

TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

**Einfluss der Haltungsbedingungen auf die  
Entwicklung von Diabetes Typ 2 in  
verschiedenen Mausmodellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

**Abdullah Kandira**

Bafra

Hannover 2018

**Wissenschaftliche Betreuung:**

1. Univ.- Prof. Dr. H. Hackbarth, Institut für Tierschutz und Verhalten  
(Heim-, Labortiere und Pferde) Tierärztliche Hochschule Hannover

2. Dr. Gabi Itter, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main

1. Gutachter:

Univ.- Prof. Dr. H. Hackbarth  
Institut für Tierschutz und Verhalten  
(Heim-, Labortiere und Pferde)  
Tierärztliche Hochschule Hannover

2. Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Karl-Heinz Esser  
Institut für Zoologie  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2018

Die Arbeit wurde durch Sanofi Aventis Deutschland GmbH gefördert.

*Meiner Frau*  
*in Liebe und Dankbarkeit*  
*gewidmet*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literatur</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Haltung von Mäusen</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.1 Gesetzliche Vorgaben und Empfehlung</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.2 Umgebungstemperatur</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1.3 Einflüsse der Einstreuvolumen auf Körpertemperatur und Ammoniakkonzentration</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Thermogenese</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3 UCP1 – Funktion, Aktivierung, Inhibierung und Einflüsse</b> .....	<b>6</b>
<b>2.4 Freie Fettsäuren</b> .....	<b>8</b>
<b>2.5 Fettgewebe</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5.1 Allgemein</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5.2 Bildung des Fettgewebes</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5.3 Vorkommen von Fettgeweben</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5.4 Weißes Fettgewebe (WAT - <i>White adipose tissue</i>)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5.5 Braunes Fettgewebe (BAT - <i>Brown adipose tissue</i>)</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5.6 Beiges oder braunweißes Fettgewebe</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5.7 Browning</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Thermoneutralzone</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7 Diabetes Typ2</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7.1 Insulinresistenz</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7.2 OGTT – Orale Glukosetoleranztest</b> .....	<b>16</b>
<b>2.7.3 Plasma-Insulinspiegel</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Auswahl der Versuchstiere</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Haltungsbedingungen</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.1 Haltungsraum</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2 Wärmeschränk</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.3. Einstreu, Futter und Wasser</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3 Akklimatisation</b> .....	<b>20</b>

3.4	Versuchsverläufe.....	21
3.5	Methodik.....	21
3.5.1	Transponderimplantaion und Tätowieren der Tiere .....	21
3.5.2	Tiergewicht, Wasser- und Futterraufnahme .....	22
3.5.3	Körpertemperatur .....	22
3.5.4	Plasmainsulinspiegel.....	22
3.5.5	Blutglukose .....	22
3.5.6	Nesttemperatur .....	23
3.5.7	Ammoniakkonzentration .....	23
3.5.8	Glukosetoleranztest .....	23
3.5.9	Finale Blutentnahme/ Tötung.....	23
3.5.10	Fettsäurenbestimmung.....	24
3.5.11	Braunes Fettgewebe und UCP1-Bestimmung .....	24
3.6	Statistische Auswertung .....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
4.1	Ergebnisse der Mäuse mit Standarddiät .....	29
4.1.1	UCP1 .....	29
4.1.2	Braunes Fettgewebe .....	31
4.1.3	Freie Fettsäuren .....	32
4.1.4	Oraler Glukosetoleranztest.....	34
4.1.5	Plasmainsulin .....	35
4.1.6	Blutglukose .....	36
4.1.7	Gewichtsentwicklung.....	38
4.1.8	Futter- und Wasserverbrauch .....	40
4.1.9	Körpertemperatur .....	43
4.1.10	Ammoniak .....	44
4.1.11	Nesttemperatur .....	46
4.2	Ergebnisse bei Fütterung mit Fettdiät.....	48
4.2.1	UCP1 .....	48
4.2.2	Braunes Fettgewebe .....	50
4.2.3	Freie Fettsäuren .....	51
4.2.4	Oraler Glukosetoleranztest.....	53
4.2.5	Plasmainsulin .....	54

4.2.6 Blutglukose .....	56
4.2.7 Gewichtsentwicklung.....	58
4.2.8 Futter- und Wasserverbrauch .....	60
4.2.9 Körpertemperatur .....	63
4.2.10 Ammoniak .....	65
4.2.11 Nesttemperatur .....	67
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1 UCP1, braunes Fettgewebe und freie Fettsäuren .....	69
5.2 Glukosetoleranz, Blutglukose und Plasmainsulin.....	70
5.3 Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch .....	72
5.4 Körpertemperatur .....	73
5.5 Nesttemperatur und Ammoniak.....	73
5.6 Schlussfolgerung .....	74
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>78</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>9 Rechtsgrundlagenverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>10 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>11 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>12 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>13 Danksagung.....</b>	<b>97</b>



### **1 Einleitung**

Die Umgebungstemperatur hat einen wesentlichen Einfluss auf den Stoffwechsel, den Energiebedarf und somit auf den Wärmehaushalt des Individuums. Die Umgebungstemperatur ist daher eine kritische Variable in metabolischen Studien. Studien haben gezeigt, dass Mäuse bei Temperaturen unterhalb ihrer Thermoneutralzone von ca. 30°C zusätzlich Energie für thermoregulatorische Wärmeproduktion aufbringen müssen (CANNON u. NEDERGAARD 2011).

Der Bereich der Umgebungstemperatur, in welchem die basale Wärmeproduktion ausreicht, um die Wärmeverluste an die Umgebung auszugleichen und daher keine zusätzliche Energie zur Regulation der Körpertemperatur aufgewendet werden muss, wird als thermoneutrale Zone bezeichnet (ECKERT et al. 2000). Unterhalb dieses Temperaturbereichs muss die Wärmeabgabe an die Umgebung durch Kältezittern oder zitterfreie Wärmebildung ausgeglichen werden, um die Körpertemperatur konstant zu halten.

Beim Kältezittern werden durch das Nervensystem Gruppen von antagonistisch arbeitenden Muskeln gleichzeitig aktiviert und durch die Spaltung von ATP wird die notwendige Energie für die Kontraktionen bereitgestellt (ECKERT et al. 2000). Untersuchungen haben gezeigt, dass eine zitterfreie Wärmebildung im braunen Fettgewebe (BAT- Brown Adipose Tissue) stattfindet. Die Wärmebildung wird über das entkoppelnde Protein 1 (UCP1-Uncoupling Protein 1) in den Mitochondrien der braunen Fettzellen 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 u. NEDERGAARD 2004). Diese Energie wird als Wärme freigesetzt. Bei akuter Kälteeinwirkung kompensiert der Körper die sinkende Körpertemperatur durch Muskelzittern. Dieser aufwendige Thermogenese-Prozess kann nur kurzfristig die absinkende Temperatur ausgleichen. Bei langfristiger Kälteexposition muss daher auf eine zitterfreie Wärmeproduktion umgesattelt werden. Dies führt zu einer Steigerung der UCP1-Expression und somit zu einem Anstieg an BAT (CANNON u. NEDERGAARD 2004). Braunes Fettgewebe befindet sich im Interscapular- (iBAT), Cervikal- (cBAT), Axillar- (aBAT), Mediastinal- (mBAT) und Perirenalbereich (prBAT).

Das Einstreumaterial hat einerseits Einfluss auf die Temperaturregelung und andererseits auf die Gesundheit und das Wohlbefinden der Nager. Laut den Studien (KIRCHNER et al. 2010, 2011) ist eine Espenholzeinstreu mit Faserstruktur besonders empfehlenswert. Ist der Einsatz einer Faser aus technischen oder hygienischen Gründen nicht möglich, sollten grobe statt feine Granulate verwendet werden. Weitere Studien (FREYMANN 2014; FREYMANN et al. 2015; FREYMANN 2017) zeigten, dass ein größeres Einstreuvolumen die Haltungsbedingungen für Labormäuse (BALB/c und C57BL/6) verbessern kann, ohne die benötigte Tierzahl eines Experiments zu erhöhen. In toxikologischen und pharmakologischen Studien beeinflusst das Einstreumaterial die Variabilität der Ergebnisse, wenn die Parameter abhängig von der Körpertemperatur sind (GORDON 2004). Es gibt zwar an Hand der Haltung von einigen Mausmodellen in verschiedenen Einstreutiefen Hinweise darauf, dass die Tiere mehr Einstreu wählen, aber der Einfluss auf die Thermogenese soll noch geklärt werden. Deshalb müssen in jedem Fall weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die sich mit Unterschieden zwischen den Mausstämmen beschäftigen und diese weiter beschreiben, damit die Auswirkung auf die unterschiedliche Stämme und der mögliche Einfluss auf die Versuchsergebnisse besser eingeschätzt werden können. (FREYMANN 2014).

Bei Labormäusen ist die Haltungstemperatur von 20-24°C deutlich unter ihrer Thermoneutralität. Die Tiere haben daher eine etwa 1,5-mal höhere Stoffwechselrate und einen 1,5-mal höheren Futtermittelverbrauch als ihr Bedarf unter optimalen Bedingungen ist (CANNON u. NEDERGAARD 2011). Der Kältestress der Tiere in der Standardhaltung hat das Potential, sowohl falsch-positive als auch falsch-negative Ergebnisse im Hinblick auf Stoffwechselaktivität zu generieren (CANNON u. NEDERGAARD 2011). Durch die zu kalte Umgebung können die Tiere Kalorien verbrennen ohne diabetisch zu werden und/oder der scheinbare Effekt eines Arzneimittels ist nur der Induktion von braunem Fettgewebe geschuldet. Dadurch besteht die Gefahr, dass Ergebnisse in Typ 2-Diabetes-Studien fehlerhaft interpretiert werden.

In dieser Studie soll untersucht werden, ob der Kältestress bei Mäusen durch vermehrte Einstreu und Erhöhung der Umgebungstemperatur reduziert werden kann und somit sich das Wohlbefinden der Mäuse erhöht. Außerdem soll untersucht werden, ob und wenn ja bei welchem Tiermodell sich die Induzierbarkeit eines Diabetes Typ 2 durch höhere Umgebungstemperaturen (mehr Einstreu) ändert. Dadurch ließe sich die Translatibilität von Mausmodellen des Diabetes Typ 2 erhöhen (3R-Refinement).

## 2 Literatur

### 2.1 Haltung von Mäusen

#### 2.1.1 Gesetzliche Vorgaben und Empfehlung

Das Deutsche Tierschutzgesetz (TierSchG), die Tierschutz–Versuchstierverordnung (TierSchVersV), die EU Richtlinie 2010/63 und die ETS fordern, Tiere entsprechend ihrer Art und ihrer Bedürfnisse angemessen zu ernähren, zu pflegen und verhaltensgerecht unterzubringen.

Die Mäuse müssen in Käfigen gehalten werden, die leicht zu reinigen und zu sterilisieren sind. Es dürfen keine Verletzungsgefahren bestehen und die Käfige sollen gut einsehbar sein (GV-SOLAS 2007, 2014). Die Haltung von Mäusen erfolgt normalerweise in transparenten Kunststoffkäfigen, in die Einstreumaterial zur Absorption von Urin eingebracht wird. Die Einstreumaterialien sollten trocken, absorbierend, staubfrei, ungiftig und frei von Krankheitserregern, Ungeziefer oder jeglicher anderer Art von Kontaminierung sein (ETS 123, Anhang A).

In der Regel werden die Labormäuse in Gruppen auf Einstreu gehalten. Um das Wohlbefinden der Mäuse zu erhöhen und die biologischen Bedürfnisse der Tiere zu erfüllen, wurden die Empfehlungen der ETS 123 (EU Empfehlungen für Tierhaltung) als Mindestanforderungen festgelegt.

Physikalische Anforderungen	Maus
Temperatur im Tierraum <sup>1)</sup>	20 – 24 °C
Luftfeuchte im Tierraum <sup>1)</sup>	45 – 65%
Luftwechsel <sup>1)</sup>	15 – 20 n/Stunde
Beleuchtung <sup>2)</sup>	<400 Lux

1) GV-SOLAS (2014)

2) NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2011)

#### 2.1.2 Umgebungstemperatur

Versuche von GORDON (1985) belegten, dass Mäuse Temperaturen zwischen 25°C und 30°C bevorzugten. Wahlversuche (GASSKILL et al. 2009) zeigten übereinstimmende Ergebnisse, dass C57BL/6J Mäuse deutlichere Präferenzen für wärmere Temperaturen (25°C oder 30°C) haben als für eine Temperatur von 20°C, insbesondere während der

Dunkelphase (aktive Zeit). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weibliche Mäuse 30°C als Umgebungstemperatur bevorzugen, im Vergleich zu männlichen Mäusen (GASKILL et al. 2009).

In der Regel werden die Labormäuse in Gruppen auf Einstreu gehalten und die Haltungstemperatur beträgt 20-24°C, was für die Mäuse viel zu kalt ist (GORDON 2004), weil das deutlich unter der präferierten Umgebungstemperatur der Tiere liegt. Auch von physiologische Veränderungen bei Mäusen aufgrund einer niedrigen Umgebungstemperatur von 20°C wurde berichtet, (MAHER et al. 2015; YAMAUCHI et al. 1983), einschließlich einer reduzierten Immunantwort im Vergleich zu in thermoneutraler Zone gehaltenen Tieren (KOKOLUS et al. 2013).

### **2.1.3 Einflüsse der Einstreuvolumen auf Körpertemperatur und Ammoniakkonzentration**

Da es nicht möglich ist, eine allgemeingültige, optimale Temperatur festzulegen (GASKILL et al. 2009), wurde empfohlen, tieferes Einstreu oder Nestmaterial anstatt einer erhöhten Umgebungstemperatur zur Verfügung zu stellen, damit die Tiere das Mikroklima in Käfigen selbst kontrollieren können (GORDON 2004; GASKILL et al. 2011, 2012). Die Studien von GORDON (2004) zeigten, dass die Einstreutiefe die Körpertemperatur beeinflusst und somit über die Stoffwechselaktivität auch Auswirkungen auf die Daten in pharmakologischen oder toxikologischen Studien haben könnte.

BALB/c- und C57BL/6-Mäuse, die auf einem höheren Einstreuvolumen gehalten wurden, hatten eine höhere Körpertemperatur während der Ruhephase und zeigten typische Anzeichen für Wärmeanpassung und einen reduzierten Energiebedarf (FREYMANN 2017).

Erhöhte Ammoniakspiegel führten insbesondere zu pathologischen Veränderungen in der Nasenregion und den oberen Atemwegen (VOGELWEID et al. 2011, FERRECCHIA et al. 2014, GAMBLE u. CLOUGH 1976) und beeinflussten die Aktivität der hepatischen mikrosomalen Enzyme (VESELL et al. 1976). YAHAV (2004) zeigte, dass die Ammoniakkonzentration die Thermoregulation beeinflussen kann. Die Ammoniakkonzentration ist außerdem antiproportional zur eingesetzten Einstreumenge und deren Absorptionsvermögen (WEISS et al. 2003, zit. nach KIRCHNER 2010). ROSENBAUM et al. (2009) haben festgestellt, dass eine größere Einstreumenge den

Ammoniakgehalt in IVC-Käfigen verringert und die Untersuchung von SMITH (2004) zeigten, dass auch die Einstreuart einen deutlichen Einfluss auf die Ammoniakkonzentration hatte.

### **2.2 Thermogenese**

Unter Thermogenese versteht man die Produktion von Wärme durch Stoffwechselprozesse, wie der Verdauung, Muskelaktivität und dem Energiestoffwechsel.

Das Prinzip der Thermogenese beruht auf dem mitochondrialen Protein Thermogenin/UCP1 im braunen Fettgewebe, das über seine Funktion als Uniporter Protonen über die Mitochondrienmembran transportiert und somit den Protonengradient abbaut. Die darin gespeicherte Energie wird nun in Form von Wärme umgesetzt. Bei dieser Art der Wärmebildung spricht man von biochemischer Thermogenese.

Daneben gibt es die muskuläre Thermogenese, die vor allem in der Skelettmuskulatur, durch körperliche Arbeit, erhöhten Muskeltonus und Kältezittern stattfindet. Die Wärmeproduktion erfolgt durch Kontraktion der Muskeln und einen Anstieg des Muskeltonus, dabei muss es nicht immer zu mechanisch (nutzbarer) Arbeit kommen. Beim Kältezittern dagegen wird der Muskeltonus weiter erhöht, was sich durch das Zittern der Muskulatur zeigt und dient in erster Linie zur Wärmeerzeugung.

Neben dem Kältezittern besteht noch die zitterfreie Thermogenese, die auch unter dem englischen Begriff "non-shivering" bekannt ist. Bei der zitterfreien Thermogenese wird gespeicherte oder direkt aus der Nahrung gewonnene Energie (Kohlenhydrate oder Fettsäuren) zur Generierung von Wärme genutzt. Zuständig für das Einleiten der zitterfreien Thermogenese ist das vom sympathischen Nervensystem freigesetzte Noradrenalin auf Grund von Kältestress, das letztendlich zur Aktivierung des wärmebildenden Proteins Thermogenin/UCP1 führt (CANNON u. NEDERGAARD 2011).

Die klassische zitterfreie Thermogenese ist eine fakultativ, adaptive Form der Wärmebildung, die durch Norepinephrininjektion akut induziert werden kann. Unter fakultativ versteht sich das Ein- und Ausschalten innerhalb von Minuten. Und unter adaptiv versteht sich die Entwicklung des zitterfreien Gewebes über Wochen (CANNON u. NEDERGAARD 2011).

Die Aktivierung der zitterfreien Thermogenese resultiert physiologisch aus einer Stimulation des Sympathikus, wodurch Noradrenalin freigesetzt wird, welches insbesondere über  $\beta$ 3-adrenerge Rezeptoren eine Lipolyse in braunen Adipozyten auslöst. Die aus der Lipolyse freigesetzten FFA werden über  $\beta$ -Oxidation weiter abgebaut. Im Mitochondrium bildet sich somit während der Atmungskette ein Protonengradient, der nicht zur Gewinnung von Energie in Form von ATP (oxidative Phosphorylierung) genutzt wird, sondern zur direkten Transformation in Wärme führt. Das braune Fettgewebe spezifisches mitochondriale Transmembranprotein UCP1 ist hier entscheidend beteiligt. Über den Anionen-Transporter UCP1 werden Protonen aus dem mitochondrialen Intermembranraum in die Matrix des Mitochondriums eingeführt. Damit ist UCP1 für eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zuständig. Die dadurch gewonnene Energie wird somit direkt in Wärme umgewandelt.

### **2.3 UCP1 – Funktion, Aktivierung, Inhibierung und Einflüsse**

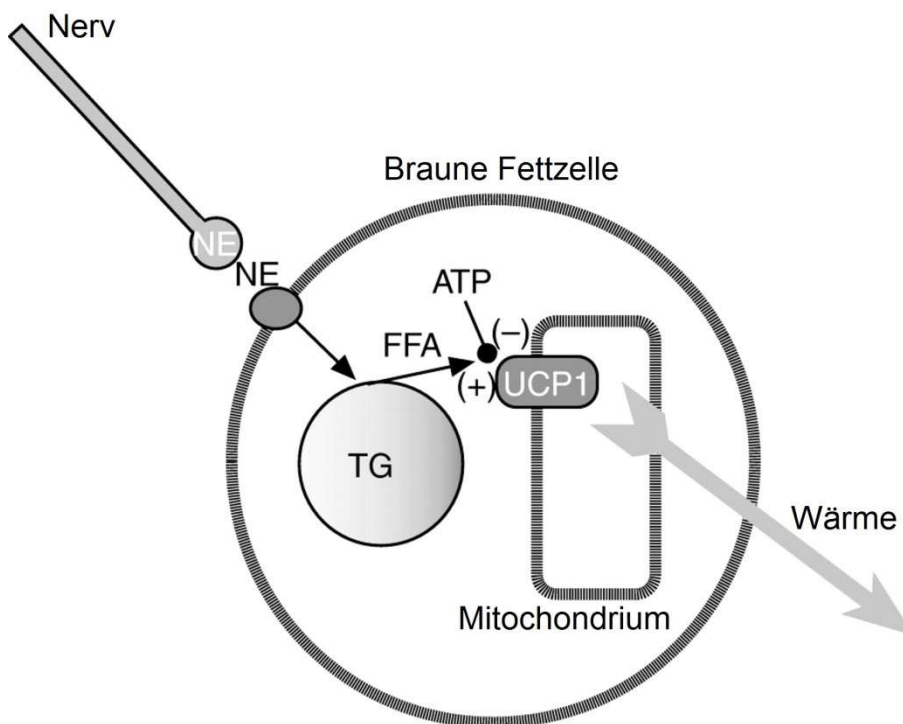
UCP1 oder auch Thermogenin ist ein Protein, welches hauptsächlich im braunen Fettgewebe gefunden wird und gilt als das wärmebildende Protein, indem es die Zerstreuung des durch die oxidative Phosphorylierung erzeugten Protonengradienten veranlasst (CANNON u. NEDERGAARD 2004). UCP1 befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und wird dort durch frei werdende Fettsäuren aktiviert. Dabei stammen die freien Fettsäuren von gespeicherten Triglyceriden ab, die in den Mitochondrien verbrannt werden (MÜLLER u. FRINGS 2009). Die große Anzahl an Mitochondrien erlaubt somit dem braunen Fettgewebe die Wärmebildung, ohne Zittern.

Die Freisetzung von Katecholaminen aus den sympathischen Nerven tritt in der Regel nach längeren Kälteauswirkungen, Stress oder als Reaktion auf Überfütterung auf (BUSIELLO et al. 2015). Die Katecholamine, wie Adrenalin und Noradrenalin, binden an Beta3-Rezeptoren, die fast ausschließlich in BAT vorkommen und aktivieren dort die braunen Adipocyten (KÖNIGSHOFF u. BRANDENBURG 2012).

Die Bindung von Noradrenalin an den Beta3-Rezeptor stimuliert die Adenylatzyklase. Dadurch kommt es zu einem Anstieg des „second messengers“ cAMP. Die Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA) führt zu einer Phosphorylierung der Lipase, die die freien Fettsäuren für die Fettsäuresynthese bereitstellt. UCP1 wird durch die Interaktion mit den freien Fettsäuren stimuliert. Die freien Fettsäuren entstehen durch den Abbau der Triglyceride, die sich in den Lipidtröpfchen befinden. Auf der

anderen Seite führt die PKA-Aktivierung zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors CREBP (CAMP-responsive-element-binding protein), der für die UCP1-Codierung in der Mitochondrienmembran zuständig ist (REHNER u. DANIEL 2010).

Die Inhibierung von UCP1 erfolgt durch cytosolische Purinnukleotide wie ATP und ADP, GTP, GDP (AZZU u. BRAND 2010). Dies führt zur Atmung in den Mitochondrien, die nun von der ATP-Synthese entkoppelt ist. Alle Energie aus der Verbrennung des Substrates (Nahrungsmittel) wird daher direkt als Wärme freigesetzt (CANNON u. NEDERGAARD 2011).



**Abbildung 1:** Die Grundprinzipien für die Wärmeproduktion im braunen Fettgewebe (CANNON u. NEDERGAARD 2011)

Das UCP1 bildet auf Grund seiner Struktur einen Protonenkanal in der inneren Mitochondrienmembran (FRISCHMUTH 2002). Die Atmungskette bildet in der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten. Durch die Aktivierung des Kanals strömen  $H^+$ -Ionen in das Innere des Mitochondriums. Die ausgebildete  $H^+$ -Permeabilitätserhöhung im Inneren verhindert die Erzeugung eines  $H^+$ -Gradienten, der für die ATP-Synthese notwendig ist. Sind die ATP-Vorräte aufgefüllt, pausiert die Atmungskette. Eine Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Produktion findet in den braunen Fettzellen statt. Durch die Kanaleigenschaft von UCP1 können Protonen

entweichen und infolgedessen wird der ATP-Bedarf nicht mehr gedeckt, die Atmungskette bleibt bestehen, was wiederum zur Wärmeproduktion führt (KURTZ et al. 2009, WANDREY et al. 2016).

UCP1 wurde erstmals im Jahre 1980 von Lin und Klingenberg isoliert und ist seit 2010 auch als Thermogenin bekannt (LIN u. KLINGENBERG 1980).

Während der Säugerevolution hat sich UCP1 relativ schnell aus einem nicht-thermogenen Protein entwickelt, wie es in Fischen gefunden werden konnte (JASTROCH et al. 2005). UCP1 kommt hauptsächlich auch in Säugetieren vor, wobei die Familie der Schweine die einzige Ausnahme darstellt (BERG et al. 2006). Schweine haben die Eigenschaft der UCP1-Expression sekundär verloren und sind deshalb unfähig zitterfreie Thermogenese zu betreiben (MOUNT 1968).

### **2.4 Freie Fettsäuren**

Die freien Fettsäuren (FFA) bilden im Plasma die Transportform für die chemische Energie und werden als Triglyceride im Fettgewebe gespeichert. Durch Botenstoffe wie Adrenalin, Noradrenalin, Glucagon oder ACTH kommt es zur Lipolyse im Fettgewebe, wodurch die Fettsäuren frei werden. Der Blutkreislauf transportiert die FFA zu den energiebedürftigen Zellen. Die Beta-Oxidation in den Mitochondrien wandelt die FFA zu Acetyl-CoA um, was der ATP-Gewinnung im Citratzyklus dient.

Ein Anstieg des Plasma-Fettsäure-Gehaltes wirkt als Hungersignal, wie er beim *Diabetes mellitus* auftritt und dadurch zu Übergewicht führen kann (CHRISTEN et al. 2015).

Die freien Fettsäuren spielen vor allem eine wichtige Rolle bei der zitterfreien Wärmeproduktion. Durch Kältestress erzeugt die Beta-Oxidation in den Mitochondrien freie Fettsäuren, die direkt das UCP1 aktivieren und Wärme bilden (PORTET et al. 1974, LAFRANCE et al. 1980).

In der Entstehung der Insulinresistenz wird insbesondere den FFA eine führende Rolle zugesprochen (BODEN 2011). Die FFA werden durch die starke Expansion des Fettgewebes im Rahmen der *Adipositas* vermehrt freigesetzt (RANDLE et al. 1963).

### 2.5 Fettgewebe

#### 2.5.1 Allgemein

Als Fettgewebe bezeichnet man lockeres Bindegewebe, das hauptsächlich aus Fettzellen/Adipocyten besteht (BIRBRAIR et al. 2013). Das Fettgewebe kann in zwei Typen unterschieden werden, die unterschiedliche Aufgaben aufweisen. Das Braune Fettgewebe oder BAT, aus dem englischen für „brown adipose tissue“ dient der Generierung der Körpertemperatur, wobei das für die Wärmeproduktion übliche Kältezittern nicht erfolgt. Das weiße Fettgewebe oder WAT, aus dem englischen für „white adipose tissue“, ist für die Energiespeicherung zuständig (MANN et al. 2014).

Eine wesentliche Rolle in der Verteilung des weißen und braunen Fettgewebes soll die Mikro-RNA 155 spielen (CHEN et al. 2013).

Weitere Studien konnten eine dritte Gruppe von Fettgewebe beobachten, das eine Art Mischfettgewebe aus braunem und weißem darstellt und deshalb als beiges oder braunweißes Fettgewebe bezeichnet wird (WU et al. 2012).

Somit unterscheiden sich die Fettgewebe-Typen nicht nur in ihrer Farbe sondern auch in der Morphologie, den metabolischen Funktionen, den biochemischen Eigenschaften und den genetischen Expressionsmustern (PARK et al. 2014).

