke Schwankungen gekennzeichnet war.



**Abb.44: Respiratorische Austauschrate unter zweitägigem Futterentzug und *ad libitum* Fütterung.** Dargestellt ist die RER während des Futterentzugs im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung. Die RER bei *ad libitum* Bedingungen stammt aus der Bestimmung des täglichen Energieumsatzes (Kap.3.4.1.3) und wurde für die entsprechenden Zeiträume eingefügt. Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. Bei beiden Geschlechtern und Genotypen war die RER unter Futterentzug im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung deutlich niedriger.  $\text{Hdac2}^{+/+}$  und  $\text{Hdac2}^{-/-}$  Männchen, genau wie  $\text{Hdac2}^{+/+}$  und  $\text{Hdac2}^{-/-}$  Weibchen, hatten in der Licht- und Dunkelphase des ersten Tags des Futterentzugs sowie in der folgenden Dunkelphase des zweiten Tags eine vergleichbare RER. In der letzten Dunkelphase des Futterentzugs zeigten  $\text{Hdac2}^{-/-}$  Mäuse beider Geschlechter einen Anstieg der RER mit deutlichen Schwankungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen:  $\text{Hdac2}^{+/+}$ : n = 8,  $\text{Hdac2}^{-/-}$ : n = 7; Weibchen:  $\text{Hdac2}^{+/+}$ : n = 7;  $\text{Hdac2}^{-/-}$ : n = 8.

### 3.4.2.4 Zusammenfassung

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren leichter als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse und verloren nach Normalisierung auf das Ausgangsgewicht mehr Gewicht. Dabei war der Anteil der Fettmasse am Gewichtsverlust zwischen beiden Genotypen vergleichbar, während die Abnahme an Magermasse bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen niedriger war. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse senkten ihre Körpertemperatur unter zweitägigem Futterentzug signifikant stärker ab als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse. Nach dem Futterentzug lag ihre Körpertemperatur im Mittel unter 29.0 °C, während die der Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse mit durchschnittlich über 33 °C deutlich höher war. Im Verlauf des Futterentzugs wurden deutlich mehr Hdac2<sup>-/-</sup> als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse hypometabol. Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen zeigten bereits innerhalb der ersten 24 Stunden Torpor. Bei beiden Geschlechtern wurden Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse identifiziert, die am zweiten Tag des Futterentzugs nicht mehr in der Lage waren ihren Sauerstoffverbrauch nach Eintritt in eine hypometabole Phase erneut zu steigern. Die Analyse der RER ergab innerhalb der ersten 36 Stunden keine Beeinträchtigung der Lipidnutzung, weil Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse eine mit Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbare Absenkung aufwiesen. Im Verlauf der zweiten Dunkelphase des Futterentzugs zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch einen deutlichen Anstieg der RER. Dies zeigt eine differentielle Substratnutzung und vermehrte Proteinoxidation.

### 3.4.3 Analyse in Thermoneutralität und unter akuter Kälteexposition

Aufgrund des thermoregulatorischen Phänotyps, mit starker Absenkung von Sauerstoffverbrauch und Körpertemperatur unter zweitägigem Futterentzug (Kap.3.4.2), wurde der Energieumsatz der Mäuse in Thermoneutralität (30 °C) und unter akuter Kälteexposition (5 °C) analysiert. Die Mäuse hatten eine Altersspanne von 22-25 Wochen. Die ermittelten Variablen befinden sich in Tabelle 14 am Ende der Zusammenfassung (Kap.3.4.3.5).

#### 3.4.3.1 Körpergewicht und Körpertemperatur

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter ( $p < 0.001$ ). Der Gewichtsverlust zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen war nicht signifikant verschieden ( $p = 0.421$ ). Nach Normalisierung hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse aufgrund des niedrigeren Ausgangsgewichts jedoch einen tendenziell höheren Gewichtsverlust ( $p = 0.088$ ).

Vor der Messung war die Körpertemperatur der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse leicht, aber dennoch signifikant niedriger ( $p < 0.05$ ). Die Weibchen hatten eine im Mittel 0.68 °C höhere Temperatur als die Männchen ( $p < 0.001$ ). Beide Geschlechter und Genotypen senkten ihre Körpertemperatur unter Kälteexposition ab, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ( $p = 0.236$ ), aber den Geschlechtern ( $p < 0.05$ ) mit stärkerer Absenkung der

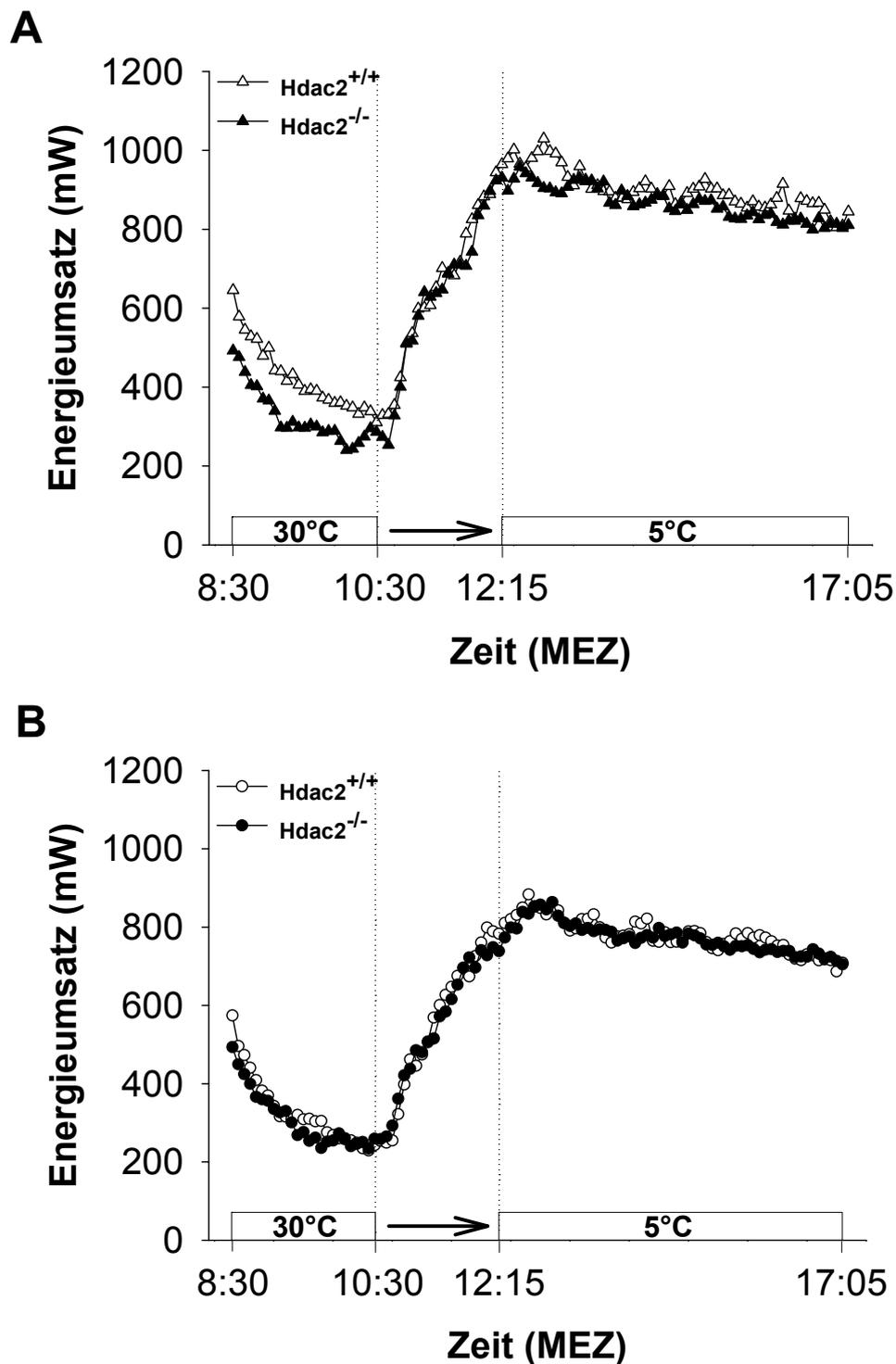
Weibchen bestand. Nach akuter Kälteexposition war die Körpertemperatur beider Genotypen vergleichbar ( $p = 0.927$ ).

### **3.4.3.2 Der Energieumsatz in Thermoneutralität und Kälte**

Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen hatten in Thermoneutralität (30 °C) einen im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen deutlich niedrigeren Energieumsatz (Abb.45A). Etwa 10-15 Minuten nach Beginn der Umgebungstemperaturabsenkung steigerten beide Genotypen ihren Energieumsatz bis zum Erreichen der 5 °C kontinuierlich. Dabei war der Anstieg zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen vergleichbar (rund 645-655 mW). In Kälte (5° C) lag der Energieumsatz der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen gering unter dem der Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen. Beide Genotypen zeigten einen stabilen Energieumsatz, mit einer leichten Absenkung im Verlauf.

Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen hatten sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte einen mit Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen vergleichbaren Energieumsatz (Abb.45B). Mit Absenkung der Umgebungstemperatur, bis zum Erreichen der 5 °C, steigerten beide Genotypen ihren Energieumsatz kontinuierlich (um etwa 480-540 mW). Ein Unterschied zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen bestand nicht. In Kälte war der Energieumsatz beider Genotypen vergleichbar. Wie bei den Männchen wurde der Energieumsatz während der gesamten Kälteexposition auf einem stabilen Niveau gehalten, mit nur geringfügiger Absenkung im zeitlichen Verlauf.

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter waren in der Lage ihren Energieumsatz in Kälte aufrecht zu halten und somit kältetolerant, wobei sie auf einem mit den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbaren Niveau thermoregulierten.



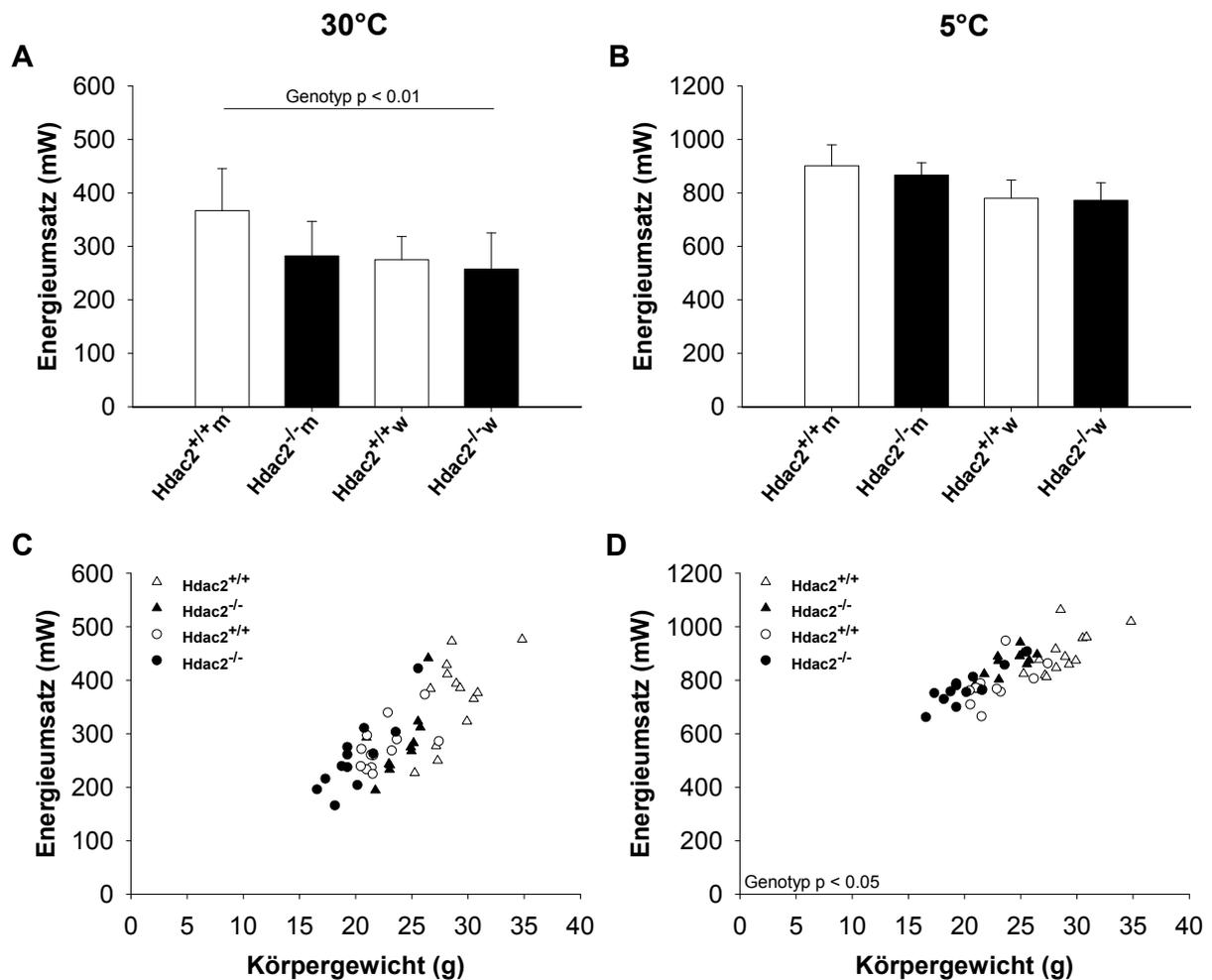
**Abb.45: Sauerstoffverbrauch in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Abbildung A zeigt den mittleren Sauerstoffverbrauch der Männchen beider Genotypen im zeitlichen Verlauf, Abbildung B den der Weibchen. In Thermoneutralität hatten Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen einen höheren Energieumsatz als Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen. Bei den Weibchen wurde kein genotypspezifischer Unterschied gefunden. Mit Absenkung der Umgebungstemperatur steigerten Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse beider Geschlechter ihren Sauerstoffverbrauch, wobei kein Unterschied zwischen den Genotypen eines Geschlechts bestand. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren in der Lage ihren Energieumsatz in Kälte auf einem mit Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbaren Niveau zu halten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 11; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 12.

Für die weitere Evaluierung wurde sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte ein Messbereich ausgewählt, in dem der Energieumsatz der Mäuse aller Gruppen vergleichbar stabil war. In Thermoneutralität wurden die letzten 15 Messwerte verwendet (9:20 - 10:30 MEZ), in Kälte die letzten 59 Messwerte (12:15 - 17:05 MEZ).

### Mittlerer Energieumsatz

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten in Thermoneutralität (30 °C) einen signifikant niedrigeren Energieumsatz ( $p < 0.01$ , Abb.46A). Dies war hauptsächlich auf den geringeren Energieumsatz der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen zurückzuführen, während bei den Weibchen kein Unterschied bestand. Die Weibchen hatten einen signifikant geringeren Energieumsatz als die Männchen ( $p < 0.01$ ). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand kein signifikanter genotypspezifischer Unterschied ( $p = 0.156$ , Abb. 46C).

Im Gegensatz zur Thermoneutralität war der Energieumsatz zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen in Kälte (5 °C) nicht signifikant verschieden ( $p = 0.268$ , Abb.46B). Weibchen hatten erneut einen niedrigeren Energieumsatz als die Männchen ( $p < 0.05$ ). Nach Normalisierung hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse aufgrund ihres geringeren Körpergewichts einen signifikant höheren Energieumsatz als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse und waren in Kälte somit hypermetabol ( $p < 0.05$ , Abb.46C). Aus dem mittleren Energieumsatz, der Körpertemperatur am Ende der Messung und der mittleren Umgebungstemperatur konnte eine überschlagsmäßige Kalkulation des Wärmeverlusts (*Conductance*) über die Oberfläche durchgeführt werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Wärmeabgabe zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen (Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $29.27 \pm 2.41 \text{ mW } ^\circ\text{C}^{-1}$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $28.20 \pm 1.62 \text{ mW } ^\circ\text{C}^{-1}$ ; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $25.37 \pm 2.01 \text{ mW } ^\circ\text{C}^{-1}$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $25.04 \pm 1.87 \text{ mW } ^\circ\text{C}^{-1}$ ;  $p = 0.229$ ). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch einen höheren Wärmeverlust ( $p < 0.05$ , Abb.S14). Dies weist auf eine ineffizientere Thermogenese hin, weil Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse zur Aufrechterhaltung einer mit den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbaren Körpertemperatur einen höheren Energieumsatz hatten.



**Abb.46: Absoluter und gegen das Körpergewicht aufgetragener mittlerer Energieumsatz in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Dargestellt ist der absolute mittlere Energieumsatz eines definierten Messzeitraums in Thermoneutralität (A) und Kälte (B) sowie der auf das Körpergewicht normalisierte Energieumsatz in Thermoneutralität (C) und Kälte (D). Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten in Thermoneutralität einen absolut gesehen signifikant niedrigeren Energieumsatz, während in Kälte kein genotypspezifischer Unterschied bestand. Sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Energieumsatz und Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse einen signifikant höheren Energieumsatz als man für ihr im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen niedrigeres Körpergewicht erwartet und waren somit hypermetabol. In thermoneutraler Umgebung bestand hingegen kein Unterschied. Abb.A+B: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $n = 13$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $n = 11$ ; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $n = 13$ , Hdac2<sup>-/-</sup>:  $n = 12$ . m: Männchen, w: Weibchen

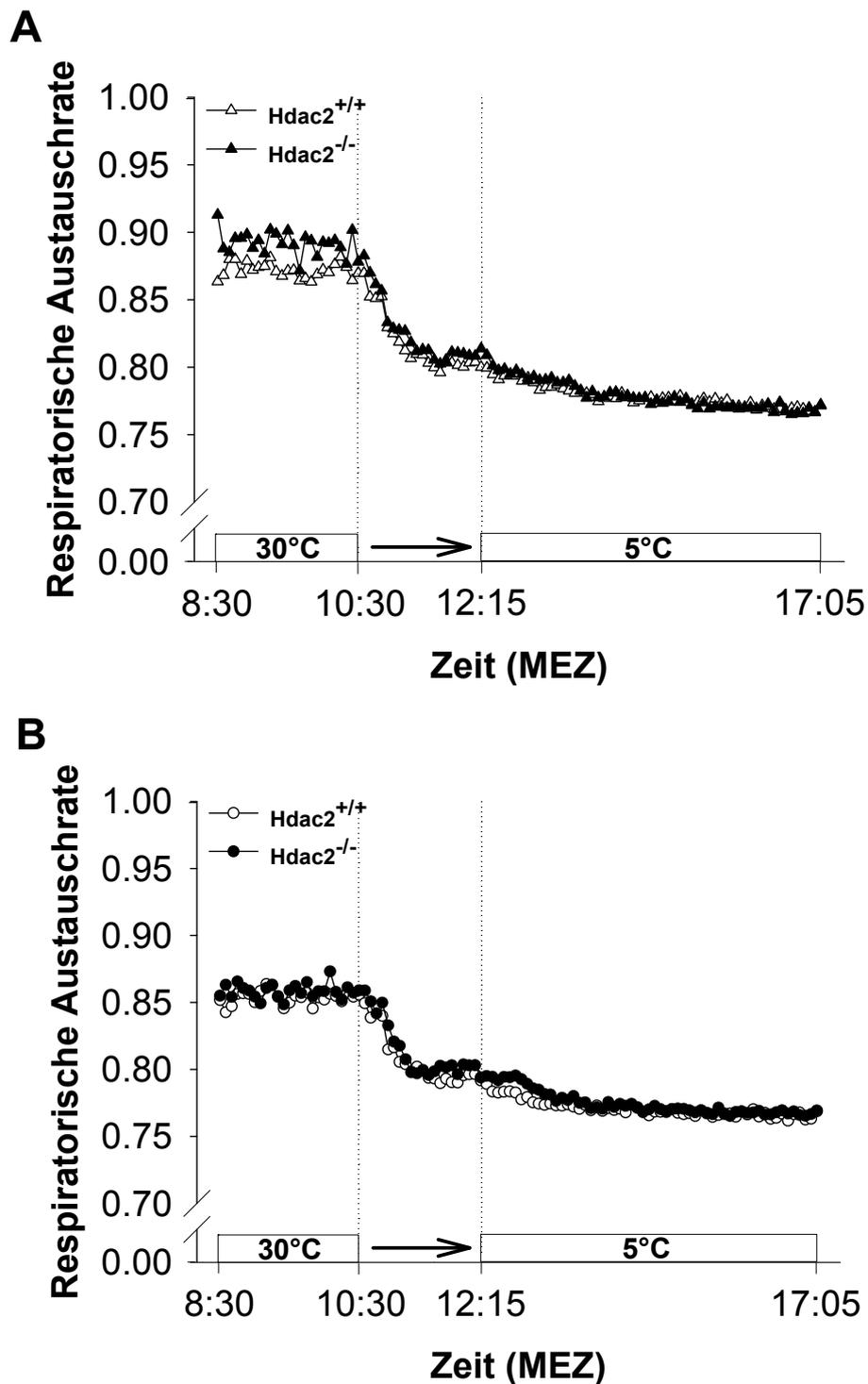
### 3.4.3.3 Die respiratorische Austauschrate

Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen hatten in Thermoneutralität eine gering höhere respiratorische Austauschrate (RER) als die Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen (Abb.47A). Etwa 15 Minuten nach Beginn der Temperaturabsenkung zeigten beide Genotypen eine starke und vergleichbare Absenkung der RER, wodurch diese in Kälte deutlich unter der in thermoneutraler Umgebung lag. In Kälte bestand kein Unterschied zwischen beiden Genotypen, die eine stabile RER mit leichter Absenkung im Verlauf zeigten.

Bei den Weibchen war die RER zwischen beiden Genotypen während der gesamten Messung vergleichbar (Abb.47B). Wie die Männchen senkten auch die Weibchen ihre RER etwa 15 Minuten nach der beginnenden Temperaturabsenkung deutlich ab. Durch die Absenkung lag die RER der Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen in Kälte deutlich unter der in Thermoneutralität, mit einer leichten Absenkung im Verlauf.

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter waren somit genau wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse in der Lage von einer vermehrten Kohlenhydrat- und Proteinoxidation auf eine vorwiegende Lipidoxidation umzustellen.

Weder in Thermoneutralität ( $p = 0.303$ ) noch in Kälte ( $p = 0.295$ ) konnte ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied gezeigt werden, auch wenn die RER der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen in thermoneutraler Umgebung gering erhöht war. Die Kälteexposition führte bei allen Mäusen unabhängig von Geschlecht und Genotyp zu einer deutlichen Absenkung der RER, die im Mittel zwischen 0.08 und 0.11 lag.



**Abb.47: Respiratorische Austauschrate in Thermoneutralität (30 °C) und Kälte (5 °C).** Abbildung A zeigt die mittlere RER der Männchen beider Genotypen im zeitlichen Verlauf, Abbildung B die der Weibchen. In Thermoneutralität war die RER der Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen tendenziell erhöht, während bei den Weibchen kein genotypspezifischer Unterschied bestand. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter waren in der Lage ihre RER mit Absenkung der Umgebungstemperatur im selben Maß wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse abzusenken. In Kälte war die RER beider Genotypen vergleichbar, wobei sie bei beiden Geschlechtern und Genotypen deutlich unter der in thermoneutraler Umgebung lag. Dies zeigt eine vermehrte Lipidoxidation in Kälte. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 11; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 12.

### 3.4.3.4 Veränderte klinische Parameter nach akuter Kälteexposition

In Kooperation mit dem Screen Klinische Chemie der GMC wurden nach erfolgter Kälteexposition Plasmaparameter bestimmt, die im Zusammenhang mit der Energieversorgung stehen. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten signifikant erhöhte Triglyceridspiegel ( $p < 0.01$ , Tab.13). Der Spiegel an unveresterten Fettsäuren sowie der Glycerolspiegel waren ebenfalls signifikant erhöht (jeweils  $p < 0.001$ ). Dies weist auf eine gesteigerte lipolytische Aktivität hin.

**Tab.13: Klinisch-chemische Parameter nach akuter Kälteexposition.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die nach der fünfstündigen Kälteexposition ermittelten Parameter aus dem Plasma. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Parameter	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht)		
	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 12	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 11	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 13	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 12	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p Interaktion
Triglyceride (mg dl <sup>-1</sup> )	43.87 $\pm$ 7.25	51.07 $\pm$ 9.67	45.12 $\pm$ 3.80	51.13 $\pm$ 5.08	<b>0.002</b>	0.738	0.761
Unveresterte Fettsäuren (mmol l <sup>-1</sup> )	0.76 $\pm$ 0.19	1.02 $\pm$ 0.28	0.94 $\pm$ 0.19	1.17 $\pm$ 0.18	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	0.869
Glycerol (mmol l <sup>-1</sup> )	0.31 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.07	<b>0.000</b>	0.098	0.170

### 3.4.3.5 Zusammenfassung

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant leichter als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse. Unter Berücksichtigung des Ausgangsgewichts verloren sie tendenziell mehr Gewicht. Die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen reagierten auf die Kälteexposition mit einer geringen Körpertemperaturabsenkung, wobei am Ende der Messung kein genotypspezifischer Unterschied bestand. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren in der Lage ihren Energieumsatz während der Absenkung der Umgebungstemperatur von 30 °C auf 5 °C im selben Maße wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse zu steigern und ihn in Kälte vergleichbar zu Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen aufrecht zu erhalten. Dies zeigt ihre Kältetoleranz. Nach Normalisierung auf das niedrigere Körpergewicht war der Energieumsatz beider Genotypen in thermoneutraler Umgebung nicht signifikant verschieden, in Kälte waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch hypermetabol. Die vergleichbare Körpertemperatur am Ende der Messung, trotz des Hypermetabolismus in Kälte, lässt auf eine ineffizientere Thermogenese schließen. Dies wird durch den erhöhten kalkulierten Wärmeverlust (*Conductance*) der Mäuse gestützt. Alle Mäuse, unabhängig von Geschlecht und Genotyp, senkten ihre RER im Verlauf der Temperaturabsenkung ab, wodurch sie im Verlauf der Kälteexposition deutlich unter der in Thermoneutralität lag. Dabei war die RER in Kälte zwischen Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbar. Dies zeigt, dass Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse genau wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse in der Lage waren von einer vorwiegenden

Kohlenhydrat- und Proteinnutzung in Thermoneutralität auf eine Lipidoxidation umzuschalten. Die Nutzung der Fettreserven war somit nicht beeinträchtigt.

Tab.14: Ermittelte Variablen während der Bestimmung des Energieumsatzes in Thermoneutralität (30 °C) und akuter Kälteexposition (5 °C). Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 13	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 11	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 13	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 12	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Körpergewicht vor Messung (g)	30.6 ± 2.4	25.6 ± 2.0	23.8 ± 2.3	21.4 ± 2.7	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.071	
Körpergewicht nach Messung (g)	27.2 ± 2.4	22.4 ± 1.6	21.1 ± 2.0	18.7 ± 2.4	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.074	
Mittleres Körpergewicht (g)	28.9 ± 2.4	24.0 ± 1.8	22.5 ± 2.2	20.0 ± 2.6	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.071	
Körpergewichtsverlust (g)	-3.5 ± 0.4	-3.2 ± 0.5	-2.7 ± 0.5	-2.7 ± 0.6	0.421 0.088	<b>0.000</b> 0.858	0.336 0.934	<b>0.000</b>
Körpertemperatur vor Messung (°C)	36.87 ± 0.72	36.54 ± 0.77	37.57 ± 0.29	37.20 ± 0.49	<b>0.044</b>	<b>0.000</b>	0.916	
Körpertemperatur nach Messung (°C)	35.89 ± 1.03	35.86 ± 0.31	35.83 ± 1.40	35.92 ± 0.79	0.927	0.988	0.828	
Körpertemperatur-Absenkung (°C)	-0.98 ± 1.24	-0.68 ± 0.87	-1.74 ± 1.39	-1.28 ± 0.70	0.236	<b>0.036</b>	0.801	
Mittlerer Energieumsatz 30°C (mW)	366.93 ± 78.43	282.34 ± 64.48	275.32 ± 42.93	257.79 ± 67.34	<b>0.008</b> 0.156	<b>0.003</b> <b>0.030</b>	0.076 0.470	<b>0.000</b>
Mittlerer Energieumsatz 5°C (mW)	901.16 ± 78.54	866.53 ± 46.18	780.09 ± 68.01	771.98 ± 66.03	0.268 <b>0.049</b>	<b>0.000</b> 0.630	0.490 0.437	<b>0.000</b>
Mittlere Respiratorische Austauschrate 30°C	0.87 ± 0.05	0.89 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.86 ± 0.04	0.303	0.050	0.554	
Mittlere Respiratorische Austauschrate 5°C	0.78 ± 0.01	0.78 ± 0.00	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.295	<b>0.005</b>	0.489	

### 3.5 Metabolische Charakterisierung der Mausmutantenlinie Ugcg

Die Mausmutantenlinie (MML) Ugcg durchlief nicht die primäre Phänotypisierung der GMC. Die Kooperationspartner fanden ein erhöhtes Gewicht der Mutanten (Ugcg<sup>ff/ff/CaMKCreERT2</sup>) gegenüber den Kontrollen (Ugcg<sup>ff/ff</sup>) und wendeten sich daher für eine detaillierte Phänotypisierung an den metabolischen Screen. In einem ersten Schritt wurden das Körpergewicht und die rektale Körpertemperatur der Mäuse bestimmt. Der Körpergewichtsphänotyp konnte bestätigt werden. Darüber hinaus konnte für die Mutanten eine deutlich niedrigere Körpertemperatur gezeigt werden. Basierend auf der Hypothese, dass die niedrigere Körpertemperatur zur Einsparung von Energie und somit zu dem erhöhten Körpergewicht führen könnte, wurden in einer umfangreichen Untersuchung neben der regelmäßigen Bestimmung von Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Körpertemperatur auch die Energieaufnahme sowie der Energieumsatz zu definierten Zeitpunkten nach Induktion (p.i.) des *Knockouts* bestimmt. Die Induzierbarkeit des *Knockouts* mittels Tamoxifen ermöglichte die zeitliche Analyse der Körpergewichts- und Körpertemperaturentwicklung sowie des Energiehaushalts, um die Verschiebungen im Energiebudget zu bestimmen. Ein Glukose- und Insulintoleranztest wurden durchgeführt sowie die spontane lokomotorische Aktivität der Mäuse bestimmt. In einer weiteren Kohorte Mäuse wurde die Körpergewichts- und Temperaturentwicklung unter Fütterung einer hochkalorischen Diät, beginnend 18 Tage p.i., untersucht. Im Folgenden werden die Kontrollen (Ugcg<sup>ff/ff</sup>) als Ugcg<sup>+/+</sup> und die Mutanten (Ugcg<sup>ff/ff/CaMKCreERT2</sup>) als Ugcg<sup>-/-</sup> abgekürzt.

#### 3.5.1 Körpergewicht, Körpertemperatur und Körperzusammensetzung

In den ersten 20 Tagen p.i. war das Körpergewicht zwischen beiden Genotypen vergleichbar (Abb.48A). Von Tag 21 bis 35 p.i. zeigten Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse eine deutlich stärkere Gewichtszunahme als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse. Dabei waren Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse 35 Tage p.i. im Mittel bereits 4.9 g schwerer (Ugcg<sup>+/+</sup>: 21.6 ± 1.3 g, Ugcg<sup>-/-</sup> 26.5 ± 3.0 g, p < 0.001). Im weiteren Verlauf zeigten beide Genotypen eine vergleichbare Körpergewichtsentwicklung mit einer leichten Zunahme, wobei Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse ihr im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhtes Körpergewicht beibehielten. In einem linearen gemischten Modell bestand eine signifikante Interaktion zwischen der Zeit p.i. und dem Genotyp (p < 0.001). Dies bedeutet, dass die Körpergewichtsentwicklung zwischen beiden Genotypen im Verlauf signifikant verschieden war.

Die Körpertemperatur unterschied sich in den ersten 32 Tagen p.i. zunächst nicht zwischen den beiden Genotypen (Abb.48A). Ab Tag 35 Tage p.i. fiel die Körpertemperatur der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse deutlich unter die der Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse ab. Bis Tag 47 p.i. zeigten Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse eine Absenkung von durchschnittlich 0.92 °C auf 35.72 ± 0.46 °C, während Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse

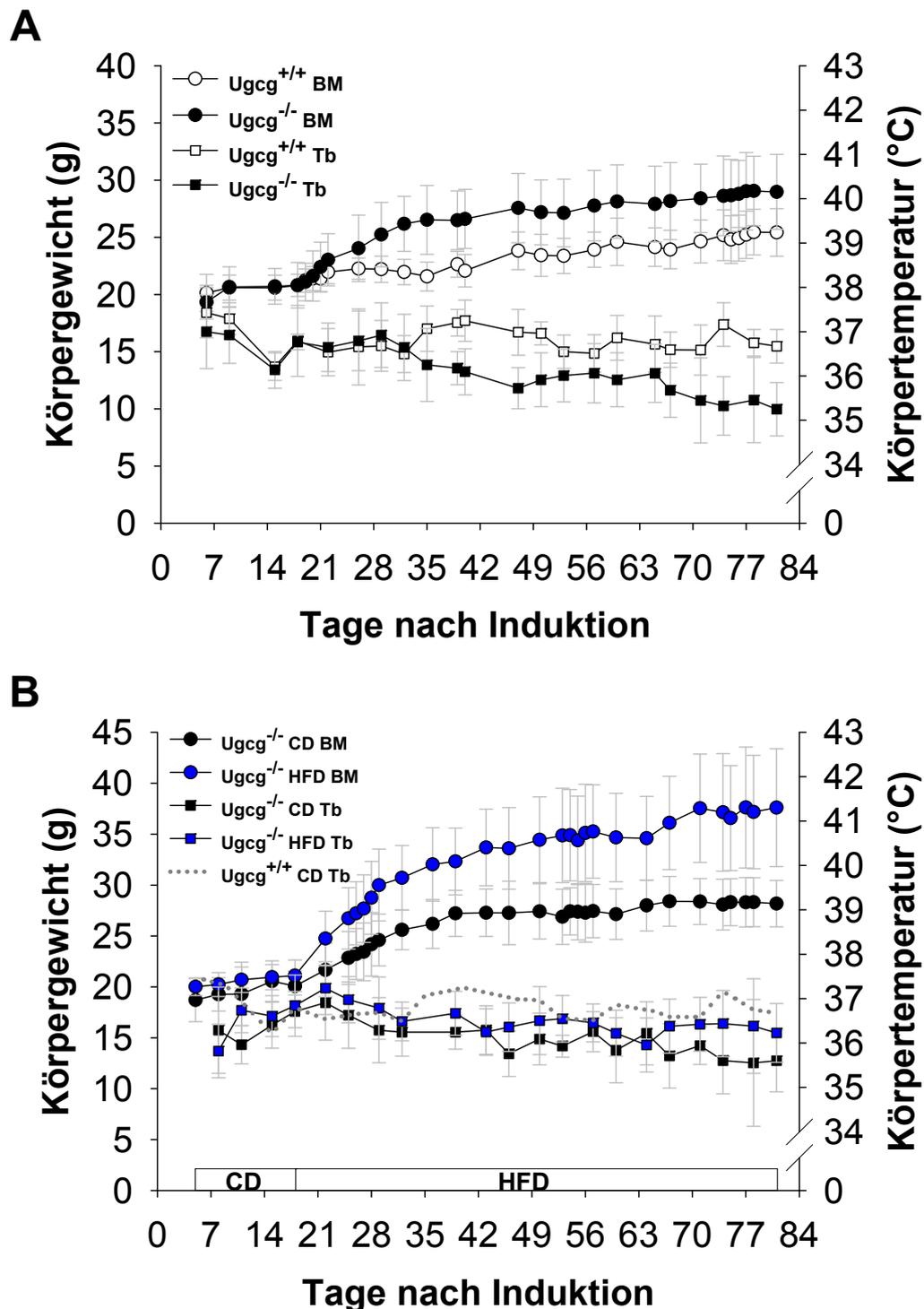
zu diesem Zeitpunkt mit  $36.99 \pm 0.52$  °C weiterhin eine signifikant höhere Körpertemperatur hatten ( $p < 0.001$ ). Wie für das Körpergewicht bestand eine signifikante Interaktion zwischen der Zeit p.i. und dem Genotyp ( $p < 0.001$ ).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Gewichtszunahme nicht mit einer niedrigeren Körpertemperatur einherging und somit unabhängig war.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob der moderat adipöse Phänotyp der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse durch Fütterung einer hochkalorischen Diät (HFD) verstärkt werden kann. Beginnend 22 bis etwa 36 Tage p.i. zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf beiden Diäten eine starke Gewichtszunahme. Diese war auf HFD im Vergleich zur Standarddiät (CD) jedoch deutlich höher (Abb.48B). 36 Tage p.i. waren  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf HFD im Mittel 5.8 g schwerer ( $Ugcg^{-/-}$  CD:  $26.2 \pm 2.4$  g,  $Ugcg^{-/-}$ :  $32.0 \pm 1.8$  g,  $p < 0.001$ ). Auch im weiteren Verlauf zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf HFD eine leichte Zunahme im Körpergewicht, diese war jedoch geringer als zu Beginn, während sich das Gewicht der Mäuse auf CD kaum veränderte. Während des gesamten Zeitraums (Tag 0-81 auf HFD) nahmen  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf HFD mit durchschnittlich  $16.1 \pm 4.4$  g rund das doppelte an Gewicht zu wie  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf CD mit im Mittel  $8.1 \pm 1.3$  g. In einem linearen gemischten Modell bestand eine signifikante Interaktion zwischen der Zeit p.i. und dem Genotyp ( $p < 0.001$ ).

$Ugcg^{-/-}$  Mäuse zeigten auf beiden Diäten eine geringe Absenkung der Körpertemperatur mit der Zeit, jedoch nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt (Abb.48B). Die Körpertemperatur der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf HFD war im Gegensatz zu den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen auf CD geringfügig höher. Dies war im zeitlichen Verlauf jedoch nicht signifikant verschieden ( $p = 0.217$ ).

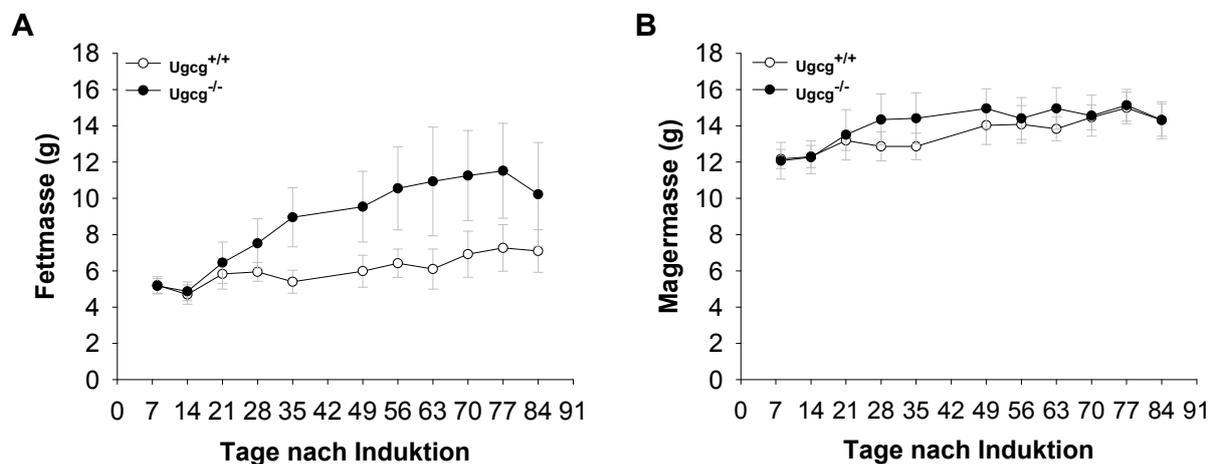
Ein Vergleich der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse beider Kohorten unter Fütterung der CD (Abb. 48A+B) zeigt, dass der Körpergewichtsphänotyp durch Induktion des *Knockouts* mittels Tamoxifen stabil und reproduzierbar ist. In beiden Kohorten entwickelte sich der Körpergewichtsphänotyp rund 21-22 Tage p.i., mit einem starken Anstieg in den folgenden Tagen zwei Wochen und einem flacheren Verlauf im weiteren Experiment. In der zweiten Kohorte war es nicht möglich  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse als Kontrollen mitzumessen, weshalb für einen Vergleich der Körpertemperaturverlauf der  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse auf CD aus der ersten Kohorte herangezogen wurde (Abb.48B). Der Körpertemperaturphänotyp konnte auch in der zweiten Kohorte weitgehend reproduziert werden.  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf beiden Diäten hatten eine niedrigere Körpertemperatur als  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse auf CD, senkten ihre Körpertemperatur im Vergleich zur ersten Kohorte jedoch nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt ab.



**Abb.48: Körpergewichts- und Körpertemperaturentwicklung unter Fütterung verschiedener Diäten.** Dargestellt sind die Entwicklung des Körpergewichts und der Körpertemperatur von  $Ugcg^{+/+}$  und  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen unter Fütterung der CD (A) sowie von  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen unter Fütterung der CD und HFD (B) zu verschiedenen Zeitpunkten p.i.. In Abbildung B wurde für die Evaluierung des Körpertemperaturverlaufs zusätzlich die Körpertemperatur der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf CD aus Abbildung A eingefügt. Beginnend 21 Tage p.i. zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf CD eine deutliche Gewichtszunahme. Zudem senkten sie ihre Körpertemperatur 35 Tage p.i. deutlich unter die der  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse ab (A). Die Fütterung einer HFD resultierte in einer verstärkten Gewichtszunahme der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse (B). Die Körpertemperatur der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse auf beiden Diäten war im Vergleich zu den  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen auf CD niedriger. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Abb.A:  $Ugcg^{+/+}$ : n = 9,  $Ugcg^{-/-}$ : n = 9-10, Abb.B:  $Ugcg^{+/+}$ : n = 5,  $Ugcg^{-/-}$ : n = 7-8. CD: Standarddiät, HFD: Hochkalorische Diät, BM: Körpergewicht,  $T_b$ : Rektale Körpertemperatur.

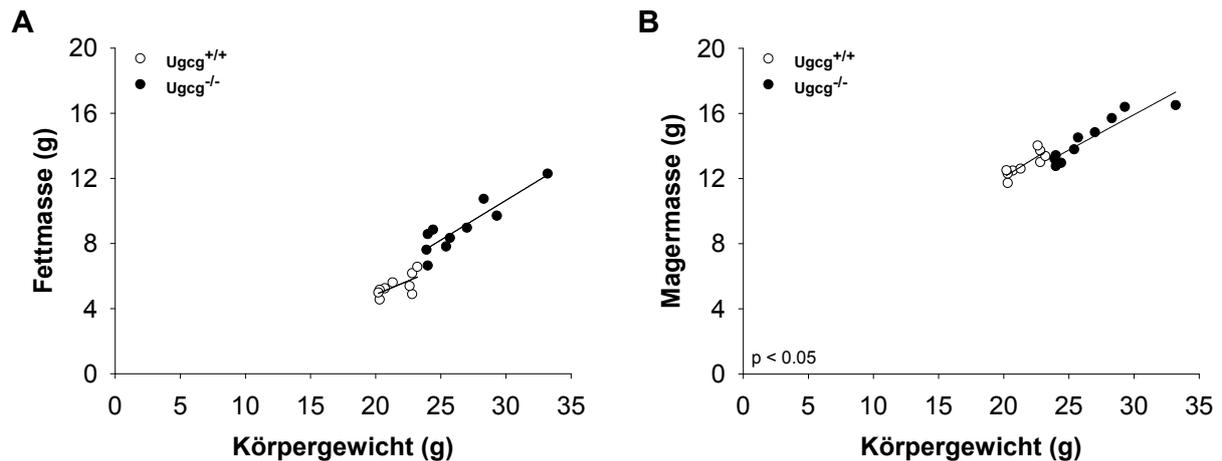
Die Körperzusammensetzung unter Fütterung der CD wurde in regelmäßigen Abständen mittels NMR analysiert. In den ersten 14 Tagen p.i. waren die Fett- und Magermasse beider Genotypen vergleichbar (Abb. 49A+B). Mit Beginn der Gewichtszunahme 21 Tage p.i. zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine deutliche Zunahme der Fettmasse. 35 Tage p.i. hatten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse durchschnittlich 3.6 g mehr Fettmasse ( $Ugcg^{+/+}$ :  $5.4 \pm 0.6$  g,  $Ugcg^{-/-}$ :  $9.0 \pm 1.6$  g,  $p < 0.001$ ). Auch im weiteren Verlauf lag die Fettmasse der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse deutlich über der Fettmasse der  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse, wobei beide Genotypen eine vergleichbare leichte Zunahme zeigten. Im zeitlichen Verlauf p.i. bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ( $p < 0.001$ ).

Im Gegensatz zur Fettmasse waren sowohl die genotypspezifischen Unterschiede als auch die Zunahme in der Magermasse gering. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen im zeitlichen Verlauf p.i. bestand nicht ( $p = 0.502$ ).