#### 2.5.2 Bildung des Fettgewebes

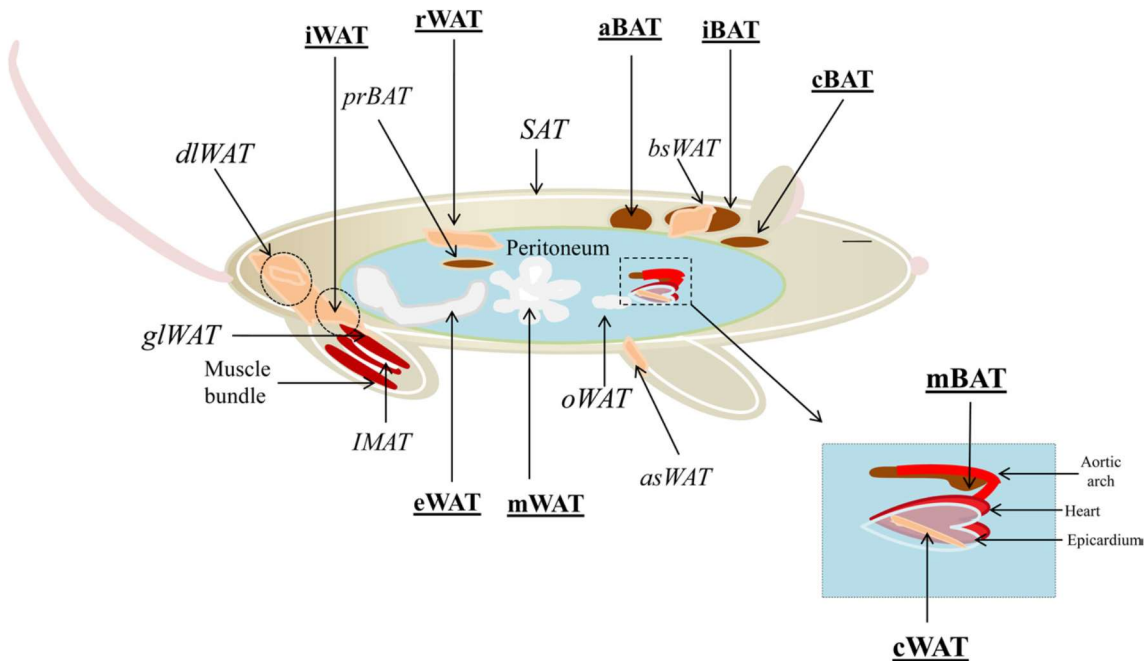
Die Entstehung des Fettgewebes beginnt mit der Bildung von Fettläppchen, die sich aus dem Zusammenschluss von Stammzellen und dem Einwachsen von Kapillaren bilden. Während der Adipogenese differenzieren sich Adipoblasten über Präadipozyten zu reifen Adipozyten aus. Transkriptionsfaktoren und Proteine der BMP-Familie spielen bei der Differenzierung der verschiedenen Fettzellstadien eine entscheidende Rolle (LURF 2013).

Weiter von Interesse ist die Differenzierung von braunen Adipocyten aus weißen Adipocyten, was als möglicher Therapieansatz bei adipösen Patienten gesehen werden kann (KAJIMURA et al. 2010).

Der Coaktivator PGC-1alpha (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator) steigert die Aktivität und Bildung des braunen Fettgewebes und wird vor allem durch Kältereize ausgeschüttet (LIANG u. WARD 2006).

### 2.5.3 Vorkommen von Fettgeweben

Fettgewebe kommt in vielen verschiedenen Körperregionen vor und dient somit der Polsterung und dem Schutz. Das Fett ist über den ganzen Körper verteilt und kann subdermal, subkutan, intramuskulär und viszeral liegen (MANN et al. 2014). Je nach Funktion und Lage ist das Fettgewebe stärker oder weniger stark ausgeprägt.



**Abbildung 2:** Darstellung von Fettgewebesdepots in der Maus (CANNON u. NEDERGAARD 2011)

Gewebe sind dunkelbraun für braunes Fettgewebe (BAT), hellbraun für „brite“ Fettgewebe und weiß für weißes Fettgewebe (WAT) dargestellt. iBAT, *interscapular* BAT; cBAT, *cervical* BAT; aBAT, *axillary* BAT; mBAT, *mediastinic* BAT; prBAT, *perirenal* BAT; cWAT, *cardiac* WAT; dlWAT, *dorsolumbar* WAT; iWAT, *inguinal* WAT; rWAT, *retroperitoneal* WAT; mWAT, *mesenteric* WAT; eWAT, *epididymal* WAT; bsWAT, *back subcutaneous* WAT; asWAT, *anterior subcutaneous* WAT; glWAT, *gluteal* WAT; oWAT, *omental* WAT; IMAT, *intramuscular adipose tissue*; SAT, *subdermal adipose tissue*.

### 2.5.4 Weißes Fettgewebe (WAT - *White adipose tissue*)

Die Adipozyten im WAT besitzen jeweils ein großes Lipidtröpfchen und eine variable Menge an Mitochondrien. Das Vorkommen von WAT im Körper ist hauptsächlich auf subkutane und viszerale Regionen begrenzt. Die Verteilung ist dabei von dem Geschlecht und Alter abhängig. Die geschlechtsabhängige Verteilung unterliegt der hormonellen

Kontrolle durch unterschiedliche Expressionsmuster von Östrogen- und Androgen-Rezeptoren. Die Hauptfunktion vom WAT ist die Speicherung von Energie in Form von Fettsäuren und der Schutz der Organe. Auf Grund der Hormonproduktion zählt das weiße Fettgewebe zu den endokrinen Organen (MANN et al. 2014, PARK et al. 2014).

Bei der Fettspeicherung nehmen die weißen Adipozyten Fettsäuren aus dem Blut auf und bilden über die Fettsäuresynthese/Lipogenese Lipide, die die Speicherform der Energie in den Zellen darstellt. Über die Lipolyse werden die Lipide gespalten, ins Blut abgegeben und stellen damit die benötigte Energie zur Verfügung. Insulin und Adrenalin steuern die Lipogenese und Lipolyse (SOBOTTA u. WELSCH 2005).

### **2.5.5 Braunes Fettgewebe (BAT - Brown adipose tissue)**

Die Adipocyten des BAT besitzen eine multilokuläre Morphologie und eine große Menge an Mitochondrien. BAT kommt vorwiegend im Nacken und in den großen Blutgefäßen sowohl des Thorax als auch des Schulterblattes vor (GIRALT u. VILLAROYA 2013). Da die Hauptfunktion von BAT in der Thermogenese besteht, zeigt es vor allem energieaufwendige Verhaltensweisen, um die benötigte Wärme zu liefern (SANCHEZ-GURMACHES et al. 2012).

Anders als die weißen Adipozyten, welche eine univakuoläre Morphologie aufweisen, sind braune Adipozyten multivakuolär und besonders reich an Mitochondrien. Der hohe Gehalt an Mitochondrien bedingt die bräunliche Erscheinung des Fettgewebes. Zusätzlich zeichnet sich das braune Fettgewebe durch eine starke Innervation und Vaskularisierung aus. Braunes Fettgewebe ist in der Lage, Energie über den Prozess der zitterfreien Thermogenese in Wärme umzuwandeln. Bei Nagern finden sich braune Fettdepots vor allem in interskapulären, aber auch axillären und periaortalen Bereichen (NEDERGAARD u. CANNON 2007). Das braune Fettgewebe stellt durch die Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese ein innovatives und vielversprechendes Ziel für die Behandlung der Adipositas und Insulinresistenz.

BAT beherbergt das einzigartige mitochondriale Protein UCP1, das für die Thermogenese ausschlaggebend ist.

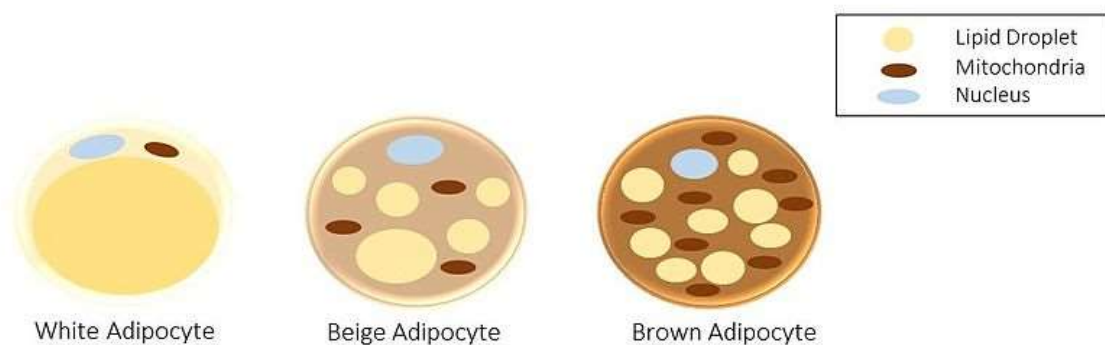
Aus Nagetierversuchen geht hervor, dass es zwei verschiedene Arten von braunen Adipozyten gibt: cBAT ist BAT embryonalen Ursprungs und kommt interskapulär vor. RBAT wird als induzierbares BAT bezeichnet und präsentiert sich zwischen WAT und Skelettmuskulatur (SCHULZ et al. 2003)

Für die Abiogenese von BAT sind das induzierende Noradrenalin und das hemmende TGF- $\beta$  die zwei wichtigsten Bestandteile (LURF 2013).

Studien widerlegten das ausschließliche Vorkommen von BAT bei Säuglingen (NEDERGAARD u. CANNON 2007; CYPESS et al. 2009; VAN MARKEN LICHTENBELT et al. 2009; VIRTANEN et al. 2009).

### 2.5.6 Beiges oder braunweißes Fettgewebe

Das beige Fettgewebe teilt sich eine analoge Morphologie und Expression mit BAT, aber hat seinen Ursprung in weißen Adipocyten (CHEN et al. 2013). Die beige Farbe entsteht, wenn sich Adipocyten in weißen Fettdepots zu braunen Adipocyten entwickeln. Dies ist vor allem auf die vermehrte Verteilung von Mitochondrien und Lipidtröpfchen, die charakteristisch für BAT sind, zurückzuführen. Durch eine erhöhte Expression des mitochondrialen UCP1 verändert sich somit auch die Funktion. Aus der anfangs energiespeichernden Zelle (WAT) wird nun eine energiefreisetzende Fettzelle (BAT, beige) (HARMS u. SEALE 2013).



**Abbildung 3:** Morphologie von drei verschiedenen Adipozyten. (TROIKE, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adipocyte\\_types.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adipocyte_types.jpg))

### 2.5.7 Browning

Unter „browning“ versteht man den Prozess der Umwandlung von normalem Fett in braune Fettzellen, die fettverbrennende Eigenschaften besitzen. Das gelingt den braunen Fettzellen indem sie das gespeicherte Fett unter Wärmeproduktion verbrennen. Da nicht nur Neugeborene diese Fähigkeit besitzen, sondern sich diese auch bei Erwachsenen findet, spielt das braune Fettgewebe in der Forschung vor allem in Bezug auf Übergewicht, Fettleibigkeit und der dadurch bedingt Erkrankung Diabetes mellitus eine wichtige Rolle (CYPESS et al. 2009).

Beim Ablauf der Wärmebildung kommt es durch den Protonenkanal UCP1 zur Entkopplung der Atmungskette und der ATP-Produktion in den braunen Fettzellen. Die Aufrechterhaltung dieses Prozesses durch den Verbrauch von Glukose und Fettsäuren führt zu einer Erhöhung der basalen Stoffwechselrate und kann zu einem Gewichtsverlust führen (LABBE et al. 2015; BARTELT et al. 2011; ROTHWELL u. STOCK 1989).

Dass für das *Browning* zuständige Protein ist UCP1. Die Stimulation der UCP1 Produktion ist somit von essentieller Rolle, da es zur Reduktion von Fettpolstern beitragen kann (WANDREY et al. 2016). Faktoren, die das *Browning* auslösen können, sind Kälte und Aktivierung des Beta3-Adrenozeptors in den Fettzellen (LONCAR 1991; HIMMS-HAGEN et al. 1994).

So zeigt die Mausstudie von GOSPODARSKA (2015), dass das kälteinduzierte *Browning* mit einer messbaren Abnahme von UCP1, innerhalb eines 24 Stunden-Zeitraums, innerhalb von 21 Tagen vollständig aufgehoben werden kann. Und werden die Tiere erneut einer kalten Umgebung ausgesetzt, adaptieren dieselben Adipozyten den beigen Phänotyp, was darauf hindeutet, dass beige Phänotypen beibehalten werden (ROSENWALD et al. 2013).

Die Regulation der *Browning-Induktion* erfolgt durch eine Vielzahl von Faktoren, darunter viele Transkriptionsregulatoren. Drei Regulatoren wird eine zentrale Rolle in dem *Browning-Prozess* zugeschrieben, sie dienen als Ziel für Moleküle, die den Prozess beeinflussen (LO u. SUN 2013). Dazu zählen:

PPARgamma (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

PRDM16 (PR domain containing 16)

PGC-1alpha (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha).

Die Anzahl der Moleküle, die den Prozess beeinflussen, steigt kontinuierlich an und je mehr Wissen vorhanden ist, desto mehr Moleküle werden es. Zwei gut studierte Moleküle sind Irisin und FGF21 (fibroblast growth factor 21). Irisin wird von Muskeln sekretiert als Antwort auf die Aktivität und es wurde gezeigt, dass es zu einem Anstieg des *Brownings* kommt, indem Irisin auf die beigen Prä-Adipocyten wirkt (BOSTRÖM et al. 2012). FGF21 ist ein Hormon, welches hauptsächlich von der Leber sekretiert wird und spielt eine wichtige Rolle als potenzieller Stimulator in der Glucose-Aufnahme und als *Browning-Regulator* (HARMS u. SEALE 2013).

Zu weiteren Mediatoren, die das Browning beeinflussen können, zählen Diäten und körperliche Aktivitäten (FENZL u. KIEFER 2014; LAEGER et al. 2014).

Viele Reaktionswege, die im WAT vorkommen und durch eine Kälteaussetzung hochreguliert sind, kommen auch im BAT vor. Dazu zählt oxidative Phosphorylierung, der Fettsäuremetabolismus und der Pyruvatmetabolismus (ROSELL et al. 2014). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Adipozyten in einen beigen Phänotyp wechseln.

### **2.6 Thermoneutralzone**

Die Thermoneutralzone beschreibt den Temperaturbereich der vorhandenen Umgebungstemperatur, bei der eine Temperaturregulation erreicht ist, ohne dass Veränderungen in der metabolischen Wärmeproduktion auftreten (MEMARZADEH 1998).

Für alle Säugetiere gibt es einen Bereich von Umgebungstemperaturen, in dem der allgemeine Stoffwechsel des Organismus ohne körperliche Aktivität genügend Wärme als Nebenprodukt des kontinuierlich laufenden Stoffwechsel erzeugt, sodass die vorbestimmte Körpertemperatur aufrecht erhalten werden kann. An dieser thermoneutralen Zone macht der Organismus seine basale Stoffwechselrate fest (CANNON u. NEDERGAARD 2011).

### **2.7 Diabetes Typ2**

#### **2.7.1 Insulinresistenz**

Insulin ist einer der wichtigsten Regulatoren der Adipozyten, die wiederum zu einem der am stärksten insulinreaktionsfähigen Zelltypen zählen. Insulin beeinflusst die Adipozyten-Triglycerid-Speicher, indem es die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten fördert und in reifen Adipozyten die Glucosetransporter- und Triglyceridsynthese stimuliert, sowie die Lipolyse hemmt. Außerdem steigert Insulin die Aufnahme von Fettsäuren, die aus zirkulierenden Lipoproteinen stammen, indem es die Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Fettgewebe stimuliert (KAHN u. FLIER 2000).

Insulin als Peptidhormon reguliert die Aufnahme der Glucose in die Körperzellen und gleichzeitig damit den Blutglukosespiegel. Es wirkt blutzuckersenkend und ist der natürliche Gegenspieler von Glucagon, das für die Freisetzung der Glukose aus den Körperzellen zuständig ist.

Von einer Insulinresistenz wird gesprochen, wenn die Wirkung des Insulins vermindert oder gar aufgehoben ist. Dies kann Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme, den Metabolismus oder den Speicher haben.

Es gibt verschiedene Ursachen, die zu einer Resistenz beim Menschen führen können. Teilweise sind die Ursachen jedoch noch nicht vollständig geklärt:

- Genetische Disposition
- Defekte der Insulinrezeptoren
- Verminderte zelluläre Expression von Insulinrezeptoren
- Bildung von Autoantikörpern gegen Insulin
- Verstärkter Abbau von Insulin

Als Folge der Insulinerhöhung im Blut kommt es zur Ausbildung einer Hyperinsulinämie und durch die verminderte bis ausbleibende Insulinwirkung zu einer pathologischen Glukosetoleranz oder auch Prädiabetes genannt, der sich bei steigender Resistenz zum Diabetes mellitus Typ 2 entwickeln kann (<http://flexikon.doccheck.com/de/Insulinresistenz>).

Die Insulinresistenz stellt einen der Hauptfaktoren dar, die für die Ausbildung eines Diabetes Typ 2 verantwortlich sind und steht möglicherweise mit Veränderungen im Fettstoffwechsel in Beziehung.

Die Studie von KIM et al. (2000) beschreibt den Mechanismus der Insulinresistenz anhand fettloser/magerer Mäuse. Das sind transgene Mäuse, die nahezu kein weißes Fettgewebe und stark reduzierte Mengen inaktiven braunen Fettgewebes besitzen und trotzdem einen Diabetes Typ 2 ausbilden. Zur Bestimmung des Mechanismus wurde die Aktivität und Signalwirkung des Insulins in Muskel- und Leberzellen gemessen.

Die Insulinresistenz bei den fettlosen Mäusen lässt sich auf die defekte Insulinaktivität in Leber- und Muskelzellen zurückführen. Hinzu kommt, dass die Aktivität des insulinstimulierenden Glukosetransporter in der Skelettmuskulatur der fettlosen Mäuse vermindert war.

Die verminderte Insulinaktivierung des Glukosetransporters in der Skelettmuskulatur stellt einen wesentlichen Faktor der Insulinresistenz in Patienten mit Diabetes Typ 2 und Übergewicht dar. Außerdem konnte in jungen gesunden Erwachsenen, deren Elternteil Diabetes Typ 2 hat, ein verminderter Muskel-Glukose-Transport/ eine verminderte

Phosphorylierungsaktivität beobachtet werden. Das zeigt, dass dieser Defekt ein Frühstadium in der Pathogenese des Diabetes Typ 2 sein kann. Dieser Defekt konnte ebenfalls bei den fettlosen Mäusen vor dem Diabetes Typ 2-Eintritt beobachtet werden.

Neben dem Defekt der Insulinwirkung in Muskel- und Leberzellen konnte gleichzeitig ein Anstieg der Triglycerid/Blutfettkonzentration in fettlosen Mäusen festgestellt werden. Dies könnte eine wichtige Beziehung zwischen den Triglyceriden und der Insulinwirkung sein. Diese Beziehung konnte auch in normalen und prä-diabetischen Menschen beobachtet werden, jedoch invers. Der Zusammenhang, der zwischen den erhöhten intrazellulären Triglyceride in der Skelettmuskulatur und der gestörten Insulinwirkung besteht, kann als möglicher Entwicklungsfaktor des Diabetes Typ 2 gesehen werden.

Durch eine Fetttransplantation gelingt es, die Triglyceride sowohl in den Muskel- als auch in den Leberzellen zu vermindern. Des Weiteren konnte dadurch die insulin-abhängige Stimulation der Glukosetransporter- und IRS-1-assoziierten PI3K-Aktivität in der Skelettmuskulatur und die IRS-2-assoziierte PI3K-Aktivität in der Leber zurück gebracht werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch die Transplantation eine Umverteilung der Triglyceride aus der Skelettmuskulatur und Leber in das transplantierte Fett erfolgt. Ein weiterer möglicher Punkt wäre die erhöhte Plasma-Leptin-Konzentration.

Ein weiterer Ansatz ist das von RANDLE et al. (1963) erstellte Konzept des Substratwettbewerbs zwischen Glukose und freien Fettsäuren, das postuliert, dass freie Fettsäuren durch eine Erhöhung der NADH/NAD- und Acetyl-CoA/CoA-Verhältnisse eine Insulinresistenz hervorrufen, was zur Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Entwicklung der Insulinresistenz bei Typ-2-Diabetes auf Veränderungen in der Verteilung von Fett zwischen Fettzellen und Muskel/Leber zurückzuführen ist. Das führt zur Akkumulation von Triglyceriden in Muskel und Leber mit anschließender Beeinträchtigung der Insulinsignalwirkung und -Aktivität (KIM et al. 2000).

### **2.7.2 OGTT – Orale Glukosetoleranztest**

Der Glukosetoleranztest, auch GTT, dient dem Nachweis einer gestörten Glukoseverwertung und kann zur Frühdiagnose des Diabetes mellitus eingesetzt werden. Die Glukose kann in unterschiedlicher Weise zugeführt werden, z. B. oral (in Wasser

gelöste Glukose) oder durch eine intravenöse Injektion, wobei die Menge genau festgelegt ist. Die Blutkonzentration steigt zunächst durch die zugeführte Glukose an, um anschließend auf Grund der Stimulation der Insulinsekretion wieder zu sinken ([http://flexikon.doccheck.com/de/Oraler\\_Glukosetoleranztest](http://flexikon.doccheck.com/de/Oraler_Glukosetoleranztest)).

Der OGTT wird standardmäßig unter Nahrungsentzug durchgeführt. Das Standardvorgehen für die OGTT bei der Maus ist diese über Nacht fasten zu lassen (HEIKKINEN et al. 2007; MUNIYAPPA et al. 2008).

### **2.7.3 Plasma-Insulinspiegel**

Unter dem Plasma-Insulin-Level versteht man die im Plasma vorhandene Menge Insulin. Die Ausschüttung von Insulin aus den Beta-Zellen des Pankreas erfolgt z.B. nach der Nahrungsaufnahme, auf Grund eines ansteigenden Plasma-Glukose-Levels. Durch die Bindung des Insulins an seinen spezifischen Insulin-Rezeptor wird die Aufnahme der Glukose aus dem Blut ins Fettgewebe und die Muskulatur eingeleitet und die Gluconeogenese in der Leber gehemmt. Die Plasma-Insulin-Konzentration hängt damit kurzfristig von der Plasma-Glukose-Konzentration ab. Auf Dauer spielt jedoch die periphere Insulin-Sensitivität eine wichtige Rolle, die vor allem beim Diabetes mellitus Typ 2 vermindert ist (ROTHER et al. 2006).

In einer Mausstudie von BRÜNNING (2000), bei der die spezifischen Insulinrezeptoren in den Neuronen ausgeschaltet waren, wurde ein fettleibiger Phänotyp beobachtet. Außerdem konnten gestörte Blutfettwerte und eine erhöhte Plasma-Insulin-Konzentration gemessen werden.

Das deutet darauf hin, dass über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Energie-Homöostase reguliert wird und für Gleichgewicht sorgt, indem der durch die Nahrungsaufnahme bedingte Anstieg des Insulin-Levels über seine Rezeptoren im Gehirn zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme führt (ROTHER et al. 2006).

Bei der Bestimmung des Plasma-Insulin-Levels ist darauf zu achten, woher die zu untersuchende Probe stammt, da die Werte je nach Quelle – venöses Plasma, venöses Vollblut oder kapillares Blut – variieren können.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Auswahl der Versuchstiere

Die vorliegende Studie wurde mit vier verschiedenen Mausstämmen durchgeführt. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Männliche Mäuse wurden genommen, weil in Vorversuchen geziegt werden konnte, dass nur männliche C57BL/6 unter Fettfütterung insulinresistent werden, und auch die anderen Tiermodelle in männlichen Tieren validiert worden sind.

Spezifiziert Pathogenfreie (SPF) BALB/cAnNRJ und C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, Frankreich) wurden als Kontrollgruppe eingesetzt. DIO (Diät-induzierte-Obese)-Tiermodelle, db/db (BKS.Cg-*Dock7<sup>m</sup>* +/+ *Lep<sup>db</sup>*/J, The Jackson Laboratory) und ob/ob (B6.Cg-*Lep<sup>ob</sup>*/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor ME, USA) wurden als spontan diabetische Tiermodelle gewählt.

B6.Cg-*Lep<sup>ob</sup>*/J (ob/ob): Das „obese“-Gen (ob-Gen) kodiert den „Sättigungsfaktor“ Leptin, welcher eine zentrale Rolle bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht spielt. Im Jahre 1994 gelang die Klonierung und Sequenzierung des ob-Gens in ob/ob-Mäusen (ZHANG et al. 1994). Eine Punktmutation im ob-Gen führt zum Abbruch der Proteinsynthese, wodurch die Bildung von biologisch aktivem Leptin verhindert wird. Mäuse mit dem ob/ob-Genotyp entwickeln ausgeprägtes Übergewicht und werden in Arzneimittelstudien als „Standardmodell“ für Adipositas und seine Komplikationen eingesetzt. Studien am Menschen legen sowohl eine Kopplung der humanen Variante der ob-Gen-Region mit extremen Adipositasformen nahe, aber auch, dass eine einzelne Mutation im ob-Gen nicht zwingend zur Entstehung von Übergewicht führt (CONSIDINE et al. 1995, 1996, NIKI et al. 1996).

BKS.Cg-*Dock7<sup>m</sup>* +/+ *Lep<sup>db</sup>*/J (db/db): Die „diabetic“ oder db-Mutation, welche in einem Rezeptor-Gen des „Sättigungsfaktors“ Leptin auftritt, wurde schon vor etwa 50 Jahren in einer Inzuchtmauslinie mit einer gestörten Körpergewichtsregulation und Blutzuckerkontrolle in Zusammenhang gebracht (HUMMEL et al. 1966). Das db/db-Mausmodell wurde in über 800 Publikationen ausführlich beschrieben und wird in Arzneimittelstudien als „Standardtiermodell“ für monogene Obesity (Diabetes assoziiert mit monogener Obesity = Übergewicht) eingesetzt. Db/db-Mäuse entwickeln auf Haltungsdiät rapide Übergewicht, Hyperglykämie, Polyurie und Glykosurie, alles charakteristische Symptome des humanen, mit Übergewicht-assoziierten Typ 2 Diabetes.

Nahezu 100% der männlichen und weiblichen db/db-Mäuse erkrankten spontan. Eine Limitierung der db/db-Mauslinie ist, dass die Ausbildung morbiden Übergewichts auf einer spontanen Mutation im Leptinrezeptor-Gen (G zu T Transversion im db Allel) beruht und das Tiermodell damit nur ein eingeschränktes „genetisches“ Spektrum humaner Diabetiker abbildet.

### 3.2 Haltungsbedingungen

Die Haltung erfolgte in Typ-III-Makrolonkäfigen (Tecniplast S.p.A., Buguggiate (VA), Italy), entweder bei  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  (in offener Regalen) oder bei  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  im Wärmeschrank.

#### 3.2.1 Haltungsraum

Die Tiere, die bei  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  gehalten wurden, wurden in einem Tierraum in offenen Regalen gehalten. Die Umweltbedingungen im Tierraum sind im Folgenden aufgeführt:

- Relative Luftfeuchtigkeit:  $55 \pm 10\%$
- Temperatur:  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Lichtregime: 12 Stunden hell (6.00 – 18.00 Uhr MEZ) / 12 Stunden dunkel (18.00 – 6.00 Uhr MEZ)
- Lichtintensität:  $280 \pm 30$  Lux (Raummitte, 1 m Höhe)
- Luftwechsel 16 fach pro Stunde

Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Hell- und Dunkelphasen wurden von einem Überwachungssystem (Watchdog® System, Edstrom, Inc., Wisconsin, USA) kontinuierlich aufgezeichnet.

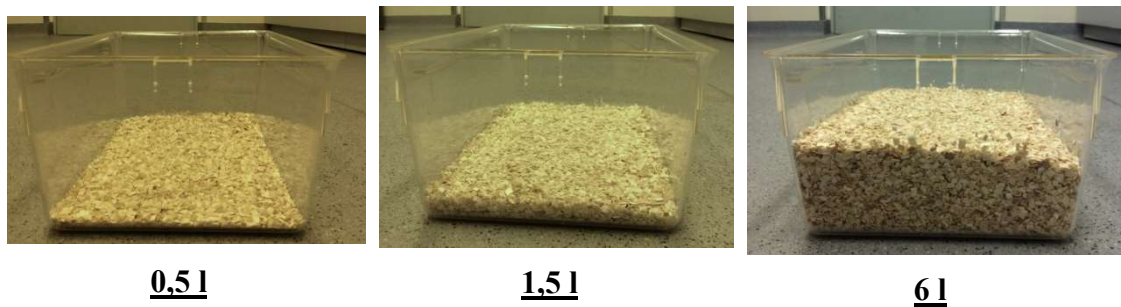
#### 3.2.2 Wärmeschrank

Die Tiere, die bei  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  gehalten wurden, wurden in einem speziellen Haltungsschrank (UniProtect, Air Flow Cabinet, Bioscape, Castrop-Rauxel, Germany) unter folgenden Umweltbedingungen untergebracht:

- Relative Luftfeuchtigkeit:  $50 \pm 10\%$
- Temperatur:  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Lichtregime: 12 Stunden hell (6.00 – 18.00 Uhr MEZ) / 12 Stunden dunkel (18.00 – 6.00 Uhr MEZ)

### 3.2.3. Einstreu, Futter und Wasser

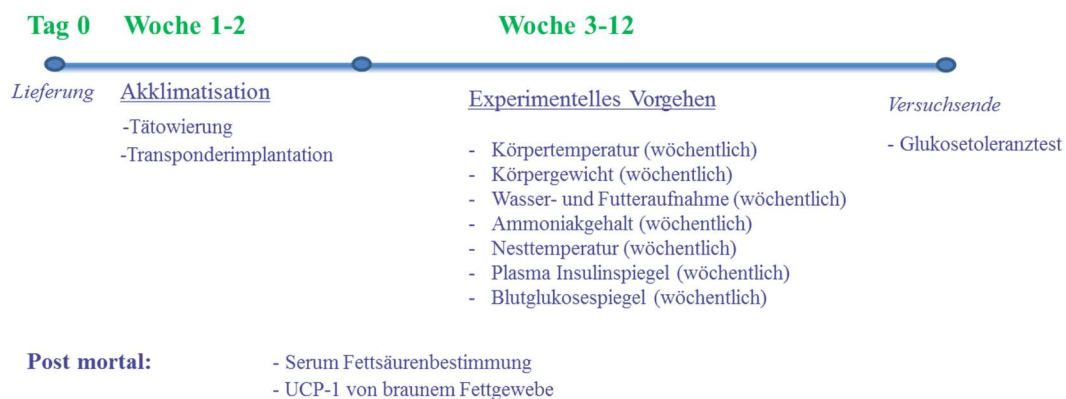
Alle Tiere wurden auf grobem Espenholzgranulat (LTE E-001, ABEDD<sup>®</sup>, LAB & VET GmbH Wien, Österreich) gehalten. Das Volumen der Einstreu pro Käfig (0,5 l, 1,5 l oder 6 l, Abbildung 4) war abhängig von der Versuchsgruppe (siehe Tabelle 1). Die Einstreu wurde bei den db/db- und ob/ob-Mäusen wegen der hohen Urinausscheidung alle 2 Tage und bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen wöchentlich gewechselt. Futter und Wasser (Leitungswasser in 750-ml-Trinkflaschen, Tecniplast S.p.A., Buguggiate (VA), Italy) wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt und deren Aufnahme regelmäßig kontrolliert. Als Standarddiät wurde „Altromin Nr. 1324“ (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und als Fettdiät „EF TD.97366 Adjusted Fat Diet“ (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 4:** Einstreutiefe in Typ-III-Makrolon<sup>®</sup> Käfigen mit 0,5 l, 1,5 l und 6 l Einstreu

### 3.3 Akklimation

Alle Tiere wurden im Alter von 3-4 Wochen angeliefert. Nach der Lieferung wurden die Tiere an die im Versuch vorgesehene Haltung und das Futter für 2 Wochen akklimatisiert (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Studiendesign.

### 3.4 Versuchsverläufe

Nach dem Eintreffen wurden die Tiere auf 8 Versuchsgruppen aufgeteilt (siehe Tabelle 1). Die Versuchsgruppen wurden jeweils auf 3 Käfige aufgeteilt, somit saßen jeweils 4 Mäuse im Käfig. Die Gesamtzahl der verwendeten Mäuse betrug 384 Tiere (12 Mäuse/Versuchsgruppe). In der zweiten Akklimatisationswoche wurde jedem Tier ein Transponder implantiert (Details siehe 3.5.2).

Nach Adaptation wurden die Ammoniakkonzentration im Käfig, die Nesttemperatur, die Wasser- und Futteraufnahme, das Körpergewicht, die Körpertemperatur, sowie der Blutglukose- und Insulinspiegel wöchentlich gemessen. Am Ende des Versuches (64. Versuchstag) wurden braunes Fettgewebe, Fettsäuren, UCP1 und Glukosetoleranz analysiert oder getestet (Abbildung 5).

**Tabelle 1:** Gruppenverteilung pro Mausstamm

Gruppen	Futter	Haltung	Tierzahl/Käfig	Käfigzahl
1	Standarddiät	0,5 l Einstreu, 22°C	4	3
2		1,5 l Einstreu, 22°C	4	3
3		6 l Einstreu, 22°C	4	3
4		0,5 l Einstreu, 30°C	4	3
5	Fettdiät	0,5 l Einstreu, 22°C	4	3
6		1,5 l Einstreu, 22°C	4	3
7		6 l Einstreu, 22°C	4	3
8		0,5 l Einstreu, 30°C	4	3

### 3.5 Methodik

#### 3.5.1 Transponderimplantation und Tätowieren der Tiere

Zwecks Körpertemperaturbestimmung wurde in der zweiten Akklimatisationswoche bei allen Tieren ein subkutaner Transponder (LifeChip®, With Bio-Thermo™, Destron Fearing™, South St. Paul, Minnesota, USA) implantiert. Für die Transponderimplantation wurden die Tiere mittels 2% Isofluran (Isofluran CP©, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) in einer Narkosebox (Dräger Titus, © Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) anästhesiert.

Zur Tieridentifikation wurden die Tiere in der ersten Akklimatisationswoche (zwischen Tag 5 und Tag 8) mit einer durchgehenden Nummer (von 1 bis 384) am Schwanz tätowiert. Die Tätowierung erfolgte ohne Anästhesie mit einem Tätowiergerät (AIMS ATS-3, Hornell (NY), USA) und schwarzer Tätowierfarbe (AIMS 242B Permanent Black, Hornell (NY), USA).

### **3.5.2 Tiergewicht, Wasser- und Futteraufnahme**

Beim wöchentlichen Umsetzen wurden die Mäuse, das Futter und das Wasser mit einer Waage „Mettler PM6“ (Mettler, Schweiz) gewogen.

### **3.5.3 Körpertemperatur**

Die Körpertemperaturen wurden wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr durch die implantierten Transponder und ein Transponderlesegerät (ScanFlex AFX-100, Allflex®, Vitré, France) gemessen.

### **3.5.4 Plasmainsulinspiegel**

Die Bestimmung der Plasmainsulinspiegel erfolgte wöchentlich nach Blutentnahme zwischen 9:00 und 11:00 Uhr ca. 50 µl Blut (Hirschmann, NH4-Heparin Kapillare, 75mm/18µl, Eberstadt, Deutschland und Haematokrit-Versiegelungskit, Fa. BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland) aus den Schwanzgefäßen nach einer Schwanzspitzenpunktion (Punktion mit einer 23G Einmalkanüle (Fa. Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland)) entnommen. Plasma wurde mittels Hämatokrit-Zentrifuge (Haematokrit 20, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) über 2 Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute gewonnen. Die Lagerung des Plasmas bis zur Insulinmessung erfolgte bei -80°C.

Die Messung wurde mittels ELISA durchgeführt. Für den Test wurde ein Mouse/Rat Insulin Assay Kit (MSD, Meso Scale Discovery, Gaithersburg (MD), USA) und das Meso QuickPlex SQ 120 (MSD, Meso Scale Discovery, Gaithersburg (MD), USA) verwendet.

### **3.5.5 Blutglukose**

Blutglukose wurde wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr mittels eines Blutglukosemessgeräts (Accu-Chek Aviva, Roche Diabetes Care Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) in 5 µl Blut aus den Schwanzgefäßen gemessen.

### 3.5.6 Nesttemperatur

Die Nesttemperatur wurde wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr mittels eines Stabthermometers (Digital Thermometer 30.1018 EN 13485 TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) gemessen. Zur Messung wurde das Thermometer direkt in das Nest gehalten.

### 3.5.7 Ammoniakkonzentration

Die Ammoniakkonzentration wurde wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr mittels Gasprüfröhrchen (Ammoniak-Messröhrchen mit dem Messbereich 0,25-3 ppm, Dräger Tubes<sup>®</sup>, Ammonia 0.25/a, Draeger Safety AG & Co. KGaA, Hamburg, Deutschland) und Handpumpe (Röhrchenhandpumpe accuro<sup>®</sup> gas detection pump, Dräger Safety AG & Co. KGaA, Hamburg, Deutschland) im Zentrum des Käfigs 1 cm oberhalb der Einstreu gemessen. Die Werte wurden nach folgenden Kategorien bewertet:

**Tabelle 2:** Ammoniakmessung

Ammoniakkonzentration	0 ppm	> 0 - ≤ 0,25 ppm	> 0,25 - ≤ 3 ppm	> 3 ppm
Kategorie	0	1	2	3

### 3.5.8 Glukosetoleranztest

Der Glukosetoleranztest wurde am letzten Versuchstag (64. Versuchstag) durchgeführt. Die Blutzuckermessungen erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 120 Minuten. Vor der Glukoseapplikation wurden den Mäusen 12-15 Stunden lang das Futter entzogen. Dann wurde 2 mg pro g Körpergewicht Glukoselösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/μl oral appliziert. Die Blutglukosekonzentration wurde mit Hilfe der Hexokinase-Methode an einem Analysegerät (Cobas 8000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) im Labor Bioscentia Ingelheim bestimmt. Dazu wurden 5 μl Vollblut aus der Schwanzvene in 250 μl Hämolyselösung lysiert.

### 3.5.9 Finale Blutentnahme/ Tötung

Die finale Blutentnahme und die Tötung fanden am letzten Versuchstag (64. Versuchstag) statt. Die Tiere wurden mit 2% Isofluran (Isofluran CP<sup>©</sup>, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) anästhetisiert. Die finale Blutentnahme und die Tötung erfolgten durch Blutentzug durch Öffnen der großen Halsgefäße.

### **3.5.10 Fettsäurenbestimmung**

Um die Fettsäuren zu bestimmen, wurde vom Tötungsblut (64. Versuchstag) Serum generiert. Das Serum wurde mittels einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5417R, Eppendorf, Deutschland) über 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute gewonnen. Die Bestimmung freier Fettsäuren erfolgte bei Sanofi im internen Labor für Klinische Chemie (Industriepark Höchst, Frankfurt, Deutschland) unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland) und eines Analysegerätes (Cobas 6000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

### **3.5.11 Braunes Fettgewebe und UCP1-Bestimmung**

Zwecks Bestimmung der Masse des braunen Fettgewebes wurden cervicales, axilläres, perirenales und interscapuläres braunes Fettgewebe entnommen und freipräpariert (Sanofi internes Sektionslabor, Industriepark Höchst, Frankfurt, Deutschland).

Die UCP1-Werte wurden in dem interscapulären braunen Fettgewebe gemessen. Die Proben wurden mit einer Feinwaage (Mettler Toledo XP204, Mettler, Schweiz) gewogen und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Messung erfolgte in einem Sanofi internes Labor (Industriepark Höchst, Frankfurt, Deutschland).

### **Gewebeaufreinigung**

Für die Gewebeaufreinigung wurden Gewebestücke (Fett) in 450  $\mu\text{l}$  RLT-Puffer (zuständig für die Zell- und Gewebeanalyse) überführt. Dafür wurde das Precellys Keramik Kit 1.4 mm (50 x 2 ml Tubes, befüllt mit Keramikkügelchen) verwendet. Die Homogenisierung der biologischen Proben erfolgte im Precellys-24-Tischgerät (Bertin Technologies S.A.S, Montigny-le-Bretonneux, France) mit dem folgenden Programm: 6800 [rpm], 1 x 30 [s]. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und danach kurz abzentrifugiert.

Danach wurde die Probe auf den QIA-Shredder aufgetragen. Der QIA-Shredder ist ein Homogenisator, bestehend aus einem Biopolymer-Zerkleinerungssystem im Mikrozentrifugen-Spin-Säulen-Format. Die aufgetragene Probe wurde in ein Sammelröhrchen gegeben und zentrifugiert (3 Min., 10000 rpm). In dem Röhrchen wurde das homogenisierte Lysat gesammelt.

350 µl des Lysats wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend das RNeasy Mini Kit angewendet. Das RNeasy Mini Kit diente der RNA Aufreinigung und wurde mit entsprechendem Protokoll (RNeasy Mini Handbook von QIAGEN) durchgeführt. Danach wurde mittels Nano-Drop die RNA-Menge bestimmt.

#### **RNA-Quantifizierung**

Die RNA Quantifizierung kann über verschiedene Messmethoden erfolgen. Dabei bedient man sich der typischen Absorption der RNA bei 260 nm. Damit lässt sich die Konzentration der RNA bestimmen. Eingesetzte Geräte sind Photometer oder Nano-Drop. Für den Nano-Drop wurde die Menge von 1 µl der Probe zur Messung verwendet.

#### **cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase eine cDNA aus einer Einzelstrang-RNA synthetisiert. Die cDNA ist dabei komplementär zur RNA. Die Synthese findet im Zuge einer RT-PCR statt.

Benötigt wurden folgende Komponenten mit entsprechenden Volumina: (verwendetes Kit: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.)

**Tabelle 3:** Komponenten und Volumina für die cDNA-Synthese

Komponenten	µl für eine Probe	µl für eine 96-Well-Platte = 2 x reverse transcription (RT) Master-Mix
10 x RT Puffer	2	400
25 x dNTP Mix (100 mM)	0,8	160
10 x RT Primer (Random)	2	400
MultiScribe Reverse Transcriptase	1	200
H <sub>2</sub> O (nukleasefrei)	4,2	840
Gesamtmenge	10	2000
RNA (aus RNA-Quantifizierung)	20	für jede Reaktion einzeln zugeben

Zu Beginn wurden die Substanzen auf Eis aufgetaut und anschließend wie oben beschrieben mit ihren entsprechenden Volumina gemischt. Die Volumina wurden anhand der erforderlichen Anzahl von Reaktionen berechnet. Für mehrere Reaktionen, wie zum Beispiel in einer 96-Well-Platte, wurde ein Master-Mix hergestellt (siehe Tabelle 3).

Dabei wurden zusätzliche Reaktionen einberechnet, um überschüssiges Volumen als Verlust zur Verfügung zu haben. Die Herstellung erfolgte ebenfalls auf Eis.

20 µl des Master-Mix wurden in jedes Well einer 96-Well-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 20 µl der RNA-Probe in jedes Well gegeben und zwei Mal auf und ab pipettiert damit die Substanzen gut vermischt werden. Es ist darauf zu achten, keine Luftblasen beim Mixen in den Wells zu erzeugen. Gegebenenfalls können dieses durch vorsichtiges Klopfen auf eine feste Unterlage zum Platzen gebracht oder bei einem kurzen Zentrifugationsschritt entfernt werden. Die 96-Well-Platte wurde davor mit einer Folie verschlossen, um einen Verlust der Proben oder ein Überschwappen in ein anderes Well zu vermeiden. Durch die Zentrifugation wurde außerdem gewährleistet, dass Reste an der Innenseite der Wells ebenfalls auf den Boden gelangen. Bis zum Start des Thermocyclers wurde die 96-Well-Platte auf Eis gelagert.

Für die RT-PCR wurde der Thermocycler MJ Research PTC-200 Thermal Cycler (Co. GMI, Ramsey, MN, USA) verwendet mit folgendem Programm:

**Tabelle 4:** Programmeinrichtung der Thermocyclerbedingungen

Einstellung	Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Temp. [°C]	25	37	85	4
Zeit [Min.]	10	120	5	∞

Bei der Programmeinstellung muss darauf geachtet werden, dass das korrekte Volumen eingestellt wird. Die Dauer des Durchlaufs beträgt 2h 15 Min. Anschließend wurde die 96-Well-Platte bei -20°C gelagert oder direkt für weitere quantitative oder andere PCR-Anwendungen z.B. TaqMan eingesetzt.

#### **TaqMan PCR im Light Cycler**

Bei der TaqMan-Methode handelt es sich um eine quantitative PCR-Analysemethode, die auf Grund ihrer Komponenten zu einer erhöhten Spezifität der quantitativen PCR führt.

Für weitere Details siehe Handbuch, TaqMan® Gene Expression Assays Protocol von appliedbiosystems, November 2010.

Das Prinzip beruht auf der zusätzlichen 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase, um eine zweifach markierte Sonde zu spalten. Die Sonde ist an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Baut

die Taq-Polymerase die Sonde während der Gegenstrangsynthese am 5'-Ende ab, dann entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander. Dadurch kann eine steigende Fluoreszenz gemessen werden, was zu einer quantitativen Messung führt.

Die PCR-Reaktion fand in weißen 384-Well-Platten im Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) statt.

Zu Beginn wurden die Substanzen auf Eis aufgetaut und anschließend bis zur Herstellung des Master-Mix auf Eis gearbeitet.

Folgende Komponenten wurden mit entsprechenden Volumina gemischt und ein Master-Mix angelegt. Außerdem wurden zusätzliche Reaktionen einberechnet, um überschüssige Volumina als Verlust zur Verfügung zu haben:

**Tabelle 5:** Komponenten und dazugehörigen Volumina

<b>Komponenten</b>	<b>µl für eine Probe</b>	<b>µl eine 96-Well-Platte</b>
TaqMan Gene Expression Master-Mix (appliedbiosystems Nr. 4369016) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	10	1000
Primer	1	100
H <sub>2</sub> O (RNasefrei)	5	500
Gesamtmenge	16	1600
cDNA	4	für jede Reaktion einzeln zugeben

Nach der Herstellung des Master-Mix in einem 2 ml-Eppendorfgefäß wurde der Mix in ein geteiltes 25 ml-Reservoir umgefüllt und auf Eis gelagert.

16 µl des Master-Mix wurden in die Wells vorgelegt und anschließend 4 µl unverdünnte cDNA (stammt aus cDNA-Synthese-Schritt, siehe 4. cDNA-Synthese) zugegeben. Auch hier wurde das Gemisch durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und Luftblasen vermieden. Die Platte wurde mit einer Folie abgedichtet und danach bei 2 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert.

Die Amplifikation der Proben in der Platte erfolgte im Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei folgendem Programm, das vom Hersteller als ‚schneller Durchlauf‘ bezeichnet wird:

**Tabelle 6:** Programmeinstellung für die PCR im Light Cycler 480

Funktion	Zyklus	Temp. [°C]	Zeit
Denaturierung	1	95	10 Min.
Amplifikation	45	95	15 s
		60	45 s
Kühlung	1	40	10 s

Eingesetzte Primer waren: UCP1, PRDM16, TLE3 und RPL37a.

Die Gesamtdauer des Durchlaufs betrug 1 h 15 Min.

Eine Auswertung der Daten konnte an dem Gerät selbst durchgeführt und auf einen Speicherplatz exportiert werden.

#### **3.6 Statistische Auswertung**

Die Analyse aller Daten erfolgt mittels des PASW-Computerprogramms (IBM® SPSS® Statistics 24, 2016, IBM Corp. Armonk NY, USA). Für die Daten von Ammoniak, Nest, Temperatur, Körpertemperatur, Glukose, so wie Futter- und Wasserverbrauch (pro Tier pro Woche), wurden die Mittelwerte von zehn Wochen berechnet und dann ausgewertet.

Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet und gegebenenfalls mittels nachfolgenden Scheffé-Test auf Unterschiede zwischen den Mäusestämmen oder den Einstreuvolumina verglichen. Die Auswertung der nichtparametrischen Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis H-Test und Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzlevel wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt. Für alle Daten wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

### 4 Ergebnisse

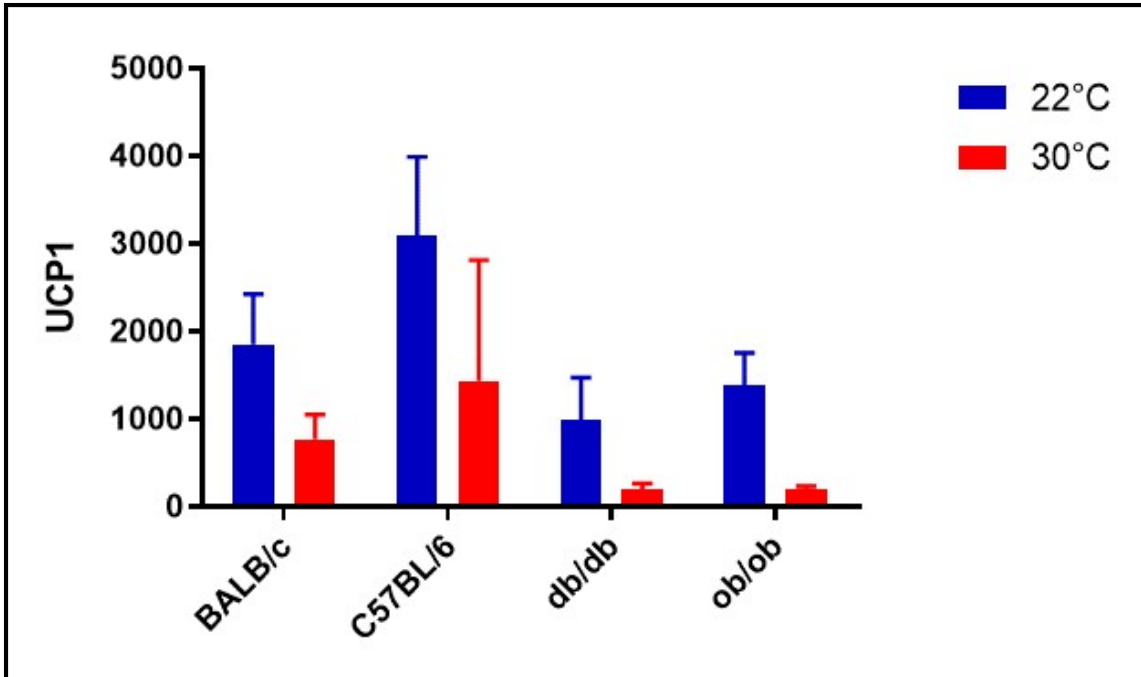
#### 4.1 Ergebnisse der Mäuse mit Standarddiät

##### 4.1.1 UCP1

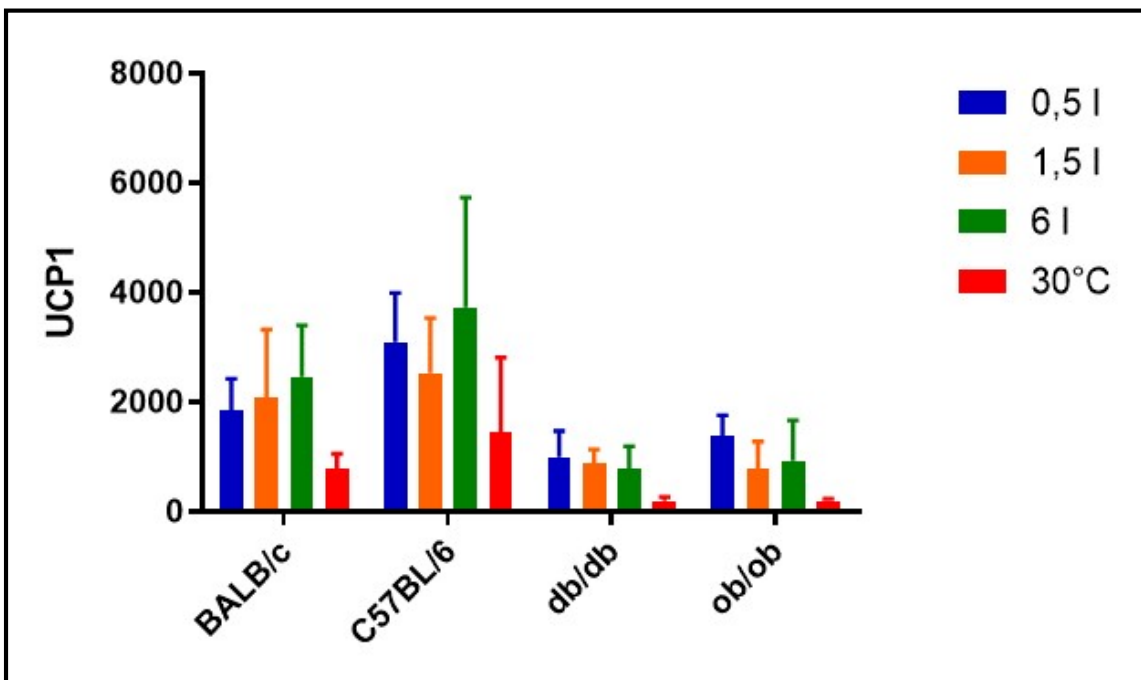
Die Untersuchung der UCP1-Expression in iBAT bei 30°C und 22°C-Haltungstemperatur ergab eine deutliche Abnahme der Expression bei der höheren Temperatur (siehe Abbildung 6; C57BL/6: Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,011$ ; BALB/c, db/db und ob/ob: ANOVA:  $p<0,001$ ).

Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt. Die UCP1-Expression der C57BL/6-Mäuse im iBAT war tendenziell höher als die der anderen Mäuse. Des Weiteren war ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-diabetischen Mäusestämmen zu erkennen (BALB/c vs. C57BL/6: Scheffe-Test: 0,5 l (22°C):  $p=0,001$ ; 30°C:  $p<0,0001$ ). Die Stammunterschiede waren zwischen C57BL/6 und den Krankheitsmodellen (db/db und ob/ob) in allen Haltungsbedingungen (Mann-Whitney U-test:  $p<0,001$ ) deutlicher. Darüber hinaus war ein signifikanter Unterschied zwischen den UCP1 der BALB/c- und db/db-Mäuse in allen Haltungsbedingungen zu erkennen (Scheffe-Test: 0,5 l (22°C):  $p=0,032$ ; Mann-Whitney U-test: 1,5 l + 6 l + 30°C:  $p<0,0001$ ). Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen db/db- und ob/ob- Mäusen erkennen.