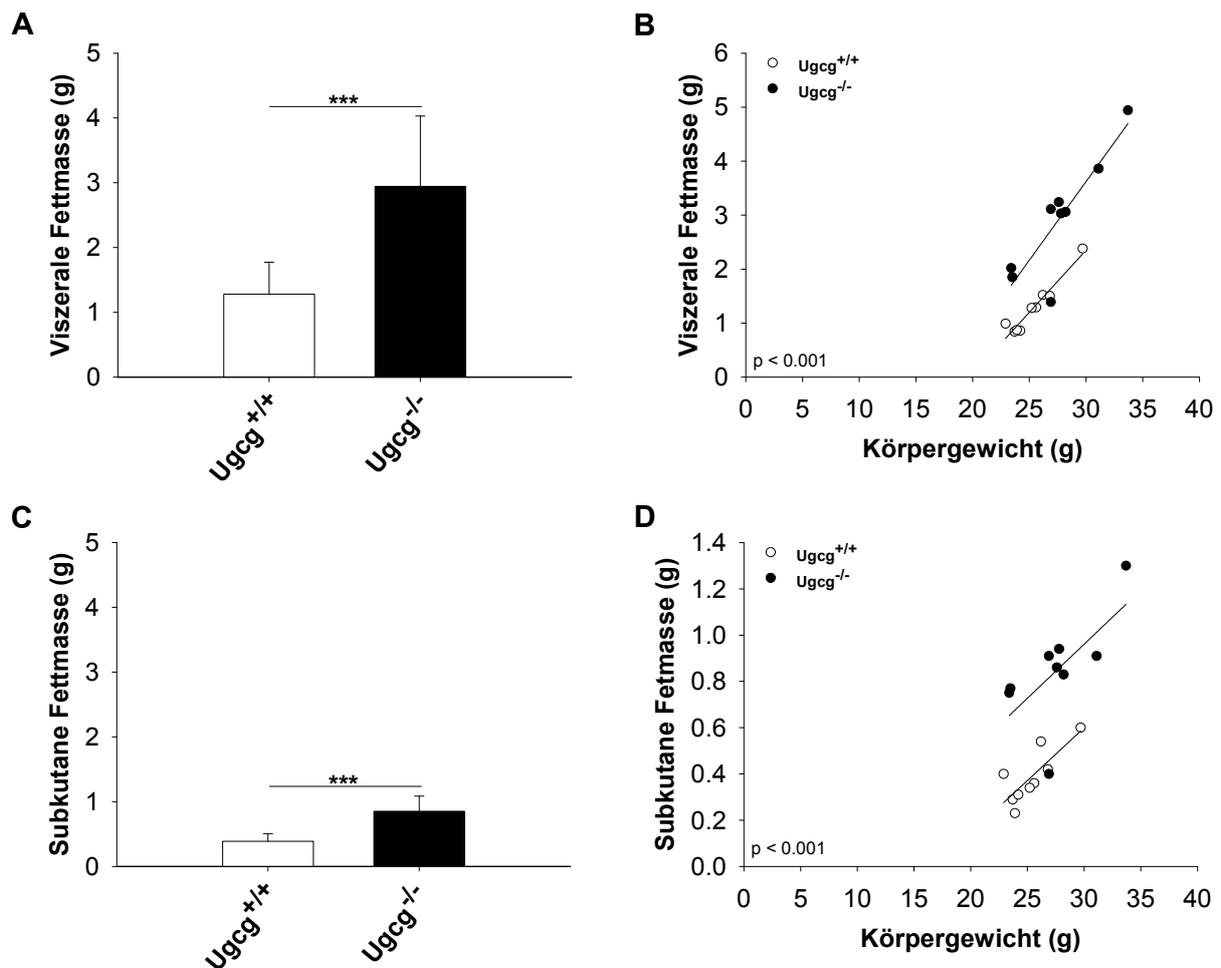
**Abb.49: Entwicklung der Fettmasse und Magermasse und nach Induktion des *Knockouts*.** Gezeigt ist der Verlauf der Fettmasse (A) und Magermasse (B) von  $Ugcg^{+/+}$  und  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen p.i.. Beginnend 21 Tage p.i. zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine deutlich stärkere Zunahme an Fettmasse als  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse, wobei die erhöhte Fettmasse im gesamten Verlauf des Experiments beibehalten wurde. In der Magermasse bestanden nur geringe Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Im zeitlichen Verlauf konnte für die Fettmasse ( $p < 0.001$ ), jedoch nicht für die Magermasse ( $p = 0.501$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen gezeigt werden. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $Ugcg^{+/+}$ :  $n = 9$ ,  $Ugcg^{-/-}$ :  $n = 9-10$ .

Um zu analysieren, ob eine genotypspezifische Verschiebung in der Körperzusammensetzung vorliegt, wurden die Fett- und Magermasse auf das Körpergewicht normalisiert. 35 Tage p.i. war bereits eine deutliche Verschiebung der Körperzusammensetzung erkennbar (Abb.50A+B). Dabei hatten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine höhere Fettmasse ( $p = 0.070$ ) und signifikant niedrigere Magermasse ( $p < 0.05$ ) als man für ihr im Vergleich zu  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen erhöhtes Gewicht erwartet. Im weiteren Verlauf des Experiments blieb die Verschiebung der Körperzusammensetzung bestehen.



**Abb.50: Fettmasse und Magermasse aufgetragen gegen das Körpergewicht.** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht normalisierte Fettmasse (A) und Magermasse (B) von Ugcg<sup>+/+</sup> und Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen 35 Tage p.i.. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fettmasse und dem Körpergewicht sowie der Magermasse und dem Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Es wurde eine genotypspezifische Verschiebung der Körperzusammensetzung gefunden, mit höherer Fettmasse und signifikant geringerer Magermasse der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse als man für ihr im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhtes Körpergewicht erwartet.

In Woche 13 p.i. wurde die Verteilung der Fettmasse in viszerales und subkutanes Fett im Abdominalbereich (Lendenwirbel 1-6) mittels Micro-Computertomographie (Micro-CT) analysiert. Zum Zeitpunkt der Analyse waren die Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse im Mittel 2.3 g schwerer als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p = 0.090$ ). Sowohl die viszerale Fettmasse, die den größten Anteil der Gesamtfettmasse ausmachte als auch die subkutane Fettmasse der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant erhöht (viszeral:  $p < 0.001$ , subkutan  $p < 0.001$ , Abb. 51A+C). Dies bestätigte auch die Normalisierung auf das Körpergewicht (viszeral:  $p < 0.001$ , subkutan:  $p < 0.001$ , Abb.51B+D, Tabelle S6).



**Abb. 51: Absolute und gegen das Körpergewicht aufgetragene viszerale und subkutane Fettmasse.** Dargestellt sind die mittels Micro-CT analysierte absolute und auf das Körpergewicht normalisierte viszerale (A, B) und subkutane (C, D) Fettmasse von  $Ugcg^{+/+}$  und  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen im Abdominalbereich 13 Wochen p.i. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen viszeraler Fettmasse und Körpergewicht ( $p < 0.001$ ) sowie subkutaner Fettmasse und Körpergewicht ( $p < 0.01$ ). Die viszerale und subkutane Fettmasse waren sowohl absolut als auch nach Normalisierung signifikant erhöht. Fettmasse der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse.  $Ugcg^{+/+}$ :  $n = 9$ ,  $Ugcg^{-/-}$ :  $n = 9$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .

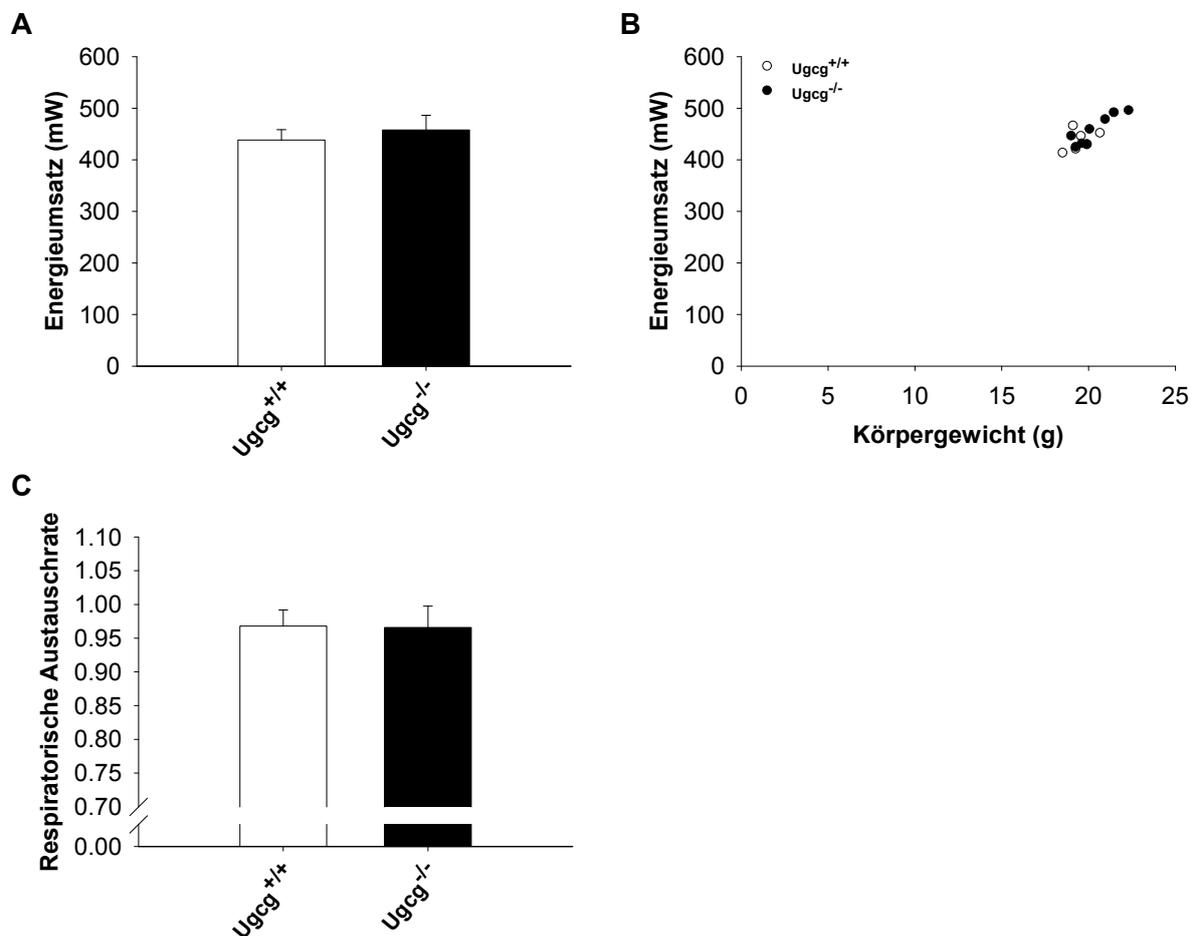
### 3.5.2 Energiehaushalt: Energieaufnahme und Energieumsatz

Die Energieaufnahme und der Energieumsatz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion bestimmt. Ein Überblick über die ermittelten Variablen zu den verschiedenen Messzeitpunkten findet sich in den Tabellen S7-S11.

#### 3.5.2.1 Energieumsatz in der 2. Woche p.i. (Tag 11-14)

In der 2. Woche p.i. waren die Mäuse phänotypisch unauffällig. Es bestand kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht ( $p = 0.154$ ), der auf das Gewicht normalisierten Körperzusammensetzung (Fettmasse:  $p = 0.146$ , Magermasse  $p = 0.524$ ) und rektalen Körpertemperatur ( $p = 0.105$ ). Auch der mittlere Energieumsatz war absolut gesehen ( $p = 0.184$ , Abb.52A) und nach Normalisierung auf das Körpergewicht ( $p = 0.764$ , Abb.52B)

zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Die mittlere respiratorische Austauschrate (RER) war ebenfalls nicht verschieden ( $p = 0.899$ , Abb.52C).

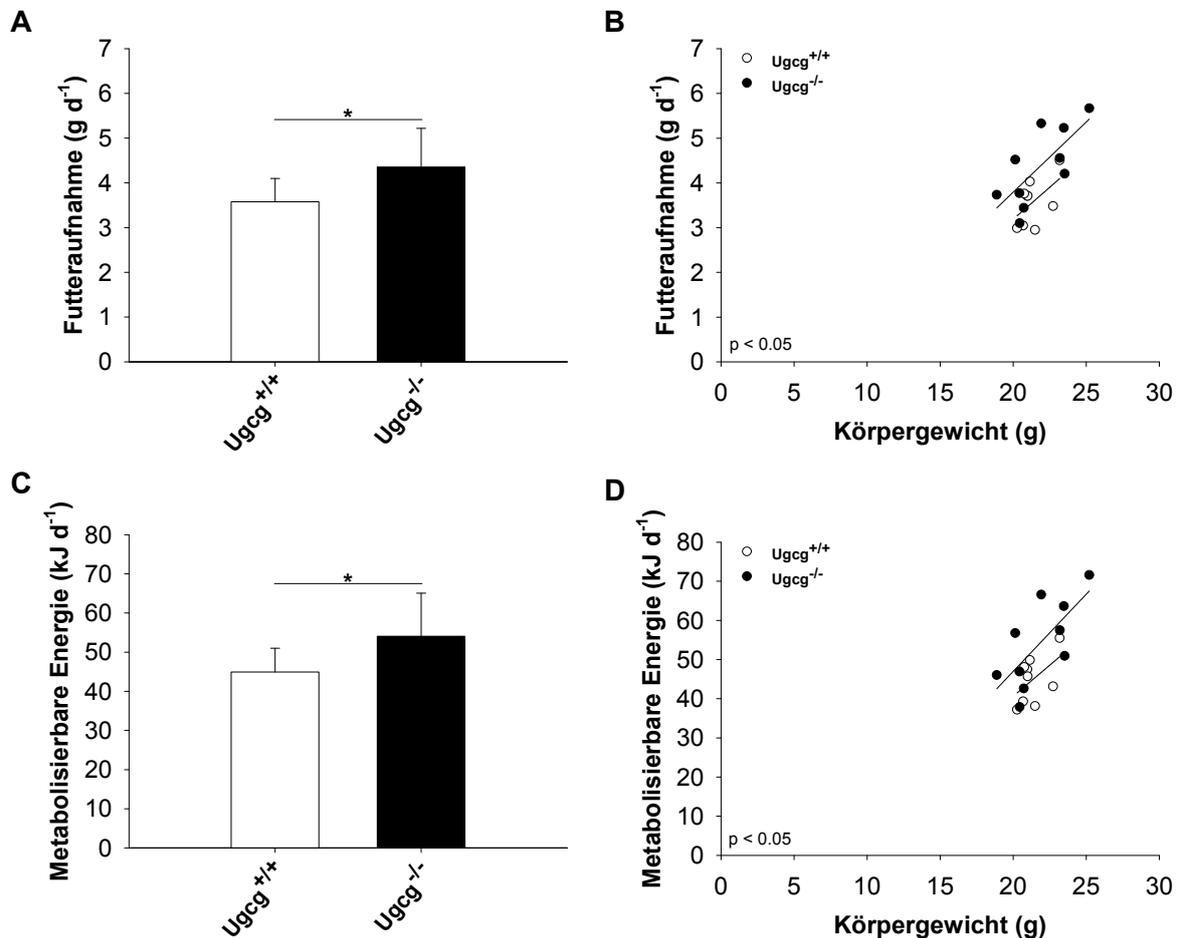


**Abb.52: Absoluter und gegen das Körpergewicht aufgetragener Energieumsatz sowie die respiratorische Austauschrate.** Dargestellt sind der absolute (A) und auf das Körpergewicht (B) normalisierte mittlere Energieumsatz sowie die mittlere respiratorische Austauschrate (C) der 21 Stunden Messung von Ugcg<sup>+/+</sup> und Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen in der 2. Woche p.i.. Weder absolut, noch nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied im Energieumsatz. Auch die respiratorische Austauschrate war nicht verschieden. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Energieumsatz und Körpergewicht ( $p < 0.01$ ). Abb. A+C: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Ugcg<sup>+/+</sup>:  $n = 6$ , Ugcg<sup>-/-</sup>:  $n = 8$ .

### 3.5.2.2 Energieaufnahme in der 3. Woche p.i. (Tag 18-22)

Die metabolisierte Energie ist die Differenz zwischen der über die Nahrung aufgenommenen und über Kot und Urin abgegebenen Energiemenge. Trotz eines vergleichbaren mittleren Körpergewichts ( $p = 0.558$ ) waren die tägliche Futtermittelaufnahme mit im Mittel  $0.8 \text{ g d}^{-1}$  ( $p < 0.05$ , Abb.53A) sowie die metabolisierbare Energie der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse mit durchschnittlich  $9.12 \text{ kJ d}^{-1}$  signifikant erhöht ( $p < 0.05$ , Abb.53C). So bestand auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht eine deutliche genotypspezifische Verschiebung mit signifikant höherer Futtermittelaufnahme ( $p < 0.05$ , Abb.53B) und metabolisierbarer Energie

( $p < 0.05$ , Abb.53D) der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse. Einhergehend mit der erhöhten Energieaufnahme zeigten  $Ugcg^{-/-}$  beginnend am Tag 21 p.i. eine im Vergleich zu  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen stärkere Körpergewichtszunahme (Kap.3.5.1, Abb.48). Die mittlere Körpertemperatur war nicht signifikant verschieden ( $p = 0.744$ ).



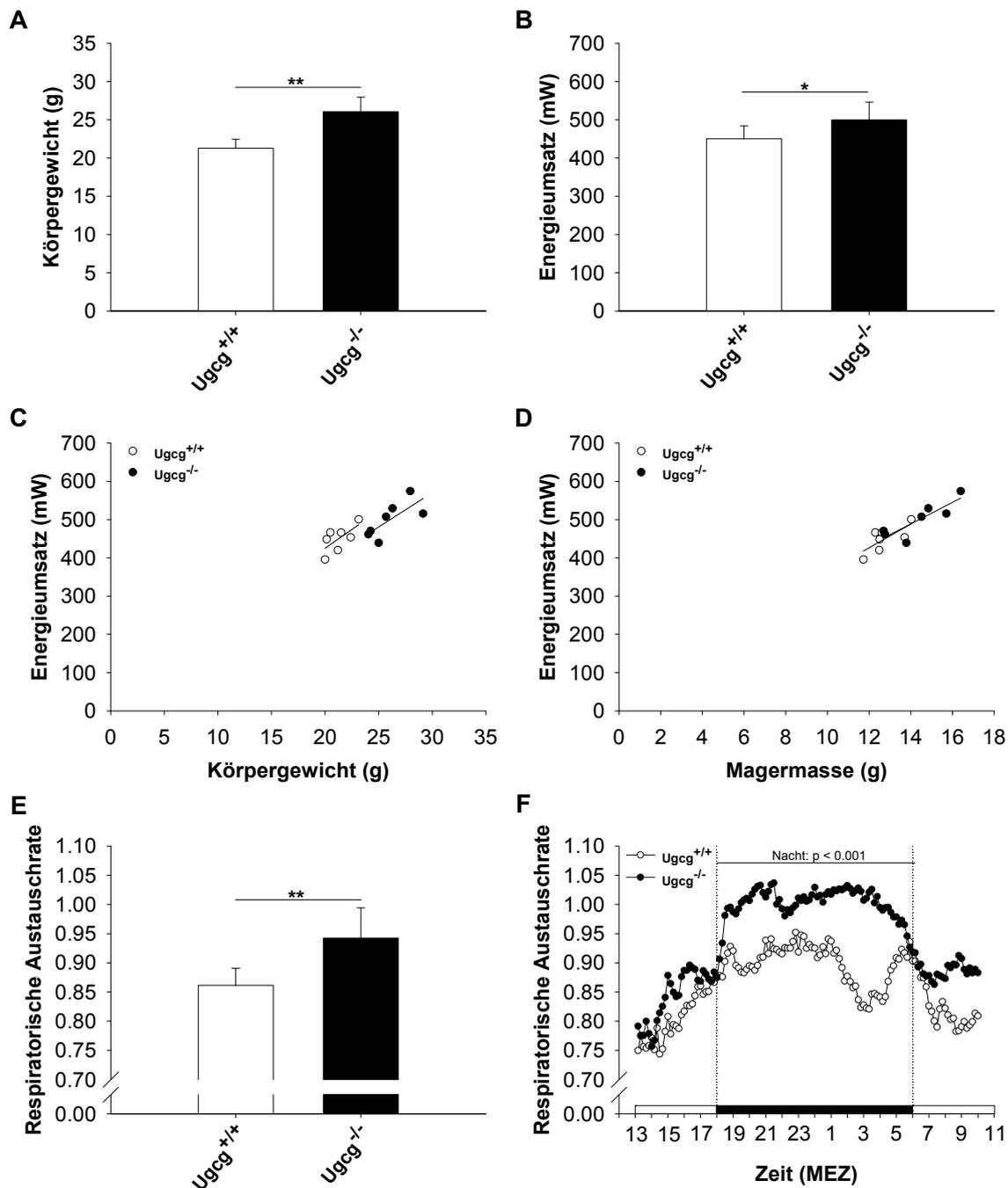
**Abb.53: Absolute und gegen das Körpergewicht aufgetragene Futteraufnahme und metabolisierbare Energie.** Dargestellt sind die absolute (A) und auf das Körpergewicht normalisierte (B) tägliche Futteraufnahme sowie die absolute (C) und auf das Körpergewicht normalisierte (D) metabolisierbare Energie von  $Ugcg^{+/+}$  und  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen in der 3. Woche p.i.. Futteraufnahme und metabolisierbare Energie der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse waren sowohl absolut als auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht signifikant erhöht. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen Futteraufnahme und Körpergewicht ( $p < 0.01$ ) sowie metabolisierbarer Energie und Körpergewicht ( $p < 0.01$ ). Abb.A+C: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $Ugcg^{+/+}$ :  $n = 9$ ,  $Ugcg^{-/-}$ :  $n = 10$ . \*  $p < 0.05$ .

### 3.5.2.3 Energieumsatz in der 5. Woche p.i. (Tag 34-36)

$Ugcg^{-/-}$  Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 4.8 g schwerer ( $p < 0.01$ , Abb.54A). Dies war auf eine deutlich erhöhte Fettmasse ( $p < 0.001$ ) und leicht erhöhte Magermasse ( $p < 0.05$ ) gegenüber den  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen zurückzuführen. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht blieb die Verschiebung der Körperzusammensetzung

mit signifikant erhöhter Fettmasse ( $p < 0.001$ ) bestehen, die Magermasse war jedoch signifikant niedriger ( $p < 0.05$ , Abb.S15).

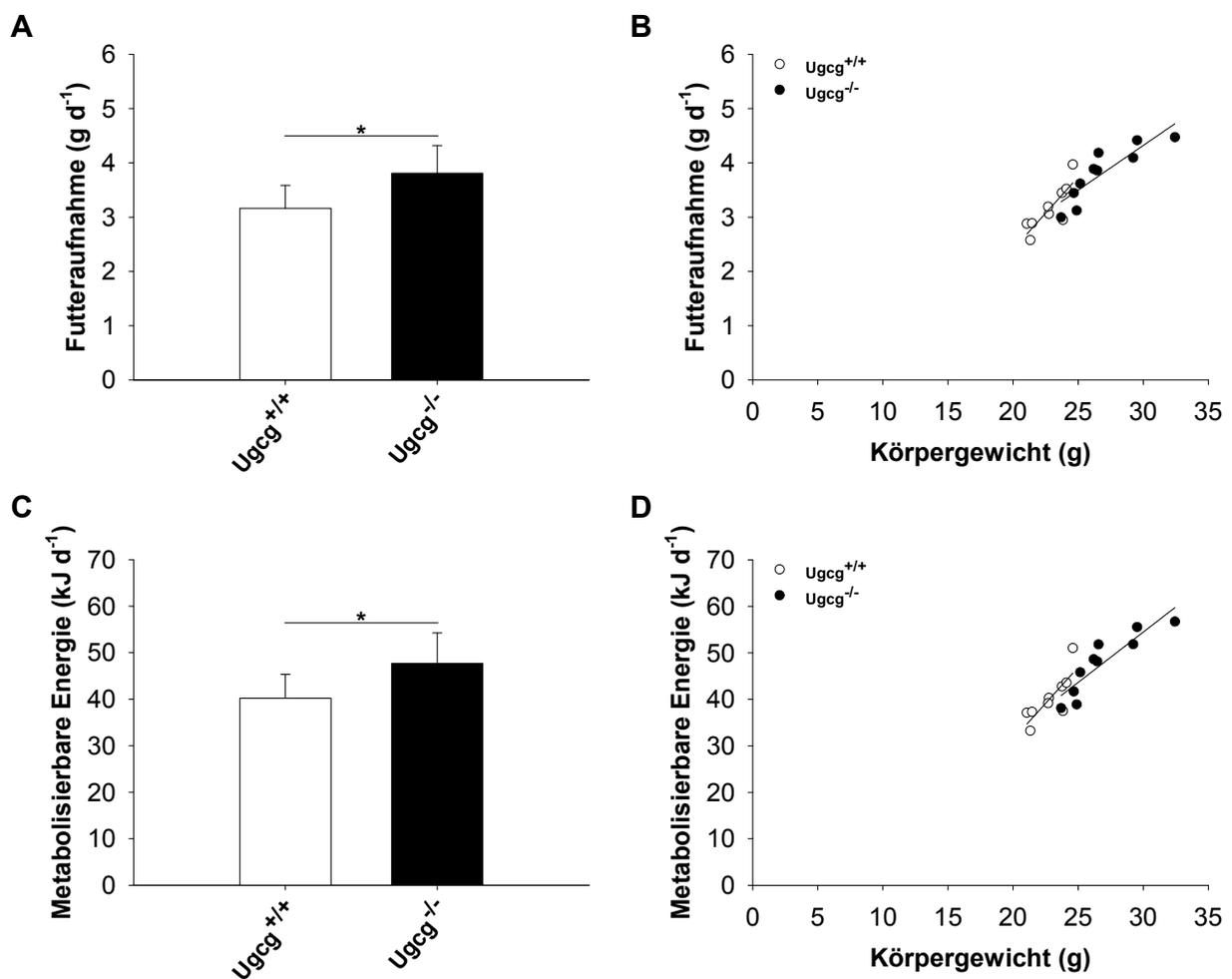
Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse hatten einen signifikant höheren Energieumsatz ( $p < 0.05$ , Abb.54B). Nach Normalisierung war er jedoch tendenziell niedriger als man für ihr erhöhtes Körpergewicht erwartet, auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant war ( $p = 0.231$ , Abb.54C). Bei Normalisierung auf die Magermasse bestand kein Unterschied ( $p = 0.869$ , Abb.54D). Ob Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse einen niedrigeren Energieumsatz hatten und dieser zu dem gezeigten Körpergewichtsphänotyp beigetragen hat wird später diskutiert (Kap.4.7.2). Weitere phänotypische Auffälligkeiten der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse waren die um durchschnittlich 0.95 °C niedrigere Körpertemperatur ( $p < 0.01$ ) sowie die signifikant erhöhte mittlere respiratorische Austauschrate ( $p < 0.01$ , Abb.54E). Der zeitliche Verlauf zeigt, dass die RER während der gesamten Messung erhöht war (Abb.54F). Ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied bestand jedoch aufgrund der hohen Variabilität nur in der Dunkelphase ( $p < 0.001$ ), mit deren Beginn Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse einen deutlich stärkeren Anstieg zeigten. Dabei lag die RER in der Dunkelphase fast durchgängig über 1.0.



**Abb.54: Körpergewicht, absoluter und gegen das Körpergewicht sowie Magermasse aufgetragener Energieumsatz und die respiratorische Austauschrate.** Dargestellt sind das Körpergewicht (A), der absolute mittlere Energieumsatz (B), der auf das Körpergewicht (C) sowie die Magermasse (D) normalisierte mittlere Energieumsatz, die mittlere Respiratorische Austauschrate (E) und der Verlauf der respiratorischen Austauschrate (F) während der 21 Stunden Messung von *Ugcg*<sup>+/+</sup> und *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäusen in der 5. Woche p.i.. *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant schwerer und hatten absolut gesehen einen signifikant höheren Energieumsatz als *Ugcg*<sup>+/+</sup> Mäuse. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht zeigten *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse einen tendenziell niedrigeren Energieumsatz als man für ihr erhöhtes Gewicht erwartet. Dieser Unterschied bestand nach Normalisierung für die Magermasse nicht mehr. Der Zusammenhang zwischen Energieumsatz und dem Körpergewicht ( $p < 0.01$ ) sowie dem Energieumsatz und der Magermasse ( $p < 0.001$ ) war signifikant. Die mittlere RER der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse war im Vergleich zu den *Ugcg*<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant erhöht. Der Verlauf zeigt, dass die mittlere RER der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl in den Lichtphasen als auch in der Dunkelphase erhöht war, wobei der größte genotypspezifische Unterschied in der Dunkelphase bestand. Abb.F: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Abb.A+B+E: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, *Ugcg*<sup>+/+</sup>: n = 6, *Ugcg*<sup>-/-</sup>: n = 7. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### 3.5.2.4 Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i. (Tag 39-47)

Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse waren im Mittel 4.1 g schwerer ( $p < 0.001$ ), mit einer durchschnittlich 1.15 °C niedrigeren Körpertemperatur ( $p < 0.001$ ). Absolut gesehen war die Futtermittelaufnahme der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse, genau wie in der 3. Woche p.i., mit um im Mittel 0.6 g d<sup>-1</sup> signifikant erhöht ( $p < 0.01$ , Abb.55A). Zudem metabolisierten sie durchschnittlich 7.5 kJ d<sup>-1</sup> mehr Energie als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0.05$ , Abb.55C). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht waren die Futtermittelaufnahme ( $p = 0.598$ , Abb.55B) und der Betrag der metabolisierbaren Energie ( $p = 0.367$ , Abb.55D) der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse im Gegensatz zur 3. Woche p.i. proportional zum erhöhten Körpergewicht.

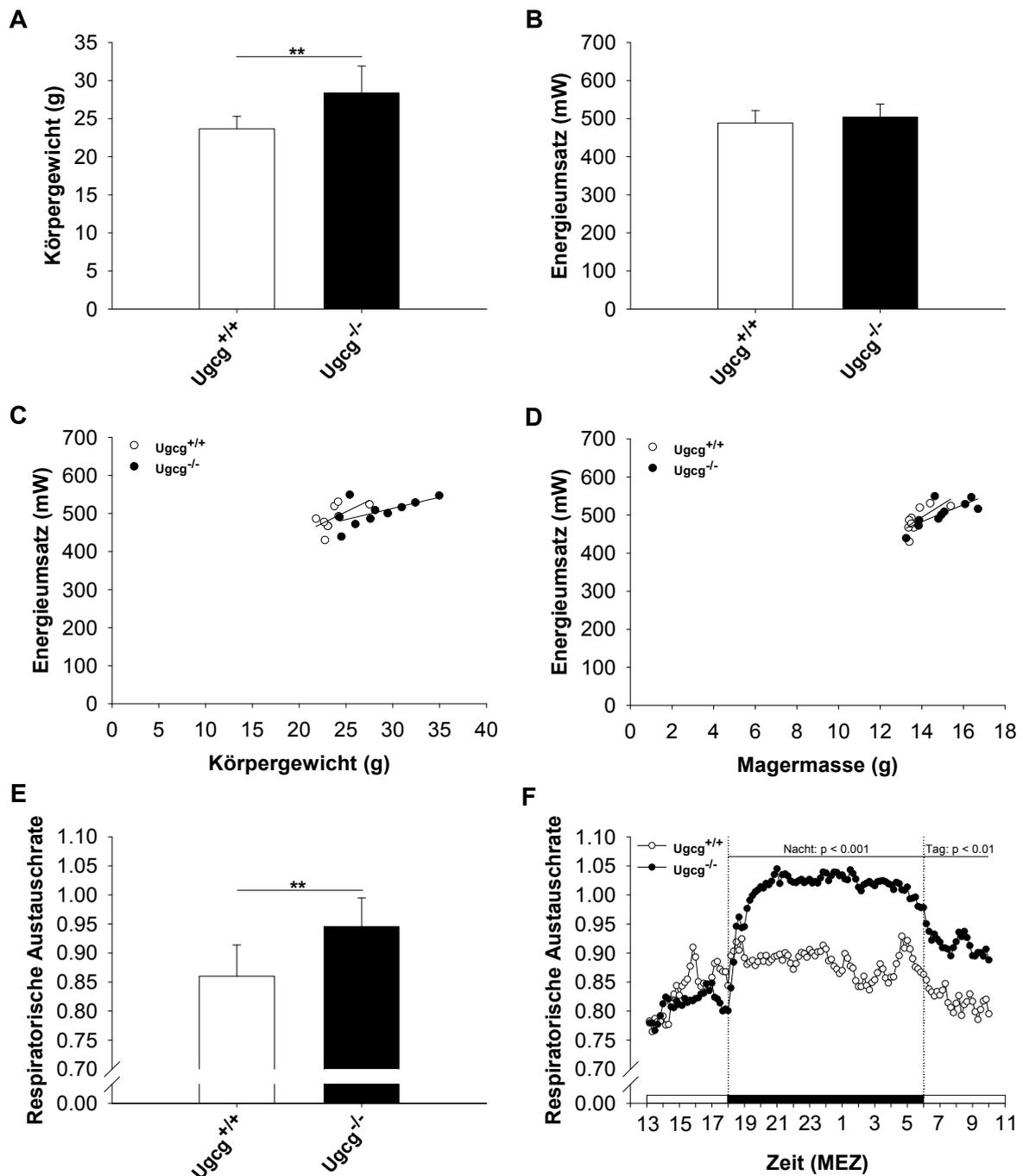


**Abb.55: Absolute und gegen das Körpergewicht aufgetragene Futtermittelaufnahme und metabolisierbare Energie.** Dargestellt sind die absolute (A) und auf das Körpergewicht normalisierte (B) tägliche Futtermittelaufnahme sowie die absolute (C) und auf das Körpergewicht normalisierte (D) metabolisierbare Energie von Ugcg<sup>+/+</sup> und Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen in der 6.-7. Woche p.i.. Absolut gesehen waren die Futtermittelaufnahme und metabolisierbare Energie der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant erhöht. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand kein genotypspezifischer Unterschied in der Futtermittelaufnahme und metabolisierbaren Energie. Der Zusammenhang zwischen Futtermittelaufnahme und Körpergewicht ( $p < 0.001$ ) sowie metabolisierbarer Energie und Körpergewicht ( $p < 0.001$ ) war signifikant. Abb.A+C: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, Ugcg<sup>+/+</sup>: n = 9, Ugcg<sup>-/-</sup>: n = 10.

### 3.5.2.5 Energieumsatz in der 9. Woche p.i. (Tag 63-66)

Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse wogen im Mittel 4.7 g mehr als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0.01$ , Abb.56A), mit einer signifikant erhöhten Fettmasse ( $p < 0.001$ ) und Magermasse ( $p < 0.05$ ). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht bestand noch immer ein Trend zu einer höheren Fettmasse ( $p = 0.352$ ) und niedrigeren Magermasse ( $p = 0.115$ ), auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren (Abb.S16).

Der mittlere Energieumsatz beider Genotypen war vergleichbar ( $p = 0.322$ , Abb.56B). Nach Normalisierung hatten Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse einen tendenziell niedrigeren Energieumsatz ( $p = 0.348$ , Abb.56C). Wie in Woche 5 p.i. war dieser Trend nach Normalisierung für die Magermasse nicht mehr erkennbar ( $p = 0.342$ , Abb.56D). Die Körpertemperatur der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse war um durchschnittlich 0.62 °C niedriger ( $p < 0.05$ ). Die mittlere respiratorische Austauschrate der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse war erneut signifikant erhöht ( $p < 0.01$ , Abb.56E), was auf eine erhöhte RER in der Dunkelphase ( $p < 0.001$ ) sowie der folgenden Lichtphase ( $p < 0.01$ ) zurückzuführen war (Abb.56F). In der ersten Lichtphase war sie leicht, jedoch nicht signifikant niedriger ( $p = 0.191$ ). Genau wie bei der Analyse in der 5. Woche p.i. zeigten Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse mit Beginn der Dunkelphase einen charakteristischen Anstieg der RER über 1.0, wobei diese in dem Zeitraum mit um im Mittel 0.13 deutlich höher war als die RER der Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse.



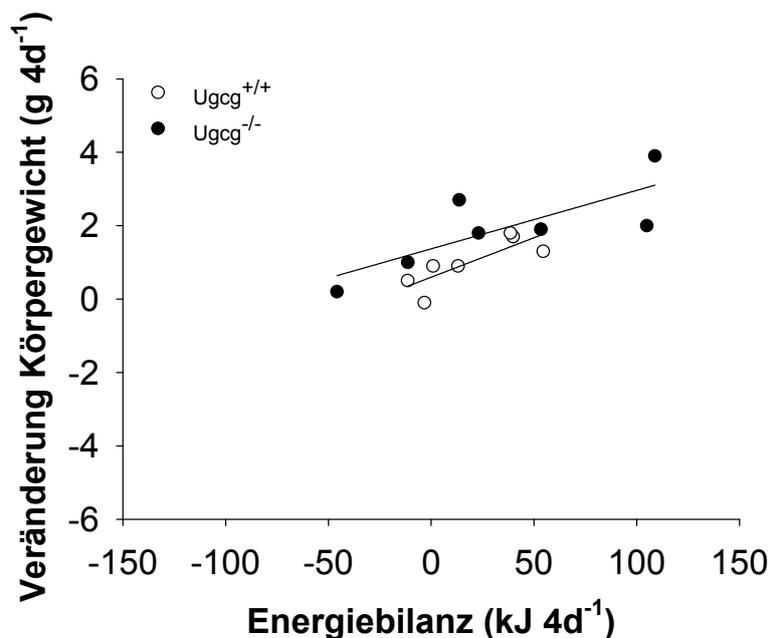
**Abb.56: Körpergewicht, absoluter und gegen das Körpergewicht sowie Magermasse aufgetragener Energieumsatz und die respiratorische Austauschrate.** Dargestellt sind das Körpergewicht (A), der absolute mittlere Energieumsatz (B), der auf das Körpergewicht (C) und die Magermasse (D) normalisierte mittlere Energieumsatz sowie die mittlere respiratorische Austauschrate (E) und der Verlauf der respiratorischen Austauschrate (F) der 21 Stunden Messung von *Ugcg*<sup>+/+</sup> und *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäusen in der 9. Woche p.i.i. *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse waren signifikant schwerer. Der absolute Energieumsatz war zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht hatten *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse einen tendenziell niedrigeren Energieumsatz als man für ihr erhöhtes Körpergewicht erwartet. Nach Normalisierung auf die Magermasse bestand dieser Unterschied nicht mehr. Der Zusammenhang zwischen Energieumsatz und dem Körpergewicht ( $p < 0.05$ ) sowie dem Energieumsatz und der Magermasse ( $p < 0.001$ ) war signifikant. *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse hatten eine signifikant erhöhte mittlere respiratorische Austauschrate. Der Verlauf zeigt, dass die respiratorische Austauschrate der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl in der Dunkelphase als auch in der folgenden Lichtphase deutlich erhöht war. Abb.F: Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet. Abb. A+C+E: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, *Ugcg*<sup>+/+</sup>:  $n = 9$ , *Ugcg*<sup>-/-</sup>:  $n = 10$ .\*\*  $p < 0.01$ .

### 3.5.2.6 Bestimmung des kalorischen Beitrags, der zur Gewichtszunahme geführt hat

Die MML Ugcg ist aufgrund der Induzierbarkeit des *Knockouts* und des beschriebenen Phänotyps über die Analyse des Energiebudgets ein gutes Modell zur Untersuchung der Imbalance in der Energieregulation, die in der starken Gewichtszunahme resultierte. Dabei kann der Energieüberschuss annäherungsweise anhand der Energieaufnahme in der 3. Woche p.i. und den Energieausgaben in der 5. Woche p.i. abgeschätzt werden. Während der Analyse der Energieaufnahme (Tag 18-22 p.i.) nahmen Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $1.9 \pm 1.2 \text{ g } 4\text{d}^{-1}$  mehr Gewicht zu als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse mit durchschnittlich  $1.0 \pm 0.7 \text{ g } 4\text{d}^{-1}$  ( $p = 0.095$ ). Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse befanden sich in diesem Zeitraum in einer positiven Energiebilanz, mit einem Energieüberschuss von  $35.22 \pm 57.66 \text{ kJ } 4\text{d}^{-1}$ , während dieser bei den Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen mit  $18.86 \pm 25.37 \text{ kJ } 4\text{d}^{-1}$  deutlich niedriger war ( $p = 0.505$ ). Auf Tagesbasis führte somit ein täglicher Energieüberschuss von  $4.09 \text{ kJ } \text{d}^{-1}$  im Vergleich zu den Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen zu der um  $0.9 \text{ g}$  stärkeren Gewichtszunahme der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse in den 4 Versuchstagen (Tag 18-22 p.i.). Dass kein signifikanter genotypspezifischer Unterschied bestand, kann auf die hohe Standardabweichung zurückgeführt werden. Trägt man die Veränderung des Körpergewichts in den 4 Tagen gegen die so geschätzte Energiebilanz auf, bestand über beide Genotypen betrachtet ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Variablen ( $p < 0.001$ ), mit einer biologisch relevanten Korrelation ( $r^2 = 0.592$ , Abb.57). Demnach befanden sich Mäuse mit einer stärkeren Gewichtszunahme in einer positiveren Energiebilanz, als Mäuse mit einer geringeren Gewichtszunahme, wobei hier der Energieüberschuss 59 % der Körpergewichtsveränderung erklärt. Bestätigt wird die Plausibilität des Modells auch dadurch, dass Mäuse, die keinen Energieüberschuss zeigten, ebenfalls keine größere Veränderung des Körpergewichts aufwiesen. Tendenziell konnte ein genotypspezifischer Unterschied gezeigt werden ( $p = 0.082$ ). Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine stärkere Änderung des Körpergewichts als man es für ihre Energiebilanz erwartet. In Tab.S12 findet sich eine Zusammenstellung der Werte.

Die Energiebilanz wurde ebenfalls aus der Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i. und den Energieausgaben in der 9. Woche p.i. kalkuliert. Zwar konnte auch hier ein signifikanter Zusammenhang beider Variablen gezeigt werden ( $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.243$ ), bei Betrachtung der graphischen Darstellung des linearen Regressionsmodells ist jedoch ersichtlich, dass Mäuse, die sich in einer negativen Energiebilanz befanden, nicht wie zu erwarten eine Abnahme im Körpergewicht zeigten, sondern keine Veränderung bis hin zur Gewichtszunahme (Abb.S17). Der Grund für die fehlende Plausibilität könnte sein, dass erneut 2-3 Wochen zwischen der Bestimmung von Energieaufnahme und Energieausgaben lagen. Zudem zeigten Mäuse in dem Zeitraum der Bestimmung der Energieaufnahme, die über 8 Tage erfolgte, nur eine geringe Gewichtszunahme mit starker Streuung

(Ugcg<sup>+/+</sup>:  $1.2 \pm 0.85 \text{ g } 8\text{d}^{-1}$ , Ugcg<sup>-/-</sup>:  $1.1 \pm 0.71 \text{ g } 8\text{d}^{-1}$ ). Auch die Standardabweichung der Energiebilanz war sehr hoch (Ugcg<sup>+/+</sup>:  $-13.8 \pm 28.19 \text{ g } 8\text{d}^{-1}$ , Ugcg<sup>-/-</sup>:  $36.0 \pm 44.41 \text{ g } 8\text{d}^{-1}$ ). Dabei wird noch einmal ersichtlich, dass sich insbesondere die Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse trotz Gewichtszunahme anhand der Kalkulation im Mittel in einer negativen Energiebilanz befanden.

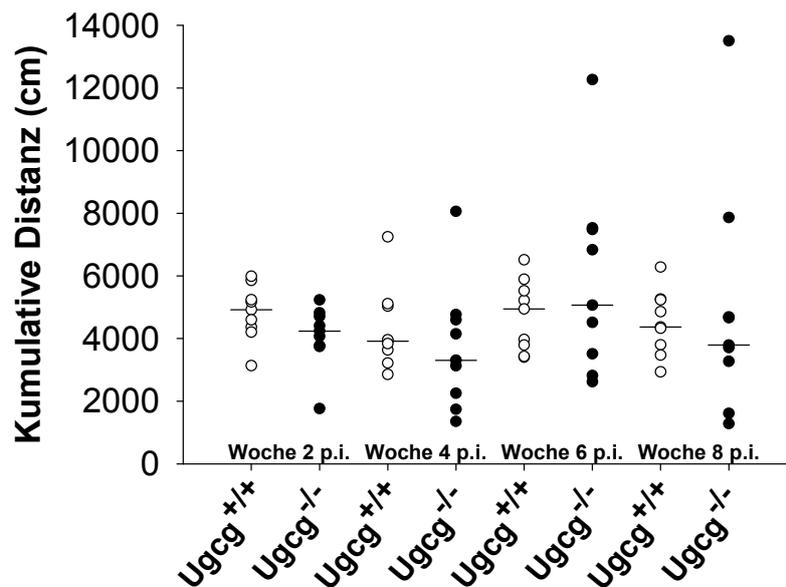


**Abb.57: Körpergewichtsveränderung aufgetragen gegen die kalkulierte Energiebilanz.** Dargestellt ist die Veränderung des Körpergewichts in einem Zeitraum von 4 Tagen, aufgetragen gegen die geschätzte Energiebilanz im entsprechenden Zeitraum. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Variablen ( $p < 0.001$ ). Unabhängig vom Genotyp zeigten Mäuse mit positiverer Energiebilanz eine stärkere Körpergewichtszunahme. Ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied bestand nicht, jedoch eine leichte Tendenz zu einer stärkeren Körpergewichtsveränderung der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse als man für ihre Energiebilanz erwartet.

### 3.5.3 Lokomotorische Aktivität

Die spontane lokomotorische Aktivität der Mäuse wurde 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Induktion des *Knockouts* in einem Zeitintervall von jeweils 60 min als kumulative Aktivität (cm) bestimmt.

Die mittlere lokomotorische Aktivität der Mäuse ist in Abb.58 dargestellt. Zu keinem der analysierten Zeitpunkte bestand ein signifikanter genotypspezifischer Unterschied (2. Woche p.i.: Ugcg<sup>+/+</sup>: 4916 cm, Ugcg<sup>-/-</sup>: 4239 cm,  $p = 0.112$ ; 4. Woche p.i.: Ugcg<sup>+/+</sup>: 3917 cm, Ugcg<sup>-/-</sup>: 3304 cm,  $p = 0.377$ ; 6. Woche p.i.: Ugcg<sup>+/+</sup>: 4946 cm, Ugcg<sup>-/-</sup>: 5069 cm,  $p = 0.596$ ; 8. Woche p.i.: Ugcg<sup>+/+</sup>: 4368 cm, Ugcg<sup>-/-</sup>: 3793 cm,  $p = 0.536$ ). Auffällig ist jedoch die größere Variabilität innerhalb der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse, insbesondere in der 4.-8. Woche p.i.



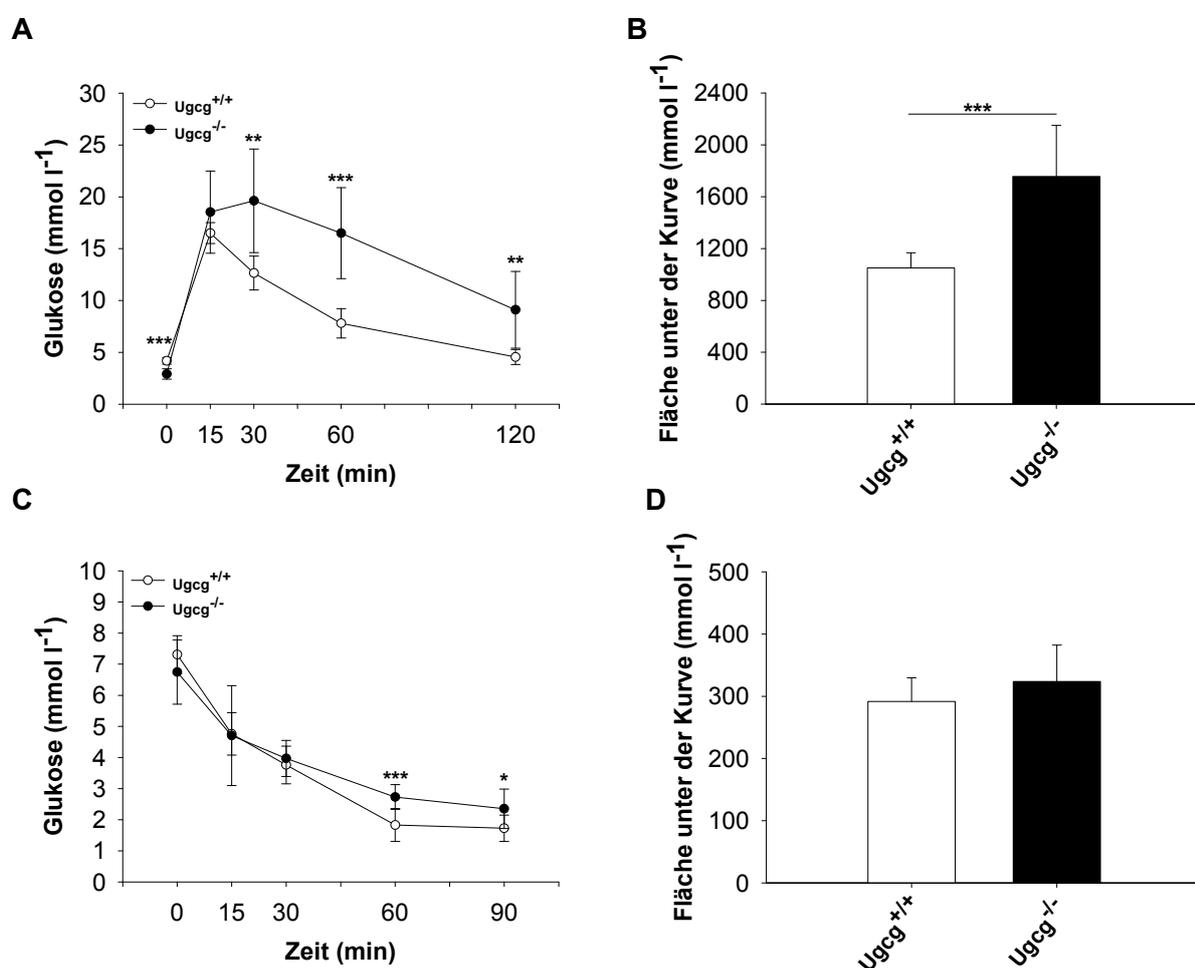
**Abb.58: Lokomotorische Aktivität der Mäuse.** Dargestellt ist die kumulative Distanz der Mäuse in der 2., 4., 6. und 8. Woche p.i. innerhalb von jeweils 60 Minuten. Zu keinem der analysierten Zeitpunkte bestand ein signifikanter Unterschied in der Aktivität. Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten in Bezug auf die Aktivität jedoch eine hohe Variabilität. Median und Einzelwerte.