**Abbildung 6:** UCP1-Expression in iBAT (Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)



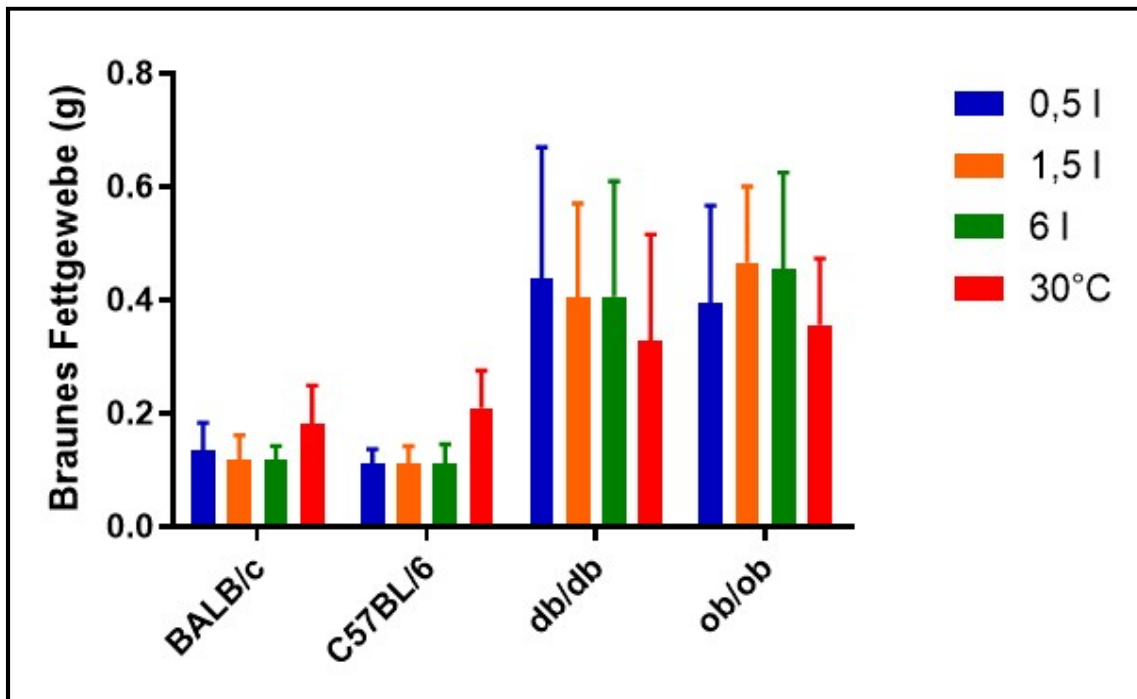
**Abbildung 7:** UCP1-Expression in iBAT (Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen

#### 4.1.2 Braunes Fettgewebe

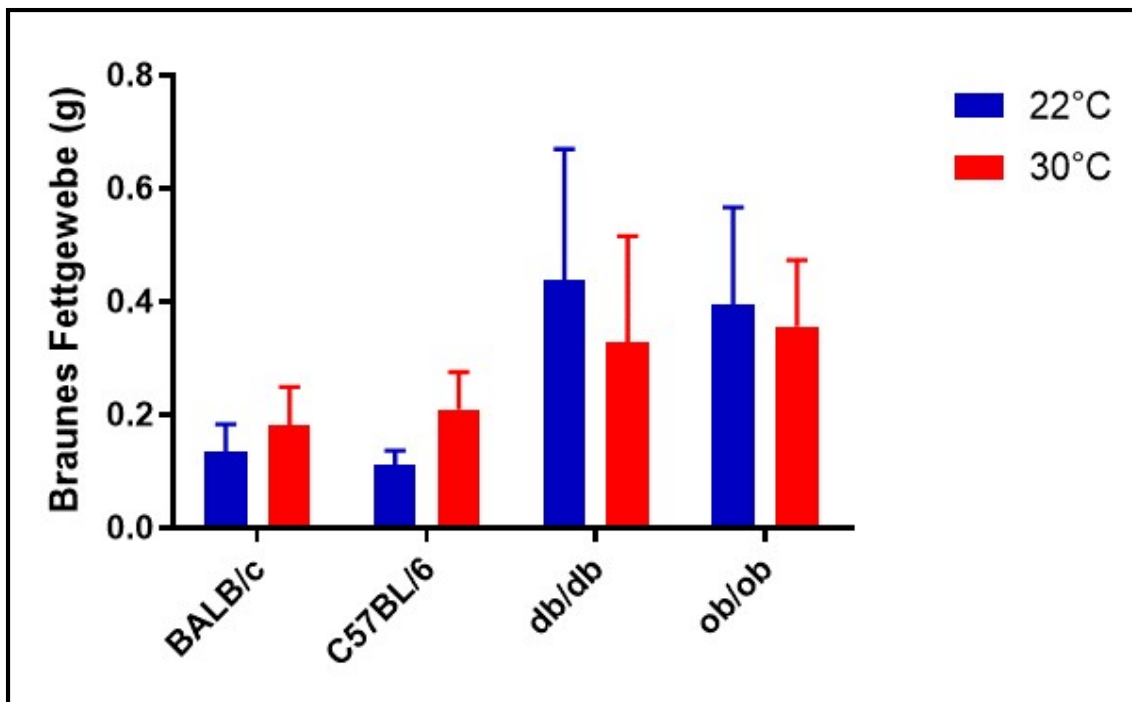
Für die BAT-Messung wurde die Gesamt-BAT-Masse (cervicales, axiläres, perirenales und interscapuläres braunes Fettgewebe) statistisch bewertet. Die Gesamt-BAT war im Gegensatz zur UCP1-Expression in den Kontrolltieren signifikant geringer als bei db/db- und ob/ob-Mäusen (siehe Abbildung 8).

Mit allen Haltungsgruppen verglichen entwickelten die db/db- und ob/ob-Mäuse signifikant höhere Fettmassen (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zur 22°C-Haltungstemperatur wurden bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen, bei 30°C-Haltungstemperatur höhere Fettmassen gemessen, das war bei db/db- und ob/ob-Mäusen umgekehrt. Des Weiteren zeigten nur die C57BL/6-Mäuse einen signifikanten Unterschied zwischen 22°C- und 30°C-Haltungsbedingungen mit 0,5 l Einstreu (ANOVA:  $p < 0,001$ , siehe Abbildung 9).

Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen in verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikante Unterschiede nachweisen.



**Abbildung 8:** Die Gesamt-BAT-Masse ([g], Mittelwert  $\pm$  SD) der mit Standarddiät gefütterten Mäuse bei in allen Haltungsbedingungen



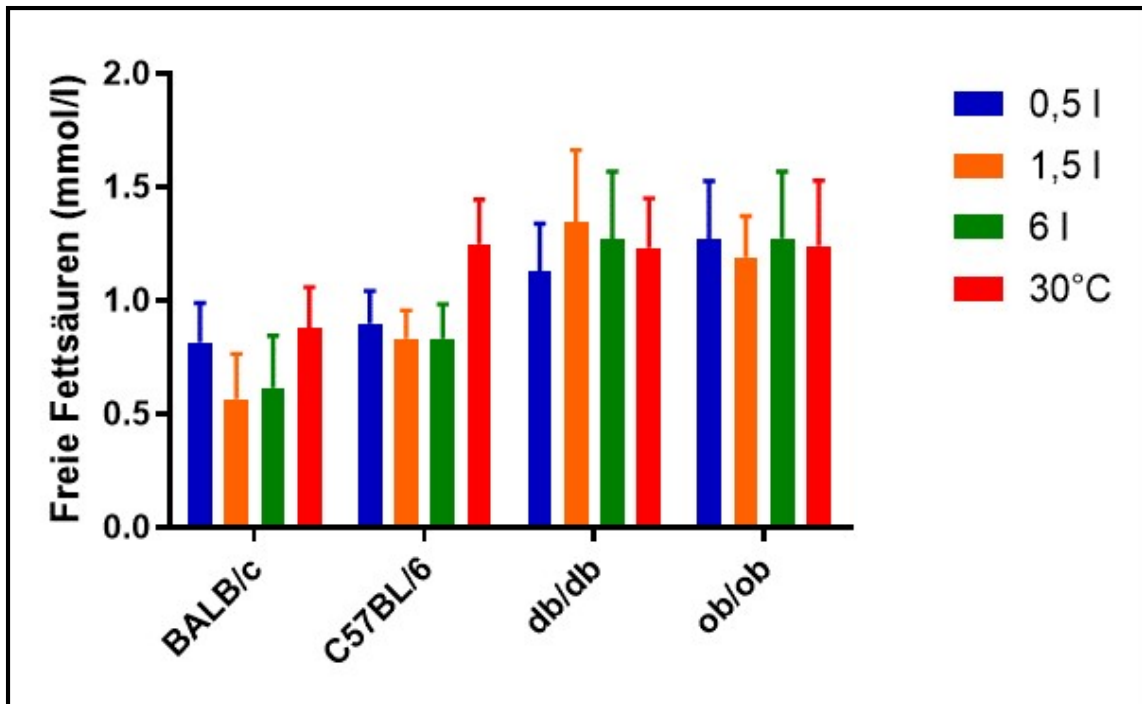
**Abbildung 9:** Die Gesamt-BAT-Masse ([g], Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.1.3 Freie Fettsäuren

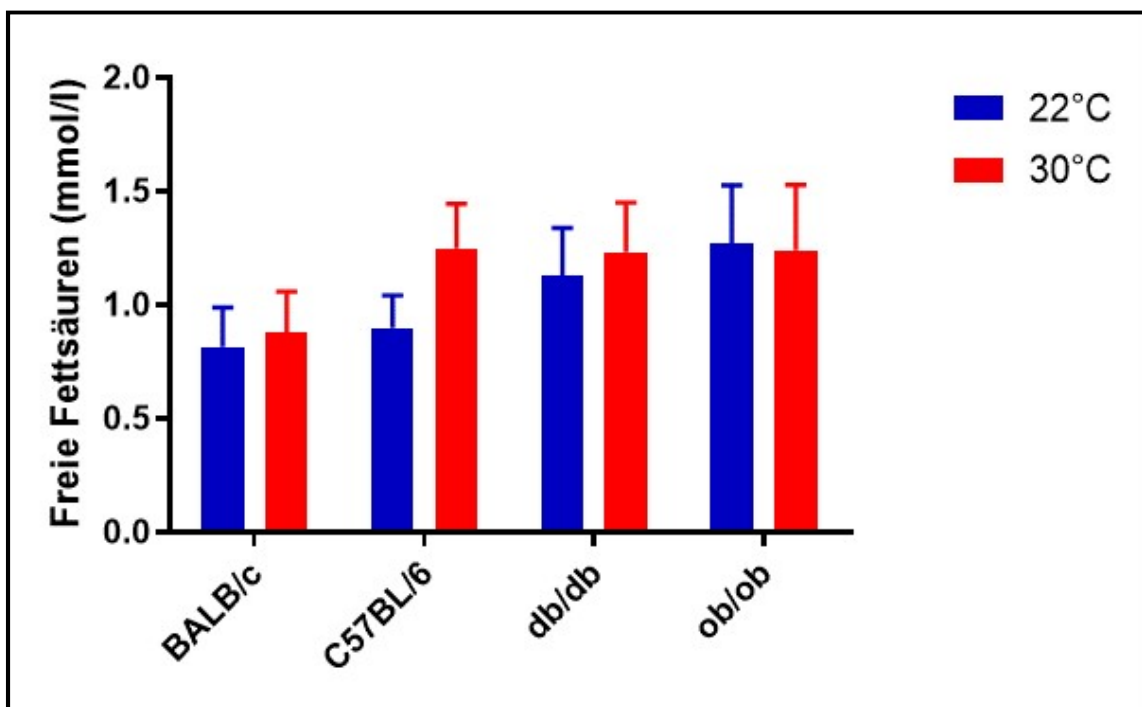
Die Konzentration der freien Fettsäuren wurden am Ende des Versuches aus dem Tötungsblut bestimmt. In Abbildung 10 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

Die C57BL/6-Mäuse nach Standarddiät-Fütterung zeigten signifikant erhöhte FFA-Werte bei 30°C-Haltung vs. 22°C- (ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Hier wurden keine signifikanten Unterschiede bei den anderen Stämmen beobachtet (siehe Abbildung 11).

Es zeigten sich bei den verschiedenen Haltungsbedingungen mehrere signifikante Stammunterschiede. Während BALB/c-Mäuse gegenüber db/db und ob/ob-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen signifikante Stammunterschiede zeigten, (BALB/c vs. ob/ob; Scheffe-Test: 0,5 l (22°C)+1,5 l+6 l:  $p < 0,0001$ ; 30°C:  $p = 0,0004$ ; BALB/c vs. db/db; 0,5 l (22°C):  $p = 0,006$ ; 1,5 l+6 l:  $p < 0,0001$ ; 30°C:  $p = 0,004$ ) zeigten C57BL/6-Mäuse keine signifikanten Unterschiede gegenüber db/db- und ob/ob-Mäusen bei 30°C-Haltung (C57BL/6 vs. ob/ob; Scheffe-Test: 0,5 l (22°C):  $p = 0,001$ ; 1,5+6 l:  $p = 0,003$ ; C57BL/6 vs. db/db; 1,5 l:  $p < 0,0001$ ; 6 l:  $p = 0,002$ ). Außerdem zeigten C57BL/6-Mäuse gegenüber BALB/c-Mäusen signifikant höhere Fettsäurewerte in der Haltung mit 1,5 l Einstreu bei 22°C (Scheffe-Test:  $p = 0,040$ ) und bei 30°C (Scheffe-Test:  $p = 0,003$ ).



**Abbildung 10:** Freie Fettsäuren im Endblut (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) von mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen

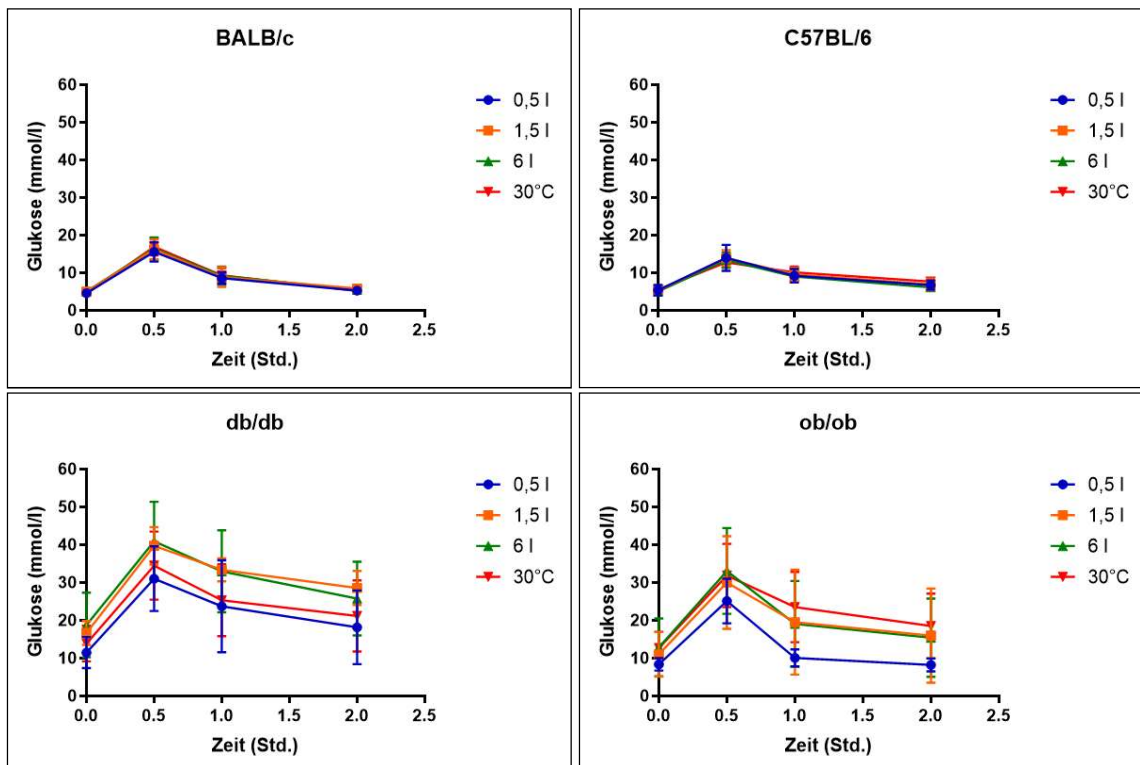


**Abbildung 11:** Freie Fettsäuren des Endbluts (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.1.4 Oraler Glukosetoleranztest

Mittels oraler Glukose-Toleranz-Tests wurde der Glukosemetabolismus aller Mäusestämme näher untersucht. Hierbei wurde vor der Glukoseapplikation den Mäusen 12-15 Stunden lang das Futter entzogen. Dann wurden 2 mg pro g Körpergewicht Glukoselösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ $\mu$ l oral appliziert. Anschließend erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 120 Minuten Blutentnahmen aus der Schwanzvene zur Bestimmung der Plasma-Glukosekonzentrationen.

Dreißig Minuten nach der Glukoseapplikation zeigten alle Stämme einen erhöhten Glukosespiegel. Die BALB/c-Mäuse wiesen zudem höhere Glukosewerte nach 30 Minuten auf, als C57/BL/6-Mäuse und ein signifikanter Unterschied wurde für 30°C-Haltungsbedingungen festgestellt (Scheffe-Test:  $p=0,022$ ). Die Blutglukosekonzentrationen waren im Verlauf des Tests bei BALB/c und C57BL/6 unter den Gruppen mit verschiedenen Einstreutiefen sehr ähnlich und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die db/db-Mäuse zeigten insgesamt höhere Blutglukosewerte als ob/ob-Mäusen. Beide diabetischen Mäusemodelle zeigten tendenziell geringerer Blutglukosespiegel in der Haltung 0,5 l Einstreu bei 22°C (Abbildung 12).



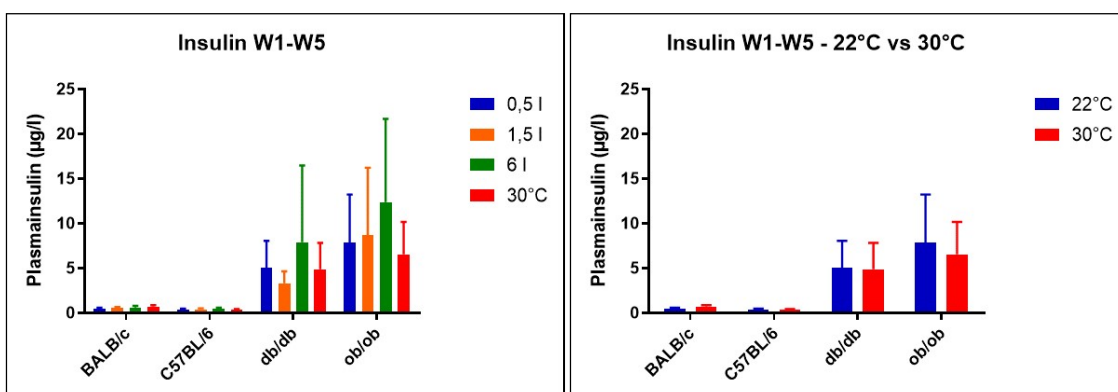
**Abbildung 12:** Orale Glukosetoleranz (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen

#### 4.1.5 Plasmainsulin

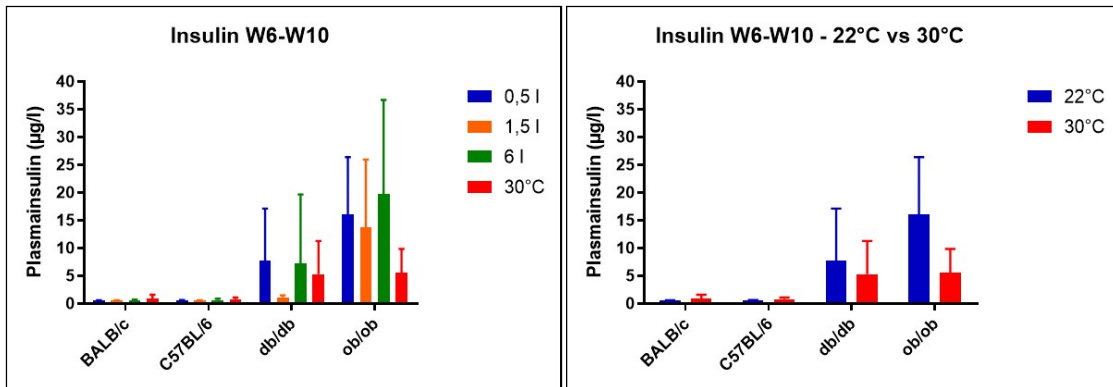
Für die Plasmainsulinspiegel-Bestimmung wurde wöchentlich von allen Tieren Blut entnommen und Plasma generiert. Die Insulinmessung wurde mittels ELISA durchgeführt. Die Ergebnisse in den ersten fünf Versuchswochen und in den letzten fünf Versuchswochen wurden separat bewertet und tabellarisch dargestellt, da die Werte in den zweiten fünf Wochen erhöht waren (siehe Abbildung 13 und 14).

Insgesamt waren die Werte des Plasmainsulins von db/db und ob/ob-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen im Vergleich zu allen anderen untersuchten Stämmen höher ( $p < 0,0001$ ). Die ob/ob-Mäuse zeigten nach Standarddiät-Fütterung in der letzten Versuchshälfte signifikant erhöhte Plasmainsulinwerte gegenüber den db/db-Mäusen unter allen Haltungsbedingungen bei 22°C (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,05$ ). Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen mit verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen, allerdings war eine Tendenz zu höheren Plasmainsulinwerten bei 22°C, in tiefer Einstreu gehaltenen BALB/c und C57BL/6, feststellbar.

Sowohl in den ersten fünf Wochen als auch in der zweiten Versuchshälfte zeigten die BALB/c-Mäuse signifikant erhöhte Plasmainsulinwerte bei 30°C-Haltung vs. 22°C- (ANOVA:  $p = 0,001$ ; Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,011$ ). In der zweiten Versuchshälfte zeigten die C57BL/6-Mäuse gleiche Ergebnisse (ANOVA:  $p = 0,006$ ), aber bei den ob/ob-Mäusen waren die Ergebnisse umgekehrt (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,003$ ).



**Abbildung 13:** Plasmainsulinspiegel in den ersten fünf Wochen ( $\mu\text{g/l}$ , Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)



**Abbildung 14:** Plasmainsulinspiegel in den letzten fünf Wochen ( $\mu\text{g/l}$ , Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

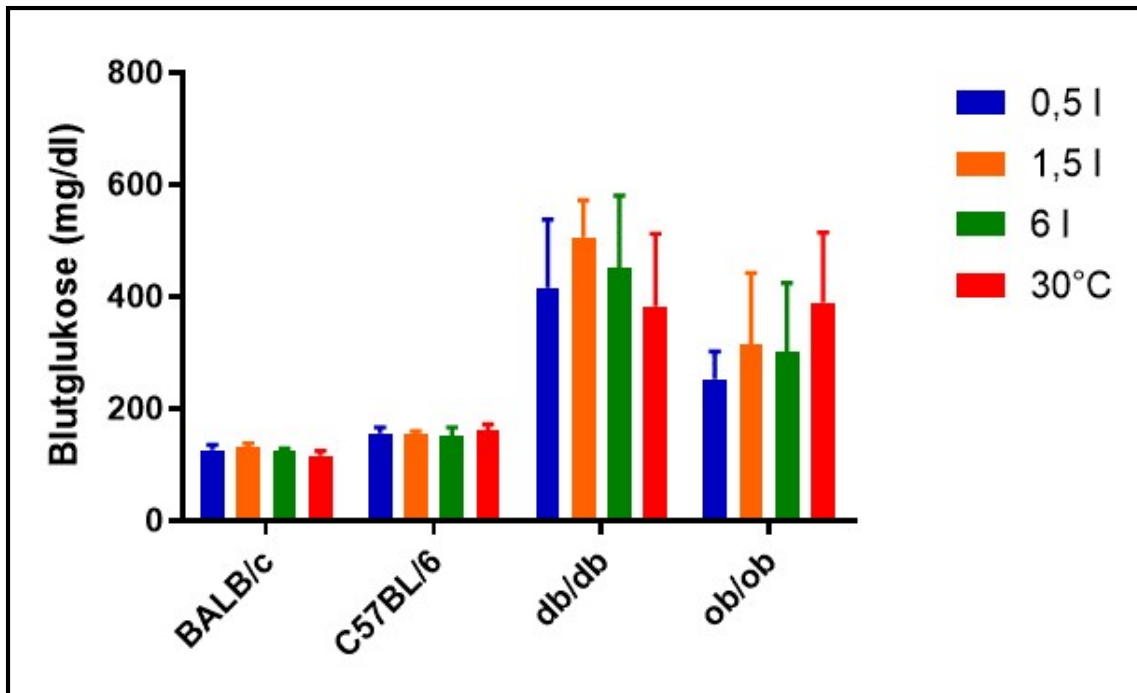
#### 4.1.6 Blutglukose

Die Blutglukose wurde wöchentlich bei allen Tieren gemessen. In Abbildung 15 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

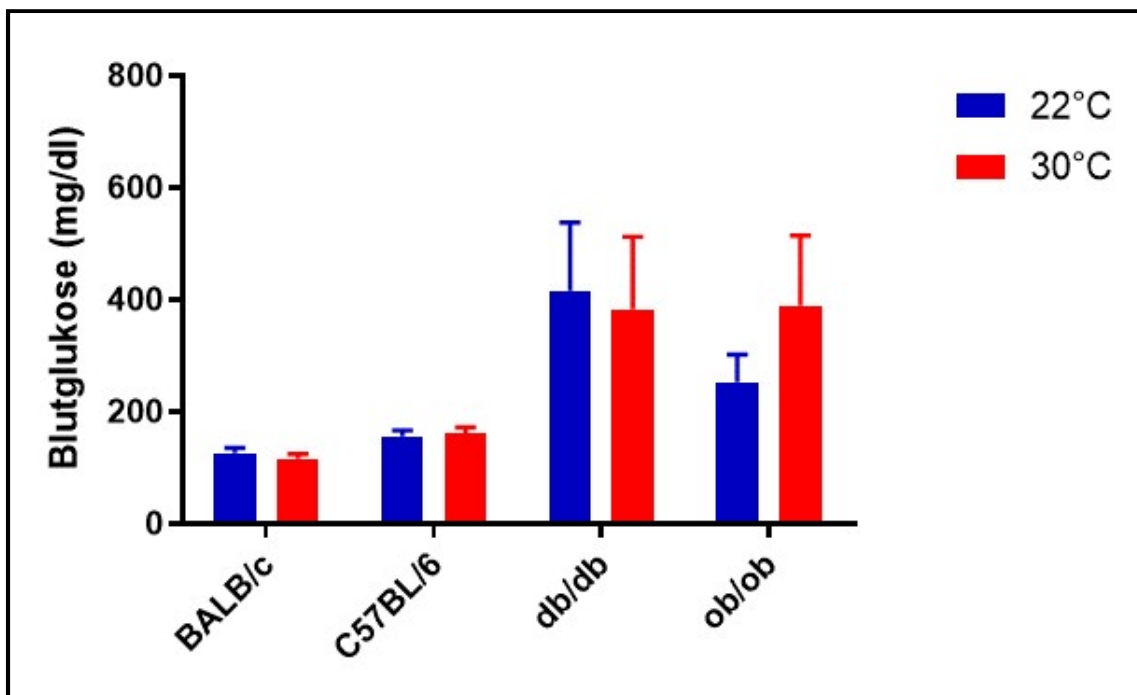
Insgesamt waren die Ergebnisse der Blutglukose bei den diabetischen Mäusemodellen (db/db und ob/ob) signifikant höher als bei den Kontrollgruppen (BALB/c und C57BL/6) unter allen Haltungsbedingungen (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,001$ ). Außerdem zeigten die db/db-Mäuse gegenüber den ob/ob-Mäusen signifikant höhere Ergebnisse bei 22°C-Haltung (Mann-Whitney U-test: 0,5 l:  $p = 0,002$ ; 1,5 l:  $p = 0,001$ ; 6 l:  $p = 0,033$ )

Die BALB/c-Mäuse nach Standarddiät-Fütterung zeigten signifikant geringere Blutglukosewerte bei 30°C-Haltung vs. 22°C- (ANOVA:  $p = 0,010$ ). Die Werte waren bei ob/ob-Mäusen umgekehrt. Sie zeigten signifikant höhere Blutglukosewerte bei 30°C- vs. 22°C-Haltung (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,021$ ) (Siehe Abbildung 16)

Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen bei verschiedenen Einstreutiefen und 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikante Unterschiede nachweisen, außer bei den BALB/c-Mäusen (Scheffe-Test: 1,5 l vs. 6 l:  $p = 0,027$ ).



**Abbildung 15:** Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen in allen Haltungsbedingungen



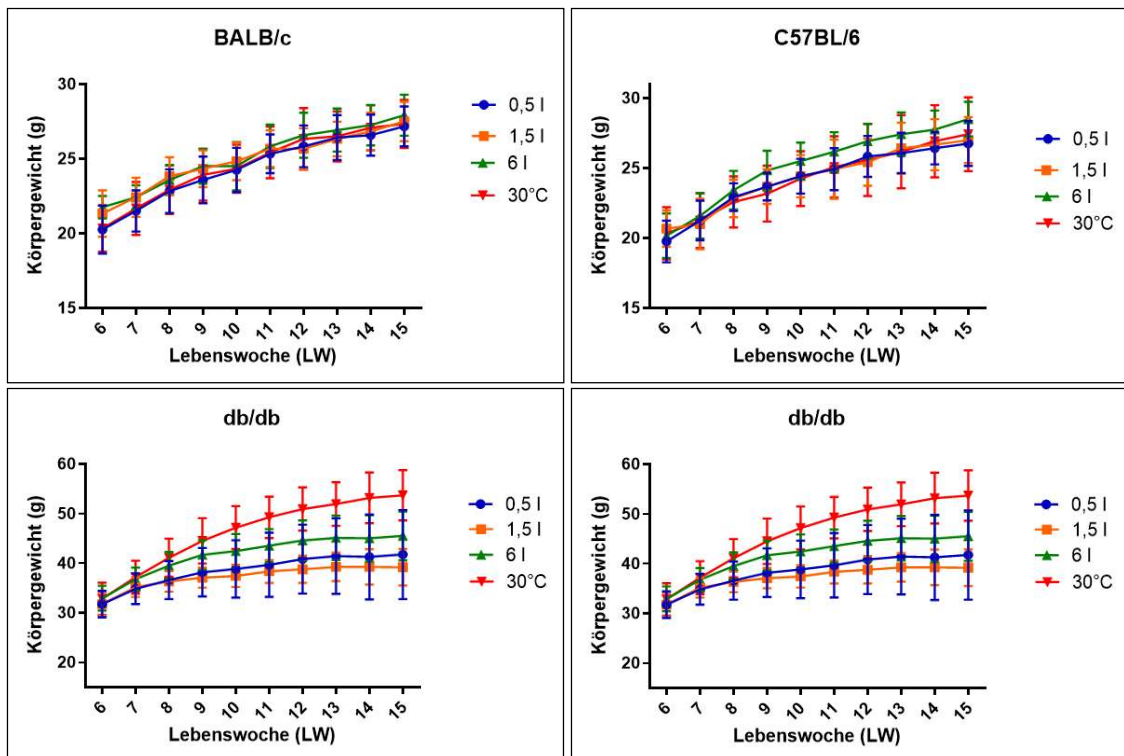
**Abbildung 16:** Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C- Haltung (0,5 l)

#### 4.1.7 Gewichtsentwicklung

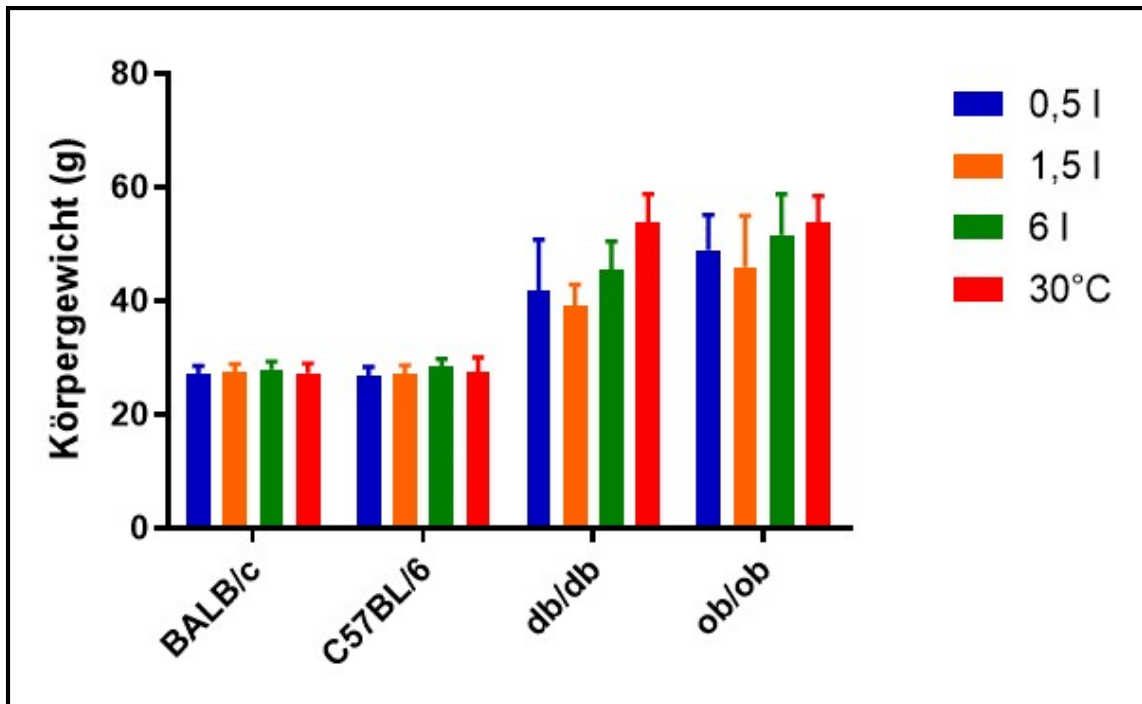
Zur Analyse der Gewichtszunahme wurden die Mäuse einmal wöchentlich gewogen. Die Gewichtsentwicklung von allen Mäusestämmen wurde zusammenfassend dargestellt (siehe Abbildung 17).

Die db/db-Mäuse nach Standarddiät zeigten signifikant höhere Körpergewichte bei 30°C- vs. 22°C- Haltung (gesamte Körpergewichtszunahme Kruskal-Wallis H-Test: db/db:  $p=0,002$  u. Gain%; ANOVA:  $p=0,001$ ) (siehe Abbildung 17 und 19).

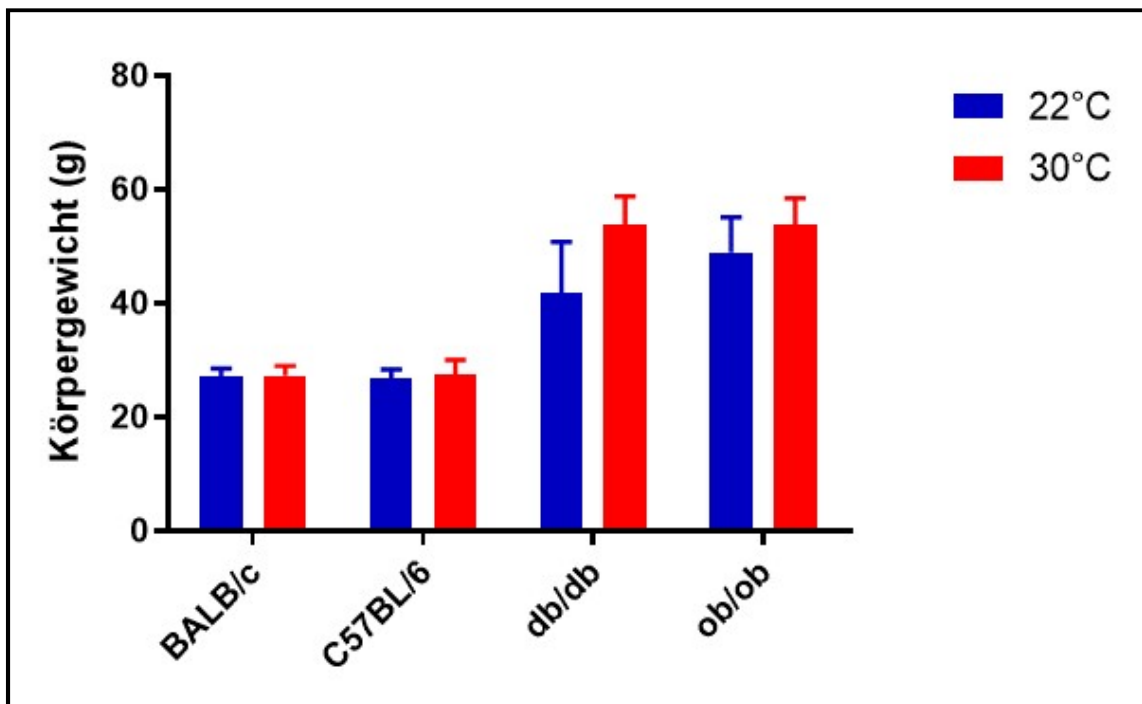
Bei der Untersuchung des Körpergewichts von C57BL/6-Mäusen in verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C zeigten sich signifikant höhere Werte in 6 l Einstreutiefe. (gesamte Körpergewichtszunahme; Scheffe-Test: 0,5 l vs. 6 l:  $p=0,045$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,002$ ; Gain%; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,034$ ) (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 17:** Gewichtsentwicklungen von Woche 1 bis Woche 10 (g, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 18:** Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 19:** Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

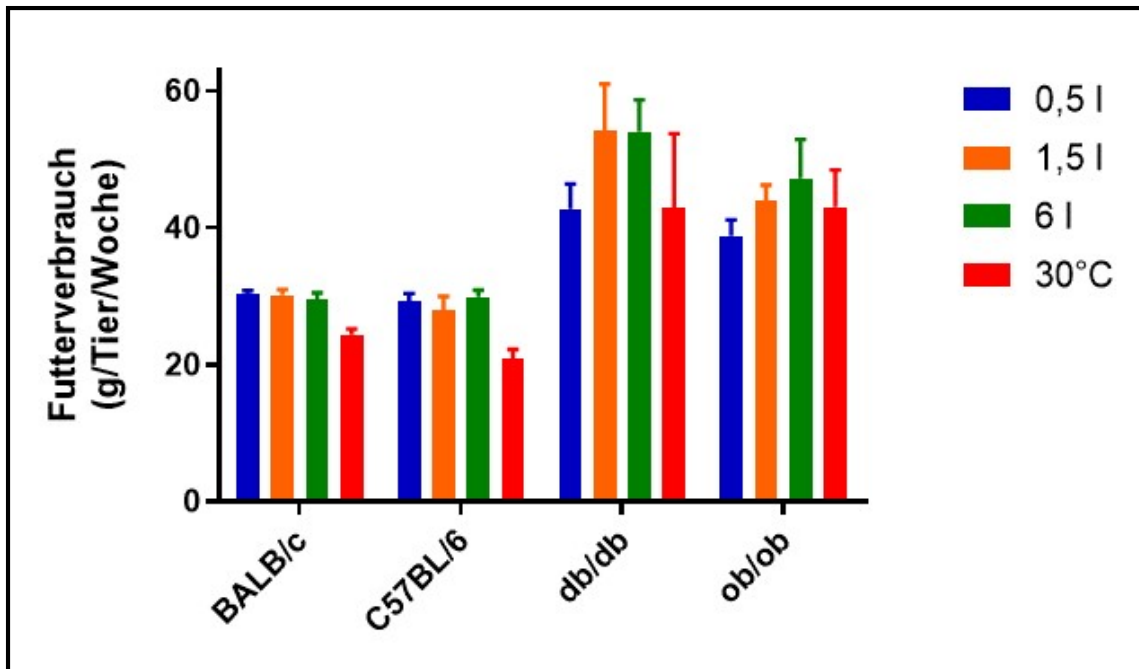
### 4.1.8 Futter- und Wasserverbrauch

Zur Analyse der Futter- und Wasseraufnahme wurden das Futter und das Wasser einmal wöchentlich gewogen. Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt (siehe Abbildungen 20 und 22).

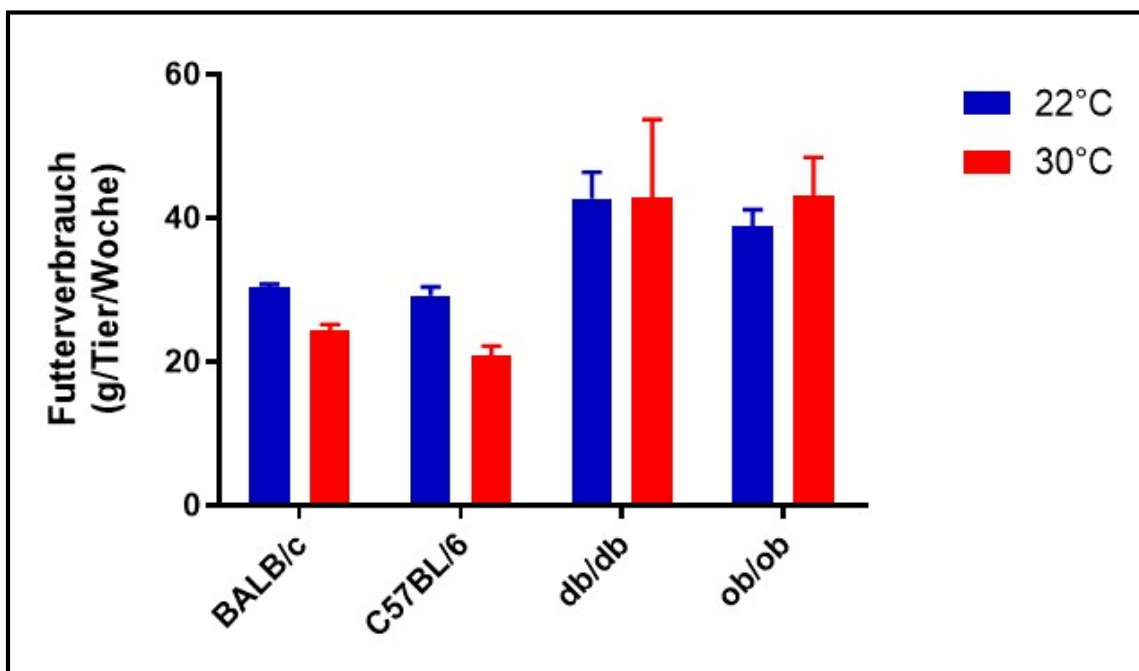
Die BALB/c- und C57BL/6-Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Futterverbrauch bei 30°C- vs. 22°C-Haltung (ANOVA:  $p=0,001$ ) (siehe Abbildung 21). Das war beim Wasserverbrauch nicht zu sehen (siehe Abbildung 22). Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen in verschiedenen Einstreutiefern bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikante Unterschiede hinsichtlich des Futter- und Wasserverbrauchs nachweisen.

Insgesamt nahmen die diabetischen Mäusemodelle (db/db und ob/ob) signifikant mehr Futter auf als die Kontrollgruppen (BALB/c und C57BL/6), ein signifikanter Stammunterschied wurde bei allen Haltungsbedingungen erkannt (ANOVA:  $p<0001$ ). Dieser Unterschied zwischen Kontrollgruppen und db/db war höher (Scheffe-Test: 0,5 l (22°C):  $p=0,001$ ; 1,5 l+6 l:  $p<0,0001$ ; 30°C:  $p<0,05$ ), als zwischen Kontrollgruppen und ob/ob (BALB/c vs. ob/ob:  $p<0,05$ ; bei allen Haltungsbedingungen und C57BL/6 vs. ob/ob:  $p<0,01$ ; bei allen Haltungsbedingungen mit 22°C).

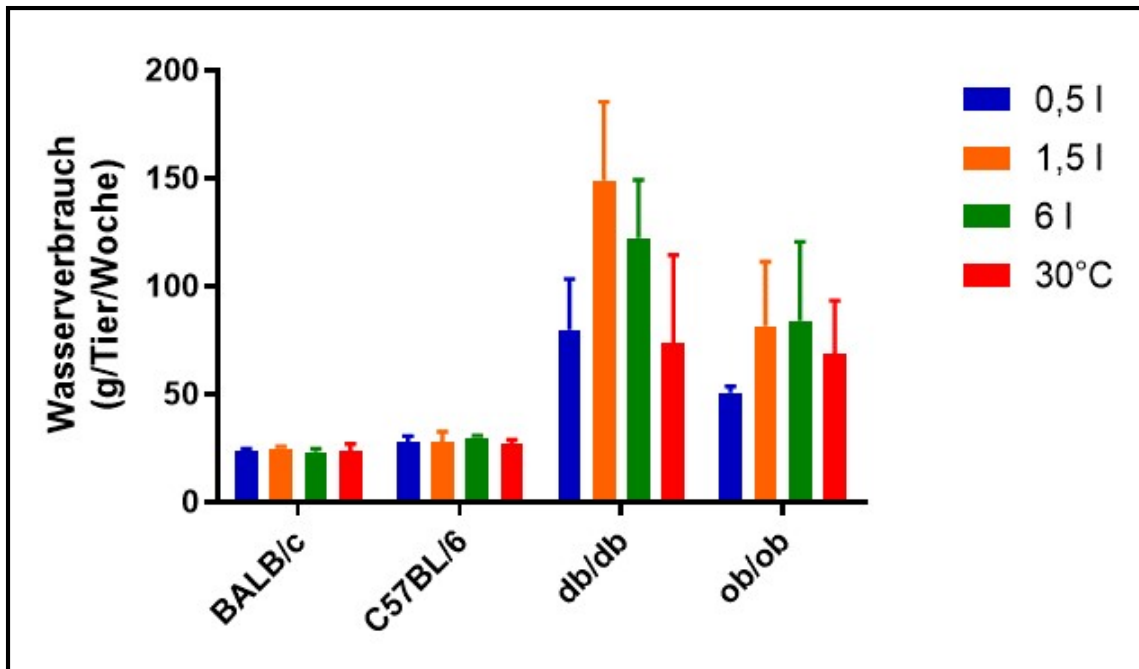
Vergleichbar zu dem Futterverbrauch zeigten die diabetischen Mäusemodelle eine höhere Wasseraufnahme, ein signifikanter Stammunterschied wurde bei 22°C-Haltungstemperatur festgestellt. Dieser Unterschied fiel bei db/db deutlicher als bei ob/ob aus (Scheffe-Test: 0,5 l (22°C): db/db vs. C57BL/6:  $p=0,005$ ; db/db vs. BALB/c:  $p=0,003$ ; 1,5 l: db/db vs. C57BL/6: db/db vs. BALB/c:  $p=0,002$ ; db/db vs. ob/ob:  $p=0,050$ ; Mann-Whitney U-test: 6 l: C57BL/6 vs. BALB/c, C57BL/6 vs. db/db, C57BL/6 vs. ob/ob, BALB/c vs. db/db, BALB/c vs. ob/ob:  $p=0,050$ ).



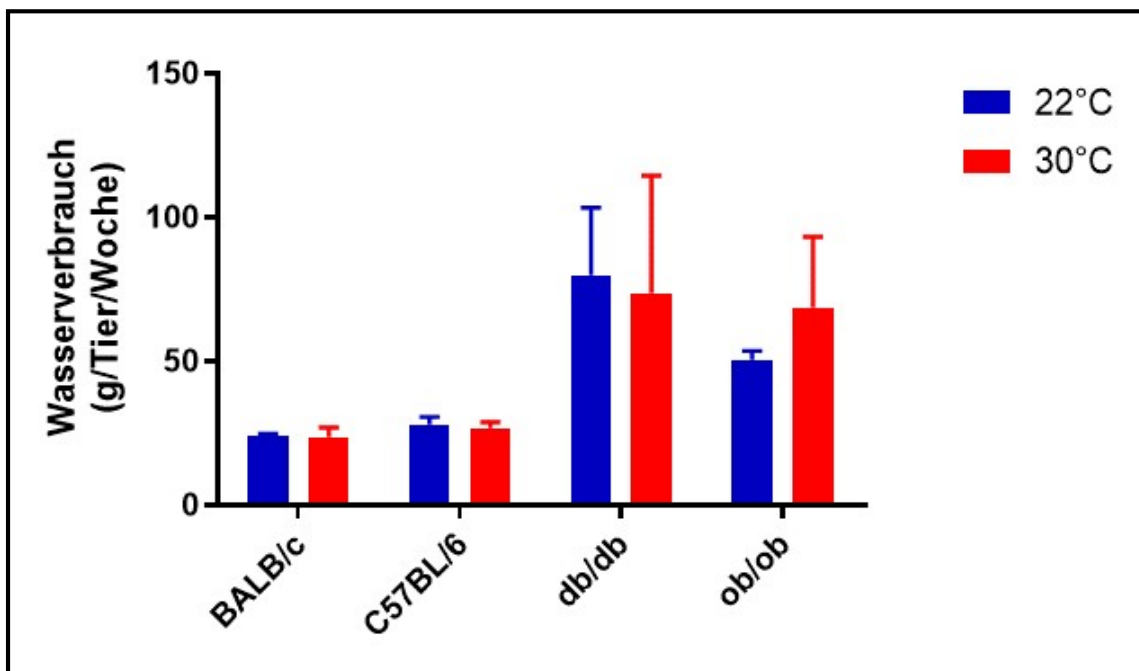
**Abbildung 20:** Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusemodellen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 21:** Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)



**Abbildung 22:** Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 23:** Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

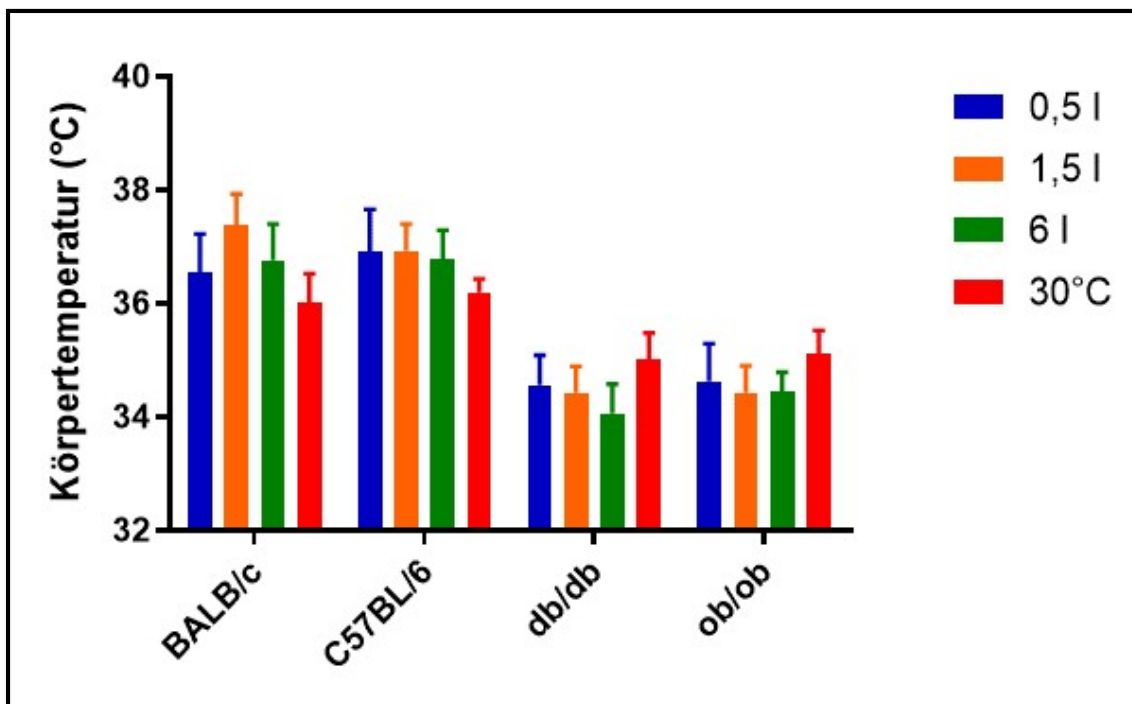
#### 4.1.9 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde über einen subkutan implantierten Transponder wöchentlich ermittelt. In Abbildung 24 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

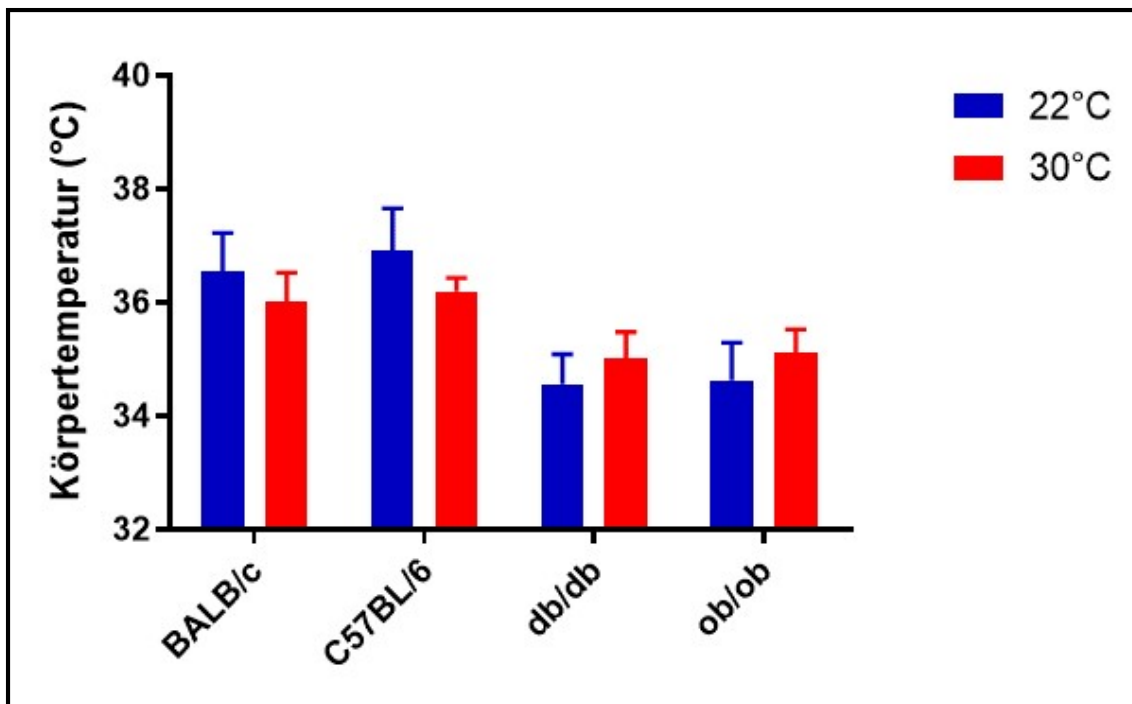
Die BALB/c- und C57BL/6-Mäuse zeigten nach Standarddiät-Fütterung eine signifikant niedrigere Körpertemperatur bei 30°C- als bei 22°C-Haltung. Die db/db- und ob/ob-Mäuse zeigten im Gegensatz zu BALB/c- und C57BL/6-Mäuse höhere Körpertemperaturen bei 30°C (ANOVA: BALB/c:  $p=0,042$ ; Kruskal-Wallis H-Test: C57BL/6:  $p=0,002$ ; db/db:  $p=0,056$ ; ob/ob:  $p=0,043$ ) (siehe Abbildung 25).