### 3.5.4 Glukose- und Insulintoleranz

Zur Überprüfung des Glukosemetabolismus wurde 12 Wochen p.i. ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durch Verabreichung einer auf das Körpergewicht abgestimmten Glukosemenge durchgeführt. Nach 15-stündigem Futterentzug (17:00-8:00 MEZ) waren Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse im Mittel 3.8 g schwerer als Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse ( $p < 0.01$ ). Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse hatten einen signifikant niedrigeren basalen Blutglukosespiegel ( $p < 0.001$ , Abb.59A). Nach Injektion der Glukoselösung zeigten beide Genotypen in den ersten 15 min einen deutlichen Anstieg des Blutglukosespiegels, der bei den Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen höher war. Der Blutglukosespiegel war 15 min nach Injektion jedoch nicht signifikant verschieden ( $p = 0.508$ ). Während Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse den höchsten Blutglukosespiegel nach 15 min erreichten wurde und es im weiteren Verlauf zu einer kontinuierlichen Absenkung kam, stieg der Blutglukosespiegel der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse bis 30 min nach der Injektion weiter an, wodurch er zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant erhöht war ( $p < 0.01$ ). Auch 60 min und 120 min nach Injektion lag der Blutglukosespiegel der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant über dem der Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse (60 min:  $p < 0.001$ , 120 min  $p < 0.01$ ). Das die Fläche unter der Kurve (AUC) bei den Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant erhöht war ( $p < 0.001$ , Abb.59B) verdeutlicht die beeinträchtigte Glukoseverwertung (siehe auch Tab.S13).

Aufgrund der beeinträchtigten Glukoseverwertung wurde mit einer weiteren Kohorte Mäuse in der 10. Woche p.i. ein intraperitonealer Insulintoleranztest durch Verabreichung einer definierten Insulindosis durchgeführt, um die Insulinsensitivität zu überprüfen. Nach dem 4-

stündigem Futterentzug (9:30-1:30 MEZ) waren  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse im Mittel 3.7 g schwerer als  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse ( $p < 0.01$ ).  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse hatten einen gering niedrigeren basalen Blutglukosespiegel ( $p = 0.179$ , Abb.59C). Nach Injektion des Insulins zeigten beide Genotypen eine Abnahme des Blutglukosespiegels. 15 min und 30 min nach Injektion hatten beide Genotypen einen vergleichbaren Blutglukosespiegel (15 min:  $p = 0.156$ , 30 min:  $p = 0.561$ ). 60 min und 90 min nach Injektion lag der Blutglukosespiegel der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse aufgrund einer geringeren Abnahme signifikant über dem der  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse (60 min:  $p < 0.001$ , 90 min:  $p < 0.05$ ). Die AUC war bei den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen tendenziell erhöht ( $p = 0.158$ , Abb.59D, siehe auch Tab. S14).



**Abb.59: Glukose- und Insulintoleranztest.** Dargestellt sind der Verlauf des Blutglukosespiegels im Glukosetoleranztest (A) und die resultierende Fläche unter der Kurve (B) sowie der Verlauf des Blutglukosespiegels im Insulintoleranztest (C) und die resultierende Fläche unter der Kurve (D). Im Glukosetoleranztest zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine im Vergleich zu  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen verlangsamte Abnahme der Blutglukose, wodurch die Fläche unter der Kurve signifikant erhöht war. Auch im Insulintoleranztest war die Absenkung des Blutglukosespiegels bei den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen geringer, mit tendenziell erhöhter Fläche unter der Kurve. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $Ugcg^{+/+}$ : n = 9,  $Ugcg^{-/-}$ : n = 8-9. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.5.5. Zusammenfassung

3 Wochen p.i. zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine im Vergleich zu  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen stärkere Gewichtszunahme, die auf einer deutlichen Zunahme an Fettmasse basierte. Die Körperzusammensetzung war deutlich verschoben, mit erhöhter Fettmasse und niedrigerer Magermasse der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse, wobei sowohl die viszerale als auch die subkutane Fettmasse erhöht war. Die Gewichtszunahme resultierte maßgeblich aus der Hyperphagie und damit einhergehenden erhöhten metabolisierbaren Energie der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse in der 3. Woche p.i., während die Energieausgaben in der 5. Woche p.i. nur gering verschieden waren: Nach Normalisierung auf das Körpergewicht zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse einen leicht niedrigeren Energieumsatz. Dieser Befund konnte nach Normalisierung für die Magermasse jedoch nicht gestützt werden. Dennoch befanden sich die Mäuse zum Zeitpunkt der Gewichtszunahme in einer positiven Energiebilanz. Eine Absenkung der Körpertemperatur wurde 5 Wochen p.i. gefunden, wodurch eine zeitliche Dissoziation zu der Gewichtszunahme bestand. Die Gewichtszunahme entwickelte sich somit unabhängig von der Körpertemperatursenkung. Nach der starken Gewichtszunahme von der 3. bis zur 5. Woche p.i. konnten im weiteren Verlauf nur geringe Änderungen im Körpergewicht gezeigt werden. Entsprechend waren die normalisierte Futteraufnahme und metabolisierbare Energie zwischen beiden Genotypen in der 6. Woche p.i. vergleichbar, während der auf das Körpergewicht normalisierte Energieumsatz 9 Wochen p.i., wie schon 5 Wochen p.i., lediglich nach Normalisierung auf das Körpergewicht, jedoch nicht für die Magermasse tendenziell niedriger war. Ein Unterschied in der spontanen lokomotorischen Aktivität der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse, als Variable der Energieausgaben, konnte nicht gezeigt werden. Eine weitere metabolische Auffälligkeit der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse war die, insbesondere in der Dunkelphase, deutlich erhöhte RER in der 5. und 9. Woche p.i., die eine Verschiebung der Substratnutzung zeigt. Zudem hatten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine beeinträchtigte Glukosetoleranz sowie eine leicht verringerte Insulinsensitivität. Die Fütterung einer hochkalorischen Diät führte bei den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen zu einer nochmaligen Steigerung der Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolldiät.

## 4 Diskussion

Zunächst werden die Variablen Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz der primären Phänotypisierung diskutiert. Dabei soll einerseits bewertet werden, ob der im Rahmen der Promotion etablierte Primärscreen zur Identifizierung von metabolischen Phänotypen im Hochdurchsatz geeignet ist. Für eine weiterführende Analyse werden der Einfluss der Körpertemperatur unter Standardhaltungsbedingungen auf das Körpergewicht und den Energieumsatz sowie der Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Energieumsatz besprochen.

Die weiteren Teile der Diskussion befassen sich mit den Befunden der Mausmutantenlinien (MML) *Mct8*, *Hdac2* und *Ugcg*, die eine dysfunktionale Körpergewichts- und / oder Körpertemperaturregulation aufwiesen. Die metabolische Phänotypisierung erfolgte in auf die jeweilige MML abgestimmten Versuchen unter Standard- und / oder *Challenge*-Bedingungen, wobei der Einfluss der Gendeletion auf die analysierten metabolischen Parameter besprochen wird.

Es wird besprochen, welchen Beitrag die Körpertemperatur an der Energiehomöostase hat und ob ein direkter Einfluss auf das Körpergewicht besteht, da eine niedrigere Körpertemperatur und die damit verbundene potentielle Energieeinsparung im Zusammenhang mit der Entstehung von Adipositas diskutiert wird.

### 4.1 Identifizierte Phänotypen im Primärscreen

#### 4.1.1 Das Körpergewicht

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es deutlich mehr MML gibt in denen die Mutanten ein im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeres Körpergewicht haben. Bei den Männchen waren die Mutanten in 37.7 % der MML signifikant leichter, bei den Weibchen waren es 16.9 %. Im Gegensatz dazu waren die Mutanten bei beiden Geschlechtern in lediglich rund 5-7 % der MML signifikant schwerer. Dieser Befund wurde auch von Reed et al. beschrieben, die Körpergewichtsdaten von 1977 *Knockout*linien analysierten, um eine Einschätzung über die Anzahl der Gene zu erhalten, die an der Regulation des Körpergewicht beteiligt sind (Reed et al. 2008a). Auch sie fanden mit 31 % deutlich mehr MML mit niedrigerem Körpergewicht der Mutanten, während die Anzahl der MML mit übergewichtigen Mutanten lediglich 3 % betrug. Nach Übertragung auf das gesamte Mausgenom könnten so schätzungsweise bis zu 6000 Gene einen Einfluss auf das Körpergewicht haben (Reed et al. 2008a). In der vorliegenden Arbeit wurden bei den Männchen deutlich mehr MML mit signifikant niedrigerem Körpergewicht der Mutanten

identifiziert als bei den Weibchen. In der Publikation von Reed et al. wurde keine Aussage über die Verteilung der Geschlechter getroffen. Obwohl die Analyse in der vorliegenden Arbeit nicht ausschließlich auf Mäuse mit einem *Knockout* beschränkt war, sondern u.a. auch N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU) generierte MML mit in die Analyse einbezogen wurden, sind die Befunde vergleichbar. Die genaue Auswirkung der identifizierten Gene auf den Organismus, bzw. den Energiehaushalt muss in weiterführenden Versuchen detailliert analysiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle identifizierten Gene einen direkten Einfluss auf stoffwechselphysiologische Signalwege haben, die das Körpergewicht regulieren. Vielmehr scheinen durch die Mutation auch Signalwege betroffen zu sein, die nicht primär mit der Regulation des Körpergewichts in Verbindung stehen und dieses sekundär beeinflussen. So könnten Mutationen z.B. eine Auswirkung auf Komponenten der Energiehomöostase, wie die Körpertemperatur oder Aktivität, haben und so sekundär zu einem veränderten Körpergewicht beitragen.

#### **4.1.2 Die Körpertemperatur**

Bei beiden Geschlechtern wurden MML identifiziert, in denen die Mutanten eine im Vergleich zu den Kontrollen veränderte Körpertemperatur aufwiesen. Dabei lag der prozentuale Anteil der MML mit höherer Körpertemperatur mit 12.3 % bei den Männchen und 8.6 % bei den Weibchen über dem der MML mit niedrigerer Körpertemperatur (Männchen: 1.7 %, Weibchen: 5.2 %). Der Unterschied in der Anzahl von MML mit erhöhter und niedrigerer Körpertemperatur war bei den Männchen größer. Die punktuelle Messung der Körpertemperatur ist demnach eine geeignete Methode zur Detektion von Genen, die einen Einfluss auf die Körpertemperatur haben. Folgt man der Argumentation von Reed et al. (2008a) scheint es im Vergleich zum Körpergewicht deutlich weniger Gene zu geben, die einen Einfluss auf die Körpertemperatur haben: In rund 14 % der analysierten MML wurde eine veränderte Körpertemperatur gefunden, anhand derer nach einer Überschlagskalkulation rund 2470 Gene betroffen sein könnten. Genau wie für das Körpergewicht kann davon ausgegangen werden, dass nicht alle Gene einen primären Einfluss auf die Körpertemperatur haben.

#### **4.1.3 Der Energieumsatz**

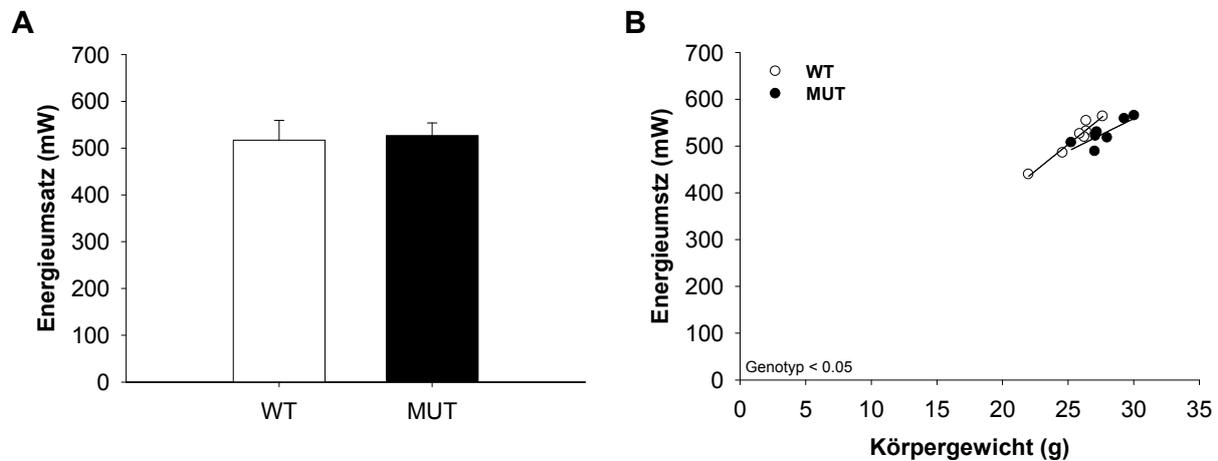
Bei den Männchen war der mittlere Energieumsatz der Mutanten in rund 18 % der MML im Vergleich zu den Kontrollen niedriger, wohingegen nur rund 8 % der MML einen erhöhten Energieumsatz hatten. Bei den Weibchen war das Verhältnis von Mutanten mit niedrigerem oder höherem Energieumsatz hingegen mit jeweils rund 12 % betroffener MML vergleichbar. Für den minimalen Energieumsatz, der als niedrigster gemessener Wert eine Annäherung an

den Ruhestoffwechsel ist, waren im Vergleich zum mittleren Energieumsatz bei beiden Geschlechtern deutlich weniger MML auffällig. Bei den Männchen sank der Anteil auf 2.0 % mit einem signifikant niedrigeren bzw. höheren minimalen Energieumsatz. Bei den Weibchen waren mit 4.7 % mit niedrigerem und 9.3 % mit erhöhtem minimalem Energieumsatz mehr MML als bei den Männchen betroffen, jedoch ebenfalls weniger als für den mittleren Energieumsatz. Dass bei Analyse des minimalen Energieumsatzes weniger auffällige MML identifiziert wurden lässt darauf schließen, dass das Verhalten der Mäuse (u.a. lokomotorische Aktivität) deutlich zu dem Energieumsatzphänotyp beiträgt.

Neben dem Körpergewicht haben auch andere Variablen wie Alter und das Geschlecht einen Einfluss auf den Energieumsatz. Der Energieumsatz verringert sich mit zunehmendem Alter (Miyasaka et al. 2003) und Weibchen haben unter Einbeziehung des Körpergewichts einen höheren Energieumsatz als die Männchen (Kap.3.1.5.3). Auf der Suche nach MML mit metabolischen Phänotypen ist es daher essentiell diese Faktoren bei der Analyse zu berücksichtigen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Alter der Mäuse auf einen zeitlichen Rahmen von 10-14 Wochen begrenzt. Um Körpergewichtsunterschiede zu berücksichtigen hat sich die graphische Darstellung der Daten mittels Streudiagramm (*Scatterplot*), durch Auftragung des Energieumsatzes jeder Maus gegen das Körpergewicht, im Rahmen des metabolischen Screens der GMC aufgrund einer robusten Trefferquote bewährt (siehe auch Kap.3.1.3). Die statistische Auswertung erfolgt durch lineare Regressionsmodelle.

Die Normalisierung des Energieumsatzes auf das Körpergewicht führte bei den Männchen zu einer deutlichen Abnahme der Quote von Mutanten mit niedrigerem Energieumsatz (4.1 %), während die Anzahl der MML mit erhöhtem Energieumsatz gering anstieg (10.2 %). Bei den Weibchen änderte sich der Anteil der betroffenen MML mit niedrigerem oder höherem Energieumsatz der Mutanten gering bis gar nicht (niedriger: 9.3 %, höher: 11.5 %). Die Normalisierung des minimalen Energieumsatzes führte bei beiden Geschlechtern zu geringen Veränderungen in der Anzahl identifizierter MML. Zu beachten ist, dass durch die Normalisierung auf das Körpergewicht MML auffällig wurden, bei denen sich die Absolutwerte nicht signifikant unterschieden (Abb.S5-8). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer geeigneten Normalisierung für die Körpergewichtsunterschiede, ohne die es zu falschen Interpretationen der Ergebnisse kommen kann. In Abb.60 ist der absolute und auf das Körpergewicht normalisierte Energieumsatz der Mutanten und Kontrollen einer MML dargestellt. Die Mutanten haben einen im Vergleich zu den Kontrollen vergleichbaren absoluten Energieumsatz. Nach Berücksichtigung des unterschiedlichen Körpergewichts ist der Energieumsatz der Mutanten signifikant niedriger, weshalb bei Betrachtung der Absolutwerte ein falsch negativer Befund vorliegt. Auf der anderen Seite würde ein

unterschiedlicher absoluter Energieumsatz, der nach Normalisierung auf das Körpergewicht zwischen den Mäusen vergleichbar ist, ein falsch positiver Befund sein.



**Abb.60: Normalisierung des Energieumsatzes zur Identifizierung metabolischer Phänotypen.** Absoluter und gegen das Körpergewicht aufgetragener mittlerer Energieumsatz der MML 57 aus Abbildung S5. Der absolute Energieumsatz war nicht signifikant verschieden (A). Nach Normalisierung auf das Körpergewicht hatten die Mutanten einen signifikant niedrigeren Energieumsatz.

#### 4.1.4 Zusammenfassung

Der neu etablierte Primärscreen ist zur Identifizierung von Genen, die einen Einfluss auf den Energiehaushalt haben, als primäre Phänotypisierungsmethode im Hochdurchsatz geeignet. Dabei führten die Mutationen maßgeblich zu Veränderungen im Körpergewicht, während für die Körpertemperatur und den Energieumsatz deutlich weniger Gene gefunden wurden. Für den mittleren Energieumsatz wurden mehr Gene, bzw. MML identifiziert als für den minimalen Energieumsatz. Da bei der Analyse des minimalen Energieumsatzes MML Auffälligkeiten zeigten, die in Bezug auf den mittleren Energieumsatz nicht auffällig wurden, ist auch die Analyse des minimalen Energieumsatzes als Phänotypisierungswerkzeug sinnvoll. Zudem ist die Normalisierung des Energieumsatzes bei MML mit Körpergewichtsunterschieden für die Evaluierung der erhobenen Daten essentiell, da der Energieumsatz stark durch das Körpergewicht beeinflusst wird.

Auch wenn bei einigen MML nur ein Geschlecht untersucht wurde, ist beim Vergleich der Geschlechter auffällig, dass bei den Männchen, insbesondere für das Körpergewicht und die Körpertemperatur, mehr Gene betroffen waren als bei den Weibchen. Zudem waren in den gemessenen Variablen bei beiden Geschlechtern zum Teil unterschiedliche Gene betroffen. Weil ein ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus bereist auf molekularer Ebene für stoffwechselaktive Gewebe gezeigt wurde (Rinn et al. 2004, Rinn und Snyder 2005, Yang et al. 2006) sollten daher, wenn möglich, Männchen und Weibchen in die Analyse mit einbezogen werden.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die 21 Stunden Messung des Energieumsatzes eine robuste Methode darstellt, die zur Detektion von Genen mit Einfluss auf den Energieumsatz geeignet ist. Die Verkürzung der Messzeit von 24 auf 21 Stunden ermöglicht die Analyse von MML im Hochdurchsatz. Durch die fehlende Adaptionszeit ist der Energieumsatz während der 21 Stunden Messung in den ersten 4 Stunden leicht erhöht, weshalb es zu einer leichten Überschätzung des Energieumsatzes kommt. Diese Überschätzung besteht jedoch auch bei jeder anderen Art von Messung ohne vorherige Adaptionszeit der Mäuse. Da es sich um ein standardisiertes Protokoll handelt, so dass alle Mutanten und Kontrollen die gleiche Behandlung erfahren, und eine hohe Korrelationen zwischen dem Energieumsatz und dem Körpergewicht bestand ( $r^2 = 0.49$ , Abb.17E+F), ist die Qualität des Messergebnisses unter Einbeziehung der ersten 4 Stunden nicht beeinträchtigt. Der charakteristische Anstieg des Energieumsatzes mit Beginn der Dunkelphase ist auf die erhöhte Aktivität und Nahrungsaufnahme der Mäuse zurückzuführen, die in der Dunkelphase rund 2/3 ihrer täglichen Nahrungsaufnahme zeigen (basierend auf eigenen Messungen mit TSE Phenomaster, unveröffentlichte Daten). Interessant ist zudem der wiederholt aufgetretene antizipatorische Anstieg gegen Ende der Dunkelphase. Der Vergleich des zeitlichen Profils von Energieumsatzmessungen zwischen zwei Genotypen könnte eine weitere Methode zur Identifizierung von Genen sein, die einen Einfluss auf die Energiehomöostase haben. Zur Identifizierung von genotypischen Unterschieden in der ultradianen Rhythmik gibt es bereits von uns verwendete Skripte, die eine automatische Auswertung des minimalen und maximalen Energieumsatzes sowohl in den beiden Lichtphasen als auch in der Dunkelphase ermöglichen. Auch der antizipatorische Anstieg gegen Ende der ersten Lichtphase und die Einteilung der Dunkelphase in eine erste (erhöhter Energieumsatz) und zweite Hälfte (niedrigerer Energieumsatz) kann aufgrund des typischen Profilverlaufs zur Identifizierung von Genen beitragen. Ob bei anderen Umgebungstemperaturen, wie z.B. in Thermoneutralität (30°C), in der keine Thermogenesekosten anfallen, ein Zusammenhang besteht, muss noch untersucht werden.

## **4.2 Zusammenhang zwischen Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Körpergewicht, Körpertemperatur und Energieumsatz auf zwei Arten evaluiert. Zum einen anhand der Differenz in der jeweiligen Variablen zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML im direkten Vergleich mit der genotypspezifischen Differenz einer anderen Variablen (Kap.3.1.4). Zum anderen wurde der Einfluss der Variablen aufeinander in linearen Regressionsmodellen anhand der Einzeldaten von 1145 Mäusen untersucht (Kap.3.1.5).

#### 4.2.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Körpertemperatur und dem Körpergewicht

Trotz tageszeitlicher Schwankungen halten endotherme Tiere ihre Körpertemperatur eng um einen Sollwert (Heldmaier und Neuweiler 2004). Mäuse zeigen tagesperiodische Schwankungen in der Körpertemperatur von etwa 2 °C (Sanchez-Alavez et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Daten von 1145 Mäusen (615 Männchen, 530 Weibchen) gezeigt werden, dass die Körpertemperatur der Weibchen im Mittel 0.37 °C höher ist als die der Männchen. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde auch bei Mäusen des Stamms C57BL/6 beschrieben, mit einer um 0.2-0.5 °C höheren Körpertemperatur der Weibchen im Alter von 3 Monaten (Sanchez-Alavez et al. 2011). Darüber hinaus variierte in dieser Studie die Körpertemperatur der Weibchen je nach Östrusphase, wobei weibliche Mäuse auch ohne Östruszyklus in Ruhe eine um 0.6 °C erhöhte Körpertemperatur hatten. Diese Befunde können einen Einfluss auf die Ergebnisse nicht nur beim Vergleich der Körpertemperaturen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen, sondern auch beim Vergleich der Körpertemperatur innerhalb der Weibchen haben, falls sich diese in unterschiedlichen Östrusphasen befinden. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich die Weibchen im Primärscreen nicht alle im gleichen Östrus befanden, sondern eine gute Durchmischung der unterschiedlichen Östrusphasen vorlag, weil sonst eine größere Varianz (Standardabweichung) in der Körpertemperatur zu erwarten gewesen wäre. Diese war bei den Weibchen mit durchschnittlich 0.55 °C sogar leicht geringer als bei den Männchen mit im Mittel 0.61 °C.

Neben einer erhöhten Körpertemperatur waren die Weibchen im Mittel 5.9 g leichter. Die zugrundeliegenden Mechanismen des Geschlechtsdimorphismus in der Körpertemperatur sind nicht vollständig geklärt, es konnte jedoch eine Beteiligung der Gonaden gezeigt werden (Sanchez-Alavez et al. 2011): Eine bilaterale Gonadektomie führte bei den Männchen zu einem deutlichen Anstieg von 0.5-0.7 °C, wodurch der Geschlechtsunterschied in der Körpertemperatur aufgehoben wurde.

Aufgrund der geschlechtsspezifischen Unterschiede wurde der Zusammenhang zwischen Körpertemperatur, Körpergewicht und Energieumsatz nach Geschlechtern getrennt betrachtet. So bestand für das Körpergewicht bei der Auswertung mittels Zweiweg-ANOVA in 13 von 56 MML eine signifikante Interaktion zwischen den Geschlechtern, weshalb sie für alle Variablen mittels anschließenden *post-hoc* Tests getrennt betrachtet wurden. In den linearen Regressionsmodellen wurden die Geschlechter von vorne herein getrennt analysiert. Zudem führt die Betrachtung beider Geschlechter in einem Modell zu keiner deutlichen Verbesserung des Erklärungsanteils an der Gesamtvarianz (Energieumsatz aufgetragen gegen Körpergewicht:  $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.521$ ; Körpergewicht gegen

Körpertemperatur:  $p < 0.001$ ,  $r^2 = 0.033$ , Energieumsatz gegen Körpertemperatur:  $p = 0.285$ ,  $r^2 = 0.001$ ).

#### **4.2.2 Einfluss des Körpergewichts auf den Energieumsatz**

Im Modell bestand eine signifikante und positive Korrelation zwischen Energieumsatz und Körpergewicht, wobei schwere Mäuse in der Regel wie erwartet einen höheren Energieumsatz aufwiesen als leichte Mäuse. Über das Regressionsmodell konnte bei beiden Geschlechtern rund 49 % der Variation im Energieumsatz durch das Körpergewicht erklärt werden. Eine Korrelation beider Variablen spiegelte sich auch im direkten visuellen Vergleich der Körpergewichtsdifferenz mit der Energieumsatzdifferenz der analysierten MML beider Geschlechter wieder, wobei ein niedrigeres Körpergewicht der Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen in der Regel mit einem ebenfalls verringerten Energieumsatz einherging und umgekehrt.

Dass der Energieumsatz mit zunehmendem Körpergewicht ansteigt ist bekannt (Heldmaier und Neuweiler 2004, Kaiyala et al. 2010, Tschöp et al. 2011). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer Normalisierung des Energieumsatzes, bei Betrachtung von Mäusen mit Körpergewichtsunterschieden. In der Literatur findet man verschiedene Methoden, die für eine Körpergewichtsnormalisierung genutzt werden. Diese reichen von der Ratiobildung für das Körpergewicht oder die Magermasse ( $\text{ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ), der Nutzung verschiedener massespezifischer Exponenten wie dem Kleiber Exponenten ( $\text{ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{0.75}$ , Kleiber 1967), oder der graphischen Darstellung des linearen Regressionsmodells, indem die Variablen mittels Streudiagramm (*Scatterplot*) gegeneinander aufgetragen werden. Die Suche nach der geeignetsten Methode, um Körpergewichtsunterschiede zu berücksichtigen, beschäftigt Wissenschaftler seit Jahrzehnten und ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Dabei wird immer mehr die Normalisierung durch Nutzung von linearen Regressionsmodellen und die graphische Darstellung mittels *Scatterplot* postuliert (Poehlman und Toth 1995, Packard und Boardman 1999, Butler und Kozak 2010, Kolokotronis et al. 2010, Kaiyala et al. 2010, Tschöp et al. 2011). Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Berücksichtigung der Körpergewichtsunterschiede genutzt.

Von einer Ratio basierten Evaluierung der Daten ist aufgrund der damit einhergehenden mathematischen Fehler in der Analyse und Interpretation der Daten abzusehen (Packard und Boardman 1999, Butler und Kozak 2010, Kolokotronis et al. 2010, Kaiyala et al. 2010, Tschöp et al. 2011). In der graphischen Darstellung des linearen Regressionsmodells (Abb.17 E+F) wird deutlich, dass der Schnittpunkt mit der y-Achse nicht durch null geht, wodurch selbst bei einem Körpergewicht von 0 g ein theoretischer Energieumsatz besteht.

Bei einer Ratio basierten Auswertung würde dieser Fehler in die Berechnung mit eingehen. Auch von der Nutzung massenspezifischer Exponenten ist aufgrund der fehlenden Allgemeingültigkeit abzusehen (Arch et al. 2006, White et al. 2007).

Da die Magermasse im Vergleich zur Fettmasse metabolisch aktiver ist, sollten beim Vergleich von stark adipösen Mäusen mit schlankeren Kontrollen nach Möglichkeit auch Unterschiede in der Körperzusammensetzung mit berücksichtigt werden (Butler und Kozak 2010, Tschöp et al. 2011).

#### **4.2.3 Einfluss der Körpertemperatur auf den Energieumsatz**

Trotz signifikanter Korrelation zwischen Körpertemperatur und Energieumsatz war der Erklärungsanteil des Modells zu gering, um auf einen biologisch relevanten Zusammenhang schließen zu lassen. Eine erhöhte Körpertemperatur geht demnach nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Energieumsatz einher und umgekehrt. Beim visuellen Vergleich der Körpertemperaturdifferenz konnte über alle MML betrachtet ebenfalls kein allgemeiner Zusammenhang gezeigt werden. Es gab jedoch einzelne MML, in denen eine signifikant niedrigere Körpertemperatur der Mutanten mit einem signifikant niedrigeren Energieumsatz einherging und umgekehrt. In einer MML hatten die Mutanten jedoch eine signifikant niedrigere Körpertemperatur und auf der anderen Seite einen signifikant erhöhten Energieumsatz.

Die Messung der Körpertemperatur erfolgte punktuell am Ende der Energieumsatzmessung zu einem Zeitpunkt (10:00 MEZ), an dem die Mäuse mitunter den niedrigsten Energieumsatz der gesamten Messung aufwiesen (siehe Kap.3.1.3, Abb.13). Der Energieumsatz spiegelt hingegen den mittleren Energieumsatz der 21 Stunden Messung wider. Dies könnte die Korrelation beider Variablen beeinflussen. Nimmt man anstelle des mittleren den minimalen Energieumsatz, der in der Regel gegen Ende der Messung gezeigt wurde und zeitlich näher an der Messung der rektalen Körpertemperatur liegt, vergrößert sich der Erklärungsanteil des Modells jedoch nicht (Männchen:  $r^2 = 0.022$ , Weibchen:  $r^2 = 0.031$ ). Dies zeigt, dass die punktuelle Messung der Körpertemperatur unter Standardhaltungsbedingungen kein Prädiktor des Energieumsatzes ist.

Um weiteren Aufschluss über den Zusammenhang zu erhalten könnte die Körpertemperatur kontinuierlich im gleichen Zeitraum wie die Energieumsatzmessung aufgezeichnet und als mittlere Körpertemperatur des Messzeitraums dargestellt werden.

#### **4.2.4 Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht**

Das mittlere Körpergewicht korrelierte bei den Männchen positiv mit der Körpertemperatur. Für die Weibchen konnte keine Korrelation gezeigt werden. Die positive Korrelation bei den

Männchen ist entgegen der Erwartung, dass ein höheres Körpergewicht mit einer niedrigeren Körpertemperatur einhergeht. Das Modell lieferte jedoch bei beiden Geschlechtern einen nur geringen Erklärungsanteil an der Gesamtvarianz. Ein biologisch relevanter Einfluss der Körpertemperatur konnte auf Basis der vorliegenden Daten bei *ad libitum* Fütterung und milder Kälteexposition somit nicht gezeigt werden. Es muss erneut berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier gezeigten Daten um eine punktuelle Messung der Körpertemperatur am Vormittag (10:00 MEZ) handelt. In einem weiterführenden Versuch könnte die Körpertemperatur der Mäuse mittels temperatursensitiver Transponder kontinuierlich über einen 24 h Zeitraum bestimmt werden, um die circadianen Veränderungen der Körpertemperatur mit einzubeziehen. Diese ist jedoch aufgrund des hohen Aufwands im Rahmen des Primärscreens nicht durchführbar.

Der Beitrag der Körpertemperatur an der Regulation des Körpergewichts konnte bisher nicht eindeutig bestimmt werden. Aufgrund der stetig steigenden Anzahl adipöser Menschen ist es ein aktuelles Thema und ein Feld intensiver Forschung mit kontroversen Ergebnissen. Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen gibt es Berechnungen über die potentielle Energieeinsparung, die durch eine Absenkung der Körpertemperatur erreicht werden kann. Klaus et al. kalkulierten anhand von Körpertemperatur- und Energieumsatzdaten von übergewichtigen Mäusen mit einer verringerten thermoregulatorischen Kapazität des braunen Fettgewebes (BAT), dass eine Absenkung der Körpertemperatur um 0.9 °C bei einer Umgebungstemperatur, die dem unteren kritischen Bereich der Thermoneutralzone entspricht, zu einer Energieeinsparung von etwa 20 % führt (Klaus et al. 1998). Überträgt man diese theoretische Energieeinsparung auf die im Rahmen des Primärscreens erhobenen Daten von 271 weiblichen Kontrollmäusen, die einen Energieumsatz von im Mittel 40.11 kJ d<sup>-1</sup> zeigten, würde die Einsparung etwa 8.02 kJ d<sup>-1</sup> betragen. Dies entspricht rund 0.21 g d<sup>-1</sup> Fettmasse (Energiegehalt 1 g Fett: ~ 39.3 kJ g<sup>-1</sup> = 9.4 kcal, physiologischer Brennwert: 37.3 kJ g<sup>-1</sup> = 9.0 kcal, Atwater 1899, Maynard 1944). Anhand einer groben Kalkulation von Landsberg et al. würde beim Menschen eine um 1 °C niedrigere Körpertemperatur zu einer Energieeinsparung von 3000 - 4000 kcal im Monat führen. Dies entspricht dem Energiegehalt von etwa 500 g Fett (Landsberg et al. 2009a, Landsberg et al. 2009b). Ein erhöhtes Körpergewicht könnte demnach das Ergebnis einer beeinträchtigten Thermogenesekapazität sein.

Die Identifizierung von MML, bei denen eine Veränderung der Körpertemperatur mit einem veränderten Körpergewicht einhergeht, unterstreicht die Annahme, dass die Körpertemperatur ein potentieller Faktor für die Regulation des Körpergewichts ist. So haben eine Reihe adipöser Mausmodelle wie Lep<sup>ob</sup> (Mutation im Leptin-Gen, Trayhurn et al. 1977), NZO (polygenetisches Modell für Adipositas, Jürgens et al. 2006) und Sma1 (Mutation im

Wachstumshormon-Gen, Meyer et al. 2004) eine niedrigere Körpertemperatur. Auf der anderen Seite gibt es MML, bei denen untergewichtige Mutanten eine erhöhte Körpertemperatur haben, wie z.B. bei Mäusen mit *Doppelknockout* von Ghrelin und dem Ghrelin-Rezeptor (Pfluger et al. 2008). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Mäuse mit einer niedrigeren Körpertemperatur anfälliger für ein erhöhtes Körpergewicht oder Adipositas sind. Erhöhte Energieausgaben könnten auf der anderen Seite der Entstehung von Adipositas entgegenwirken. Ein potentiell Beispiel ist der Inzuchtstamm SWR/J, bei dem die Mäuse unter 6 untersuchten Inzuchtstämmen die höchste Körpertemperatur aufwiesen (Ehrhardt 2008). Gleichzeitig sind sie resistent gegenüber diätinduzierter Adipositas (Hesse et al. 2010). Auf der anderen Seite sind Mäuse des Inzuchtstamms AKR/J nicht resistent gegenüber diätinduzierter Adipositas und zeigen keine Auffälligkeiten in der Körpertemperatur (Ehrhardt 2008, Hesse et al. 2010).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein genereller Zusammenhang beider Variablen gefunden wurde, so konnten beim direkten Vergleich der Körpertemperaturdifferenz mit der Körpergewichtsdifferenz einer MML einzelne MML identifiziert werden, in denen ein Zusammenhang zwischen beiden Variablen bestand. Dabei ging bei den Mutanten einiger MML eine signifikant erhöhte Körpertemperatur mit einem signifikant niedrigeren Körpergewicht einher. Auf der anderen Seite wurden jedoch auch MML identifiziert, in denen eine signifikant erhöhte Körpertemperatur mit einem signifikant erhöhten Körpergewicht einherging und umgekehrt.

Beim Menschen gibt es unterschiedliche Befunde in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Körpertemperatur und Körpergewicht. Adam fand unabhängig vom Geschlecht eine umgekehrte Beziehung zwischen oraler Temperatur und Körpergewicht (Adam 1989), während Eriksson et al. eine positive Beziehung zwischen oraler Körpertemperatur am Morgen und dem Körpergewicht und Körperfett beschrieb (Eriksson et al. 1985). Auch bei den männlichen Mäusen wurde eine positive Korrelation mit tendenziell höherer Körpertemperatur der schweren Mäuse gefunden, was im Gegensatz zu den theoretischen Annahmen steht. Neuere Untersuchungen unter Verwendung von temperatursensitiven Kapseln, die von den Probanden zur Aufzeichnung der Kernkörpertemperatur geschluckt werden, zeigen jedoch, dass es keinen Unterschied in der Körpertemperatur von normalgewichtigen und adipösen Probanden gibt (Savastano et al. 2009, Heikens et al. 2011, Hoffmann et al. 2012). In der aktuellsten Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die Körpertemperatur weder in Ruhe, nach dem Essen, während Aktivität oder im Schlaf signifikant verschieden ist (Hoffmann et al. 2012). Frauen haben jedoch eine höhere Körpertemperatur als Männer, wobei der geschlechtsspezifische Unterschied bei den Analysen mittels geschluckter Transponder zwischen  $\sim 0.23$  und  $\sim 0.38^\circ\text{C}$  lag (Heikens et al. 2011, Hoffmann et al. 2012). Ein klarer Zusammenhang zwischen metabolisch aktivem

braunem Fettgewebe und dem Body-Mass-Index (BMI) konnte lange Zeit aufgrund widersprüchlicher Forschungsergebnisse nicht eindeutig geklärt werden (Nedergaard et al. 2007). Neuere Studien zeigen jedoch eine negative Korrelation zwischen der BAT Aktivität in Kälte und dem Körperfettanteil sowie BMI (van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Saito et al. 2009).

#### **4.2.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Übergewicht und Adipositas entstehen aus dem Zusammenspiel genetischer Prädisposition und verschiedener Umwelt- sowie psychosozialer Faktoren, resultierend in einer Imbalance des Energiehaushalts (Spiegelman und Flier 2001, Tremblay 2004). Insbesondere der Lebensstil mit einem Überangebot an Nahrung und verringerter Aktivität führte in den letzten Jahrzehnten nicht nur in der westlichen Welt, sondern weltweit zu einem dramatischen Anstieg von Betroffenen. Nach neuesten Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO (<http://www.who.int/en/>) sterben jährlich weltweit rund 2.6 Millionen Menschen an den Folgen von Übergewicht und Adipositas. Im Jahr 2008 waren 1.4 Milliarden Menschen über 20 Jahre übergewichtig, 2010 bereits 43 Millionen Kinder unter 5 Jahren (World Health Organisation 2011). Die dramatischen Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit präventiver Maßnahmen sowie des Verständnisses der zugrunde liegenden Mechanismen.

Für die Identifizierung von Genen die an der Regulation des Energiehaushalts beteiligt sind und zur Aufklärung molekularer Mechanismen hat sich die Maus als Modellorganismus etabliert (Robinson et al. 2000, Brockmann und Bevova 2002, Pomp et al. 2008, Mathes et al. 2011). Der hohe tägliche Energieumsatz beträgt bei einer männlichen Wildtyp-Maus mit einem mittleren Körpergewicht von ~27.0 g theoretisch rund 1:5 des Körperenergiegehalts in Bezug auf die Fettmasse (Kalkulation basierend auf eigenen Daten von 320 Mäusen, Energieumsatz:  $43.94 \text{ kJ d}^{-1}$ , Fettmasse: 6.1 g). Dies zeigt, dass Mäuse aufgrund ihrer geringen Energiereserven empfindlich gegenüber kleinen Veränderungen in der Energieaufnahme oder den Energieausgaben sind, was sie zu einem geeigneten Untersuchungsmodell macht. Kleinsäuger haben einen deutlich höheren Stoffwechsel als große Säugetiere, wobei die Effizienz der Energienutzung jedoch vergleichbar ist. Dies wurde 1967 von Kleiber anhand des Vergleichs hinsichtlich der Gewichtszunahme zwischen einem Ochsen und 300 Kaninchen, die dem Gewicht des Ochsen entsprechen, gezeigt: Bei gleicher absoluter Nahrungsaufnahme (1 Tonne Heu), zeigen Ochse und Kaninchen trotz unterschiedlich schnellem Stoffwechsel die gleiche Gewichtszunahme. Die Kaninchen erreichen diese jedoch innerhalb von 33 Tagen, während der Ochse 130 Tage benötigt (Kleiber 1967). Im Gegensatz zur Maus beläuft sich der tägliche Energieumsatz des Menschen auf rund 1:70 des Körperenergiegehalts (Gailus-Durner et al. 2011), wodurch er weniger empfindlich gegenüber kurzfristigen Schwankungen im Energiehaushalt ist.

Langfristig gesehen kann jedoch bereits ein sehr geringer täglicher Energieüberschuss einen starken Einfluss auf das Körpergewicht haben. So kann eine tägliche Mehraufnahme von 350 mg Essen über dem Bedarf zur Aufrechterhaltung eines ausgeglichenen Energiehaushalts, über einen Zeitraum von rund 40 Jahren in einer Gewichtszunahme von 11 kg resultieren (Hervey 1969).

Auf der Suche nach pathophysiologischen Mechanismen, die an der Entstehung von Übergewicht und Adipositas beteiligt sind, ist der Beitrag der Thermogenese zur Regulation der Körpertemperatur auf Seiten der Energieausgaben in den letzten Jahren immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt. Grund sind die energetischen Kosten zur Aufrechterhaltung einer normothermen Körpertemperatur, die einen bedeutenden Anteil der Energieausgaben ausmachen (Landsberg et al. 2009a, Landsberg et al. 2009b, Foster 1984, Cannon und Nedergaard 2011). Veränderungen in der Körpertemperatur könnten somit zu einer Verschiebung in der Energiebilanz führen und dementsprechend Auswirkungen auf das Körpergewicht haben.

Zusammenfassend konnte, basierend auf der Datenlage der Einzelwerte von 1145 Mäusen unter Standardhaltungsbedingungen, kein genereller Einfluss der Körpertemperatur auf das Körpergewicht und den Energieumsatz gezeigt werden. Bei einzelnen MML bestand bei Betrachtung der Differenzen zwischen Mutanten und Kontrollen ein Zusammenhang zwischen beiden Variablen, die MML waren jedoch bei der Analyse der Einzelwerte in einem linearen Regressionsmodell nicht mehr sichtbar. Im Gegensatz dazu konnte sowohl bei Betrachtung der Einzelwerte als auch der MML ein deutlicher Einfluss des Körpergewichts den Energieumsatz gezeigt werden. Da beim Differenzvergleich der Variablen zwischen Mutanten und Kontrollen einiger MML ein entgegengesetzter geschlechtsspezifischer Effekt gefunden wurde empfiehlt es sich, wenn möglich, immer beide Geschlechter zu analysieren.

Bei *ad libitum* Fütterung und thermoregulatorischen Kosten bei Haltungstemperatur (24 °C) konnte kein Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und dem Energieumsatz sowie dem Körpergewicht gezeigt werden. Es gibt es jedoch physiologische Zustände wie den fasteninduzierten Torpor bei der Maus, bei dem die Körpertemperatur eng mit dem Energieumsatz und der Regulation des Energiehaushalts verbunden ist. Darauf wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

### **4.3 Gene die im Zusammenhang mit einer veränderten Körpertemperaturregulation stehen**

Unter zweitägigem Futterentzug wurden 7 Gene identifiziert, die zu einer signifikanten Absenkung der Körpertemperatur im Vergleich zu den Kontrollen führten. Der Futterentzug

ist somit zur Identifizierung von Körpertemperaturphänotypen geeignet, wobei die Gene an der zentralen oder peripheren Regulation der Energiehomöostase beteiligt sein könnten. Die MML *Mct8* und *Hdac2* wurden aufgrund einer mittleren Körpertemperatur von unter 32 °C nach zweitägigem Futterentzug als torpid eingestuft. Sie können zur Aufklärung von Mechanismen, die an der Regulation des Torpors beteiligt sind, beitragen. Rikke et al. führten eine Quantitative Trait Locus (QTL)-Analyse zur Identifizierung von Chromosomabschnitten durch, die unter Futterrestriktion in Zusammenhang mit einer veränderten Körpertemperaturregulation stehen (Rikke et al. 2004). Dabei konnten sie signifikante QTLs auf Chromosom 9 und 17 identifizieren. Von den im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Genen befand sich keines auf Chromosom 9 oder 17. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei Rikke et al. kein Futterentzug, sondern eine Futterrestriktion durchgeführt wurde, bei dem die Mäuse noch 60 % der *ad libitum* Futtermenge konsumierten. Das unterschiedliche Futterrestriktionsregime zur Identifizierung verschiedener Gene führen wurde bereits gezeigt (Ehrhardt 2008, Willershäuser et al. 2012). Da Mäuse durch kurzzeitige Futterrestriktion im Vergleich zum Futterentzug in der Regel nicht torpid werden empfehlen sich beide Futterrestriktionsregime durchzuführen (Willershäuser et al. 2012).

#### 4.4 Einfluss von *Mct8* auf den Energiehaushalt

Mutationen im *MCT8* (Monocarboxylattransporter 8) Gen führen beim Menschen zum Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (AHDS), einer X-chromosomalen Erkrankung mit schwerer mentaler Retardierung und Muskelschwäche. Die Mutationen umfassen Punktmutationen, bis hin zu großen Deletionen, die zum Verlust mehrerer Exons führen können (Friesema et al. 2010). Patienten haben erhöhte Trijodthyronin ( $T_3$ )- und verringerte Tetrajodthyronin ( $T_4$ )-Spiegel, mit normalen bis leicht erhöhten Spiegeln des Thyreoidea stimulierenden Hormons (TSH, Dumitrescu et al. 2004, Friesema et al. 2004, Biebermann et al. 2005). *Mct8*-defiziente Mäuse spiegeln den Schilddrüsenhormonphänotyp des Menschen wieder, zeigen jedoch keinen neurologischen Phänotyp (Wirth et al. 2009). Um die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die zu dem veränderten Schilddrüsenhormonspiegel führen, wurden *Mct8*-defiziente Mäuse in einer Reihe von Studien untersucht (u.a. Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Wirth et al. 2009, Di Cosmo et al. 2010, Trajkovic-Arsic et al. 2010a, Trajkovic-Arsic et al. 2010b, Liao et al. 2011). Dabei konzentrierten sich die Analysen vornehmlich auf *Mct8*-defiziente Männchen, bedingt durch das Auftreten von AHDS bei männlichen Patienten.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss der Mct8-Defizienz anhand eines *Knockout*-Mausmodells *in vivo* auf den Energiehaushalt bei *ad libitum* Fütterung sowie unter Futterentzug und akuter Kälteexposition bei beiden Geschlechtern untersucht.

#### 4.4.1 Veränderte zirkulierende Schilddrüsenhormonspiegel

Bei *ad libitum* Fütterung hatten Mct8<sup>-/-</sup> Männchen den typischen Schilddrüsenhormonphänotyp mit erhöhten T<sub>3</sub>- und niedrigen T<sub>4</sub>-Spiegeln, die bereits in mehreren Studien an Mct8-defizienten Männchen beschrieben wurden (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Trajkovic-Arsic et al. 2010a, Wirth 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen ebenfalls einen erhöhten T<sub>3</sub>-Spiegel haben, während der T<sub>4</sub>-Spiegel nicht verschieden war. Dumitrescu et al. fanden in ihren Analysen von Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen neben einem erhöhten T<sub>3</sub>- einen verringerten T<sub>4</sub>-Spiegel (Dumitrescu et al. 2006). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Mäuse der Studie im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit einen gemischten genetischen Hintergrund (C57Bl/6J:129Sv) hatten. Die Mechanismen, die zu den veränderten Schilddrüsenhormonspiegeln Mct8-defizienter Mäuse führen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Unter anderem wurden eine verringerte Sekretion von Schilddrüsenhormonen aus der Schilddrüse beschrieben (Di Cosmo et al. 2010, Liao et al. 2011). Auch eine Beteiligung verschiedener Organe wie Leber und Niere, die aufgrund einer veränderter Expression und Aktivität der Deiodasen zu dem Schilddrüsenhormon Phänotyp beitragen, wurde gezeigt (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Trajkovic-Arsic et al. 2010b, Liao et al. 2011, siehe auch Kap.4.4.9).

#### 4.4.2 Niedrigeres Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde in mehreren Kohorten zu verschiedenen Alterszeitpunkten bestimmt. Mct8<sup>-/-</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse waren zu fast allen Zeitpunkten signifikant leichter als Mct8<sup>+/-</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäuse. Die Analyse der Körperzusammensetzung unter Berücksichtigung des Körpergewichts ergab keine genotypspezifische Verschiebung in den Anteilen der Fett- und Magermasse. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich des Körpergewichts von Mct8-defizienten Mäusen. Diese reichen von keinem genotypspezifischen Unterschied (Trajkovic et al. 2007) bis zu einem tendenziell niedrigeren Körpergewicht (Liao et al. 2011, Wirth 2010). Die unterschiedlichen Befunde dieser Studien in Bezug auf das Körpergewicht können unter anderem das Resultat von Zufallseffekten sein, da die Körpergewichtsunterschiede teilweise zwar statistisch signifikant, jedoch nicht allzu groß waren. Generell scheint die Deletion von Mct8 jedoch in einem verringerten Körpergewicht zu resultieren. Dies könnte das Resultat der veränderten Schilddrüsenhormonspiegel sein: T<sub>3</sub> wirkt bekanntermaßen stimulierend auf den

Energieumsatz, wodurch es zu leichten Veränderungen im Energiehaushalt kommen könnte. Das geringere Gewicht scheint jedoch nicht auf einer langfristig negativen Energiebilanz zu beruhen. Die Energiereserven von Mäusen sind im Gegensatz zum Menschen nur für einen kurzen Zeitraum ausreichend (rund 5 Tage, Kap.4.2.5). Befinden sich Mäuse über einen langen Zeitraum in einer negativen Energiebilanz würden sie innerhalb einer kurzen Zeit eine starke Gewichtsabnahme zeigen und sterben. Mct8-defiziente Mäuse scheinen daher keine Probleme mit der täglichen Regulation ihrer Energieausgaben zu haben. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mäuse in einer weniger positiven Energiebilanz als die Kontrollen befinden. In anderen Mausmutantenlinien (MML), die aufgrund einer Mutation oder Deletion, wie z.B. des Schilddrüsenhormonrezeptors  $\alpha$  (TR $\alpha$ ), veränderte Schilddrüsenhormonspiegel aufweisen, konnte ein verringertes Körpergewicht einhergehend mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch gezeigt werden (Sjörgen et al. 2007, Pelletier et al. 2008). Auch in T<sub>3</sub>- Injektionsstudien an Ratten wurde in der Regel eine verringerte Gewichtszunahme bis hin zur Gewichtsabnahme gefunden (Oppenheimer et al. 1991, Ishii et al. 2003, Villicev et al. 2007, Ishii et al. 2008).

#### 4.4.3 Tendenzieller Hypermetabolismus bei Raumtemperatur

Unter Standardhaltungsbedingungen (*ad libitum* Fütterung, 24 °C) konnte bei der Analyse des täglichen Energieumsatzes (DEE) ein Trend zu einem Hypermetabolismus der Mct8<sup>-ly</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse gezeigt werden. Dabei hatten die Mct8<sup>-ly</sup> Männchen in der Licht- und Dunkelphase einen tendenziell erhöhten Energieumsatz, der sich auch in erhöhten Ruhestoffwechselraten widerspiegelte. Bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen war der Energieumsatz nur in der Lichtphase tendenziell erhöht. Interessanterweise war der Ruhestoffwechsel der Weibchen nicht nur in der Licht-, sondern auch Dunkelphase erhöht. Dies ist wahrscheinlich auf eine geringere Absenkung des Energieumsatzes im Vergleich zu den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen zurückzuführen. In thermoneutraler Umgebung (30 °C) wurde kein erhöhter Energieumsatz gefunden.

Es ist beschrieben, dass Schilddrüsenhormone sowohl die obligatorische Thermogenese (Basal- und Ruhestoffwechsel) als auch die fakultative (kurzfristige) und adaptive (langfristige) Thermogenese außerhalb der Thermoneutralzone stimulieren (Silva 1995, Silva 2003, Silva 2006). Ratten, die als Folge einer Schilddrüsenektomie hypothyreot sind, zeigten einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch, während Injektionen von T<sub>4</sub> zu einem Anstieg führten (Barker und Klitgaard 1952). Ebenso hatten Ratten, die durch Verabreichung von Methimazol hypothyreot waren, bei Raumtemperatur einen tendenziell niedrigeren Gesamtenergieumsatz und einen signifikant geringeren Ruhestoffwechsel, während die chronische Verabreichung von T<sub>4</sub> einen thyreotoxischen Zustand mit signifikant erhöhtem Gesamtenergieumsatz und Ruhestoffwechsel hervorrief (Klieverik et al. 2009). Auch ein

Einfluss erhöhter Schilddrüsenhormonspiegel auf den basalen Energieumsatz wurde gezeigt (Magnus-Levy 1895, Kong et al. 2004). Beim Menschen beeinflussen Hypo- und Hyperthyreose ebenfalls das Körpergewicht und den Energieumsatz (Krotkiewski 2000, Hulbert 2000, Krotkiewski 2002, Karmisholt et al. 2011). Aufgrund der publizierten Ergebnisse wurde der Energieumsatz der Mäuse unter Standardhaltungsbedingungen und in thermoneutraler Umgebung detailliert analysiert. Ein stimulierender Einfluss des erhöhten Schilddrüsenhormonspiegels auf den Energieumsatz konnte jedoch in Ansätzen nur unter moderater Kälteexposition bei Raumtemperatur gezeigt werden, mit tendenziell erhöhtem DEE und Ruhestoffwechselraten.

Weitere Komponenten, die einen Einfluss auf die Allokation der Energieausgaben haben, sind die Körpertemperatur und die Aktivität. Die Körpertemperatur war nicht verändert. Die Aktivität konnte in dem verwendeten Versuchsaufbau nicht registriert werden. Während der Bestimmung des DEE zeigten *Mct8<sup>-y</sup>* Männchen in der zweiten Hälfte der Dunkelphase eine stärker ausgeprägte ultradiane Rhythmik im Energieumsatz. Dies lässt eine phasenweise höhere Aktivität vermuten. Wirth et al. untersuchten in Kooperation mit der Deutschen Mauslinik das Verhalten *Mct8*-defizienter Mäuse. Dabei zeigten *Mct8<sup>-y</sup>* Männchen einen Trend zu einer erhöhten Aktivität in Bezug auf die zurückgelegte Strecke im *modified-hole-board* Test (Wirth et al. 2009). Zudem hatten *Mct8*-defiziente Mäuse in der Studie ein verringertes Angstverhalten. In der Literatur gibt es unterschiedliche Befunde über den Einfluss des Schilddrüsenhormonspiegels auf die Aktivität (Sala-Roca et al. 2002, Levine et al. 2002, Klieverik et al. 2009).

Beim Vergleich der erhobenen Daten mit publizierten Ergebnissen verschiedener Nagetiermodelle muss generell berücksichtigt werden, dass die Deletion von *Mct8* zu einer chronischen Veränderung der Schilddrüsenhormonspiegel führt, denen die Mäuse bereits während der Entwicklung ausgesetzt sind. Infolge kann es zu kompensatorischen Mechanismen kommen. Im Gegensatz dazu wurde in vielen der genannten Studien die Auswirkung eines akut induzierten thyreotoxischen Zustands durch Injektion von Schilddrüsenhormonen untersucht wird. Im Fall von Mäusen mit Mutationen lag ein anderer molekularer Mechanismus zugrunde, der ebenfalls in veränderten Schilddrüsenhormonspiegeln resultierte.

#### **4.4.4 Geringe Verschiebung der Substratnutzung bei *ad libitum* Fütterung und in thermoneutraler Umgebung**

Die respiratorische Austauschrate (RER) erlaubt eine Aussage über das zur Energiegewinnung genutzte Substrat (Elia und Livesey 1988). Während der Analyse des

DEE zeigten die Mäuse beider Geschlechter und Genotypen den typischen diurnalen Rhythmus, mit erhöhter RER in der Dunkelphase. Dies ist auf eine vermehrte Nutzung von Kohlenhydraten aufgrund der gesteigerten Nahrungsaufnahme zurückzuführen, die in der Dunkelphase rund 2/3 der täglichen Nahrungsaufnahme ausmacht (basierend auf eigenen Messungen mit TSE Phenomaster, unveröffentlichte Daten). Die mittlere RER der DEE-Messung zwischen  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  und  $Mct8^{+/y} / Mct8^{+/-}$  Mäusen war nicht signifikant verschieden. Dies zeigt eine nicht veränderte Nutzung der Substrate, auch wenn  $Mct8^{-/y}$  Männchen in der Dunkelphase mit im Mittel 0.03 eine leicht höhere RER als  $Mct8^{+/y}$  Männchen hatten. In Thermoneutralität war die RER der  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse leicht, jedoch signifikant niedriger. Dabei bestand der genotypspezifische Unterschied hauptsächlich bei den Weibchen, wobei die RER der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen jedoch lediglich um im Mittel 0.02 niedriger war. Vergleicht man die genotypspezifischen Unterschiede in der RER mit den für die MML Ugcg beschriebenen (Kap.3.5.2) sind sie gering gewesen. Die RER und ihr Potential als phänotypisches Unterscheidungskriterium muss in weiteren Versuchen noch evaluiert werden. Im Gegensatz zu der hier gezeigten vergleichbaren, bis tendenziell erhöhten RER, beschrieben Kliverik et al. eine niedrigere RER in hypo- und hyperthyreoten Ratten (Kliverik et al. 2009). Der unterschiedliche Befund könnte auf die bei Kliverik et al. akut herbeigeführten Veränderungen der Schilddrüsenhormonspiegel zurückgeführt werden.

#### 4.4.5 $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$ Mäuse sind kältetolerant

Die Rekrutierung der Thermogenese war durch die Deletion von  $Mct8$  nicht beeinträchtigt. Die Mäuse zeigten mit Beginn der Umgebungstemperaturabsenkung von 30 °C auf 5 °C einen deutlichen Anstieg im Energieumsatz, entsprechend dem Scholander-Modell der Thermoregulation (Scholander et al. 1950), der innerhalb der Männchen und Weibchen bei beiden Genotypen vergleichbar war. Während der 5-stündigen akuten Kälteexposition waren  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse in der Lage ihren Energieumsatz aufrecht zu halten und somit kältetolerant. Im Vergleich zu den  $Mct8^{+/y} / Mct8^{+/-}$  Mäusen war der absolute mittlere Energieumsatz in Kälte jedoch signifikant niedriger. Der geringere Energieumsatz war aber nicht mit einer stärkeren Absenkung der Körpertemperatur verbunden, die nach Beendigung der akuten Kälteexposition zwischen beiden Genotypen nicht signifikant verschieden war. Der Befund zeigt, dass von der Körpertemperatur nicht direkt auf den Energieumsatz geschlossen werden kann. Dies wurde insbesondere bei den Männchen deutlich. Auch nach Normalisierung auf das Körpergewicht zeigten  $Mct8^{-/y} / Mct8^{-/-}$  Mäuse einen leichten Trend zum Hypometabolismus, der bei den Weibchen stärker ausgeprägt war, aber statistisch nicht belegt werden konnte. Dass Schilddrüsenhormone außerhalb der Thermoneutralzone an der Regulation der Thermogenese beteiligt sind, ist bekannt (Silva 1995, Silva 2003, Silva 2006). Dies konnte auch eindrucksvoll in einem Versuch an Ratten gezeigt werden, die durch

Thyroidektomie hypothyreot waren: Als Folge wurden sie in Kälte hypometabol, was durch Injektion von  $T_4$  verhindert werden konnte (Bianco und Silva 1987a). Bei den hyperthyreoten  $Mct8^{-y} / Mct8^{-/-}$  Mäusen könnte man daher in Kälte einen unveränderten bis erhöhten Energieumsatz vermuten und nicht wie gezeigt, einen verringerten. Weil die Mäuse chronisch hyperthyreot sind ist ein direkter Vergleich mit einer akut herbeigeführten Veränderung des Schilddrüsenhormonspiegels jedoch schwierig. Um die molekularen Mechanismen des tendenziellen Hypometabolismus weiter zu untersuchen, wurde der Gehalt des Entkopplerproteins 1 (Ucp1) im braunen Fettgewebe (BAT) analysiert (Kap.4.4.6).

#### 4.4.6 Verringerter Ucp1-Gehalt bei $Mct8^{-/-}$ Weibchen

Die Analyse des Ucp1-Gehalts bei Haltungstemperatur (24 °C) ergab einen signifikant niedrigeren Ucp1-Gehalt im interskapularen braunen Fettgewebe (iBAT) der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen. Bei den Männchen bestand hingegen kein signifikanter genotypspezifischer Unterschied. Zwar waren  $Mct8^{-/-}$  Weibchen kältetolerant, im Vergleich zu den  $Mct8^{+/-}$  Weibchen waren sie jedoch tendenziell hypometabol, mit stärkerer Ausprägung als bei den Männchen. Dies kann für eine leichte Beeinträchtigung der BAT-vermittelten Thermogenese bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen, basierend auf dem geringeren Ucp1-Gehalt, sprechen, auch wenn die punktuelle Messung der Körpertemperatur am Versuchsende nicht verschieden war.

In Kälte ist die Ucp1-vermittelte zitterfreie Wärmebildung im BAT die Hauptquelle der Wärmegenerierung (Kap.1.2). Dies wird durch Ucp1-defiziente Mäuse verdeutlicht, die bei vorangegangener Akklimatisationstemperatur zwischen 24 °C und 30 °C kälteintolerant sind (Golozoubova et al. 2001, Meyer et al. 2010). Die Aktivierung von Ucp1 erfolgt über das sympathische Nervensystem durch die Freisetzung von Noradrenalin an den synaptischen Nervenendigungen, das an auf den Adipozyten lokalisierte  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren bindet. Schilddrüsenhormone interagieren mit dem sympathischen Nervensystem und stehen im Zusammenhang mit der Expression  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren (Rubio et al. 1995, Silva 1995, Silva 2006, Bianco et al. 2005). Zudem ist  $T_3$  an der Regulation der Ucp1 Expression beteiligt (Bianco und Silva 1987a, Bianco et al. 1988, Branco et al. 1999). Im Ucp1 Gen gibt es zwei Bindestellen für  $T_3$ , die Schilddrüsenhormonrezeptoren  $TR\alpha$  und  $TR\beta$  (Silva und Rabelo 1997), wobei die Expression von Ucp1 durch Bindung von  $T_3$  an den  $TR\beta$  vermittelt wird (Ribeiro 2010).

Hypothyreote Ratten zeigen bereits bei Raumtemperatur einen verringerten Ucp1-Gehalt, der durch Kälteexposition nur geringfügig ansteigt und durch Injektion von  $T_4$  oder hohen Dosen an  $T_3$  während einer Kälteexposition normalisiert werden kann (Bianco und Silva 1987a, Silva 1988). Mausmodelle mit Deletionen der Schilddrüsenhormonrezeptoren  $TR\alpha$

und TR $\beta$  haben, je nach Mutation, eine eingeschränkte Körpertemperaturregulation, die bis zur Kälteintoleranz führen kann (Ribeiro et al. 2001, Golozoubova et al. 2004, Wickström et al. 1998, Marrif et al. 2005). Auch die Deletion des Rezeptors für das Thyreoidea-Stimulierende Hormon im BAT führt im Mausmodell zu Hypothyreose und Kältesensitivität (Endo und Kobayashi 2008). Beim Menschen geht eine Hypothyreose ebenfalls mit einer erhöhten Kältesensitivität einher, während Hyperthyreose zu einer verringerten Wärmetoleranz führt (Silva 2003).

Da ein verringerter Ucp1-Gehalt in der Regel für hypothyreote Zustände beschrieben wird, könnte man schlussfolgern, dass sich das BAT bei den Weibchen in einem tendenziell hypothyreoten Zustand befindet. Dagegen spricht, dass neben Mct8 auch alternative Schilddrüsenhormontransporter im BAT exprimiert werden (unveröffentlichte Ergebnisse der AG Schweizer, persönliche Kommunikation), die für den Ausfall von Mct8 kompensieren könnten. Daher könnte sich das BAT infolge des erhöhten Serum T<sub>3</sub>-Spiegels, genau wie Leber und Niere, in einem hyperthyreoten Zustand befinden.

Weitere Aufklärung könnte neben der Analyse des Schilddrüsenhormongehalts die Analyse der Dejodase2 (Dio2) bringen, die eine wichtige Rolle für die lokale Verfügbarkeit von T<sub>3</sub> im BAT während der adaptiven Thermogenese spielt (Silva und Larsen 1983, Silva und Larsen 1985, Bianco und Silva 1987a, Bianco und Silva 1987b). Die Dio2 ist bereits während der Embryogenese für die normale Entwicklung des BAT essentiell und ihre Deletion führt zu einer verringerten Expression von thermoregulatorisch wichtigen Genen wie Ucp1 (Hall et al. 2010). Daher kommt es bei Kälteexposition infolge einer beeinträchtigten zitterfreien Wärmebildung zur Absenkung der Körpertemperatur und starker Gewichtsabnahme (de Jesus et al. 2001). Auch ein Einfluss auf die Lipogenese im BAT wurde beschrieben (Bianco et al. 1998). Die Verfügbarkeit von Fettsäuren zur Aktivierung von Ucp1 und als Substrat der Atmungskette scheint nicht beeinträchtigt zu sein, da Mct8<sup>-ly</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse ihre RER bei Kälteexposition den Mct8<sup>+ly</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäusen vergleichbar stark absenken konnten.

Meyer et al. untersuchten den Anteil von Ruheumsatz, noradrenalininduzierter zitterfreier Wärmebildung und maximaler Thermogenesekapazität (HP<sub>max</sub>) von warm (27 °C), moderat kalt (18 °C) und kaltakklimatisierten (5 °C) Wildtyp-Mäusen und Ucp1-defizienten Mäusen (Meyer et al. 2010). Basierend auf ihren Daten benötigt eine an Raumtemperatur (24 °C) akklimatisierte 23 g schwere Wildtyp-Maus eine Thermogeneseleistung von rund 850 mW um in Kälte (5 °C) bestehen zu können (kalkuiert aus Meyer et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten während der akuten Kälteexposition die maximalen Energieumsatzraten ermittelt werden. Diese entsprechen jedoch nicht der maximal induzierbaren Thermogenesekapazität, die in der Regel erst bei noch niedrigeren Temperaturen erreicht wird (Willershäuser 2007). Bei beiden Geschlechtern und Genotypen lag der maximal

ermittelte Energieumsatz in Kälte jedoch deutlich über den kalkulierten 850 mW (Mct8<sup>+/-</sup>: 1100.96 ± 70.20 mW, Mct8<sup>-/-</sup>: 1106.70 ± 87.25 mW, Mct8<sup>+/-</sup>: 1002.59 ± 85.80 mW, Mct8<sup>-/-</sup>: 932.88 ± 42.92 mW). Dies zeigt, dass sich die Mäuse beider Genotypen nicht in einem thermoregulatorischen Engpass befanden.

#### 4.4.7 Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen wurden unter Futterentzug torpid

Der Futterentzug führte bei allen Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen bereits am ersten Tag zum Eintritt in eine mehrstündige hypometabole Phase mit stark abgesenktem Sauerstoffverbrauch. Der Verlauf wies die Charakteristika eines typischen Torporbouts auf, wie sie unter anderem für den spontanen Torpor beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) und fasteninduzierten Torpor bei der Maus beschrieben wurden (Heldmaier und Ruf 1992, Heldmaier et al. 1999, Hudson 1979). Das Torporereignis ist durch eine Absenkung des Sauerstoffverbrauchs, gefolgt von einer mehrstündigen hypometabolen Phase und schneller Steigerung beim Austritt, gekennzeichnet. Viele Kleinsäuger, aber auch Vögel, die aufgrund ihrer geringen Fettreserven in erster Linie auf über die Nahrung aufgenommene Energie zur Aufrechterhaltung ihres Energiehaushalts angewiesen sind, zeigen bei Nahrungsmangel täglichen Torpor, um ihre täglichen Energieausgaben zu regulieren (Geiser und Ruf 1995, Geiser 2004, Heldmaier und Ruf 1992, Heldmaier et al. 2004). Wie bereits für nachtaktive Säuger beschrieben (Geiser 2004, Gluck et al. 2006, Swoap et al. 2006, Brown und Staples 2010) lag der Torporeintritt der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen in der zweiten Hälfte der Dunkelphase und endete im Verlauf der folgenden Lichtphase.

Die mittlere Torpordauer betrug 6.18 Stunden mit einer individuell verschiedenen Länge zwischen 4.00 und 8.92 Stunden. Dies liegt im Bereich der für Mäuse beschriebenen mittleren Torpordauer von rund 4-11 Stunden (Hudson 1979, Swoap 2008, Dikic et al. 2008, Brown und Staples 2010, Oelkrug et al. 2011). In der Literatur sind Reduktionen der täglichen Energieausgaben durch Torpor von 50-90 % beschrieben, wobei der Energieumsatz während des Torpors etwa 30 % des Basalstoffwechsels beträgt (Geiser und Ruf 1995, Geiser 2004). Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten während des Torporbouts eine Energieeinsparung von im Mittel rund 70 % gegenüber dem *ad libitum* Verbrauch bei Raumtemperatur, der mit thermoregulatorischen Kosten verbunden ist. Die Abschätzung der Energieeinsparnis, in Bezug auf den täglichen Energieumsatz, ergab eine tägliche Energieeinsparung von im Mittel rund 34 %. Sowohl die Energieeinsparung während des Torporereignisses, als auch in Bezug auf die täglichen Energieausgaben ist daher mit den in der Literatur beschriebenen Daten vergleichbar. Im Verlauf der zweiten Dunkelphase des Futterentzugs wurden Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen erneut torpid. Im Gegensatz zu den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen zeigte lediglich eines der Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen (1/5) eine deutlich kürzere hypometabole Phase. Von den Mct8<sup>-/-</sup> Männchen wurde nur eins (1/6) torpid, von den Mct8<sup>+/-</sup> Männchen keines.

Während des Torpors kommt es neben der aktiv regulierten Absenkung des Energieumsatzes in Folge der fehlenden Wärmebildung zu einer starken Absenkung der Körpertemperatur. Dies führt zu einer Verringerung des Gradienten zwischen Körpertemperatur und Umgebungstemperatur. Der resultierende verringerte Wärmeverlust trägt so zur Energieeinsparung bei (Heldmaier und Ruf 1992, Heldmaier et al. 1999, Heldmaier et al. 2004). Somit ist nicht die absolute Körpertemperatur während des Torpors, sondern der Gradient zwischen Körper- und Umgebungstemperatur entscheidend für die Energieeinsparung. Dies wird auch durch das Beispiel des Fettschwanzmakis *Cheirogaleus medius* verdeutlicht, der trotz hoher Umgebungstemperaturen, die über 30 °C liegen können, Winterschlaf hält (Dausmann et al. 2004, Dausmann et al. 2005).

Nicht nur der Energieumsatz, auch die Körpertemperatur wird während des Torpors aktiv reguliert, wobei eine Verschiebung des Sollwertes der Körpertemperatur deren Absenkung ermöglicht (Morhardt und Hudson 1966, Hudson 1979, Heldmaier und Ruf 1992, Geiser 2004). Im Einklang mit dem niedrigeren Sauerstoffverbrauch am Ende des zweitägigen Futterentzugs waren *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen hypotherm, mit einer mittleren Körpertemperatur unter 31 °C. Diese Schwelle wird auch in der Literatur als Torporkriterium bei der Maus verwendet (Hudson 1979, Dikic et al. 2008, Swoap et al. 2006, Brown und Staples 2010). Nach dem zweitägigen Futterentzug zeigten auch *Mct8*<sup>+/-</sup> Weibchen und *Mct8*<sup>+y</sup> / *Mct8*<sup>-y</sup> Männchen Absenkungen im Sauerstoffverbrauch. Im Vergleich zu den *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen waren sie jedoch nicht so ausgeprägt und gingen mit höheren Körpertemperaturen von im Mittel über 33 °C einher.

Bei Betrachtung auf Einzeltierebene, die beide Geschlechter und Genotypen einbezieht, zeigten Mäuse mit der geringsten Gewichtsabnahme die stärkste Körpertemperaturabsenkung. Ohne die torpiden *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen bestand jedoch keine Korrelation, weshalb sich bei Einzelbetrachtung der Geschlechter nur innerhalb der Weibchen, jedoch nicht innerhalb der Männchen ein signifikanter Zusammenhang ergab. Bei einem akuten Futterentzug von 31 Mausmutantenlinien über 2 Tage, wie er auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, konnte bei Einzelbetrachtung der Geschlechter kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (Ehrhardt 2008). Das Ergebnis verdeutlicht, dass die stärkere Absenkung der Körpertemperatur bei den *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen zu einer höheren Energieeinsparung beigetragen hat. Das Ausgangsgewicht hatte bei den *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen keinen Einfluss auf die Energieeinsparung und die Torpordauer.

Die molekularen Mechanismen, die zum Torporeintritt führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Futterentzug oder Futterrestriktion zu einer Reihe von Veränderungen im Hormonhaushalt kommt, denen eine Beteiligung am

Torporeintritt zugesprochen wird. So konnte in zahlreichen Versuchen eine Beteiligung von Leptin und Ghrelin gezeigt werden.

Leptin wird in weißen Fettzellen exprimiert und seine Konzentration im Plasma korreliert mit der Fettmasse (Zhang et al. 1994, Maffei et al. 1995). Der Leptinspiegel sinkt während des Fastens ab (Frederich et al. 1995, Ahima et al. 1996). Dies wird durch die verstärkte sympathische Innervierung des weißen Fettgewebes über  $\beta_3$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt (Mantzoros et al. 1996, Migliorini et al. 1997, Swoap et al. 2006). Dabei sind die Innervierung des weißen Fettgewebes und die Absenkung der Leptinspiegel essentiell für den Torporeintritt (Swoap und Weinshenker 2008). Leptinverabreichung unter Futterentzug führt zum Ausbleiben des Torpors oder zu einer Verkürzung der Torporlänge (Döring et al. 1998, Geiser et al. 1998, Gavrilova et al. 1999). Leptindefiziente Lep<sup>ob</sup> Mäuse werden aufgrund des fehlenden Sättigungssignals adipös und zeigen trotz der großen Energiereserven sowohl spontanen Torpor in Anwesenheit von Futter als auch unter Futterentzug (Webb et al. 1982, Swoap 2001, Swoap 2008). Eine Substitution mit Leptin verhindert den Torporeintritt von Lep<sup>ob</sup> Mäusen (Gavrilova et al. 1999). Leptinrezeptoren befinden sich in verschiedenen Gebieten des Hypothalamus (Mercer et al. 1996), unter anderem in den anorexygenen Proopiomelanocortin (Pomc)-Neuronen, auf die Leptin eine stimulierende Wirkung hat, und in den orexygenen *agouti-related peptide* (Agrp) / Neuropeptid Y (Npy)-Neuronen mit hemmender Wirkung des Leptins (Elias et al. 1999).

Die Veränderung des Leptinspiegels ist jedoch nicht das einzige Signal für den Torporeintritt. A-ZIP / F1 Mäuse haben die eine geringe Menge an Fettmasse und einen rund 20 fach niedrigeren Leptinspiegel (Moitra et al. 1998). Während des Fastens zeigen sie ausgeprägte Torporbouts, die nicht durch Leptininjektionen unterdrückt werden können (Gavrilova et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Fasten zu einer Erhöhung des Ghrelinspiegels führt (Tschöp et al. 2000). Ghrelin hat im Gegensatz zu Leptin eine stimulierende Wirkung auf die orexygenen Agrp- / Npy-Neurone (Kohno et al. 2003). Gluck et al konnten zeigen, dass eine Injektion von Ghrelin über die Npy-Neurone im Nucleus arcuatus des Hypothalamus zu einer Intensivierung des Torporbouts mit stärkerer Temperaturabsenkung führt (Gluck et al. 2006). Dem Hypothalamus kommt somit eine wichtige Rolle bei der zentralen Kontrolle des Energiestoffwechsels zu. Durch den fasteninduzierten niedrigeren Leptin- und erhöhten Ghrelinspiegel kommt es zusammenfassend zu einer Stimulation des orexygenen und Hemmung des anorexygenen Signalweges. Dies führt bei Nahrungsmangel zur Absenkung des Energieumsatzes und Körpertemperatur.

Für den Torporaustritt konnte, genau wie für den Torporeintritt, gezeigt werden, dass die Aktivierung von  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren über Norepinephrin für einen normalen Aufwachvorgang notwendig ist (Swoap und Weinshenker 2008). Dabei ist insbesondere die

Aktivierung der  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren des braunen Fettgewebes für die benötigte Wärmeproduktion während des Torporaustritts essentiell. Bei Ucp1-defizienten Mäusen, die keine Ucp1-vermittelte Thermogenese zeigen, verlängerte sich die Aufwachphase aufgrund der fehlenden zitterfreien Wärmebildung im braunen Fettgewebe deutlich (Oelkrug et al. 2011).

Auch in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse (HPT)-Achse kommt es zu Veränderungen, die sich auf den Schilddrüsenhormonhaushalt auswirken (Boelen et al. 2008). So resultiert Futterentzug in einer schnellen Absenkung der  $T_3$ - und leichten Absenkung der  $T_4$ -Serumspiegel (Boelen et al. 2008). Der Nucleus arcuatus im Hypothalamus hat eine wichtige Funktion in der zentralen Kontrolle des Fastens und des Energiestoffwechsels: Wird er durch Mononatriumglutamat zerstört hat Fasten keinen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonspiegel und Pro-Thyreoliberin (pro-TRH) mRNA Expression (Legardi et al. 1998). Die bisher bekannten Mechanismen und gewebespezifischen Veränderungen unter Futterentzug sind mit den jeweiligen Literaturangaben und den in der vorliegenden Arbeit analysierten Parametern Mct8-defizienter Mäuse unter Futterentzug, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden, in Abb.61 zusammengefasst.

#### **4.4.8 Wieso werden Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse torpid?**

Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen wurden bereits innerhalb des ersten Tages des Futterentzugs torpid, Mct8<sup>-/-</sup> Männchen hingegen nicht. Es ist bekannt, dass weibliche Mäuse unter Futterentzug leichter torpid werden als männliche Mäuse (Swoap und Gutilla 2009), weshalb sie in der Regel in Torporstudien genutzt werden (Brown und Staples 2010, Oelkrug et al. 2011, Dikic et al. 2008, Swoap et al. 2006, Gluck et al. 2006, Swoap et al. 2007). Detaillierte Untersuchungen über die Ursachen des geschlechtsspezifischen Effekts gibt es bisher nicht. Es scheint jedoch, dass Testosteron bei männlichen Nagetieren einen hemmenden Einfluss auf Torpor hat (Mzilikazi und Lovegrove 2002). Zudem könnte der geschlechtsspezifische Körpergewichtsunterschied mit höherem Gewicht der Männchen das Torporverhalten beeinflussen. Weibliche Mäuse haben zwar eine im Vergleich zu Männchen höhere Fettmasse als man für ihr niedrigeres Körpergewicht erwartet (eigene Körperzusammensetzungsdaten von 877 Mäusen, siehe Abb.S12,  $p < 0.001$ ), absolut gesehen ist sie jedoch niedriger (Männchen:  $6.1 \pm 1.0$  g, Weibchen:  $5.0 \pm 0.9$  g, eigene Daten von 477 Männchen und 400 Weibchen). Die geringeren Energiereserven könnten eine höhere Energieeinsparung notwendig machen.

Dass die  $Mct8^{-/-}$  Weibchen torpid wurden zeigt ein durch das Energiedefizit herbeigeführtes Kompensationsproblem, das eine größere Energieeinsparung notwendig machte.  $Mct8^{-/-}$  Weibchen waren vor dem Futterentzug leichter und verloren während dem Futterentzug weniger Gewicht. Ein Zusammenhang zwischen geringerem Ausgangsgewicht und verringerter Körpergewichtsabnahme unter akutem zweitägigem Futterentzug wurde auch in einer anderen Studie gezeigt (Ehrhardt 2008). Bei Betrachtung der Gewichtsveränderung muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch die Kotabgabe und der Flüssigkeitsverlust einen Einfluss haben. Der Anteil am Körpergewichtsverlust, der nicht durch die Fett- oder Magermasse erklärt werden konnte und bei dem es sich wahrscheinlich um Kot und Flüssigkeit handelte, war jedoch in einer unabhängig analysierten Kohorte zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Die Bestimmung der Körperzusammensetzung in einer separaten Kohorte ergab nach zweitägigem Futterentzug eine um im Mittel 1.9 g niedrigere Fettmasse der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen ( $Mct8^{+/+}$ :  $4.8 \pm 2.4$  g,  $Mct8^{-/-}$ :  $3.3 \pm 1.3$  g,  $p = 0.171$ ). Da die Weibchen bereits am ersten Tag des Futterentzugs torpid wurden, dürften die Fettreserven zum Zeitpunkt des Torporeintritts dementsprechend größer gewesen sein. Zudem war die anteilige Abnahme von Fett- und Magermasse am Gewichtsverlust zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Dies zeigt, dass es keine Defizite in der Mobilisierung der Fettreserven und Nutzung der verschiedenen Energiequellen gab. Anhand des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung, bzw. der Veränderung der Variablen unter Futterentzug lässt sich somit kein eindeutiger Anhaltspunkt für den Torpor der  $Mct8^{-/-}$  Weibchen finden.

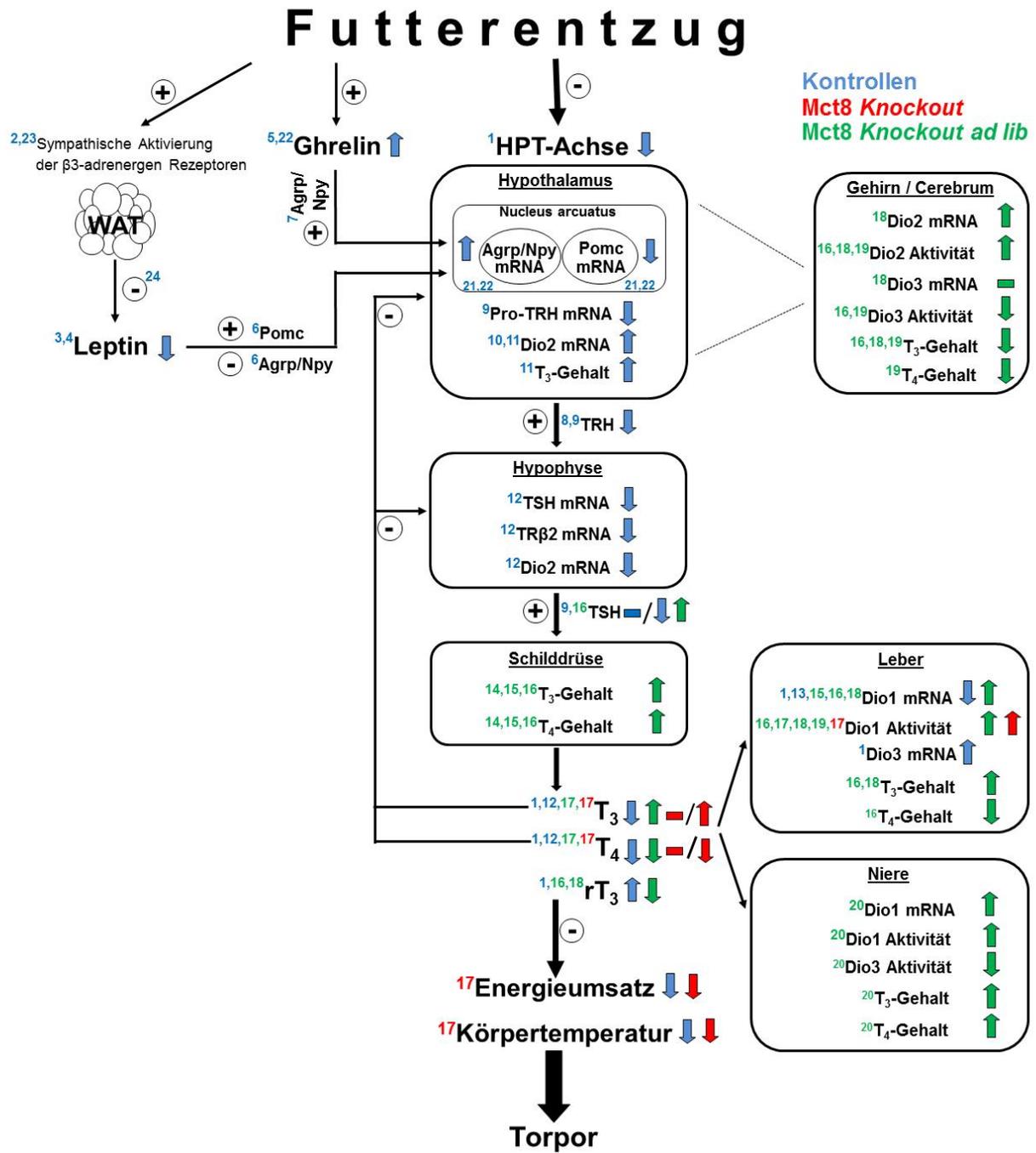
Dass die Mäuse keine Mobilisierungsprobleme der Fettreserven hatten wird auch durch die RER unterstützt, die bei beiden Genotypen vergleichbar war und deutlich unter der RER bei *ad libitum* Fütterung lag. Dies zeigt die Verstoffwechslung von Proteinen und Lipiden während dem Futterentzug an. Bei Mobilisierungsproblemen, wie sie beispielsweise durch *Knockout* der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Atgl) gezeigt werden konnte, wäre eine Absenkung der RER nicht möglich gewesen (Haemmerle et al 2006). Die während der Torporereignisse aufgetretenen starken Schwankungen der RER konnten nicht auf Ungenauigkeiten der Messmethode zurückgeführt werden. Sogenannte "Auswascheffekte", die sich aufgrund der niedrigen Energieumsatzraten während des Torpors und der im Vergleich dazu hohen Absaugrate der Käfigluft ergeben könnten, sind auszuschließen. Sowohl der registrierte Sauerstoffverbrauch (Kap. 3.3.2.2, Abb. 25) als auch die Kohlendioxidproduktion (nicht gezeigt) wiesen keine Schwankungen auf. Diese ergaben sich erst durch die Verrechnung beider Variablen zur RER. Der Befund könnte daher physiologischer Natur sein. Nestler et al. konnten während des Torpors von Hirschmäusen Schwankungen der RER zeigen, die mit einer Veränderung des Kohlendioxidgehalts im

Plasma einhergehen (Nestler 1990). So kann schon eine geringe Verzögerung in der Abatmung des Kohlendioxids in den starken Schwankungen resultieren.

Auf der Suche nach den grundlegenden molekularen Mechanismen des Torporeintritts wurde in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der Parameter begonnen, von denen eine Regulation beim fasteninduzierten Torpor bekannt ist.  $T_3$  hat eine stimulierende Wirkung auf den Energieumsatz. Aufgrund der signifikant erhöhten  $T_3$ -Spiegel bei *ad libitum* Fütterung könnte man erwarten, dass  $Mct8^{-/-}$  Weibchen weniger schnell torpid werden. Auf der anderen Seite führte der hyperthyreote Zustand unter Standardhaltungsbedingungen zu tendenziell erhöhten Energieausgaben, was eine stärkere Energieeinsparung bei Nahrungsmangel notwendig machen könnte. Eine Erklärung des bei den  $Mct8^{-/-}$  Weibchen aufgetretenen Torpors könnte die Veränderung der Schilddrüsenhormonspiegel durch das Fasten sein. Torpide  $Mct8^{-/-}$  Weibchen hatten während des Torpors einen mit nicht torpiden  $Mct8^{+/-}$  Weibchen vergleichbaren  $T_3$ -Spiegel. Im Vergleich zur *ad libitum* Fütterung zeigten sie unter Futterentzug jedoch eine deutlich stärkere Absenkung des  $T_3$ -Spiegels und eine gering höhere des  $T_4$ -Spiegels. Dazu passt, dass nicht torpide Männchen beider Genotypen ebenfalls eine geringere Absenkung des  $T_3$ - Spiegels aufwiesen. Die starke Absenkung der  $T_3$ - und  $T_4$ -Spiegel könnte zu einer Mangelsituation von Schilddrüsenhormonen im Gehirn führen. Die Expression alternativer Schilddrüsenhormontransporter, die für die  $Mct8$ -Defizienz kompensieren könnten, wurde im Gehirn gezeigt (Wirth 2010). Je nach Effizienz der Transporter könnte es unter Futterentzug aufgrund der niedrigen Schilddrüsenhormonspiegel zu einer Unterversorgung kommen, die bei *ad libitum* Fütterung aufgrund des Hyperthyreoidismus nicht vorliegt.

Zudem konnte hier in einer ersten Analyse gezeigt werden, dass die Aktivität der Dejodase 1 (Dio1) in der Leber von  $Mct8^{-/-}$  Weibchen im Vergleich zu  $Mct8^{+/-}$  Weibchen bei *ad libitum* Fütterung erhöht ist. Gleiches ist bereits von  $Mct8$ -defizienten Männchen bekannt (Dumitrescu et al. 2006, Liao et al. 2011). Es ist beschrieben, dass Futterentzug, je nach Dauer, zu einer verminderten Expression und Aktivität der Dio1 führt (Boelen et al. 2008). Interessanterweise war die Aktivität der Dio1 von  $Mct8^{-/-}$  Mäusen im Gegensatz zu  $Mct8^{+/-}$  Mäusen unter Futterentzug nicht verringert. Die Leber könnte sich daher noch immer in einem hyperthyreoten Zustand befinden. Ob die Dio1 bei  $Mct8^{-/-}$  Mäusen weiterhin  $T_4$  zu  $T_3$  dejodiert oder  $T_4$  in inaktives  $rT_3$  umwandelt müsste durch Analyse der Schilddrüsenhormonwerte der Leber untersucht werden.

**Abb.61 (Seite 178): Schematische Zusammenfassung der durch Futterentzug und Futterrestriktion induzierten Veränderungen der HPT-Achse, im Serum und Geweben.** Dargestellt sind die wichtigsten Veränderungen in der HPT-Achse, dem Serum und Geweben von Mct8-defizienten Mäusen bei *ad libitum* (*ad lib*) Fütterung (grüne Pfeile) und unter Futterentzug (rote Pfeile / Balken) sowie in der Literatur beschriebene fasteninduzierte Veränderungen bei Nagetieren (blaue Pfeile / Balken). Durch Futterentzug oder Futterrestriktion (FR) kommt es zu zahlreichen Veränderungen in der zentralen und peripheren Regulation des Energiestoffwechsels. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mct8-defiziente Mäuse unter Futterentzug einen im Vergleich zu den Kontrollen vergleichbaren (Weibchen) bis erhöhten (Männchen) T<sub>3</sub>-Spiegel haben, während die T<sub>4</sub>-Spiegel bei den Männchen, jedoch nicht bei den Weibchen niedriger war. Bei Mct8-defizienten Weibchen wurde zudem eine erhöhte Dio1 Aktivität in der Leber unter Futterentzug gefunden, die im Gegensatz zu den Kontrollen nicht herunter reguliert wurde. Pfeil nach unten: Niedriger, bzw. im Vergleich zu Kontrollen niedriger, Pfeil nach oben: Erhöht, bzw. im Vergleich zu Kontrollen erhöht, Querbalken: Kein Unterschied zu den Kontrollen. Literatur: 1: Boelen et al. 2008, 2: Swoap et al. 2006, 3: Frederich et al. 1995, 4: Ahima et al. 1996, 5: Tschöp et al. 2000, 6: Elias et al. 1999, 7: Kohno et al. 2003, 8: Blake et al. 1991, 9: Legradi et al. 1997, 10: Diano et al. 1998, 11: Coppola et al. 2005, 12: Boelen et al. 2006, 13: Boelen et al. 1996, 14: Di Cosmo et al. 2010, 15: Trajkovic-Arsic et al. 2010a, 16: Liao et al. 2011, 17: Eigene Ergebnisse, 18: Dumitrescu et al. 2006, 19: Trajkovic et al. 2007, 20: Trajkovic-Arsic et al. 2010b, 21: Mizuno et al. 1999, 22: Swart et al. 2002, 23: Reed et al. 2008b, 24: Mantzoros et al. 1996.