Insgesamt waren die Ergebnisse der Körpertemperatur bei den Kontrollgruppen (BALB/c und C57BL/6) signifikant höher als bei den diabetischen Mäusemodellen (db/db und ob/ob) unter allen Haltungsbedingungen (Mann-Whitney U-test oder Scheffe-Test:  $p<0,001$ ).

Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen mit verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.



**Abbildung 24:** Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 25:** Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.1.10 Ammoniak

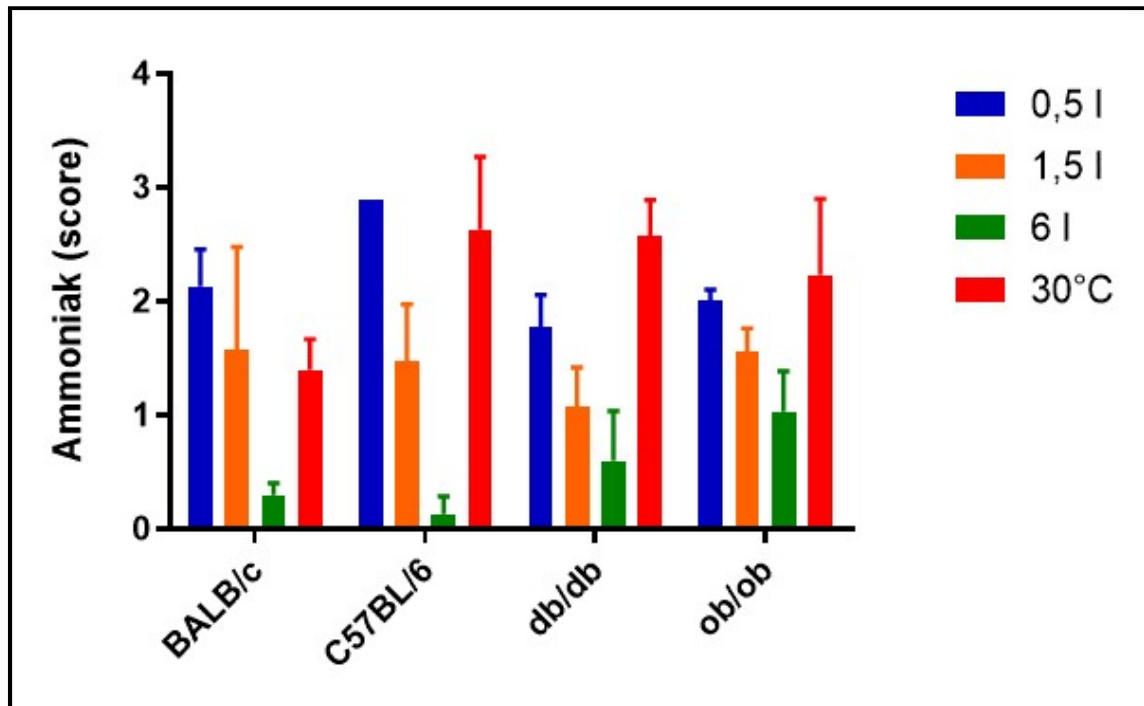
Die Ammoniakkonzentrationen der Käfige wurden wöchentlich bestimmt und von 0 bis 3 skaliert (siehe Tabelle 2). In Abbildung 26 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

Die Haltungsgruppe mit 6 l Einstreutiefe zeigte bei allen Mäusestämmen die signifikant geringste Ammoniakkonzentration (ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Je mehr Einstreu vorhanden war, desto geringer waren die Werte. Zwischen 0,5 l (22°C) und 6 l wurden bei allen Mäusestämmen signifikante Unterschiede erkannt (BALB/c: Scheffe-Test:  $p = 0,020$ ; C57BL/6: Scheffe-Test:  $p < 0,0001$ ; db/db: Mann-Whitney U-test:  $p = 0,046$ ; ob/ob; Scheffe-Test:  $p = 0,014$ ). Unterschiede zwischen 1,5 l und 6 l wurden bei C57BL/6 (Scheffe-Test:  $p = 0,005$ ) und db/db (Mann-Whitney U-Test:  $p = 0,046$ ) nachgewiesen. Aber nur C57BL/6-Mäuse zeigten einen statistischen Unterschied zwischen 1,5 l (22°C) und 6 l ( $p = 0,005$ )

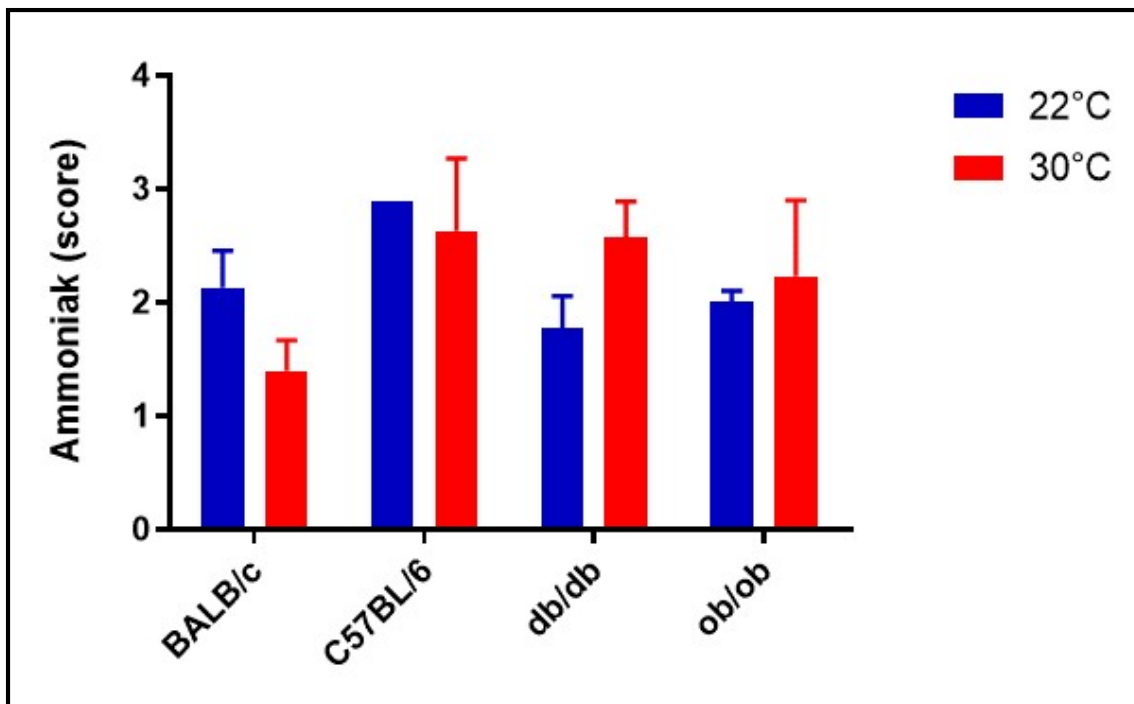
Die BALB/c-Mäuse zeigten nach Standarddiät-Fütterung signifikant erhöhte Ammoniak-Werte bei 22°C-, im Vergleich zur 30°C-Haltung (ANOVA:  $p = 0,038$ ). Im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen zeigten die db/db-Mäuse signifikant erhöhte Ammoniak-Werte bei

30°C- vs. 22°C-Haltung (ANOVA:  $p=0,046$ ) (siehe Abbildung 27).

Den einzigen signifikanten Stammunterschied zeigten die BALB/c-Mäuse gegenüber den C57BL/6-Mäusen bei der Haltung mit 0,5 l Einstreu bei 22°C (ANOVA:  $p=0,014$ ).



**Abbildung 26:** Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



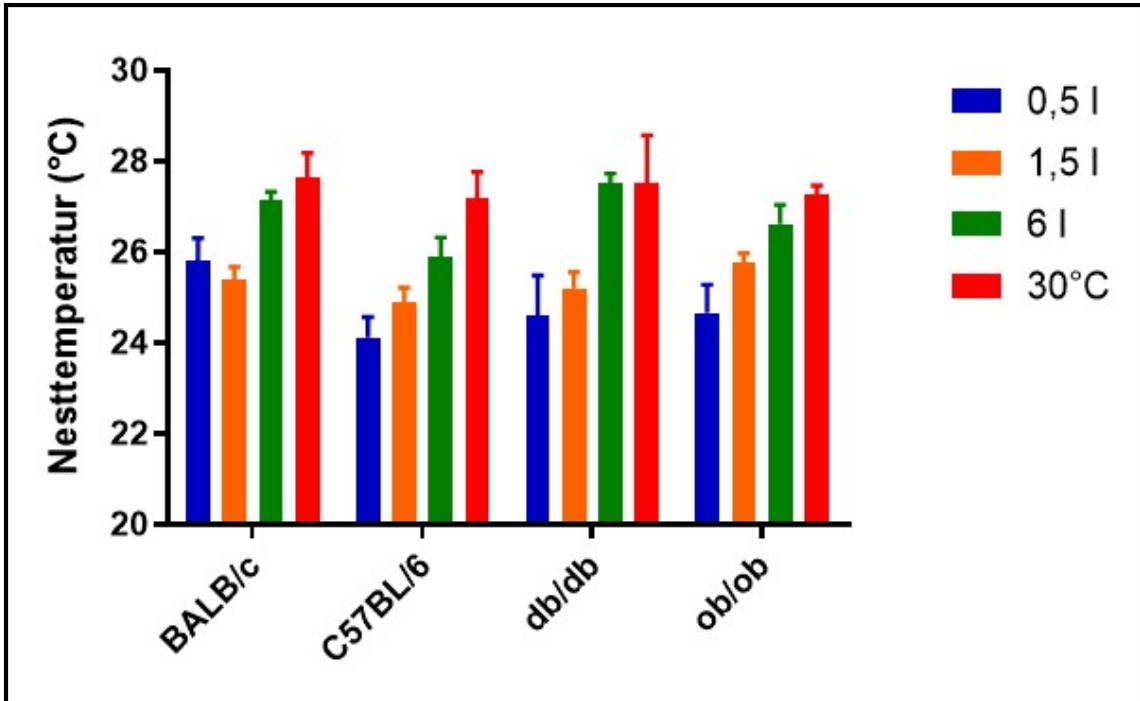
**Abbildung 27:** Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.1.11 Nesttemperatur

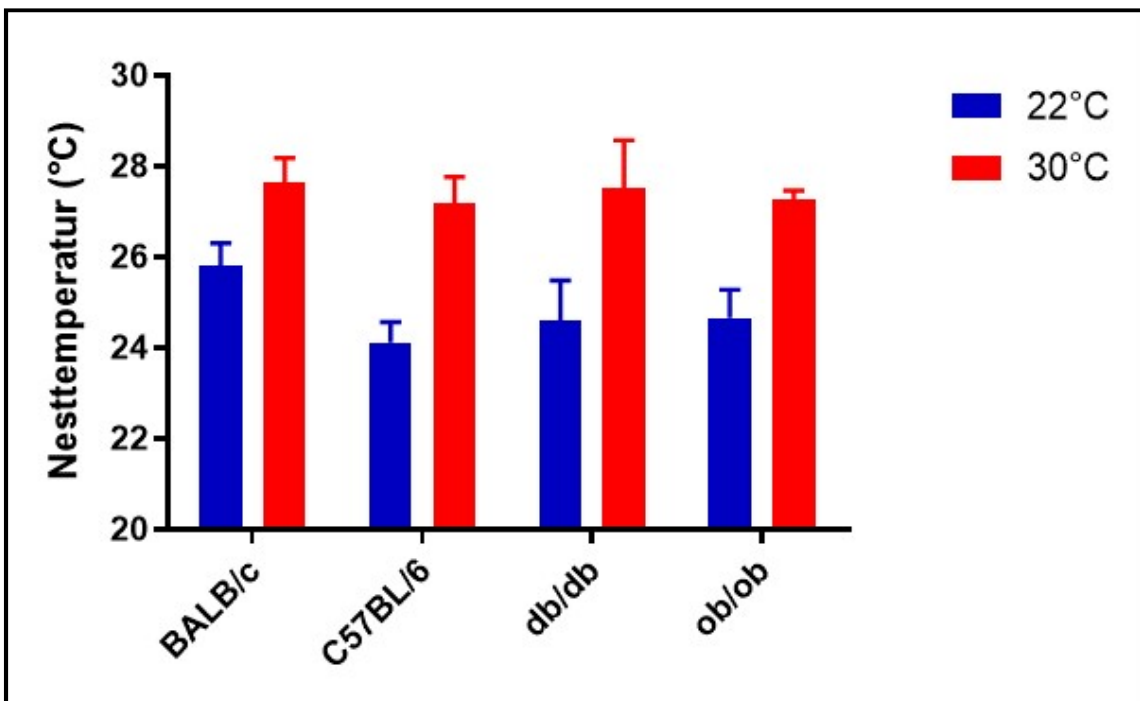
Die Nesttemperatur wurde wöchentlich bestimmt. In Abbildung 28 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

Alle Mäusestämme zeigten nach Standarddiät-Fütterung signifikant höhere Nesttemperaturen bei 30°C-, als bei 22°C- Haltung (ANOVA: BALB/c:  $p=0,013$ ; C57BL/6:  $p=0,002$ ; db/db:  $p=0,021$ ; ob/ob:  $p=0,002$ ) (siehe Abbildung 29).

Die Nesttemperatur der Haltungsgruppe mit 6 l Einstreutiefe bei 22°C war bei allen Mäusestämmen deutlich höher als bei Haltungsgruppen mit 0,5 l und 1,5 l Einstreutiefe (Scheffe-Test: BALB/c: 0,5 l vs. 6 l:  $p=0,010$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,003$ ; C57BL/6: 0,5 l vs. 6 l:  $p=0,006$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,066$ ; db/db: 0,5 l vs. 6 l:  $p=0,002$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,007$ ; ob/ob: 0,5 l vs. 6 l:  $p=0,005$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,061$ ).



**Abbildung 28:** Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 29:** Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

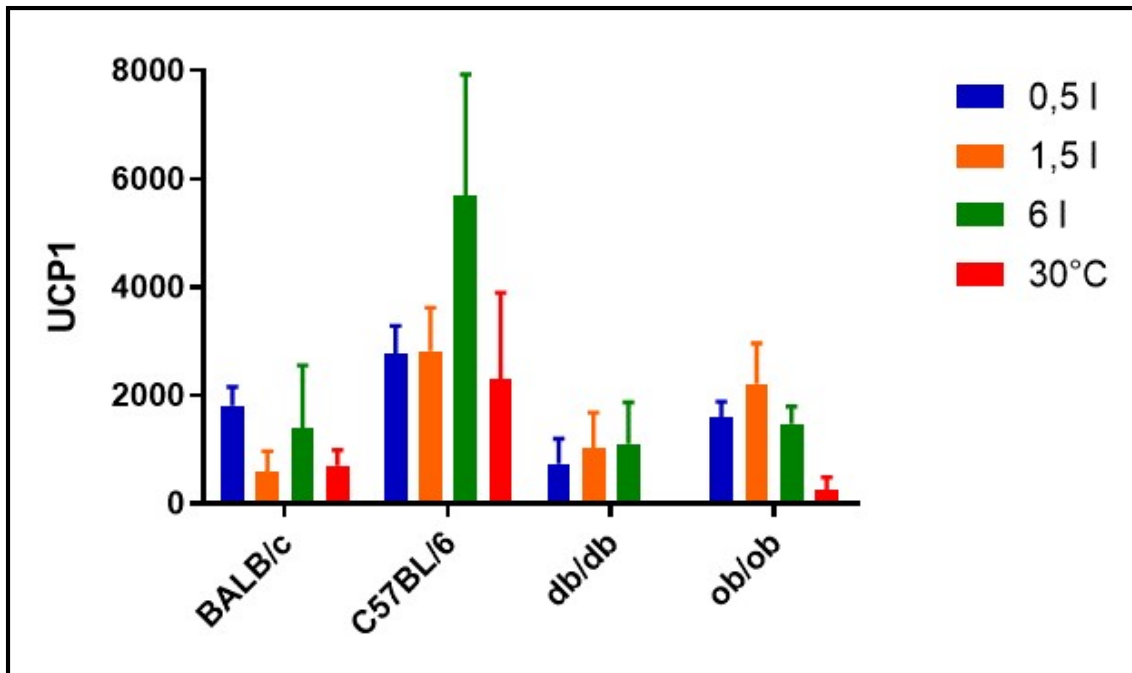
### 4.2 Ergebnisse bei Fütterung mit Fettdiät

#### 4.2.1 UCP1

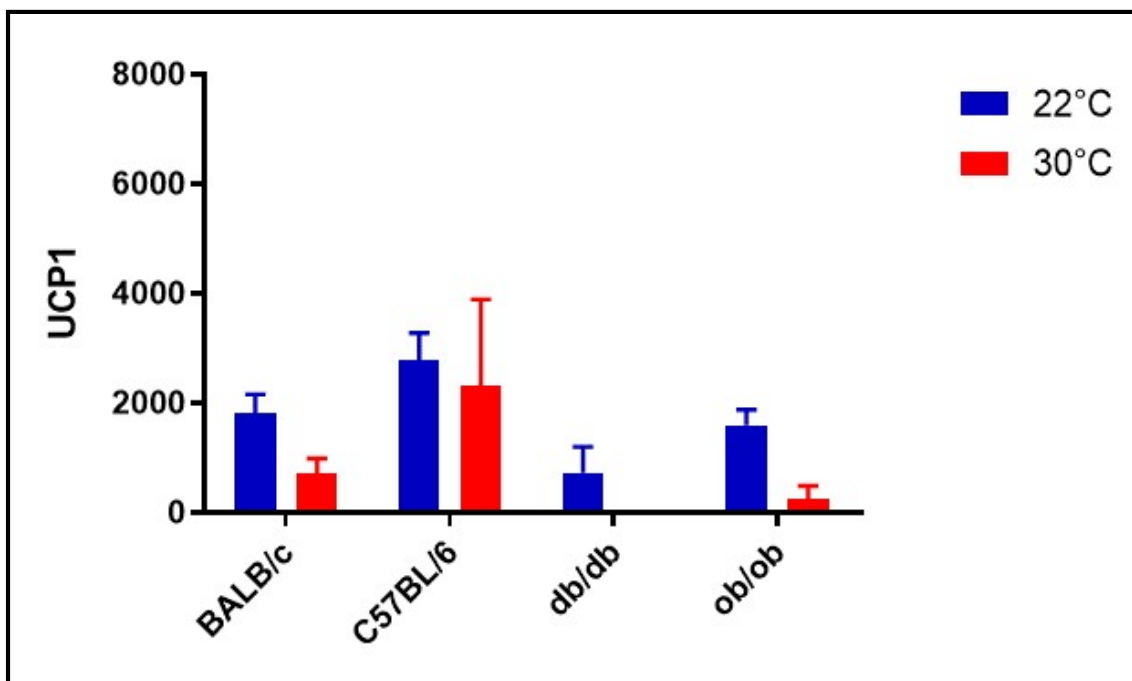
Auch nach Fettdiät-Fütterung zeigte die Untersuchung der UCP1-Expression in iBAT bei 30°C- und 22°C-Haltungstemperatur eine Abnahme der Expression bei der höheren Temperatur. Diese Ergebnisse waren bei BALB/c- und ob/ob-Mäusen höchst signifikant. Bei db/db-Mäusen waren die Ergebnisse wegen fehlenden iBAT (kein erkennbares braunes Fettgewebe) nicht zu vergleichen (siehe Abbildung 31; BALB/c: Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,001$ ; ob/ob: Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,010$ ).

In Abbildung 30 sind alle Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt. Die UCP1-Expression im iBAT der C57BL/6-Mäuse war auch nach Fettdiät-Fütterung signifikant höher als im iBAT der anderen Mäusen. Die Stammunterschiede waren zwischen C57BL/6 und Krankheitsmodellen (db/db und ob/ob) bei den Haltungsbedingungen mit 0,5 l (bei 22°C) und 6 l Einstreu deutlicher (Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C):  $p=0,001$ ; 6 l:  $p<0,001$ ). Darüber hinaus war ein signifikanter Unterschied zwischen den UCP1 der C57BL/6- und BALB/c-Mäusen zu erkennen (Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C):  $p=0,001$ ; 6 l:  $p<0,001$ ). Es ließen sich auch statistisch signifikante Unterschiede zwischen db/db und ob/ob-Mäuse in der Haltung auf 0,5 l (22°C) und 1,5 l Einstreu feststellen (Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C):  $p=0,010$ ; Scheffe-Test: 1,5 l:  $p=0,012$ ).

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der C57BL/6 und ob/ob-Mäuse deutliche, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur (Scheffe-Test: C57BL/6: 0,5 l vs. 6 l, 1,5 l vs. 6 l:  $p<0,0001$ ; ob/ob: 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,044$ )



**Abbildung 30:** UCP1-Expression in iBAT (Mittelwert  $\pm$  SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



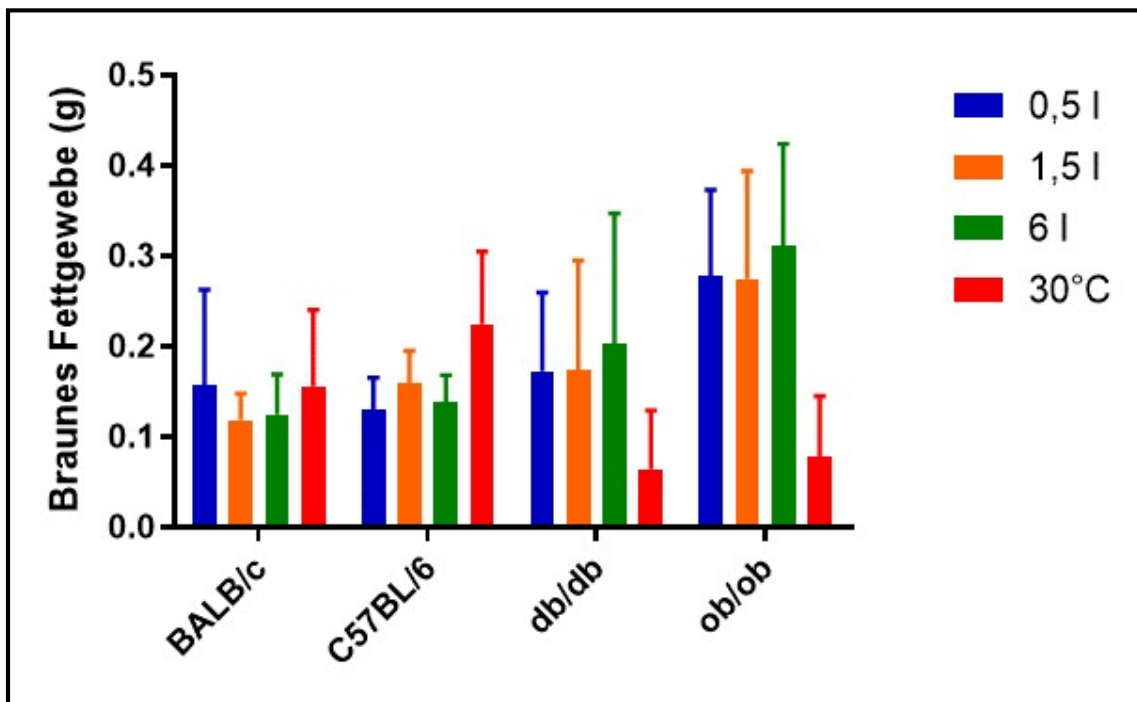
**Abbildung 31:** UCP1 Expression in iBAT (Mittelwert  $\pm$  SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

### 4.2.2 Braunes Fettgewebe

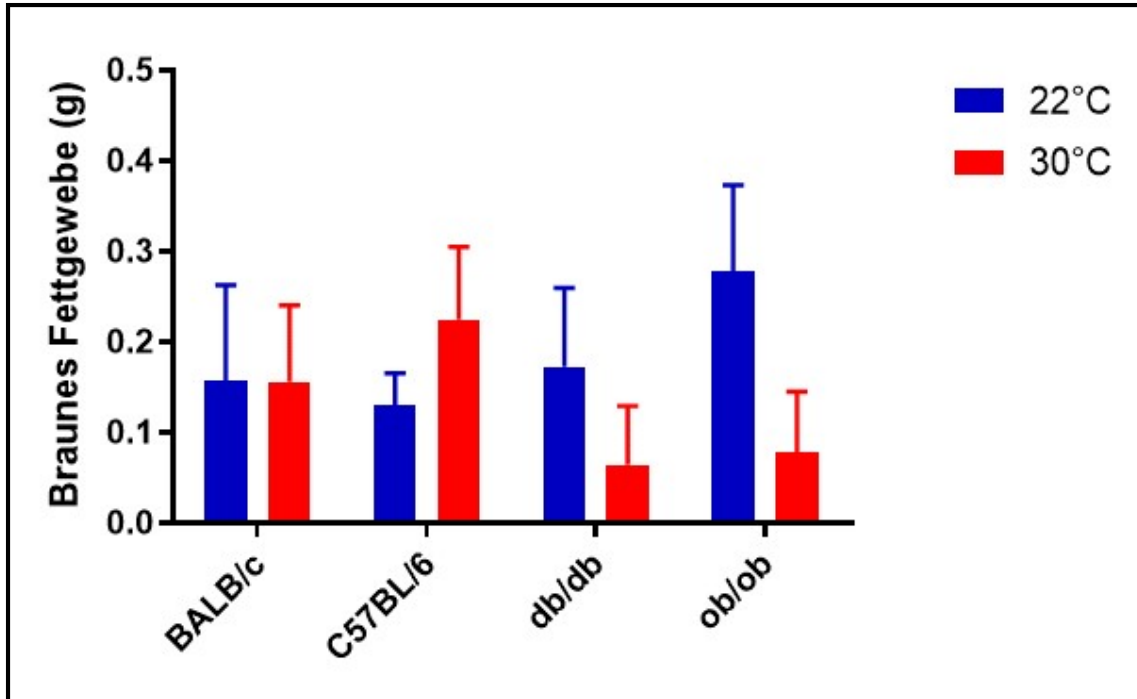
Der Gesamt-BAT war bei Fettdiät-Fütterung gegenüber der Standarddiät-Fütterung (Abbildung 8) in den db/db- und ob/ob-Mäusen deutlich geringer (db/db: 22°C (0,5 l+ 1,5 l+6 l):  $p=0,002$ ; 30°C:  $p=0,001$ ; ob/ob: 22°C (1,5 l u. 6 l):  $p=0,002$  u.  $p=0,028$ ; 30°C:  $p<0,0001$ ). Im Gegensatz zu den db/db- und ob/ob-Mäusen zeigten die C57BL/6-Mäuse bei Fettdiät-Fütterung signifikant höhere Ergebnisse bei der Haltung auf 1,5 l und 6 l Einstreu (1,5 l: ANOVA:  $p=0,002$ ; 6 l: Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,017$ ).