#### **4.4.9 Zusammenfassung und Ausblick: Bekanntes und Neues**

In Studien an Mct8-defizienten Mäusen konnten bisher zahlreiche Veränderungen der HPT-Achse gezeigt werden (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Trajkovic-Arsic 2010a). Dazu gehört unter anderem ein veränderter Schilddrüsenhormongehalt im Cerebrum mit weniger T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Liao et al. 2011). Die Schilddrüse von Mct8-defizienten Mäusen hat einen signifikant erhöhten Durchmesser der Follikelzellen sowie erhöhten Gehalt von freiem und an Thyreoglobulin gebundenem T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>, wahrscheinlich aufgrund einer verminderten Sekretion der Schilddrüsenhormone (Di Cosmo et al. 2010, Trajkovic-Arsic et al. 2010a, Liao et al. 2011).

Zudem besteht, abhängig von den im Zielgewebe exprimierten Schilddrüsenhormontransportern und Dejodasen, ein gewebespezifischer Unterschied in der Aufnahme und lokalen Verfügbarkeit der Schilddrüsenhormone: Leber und Niere befinden sich in einem hyperthyreoten Zustand mit einem erhöhtem T<sub>3</sub>- und verringertem T<sub>4</sub>-Gehalt in der Leber (Dumitrescu et al. 2006, Liao et al. 2011) sowie erhöhten T<sub>3</sub>- und T<sub>4</sub>-Gehalt der Niere (Trajkovic-Arsic et al. 2010b). Dies zeigt, dass Mct8 nicht essentiell für die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in die Leber und Niere ist. Mct8-defiziente Mäuse haben zudem eine signifikant erhöhte T<sub>4</sub>- und T<sub>3</sub>- Ausscheidung über den Urin (Trajkovic-Arsic et al. 2010b). Für das Gehirn und primäre cortikale Neurone konnte eine beeinträchtigte Aufnahme von <sup>125</sup>I-T<sub>3</sub> gezeigt werden (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Wirth et al. 2009). Die T<sub>3</sub>-Aufnahme ist jedoch nicht in allen Bereichen des zentralen Nervensystems beeinträchtigt (Trajkovic et al. 2007). Der Befund wird durch Verhaltensversuche gestützt. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass es Gehirnregionen gibt, die auf Mct8 als Schilddrüsenhormontransporter angewiesen sind und bei einer Deletion von Mct8 hypothyreot sind, während andere Regionen, die in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden T<sub>3</sub> stehen und alternative Schilddrüsenhormontransporter exprimieren hyperthyreot sind (Wirth et al. 2009). Ein alternativer Transporter ist der L-Typ-Aminosäuretransporter 2 (LAT2), der auch das Ausbleiben des von AHDS Patienten beschriebenen neurologischen Phänotyps bei den Mct8-defizienten Mäusen erklären könnte: LAT2 wird während der Gehirnentwicklung in den Neuronen von Mäusen, jedoch nicht in den Neuronen von menschlichen Föten exprimiert und könnte so bei der Maus eine kompensatorische Funktion haben (Wirth et al. 2009).

Für Mct8-defiziente Mäuse wurden zudem veränderte Expressionen und Aktivitäten der Dejodasen in verschiedenen Geweben gezeigt. Dazu gehören eine erhöhte mRNA Expression und Aktivität der Dio2 im Cerebrum, während die Expression der Dio3 tendenziell und die Aktivität der Dio3 verringert war (Dumitrescu et al. 2006, Trajkovic et al. 2007, Liao et al. 2011). Auch eine erhöhte mRNA Expression und Aktivität der Dio1 in Leber und Niere ist bekannt, weshalb eine verstärkte Umwandlung von T<sub>4</sub> in T<sub>3</sub> angenommen werden kann,

während die Aktivität der Dio3 in der Niere verringert war (Trajkovic-Arsic et al. 2010b). Neueste Untersuchungen von Mct8-defizienten Mäusen in Kombination mit einer Deletion der Dio1 und Dio2 liefern einen weiteren Ansatz zum Verständnis der Beteiligung von Dejodasen an den veränderten Schilddrüsenhormonspiegeln (Liao et al. 2011). Als nächster Schritt müsste jedoch die Analyse einer Mct8-Defizienz in Kombination mit gewebespezifischen *Knockouts* der Dejodasen folgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss der Mct8-Defizienz bei beiden Geschlechtern untersucht, nachdem sich die in der Literatur beschriebenen Daten bisher vornehmlich auf männliche Mäuse beschränkten. Es konnte gezeigt werden, dass Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen, genau wie die Männchen, erhöhte Serum-T<sub>3</sub>-Spiegel haben. Der T<sub>4</sub>-Spiegel war bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen jedoch nicht verschieden. Hyperthyreote Mct8<sup>-ly</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse haben unter Standardhaltungsbedingungen (24 °C) tendenziell erhöhte Energieausgaben und ein niedrigeres Körpergewicht. Trotz der geringeren Energieausgaben kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mäuse nicht in einer negativen, sondern in einer weniger positiven Energiebilanz als die Kontrollen befanden. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen noch in fortführenden Studien untersucht werden. Hyperthyreote Gewebe wie Leber und Niere (Dumitrescu et al. 2006, Liao et al. 2011, Trajkovic-Arsic et al. 2010b) könnten jedoch zu dem leicht erhöhten Energieumsatz beitragen. Eine veränderte Substratnutzung liegt nicht vor.

Während bei Raumtemperatur sowie in Thermoneutralität und Kälte nur leichte phänotypische Veränderungen in Bezug auf den Energieumsatz bestanden, wurden Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen unter Futterentzug torpid. Dies zeigt ein Kompensationsproblem der Mäuse bei einem Energiedefizit. Anhand der gezeigten Torporereignisse von Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen und der mit der Körpertemperaturabsenkung einhergehenden Energieersparnis wird deutlich, dass die Körpertemperatur einen wichtigen Beitrag an der Regulation der Energiehomöostase hat. Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse können somit dazu beitragen, den generellen Einfluss von Schilddrüsenhormontransportern am Energiestoffwechsel zu untersuchen sowie neue Mechanismen der Torporregulation zu identifizieren. Erste molekulare Untersuchungen zeigen deutliche genotypspezifische Veränderungen während des Torpors, zu denen eine stärkere Absenkung der Schilddrüsenhormonspiegel sowie eine ausbleibende Absenkung der Dio1 Aktivität gehören. Anhand der bisherigen Analysen kann nicht gesagt werden, ob der Torpor der Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse durch zentrale oder periphere Veränderungen vermittelt wird. In einem weiteren Schritt müssten Parameter analysiert werden, von denen eine Beteiligung an der Regulation des Stoffwechsels und insbesondere des Torpors bekannt ist. Dazu gehört die Analyse der Leptin-, Ghrelin- und Insulinspiegel sowie von Metaboliten der Schilddrüsenhormone wie Thyronamin, das eine den Schilddrüsenhormonen

entgegengesetzte Wirkung mit Erniedrigung von Energieumsatz und Körpertemperatur hat. Zudem ist eine Untersuchung der HPT-Achse und weiterer Gewebe, wie der Leber, die zu den veränderten Schilddrüsenhormonspiegeln beitragen, in Hinblick auf die Expression und Aktivität der Deiodasen sowie der Schilddrüsenhormonspiegel, essentiell. Der Hypothalamus ist aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Stoffwechsels für eine primäre Untersuchung interessant. Die Expressionsanalyse der orexygenen Peptide Agrp und Npy sowie des anorexygenen Pomc, des TRH und der Dio2 mittels quantitativer Echtzeit-PCR könnte weitere Erkenntnisse über die zentrale Regulation bringen. Auch die TSH-Expression in der Hypophyse muss für ein umfassendes Bild analysiert werden. Um den Beitrag der zentralen, neuroendokrin vermittelten sowie der peripherer vermittelten Mct8 Defizienz am Torpor zu bestimmen würde sich zudem die Analyse von Mäusen mit gewebespezifischen Deletionen anbieten. So könnte eine neuronenspezifische Deletion von Mct8 weiteren Aufschluss darüber geben, ob dem Torpor Veränderungen in der zentralen Regulation zugrunde liegen.

## **4.5 Einfluss von Hdac2 auf den Energiehaushalt**

Epigenetische Mechanismen wie die Deacetylierung von Histonproteinen durch Histondeacetylasen stehen beim Menschen unter anderem im Zusammenhang mit Krebs, Atemwegs- und neurodegenerativen Erkrankungen. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen ist von großem Interesse und gilt als vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Entwicklung spezifischer Medikamente. Anhand von Mausmodellen mit einer Deletion von Hdac2 konnte bisher gezeigt werden, dass Hdac2 an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt ist, unter anderem des Herzens, Gehirns, Axialskelett und Darm.

In der vorliegenden Dissertation wurde erstmalig der Einfluss der Histondeacetylase2 (Hdac2) auf den Energiehaushalt *in vivo* anhand eines *Knockout*-Mausmodells bei *ad libitum* Fütterung sowie unter Futterentzug und akuter Kälteexposition untersucht.

### **4.5.1 Niedrigeres Körpergewicht**

In allen analysierten Kohorten waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen leichter. Der Gewichtsunterschied resultierte vor allem aus einer niedrigeren Magermasse der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse, während die Fettmasse beider Genotypen nicht signifikant verschieden war. Dies bestätigt den bereits in der Literatur beschriebenen Gewichtsphänotyp, wonach lebensfähige Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse kleiner sind als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse (Trivedi et al. 2007, Zimmermann et al. 2007). Während der genotypspezifische Gewichtsunterschied bei Trivedi et al. im Alter von 8 Wochen nicht mehr vorhanden war, zeigten Zimmermann et al. einen

bleibenden Gewichtsunterschied. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse analysiert, die auf demselben genetischen Hintergrund und die gleiche Weise wie die von Zimmermann et al. 2007 untersuchten Mäuse generiert wurden. Für Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse wurde zudem eine Verringerung von Gehirn und Testis um 25 % sowie ein verkleinertes Axialskelett beschrieben (Zimmermann et al. 2007). Die Deletion von Hdac2 hat somit einen Einfluss auf die Entwicklung der Mäuse. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass Hdac2-defiziente Mäuse, insbesondere in den ersten Wochen nach der Geburt, in ihrer körperlichen Konstitution im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern retardiert sind (Zimmermann et al. 2007). Zum Zeitpunkt des Absetzens ist ein Verlust von bis zu 50 % der Mäuse beschrieben, der jedoch durch intensivere Pflege, wie die Gabe von Breifutter, verringert werden kann (Zimmermann et al. 2007).

#### **4.5.2 Normaler Energieumsatz bei Raumtemperatur und in Thermoneutralität**

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten, auch unter Berücksichtigung des niedrigeren Körpergewichts, einen mit den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbaren täglichen Energieumsatz (DEE) bei Haltungstemperatur (24 °C). Die detaillierte Analyse ergab nur geringe Unterschiede zwischen den Genotypen: Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen hatten einen tendenziell erhöhten mittleren Energieumsatz in der Dunkelphase. Dieser könnte aus einer erhöhten Aktivität resultieren, die jedoch im vorliegenden Versuchsaufbau nicht registriert werden konnte. Zudem zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter in der Dunkelphase einen tendenziell erhöhten Ruhestoffwechsel. Wie man im Verlauf des Energieumsatzes während der Dunkelphase sieht, senkten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse ihren Energieumsatz nicht so stark ab wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse (Kap.3.4.1.2, Abb.36). Dies könnte zu dem erhöhten Ruhestoffwechsel beitragen. Die Unterschiede spiegelten sich jedoch nicht in einem erhöhten DEE wieder und konnten statistisch nicht belegt werden. Die Analyse der rektalen Körpertemperatur als Variable des Energieumsatzes ergab keinen genotypspezifischen Unterschied. Weibchen hatten jedoch eine höhere Körpertemperatur als die Männchen, was den typischen Geschlechtsdimorphismus widerspiegelt (siehe Kap.3.1.5). In thermoneutraler Umgebung (30 °C) hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse keinen auffälligen Energieumsatz.

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse waren sowohl bei einer Umgebungstemperatur, die mit Kosten für die Thermoregulation verbunden ist (24 °C) als auch in thermoneutraler Umgebung ohne thermoregulatorische Kosten, auf Seiten der Energieausgaben weitgehend phänotypisch unauffällig. Dies könnte auf eine kompensatorische Funktion anderer Klasse I Hdacs, insbesondere der Hdac1 zurückzuführen sein, die häufig gemeinsam mit Hdac2 in Proteinkomplexen vorliegt (Grozinger und Schreiber 2002, Brunmeir et al. 2009). Die kompensatorische Funktion von Hdac1 für das Fehlen von Hdac2 wurde bereits bei

gewebespezifischen Deletionen im Herzen (Montgomery et al. 2007) und Gehirn (Montgomery et al. 2009) gezeigt.

Die Hdac2-defizienten Mäuse wurden durch Insertion eines pPT1- $\beta$ geo-Vektors mittels *Gene Trap* generiert (Trivedi et al. 2007, Zimmermann et al. 2007). Bei *Gene Trap* mutierte Genen kommt es vor, dass kein vollständiger Funktionsverlust besteht (Voss et al. 1998). Dies kann aber im hier untersuchten Modell ausgeschlossen werden, weil sowohl der Verlust der katalytischen Aktivität des Hdac2-LacZ Fusionsproteins als auch die fehlende Expression des Wildtypproteins gezeigt werden konnte (Trivedi et al. 2007, Zimmermann et al. 2007).

#### **4.5.3 Normale Substratnutzung bei *ad libitum* Fütterung und in thermoneutraler Umgebung**

Die respiratorische Austauschrate (RER) gibt einen Hinweis auf das verstoffwechselte Substrat. Mäuse nehmen rund 2/3 der täglichen Nahrungsmenge in der Dunkelphase auf (basierend auf eigenen Messungen mit TSE Phenomaster, unveröffentlichte Daten). Dementsprechend zeigten Hdac2<sup>+/+</sup> und Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse während der Analyse des DEE in der Dunkelphase eine im Vergleich zur Lichtphase erhöhte RER, die sich aus der vermehrten Nutzung von über die Nahrung aufgenommenen Kohlenhydraten ergibt. Die mittlere RER beider Genotypen war während der DEE-Messung bei Raumtemperatur (24 °C) sowie in Thermoneutralität (30 °C) nicht signifikant verschieden. Dies zeigt eine normale Substratnutzung.

#### **4.5.4 Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse sind in Kälte hypermetabol**

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter waren in der Lage ihren Energieumsatz mit Absenkung der Umgebungstemperatur im gleichen Maß wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse zu steigern und über den gesamten Zeitraum der Kälteexposition aufrecht zu erhalten. Absolut gesehen war der Energieumsatz zwischen Hdac2<sup>-/-</sup> und Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen in Kälte vergleichbar. Nach Normalisierung auf das niedrigere Körpergewicht waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch deutlich hypermetabol, wobei die Körpertemperatur am Ende der Kälteexposition mit den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbar war. Dieser Befund deutet auf eine ineffizientere Thermogenese hin, was auch anhand eines erhöhten kalkulierten Wärmeverlusts (*Conductance*) bestätigt werden konnte. Ein Grund für den höheren Wärmeverlust könnte eine höhere lokomotorische Aktivität der Mäuse sein, wodurch die isolierende Wirkung des Fells herabgesetzt wird. Die erhöhten Energieausgaben könnten zu der stärkeren Gewichtsabnahme der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse während des Versuchs beigetragen haben. Für eine genauere Aussage müssten die Aktivität sowie die Änderung der Körperzusammensetzung durch die Kälteexposition in einem weiteren Versuch überprüft werden.

Die Analyse der respiratorischen Austauschrate zeigte, dass Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse in der Lage sind ihre RER im gleichen Maße wie Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse abzusenken und während der akuten Kälteexposition vorwiegend Proteine und Lipide als Energiequelle zu nutzen. Der im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhte Plasmagehalt an Triglyceriden sowie unveresterten Fettsäuren und Glycerol lässt auf eine verstärkte lipolytische Aktivität während der Kälteexposition schließen. Die Deletion von Hdac2 hat somit keine Auswirkung auf die Kältetoleranz oder die Thermogeneseleistung der Mäuse.

#### **4.5.5 Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse werden unter Futterentzug hypometabol und hypotherm**

Einige der grundlegenden physiologischen Mechanismen unter Futterentzug wurden bereits bei der Mausmutantenlinie Mct8 beschrieben, weshalb im Folgenden bei Bedarf auf die entsprechenden Kapitel verwiesen wird.

Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten im Verlauf des zweiten Tags des Futterentzugs, insbesondere in der Dunkelphase, einen deutlich niedrigeren mittleren Sauerstoffverbrauch als Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse. Zudem senkten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse ihre Körpertemperatur deutlich stärker ab. Am Ende des Futterentzugs befanden sich die Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse in einer hypometabolen Phase mit geringem Sauerstoffverbrauch. Entsprechend war die rektale Körpertemperatur mit im Mittel unter 29°C signifikant niedriger als die der Hdac2<sup>+/+</sup> Mäuse mit durchschnittlich über 33 °C. Wie bereits in Kapitel 4.4.7 beschrieben, ist die Absenkung von Energieumsatz und Körpertemperatur ein im Tierreich weit verbreiteter Mechanismus zur Energieeinsparung und Regulierung der täglichen Energieausgaben. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse durch das über den Futterentzug herbeigeführte Energiedefizit ein Kompensationsproblem hatten, wodurch eine größere Notwendigkeit zur Energieeinsparung bestand.

Bei der Betrachtung der Einzelverläufe des Sauerstoffverbrauchs zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen während des Futterentzugs deutlich mehr hypometabole Phasen und Torporereignisse. Mehr als die Hälfte der analysierten Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen wurde bereits innerhalb der ersten 24 Stunden des Futterentzugs torpid, während von den Hdac2<sup>+/+</sup> Weibchen nur eines Torpor zeigte. Von den im Vergleich zu den Weibchen deutlich schwereren Hdac2<sup>-/-</sup> Männchen wurde eines innerhalb der ersten 24 Stunden torpid, von den Hdac2<sup>+/+</sup> Männchen keines. Dass Weibchen leichter torpid werden als Männchen ist in der Literatur beschrieben und wurde bereits diskutiert (Swoap und Gutilla 2009, Kap.4.4.8). Im Verlauf des zweiten Tages des Futterentzugs wurden Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse beider Geschlechter hypometabol, wobei jedoch Unterschiede bezüglich des Eintrittszeitpunkts gefunden wurden: Ein Weibchen und zwei Männchen wurden bereits in der Lichtphase hypometabol. Dies lässt nicht auf einen Torporeintritt schließen. Vielmehr deuten die Länge und der sehr geringe Sauerstoffverbrauch darauf hin, dass die Maus ohne Eingriff von außen (Bereitstellung von

Futter) nicht mehr in der Lage war ihren Sauerstoffverbrauch und die Körpertemperatur zu steigern, um aus der hypometabolen Phase auszutreten. Die beschriebenen Mäuse hatten am Ende der Messung auch die niedrigste Körpertemperatur. Brown et al. zeigten ebenfalls, dass Mäuse, die ihre Körpertemperatur unter Futterentzug bereits in der Lichtphase absenkten und hypotherm werden, nicht mehr in der Lage sind diese ohne Futtergabe erneut zu steigern (Brown und Staples 2010). Die übrigen  $Hdac2^{-/-}$  Weibchen senkten ihren Sauerstoffverbrauch, wie für torpide Mäuse unter Futterentzug beschrieben, im Verlauf der Dunkelphase ab (Kap.4.4.7). Da sie jedoch bis zum Ende der Messung hypometabol waren, kann keine genaue Aussage getroffen werden, ob sie in der Lage gewesen wären, ihren Sauerstoffverbrauch erneut zu steigern. Für eine Klärung müsste der Versuch mit einer etwas längeren Messdauer wiederholt werden. Auch bei den Männchen wurden deutlich mehr  $Hdac2^{-/-}$  Männchen als  $Hdac2^{+/+}$  Männchen im Verlauf der Dunkelphase des zweiten Tages des Futterentzugs hypometabol.

#### 4.5.6 Wieso haben $Hdac2^{-/-}$ Mäuse ein Kompensationsproblem?

Bei Nahrungsmangel gibt es zwei grundsätzliche Optionen: Sollen Körpertemperatur und Energieumsatz aufrechterhalten werden, kommt es aufgrund des Energiedefizits zu einer Abnahme der Energiereserven und somit des Körpergewichts. Stehen auf der anderen Seite nicht genügend Reserven zur Verfügung, muss Energie eingespart werden, wobei es zur Absenkung von Körpertemperatur und Energieumsatz kommt. In der Regel besteht jedoch ein *Trade-Off* beider Strategien, so dass viele Mäuse unter akutem Futterentzug eine Kombination aus Temperatur- und Gewichtsabsenkung zeigen (Ehrhardt 2008).

Da der Unterschied im Ausgangsgewicht zwischen  $Hdac2^{-/-}$  und  $Hdac2^{+/+}$  Mäusen gering war, besteht zunächst kein Anhaltspunkt für die verstärkt aufgetretenen torpiden Phasen der  $Hdac2^{-/-}$  Mäuse. Einige der  $Hdac2^{-/-}$  Mäuse verblieben am zweiten Tag des Futterentzugs in der hypometabolen Phase und konnten ihren Sauerstoffverbrauch nicht mehr steigern. Dies lässt vermuten, dass nicht mehr genügend Energiereserven zur Verfügung standen, oder es Probleme in der Energieversorgung gab. Dafür spricht auch, dass  $Hdac2^{-/-}$  Mäuse mehr Gewicht verloren und ihre Körpertemperatur stärker absenkten als  $Hdac2^{+/+}$  Mäuse.

Unter Futterentzug wird zunächst die Energie genutzt, die noch in Form von aufgenommener Nahrung im Magen-Darm-Trakt und Glykogen in der Leber vorliegt. Dabei ist der Magen-Darm-Trakt innerhalb weniger Stunden entleert (Bronson 1987). Auch die Glykogenspeicher der Leber sinken innerhalb kurzer Zeit stark ab (Menahan und Sobociniski 1983). Zudem kommt es bereits nach wenigen Stunden zu einer Abnahme von Fettmasse (Bronson 1987, Bronson et al. 1991). In geringerem Umfang als bei der Fettmasse, kommt es auch zu einem Abbau von Muskelmasse (Cherel et al. 1992), wodurch vornehmlich Proteine verstoffwechselt werden.

Mäuse mit *Knockout* der Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Atgl) werden bereits unter 18-stündigem Futterentzug hypometabol und sind nicht mehr in der Lage ihren Energieumsatz zu steigern (Haemmerle et al. 2006). Zudem sind sie bei akuter Kälteexposition (4 °C) kältesensitiv (Haemmerle et al. 2006). Grund ist der beeinträchtigte Katabolismus von Triglyceriden und der damit einhergehende Mangel an freien Fettsäuren. Verdeutlicht wird die beeinträchtigte Lipolyse zudem durch die fehlende Absenkung der RER unter Futterentzug (Haemmerle et al. 2006). Weil Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse jedoch in der Lage waren ihre RER innerhalb der ersten 36 Stunden mit Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen vergleichbar abzusenken, kann eine schwerwiegender Defekt in der Lipolyse für diesen Zeitraum des Futterentzugs ausgeschlossen werden. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hatten bei akuter Kälteexposition über 5 Stunden zudem keine thermoregulatorischen Schwierigkeiten. Der Anstieg der RER in den letzten Stunden des Fastens zeigt jedoch eine veränderte Substratnutzung der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse. Dies lässt auf eine vermehrte Verstoffwechslung von Proteinen schließen. Die Analyse der Körperzusammensetzung zeigte, dass rund 50 % Gewichtsverlusts bei beiden Geschlechtern und Genotypen aus der Abnahme an Fettmasse resultierte. Der Anteil der Magermasse am Gewichtsverlust war bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen jedoch nicht erhöht (Hdac2<sup>-/-</sup>: 31 %, Hdac2<sup>+/+</sup>: 38 %). Ob die vermehrte Proteinoxidation in den letzten 8 Stunden des Futterentzugs bereits einen erkennbaren Einfluss auf die messbare Magermasse hat, müsste im Weiteren untersucht werden.

Für den Aufwachvorgang aus dem Torpor muss Wärme produziert werden (Oelkrug et al. 2011), weshalb die Verfügbarkeit von Energiereserven eine wichtige Voraussetzung ist. Anhand von Futterrestriktionsversuchen wurde abgeschätzt, dass der Körperfettanteil für den Torporaustritt etwa 1.5 % betragen muss (Yousef und Dill 1971), wobei rund 10 % des Körperfetts nicht mobilisierbar sind (Bronson et al. 1991). Bei den einzelnen Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen beider Geschlechter variierte der Körperfettanteil nach dem Futterentzug zwischen 8.6 % und 21.4 %. Zudem betragen die Fettreserven aller Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse noch deutlich mehr als 10 % der Ausgangsfettmasse (Männchen: Hdac2<sup>-/-</sup>: 49.2 ± 10.53 %; Weibchen: Hdac2<sup>-/-</sup>: 38.2 ± 6.7 %) und müssten daher ausreichend für den Torporaustritt gewesen sein. Warum Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse unter Futterentzug kompensatorische Schwierigkeiten hatten kann aufgrund der bisherigen Daten nicht geklärt werden. Die differentielle Substratnutzung gegen Ende des Futterentzugs belegt jedoch eine beeinträchtigte Lipidnutzung nach längerem Futterentzug. In wieweit diese für bereits am ersten Tag auftretenden Torporereignisse verantwortlich ist, bleibt zu klären.

#### 4.5.7 Zusammenfassung und Ausblick

Unter Standardhaltungsbedingungen (Futter *ad libitum*, Haltungstemperatur von 24 °C) und in Thermoneutralität (30 °C) waren Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse, abgesehen von dem niedrigeren

Körpergewicht, phänotypisch weitgehend unauffällig. Während der akuten Kälteexposition von 5 Stunden bei 5 °C hatten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse, im Gegensatz zum zweitägigen Futterentzug, keine thermoregulatorischen Probleme. Die Analyse der RER zeigte, dass Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse während der Kälteexposition uneingeschränkt auf ihre Fettreserven zurückgreifen konnten. Die Analyse von Plasmaparametern nach erfolgter Kältechallenge zeigte aufgrund des signifikant erhöhten Triglyceridspiegels sowie den erhöhten Spiegeln an unveresterten Fettsäuren und Glycerol eine nicht beeinträchtigte Lipidmobilisierung. Das über den Futterentzug herbeigeführte Energiedefizit stellte Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse hingegen vor energetische Probleme. Dies wird durch den stärkeren Körpergewichtsverlust und die stärkere Körpertemperaturabsenkung im Vergleich zu den Hdac2<sup>+/+</sup> Mäusen verdeutlicht. Viele der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse wurden bereits innerhalb der ersten 24 Stunden torpid und einige verblieben im Verlauf des Futterentzugs in einem hypometabolen Zustand. Die Ursachen dieser metabolischen Störung konnten in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Nach 36-stündigem Futterentzug zeigten Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse einen Anstieg der RER, der auf eine vermehrte Proteinoxidation hinweisen könnte. Der Funktionsverlust von Hdac2 scheint die langfristige Aufrechterhaltung hoher Lipidoxidationsraten im Fastenzustand zu erschweren. Somit sind die Mutanten nicht mehr in der Lage ihre Fettreserven als Energiequelle zu nutzen, während nach funfstündiger Kälteexposition keine beeinträchtigte Lipidnutzung vorlag.

Die Leber als ein wichtiger Ort der Lipidoxidation ist daher ein potentiell Organ für weitere Untersuchungen, z.B. in Form von Genexpressionsanalysen, um die molekularen Ursachen der Fettstoffwechselstörung zu identifizieren. Zudem kommt es durch Futterentzug zu zahlreichen Veränderungen in der zentralen und peripheren Regulation des Energiehaushalts (Kap.4.4.7). Eine Analyse von Plasmaparametern, die in Zusammenhang mit der Energieversorgung stehen (unter anderem T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub>, Leptin, Ghrelin), könnte daher ein weiterer Schritt in der Aufklärung potentieller Mechanismen sein. Ein weiterer Ansatz ist die Analyse der hypothalamischen Genexpression regulativer Gene, die durch die Deletion von Hdac2 verändert sein könnten.

#### **4.6 Die MML Mct8 und Hdac2: Phänotypischer Vergleich unter Futterentzug**

Trotz des vergleichbaren Ausgangsgewichts zwischen Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen (21.7 ± 1.8 g) und Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen (21.5 ± 2.5 g) wurden im Gegensatz zu den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen nicht alle Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen innerhalb der ersten 24 Stunden des Futterentzugs torpid und zeigten in der Regel auch eine kürzere Torpordauer. Dies wird ebenfalls beim Verlauf des Sauerstoffverbrauchs deutlich: Bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen war auch im mittleren Verlauf des

Sauerstoffverbrauchs eine deutliche hypometabole Phase sichtbar (Kap.3.3.2.2, Abb.25B), bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen nicht (Kap.3.4.2.2, Abb.41B). Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen wurden jedoch genau wie Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen gegen Ende des Futterentzugs erneut hypometabol. Die mittlere Körpertemperatur beider Mausmutantenlinien (MML) nach der Messung lag im Mittel unter 30 °C, wobei die Körpertemperaturabsenkung der Hdac2<sup>-/-</sup> Weibchen, genau wie der Körpergewichtsverlust, stärker war. Dies deutet darauf hin, dass die ausgeprägteren Torporereignisse der Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen zu einer größeren Energieeinsparung geführt haben, wodurch es zu einer geringeren Gewichtsabnahme kam. Beide MML hatten unter Futterentzug ein Kompensationsproblem. Während der durch die Deletion von Mct8 resultierende Phänotyp in erster Linie auf Veränderungen der HPT-Achse zu beruhen scheint und in Zeiten einer negativen Energiebilanz eine Energieeinsparung nötig macht, stellt die Deletion von Hdac2 die Mäuse vor größere Probleme der Energieversorgung. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass bei den Hdac2<sup>-/-</sup> Mäusen beide Geschlechter mit einer deutlichen Absenkung der Körpertemperatur reagierten, während eine vergleichbare Absenkung geschlechtsspezifisch nur bei den Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen vorlag. Der Befund wird durch die respiratorische Austauschrate gestützt. Mct8<sup>-/-</sup> Weibchen konnten während des gesamten Futterentzugs uneingeschränkt auf ihre Lipidreserven zurückgreifen und hatten eine mit den Mct8<sup>+/-</sup> Weibchen vergleichbare respiratorische Austauschrate. Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach 36-stündigem Futterentzug hingegen einen Anstieg der respiratorischen Austauschrate, der auf eine vermehrte Proteinoxidation schließen lässt. Demnach scheint die Nutzung der Lipide beeinträchtigt gewesen zu sein.

Die Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit von detaillierten Analysen zur Identifizierung neuer Phänotypen, weil die Weibchen beider MML am Ende der Messung zwar eine mittlere Körpertemperatur unter 30 °C aufwiesen, das thermoregulatorische Verhalten während dem Futterentzug jedoch deutlich verschieden war. Neben der Analyse des Sauerstoffverbrauchs empfiehlt sich auch eine kontinuierliche Aufzeichnung der Körpertemperatur. Dies kann über temperatursensitive Transmitter geschehen, die in die Bauchhöhle implantiert werden. Dies war bei beiden MML aufgrund des niedrigen Körpergewichts der weiblichen Mutanten und dem hohen Gewicht von Mini Mittern (rund 1.5 g, 3000er Serie; Mini Mitter Company, Inc.) nicht durchführbar.

#### **4.7 Einfluss von Ugcg auf den Energiehaushalt**

Die UDP-Glukose-Ceramid-Glukosyltransferase (Ugcg) ist das Schlüsselenzym der Synthese von Gangliosiden, die vermehrt in Neuronen und Gliazellen vorkommen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Glykosphingolipide essentiell für die Embryonalentwicklung sowie die Gehirnentwicklung sind (Yamashita et al. 1999, Jennemann et al. 2005). Die

Induzierbarkeit des *Ugcg-Knockouts* im Vorderhirn der Mäuse über Tamoxifen ermöglichte die Analyse des Gangliosidmangels auf die Körpergewichts-, Körperzusammensetzung- und Körpertemperaturentwicklung im zeitlichen Verlauf, ohne vorherigen Einfluss der Deletion auf die Entwicklung der Mäuse. Durch die Analyse der Energieaufnahme und Energieausgabe konnte so die Energiebilanz bestimmt werden.

#### **4.7.1 *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse waren in der 2. Woche nach Induktion phänotypisch unauffällig**

Für keinen der analysierten Parameter (Gewicht, Körperzusammensetzung, Körpertemperatur, Energieumsatz und respiratorische Austauschrate) wurden in der 2. Woche nach Induktion (p.i.) signifikante genotypspezifische Unterschiede gefunden. Eine Analyse des Hippocampus mittels Dünnschichtchromatographie zeigte eine stabile und signifikante Reduktion der Ganglioside 3 Wochen p.i. (Grube 2010). Es wurden jedoch noch geringe Mengen Ganglioside nachgewiesen. Diese resultierende wahrscheinlich von Gliazellen, die nicht von der Tamoxifen induzierten Deletion betroffen waren. Da in der 2. Woche p.i. kein metabolischer Phänotyp gefunden wurde, kann angenommen werden, dass dieser nicht direkt proportional zur Gangliosidmenge ist, sondern sich erst bei Unterschreitung einer kritischen Schwelle entwickelt.

#### **4.7.2 Zeitliche Dissoziation zwischen Gewichtszunahme und Hypothermie**

*Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten zwischen der 3. und 5. Woche p.i. eine deutliche Gewichtszunahme, während die Körpertemperatur erst in der 5. Woche p.i. abgesenkt wurde. In einer unabhängigen Kohorte konnte mit Beginn der Gewichtszunahme (3. Woche p.i.) eine signifikante Gangliosidreduktion gezeigt werden (Grube 2010). Aufgrund der zeitlichen Dissoziation zwischen der Gewichtszunahme und Hypothermie konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Körpertemperatur nicht zur Gewichtszunahme beitrug. Das Ungleichgewicht im Energiehaushalt, das zu der stärker positiven Energiebilanz der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den *Ugcg*<sup>+/+</sup> Mäusen von rund 4 kJ d<sup>-1</sup> führte, resultierte hauptsächlich aus der klaren Hyperphagie in der 3. Woche p.i. und damit einhergehender erhöhter metabolisierbarer Energie.

Auf Seiten der Energieausgaben hatten *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse in der 5. Woche p.i. absolut gesehen einen signifikant erhöhten Energieumsatz. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht waren sie tendenziell hypometabol, während die Normalisierung auf die Magermasse keinen genotypspezifischen Unterschied ergab. *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse hatten absolut gesehen eine deutlich erhöhte Fettmasse, während für die Magermasse nur geringe Unterschiede bestanden. Da die Fettmasse im Vergleich zur Magermasse stoffwechselphysiologisch weniger aktiv ist, kann es bei Normalisierung auf das Körpergewicht zu einer Unterschätzung des

Energieumsatzes kommen, was besonders bei stark adipösen Mäusen der Fall ist (Butler und Kozak 2010, Tschöp et al. 2011). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Fettmasse metabolisch nicht inert ist und so bei adipösen Mäusen ebenfalls einen Anteil am Energieumsatz hat, der bei alleiniger Normalisierung für die Magermasse nicht berücksichtigt wird (Tschöp et al. 2011). Um eine genauere Einschätzung darüber zu erhalten, ob Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse in der 5. Woche p.i. hypometabol waren und welchen Beitrag die Körpertemperatur hatte, wird im Folgenden durch einige theoretische Rechenbeispiele eine grobe Annäherung an die Fragestellung durchgeführt:

Anhand der Regressionsgleichung, die man nach Auftragung des Energieumsatzes gegen das Körpergewicht für Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse erhält ( $y = 19.577 x + 33.701$ , Kap.3.5.2.3, Abb.54C), lässt sich der theoretische Energieumsatz berechnen, den Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse mit einem mittleren Körpergewicht von Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen hätten. Vergleicht man diesen mit dem tatsächlichen Energieumsatz der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse, erhält man eine theoretische Energieeinsparung von rund  $3.82 \text{ kJ d}^{-1}$ . Dies liegt in einem biologisch relevanten Bereich und lässt auf einen leichten Hypometabolismus der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse schließen. Es ist somit möglich, dass neben der gezeigten Hyperphagie in der 3. Woche p.i. auch der Energieumsatz zu der positiven Energiebilanz beiträgt.

Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse hatten in der 5. Woche p.i. eine signifikant niedrigere Körpertemperatur. Um den Beitrag der Körpertemperaturabsenkung am geringeren Energieumsatz (HP) zu bestimmen, wurde eine Modellrechnung unter Anwendung von Daten aus der Literatur durchgeführt: Eine rund 22 g schwere Maus, die an  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  akklimatisiert wurde, hat bei Raumtemperatur ( $T_a = 24 \text{ }^\circ\text{C}$ ) eine Wärmedurchgangszahl (C) von rund  $25 \text{ mW }^\circ\text{C}^{-1}$  (Meyer et al. 2010). Nimmt man nun an, dass sich lediglich die Körpertemperatur ( $T_b$ ) als Variable der Gleichung zur Bestimmung der Wärmedurchgangszahl ändert ( $C [\text{mW }^\circ\text{C}^{-1}] = \text{HP} [\text{mW}] (T_b[^\circ\text{C}] - T_a[^\circ\text{C}])^{-1}$ ), beträgt die Energieeinsparung der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse durch die im Mittel  $0.95 \text{ }^\circ\text{C}$  niedrigere Körpertemperatur im Vergleich zu den Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen rund  $2.03 \text{ kJ d}^{-1}$ . So ergibt sich etwa die Hälfte der theoretischen Energieeinsparung von rund  $3.82 \text{ kJ d}^{-1}$  alleine durch die niedrigere Körpertemperatur. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich der Körpergewichtsunterschied zwischen den "Modellmäusen" und den deutlich schwereren Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen auf die Körpertemperatureinsparung auswirken kann, da größere Mäuse ein günstigeres Verhältnis von Volumen und Körperoberfläche haben und somit einen geringeren Wärmeverlust aufweisen. Daher könnte der Beitrag der Körpertemperatur an der Energieeinsparung tendenziell noch unterschätzt sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse tendenziell hypometabol waren und der niedrigere Energieumsatz daher ebenfalls einen geringen Beitrag an der positiven Energiebilanz hatte, wobei diese jedoch hauptsächlich durch die Hyperphagie der Mäuse herbeigeführt wurde.

Die große Variabilität in der kalkulierten Energiebilanz zwischen der 3. und 5. Woche p.i., die insbesondere bei den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen bestand, kann zum einen auf die Induzierbarkeit des *Knockouts* und die damit verbundene individuelle Reaktion der Mäuse zurückgeführt werden. So begann die Gewichtszunahme nicht bei allen  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen am gleichen Tag p.i., sondern unterlag leichten zeitlichen Verschiebungen von 1-2 Tagen. Auch der Betrag der Gewichtszunahme während der Bestimmung der Energieaufnahme (3. Woche p.i.) war verschieden stark. Zudem war die zeitgleiche Bestimmung von Energieaufnahme und Energieumsatz technisch nicht möglich, wodurch etwa 2 Wochen zwischen beiden Analysen lagen. Trotz der nicht zeitgleichen Bestimmung konnte jedoch wie zu erwarten und genotypunabhängig gezeigt werden, dass Mäuse mit einer stärkeren Zunahme an Körpergewicht eine positivere Energiebilanz hatten. Dies unterstreicht die Plausibilität der Kalkulation. Basierend auf der Körpergewichtsänderung und Futteraufnahme ist es möglich, den Energieumsatz rechnerisch in einer groben Annäherung zu bestimmen (Weiss et al. 1998). Dies wurde für den Zeitpunkt der Energieaufnahmebestimmung in der 3. Woche p.i. exemplarisch durchgeführt, um die zeitliche Differenz bei der bisherigen Berechnung der Energiebilanz zwischen der 3. und 5. Woche p.i. zu umgehen. Basierend auf den gemessenen Daten der Energieaufnahme und den daraus resultierenden kalkulierten Energieausgaben ergibt sich in der 3. Woche p.i. für  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse ein Energieüberschuss von rund  $4.0 \text{ kJ d}^{-1}$  und rund  $9.9 \text{ kJ d}^{-1}$  für die  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse. Dies entspricht in etwa den kalkulierten Energieüberschüssen aus den tatsächlich gemessenen Werten in der 3. und 5. Woche p.i. ( $Ugcg^{+/+}$ :  $4.72 \pm 6.34 \text{ kJ d}^{-1}$ ,  $Ugcg^{-/-}$ :  $8.81 \pm 14.42 \text{ kJ d}^{-1}$ ) und unterstreicht die klar positive Energiebilanz der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse in diesem Zeitraum.

Bei der Regulation der Energiehomöostase kommt dem Hypothalamus eine zentrale Rolle in der Verarbeitung peripherer Signale zu (Schwartz et al. 2000, Morton et al. 2006). 19 Wochen p.i. konnte eine signifikante Abnahme der Ganglioside im Hippocampus, der Großhirnrinde und dem Hypothalamus gezeigt werden (Grube 2010). Die Analyse der Cre-Aktivität ergab eine starke Expression u.a. im Nucleus arcuatus und der mittleren präoptischen Region des Hypothalamus (Grube 2010), den Hauptregionen des zentralen Nervensystems zur Regulation von Körpergewicht und Körpertemperatur. Die Regulation der Nahrungsaufnahme findet hauptsächlich im Nucleus arcuatus des Hypothalamus statt, in dem sich anorexygene Proopiomelanocortin (Pomc)-Neurone und orexygene *agouti-related peptide* (Agrp)- / Neuropeptid Y (Npy)- Neurone mit Rezeptoren zur Integration peripherer Signale befinden, unter anderem für Leptin, Insulin und Ghrelin (Schwartz et al. 2000, Morton et al. 2006). Das von den Adipozyten gebildete Leptin sowie das vom Pankreas gebildete Insulin spiegeln den Körperfettgehalt wieder (Bagdade et al. 1967, Maffei et al. 1995), weshalb sie bei Energieüberschuss erhöht sind. Das im Magen gebildete Ghrelin wird

hingegen verstärkt bei Nahrungsmangel gebildet (Tschöp et al. 2000). Dementsprechend inhibieren erhöhte zirkulierende Leptin- und Insulinspiegel die Agrp- / Npy- Neuronen und aktivieren andererseits die Pomc-Neuronen, was letztendlich in einer verringerten Nahrungsaufnahme resultiert, während Ghrelin eine gegenteilige Wirkung hat (Schwartz et al. 2000, Morton et al. 2006). In der Literatur findet man sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Hinweise auf eine Beteiligung von Gangliosiden an der Regulation von Rezeptoren. *In vitro* konnte eine Beteiligung an der Aktivität des Insulinrezeptors sowie von Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren gezeigt werden (Mutoh et al. 1995, Miljan und Bremer 2002, Tagami et al. 2002). GM3-Synthase defiziente Mäuse sind aufgrund einer erhöhten Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Muskel insulinresistiver und resistent gegenüber einer diätinduzierten Insulinresistenz (Yamashita et al. 2003). Basierend auf den Befunden könnte das in der vorliegenden Arbeit gezeigte Ungleichgewicht des Energiehaushalts, aufgrund des Gangliosidmangels, auf einer veränderten Sensitivität von Neuronen im Hypothalamus auf periphere Signale basieren. Tatsächlich konnte eine verminderte Sensitivität für orexygene Npy-Neurone und anorexygene  $\alpha$ -Melanozyten stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH)-positive Neuronen des Nucleus arcuatus gegenüber peripheren Signalen wie Leptin gezeigt werden (Grube 2010).

Nach der starken initialen Gewichtszunahme zeigten  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse eine nur noch geringe Zunahme, deren Verlauf mit dem der  $Ugcg^{+/+}$  Mäuse vergleichbar war. Im Gegensatz zur 3. Woche p.i. waren sie in der 6.-7. Woche p.i. nach Normalisierung auf das erhöhte Körpergewicht nicht mehr hyperphag und metabolisierten die Energie, die man für ihr Körpergewicht erwartet. Dies könnte auf kompensatorische Mechanismen zurückzuführen sein. So wird der Hypothalamus zwar als Hauptgebiet im zentralen Nervensystem zur Verarbeitung der peripheren Signale wie Leptin angesehen, Leptinrezeptoren werden jedoch auch in anderen Gehirnregionen exprimiert, die ebenfalls an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind (Mercer et al. 1996, Grill et al. 2002, Morton et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Leptininjektionen in den ventromedialen Hypothalamus (VMH) zur Gewichtsabnahme führen (Sato et al. 1997).  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse zeigen im VMH keine Cre-Aktivität (Grube 2010), weshalb er kompensatorisch wirken könnte.

Der Energieumsatz in der 9. Woche p.i. war absolut gesehen nicht signifikant verschieden. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht ergab sich ein tendenziell niedrigerer Energieumsatz der schwereren  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse, während er, wie schon in der 5. Woche p.i., nach Normalisierung auf die stoffwechselphysiologisch aktivere Magermasse nicht verschieden war. Sowohl in der 6.-7. Woche p.i. als auch in der 9. Woche p.i. war die Körpertemperatur der  $Ugcg^{-/-}$  Mäuse signifikant niedriger. Der vergleichbare Verlauf im Körpergewicht zwischen beiden Genotypen nach der initialen Gewichtszunahme zeigt, dass

die potentielle Energieeinsparung durch die niedrigere Körpertemperatur gering war. Nach der anfänglichen stark positiven Energiebilanz führte somit die Normalisierung der Nahrungsaufnahme zu einer weitgehend ausgeglichenen Energiehomöostase. Dies unterstreicht den starken Beitrag der Hyperphagie an der positiven Energiebilanz bei der initialen Gewichtszunahme. Eine Aussage über die Energiebilanz zwischen der Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i. und den Energieausgaben in der 9. Woche p.i. war nicht möglich, da einige Mäuse, die sich nach der Kalkulation in einer negativen Energiebilanz befanden, nicht wie zu erwarten eine Gewichtsabnahme, sondern keine Körpergewichtsveränderung bis hin zur Gewichtszunahme zeigten. Gründe für den Befund könnte die geringe Zunahme an Körpergewicht in diesem Zeitraum sein. Dies erschwert die Analyse des Energiebudgets, weil die geringen Veränderungen im Energiehaushalt durch die verwendeten Techniken nicht mehr zu detektieren sind. Hinzu kommt die Zeitspanne, die zwischen der Bestimmung von Energieaufnahme und den Energieausgaben lag und die Tatsache, dass Mäuse tägliche Schwankungen im Körpergewicht zeigen und ihren Energiehaushalt auf einer täglichen Basis regulieren, weshalb geringe Verschiebungen nicht mehr zu Messen sind.

Die lokomotorische Aktivität als Variable der Energieausgaben war nicht verändert, auch wenn für adipöse Mäuse eine verringerte Aktivität beschrieben wurde (Pelleymounter et al. 1995, Hesse et al. 2010). Dabei sind jedoch die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen zur Bestimmung der Aktivität sowie der Grad des Übergewichts zu berücksichtigen. Beim Umgang mit den Mäusen wurde ein aggressiveres und unruhigeres Verhalten der  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen beobachtet, dass sich jedoch nicht in einer erhöhten Aktivität im Versuch widerspiegelte.

#### **4.7.3 Vermehrte Fettspeicherung und beeinträchtigte Glukosetoleranz**

Die Zunahme an Körpergewicht resultierte aus einer deutlichen Zunahme an Fettmasse, während es bei der Magermasse nur geringe Veränderungen gab. Die Normalisierung auf das Körpergewicht ergab eine deutliche Verschiebung der Körperzusammensetzung mit höherer Fettmasse und niedrigerer Magermasse als man für ihr im Vergleich zu den  $Ugcg^{+/+}$  Mäusen erhöhtes Körpergewicht erwartet. Dabei waren sowohl die subkutane als auch die viszerale Fettmasse erhöht. Übergewicht und Adipositas gehen oft mit einem gestörten Glukosestoffwechsel und gestörter Insulinsensitivität einher (Kahn et al. 2006). Insbesondere die viszerale Fettmasse wird mit einem erhöhten Risiko für metabolische Erkrankungen, wie Diabetes, in Verbindung gebracht (Bosello und Zamboni 2000, Després und Lemieux 2006, Fox et al. 2007). Auch bei den  $Ugcg^{-/-}$  Mäusen gingen das erhöhte Körpergewicht und die erhöhte Fettmasse, trotz niedrigerem basalen Glukosespiegel, mit einer deutlich eingeschränkten Glukosetoleranz sowie einer leicht verringerten

Insulinsensitivität einher. Das Ergebnis deutet erneut darauf hin, dass es durch den Gangliosidmangel zu einer Beeinträchtigung der zentralen Regulation des Energiehaushalts kommt, die nicht vollständig kompensiert werden konnte. In Studien mit diabetischen und über eine Diät induzierten adipösen Nagetieren wurde unter anderem gezeigt, dass die systemische Inhibierung der Ugcg zu einer Verbesserung der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität führt sowie in einer Reduzierung von Fettleber und verbesserter Funktion des Fettgewebes resultiert (Aerts et al. 2007, van Eijk et al. 2009, Zhao et al. 2009, Yew et al. 2010). Da es sich bei diesen Studien um eine systemische Blockierung durch Inhibitoren handelte, sind die verschiedenen Befunde nicht als ungewöhnlich anzusehen. Es stellt sich zudem die Frage nach der Spezifität der Inhibitoren, die auch Einfluss auf andere Stoffwechselwege nehmen könnten. Die Deletion der GM3-Synthase in einem *Knockout*-Mausmodell führte aufgrund einer erhöhten Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Skelettmuskel zu einer verbesserten Insulinsensitivität (Yamashita et al. 2003). Da es sich um eine konstitutive Deletion handelte, ist dies ebenfalls nicht mit dem zentralnervösen *Knockout* des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modells vergleichbar. Gleiches gilt für den *Knockout* der Ugcg in Hepatozyten, der keinen Einfluss auf den Glukose- und Lipoproteinmetabolismus der Mäuse hatte (Jennemann et al. 2010).

#### 4.7.4 Verschiebung der Substratnutzung

Die respiratorische Austauschrate (RER) gibt Auskunft über das zur Energiegewinnung genutzte Substrat, wobei RERs zwischen 0.7 und 1.0 im physiologischen Bereich liegen. Eine RER von 1.0 zeigt eine ausschließliche Oxidation von Kohlenhydraten an, eine RER von 0.7 eine reine Fettoxidation (Elia und Livesey 1988). Liegt die RER um 0.8 und tiefer weist dies auf eine vermehrte Protein- und Lipidoxidation hin, wie sie unter mehrstündigem Fasten gefunden wird (Kap.3.3.2.3 und Kap.3.4.2.3). Sowohl in der 5. als in der 9 Wochen p.i. zeigten Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse eine deutliche Verschiebung der Substratnutzung mit erhöhter RER, was auf eine vermehrte Oxidation von Kohlenhydraten hinweist. Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs zeigte, dass die erhöhte RER maßgeblich aus einer signifikant erhöhten RER in der Dunkelphase resultierte. Dabei wurde in der Dunkelphase ein Anstieg der RER über 1.0 gefunden. Dies liegt außerhalb des physiologischen Bereichs, könnte jedoch auf eine vermehrte Lipidsynthese hinweisen (Elia und Livesey 1988). Auffällig war zudem der starke und schnelle Anstieg der RER mit Beginn der Dunkelphase. Dabei handelt es sich wahrscheinlich noch nicht um eine vermehrte Oxidation von Kohlenhydraten, die über die Nahrung aufgenommen werden. Vielmehr scheinen Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse mit Beginn der Dunkelphase direkt auf ihre Glykogenreserven zurückzugreifen. Die zugrundeliegenden physiologischen Mechanismen müssen in weiteren Versuchen analysiert werden. So könnte

eine Blutgasanalyse zur Bestimmung des Partialdrucks von Sauerstoff und Kohlendioxid sowie des pH-Werts durchgeführt werden.

#### **4.7.5 Die Fütterung einer HFD führt zur Verstärkung des Gewichtsphänotyps**

Die Fütterung der hochkalorischen Diät (HFD) führte zu einer Verstärkung des Gewichtsphänotyps, mit einer deutlicheren Zunahme an Körpergewicht, im Vergleich zur Fütterung der Standarddiät (CD). Der Befund unterstreicht erneut die beeinträchtigte Regulation der Energiehomöostase. *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse auf HFD zeigten, genau wie auf CD, eine initiale Phase mit starker Gewichtszunahme, die ebenfalls in der 3. Woche p.i. einsetzte. Interessanterweise war die Körpertemperatur der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse auf HFD im Verlauf gering höher als die der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse auf CD. Dabei könnte es sich um diätinduzierte Thermogenese handeln, einen kompensatorischen Mechanismus, der zur Verbrennung überschüssiger Energie diskutiert wird (Rothwell und Stock 1979, Kozak 2010, Fromme und Klingenspor 2011).

#### **4.7.6 Reproduzierbarkeit des Phänotyps**

Da sowohl die konstitutive als auch die gewebespezifische Deletion von *Ugcg* im Gehirn sind während der Embryonalentwicklung oder den ersten Lebenswochen letal (Yamashita et al. 1999, Jennemann et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des gewebespezifischen, durch Tamoxifen induzierbaren, *Knockouts* im Vorderhirn der Mäuse auf den Energiehaushalt analysiert. Dies bietet den Vorteil, die Auswirkung der Deletion zu einem beliebigen Zeitpunkt in der juvenilen oder adulten Maus zu analysieren, ohne zuvor Einfluss auf die Entwicklung der Maus zu nehmen. So treten insbesondere während der Gehirnentwicklung deutliche Veränderungen der Gangliosidzusammensetzung auf (Yu et al. 2009). Durch die Induktion des *Knockouts* zu einem späteren Zeitpunkt ist die regelgerechte Entwicklung des Gehirns gewährleistet. Zudem können kompensatorische Mechanismen, die durch andere Gene auftreten könnten, umgangen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gewichts- und Körpertemperaturentwicklung von *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse unter Fütterung einer CD in zwei unabhängigen Kohorten gezeigt (Abb.48). Der Körpergewichtsphänotyp trat bei beiden Kohorten in der 3. Woche p.i. auf und konnte stabil reproduziert werden. Dies zeigt die Zuverlässigkeit der Deletion über Tamoxifeninjektion. Beim Vergleich der Körpertemperaturentwicklung bestanden jedoch leichte Unterschiede zwischen beiden Kohorten. So war in der ersten Kohorte (Abb.48A) eine deutliche Temperaturabsenkung der *Ugcg*<sup>-/-</sup> Mäuse beginnend in der 5. Woche p.i. sichtbar, während in der zweiten Kohorte keine deutliche Absenkung zu einem bestimmten Zeitpunkt gefunden wurde (Abb.48B). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der zweiten Kohorte keine *Ugcg*<sup>+/+</sup> Mäuse für einen

direkten Vergleich analysiert wurden. Beim Vergleich mit der Körpertemperatur der Ugcg<sup>+/+</sup> Mäuse der ersten Kohorte auf CD konnte jedoch eine niedrigere Körpertemperatur der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse, insbesondere auf CD gezeigt werden. Der Temperaturphänotyp konnte darüber hinaus in zwei weiteren Kohorten (Ergebnisse nicht gezeigt) nochmals bestätigt werden, weshalb auch dieser Phänotyp als reproduzierbar angesehen werden kann. Zusammengefasst ist die über Tamoxifen induzierbare zeit- und gewebespezifische Deletion eine zuverlässige Methode mit reproduzierbarem Phänotyp.

#### 4.7.7 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der primären Analyse der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse wurden ein im Vergleich zu den Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhtes Körpergewicht und eine niedrigere rektale Körpertemperatur gefunden. Daher wurde die Hypothese generiert, dass die niedrigere Körpertemperatur zur Energieeinsparung führt und somit zu dem erhöhten Körpergewicht beiträgt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es eine deutliche zeitliche Dissoziation von rund 2 Wochen zwischen der beginnenden Gewichtszunahme in der 2. Woche p.i. und der Absenkung der Körpertemperatur in der 5. Woche p.i. gibt. Die Körpertemperatur trug somit nicht zur Gewichtszunahme bei. Dies verdeutlicht, dass ein erhöhtes Körpergewicht nicht zwangsläufig mit einer niedrigeren Körpertemperatur einhergeht, was auch im Rahmen der Evaluierung des Primärscreens gezeigt werden konnte (siehe Kap.3.1.6). Die Induzierbarkeit des *Knockouts* ermöglicht es Mechanismen der Gewichtszunahme zu untersuchen, die unabhängig von einer veränderten Körpertemperatur sind. Durch die Bestimmung der Energieaufnahme und Energieausgaben konnte gezeigt werden, dass sich die Mäuse in einer positiven Energiebilanz befanden. Der tägliche Energieüberschuss gegenüber den Kontrollen, der im stärkeren Gewichtsanstieg resultierte, betrug rund 4 kJ d<sup>-1</sup>. Bereits kleine Verschiebungen im Energiebudget haben somit eine deutliche Auswirkung auf den Energiehaushalt, bzw. das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung. Die Analyse der Körperzusammensetzung ergab, dass die Veränderung des Gewichts auf einer Zunahme von Fettmasse basierte. Auch die insbesondere in der Dunkelphase stark erhöhte RER, die mit über 1.0 in dieser Phase außerhalb des normalen physiologischen Bereichs lag deutet auf eine vermehrte Lipidsynthese hin.

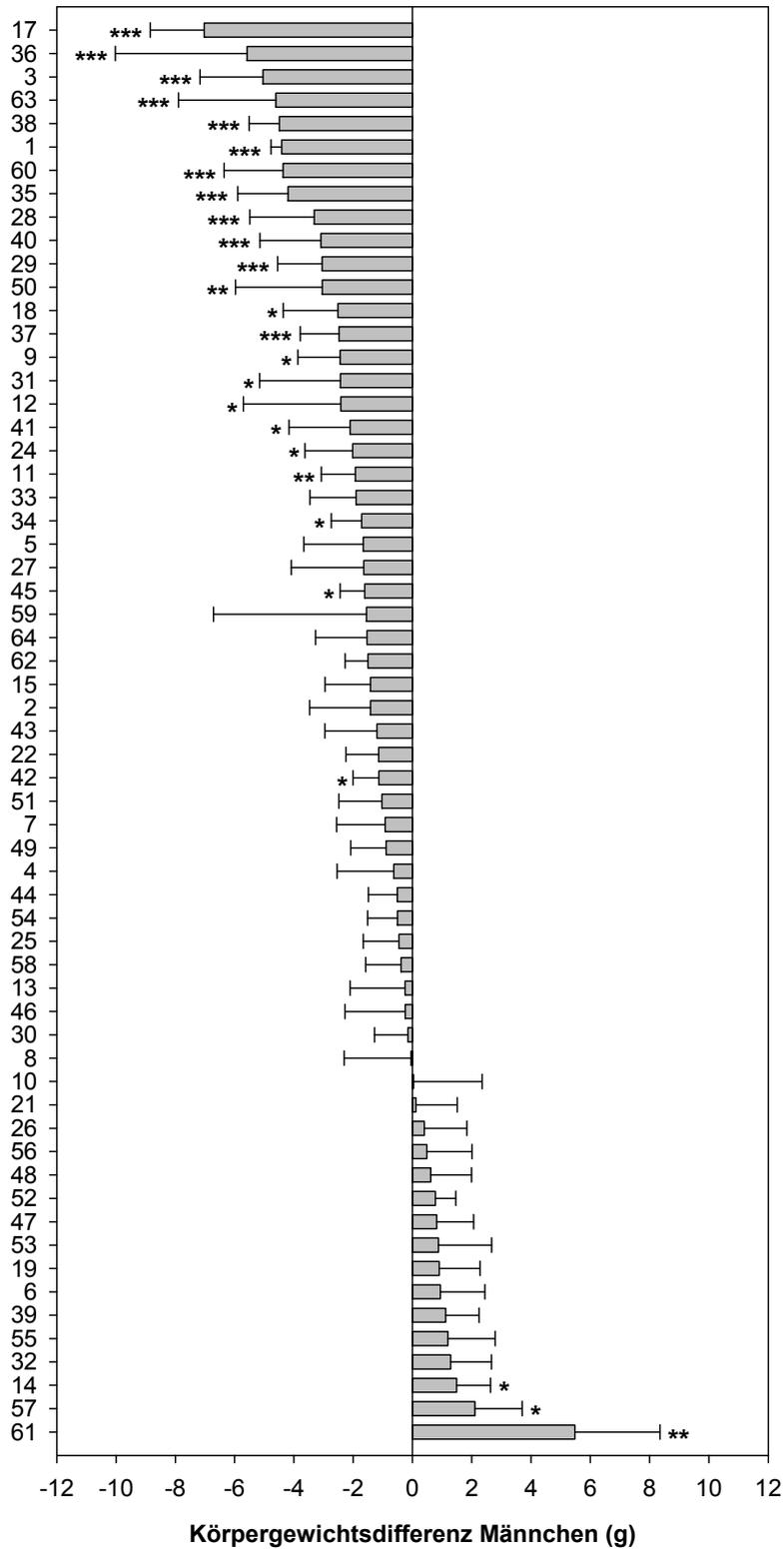
Die Regulation der Körpertemperatur findet, wie die Regulation des Körpergewichts, im Hypothalamus statt, jedoch nicht im Nucleus arcuatus, sondern in der präoptischen Region (Morrison et al. 2008, Morrison und Nakamura 2011, Nakamura 2011). Das zeitlich getrennte Auftreten beider Phänotypen könnte auf einen unterschiedlich schnellen Abbau der Ganglioside in verschiedenen Regionen des Hypothalamus nach der Induktion basieren. In einem weiteren Schritt müsste daher der Gangliosidabbau in den Regionen des Hypothalamus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion analysiert werden. Zudem

verdeutlicht die Datenlage, dass bei einem phänotypischen Befund von Körpergewicht und Körpertemperatur nach Möglichkeit beide Parameter im zeitlichen Verlauf analysieren werden sollten und nicht nur zu einem Zeitpunkt, da dies zu Fehlinterpretationen führen kann. Zum Induktionszeitpunkt des *Knockouts* (rund 6 Wochen) befanden sich die Mäuse noch im Wachstum. In einem nächsten Schritt wäre die Induktion zu einem späteren Zeitpunkt in adulten Mäusen interessant, um den Einfluss des Gangliosidmangels auf die Energiehomöostase zu untersuchen.

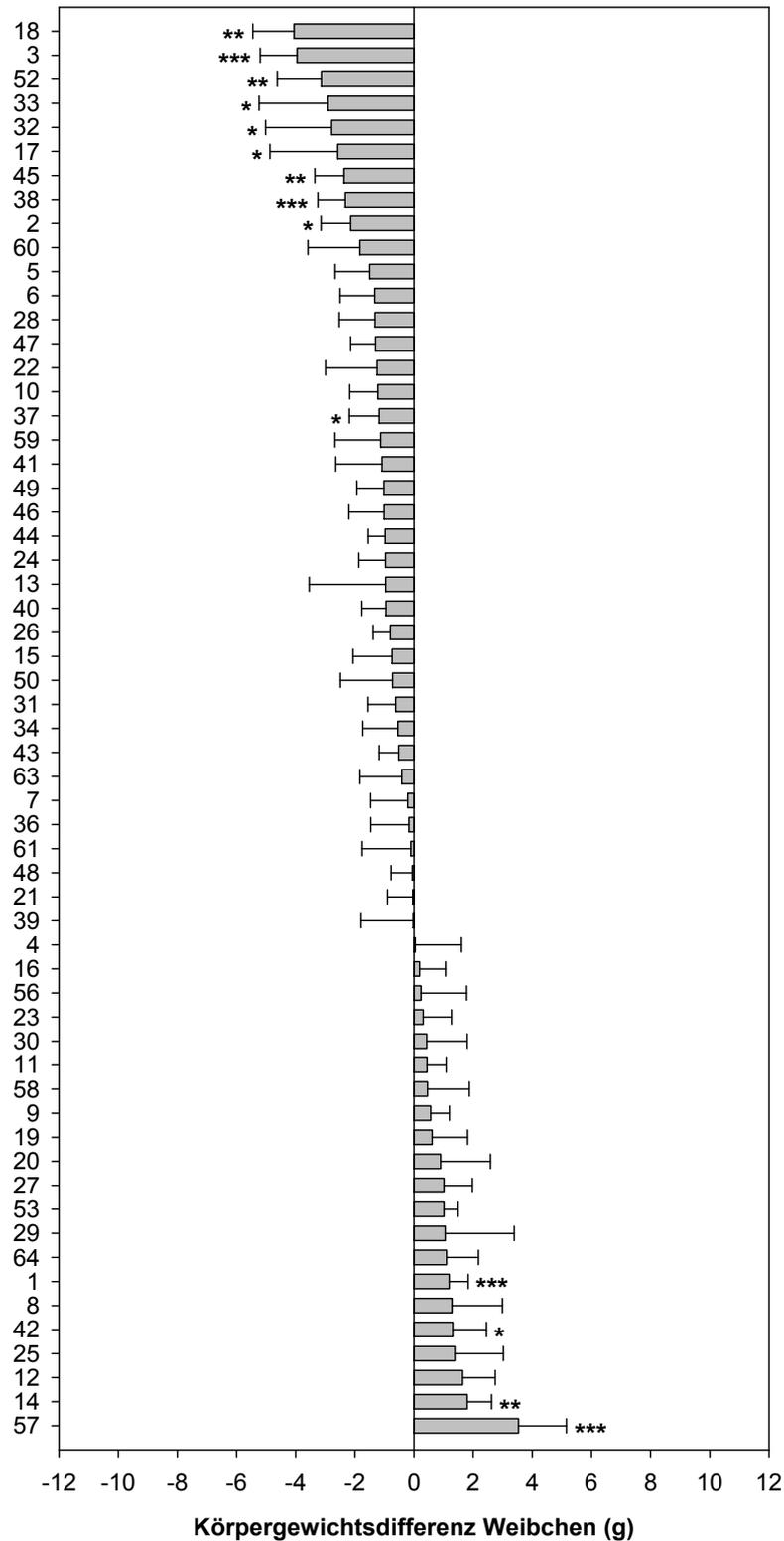
Viele neurodegenerative Erkrankungen sind mit Störungen in der Regulation des Energiehaushalts wie Übergewicht und Diabetes assoziiert, die als Risikofaktor für deren Entstehung angesehen werden (Ristow 2004, Luchsinger und Gustafson 2009). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Aufklärung grundlegender molekularer Mechanismen, die an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind. Anhand des induzierbaren *Knockouts* konnte in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle der auf der Synthese durch Ugcg basierenden Glykosphingolipide im Vorderhirn von Mäusen an der Regulation der Energiehomöostase gezeigt werden. Diese basiert wahrscheinlich auf einer Interaktion zwischen Gangliosiden und Rezeptoren, deren Sensitivität für periphere Signale durch das Fehlen der Ganglioside beeinträchtigt zu sein scheint, was letztendlich in einer zentralen dysfunktionalen Regulation des Energiehaushalts resultiert (Grube 2010). Ein Zusammenhang zwischen Gangliosiden im Gehirn und Thermoregulation ist seit langem bekannt (Rahmann 1978, Rahmann et al. 1984). Die neuen Erkenntnisse liefern nicht nur einen Beitrag zum Verständnis der grundlegenden Mechanismen, die MML Ugcg bietet zudem einen neuen Ansatz zur Erforschung von Gangliosiden in der Kontrolle der Körpertemperatur.

## **5 Supplement**

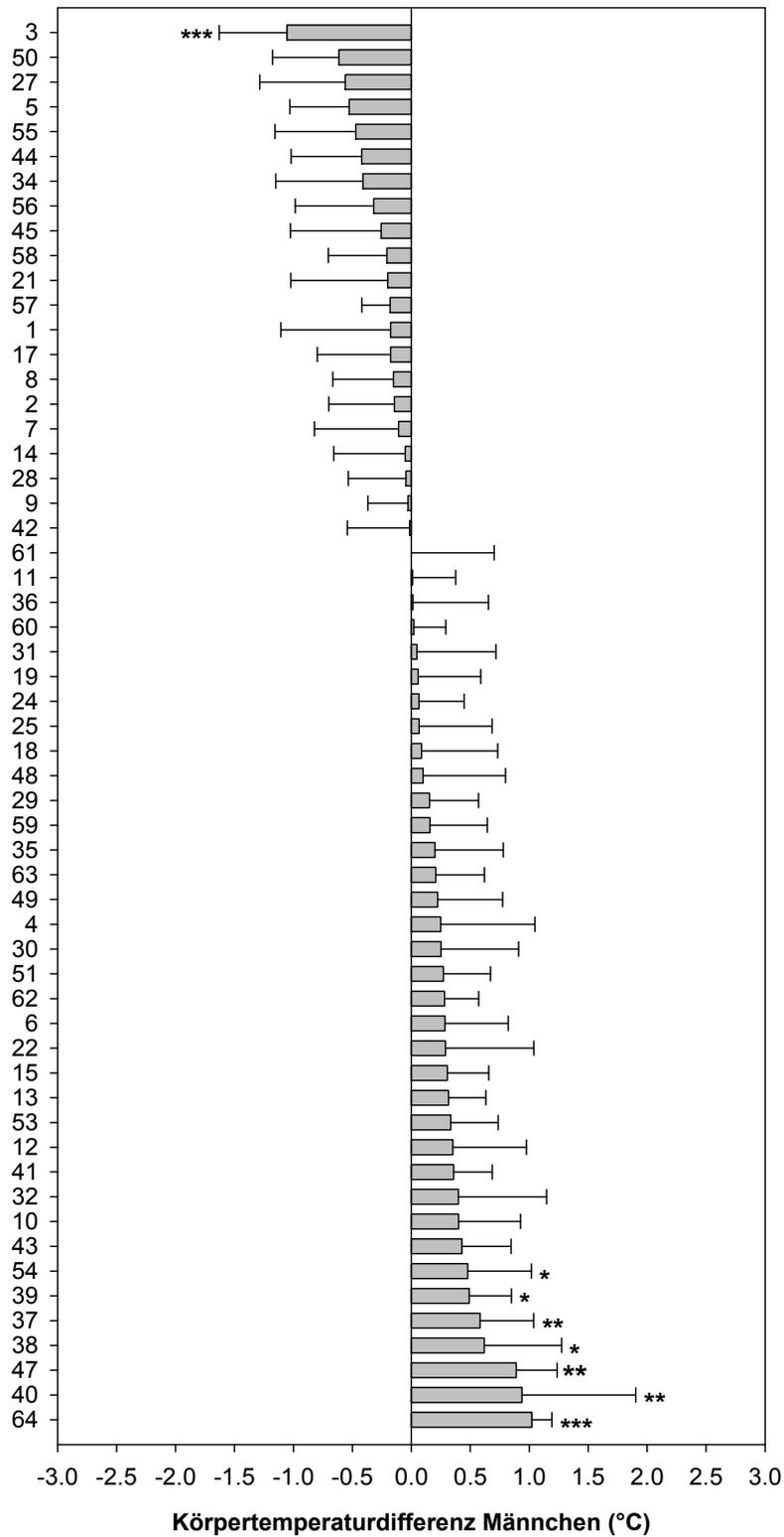
## 5.1 Primärscreen



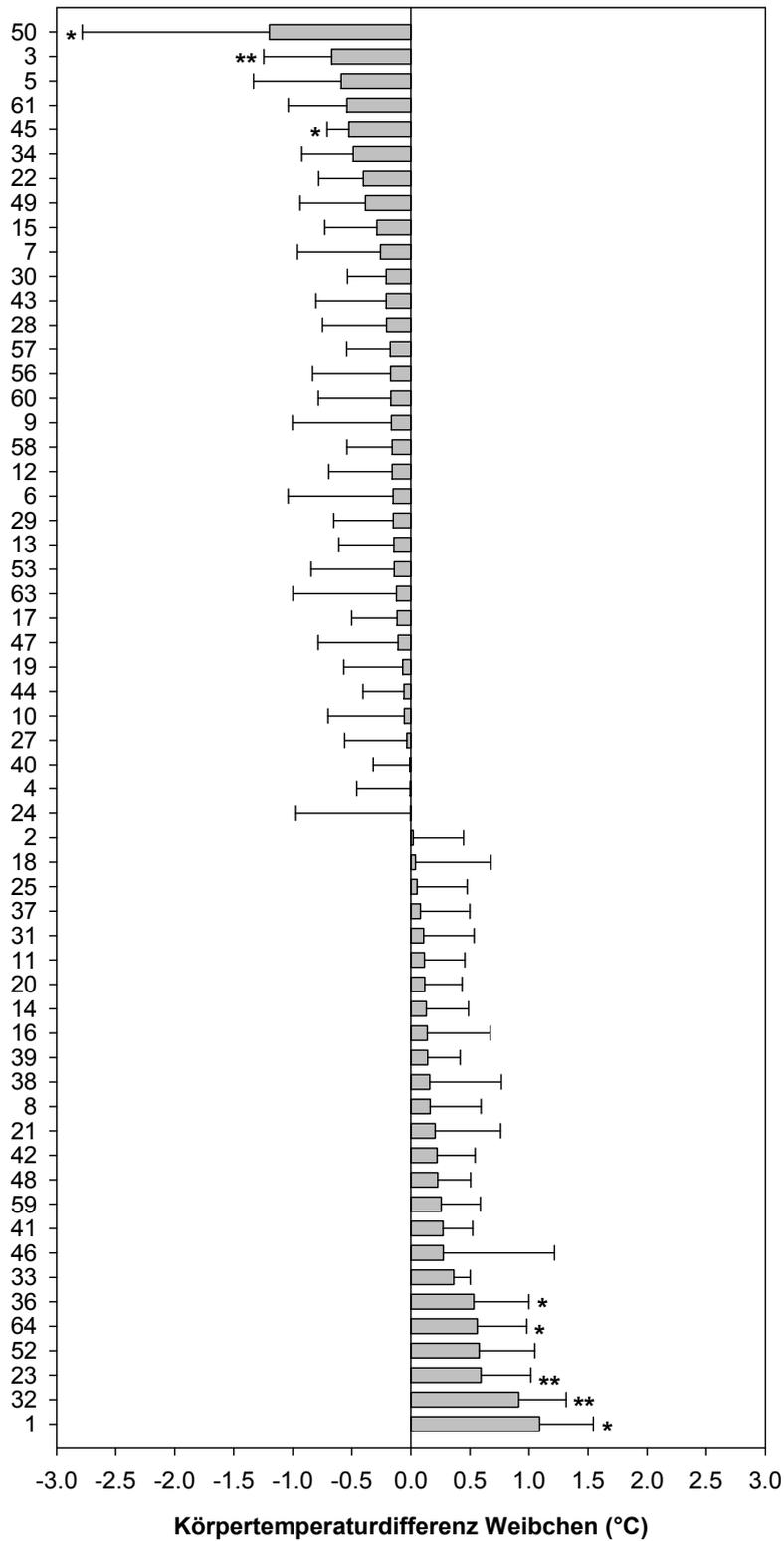
**Abb.S1: Körpergewichtsdifferenz der Männchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Körpergewichtsdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML. Das Körpergewicht wurde von 61 MML analysiert. Ein im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeres Körpergewicht der Mutanten ist als negative Differenz, ein erhöhtes Gewicht als positive Differenz dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



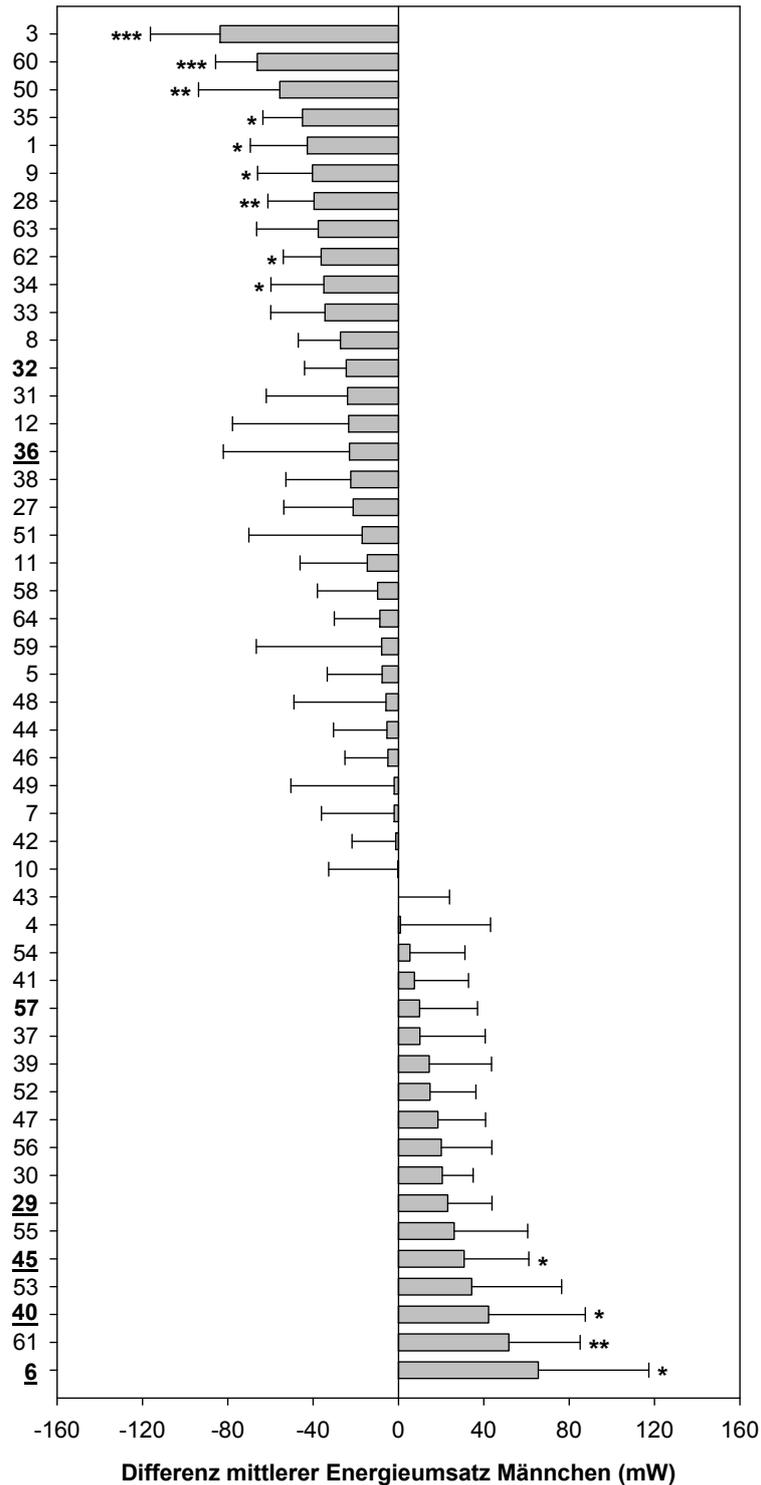
**Abb.S2: Körpergewichtsdifferenz der Weibchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Körpergewichtsdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML. Das Körpergewicht wurde von 59 MML analysiert. Ein im Vergleich zu den Kontrollen niedrigeres Körpergewicht der Mutanten ist als negative Differenz, ein erhöhtes Gewicht als positive Differenz dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



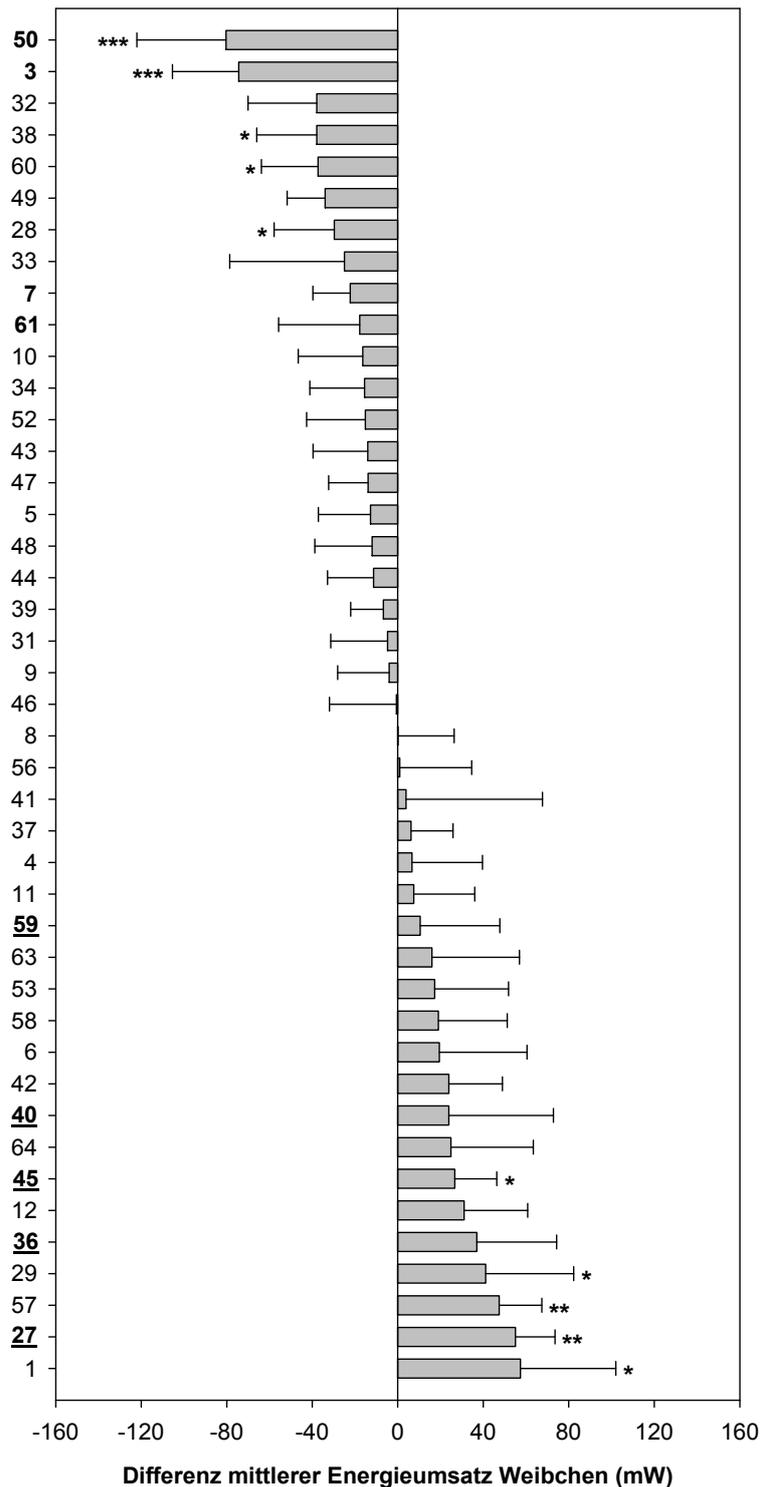
**Abb.S3: Körpertemperaturdifferenz der Männchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Körpertemperaturdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML. Die Körpertemperatur wurde von 57 MML analysiert. Eine im Vergleich zu den Kontrollen niedrigere Körpertemperatur der Mutanten ist als negative Differenz, eine erhöhte Temperatur als positive Differenz dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



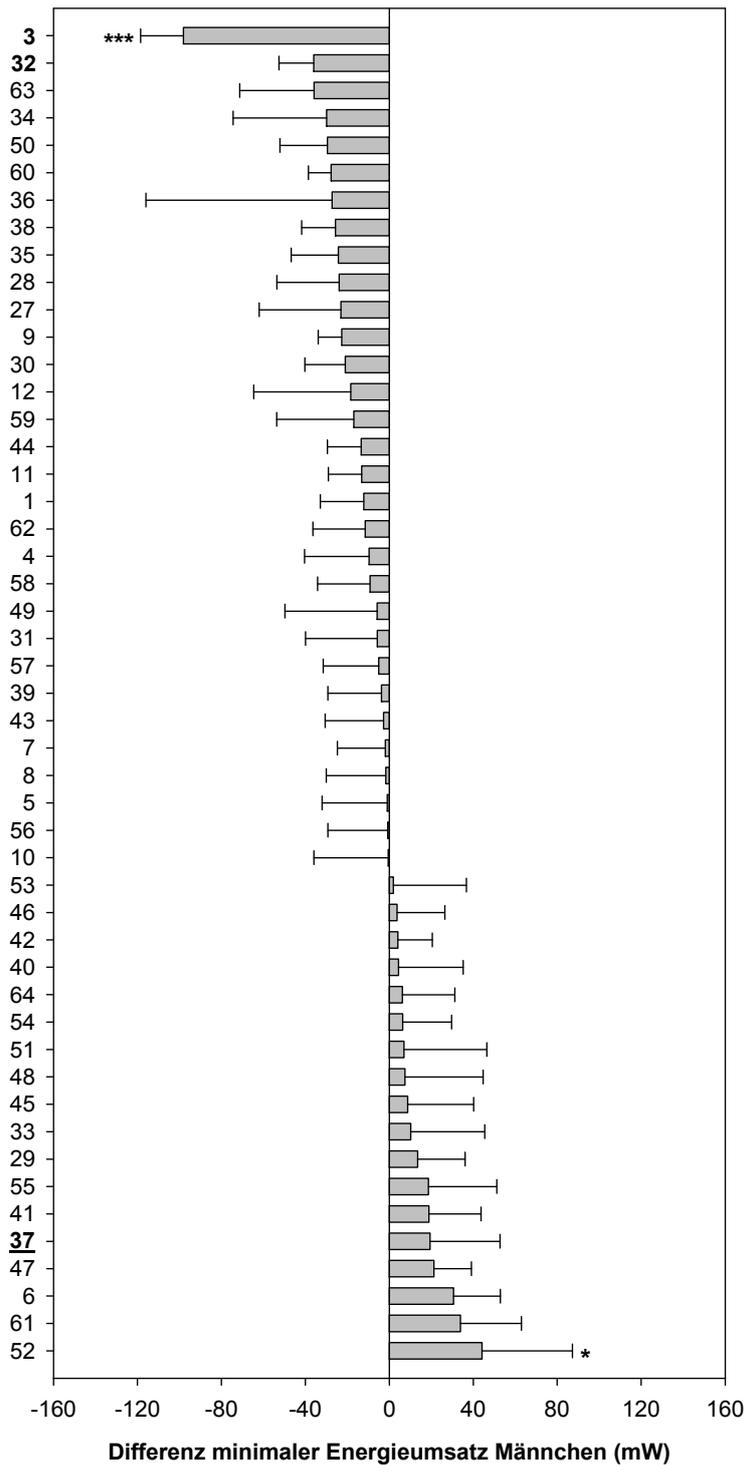
**Abb.S4: Körpertemperaturdifferenz der Weibchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Körpertemperaturdifferenz zwischen Mutanten und Kontrollen einer MML. Die Körpertemperatur wurde von 58 MML analysiert. Eine im Vergleich zu den Kontrollen niedrigere Körpertemperatur der Mutanten ist als negative Differenz, eine erhöhte Temperatur als positive Differenz dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



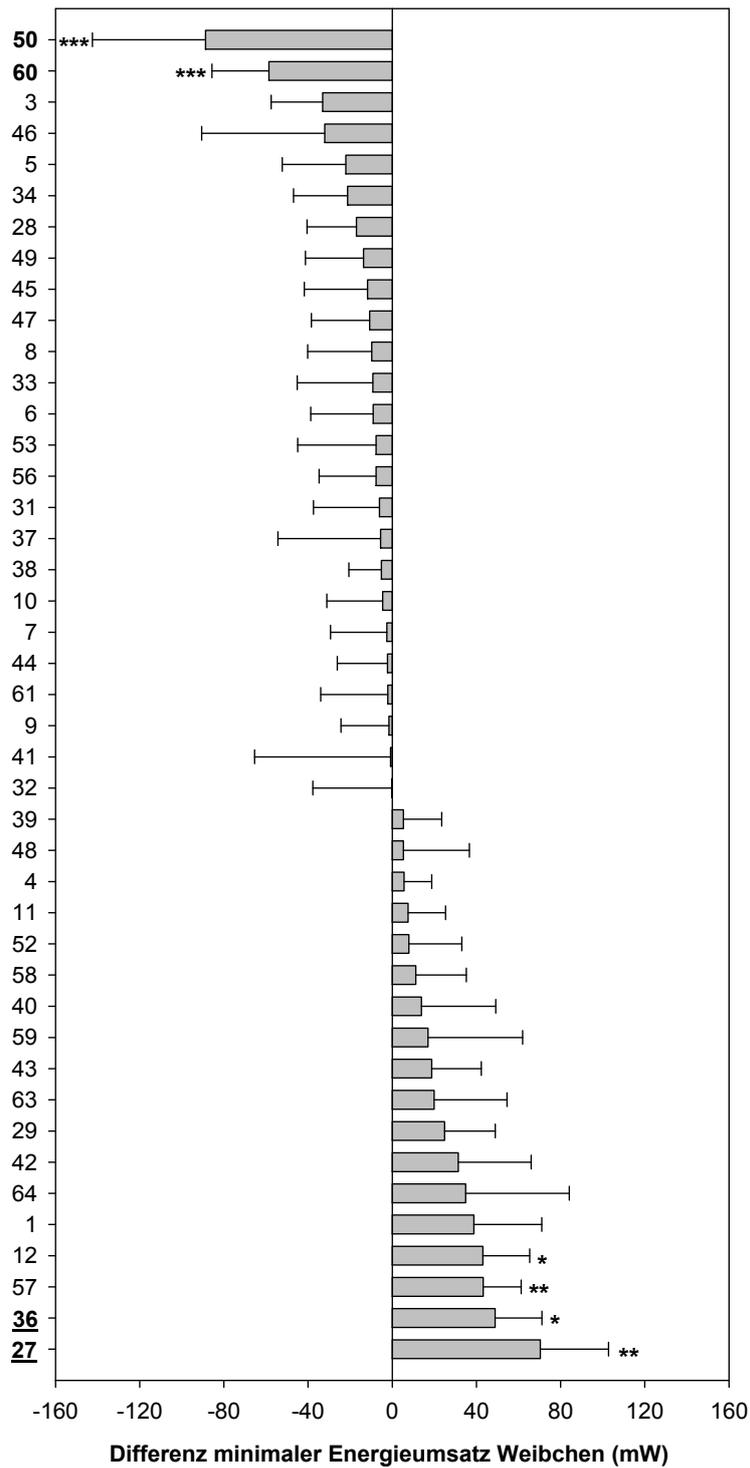
**Abb.S5: Differenz im mittleren Energieumsatz der Männchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Differenz des mittleren Energieumsatzes der 21 Stunden Messungen zwischen Mutanten und Kontrollen. Ein im Vergleich zu den Kontrollen absolut gesehen niedrigerer Energieumsatz der Mutanten ist als negative Differenz, ein höherer Energieumsatz als positive Differenz dargestellt. Bei den in **Fett** markierten MML zeigten die Mutanten nach Normalisierung auf das Körpergewicht einen signifikant niedrigeren, die **Fett und unterstrichenen** MML einen signifikant erhöhten Energieumsatz im Vergleich zu den Kontrollen. Der Energieumsatz wurde in 49 MML analysiert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Abb.S6: Differenz im mittleren Energieumsatz der Weibchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Differenz des mittleren Energieumsatzes der 21 Stunden Messungen zwischen Mutanten und Kontrollen. Ein im Vergleich zu den Kontrollen absolut gesehen niedrigerer Energieumsatz der Mutanten ist als negative Differenz, ein höherer Energieumsatz als positive Differenz dargestellt. Bei den in **Fett** markierten MML zeigten die Mutanten nach Normalisierung auf das Körpergewicht einen signifikant niedrigeren, die **Fett und unterstrichenen** MML einen signifikant erhöhten Energieumsatz im Vergleich zu den Kontrollen. Der Energieumsatz wurde in 43 MML analysiert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Abb.S7: Differenz im minimalen Energieumsatz der Männchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Differenz des minimalen Energieumsatzes der 21 Stunden Messungen zwischen Mutanten und Kontrollen. Ein im Vergleich zu den Kontrollen absolut gesehen niedrigerer Energieumsatz der Mutanten ist als negative Differenz, ein höherer Energieumsatz als positive Differenz dargestellt. Bei den in **Fett** markierten MML zeigten die Mutanten nach Normalisierung auf das Körpergewicht einen signifikant niedrigeren, die **Fett und unterstrichenen** MML einen signifikant erhöhten Energieumsatz im Vergleich zu den Kontrollen. Der Energieumsatz wurde in 49 MML analysiert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

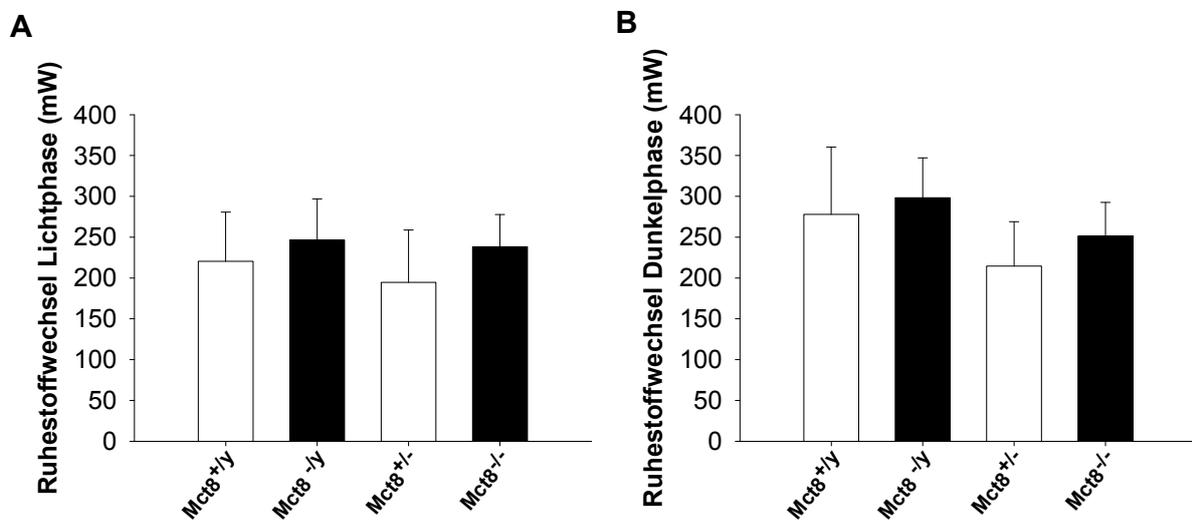


**Abb.S8: Differenz im minimalen Energieumsatz der Weibchen analysierter MML.** Dargestellt ist die Differenz des minimalen Energieumsatzes der 21 Stunden Messungen zwischen Mutanten und Kontrollen. Ein im Vergleich zu den Kontrollen absolut gesehen niedrigerer Energieumsatz der Mutanten ist als negative Differenz, ein höherer Energieumsatz als positive Differenz dargestellt. Bei den in **Fett** markierten MML zeigten die Mutanten nach Normalisierung auf das Körpergewicht einen signifikant niedrigeren, die **Fett und unterstrichenen** MML einen signifikant erhöhten Energieumsatz im Vergleich zu den Kontrollen. Der Energieumsatz wurde in 49 MML analysiert. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

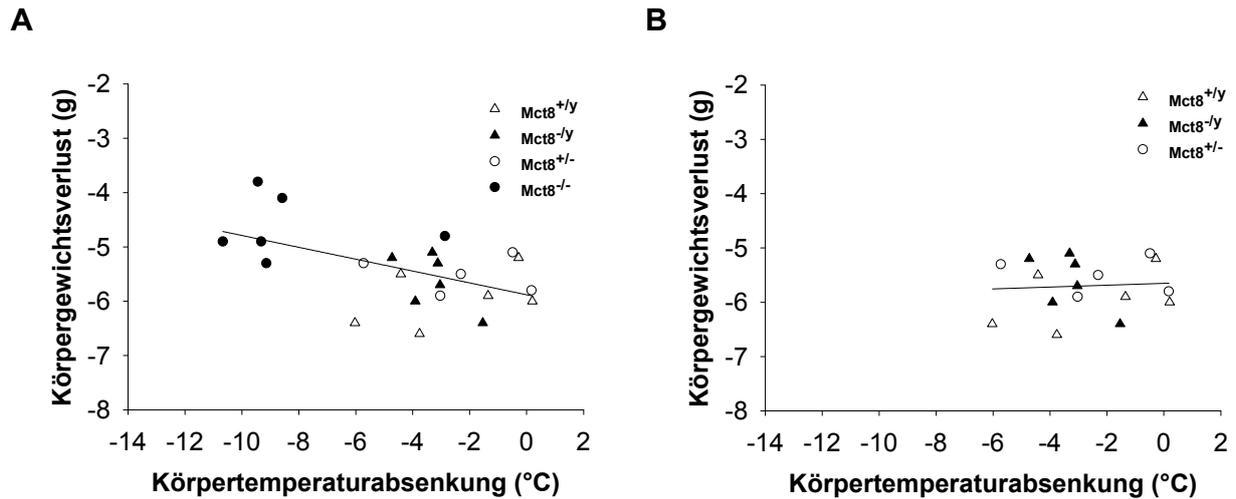
## 5.2 Mausmutantenlinie Mct8

Tab.S1: Körperzusammensetzung bei *ad libitum* Fütterung im Alter von 17 Wochen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Mct8 <sup>+/y</sup> n = 8	Mct8 <sup>-/y</sup> n = 8	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 8	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Körpergewicht (g)	31.3 $\pm$ 2.1	28.8 $\pm$ 1.1	24.4 $\pm$ 2.1	23.3 $\pm$ 2.0	<b>0.009</b>	<b>0.000</b>	0.293	
Fettmasse (g)	7.2 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 0.9	<b>0.020</b> 0.760	<b>0.000</b> <b>0.008</b>	0.189 0.473	<b>0.000</b>
Magermasse (g)	19.9 $\pm$ 1.3	18.4 $\pm$ 0.8	15.2 $\pm$ 1.2	14.5 $\pm$ 1.0	<b>0.009</b> 0.751	<b>0.000</b> <b>0.002</b>	0.325 0.928	<b>0.000</b>



**Abb.S9: Ruhestoffwechsel in der Licht- und Dunkelphase.** Dargestellt sind der absolute Ruhestoffwechsel in der Licht- (A) und Dunkelphase (B). Mct8<sup>-/y</sup> / Mct8<sup>-/-</sup> Mäuse hatten sowohl in der Licht-, als auch in der Dunkelphase einen im Vergleich zu den Mct8<sup>+/y</sup> / Mct8<sup>+/-</sup> Mäusen absolut gesehen erhöhten Ruhestoffwechsel, wobei jedoch keine signifikanten genotypspezifischen Unterschiede bestanden (Lichtphase:  $p = 0.140$ , Dunkelphase:  $p = 0.265$ ). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Mct8<sup>+/y</sup>:  $n = 6$ , Mct8<sup>-/y</sup>:  $n = 6$ , Mct8<sup>+/-</sup>:  $n = 5$ , Mct8<sup>-/-</sup>:  $n = 6$ .