Mit allen Haltungsgruppen bei 22°C verglichen entwickelten die ob/ob-Mäuse bei dieser Temperatur signifikant höhere Fettmassen (Abbildung 32) im Vergleich zu den BALB/c- und C57BL/6-Mäusen. (ob/ob vs. BALB/c: Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+6 l:  $p\leq 0,0001$ ; Scheffe-Test: 1,5 l:  $p=0,002$ ; ob/ob vs. C57BL/6: Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+6 l,  $p\leq 0,0001$ ; Scheffe-Test: 1,5 l:  $p=0,024$ ).

Zwischen den einzelnen Haltungsgruppen bei verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (siehe Abbildung 32), während statistische Unterschiede zwischen den Gruppen 0,5 l (22°C) und 30°C bei C57BL/6-, db/db- und ob/ob-Mäusen festgestellt wurden (ANOVA:  $p=0,001$ ;  $p=0,013$ ;  $p<0,001$ ).



**Abbildung 32:** Die Gesamt-BAT-Masse (g, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 33:** Die Gesamt-BAT-Masse ([g], Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.2.3 Freie Fettsäuren

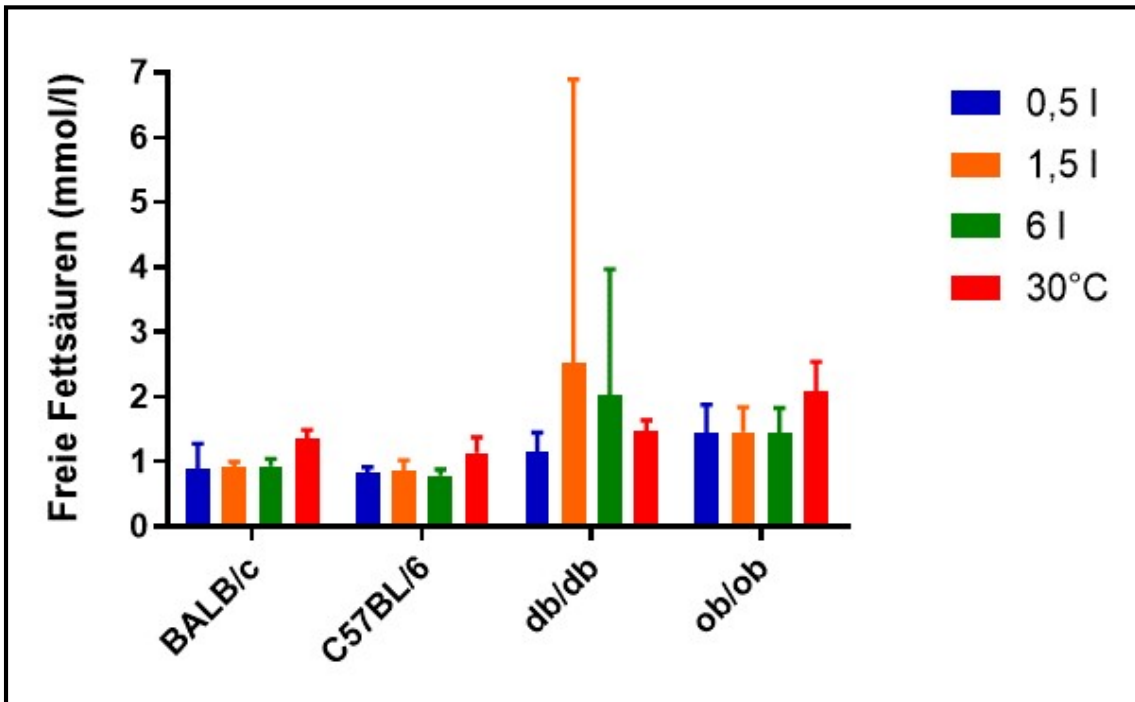
In Abbildung 34 sind die Mittelwerte der Ergebnisse der freien Fettsäuren in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

Nach Fettdiät-Fütterung zeigten die BALB/c-, db/db- und ob/ob-Mäuse gegenüber Standarddiät-Fütterung (Abbildung 10) signifikant erhöhte Werte von freien Fettsäuren bei 30°C-Haltung. (ANOVA: BALB/c u. ob/ob:  $p < 0,0001$ ; db/db:  $p = 0,011$ ). Darüber hinaus waren die Ergebnisse bei den BALB/c-Mäusen in 1,5 und 6 l Einstreu signifikant erhöht (ANOVA: 1,5 l:  $p < 0,0001$ ; 6 l:  $p = 0,001$ ), sowie bei db/db in 1,5 l Einstreu (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,027$ ).

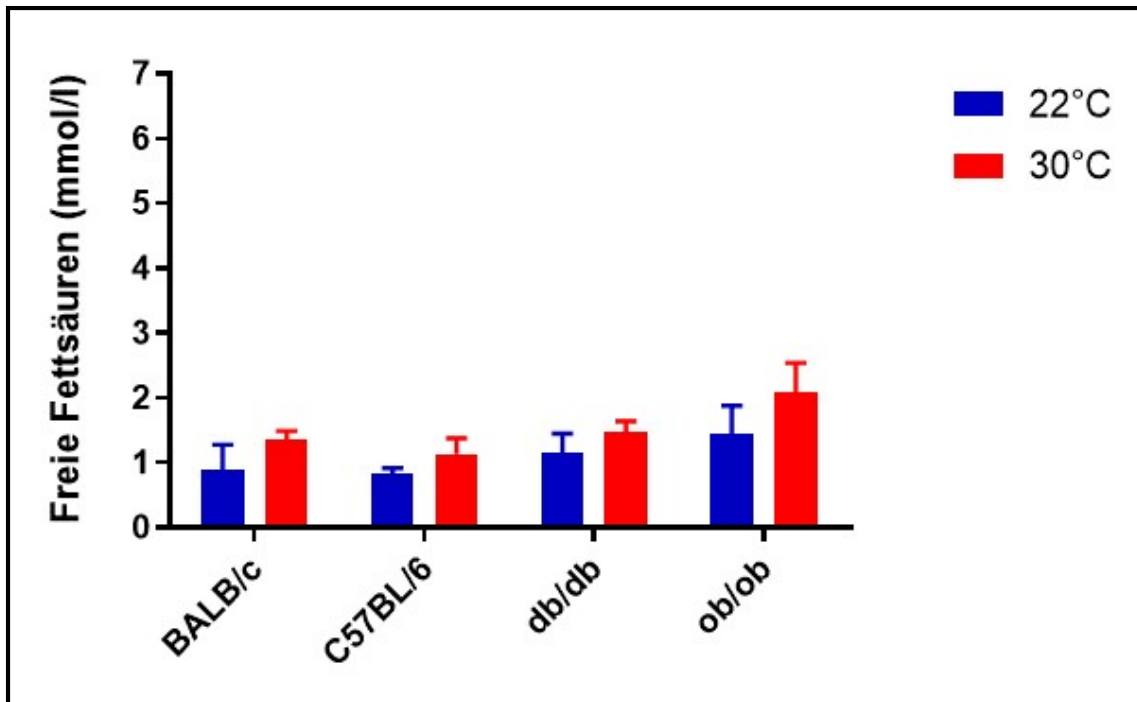
Nach Fettdiät-Fütterung zeigten alle Mäusestämme signifikant erhöhte FFA-Werte bei 30°C- vs. 22°C- Haltung (ANOVA:  $p < 0,01$ ) (siehe Abbildung 35).

Es zeigten sich unter den verschiedenen Haltungsbedingungen mehrere signifikante Stammunterschiede. Während ob/ob-Mäuse gegenüber BALB/c- und C57BL/6-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen signifikante höhere FFA-Werte zeigten, (ob/ob vs. BALB/c; Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+1,5 l+6 l:  $p < 0,01$ ; Scheffe-Test: 30°C:  $p < 0,0001$ ; ob/ob vs. C57BL/6: Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+1,5 l+6 l:  $p < 0,0001$ ;

Scheffe-Test: 30°C:  $p < 0,0001$ ) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen db/db- und BALB/c-Mäusen oder zwischen db/db- und C57BL/6-Mäusen bei der 30°C-Haltung gefunden (db/db vs. BALB/c: Mann-Whitney U-test:  $0,5 \text{ l } (22^\circ\text{C}) + 1,5$ :  $p < 0,01$ ; db/db vs. C57BL/6:  $0,5 \text{ l } (22^\circ\text{C}) + 1,5 + 6 \text{ l}$ :  $p < 0,01$ ). Außerdem zeigten BALB/c-Mäuse gegenüber C57BL/6-Mäusen signifikant höhere Werte bei 22°C-Haltung (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 34:** Freie Fettsäuren gemessen im Tötungsblut (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



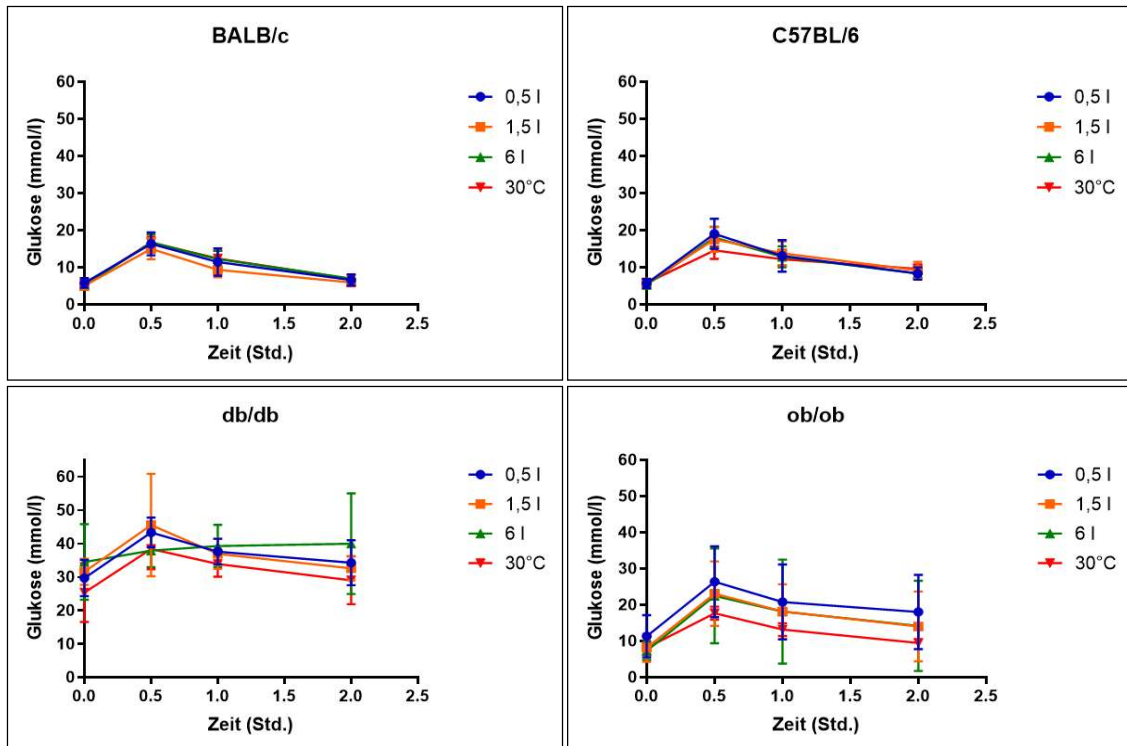
**Abbildung 35:** Freie Fettsäuren gemessen im Tötungsblut (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

#### 4.2.4 Oraler Glukosetoleranztest

Nach Fettdiät-Fütterung zeigten die BALB/C-, C57BL/6- und db/db-Mäuse bei allen Haltungsbedingungen gegenüber Standarddiät-Fütterung erhöhte Nüchtern-Glukosewerte. Sogar die ob/ob-Mäuse wiesen höhere Blutglukosespiegel bei der Haltung auf 0,5 l Einstreu bei 22°C nach Fettdiätfütterung auf, aber sie zeigten in anderen Haltungsgruppen geringere Blutglukosewerte im Gegensatz zur Standarddiätfütterung. Ansonsten zeigten die C57BL/6-Mäuse mit Fettdiätfütterung eine beeinträchtigte Glukosetoleranz. Die db/db-Mäuse zeigten weiterhin pathologisch erhöhte Nüchtern-Glukosewerte, allerdings sind die Werte deutlich höher nach Fettdiätfütterung.

Die diabetischen Mäusestämme wiesen tendenziell niedrigere Blutglukosewerte bei 30°C-Haltungstemperatur nach Fettdiätfütterung auf. Tendenziell gleiche Ergebnisse zeigten auch die C57BL/6-Mäuse bei dem 0,5-Stunden-Wert (siehe Abbildung 36).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass orale Glukosetoleranz bei den Mäusen unter Standarddiätfütterung (Abbildung 12) besser war als unter Fettdiätfütterung. Im Vergleich zu den anderen Versuchsstämmen zeigten db/db-Mäuse tendenziell die schlechteste Glukosetoleranz.



**Abbildung 36:** Orale Glukosetoleranz (mmol/l, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen

#### 4.2.5 Plasmainsulin

Auch bei Fettdiät-Fütterung wurden die Ergebnisse in den ersten fünf Versuchswochen und in den letzten fünf Versuchswochen separat bewertet und tabellarisch dargestellt, da die Werte in den zweiten fünf Wochen erhöht waren (siehe Abbildung 37 und 38).

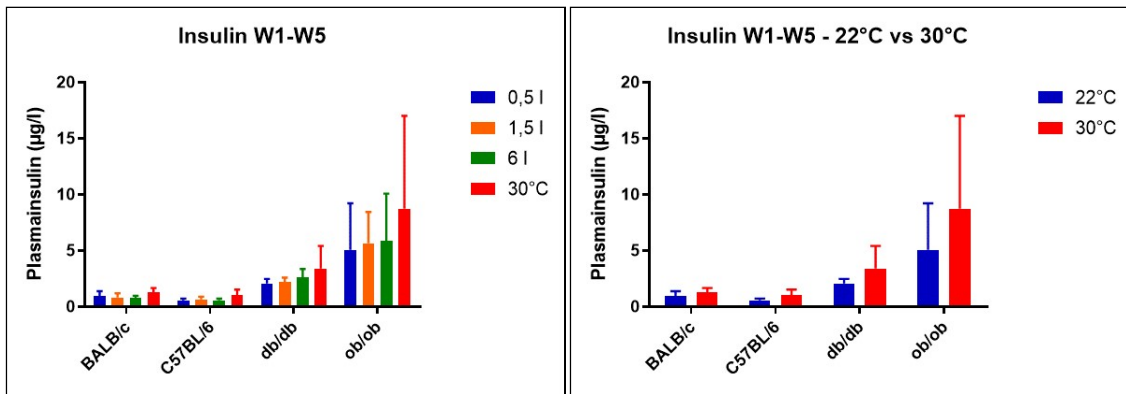
Nach Fettdiät-Fütterung zeigten die BALB/c-, C57BL/6- und db/db-Mäuse gegenüber Standarddiät-Fütterung (Abbildung 13 u. 14) deutlich erhöhte Plasmainsulinwerte bei allen Haltungsbedingungen, ein signifikanter Unterschied wurde bei allen Gruppen, außer ob/ob und db/db bei 30°C, erkannt (BALB/c:  $p < 0,0001$ , C57BL/6:  $p \leq 0,001$ ; db/db: 22°C:  $p < 0,05$ ).

Insgesamt waren die Ergebnisse des Plasmainsulins nach Fettdiät-Fütterung bei ob/ob-Mäusen höher als bei allen anderen Mäusestämmen ( $p < 0,0001$ ). Darüber hinaus waren die Ergebnisse von db/db-Mäusen unter 22°C-Haltungsbedingungen in den ersten fünf Wochen deutlich höher als bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen (Mann-Whitney U-test: db/db vs. BALB/c: 1,5 l+30°C:  $p < 0,0001$ ; db/db vs. C57BL/6: 0,5 l (22°C)+1,5 l:  $p < 0,0001$ ; ob/ob vs. BALB/c und C57BL/6:  $p < 0,0001$  für 0,5 l (22°C)+1,5 l+6 l). Im Gegensatz dazu sind die Plasmainsulinwerte der beiden diabetischen Mäusestämmen bei

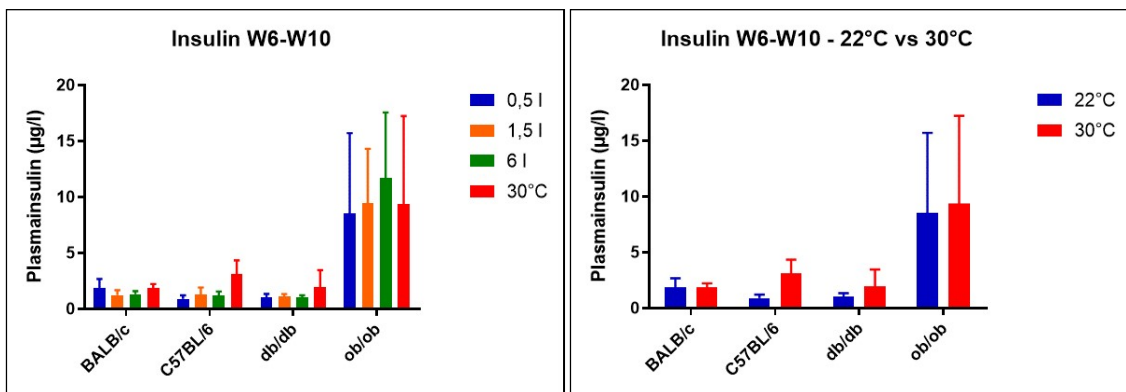
30°C in den ersten fünf Wochen signifikant niedriger als die der beiden Kontrollgruppen (Mann-Whitney U-test:  $p \leq 0,001$ ).

Die Plasmainsulinwerte von db/db-Mäusen nahmen in der letzten Versuchshälfte stark ab, während die Werte der anderen Stämmen weiter erhöht sind. Zwischen den Haltungsgruppen bei verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Im Vergleich zu 0,5 l (22°C) sind die Werte von 30°C bei C57BL/6 und db/db-Mäusen in der gesamten Studie merklich höher. Signifikant erhöhte Plasmainsulinwerte zeigen sich bei 30°C-Haltung (ANOVA: C57BL/6:  $p < 0,0001$ ; db/db:  $p = 0,041$ ).



**Abbildung 37:** Plasma Insulinspiegel in der ersten 5 Wochen ( $\mu\text{g/l}$ , Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)



**Abbildung 38:** Plasma Insulinspiegel in der letzten 5 Wochen ( $\mu\text{g/l}$ , Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

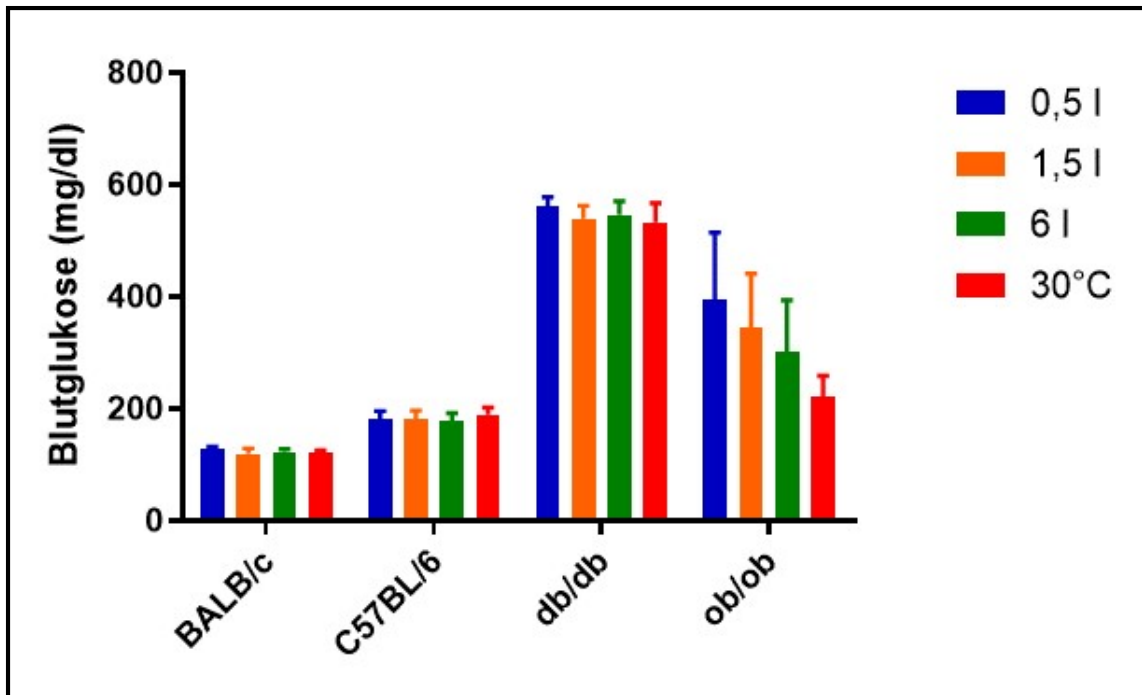
### 4.2.6 Blutglukose

Es gibt eine Tendenz, dass die Fettdiät-Fütterung die Glukosewerte von C57BL/6-, db/db- und ob/ob-Mäusen erhöhte. Ein statistisch erhöhter Blutglukosewert wurde bei C57BL/6-Mäusen unter allen Haltungsbedingungen (ANOVA:  $p < 0,0001$ ) und bei in 6 l Einstreu gehalten db/db-Mäusen (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,002$ ) gefunden. Weiterhin zeigten die db/db- und ob/ob-Mäuse, die mit Fettdiät gefüttert und in 0,5 l Einstreu gehalten wurden, signifikant höhere Blutglukosewerte, im Vergleich zur denen, die mit Standarddiät gefüttert wurden. (db/db: ANOVA: 22°C:  $p < 0,0001$ ; 30°C:  $p = 0,001$ ; ob/ob: ANOVA: 22°C:  $p = 0,009$ ; Kruskal-Wallis H-Test: 30°C:  $p = 0,006$ ).

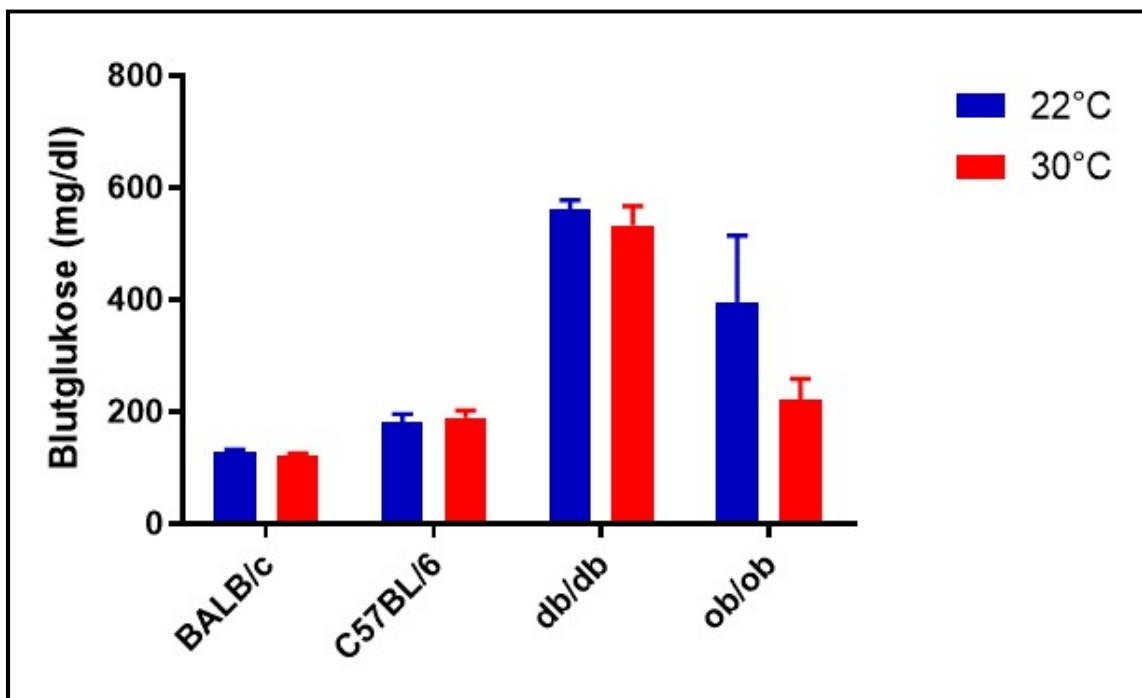
Insgesamt waren die Ergebnisse der Blutglukose bei den db/db- und ob/ob-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen signifikant höher als bei den BALB/c- und C57BL/6-Mäusen (Mann-Whitney U-test:  $p \leq 0,001$ ). Außerdem zeigten die db/db-Mäuse bei allen Haltungsbedingungen signifikant höhere Werte im Vergleich zu den ob/ob-Mäusen (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,0001$ ). Die C57BL/6-Mäuse haben bei allen Haltungsbedingungen höhere Glukosewerte als BALB/c-Mäusen und die Werte von C57BL/6-Mäusen waren gegenüber BALB/c-Mäusen signifikant höher bei der 30°C-Haltung (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,0001$ ) und auch in 1,5 l Einstreu (Scheffe-Test:  $p = 0,045$ ) (siehe Abbildung 39).

Die BALB/c-, db/db- und ob/ob-Mäuse unter Fettdiät-Fütterung zeigten signifikant höhere Blutglukosewerte bei 22°C- als bei 30°C-Haltung (ANOVA: BALB/c:  $p < 0,0001$ ; db/db:  $p = 0,045$ ; ob/ob: Kruskal-Wallis H-Test:  $p < 0,0001$ ). Die Werte waren bei C57BL/6-Mäusen umgekehrt, aber nicht signifikant (siehe Abbildung 40).

Obwohl alle in 0,5 l Einstreu und bei 22°C gehaltenen Stämme höhere Blutglukosewerte aufweisen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur nachweisen, außer bei BALB/c (ANOVA:  $p = 0,007$ ).