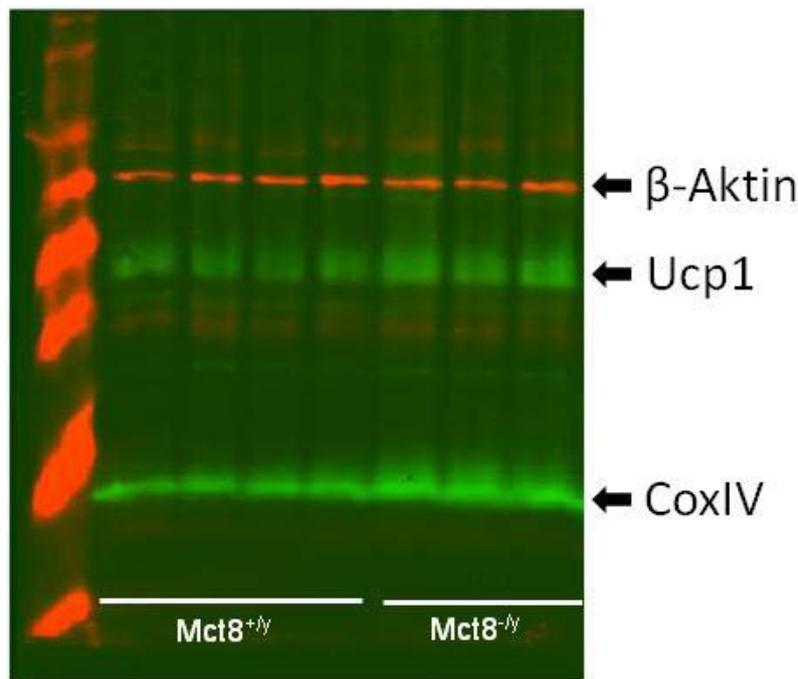
**Abb.S10: Körpergewichtsverlust aufgetragen gegen die Körpertemperaturabsenkung nach zweitägigem Futterentzug.** Dargestellt ist der Körpergewichtsverlust in Abhängigkeit der Körpertemperaturabsenkung *Mct8*-defizienter Mäuse beider Geschlechter und Genotypen (A) sowie für die Männchen beider Genotypen und die weiblichen Kontrollen (B). Bei Betrachtung beider Geschlechter und Genotypen bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gewichtsverlust und der Körpertemperaturabsenkung ( $p < 0.01$ ), wobei Mäuse mit niedrigerem Gewichtsverlust eine stärkere Temperaturabsenkung zeigten. Ohne *Mct8*<sup>-/-</sup> Weibchen, welche die stärkste Absenkung der Körpertemperatur nach zweitägigem Futterentzug aufwiesen, bestand kein Zusammenhang zwischen beiden Variablen ( $p = 0.803$ ).

**Tab.S2: Körpergewicht und Körperzusammensetzung bei zweitägigem Futterentzug.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Weibchen		Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	<i>Mct8</i> <sup>+/-</sup> n = 7	<i>Mct8</i> <sup>-/-</sup> n = 7	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Körpergewicht vor Messung (g)	28.0 $\pm$ 2.8	24.6 $\pm$ 2.4	<b>0.032</b>	
Körpergewicht nach Messung (g)	22.1 $\pm$ 3.0	19.6 $\pm$ 2.2	0.103	
Körpergewichts- verlust (g)	-5.9 $\pm$ 0.7	-5.0 $\pm$ 1.2	0.101 0.320	0.522
Fettmasse vor Messung (g)	7.5 $\pm$ 1.7	5.6 $\pm$ 1.1	<b>0.031</b> 0.647	<b>0.000</b>
Magermasse vor Messung (g)	16.7 $\pm$ 1.4	15.4 $\pm$ 1.4	0.102 0.168	<b>0.000</b>
Fettmasse nach Messung (g)	4.8 $\pm$ 2.4	3.3 $\pm$ 1.3	0.171 0.685	<b>0.000</b>
Magermasse nach Messung (g)	14.6 $\pm$ 1.2	13.6 $\pm$ 1.0	0.125 0.981	<b>0.000</b>
Verlust Fettmasse (g)	-2.8 $\pm$ 0.8	-2.3 $\pm$ 0.7	0.314 0.223	0.454
Verlust Magermasse (g)	-2.1 $\pm$ 0.5	-1.8 $\pm$ 0.5	0.182 0.965	<b>0.030</b>

**Tab.S3: Deiodase 1 Aktivität in der Leber.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

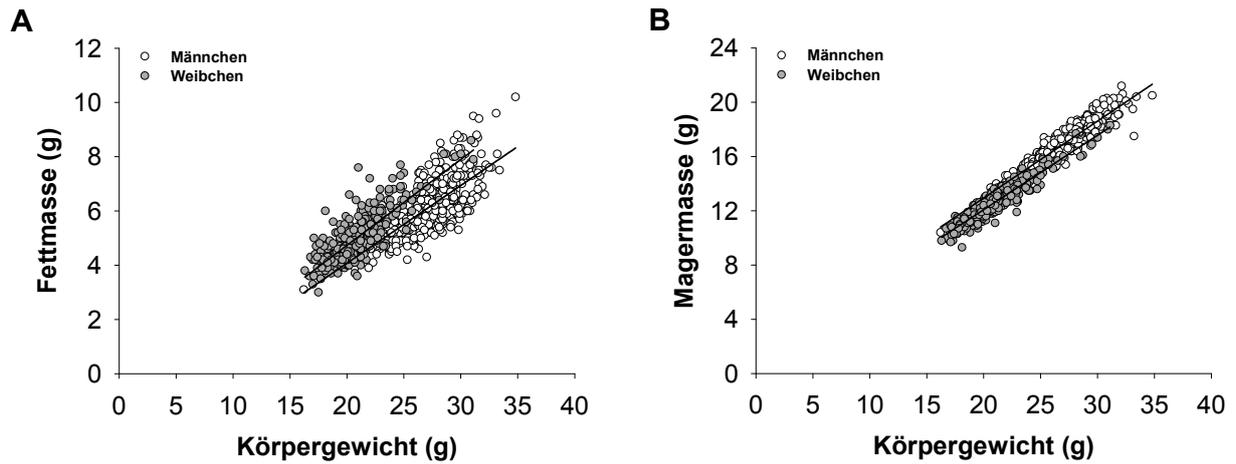
Variable	Ad libitum		Futterentzug		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Behandlung)		
	Mct8 <sup>+/-y</sup> n = 6	Mct8 <sup>-y</sup> n = 6	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 6	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 6	p-Wert Genotyp	p-Wert Behandlung	p-Wert Interaktion
Dio1 Aktivität (pmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	120.04 $\pm$ 66.47	158.16 $\pm$ 62.48	78.82 $\pm$ 37.04	152.27 $\pm$ 18.13	<b>0.013</b>	0.263	0.398



**Abb.S11: Western Blot für Ucp1 im interskapulären braunen Fettgewebe (iBAT).** Dargestellt ist ein Ausschnitt des Western Blots zur Bestimmung des Ucp1-Gehalts im iBAT. Für eine spätere Normalisierung wurden zudem  $\beta$ -Aktin und CoxIV detektiert.

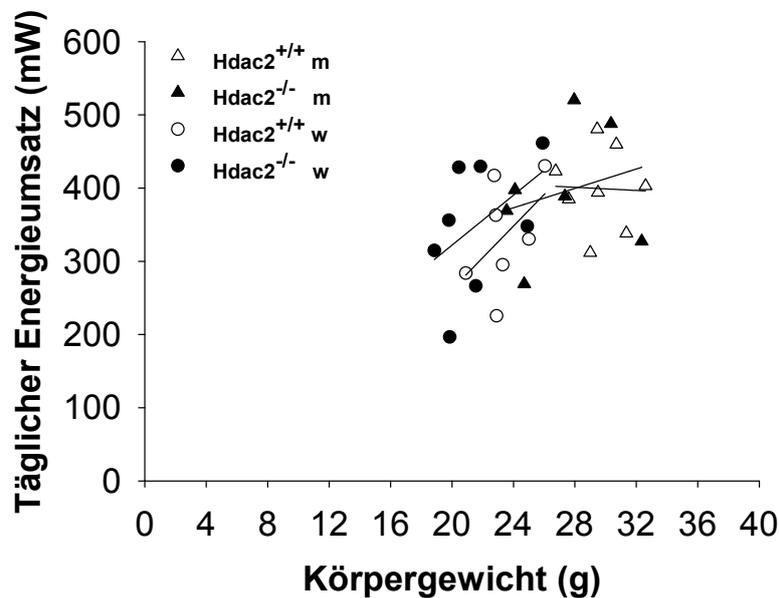
**Tab.S4: Ucp1-Gehalt im BAT normalisiert für  $\beta$ -Aktin und CoxIV.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht)		
	Mct8 <sup>+/-y</sup> n = 5-6	Mct8 <sup>-y</sup> n = 6	Mct8 <sup>+/-</sup> n = 5	Mct8 <sup>-/-</sup> n = 6	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion
Relative Einheiten von UCP1 normalisiert für $\beta$ -Aktin ad libitum	1.01 $\pm$ 0.74	1.40 $\pm$ 0.62	1.64 $\pm$ 0.76	0.59 $\pm$ 0.22	0.212	0.739	<b>0.011</b>
Relative Einheiten von UCP1 normalisiert für CoxIV ad libitum	0.90 $\pm$ 0.25	0.87 $\pm$ 0.35	1.18 $\pm$ 0.35	0.66 $\pm$ 0.20	<b>0.033</b>	0.783	0.054



**Abb.S12: Geschlechtsspezifischer Unterschied der Körperzusammensetzung.** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht normalisierte Fett- (A) und Magermasse (B) männlicher (477 Tiere) und weiblicher Mäuse (400 Tiere). Es besteht eine geschlechtsspezifische Verschiebung der Körperzusammensetzung mit erhöhter Fettmasse ( $p < 0.001$ ) und geringerer Magermasse der Weibchen ( $p < 0.001$ ).

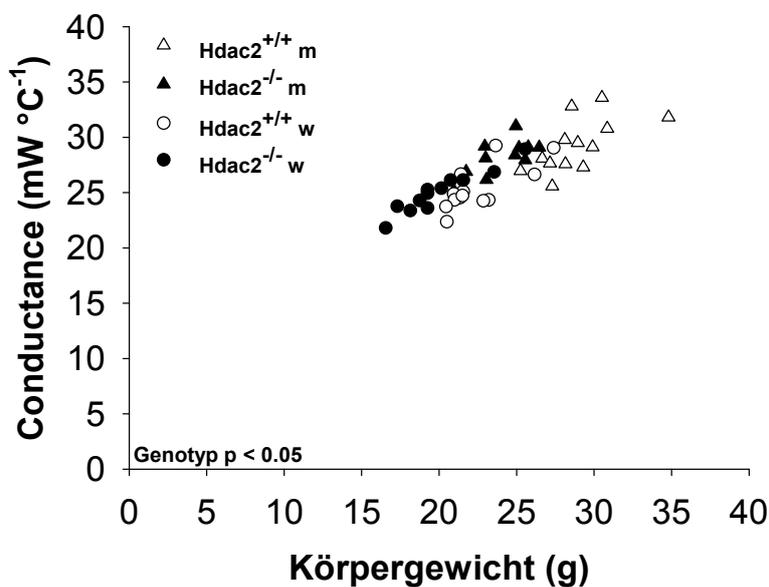
### 5.3 Mausmutantenlinie Hdac2



**Abb.S13: Täglicher Energieumsatz aufgetragen gegen das Körpergewicht.** Dargestellt ist der auf das Körpergewicht normalisierte tägliche Energieumsatz. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang mit dem Körpergewicht (jeweils  $p = 0.113$ ). Die geringe Korrelation innerhalb der Männchen kann auf die geringe Gewichtsspanne und die hohe Variabilität des Energieumsatzes innerhalb der Genotypen zurückgeführt werden. Anzahl Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>  $n = 8$ ; Hdac2<sup>-/-</sup>  $n = 7$ , Anzahl Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>:  $n = 7$ ; Hdac2<sup>-/-</sup>:  $n = 8$ . m: Männchen, w: Weibchen.

**Tab.S5: Körperzusammensetzung und deren Veränderung unter zweitägigem Futterentzug.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die vor und nach dem Futterentzug ermittelten Variablen. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable	Männchen		Weibchen		Zweiweg-ANOVA (Genotyp * Geschlecht) LM (Genotyp * Geschlecht + Gewicht)			
	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 8	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 7	Hdac2 <sup>+/+</sup> n = 7	Hdac2 <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Geschlecht	p-Wert Interaktion	p-Wert Gewicht
Fettmasse vor Messung (g)	6.4 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 0.5	0.315 0.683	<b>0.000</b> 0.675	0.663 0.841	<b>0.000</b>
Magermasse vor Messung (g)	18.3 $\pm$ 1.0	16.8 $\pm$ 1.8	14.2 $\pm$ 0.9	13.0 $\pm$ 1.8	<b>0.015</b> 0.071	<b>0.000</b> 0.071	0.821 0.592	<b>0.000</b>
Fettmasse nach Messung (g)	3.4 $\pm$ 1.1	3.0 $\pm$ 1.3	2.4 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.5	0.134 0.693	<b>0.003</b> 0.140	0.787 0.754	<b>0.000</b>
Magermasse nach Messung (g)	16.1 $\pm$ 0.8	15.0 $\pm$ 1.6	12.5 $\pm$ 0.9	11.2 $\pm$ 1.3	<b>0.014</b> 0.799	<b>0.000</b> <b>0.013</b>	0.866 0.821	<b>0.000</b>
Verlust Fettmasse (g)	-2.9 $\pm$ 0.5	-2.9 $\pm$ 0.3	-2.5 $\pm$ 0.6	-2.9 $\pm$ 0.3	0.238 0.062	0.151 0.718	0.149 0.169	0.591
Verlust Magermasse (g)	-2.3 $\pm$ 0.6	-1.8 $\pm$ 0.4	-1.8 $\pm$ 0.4	-1.8 $\pm$ 0.6	0.244 0.665	0.166 0.133	0.317 0.373	<b>0.012</b>



**Abb.S14: Conductance** unter akuter Kälteexposition aufgetragen gegen das Körpergewicht. Dargestellt ist die auf das Körpergewicht normalisierte *Conductance* (Wärmedurchgangszahl) während der akuten Kälteexposition (5 °C). Es bestand ein signifikanter Zusammenhang mit dem Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Die *Conductance* der Hdac2<sup>-/-</sup> Mäuse war in Kälte signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ), was eine erhöhte Wärmeabgabe über die Körperoberfläche anzeigt. Männchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 11; Weibchen: Hdac2<sup>+/+</sup>: n = 13, Hdac2<sup>-/-</sup>: n = 12. m: Männchen, w: Weibchen.

## 5.4 Mausmutantenlinie Ugcg

**Tab.S6: Analyse der Körperzusammensetzung mittels Micro-CT.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die mittels Micro-CT ermittelte Verteilung der Fettmasse in subkutanes und viszerales Fett im Abdominalbereich (Lendenwirbel 1-6) 13 Wochen p.i. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 4	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 7	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Körpergewicht (g)	25.4 $\pm$ 2.1	27.7 $\pm$ 3.3	0.090	
Viszerale Fettmasse (g)	1.3 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 1.1	<b>0.000</b> <b>0.000</b>	<b>0.000</b>
Subkutane Fettmasse (g)	0.4 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	<b>0.000</b> <b>0.000</b>	<b>0.003</b>

**Tab.S7: Ermittelte Variablen der 21-stündigen Energieumsatzmessung in der 2. Woche p.i..** Die Körperzusammensetzung konnte aus technischen Gründen nicht bei allen Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen bestimmt werden. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 6	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 8	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	19.5 $\pm$ 0.7	20.3 $\pm$ 1.1	0.154	
Fettmasse (g)	4.4 $\pm$ 0.3 n = 5	4.9 $\pm$ 0.5	0.051 0.146	<b>0.010</b>
Magermasse (g)	12.3 $\pm$ 0.5 n = 5	12.8 $\pm$ 0.6	0.158 0.524	<b>0.000</b>
Körpertemperatur (°C)	36.49 $\pm$ 0.51	36.07 $\pm$ 0.39	0.105	
Mittlerer Energieumsatz (mW)	438.33 $\pm$ 20.08	457.66 $\pm$ 28.55	0.184 0.764	<b>0.002</b>
Mittlere Respiratorische Austauschrate	0.97 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.03	0.899	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 13:00-18:00 MEZ	0.92 $\pm$ 0.05	0.86 $\pm$ 0.09	0.187	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Dunkelphase 18:00-6:00 MEZ	1.02 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.02	0.284	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 6:00-10:00 MEZ	0.86 $\pm$ 0.03	0.87 $\pm$ 0.04	0.564	

**Tab.S8: Ermittelte Variablen während der Analyse der Energieaufnahme in der 3. Woche p.i..**  
Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 9	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 10	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	21.4 ± 1.0	21.8 ± 2.0	0.558	
Mittlere Körpertemperatur (°C)	36.66 ± 0.54	36.71 ± 0.24	0.744	
Futtermenge (g d <sup>-1</sup> )	3.6 ± 0.5	4.4 ± 0.9	<b>0.031</b> <b>0.021</b>	<b>0.002</b>
Energieaufnahme (kJ d <sup>-1</sup> )	61.43 ± 8.94	74.83 ± 14.79	<b>0.031</b> <b>0.021</b>	<b>0.002</b>
Metabolisierbare Energie (kJ d <sup>-1</sup> )	44.94 ± 6.07	54.06 ± 11.03	<b>0.042</b> <b>0.034</b>	<b>0.002</b>

**Tab.S9: Ermittelte Variablen der 21-stündigen Energieumsatzmessung in der 5. Woche p.i..** Die Tabelle gibt einen Überblick über die während der Energieumsatzmessung in der 5. Woche p.i. ermittelten Variablen. Mittelwerte ± Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 7	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 7	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	21.3 ± 1.2	26.1 ± 1.9	<b>0.001</b>	
Fettmasse (g)	5.1 ± 0.3	9.0 ± 1.0	<b>0.000</b> <b>0.000</b>	<b>0.001</b>
Magermasse (g)	12.8 ± 0.8	14.4 ± 1.4	<b>0.021</b> <b>0.021</b>	<b>0.000</b>
Körpertemperatur (°C)	37.05 ± 0.56	36.10 ± 0.50	<b>0.005</b>	
Mittlerer Energieumsatz (mW)	450.13 ± 34.05	499.71 ± 46.20	<b>0.041</b> 0.231	<b>0.006</b>
Mittlere Respiratorische Austauschrate	0.86 ± 0.03	0.94 ± 0.05	<b>0.003</b>	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 13:00-18:00 MEZ	0.81 ± 0.04	0.84 ± 0.08	0.282	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Dunkelphase 18:00-6:00 MEZ	0.90 ± 0.04	1.00 ± 0.04	<b>0.000</b>	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 6:00-10:00 MEZ	0.82 ± 0.03	0.89 ± 0.09	0.259	

**Tab.S10: Ermittelte Variablen während der Analyse der Energieaufnahme in der 6.-7. Woche p.i..**  
Mittelwerte ± Standardabweichung.

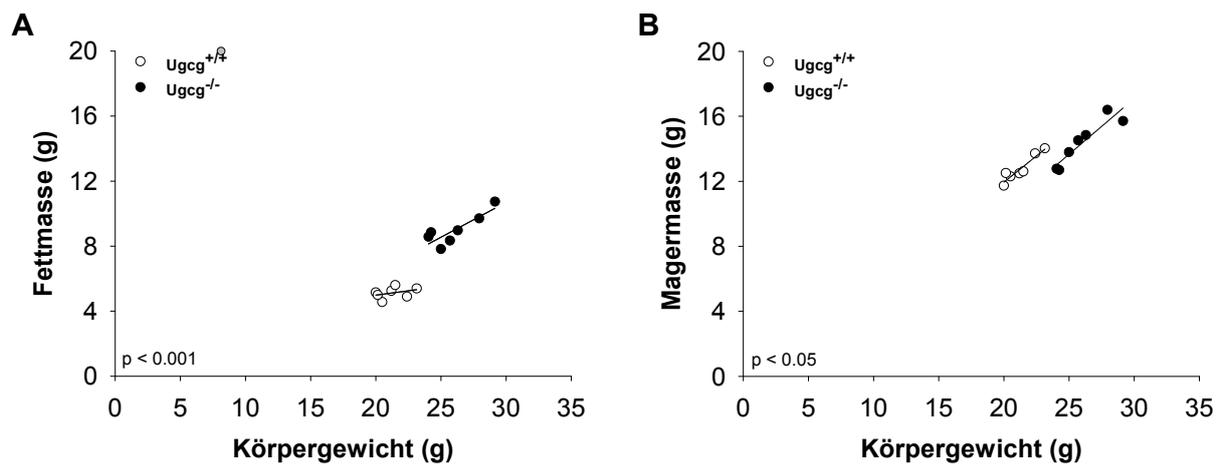
Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 9	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 10	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	22.8 ± 1.3	26.9 ± 2.7	<b>0.000</b>	
Mittlere Körpertemperatur (°C)	37.15 ± 0.35	36.00 ± 0.35	<b>0.000</b>	
Futtermenge (g d <sup>-1</sup> )	3.2 ± 0.4	3.8 ± 0.5	<b>0.008</b> 0.598	<b>0.000</b>
Energieaufnahme (kJ d <sup>-1</sup> )	54.37 ± 7.25	65.44 ± 8.77	<b>0.008</b> 0.598	<b>0.000</b>
Metabolisierbare Energie (kJ d <sup>-1</sup> )	40.21 ± 5.12	47.71 ± 6.55	<b>0.014</b> 0.367	<b>0.000</b>

**Tab.S11: Ermittelte Variablen der 21-stündigen Energieumsatzmessung in der 9. Woche p.i..**  
Mittelwerte ± Standardabweichung.

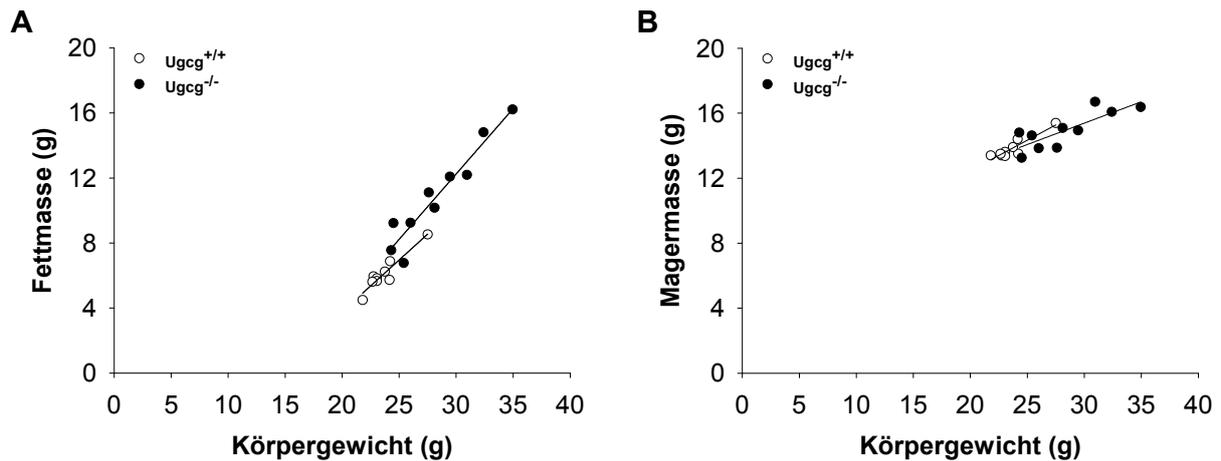
Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp) LM (Genotyp + Gewicht)	
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 9	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 10	p-Wert Genotyp	p-Wert Gewicht
Mittleres Körpergewicht (g)	23.7 ± 1.6	28.4 ± 3.6	<b>0.002</b>	
Fettmasse (g)	6.1 ± 1.1	10.9 ± 3.0	<b>0.000</b> 0.352	<b>0.000</b>
Magermasse (g)	13.8 ± 0.7	15.0 ± 1.1	<b>0.020</b> 0.115	<b>0.000</b>
Körpertemperatur (°C)	36.72 ± 0.64	36.09 ± 0.61	<b>0.043</b>	
Mittlerer Energieumsatz (mW)	488.33 ± 32.50	503.93 ± 33.97	0.322 0.348	<b>0.012</b>
Mittlere Respiratorische Austauschrate	0.86 ± 0.05	0.95 ± 0.05	<b>0.002</b>	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 13:00-18:00 MEZ	0.84 ± 0.06	0.81 ± 0.08	0.191	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Dunkelphase 18:00-6:00 MEZ	0.88 ± 0.07	1.01 ± 0.06	<b>0.000</b>	
Mittlere Respiratorische Austauschrate Lichtphase 6:00-10:00 MEZ	0.82 ± 0.05	0.91 ± 0.07	<b>0.002</b>	

**Tab.S12: Variablen zur Kalkulation des Energieüberschusses.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die ermittelten Variablen zur Kalkulation des Energieüberschusses zwischen Tag 18-22 p.i. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

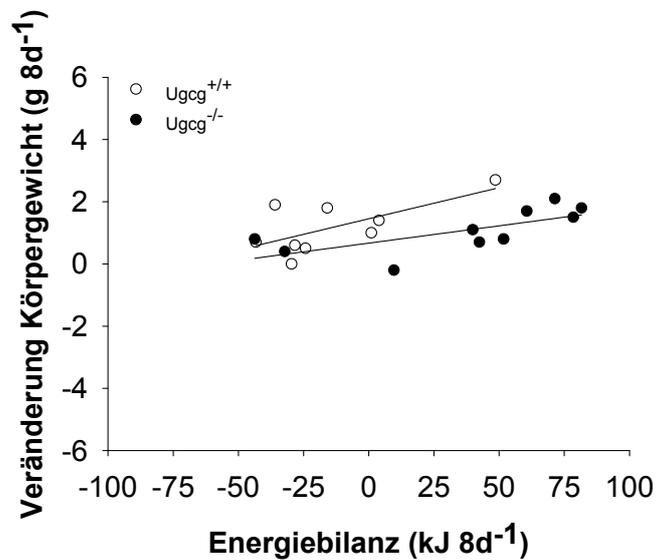
Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp)
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 7	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 7	p-Wert Genotyp
Gewichtszunahme (g 4d <sup>-1</sup> )	1.0 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.2	0.095
Metabolisierbare Energie (kJ 4d <sup>-1</sup> )	174.43 $\pm$ 21.05	207.92 $\pm$ 44.34	0.096
Energieumsatz (kJ 4d <sup>-1</sup> )	155.56 $\pm$ 11.77	172.70 $\pm$ 15.97	<b>0.041</b>
Energieüberschuss (kJ 4d <sup>-1</sup> )	18.86 $\pm$ 25.37	35.22 $\pm$ 57.66	0.505
Energieüberschuss (kJ d <sup>-1</sup> )	4.72 $\pm$ 6.34	8.81 $\pm$ 14.42	0.505



**Abb.S15: Fettmasse und Magermasse aufgetragen gegen das Körpergewicht in der 5. Woche p.i..** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht normalisierte Fettmasse (A) und Magermasse (B) von Ugcg<sup>+/+</sup> und Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen während der Energieumsatzmessung in der 5. Woche p.i.. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fettmasse und dem Körpergewicht sowie der Magermasse und dem Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Es wurde eine genotypspezifische Verschiebung der Körperzusammensetzung gefunden, mit signifikant höherer Fettmasse und signifikant geringerer Magermasse der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse als man für ihr im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhtes Körpergewicht erwartet.



**Abb.S16: Fettmasse und Magermasse aufgetragen gegen das Körpergewicht in der 9. Woche p.i..** Dargestellt sind die auf das Körpergewicht normalisierte Fettmasse (A) und Magermasse (B) von Ugcg<sup>+/+</sup> und Ugcg<sup>-/-</sup> Mäusen während der Energieumsatzmessung in der 9. Woche p.i.. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Fettmasse und dem Körpergewicht sowie der Magermasse und dem Körpergewicht (jeweils  $p < 0.001$ ). Es wurde eine genotypspezifische Verschiebung der Körperzusammensetzung gefunden, mit leicht höherer Fettmasse und leicht geringerer Magermasse der Ugcg<sup>-/-</sup> Mäuse als man für ihr im Vergleich zu Ugcg<sup>+/+</sup> Mäusen erhöhtes Körpergewicht erwartet.



**Abb.S17: Körpergewichtsveränderung aufgetragen gegen die kalkulierte Energiebilanz.** Dargestellt ist die Veränderung des Körpergewichts in einem Zeitraum von 8 Tagen, aufgetragen gegen die kalkulierte Energiebilanz. Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Variablen ( $p < 0.001$ ). Auffällig ist, dass einige der Mäuse beider Genotypen trotz negativer Energiebilanz keine Abnahme im Körpergewicht zeigten. Dieser Zusammenhang ist biologisch nicht zu begründen, weshalb das Modell nicht aussagekräftig ist.

**Tab.S13: Glukosetoleranztest.** Die Tabelle gibt einen Überblick über das Körpergewicht, die Blutglukosespiegel und die Fläche unter der Kurve. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp)
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 9	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 9	p-Wert Genotyp
<b>Gewicht (g)</b>	22.5 $\pm$ 2.0	26.3 $\pm$ 3.0	<b>0.006</b>
<b>Basaler Blutglukosespiegel (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	4.2 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.5	<b>0.000</b>
<b>Blutglukosespiegel 15 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	16.5 $\pm$ 1.0	18.5 $\pm$ 4.0	0.508
<b>Blutglukosespiegel 30 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	12.6 $\pm$ 1.6	19.6 $\pm$ 5.0	<b>0.005</b>
<b>Blutglukosespiegel 60 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	7.8 $\pm$ 1.4	16.5 $\pm$ 4.4	<b>0.000</b>
<b>Blutglukosespiegel 120 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	4.5 $\pm$ 0.7	9.1 $\pm$ 3.7	<b>0.005</b>
<b>Fläche unter der Kurve (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	1050.8 $\pm$ 116.5	1756.1 $\pm$ 394.1	<b>0.000</b>

**Tab.S14: Insulintoleranztest.** Die Tabelle gibt einen Überblick über das Körpergewicht, die Blutglukosespiegel und die Fläche unter der Kurve. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Variable			Einweg-ANOVA (Genotyp)
	Ugcg <sup>+/+</sup> n = 9	Ugcg <sup>-/-</sup> n = 8-9	p-Wert Genotyp
<b>Gewicht (g)</b>	24.8 $\pm$ 1.9	28.5 $\pm$ 2.5	<b>0.003</b>
<b>Basaler Blutglukosespiegel (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	7.3 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 1.0	0.179
<b>Blutglukosespiegel 15 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	4.8 $\pm$ 0.7	4.7 $\pm$ 1.6	0.156
<b>Blutglukosespiegel 30 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	3.8 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.6	0.561
<b>Blutglukosespiegel 60 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	1.8 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.4	<b>0.000</b>
<b>Blutglukosespiegel 90 min p.i. (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	1.7 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.6	<b>0.029</b>
<b>Fläche unter der Kurve (mmol l<sup>-1</sup>)</b>	291.7 $\pm$ 37.9	323.8 $\pm$ 58.4	0.158

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe T, Suzuki T, Unno M, Tokui T, Ito S (2002)** Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends Endocrinol Metab* 13(5):215-20.
- Abel T, Zukin RS (2008)** Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 8(1):57-64.
- Adam K (1989)** Human body temperature is inversely correlated with body mass. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 58(5):471-5.
- Aerts JM, Ottenhoff R, Powlson AS, Grefhorst A, van Eijk M, Dubbelhuis PF, Aten J, Kuipers F, Serlie MJ, Wennekes T, Sethi JK, O'Rahilly S, Overkleeft HS (2007)** Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity. *Diabetes* 56(5):1341-9.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS (1996)** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382(6588):250-2.
- Allan W, Herndon CN, Dudley FC (1944)** Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microrcephaly. *Am J Ment Defic* 48:325-334.
- Amin A, Dhillo WS, Murphy KG (2011)** The central effects of thyroid hormones on appetite. *J Thyroid Res* 2011:306510.
- Arch JR, Hislop D, Wang SJ, Speakman JR (2006)** Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 30(9):1322-31.
- Ariga T, McDonald MP, Yu RK (2008)** Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J Lipid Res* 49(6):1157-75.
- Atwater WO (1899)** Discussion of the terms digestibility, availability, and fuel value. 12<sup>th</sup> Annual Report of the Storrs Agricultural Experiment Station. Middletown, Connecticut.
- Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr (1967)** The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 46(10):1549-57.
- Barker SB, Klitgaard HM (1952)** Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. *Am J Physiol* 170(1):81-6.
- Bartke N, Hannun YA (2009)** Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 50 Suppl:S91-6.
- Bartl S, Taplick J, Lagger G, Khier H, Kuchler K, Seiser C (1997)** Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Mol Cell Biol* 17(9):5033-43.
- Basu S, Kaufman B, Roseman S (1968)** Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J Biol Chem* 243(21):5802-4.
- Beckers J, Wurst W, de Angelis MH (2009)** Towards better mouse models: enhanced genotypes, systemic phenotyping and envirotype modelling. *Nat Rev Genet* 10(6):371-80.
- Bianco AC, Silva JE (1987a)** Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 79(1):295-300.
- Bianco AC, Silva JE (1987b)** Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* 120(1):55-62.
- Bianco AC, Sheng XY, Silva JE (1988)** Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem* 263(34):18168-75.
- Bianco AC, Carvalho SD, Carvalho CR, Rabelo R, Moriscot AS (1998)** Thyroxine 5'-deiodination mediates norepinephrine-induced lipogenesis in dispersed brown adipocytes. *Endocrinology* 139(2):571-8.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR (2002)** Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23(1):38-89.
- Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA (2005)** Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep* 25(3-4):191-208.
- Bianco AC, Kim BW (2006)** Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116(10):2571-9.
- Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grueters A (2005)** Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *Eur J Endocrinol* 153(3):359-66.
- Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL (1991)** Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129(5):2714-8.

- Blaza S (1983)** Brown adipose tissue in man: a review. *J R Soc Med* 76(3):213-6.
- Boelen A, Platvoet-ter Schiphorst MC, van Rooijen N, Wiersinga WM (1996)** Selective macrophage depletion in the liver does not prevent the development of the sick euthyroid syndrome in the mouse. *Eur J Endocrinol* 134(4):513-8.
- Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM, Fliers E (2006)** Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J Endocrinol* 190(2):537-44.
- Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E (2008)** Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* 18(2):123-9.
- Bosello O, Zamboni M (2000)** Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev* 1(1):47-56.
- Branco M, Ribeiro M, Negrão N, Bianco AC (1999)** 3,5,3'-Triiodothyronine actively stimulates UCP in brown fat under minimal sympathetic activity. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):E179-87.
- Braulke LJ, Klingenspor M, DeBarber A, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Heldmaier G (2008)** 3-Iodothyronamine: a novel hormone controlling the balance between glucose and lipid utilisation. *J Comp Physiol B* 178(2):167-77.
- Braun D, Wirth EK, Schweizer U (2010)** Thyroid hormone transporters in the brain. *Rev Neurosci* 21(3):173-86.
- Brockmann GA, Bevova MR (2002)** Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *Trends Genet* 18(7):367-76.
- Bronson FH (1987)** Susceptibility of the fat reserves of mice to natural challenges. *J Comp Physiol B* 157(5):551-4.
- Bronson FH, Heideman PD, Kerbeshian MC (1991)** Lability of fat stores in peripubertal wild house mice. *J Comp Physiol B* 161(1):15-8.
- Brown DA, London E (2000)** Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275(23):17221-4.
- Brown JC, Staples JF (2010)** Mitochondrial metabolism during fasting-induced daily torpor in mice. *Biochim Biophys Acta* 1797(4):476-86.
- Brown SD, Hancock JM, Gates H (2006)** Understanding mammalian genetic systems: the challenge of phenotyping in the mouse. *PLoS Genet* 2(8):e118.
- Brown SD, Wurst W, Kühn R, Hancock JM (2009)** The functional annotation of mammalian genomes: the challenge of phenotyping. *Annu Rev Genet* 43:305-33.
- Brunmeir R, Lagger S, Seiser C (2009)** Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. *Int J Dev Biol* 53(2-3):275-89.
- Butler AA, Kozak LP (2010)** A recurring problem with the analysis of energy expenditure in genetic models expressing lean and obese phenotypes. *Diabetes* 59(2):323-9.
- Cannon B, Nedergaard J (2004)** Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84(1):277-359.
- Cannon B, Nedergaard J (2011)** Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* 214(Pt 2):242-53.
- Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J (2004)** Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mamm Genome* 15(10):768-83.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ (2010)** Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31(2):139-70.
- Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y (1992)** Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B* 162(4):305-13.
- Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL (2000)** A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol* 166(2):227-34.
- Collins FS, Finnell RH, Rossant J, Wurst W (2007)** A new partner for the international knockout mouse consortium. *Cell* 129(2):235.
- Coppola A, Hughes J, Esposito E, Schiavo L, Meli R, Diano S (2005)** Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett* 579(21):4654-8.
- Das C, Kundu TK (2005)** Transcriptional regulation by the acetylation of nonhistone proteins in humans -- a new target for therapeutics. *IUBMB Life* 57(3):137-49.
- Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU, Heldmaier G (2004)** Physiology: hibernation in a tropical primate. *Nature* 429(6994):825-6.
- Dausmann KH, Glos J, Ganzhorn JU, Heldmaier G (2005)** Hibernation in the tropics: lessons from a primate. *J Comp Physiol B* 175(3):147-55.
- Davis PJ, Davis FB (1996)** Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 6(5):497-504.
- Debrand E, Heard E, Avner P (1998)** Cloning and localization of the murine Xpct gene: evidence for complex rearrangements during the evolution of the region around the Xist gene. *Genomics* 48(3):296-303.

- de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC (2001)** The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108(9):1379-85.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg A (2003)** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370(Pt 3):737-49.
- Després JP, Lemieux I (2006)** Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444(7121):881-7.
- Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL (1998)** Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139(6):2879-84.
- Dikic D, Heldmaier G, Meyer CW (2008)** Induced torpor in different strains of laboratory mice. In: *Hypometabolism in animals - hibernation, torpor and cryobiology* (eds. Lovegrove BG, McKechnie AE). University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, SA.
- Di Cosmo C, Liao XH, Dumitrescu AM, Philp NJ, Weiss RE, Refetoff S (2010)** Mice deficient in MCT8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. *J Clin Invest* 120(9):3377-88.
- Döring H, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Schmidt I (1998)** Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(2):83-8.
- Drozd A (1975)** Food habits and food assimilation in mammals. In: *Methods for Ecological Bioenergetics*, edited by W. Grodzinski, R.Z. Klekowski and A Duncan. Oxford, UK: Blackwell, pp: 23-47.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S (2004)** A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 74(1):168-75. Erratum in: *Am J Hum Genet* 74(3):598.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S. (2006)** Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology* 147(9):4036-43.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004)** Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990):457-63.
- Ehrhardt N (2008)** Metabolische Phänotypisierung von Mausmutantenlinien im Rahmen des metabolischen Labors der Deutschen Mauslinik.
- Elia M, Livesey G (1988)** Theory and validity of indirect calorimetry during net lipid synthesis. *Am J Clin Nutr* 47(4):591-607.
- Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK (1999)** Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23(4):775-86.
- Endo T, Kobayashi T (2008)** Thyroid-stimulating hormone receptor in brown adipose tissue is involved in the regulation of thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2):E514-8.
- Erdmann G, Schütz G, Berger S (2007)** Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci* 8:63.
- Erickson RP (1996)** Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man? *Bioessays* 18(12):993-8.
- Eriksson H, Svärdsudd K, Larsson B, Welin L, Ohlson LO, Wilhelmsen L (1985)** Body temperature in general population samples. The study of men born in 1913 and 1923. *Acta Med Scand* 217(4):347-52.
- Esteller M. (2008)** Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358(11):1148-59.
- Feinberg AP (2007)** Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447(7143):433-40.
- Foster DO, Frydman ML (1978)** Nonshivering thermogenesis in the rat. II. Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can J Physiol Pharmacol* 56(1):110-22.
- Foster DO, Frydman ML (1979)** Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats reevaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role of brown adipose tissue in the replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 57(3):257-70.
- Foster DO (1984)** Quantitative contribution of brown adipose tissue thermogenesis to overall metabolism. *Can J Biochem Cell Biol* 62(7):618-22.
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ (2007)** Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116(1):39-48.
- Frederich RC, Löllmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS (1995)** Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *J Clin Invest* 96(3):1658-63.

- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ (2003)** Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278(41):40128-35.
- Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ (2004)** Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364(9443):1435-7.
- Friesema EC, Visser WE, Visser TJ (2010)** Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol Cell Endocrinol* 30;322(1-2):107-13.
- Frints SG, Lenzner S, Bauters M, Jensen LR, Van Esch H, des Portes V, Moog U, Macville MV, van Roozendaal K, Schrandt-Stumpel CT, Tzschach A, Marynen P, Fryns JP, Hamel B, van Bokhoven H, Chelly J, Beldjord C, Turner G, Gecz J, Moraine C, Raynaud M, Ropers HH, Froyen G, Kuss AW (2008)** MCT8 mutation analysis and identification of the first female with Allan-Herndon-Dudley syndrome due to loss of MCT8 expression. *Eur J Hum Genet* 16(9):1029-37.
- Fromme T, Klingenspor M (2011)** Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(1):R1-8.
- Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Pimentel JA, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Dalke C, Ehrhardt N, Fasnacht N, Ferwagner B, Frischmann U, Hans W, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kallnik M, Kling E, Lengger C, Maier H, Mossbrugger I, Mörth C, Naton B, Nöth U, Pasche B, Prehn C, Przemeck G, Puk O, Racz I, Rathkolb B, Rozman J, Schäble K, Schreiner R, Schrewe A, Sina C, Steinkamp R, Thiele F, Willershäuser M, Zeh R, Adamski J, Busch DH, Beckers J, Behrendt H, Daniel H, Esposito I, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Höfler H, Ivandic B, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Mempel M, Müller W, Neschen S, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Rosenstiel P, Schmidt J, Schreiber S, Schughart K, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Hrabé de Angelis M (2009)** The German Mouse Clinic: a platform for systemic phenotype analysis of mouse models. *Curr Pharm Biotechnol* 10(2):236-43.
- Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, Da Silva-Buttkus P, Neff F, Götz A, Hans W, Hölter SM, Horsch M, Kastenmüller G, Kemter E, Lengger C, Maier H, Matloka M, Möller G, Naton B, Prehn C, Puk O, Racz I, Rathkolb B, Römisch-Margl W, Rozman J, Wang-Sattler R, Schrewe A, Stöger C, Tost M, Adamski J, Aigner B, Beckers J, Behrendt H, Busch DH, Esposito I, Graw J, Illig T, Ivandic B, Klingenspor M, Klopstock T, Kremmer E, Mempel M, Neschen S, Ollert M, Schulz H, Suhre K, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Hrabě de Angelis M (2011)** Mouse phenotyping. *Methods* 53(2):120-35.
- Funato H, Oda S, Yokofujita J, Igarashi H, Kuroda M (2011)** Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS One* 6(4):e18950.
- Futerman AH, Pagano RE (1991)** Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J* 280 (Pt 2):295-302.
- Futerman AH, Hannun YA (2004)** The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 5(8):777-82.
- Futerman AH, van Meer G (2004)** The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(7):554-65.
- Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Elvert R, Ehrhardt N, Dalke C, Franz TJ, Grundner-Culemann E, Hammelbacher S, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kalaydjiev SV, Klempt M, Kling E, Kunder S, Lengger C, Lisse T, Mijalski T, Naton B, Pedersen V, Prehn C, Przemeck G, Racz I, Reinhard C, Reitmeir P, Schneider I, Schrewe A, Steinkamp R, Zybill C, Adamski J, Beckers J, Behrendt H, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Höfler H, Ivandic B, Katus H, Kirchhof P, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Müller W, Ohl F, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schmidt J, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Busch DH, de Angelis MH (2005)** Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods* 2(6):403-4.
- Gailus-Durner V, Fuchs H, Adler T, Aguilar Pimentel A, Becker L, Bolle I, Calzada-Wack J, Dalke C, Ehrhardt N, Ferwagner B, Hans W, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kallnik M, Kling E, Lengger C, Mörth C, Mossbrugger I, Naton B, Prehn C, Puk O, Rathkolb B, Rozman J, Schrewe A, Thiele F, Adamski J, Aigner B, Behrendt H, Busch DH, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Ivandic B, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Kremmer E, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schulz H, Wolf E, Wurst W, de Angelis MH (2009)** Systemic first-line phenotyping. *Methods Mol Biol* 530:463-509.

- Gailus-Durner V, Naton B, Adler T, Afonso L, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, Cohrs C, da Silva-Buttkus P, Hans W, Horsch M, Kahle M, Lengger C, Ludwig T, Maier H, Micklich K, Möller G, Neff F, Neschen S, Prehn C, Rathkolb B, Rozman J, Schiller E, Schrewe A, Scheerer M, Schöfer F, Steinkamp R, Stöger c, Thiele F, Tost M, Treis I, Willershäuser M, Zeh R, Adamski J, Bekeredjian R, Beckers J, Esposito I, Höfler H, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Ollert M, Wolf E, Busch DH, Fuchs H, de Angelis MH (2011)** Systematic mouse phenotyping in search of new gene candidates playing a role in energy homeostasis. In: *Mouse as a model organism- from animals to cells* (eds. Brakebusch C, Pihlajaniemi T). Springer-Verlag.
- Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Mason MM, Castle AL, Refetoff S, Vinson C, Reitman ML (1999)** Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25):14623-8.
- Geiser F, Ruf T (1995)** Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiol Zool* 68 (6):935-66.
- Geiser F, Körtner G, Schmidt I (1998)** Leptin increases energy expenditure of a marsupial by inhibition of daily torpor. *Am J Physiol*. 275(5 Pt 2):R1627-32.
- Geiser F (2004)** Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* 66:239-74.
- Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC (2008)** Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29(7):898-938.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005)** Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15-23.
- Gluck EF, Stephens N, Swoap SJ. (2006)** Peripheral ghrelin deepens torpor bouts in mice through the arcuate nucleus neuropeptide Y signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(5):R1303-9.
- Golozoubova V, Hohtola E, Matthias A, Jacobsson A, Cannon B, Nedergaard J (2001)** Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J* 15(11):2048-50.
- Golozoubova V, Gullberg H, Matthias A, Cannon B, Vennström B, Nedergaard J (2004)** Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 18(2):384-401.
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV (2004)** Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338(1):17-31.
- Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG (2002)** Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143(1):239-46.
- Grozinger CM, Schreiber SL (2002)** Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9(1):3-16.
- Grube (2010)** Deletion of glucosylceramide synthase in adult mouse forebrain neurons leads to obesity and hypothermia.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009)** HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459(7243):55-60.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009a)** The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10(1):32-42.
- Haberland M, Mokalled MH, Montgomery RL, Olson EN (2009b)** Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8. *Genes Dev* 23(14):1625-30.
- Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R (2006)** Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312(5774):734-7.
- Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S (2009)** Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325(5945):1254-7. Erratum in: *Science* 326(5951):366.
- Hakomori S (1981)** Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50:733-64.
- Hakomori S (1990)** Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 265(31):18713-6.
- Hakomori S, Igarashi Y (1995)** Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* 118(6):1091-103.
- Halestrap AP, Meredith D (2004)** The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447(5):619-28.

- Hall JA, Ribich S, Christoffolete MA, Simovic G, Correa-Medina M, Patti ME, Bianco AC (2010)** Absence of thyroid hormone activation during development underlies a permanent defect in adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 151(9):4573-82.
- Hancock JM, Mallon AM, Beck T, Gkoutos GV, Mungall C, Schofield PN (2009)** Mouse, man, and meaning: bridging the semantics of mouse phenotype and human disease. *Mamm Genome* 20(8):457-61.
- Hannun YA, Obeid LM (2008)** Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):139-50.
- Heaton JM (1972)** The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat* 112(Pt 1):35-9.
- Heikens MJ, Gorbach AM, Eden HS, Savastano DM, Chen KY, Skarulis MC, Yanovski JA (2011)** Core body temperature in obesity. *Am J Clin Nutr* 93(5):963-7.
- Heldmaier (1975)** Metabolic and thermoregulatory responses to heat and cold in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol* 102(2):115-122.
- Heldmaier G, Steinlechner S (1981)** Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *J Comp Physiol* 142(4):429-437.
- Heldmaier G, Ruf T (1992)** Body temperature and metabolic rate during natural hypothermia in endotherms. *J Comp Physiol B* 162(8):696-706.
- Heldmaier G, Klingenspor M, Werneyer M, Lampi BJ, Brooks SP, Storey KB (1999)** Metabolic adjustments during daily torpor in the Djungarian hamster. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1):E896-906.
- Heldmaier G und Neuweiler G (2004)**. Vergleichende Tierphysiologie Band 2. Springer-Verlag.
- Heldmaier G, Ortman S, Elvert R (2004)** Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir Physiol Neurobiol* 141(3):317-29.
- Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ (2001)** Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 22(4):451-76.
- Hervey GR (1969)** Regulation of energy balance. *Nature* 222(5194):629-31.
- Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P (2008)** Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts* 1(2):71-9.
- Hesse D, Dunn M, Heldmaier G, Klingenspor M, Rozman J (2010)** Behavioural mechanisms affecting energy regulation in mice prone or resistant to diet- induced obesity. *Physiol Behav* 99(3):370-80.
- Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, Bauer K (2005)** The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146(4):1701-6.
- Hidari KIPJ, Ichikawa S, Fujita T, Sakiyama H, Hirabayashi Y (1996)** Complete removal of sphingolipids from the plasma membrane disrupts cell to substratum adhesion of mouse melanoma cells. *J Biol Chem* 271(24):14636-41.
- Himms-Hagen J, Desautels M (1978)** A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold by an increase in binding. *Biochem Biophys Res Commun* 83(2):628-34.
- Himms-Hagen J (1979)** Obesity may be due to a malfunctioning of brown fat. *Can Med Assoc J* 121(10):1361-4.
- Hoffmann ME, Rodriguez SM, Zeiss DM, Wachsberg KN, Kushner RF, Landsberg L, Linsenmeier RA (2012)** 24-h Core Temperature in Obese and Lean Men and Women. *Obesity* (Silver Spring) doi: 10.1038/oby.2011.380.
- Hrabě de Angelis M, Balling R (1998)** Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res* 400(1-2):25-32.
- Hudson JW, Scott IM (1979)** Daily torpor in the laboratory mouse *Mus musculus* var albino. *Physiol Zool* 52(5):205-218.
- Hulbert AJ (2000)** Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol Rev Camb Philos Soc* 75(4):519-631.
- Ichikawa S, Sakiyama H, Suzuki G, Hidari KI, Hirabayashi Y (1996)** Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22):12654.
- Ichikawa S, Hirabayashi Y (1998)** Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 8(5):198-202.
- Ichikawa S, Ozawa K, Hirabayashi Y (1998a)** Assignment1 of a UDP-glucose:ceramide glucosyltransferase gene (Ugcg) to mouse chromosome band 4B3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83(1-2):14-5.
- Ichikawa S, Ozawa K, Hirabayashi Y (1998b)** Molecular cloning and characterization of the mouse ceramide glucosyltransferase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 253(3):707-11.

- Ichikawa S, Ozawa K, Hirabayashi Y (1998c)** Molecular cloning and expression of mouse ceramide glucosyltransferase. *Biochem Mol Biol Int* 44(6):1193-202.
- International Mouse Knockout Consortium, Collins FS, Rossant J, Wurst W (2007)** A mouse for all reasons. *Cell* 128(1):9-13.
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S (2003)** Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 78(6):321-30.
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S (2008)** Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul Pept* 151(1-3):164-9.
- Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ (2005)** Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid* 15(8):757-68.
- Jeckel D, Karrenbauer A, Burger KN, van Meer G, Wieland F (1992)** Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* 117(2):259-67.
- Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, Kiss E, Gretz N, Zuliani C, Martin-Villalba A, Jäger R, Schorle H, Kenzelmann M, Bonrouhi M, Wiegandt H, Gröne H (2005)** Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35):12459-64.
- Jennemann R, Rothermel U, Wang S, Sandhoff R, Kaden S, Out R, van Berkel TJ, Aerts JM, Ghauharali K, Sticht C, Gröne HJ (2010)** Hepatic glycosphingolipid deficiency and liver function in mice. *Hepatology* 51(5):1799-809.
- Johnstone RW (2002)** Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1(4):287-99.
- Jürgens HS, Schürmann A, Kluge R, Ortmann S, Klaus S, Joost HG, Tschöp MH (2006)** Hyperphagia, lower body temperature, and reduced running wheel activity precede development of morbid obesity in New Zealand obese mice. *Physiol Genomics* 25(2):234-41.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006)** Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121):840-6.
- Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW (2010)** Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. *Diabetes* 59(7):1657-66.
- Karmisholt J, Andersen S, Laurberg P (2011)** Weight loss after therapy of hypothyroidism is mainly caused by excretion of excess body water associated with myxoedema. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1):E99-103.
- Kazantsev AG, Thompson LM (2008)** Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7(10):854-68.
- Klaus S, Münzberg H, Trüloff C, 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):R287-93.
- Kleiber M (1967)** *Der Energiehaushalt von Mensch und Haustier*. Paul Parey, Hamburg.
- Klieverik LP, Coomans CP, Endert E, Sauerwein HP, Havekes LM, Voshol PJ, Rensen PC, Romijn JA, Kalsbeek A, Fliers E (2009)** Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology* 150(12):5639-48.
- Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003)** Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52(4):948-56.
- Köhrle J (2000)** The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Rev Endocr Metab Disord* 1(1-2):49-58.
- Köhrle J (2002)** Iodothyronine deiodinases. *Methods Enzymol* 347:125-67.
- Kolokotronis T, Van Savage, Deeds EJ, Fontana W (2010)** Curvature in metabolic scaling. *Nature* 464(7289):753-6.
- Kolter T, Proia RL, Sandhoff K (2002)** Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* 277(29):25859-62.
- Kolter T, Sandhoff K (2006)** Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758(12):2057-79.
- Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, Dhillon WS, Ghatgei MA, Small CJ, Bloom SR (2004)** Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology* 145(11):5252-8.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999)** Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98(3):285-94.
- Kouzarides T (2007)** Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4):693-705.

- Kozak LP (2010)** Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metab* 11(4):263-7.
- Krämer OH, Göttlicher M, Heinzl T (2001)** Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 12(7):294-300.
- Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G (1978)** Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett.* 91(1):113-6.
- Krotkiewski M (2000)** Thyroid hormones and treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2:S116-9.
- Krotkiewski M (2002)** Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 440(2-3):85-98.
- Kuiper GG, Kester MH, Peeters RP, Visser TJ (2005)** Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. *Thyroid* 15(8):787-98.
- Kuo MH und Allis CD (1998)** Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20(8):615-26.
- Kurdistani SK, Grunstein M (2003)** Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4):276-84.
- Lafrenière RG, Carrel L, Willard HF (1994)** A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum Mol Genet* 3(7):1133-9.
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schuettengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C (2002)** Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 21(11):2672-81.
- Lahiri S, Futerman AH (2007)** The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 64(17):2270-84.
- Landsberg L, Young JB, Leonard WR, Linsenmeier RA, Turek FW (2009a)** Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism* 58(6):871-6.
- Landsberg L, Young JB, Leonard WR, Linsenmeier RA, Turek FW (2009b)** Do the obese have lower body temperatures? A new look at a forgotten variable in energy balance. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120:287-95.
- Larsen PR, Berry MJ (1995)** Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Annu Rev Nutr* 15:323-52.
- Lean ME (1989)** Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc* 48(2):243-56.
- Ledeer RW, Wu G, Lu ZH, Koziński-Chuback D, Fang Y (1998)** The role of GM1 and other gangliosides in neuronal differentiation. Overview and new finding. *Ann N Y Acad Sci* 845:161-75.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM (1997)** Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138(6):2569-76.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM (1998)** Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 68(2):89-97.
- Levine JA, Nygren J, Short KR, Nair KS (2003)** Effect of hyperthyroidism on spontaneous physical activity and energy expenditure in rats. *J Appl Physiol* 94(1):165-70.
- Liao XH, Di Cosmo C, Dumitrescu AM, Hernandez A, Van Sande J, St Germain DL, Weiss RE, Galton VA, Refetoff S (2011)** Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: a comparison of eight different mouse genotypes. *Endocrinology* 152(3):1180-91.
- Luchsinger JA, Gustafson DR (2009)** Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16(4):693-704.
- Lund AH, van Lohuizen M (2004)** Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18(19):2315-35.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al (1995)** Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1(11):1155-61.
- Magnus-Levy A (1895)** Ueber den respiratorischen Gaswechsel unter dem Einfluss der Thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen Zuständen. *Berlin Klin Wochenschr* 32:650-652.
- Mantzoros CS, Qu D, Frederich RC, Susulic VS, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS (1996)** Activation of beta(3) adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice. *Diabetes* 45(7):909-14.
- Marconi S, De Toni L, Lovato L, Tedeschi E, Gaetti L, Acler M, Bonetti B (2005)** Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. *J Neuroimmunol* 170(1-2):115-21.
- Marks N, Berg MJ, Saito M, Saito M (2008)** Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons. *Brain Res* 1191:136-47.

- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK (2001)** Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1(3):194-202.
- Marrif H, Schifman A, Stepanyan Z, Gillis MA, Calderone A, Weiss RE, Samarut J, Silva JE (2005)** Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor-alpha gene products. *Endocrinology* 146(7):2872-84.
- Mathes WF, Kelly SA, Pomp D (2011)** Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *Br J Nutr* 106 Suppl 1:S1-10.
- Maynard LA (1944)** The Atwater system of calculating the caloric value of diets. *J Nutr* 28:443-452.
- Menahan LA, Sobocinski KA (1983)** Comparison of carbohydrate and lipid metabolism in mice and rats during fasting. *Comp Biochem Physiol B* 74(4):859-64.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996)** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387(2-3):113-6.
- Meredith D, Christian HC (2008)** The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* 38(7-8):1072-106.
- Meyer CW, Klingenspor M, Rozman J, Heldmaier G (2004)** Gene or size: metabolic rate and body temperature in obese growth hormone-deficient dwarf mice. *Obes Res* 12(9):1509-18.
- Meyer CW, Willershäuser M, Jastroch M, Rourke BC, Fromme T, Oelkrug R, Heldmaier G, Klingenspor M (2010)** Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299(5):R1396-406.
- Migliorini RH, Garofalo MA, Kettelhut IC (1997)** Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2):R656-61.
- Miljan EA, Bremer EG (2002)** Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* 2002(160):re15.
- Minucci S, Pelicci PG (2006)** Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6(1):38-51.
- Miyasaka K, Ichikawa M, Kawanami T, Kanai S, Ohta M, Sato N, Ebisawa H, Funakoshi A (2003)** Physical activity prevented age-related decline in energy metabolism in genetically obese and diabetic rats, but not in control rats. *Mech Ageing Dev* 124(2):183-90.
- Mizuno TM, Makimura H, Silverstein J, Roberts JL, Lopingco T, Mobbs CV (1999)** Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y, agouti-related peptide, and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin. *Endocrinology* 140(10):4551-7.
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrillova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C (1998)** Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 12(20):3168-81.
- Montagutelli X (2000)** Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. *J Am Soc Nephrol* 11 Suppl 16:S101-5.
- Montgomery RL, Davis CA, Potthoff MJ, Haberland M, Fielitz J, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Olson EN (2007)** Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 21(14):1790-802.
- Montgomery RL, Potthoff MJ, Haberland M, Qi X, Matsuzaki S, Humphries KM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2008)** Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice. *J Clin Invest* 118(11):3588-97.
- Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN (2009)** Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(19):7876-81.
- Moore KJ (1999)** Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes. *Drug Discov Today* 4(3):123-128.
- Morell P, Radin NS (1969)** Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. *Biochemistry* 8(2):506-12.
- Morgan H, Beck T, Blake A, Gates H, Adams N, Debouzy G, Leblanc S, Lengger C, Maier H, Melvin D, Meziane H, Richardson D, Wells S, White J, Wood J; EUMODIC Consortium, de Angelis MH, Brown SD, Hancock JM, Mallon AM (2010)** EuroPhenome: a repository for high-throughput mouse phenotyping data. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue):D577-85.
- Morhardt JE, Hudson JW (1966)** Daily torpor induced in white-footed mice (*Peromyscus* spp.) by starvation. *Nature* 212(5066):1046-7.
- Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ (2008)** Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93(7):773-97.
- Morrison SF, Nakamura K (2011)** Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci* 16:74-104.

- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006)** Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443(7109):289-95.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyraas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002)** Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915):520-62.
- Mutoh T, Tokuda A, Miyadai T, Hamaguchi M, Fujiki N (1995)** Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):5087-91.
- Mzilikazi N, Lovegrove BG (2002)** Reproductive activity influences thermoregulation and torpor in pouched mice, *Saccostomus campestris*. *J Comp Physiol B* 172(1):7-16.
- Nakamura K (2011)** Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301(5):R1207-28.
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B (2007)** Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2):E444-52.
- Nedergaard J, Cannon B (2010)** The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab* 11(4):268-72.
- Neufeld EF (1991)** Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem* 60:257-80.
- Nicholls DG, Locke RM (1984)** Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64(1):1-64.
- O'Brien T, Woychik R (2003)** Our small relative. *Nat Genet* 33(1):3-4.
- Oelkrug R, Heldmaier G, Meyer CW (2011)** Torpor patterns, arousal rates, and temporal organization of torpor entry in wildtype and UCP1-ablated mice. *J Comp Physiol B* 181(1):137-45.
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP (1991)** Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest* 87(1):125-32.
- Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D, Carpentier AC (2012)** Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 122(2):545-52. doi: 10.1172/JCI60433.
- Packard GC, Boardman TJ (1999)** The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comp Biochem Physiol Part A* 122(1): 37-44.
- Pazin MJ, Kadonaga JT (1997)** What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89(3):325-8.
- Pelletier P, Gauthier K, Sideleva O, Samarut J, Silva JE (2008)** Mice lacking the thyroid hormone receptor-alpha gene spend more energy in thermogenesis, burn more fat, and are less sensitive to high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology* 149(12):6471-86.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995)** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269(5223):540-3.

- Pfluger PT, Kirchner H, Günnel S, Schrott B, Perez-Tilve D, Fu S, Benoit SC, Horvath T, Joost HG, Wortley KE, Sleeman MW, Tschöp MH (2008)** Simultaneous deletion of ghrelin and its receptor increases motor activity and energy expenditure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(3):G610-8.
- Piehl S, Hoefig CS, Scanlan TS, Köhrle J (2011)** Thyronamines--past, present, and future. *Endocr Rev* 32(1):64-80.
- Poehlman ET, Toth MJ (1995)** Mathematical ratios lead to spurious conclusions regarding age- and sex-related differences in resting metabolic rate. *Am J Clin Nutr* 61(3):482-5.
- Pomp D, Nehrenberg D, Estrada-Smith D (2008)** Complex genetics of obesity in mouse models. *Annu Rev Nutr* 28:331-45.
- Proia RL (2003)** Glycosphingolipid functions: insights from engineered mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1433):879-83.
- Rao GS, Eckel J, Rao ML, Breuer H (1976)** Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 73(1):98-104.
- Rahmann H (1978)** Gangliosides and thermal adaptation in vertebrates. *Jpn J Exp Med* 48(2):85-96.
- Rahmann H, Hilbig R, Probst W, Muhleisen (1984)** Brain gangliosides and thermal adaptation in vertebrates. *M. Adv Exp Med Biol* 174:395-404.
- Ravussin E, Kozak LP (2009)** Have we entered the brown adipose tissue renaissance? *Obes Rev* 10(3):265-8.
- Reed DR, Lawler MP, Tordoff MG (2008a)** Reduced body weight is a common effect of gene knockout in mice. *BMC Genet* 9:4.
- Reed JA, Benoit SC, Pfluger PT, Tschöp MH, D'Alessio DA, Seeley RJ (2008b)** Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(4):E752-60.
- Renko K, Hoefig CS, Hiller F, Schomburg L, Köhrle J (2012)** Identification of Iopanoic Acid as Substrate of Type 1 Deiodinase by a Novel Nonradioactive Iodide-Release Assay. *Endocrinology* 153(5):2506-13.
- Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, Brent GA (2001)** Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest* 108(1):97-105.
- Ribeiro MO, Bianco SD, Kaneshige M, Schultz JJ, Cheng SY, Bianco AC, Brent GA (2010)** Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 151(1):432-40.
- Rikke BA, Yerg JE 3rd, Battaglia ME, Nagy TR, Allison DB, Johnson TEJ, Gerontol A (2004)** Quantitative trait Loci specifying the response of body temperature to dietary restriction. *Biol Sci Med Sci* 59(2):118-25.
- Ringwald M, Iyer V, Mason JC, Stone KR, Tadepally HD, Kadin JA, Bult CJ, Eppig JT, Oakley DJ, Briois S, Stupka E, Maselli V, Smedley D, Liu S, Hansen J, Baldock R, Hicks GG, Skarnes WC (2011)** The IKMC web portal: a central point of entry to data and resources from the International Knockout Mouse Consortium. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D849-55
- Rinn JL, Rozowsky JS, Laurenzi IJ, Petersen PH, Zou K, Zhong W, Gerstein M, Snyder M (2004)** Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function. *Dev Cell* 6(6):791-800.
- Rinn JL, Snyder M (2005)** Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet* 21(5):298-305.
- Ristow M (2004)** Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl)* 82(8):510-29.
- Robinson SW, Dinulescu DM, Cone RD (2000)** Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. *Annu Rev Genet* 34:687-745.
- Rosenthal N, Brown S (2007)** The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol* 9(9):993-9.
- Rothwell NJ, Stock MJ (1979)** A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* 281(5726):31-5.
- Rubio A, Raasmaja A, Maia AL, Kim KR, Silva JE (1995)** Effects of thyroid hormone on norepinephrine signaling in brown adipose tissue. I. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptors and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate generation. *Endocrinology* 136(8):3267-76.
- Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM, Grunstein M (1996)** HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25):14503-8.

- Saito M, oktamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M (2009)** High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58(7):1526-31.
- Sala-Roca J, Martí-Carbonell MA, Garau A, Darbra S, Balada F (2002)** Effects of chronic dysthyroidism on activity and exploration. *Physiol Behav* 77(1):125-33.
- Sananbenesi F, Fischer A (2009)** The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. *Biol Chem* 390(11):1145-53.
- Sanchez-Alavez M, Alboni S, Conti B (2011)** Sex- and age-specific differences in core body temperature of C57Bl/6 mice. *Age (Dordr)* 33(1):89-99.
- Sandhoff K, Kolter T (2003)** Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1433):847-61.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Hayase M, Tsuji T, Imagawa K, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K (1997)** The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett* 224(3):149-52.
- Savastano DM, Gorbach AM, Eden HS, Brady SM, Reynolds JC, Yanovski JA (2009)** Adiposity and human regional body temperature. *Am J Clin Nutr* 90(5):1124-31.
- Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, Frascarelli S, Crossley DA, Bunzow JR, Ronca-Testoni S, Lin ET, Hatton D, Zucchi R, Grandy DK (2004)** 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med* 10(6):638-42.
- Scanlan TS (2009)** Minireview: 3-Iodothyronamine (T1AM): a new player on the thyroid endocrine team? *Endocrinology* 150(3):1108-11.
- Scholander PF, Hock R, Walters V, Irving L (1950)** Adaptation to cold in arctic and tropical mammals and birds in relation to body temperature, insulation, and basal metabolic rate. *Biol Bull* 99(2):259-71.
- Schomburg L, Riese C, Michaelis M, Griebert E, Klein MO, Sapin R, Schweizer U, Köhrle J (2006)** Synthesis and metabolism of thyroid hormones is preferentially maintained in selenium-deficient transgenic mice. *Endocrinology* 147(3):1306-13.
- Schulte S, Stoffel W (1993)** Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10265-9.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG (2000)** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778):661-71.
- Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ, Stevenson RE (2005)** Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet* 77(1):41-53.
- Schwartz CE, Stevenson RE (2007)** The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(2):307-21.
- Schweizer U, Weitzel JM, Schomburg L (2008)** Think globally: act locally. New insights into the local regulation of thyroid hormone availability challenge long accepted dogmas. *Mol Cell Endocrinol* 289(1-2):1-9.
- Shahbazian MD, Grunstein M (2007)** Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75-100.
- Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, Griffin JW, Schnaar RL (1999)** Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7532-7.
- Silajdžić E, Willison HJ, Furukawa K, Barnett SC (2009)** In vitro analysis of glial cell function in ganglioside-deficient mice. *J Neurosci Res* 87(11):2467-83.
- Silva JE, Larsen PR (1983)** Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305(5936):712-3.
- Silva JE, Larsen PR (1985)** Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest* 76(6):2296-305.
- Silva JE (1988)** Full expression of uncoupling protein gene requires the concurrence of norepinephrine and triiodothyronine. *Mol Endocrinol* 2(8):706-13.
- Silva JE (1995)** Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5(6):481-92.
- Silva JE, Rabelo R (1997)** Regulation of the uncoupling protein gene expression. *Eur J Endocrinol* 136(3):251-64.
- Silva JE (2003)** The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med* 139(3):205-13.
- Silva JE (2006)** Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 86(2):435-64.

- Simons K, Toomre D (2000)** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):31-9. Erratum in: (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3):216.
- Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DC, Reinkensmeier G, Wang H, Wiznitzer M, Gurtz K, Verganelaki A, Pryde A, Patton MA, Dwek RA, Butters TD, Platt FM, Crosby AH (2004)** Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet* 36(11):1225-9.
- Sjögren M, Alkemade A, Mittag J, Nordström K, Katz A, Rozell B, Westerblad H, Arner A, Vennström B (2007)** Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO J* 26(21):4535-45.
- Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Marschall S, Wolf E, Balling R, Hrabé de Angelis M (2000)** The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm Genome* 11(7):507-10.
- Somech R, Izraeli S, J Simon A (2004)** Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer. *Cancer Treat Rev* 30(5):461-72.
- Söderlund V, Larsson SA, Jacobsson H (2007)** Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34(7):1018-22.
- Spiegelman BM, Flier JS (2001)** Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104(4):531-43.
- Sprong H, Kruithof B, Leijendekker R, Slot JW, van Meer G, van der Sluijs P (1998)** UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273(40):25880-8.
- Sprong H, Degroote S, Claessens T, van Drunen J, Oorschot V, Westerink BH, Hirabayashi Y, Klumperman J, van der Sluijs P, van Meer G (2001)** Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol* 155(3):369-80.
- St Germain DL, Galton VA (1997)** The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7(4):655-68.
- Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S (2010)** Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol* 688:141-55.
- Suzuki T, Abe T (2008)** Thyroid hormone transporters in the brain. *Cerebellum* 7(1):75-83.
- Svensson PA, Jernås M, Sjöholm K, Hoffmann JM, Nilsson BE, Hansson M, Carlsson LM (2011)** Gene expression in human brown adipose tissue. *Int J Mol Med* 27(2):227-32. doi: 10.3892/ijmm.2010.566.
- Swart I, Jahng JW, Overton JM, Houpt TA (2002)** Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5):R1020-6.
- Swoap SJ (2001)** Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(6):H2473-9.
- Swoap SJ, Gutilla MJ, Liles LC, Smith RO, Weinschenker D (2006)** The full expression of fasting-induced torpor requires beta 3-adrenergic receptor signaling. *J Neurosci* 26(1):241-5.
- Swoap SJ, Rathvon M, Gutilla M (2007)** AMP does not induce torpor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(1):R468-73.
- Swoap SJ (2008)** The pharmacology and molecular mechanisms underlying temperature regulation and torpor. *Biochem Pharmacol* 76(7):817-24.
- Swoap SJ, Weinschenker D (2008)** Norepinephrine controls both torpor initiation and emergence via distinct mechanisms in the mouse. *PLoS One* 3(12):e4038.
- Swoap SJ, Gutilla MJ (2009)** Cardiovascular changes during daily torpor in the laboratory mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(3):R769-74.
- Tagami S, Inokuchi Ji J, Kabayama K, Yoshimura H, Kitamura F, Uemura S, Ogawa C, Ishii A, Saito M, Ohtsuka Y, Sakaue S, Igarashi Y (2002)** Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem* 277(5):3085-92.
- Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, Fukumoto S, Haraguchi M, Takeda N, Fujimura K, Sakae M, Kishikawa M, Shiku H, Furukawa K, Aizawa S (1996)** Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20):10662-7.
- Thurlby PL, Trayhurn P (1980)** Regional blood flow in genetically obese (ob/ob) mice. The importance of brown adipose tissue to the reduced energy expenditure on non-shivering thermogenesis. *Pflugers Arch* 385(3):193-201.
- Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H (2007)** Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest* 117(3):627-35.
- Trajkovic-Arsic M, Müller J, Darras VM, Groba C, Lee S, Weih D, Bauer K, Visser TJ, Heuer H. (2010a)** Impact of monocarboxylate transporter-8 deficiency on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in mice. *Endocrinology* 151(10):5053-62.

- Trajkovic-Arsic M, Visser TJ, Darras VM, Friesema EC, Schlott B, Mittag J, Bauer K, Heuer H (2010b)** Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice. *Endocrinology* 151(2):802-9.
- Trayhurn P, Thurlby PL, James WP (1977)** Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice. *Nature* 266(5597):60-2.
- Trayhurn P, James WP (1978)** Thermoregulation and non-shivering thermogenesis in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Pflugers Arch* 373(2):189-93.
- Trayhurn P, Goodbody AE, James WP (1982)** A role for brown adipose tissue in the genesis of obesity? Studies on experimental animals. *Proc Nutr Soc* 41(2):127-31.
- Tremblay A, Pérusse L, Bouchard C (2004)** Energy balance and body-weight stability: impact of gene-environment interactions. *Br J Nutr* 92 Suppl 1:S63-6.
- Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, Zhang M, Zhu W, Wang T, Floss T, Goettlicher M, Noppinger PR, Wurst W, Ferrari VA, Abrams CS, Gruber PJ, Epstein JA (2007)** Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med* 13(3):324-31.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000)** Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-13.
- Tschöp MH, Speakman JR, Arch JR, Auwerx J, Brüning JC, Chan L, Eckel RH, Farese RV Jr, Galgani JE, Hambly C, Herman MA, Horvath TL, Kahn BB, Kozma SC, Maratos-Flier E, Müller TD, Münzberg H, Pfluger PT, Plum L, Reitman ML, Rahmouni K, Shulman GI, Thomas G, Kahn CR, Ravussin E (2011)** A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nat Methods* 9(1):57-63. doi: 10.1038/nmeth.1806.
- van Eijk M, Aten J, Bijl N, Ottenhoff R, van Roomen CP, Dubbelhuis PF, Seeman I, Ghauharali-van der Vlugt K, Overkleeft HS, Arbeeny C, Groen AK, Aerts JM (2009)** Reducing glycosphingolipid content in adipose tissue of obese mice restores insulin sensitivity, adipogenesis and reduces inflammation. *PLoS One* 4(3):e4723.
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ (2009)** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360(15):1500-8. Erratum in: *N Engl J Med* 360(18):1917.
- Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, Ribeiro MO, Bianco AC, Gouveia CH (2007)** Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol* 193(1):21-9.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S, Nuutila P (2009)** Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360(15):1518-25. Erratum in: *N Engl J Med* 361(11):1123.
- Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ (2007)** Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(2):223-36.
- Visser WE, Friesema EC, Visser TJ (2011)** Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 25(1):1-14.
- Voss AK, Thomas T, Gruss P (1998)** Efficiency assessment of the gene trap approach. *Dev Dyn* 212(2):171-80.
- Waddington CH (1942)** The Epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20.
- Webb GP, Jagot SA, Jakobson ME (1982)** Fasting-induced torpor in *Mus musculus* and its implications in the use of murine models for human obesity studies. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 72(1):211-9.
- Weiss RE, Murata Y, Cua K, Hayashi Y, Seo H, Refetoff S (1998)** Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology* 139(12):4945-52. Erratum in: *Endocrinology*. 2000 Dec;141(12):4767.
- White CR, Cassey P, Blackburn TM (2007)** Allometric exponents do not support a universal metabolic allometry. *Ecology* 88(2):315-23.
- Wikström L, Johansson C, Saltó C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, Forrest D, Thorén P, Vennström B (1998)** Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J* 1998 17(2):455-61.
- Willershäuser M (2007)** Thermophysiologicaler Vergleich zwischen UCP1-Knockout und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich ihrer Kältetoleranzschwelle und Wärmedurchgangszahl.
- Willershäuser M, Ehrhardt N, Elvert R, Wirth EK, Schweizer U, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabě de Angelis M, Rozman J, Klingenspor M (2012)** Systematic screening for mutant mouse lines with defects in body temperature regulation. In: *Living in a seasonal world – Thermoregulatory and metabolic adaptations* (eds. Ruf T, Bieber C, Arnold W, Millesi E). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH (2001)** The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74(4-5):683-701.

- Wirth EK, Roth S, Blechschmidt C, Hölter SM, Becker L, Racz I, Zimmer A, Klopstock T, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wurst W, Naumann T, Bräuer A, de Angelis MH, Köhrle J, Grüters A, Schweizer U (2009)** Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J Neurosci* 29(30):9439-49.
- Wirth EK (2010)** Untersuchungen zur Rolle des Monocarboxylattransporters 8 anhand des Knock-out Mausmodells.
- Wirth EK, Sheu SY, Chiu-Ugalde J, Sapin R, Klein MO, Mossbrugger I, Quintanilla-Martinez L, de Angelis MH, Krude H, Riebel T, Rothe K, Köhrle J, Schmid KW, Schweizer U, Grüters A (2011)** Monocarboxylate transporter 8 deficiency: altered thyroid morphology and persistent high triiodothyronine/thyroxine ratio after thyroidectomy. *Eur J Endocrinol* 165(4):555-61.
- World Health Organisation (2011)** Obesity and overweight. Fact sheet No° 311. <http://www.who.int/en/>
- Wurst W, de Angelis MH (2010)** Systematic phenotyping of mouse mutants. *Nat Biotechnol* 28(7):684-5.
- Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL (1999)** A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9142-7.
- Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, Kono M, Tsuji S, Daniotti JL, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL (2003)** Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6):3445-9.
- Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D, Seto E (1996)** Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23):12845-50.
- Yang WM, Yao YL, Sun JM, Davie JR, Seto E (1997)** Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem* 272(44):28001-7.
- Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ (2006)** Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res* 16(8):995-1004.
- Yen PM (2001)** Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81(3):1097-142.
- Yew NS, Zhao H, Hong EG, Wu IH, Przybylska M, Siegel C, Shayman JA, Arbeeny CM, Kim JK, Jiang C, Cheng SH (2010)** Increased hepatic insulin action in diet-induced obese mice following inhibition of glucosylceramide synthase. *PLoS One* 5(6):e11239.
- Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Saito M (2011)** Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring)* 19(1):13-6.
- Yousef MK, Dill DB (1971)** Daily cycles of hibernation in the kangaroo rat, *Dipodomys merriami*. *Cryobiology* 8(5):441-6.
- Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M (2009)** The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J Lipid Res* 50 Suppl:S440-5.
- Zeng Y, Tang CM, Yao YL, Yang WM, Seto E (1998)** Cloning and characterization of the mouse histone deacetylase-2 gene. *J Biol Chem* 273(44):28921-30.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994)** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 374(6521):479.
- Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Zhang J, Maniatis P, Pacheco J, Piepenhagen P, Copeland D, Arbeeny C, Shayman JA, Aerts JM, Jiang C, Cheng SH, Yew NS (2009)** Inhibiting glycosphingolipid synthesis ameliorates hepatic steatosis in obese mice. *Hepatology* 50(1):85-93.
- Zimmermann S, Kiefer F, Prudenziati M, Spiller C, Hansen J, Floss T, Wurst W, Minucci S, Göttlicher M (2007)** Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice. *Cancer Res* 67(19):9047-54.
- Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, Nedergaard J, Cinti S (2009)** The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* 23(9):3113-20.

## 7 Publikationen

Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Pimentel JA, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Dalke C, Ehrhardt N, Fasnacht N, Ferwagner B, Frischmann U, Hans W, Hölter SM, Hölzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kallnik M, Kling E, Lengger C, Maier H, Mossbrugger I, Mörth C, Naton B, Nöth U, Pasche B, Prehn C, Przemeczek G, Puk O, Racz I, Rathkolb B, Rozman J, Schäble K, Schreiner R, Schrewe A, Sina C, Steinkamp R, Thiele F, Willershäuser M, Zeh R, Adamski J, Busch DH, Beckers J, Behrendt H, Daniel H, Esposito I, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Höfler H, Ivandic B, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Mempel M, Müller W, Neschen S, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Rosenstiel P, Schmidt J, Schreiber S, Schughart K, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Hrabé de Angelis M (2009) The German Mouse Clinic: a platform for systemic phenotype analysis of mouse models. *Curr Pharm Biotechnol* 10(2):236-43.

Gailus-Durner V, Naton B, Adler T, Afonso L, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, Cohrs C, da Silva-Buttkus P, Hans W, Horsch M, Kahle M, Lengger C, Ludwig T, Maier H, Micklich K, Möller G, Neff F, Neschen S, Prehn C, Rathkolb B, Rozman J, Schiller E, Schrewe A, Scheerer M, Schöfer F, Steinkamp R, Stöger c, Thiele F, Tost M, Treis I, Willershäuser M, Zeh R, Adamski J, Bekeredjian R, Beckers J, Esposito I, Höfler H, Katus H, Klingenspor M, Klopstock T, Ollert M, Wolf E, Busch DH, Fuchs H, de Angelis MH (2011) Systematic mouse phenotyping in search of new gene candidates playing a role in energy homeostasis. In: *Mouse as a model organism- from animals to cells* (eds. Brakebusch C, Pihlajaniemi T). Springer-Verlag.

Helmut Fuchs, Susanne Neschen, Jan Rozman, Birgit Rathkolb, Sibylle Wagner, Thure Adler, Luciana Afonso, Juan Antonio Aguilar-Pimentel, Lore Becker, Alexander Bohla, Julia Calzada-Wack, Christian Cohrs, András Frankó, Lillian Garrett, Lisa Glasl, Alexander Götz, Michael Hagn, Wolfgang Hans, Sabine M. Hölter, Marion Horsch, Melanie Kahle, Martin Kistler, Tanja Klein-Rodewald, Christoph Lengger, Tonia Ludwig, Holger Maier, Susan Marschall, Kateryna Micklich, Gabriele Möller, Beatrix Naton, Frauke Neff, Cornelia Prehn, Oliver Puk, Ildikó Rácz, Michael Räß, Markus Scheerer, Evelyn Schiller, Felix Schöfer, Anja Schrewe, Ralph Steinkamp, Claudia Stöger, Irina Treise, Monja Willershäuser, Annemarie Wolff-Muscate, Ramona Zeh, Jerzy Adamski, Johannes Beckers, Raffi Bekeredjian, Dirk H. Busch, Jack Favor, Jochen Graw, Hugo Katus, Thomas Klopstock, Markus Ollert, Holger Schulz, Tobias Stöger, Wolfgang Wurst, Ali Önder Yildirim, Andreas Zimmer, Eckhard Wolf, Martin Klingenspor, Valérie Gailus-Durner, and Martin Hrabé de Angelis (2012) Chapter 7: Mouse Genetics and Metabolic Mouse Phenotyping. In: *Genetics Meets Metabolomics: from Experiment to Systems Biology* (ed. Suhre K). DOI 10.1007/978-1-4614-1689-0\_7, Springer Science+Business Media, LLC 2012

Meyer CW, Willershäuser M, Jastroch M, Rourke BC, Fromme T, Oelkrug R, Heldmaier G, Klingenspor M (2010) Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299(5):R1396-406.

Morgan H, Beck T, Blake A, Gates H, Adams N, Debouzy G, Leblanc S, Lengger C, Maier H, Melvin D, Meziane H, Richardson D, Wells S, White J, Wood J; EUMODIC Consortium, de Angelis MH, Brown SD, Hancock JM, Mallon AM (2010). EuroPhenome: a repository for high-throughput mouse phenotyping data. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue):D577-85.

**Nordström V\*, Willershäuser M\*, Rozman J, von Bohlen und Halbach O, Waldeck C, Gretz N, Meldner S, Rothermel U, Hrabé de Angelis M, Draghun A, Klingenspor M, Gröne HJ, Jennemann R** Neuron-specific deficiency of glucosylceramide synthase in adult forebrain leads to obesity and hypothermia. Manuskript eingereicht. \*Gleicher Beitrag

**Willershäuser M\*, Ehrhardt N\*, Elvert R, Wirth EK, Schweizer U, Gailus-Durner V, Fuchs H, Hrabé de Angelis M, Rozman J, Klingenspor M (2012)** Systematic screening for mutant mouse lines with defects in body temperature regulation. In: Living in a seasonal world – Thermoregulatory and metabolic adaptations (eds. Ruf T, Bieber C, Arnold W, Millesi E). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.  
\*Gleicher Beitrag

## **8 Danksagung**

Bei Prof. Martin Klingenspor möchte ich mich herzlich für die Betreuung und die große Unterstützung bedanken, die ich nicht erst seit meiner Promotion sondern schon während meiner Diplomarbeit bekommen habe. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Martin Hrabě de Angelis möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Promotion am Institut für Experimentelle Genetik im Metabolischen Screen der Deutschen Mauslinik durchführen zu können. Auch möchte ich mich für die Fortbildungsmöglichkeiten während meiner Promotion bedanken.

Frau Prof. Angelika Schnieke danke ich für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jan Rozman für die Betreuung meiner Dissertation an der Deutschen Mauslinik. Vielen Dank für die unendliche Geduld (um nur ein Stichwort zu nennen: Statistik) und Unterstützung, das immer offene Ohr, die wertvollen Ratschläge und anregenden Diskussionen sowie die Freiräume bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an meine Kooperationspartner, ohne die meine Dissertation in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre. Bei Herrn Prof. Martin Göttlicher (MML Hdac2), Herrn Prof. Josef Köhrle und Herrn PD Dr. Ulrich Schweizer (MML Mct8) sowie Herrn Prof. Hermann-Josef Gröne und Herrn Dr. Richard Jennemann (MML Ugcg) möchte ich mich für die Bereitstellung ihrer Mausmutantenlinien und die tolle Kooperation bedanken. Insbesondere möchte ich Dr. Eva Wirth und Dr. Viola Nordström für die enge Zusammenarbeit, Unterstützung und die inspirierenden Diskussionen danken. Dr. Kostja Renko danke ich für die Hilfe bei der Analyse der Dejodase 1 Aktivität in der Leber der MML Mct8. Ein weiterer Dank geht auch an Dr. Birigit Rathkolb und Elfi Holupirek für die Analyse der Klinisch-chemischen Blutparameter der MML Hdac2.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Helmut Fuchs und Dr. Valérie Gailus-Durner sowie dem gesamten GMC-Team.

Ein ganz großer Dank geht an Ann-Elisabeth Schwarz für die Einarbeitung in den Screen, die große Unterstützung bei der Analyse der Mausmutantenlinien sowie die vielen aufbauenden Gespräche. Auch bei Dr. Nicole Ehrhardt möchte ich mich für die Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit in der GMC und darüber hinaus

bedanken. Dem übrigen Metabolismus-Team danke ich ebenfalls für die schöne gemeinsame Zeit: Martin Kistler, Anna Dewert und Brigitte Herrmann. Bei meiner Arbeitsgruppe in Freising bedanke ich mich für die nette Aufnahme nach meinem Wechsel aus der GMC sowie die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Gespräche. Sabine Mocek danke ich für die Unterstützung bei der Gentyptisierung sowie für die Analyse des Ucp1-Gehalts im braunen Fettgewebe der MML Mct8.

Allen Mitdoktoranden danke ich für die lustigen Stunden, die wir zusammen verbracht haben sowie die interessanten Gespräche. Für das Gelingen der Arbeit möchte ich mich zudem bei Dr. Tobias Fromme, Dr. Anja Schrewe, Dr. Eva Wirth, Dr. Nicole Ehrhardt und Christoph Hoffmann bedanken sowie allen, die mir während meiner Promotion in der einen oder anderen Weise geholfen haben.

Meinen Freunden aus der Heimat möchte ich einfach Danke dafür sagen, dass ihr immer für mich da seid, auch wenn es insbesondere in den letzten Monaten oft nicht leicht mit mir gewesen ist. Ein weiterer Dank gilt den Freunden und Bekannten, die in meiner Zeit in München neu hinzugewonnenen habe und die es geschafft haben, dass ich mich nach anfänglichen Schwierigkeiten doch noch eingelebt habe. Ein großer Dank geht dabei an meinen Freund, der mich in den letzten Monaten sehr unterstützt hat und immer für mich da ist.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Großeltern und meinen Bruder. Ich kann euch garnicht genug danken. Ihr habt mir alles erst ermöglicht und ohne euch wäre ich oft verzweifelt. Vielen Dank für eure uneingeschränkte Unterstützung und das ihr immer hinter mir steht.