**Abbildung 39:** Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 40:** Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

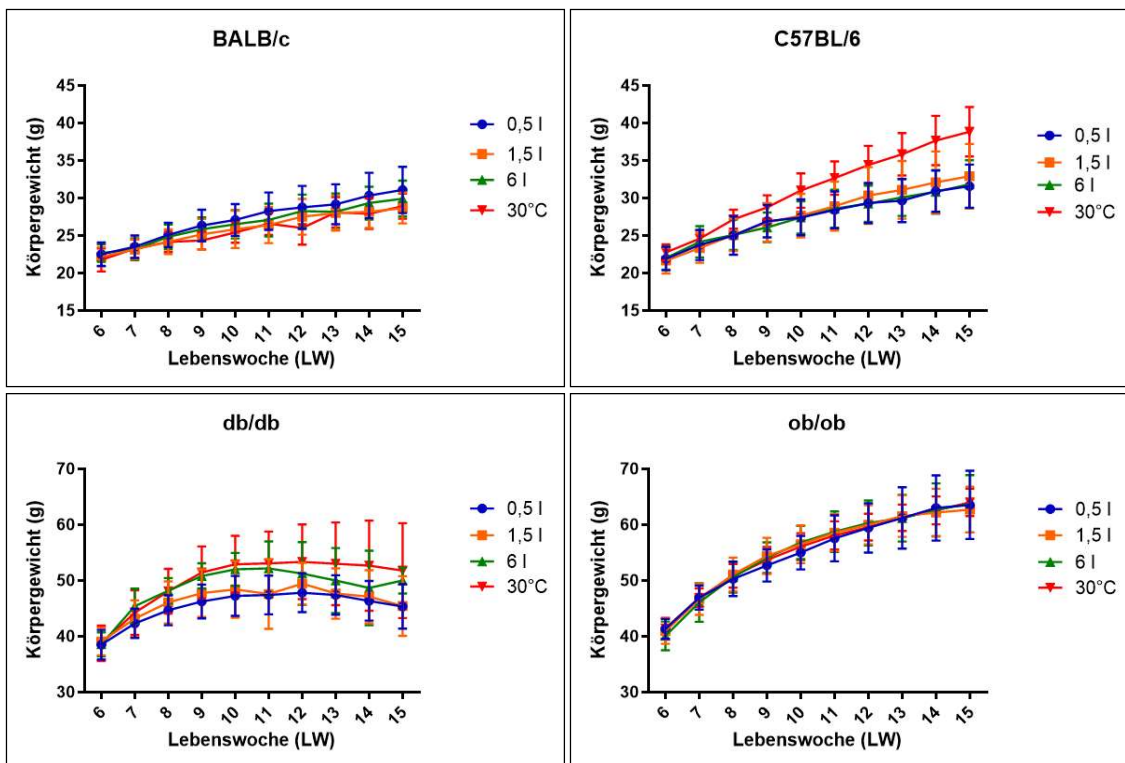
### 4.2.7 Gewichtsentwicklung

Zur Analyse der Gewichtszunahme wurden die Mäuse einmal wöchentlich gewogen. Die Gewichtsentwicklung von allen Mäusestämmen wurde zusammenfassend dargestellt (siehe Abbildung 41).

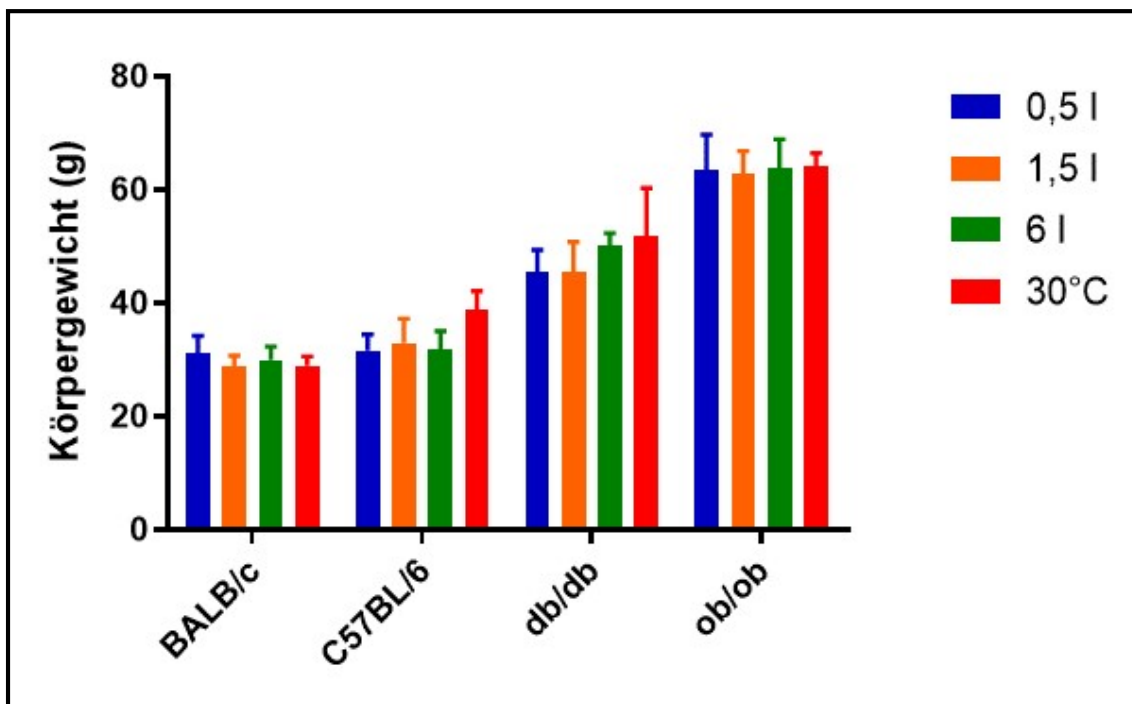
Nach Fettdiät-Fütterung zeigten die meisten Versuchsgruppen gegenüber Standarddiät-Fütterung ein signifikant erhöhtes finales Körpergewicht. Dieser Unterschied ist bei C57BL/6- und ob/ob-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen deutlicher zu sehen. (C57BL/6: 0,5 l (22°C u. 30°C)+1,5 l:  $p < 0,0001$ ; 6 l:  $p = 0,003$ ; ob/ob:  $p < 0,0001$ ; db/db: 1,5 l:  $p = 0,005$ ; 6 l:  $p = 0,007$ ; BALB/c; 0,5 l (22°C):  $p = 0,001$ ; 6 l:  $p = 0,020$ ; 30°C:  $p = 0,028$ ).

Bei einer Haltungstemperatur von 30°C haben alle Stämme, außer BALB/c, höhere Körpergewichte als bei 22°C. Die C57BL/6-Mäuse zeigten nach Fettdiät-Fütterung signifikant höhere Körpergewichte im Vergleich zu 22°C (finales Körpergewicht und Gain%; ANOVA:  $p < 0,0001$ ), während sich ein umgekehrtes Ergebnis bei BALB/c ergab (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,008$ ) (siehe Abbildung 41 und 42).

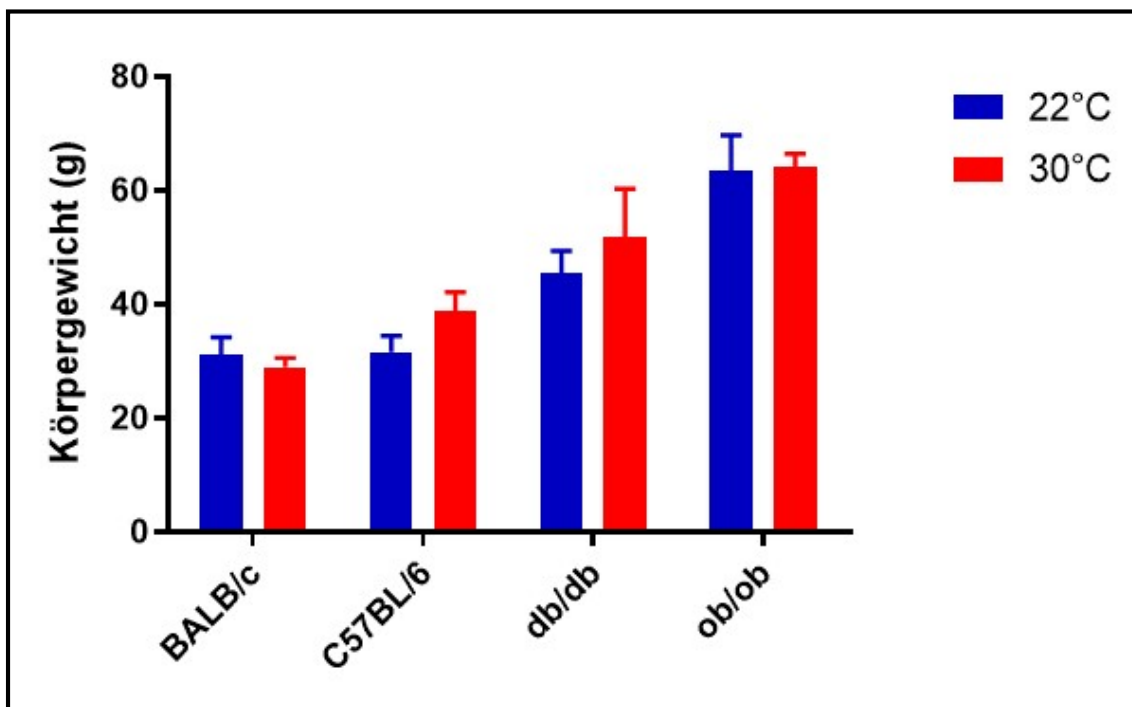
Bei der Untersuchung des Körpergewichts von db/db-Mäusen auf verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C zeigten sich signifikant höhere Werte bei 6 l Einstreutiefe. (finales Körpergewicht; Mann-Whitney U-test: 0,5 l vs. 6 l:  $p = 0,005$ ; 1,5 vs. 6 l:  $p = 0,048$ ; Gain%; 0,5 l vs. 6 l:  $p = 0,038$ ; 1,5 vs. 6 l:  $p = 0,016$ ) (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 41:** Gewichtsentwicklungen von Woche 1 bis Woche 10 (g, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 42:** Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 43:** Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert  $\pm$  SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

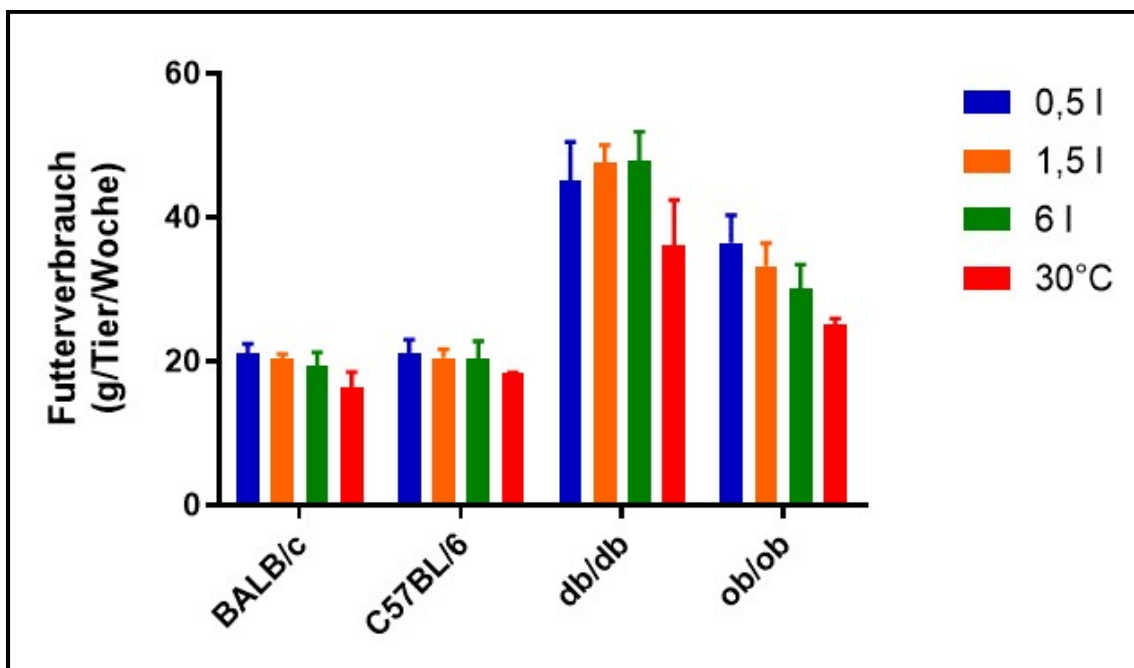
#### 4.2.8 Futter- und Wasserverbrauch

Zur Analyse der Futter- und Wasseraufnahme wurden das Futter und das Wasser einmal wöchentlich gewogen. Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt (siehe Abbildung 44 und 46).

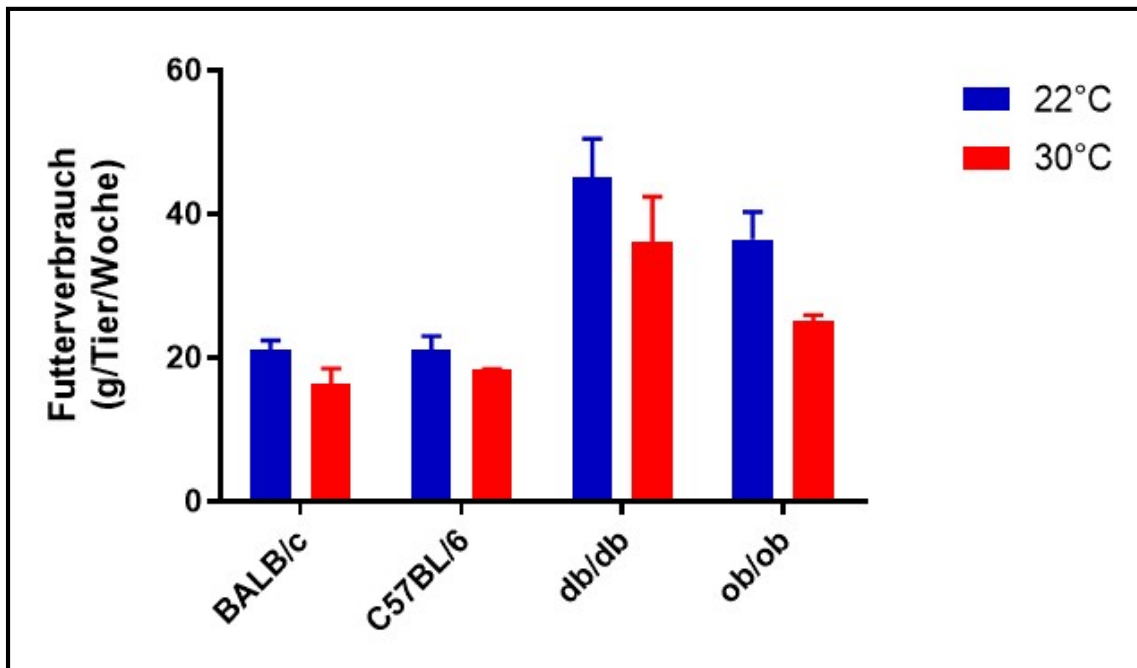
Außer bei in 0,5 l Einstreu (22°C) gehaltenen db/db-Mäusen, nahmen alle mit Fettdiät gefütterten Gruppen weniger Futter auf. Die BALB/c-, C57BL/6- und ob/ob-Mäuse zeigten bei den Versuchen mit Fettdiät-Fütterung eine signifikante Abnahme gegenüber den Studien mit Standarddiät-Fütterung (ANOVA: BALB/c: 22°C:  $p < 0,0001$ ; 30°C:  $p = 0,004$ ; C57BL/6; 0,5 l (22°C)+6 l:  $p = 0,003$ ; 1,5 l:  $p = 0,005$ ; 30°C:  $p = 0,026$ ; ob/ob: 1,5 l:  $p = 0,009$ ; 0,6 l:  $p = 0,011$ ; 30°C:  $p = 0,005$ ). Darüber hinaus zeigten die BALB/c- und C57BL/6-Mäuse eine geringere Wasseraufnahme und im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen nahmen die db/db-Mäuse mehr Wasser bei der Fettdiät-Fütterung auf (ANOVA: BALB/c: 0,5 l (22°C):  $p = 0,009$ ; 1,5 l:  $p < 0,0001$ ; 6 l:  $p = 0,011$ ; 30°C:  $p = 0,022$ ; C57BL/6; 30°C:  $p = 0,049$ ; db/db: 0,5 l (22°C):  $p = 0,002$ ).

Die BALB/c- und ob/ob-Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Futterverbrauch bei 30°C- vs. 22°C-Haltung (ANOVA: BALB/c:  $p=0,034$ ; ob/ob:  $p=0,007$ ) (siehe Abbildung 45). Des Weiteren nahmen die db/db und ob/ob-Mäuse signifikant weniger Wasser bei 30°C-Haltung als bei 22°C auf (ANOVA: db/db:  $p=0,005$ ; ob/ob:  $p=0,008$ ) (siehe Abbildung 47). Zwischen verschiedenen Einstreutiefen bei 22°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Futter- und Wasserverbrauchs nachweisen.

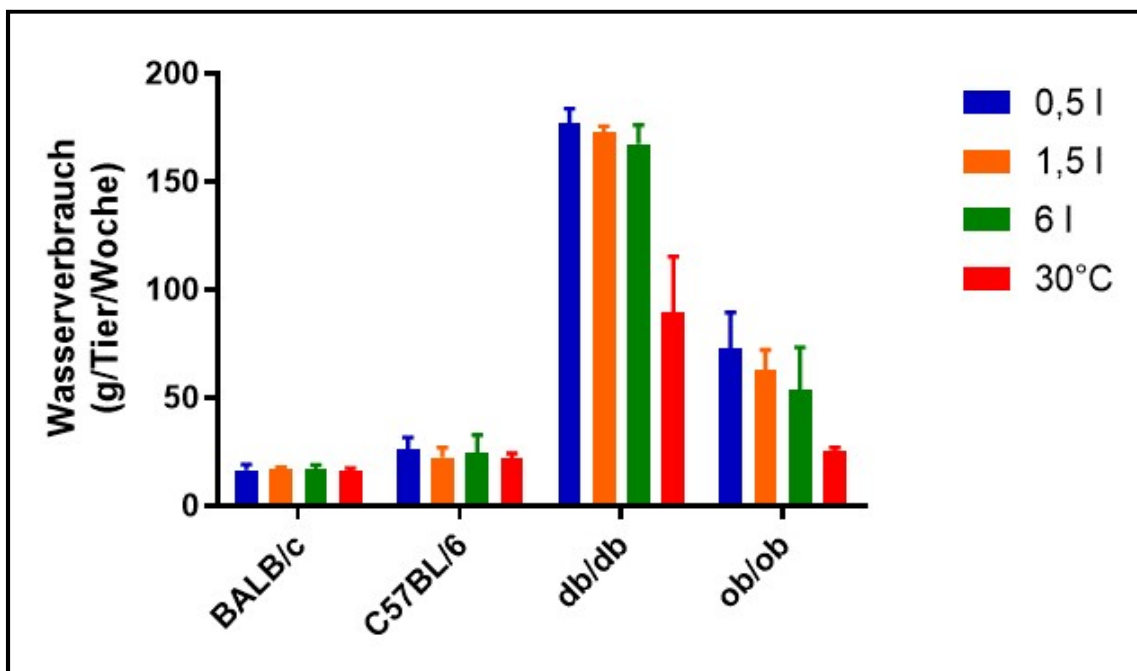
Insgesamt war der Futterverbrauch bei den db/db- und ob/ob-Mäusen bei allen Haltungsbedingungen signifikant höher als bei den BALB/c- und C57BL/6-Mäusen, außer von ob/ob-Mäusen bei 30°C-Haltung (BALB/c und C57BL/6 vs. db/db: Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+1,5 l:  $p=0,050$ ; Scheffe-Test: 6 l:  $p<0,0001$ ; 30°C:  $p=0,001$ ; BALB/c und C57BL/6 vs. ob/ob: Mann-Whitney U-test: 0,5 l (22°C)+1,5 l:  $p=0,050$ ; Scheffe-Test: 6 l:  $p=0,019$  u. 0,030).



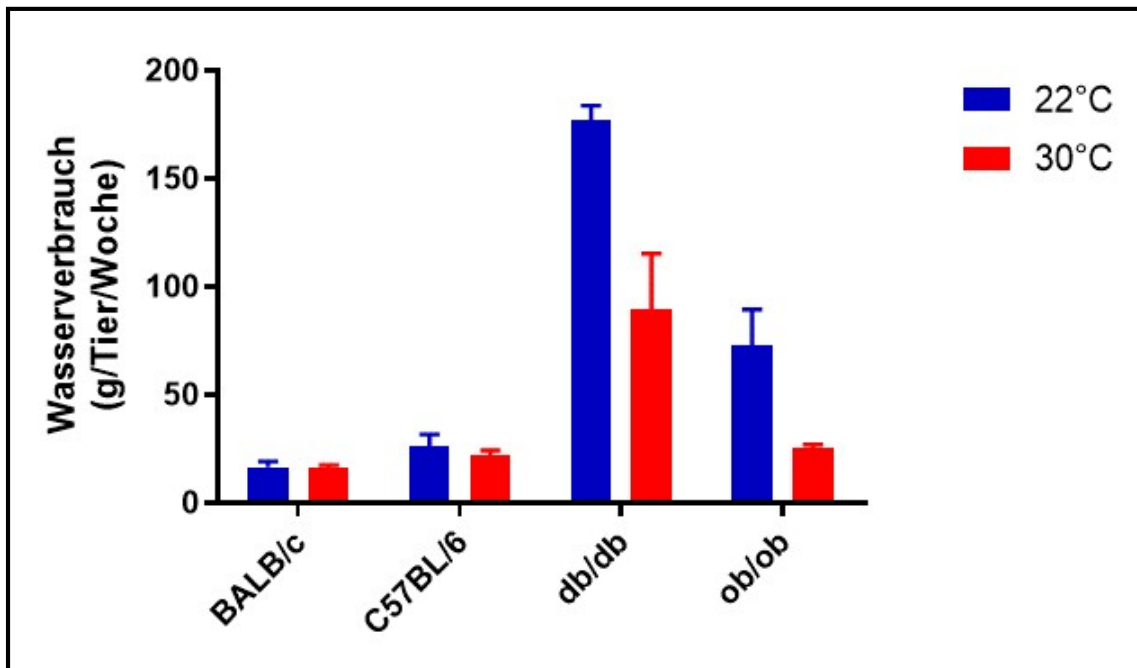
**Abbildung 44:** Der wöchentliche Futterverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 45:** Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)



**Abbildung 46:** Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 47:** Der wöchentliche Wasserbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

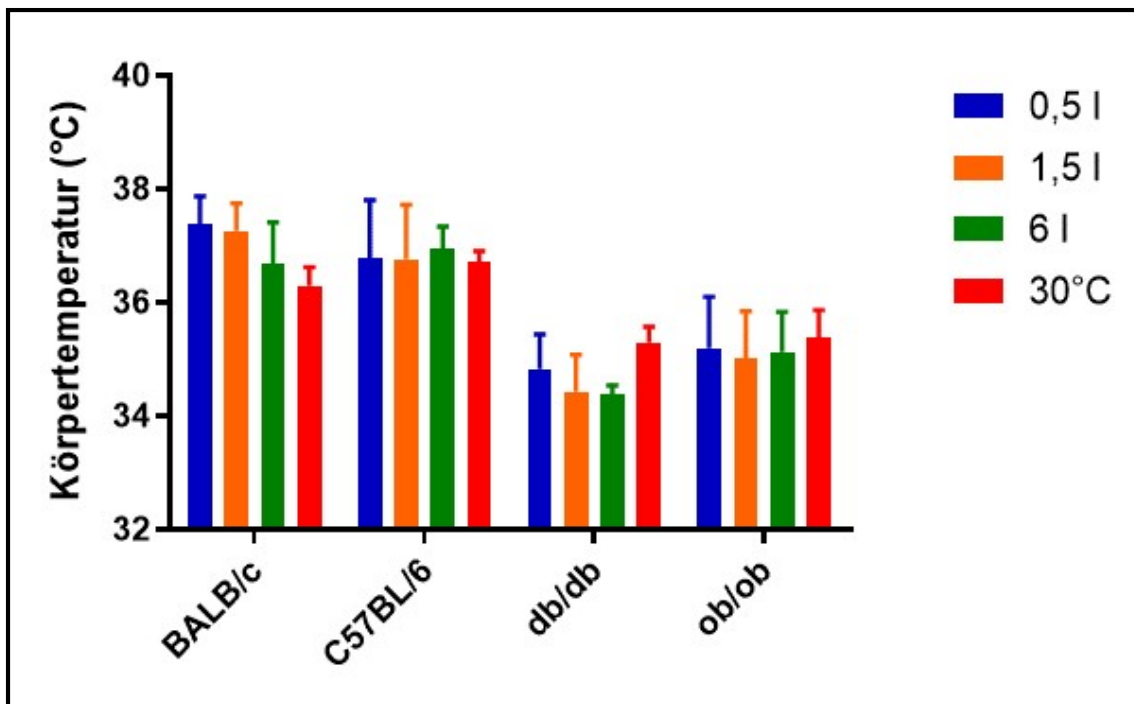
#### 4.2.9 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde mit einem subkutan implantierten Transponder wöchentlich ermittelt. In Abbildung 48 sind die Mittelwerte der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

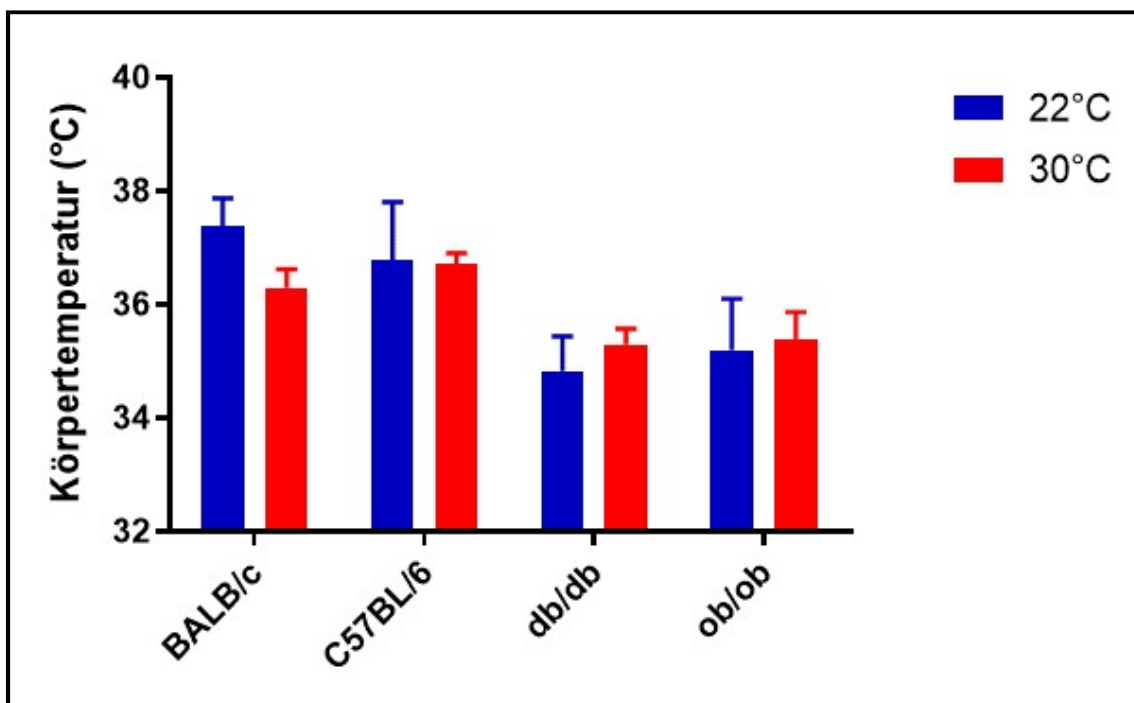
Die Ergebnisse zeigten keine einheitlichen signifikanten Unterschiede zwischen Fett- und Standarddiätfütterung:

Die BALB/c-Mäuse zeigten nach Fettdiät-Fütterung eine signifikant niedrigere Körpertemperatur bei 30°C- vs. 22°C-Haltung (ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Die db/db-Mäuse zeigten im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen eine signifikant höhere Körpertemperatur bei 30°C (Kruskal-Wallis H-Test:  $p = 0,045$ ) (siehe Abbildung 49).

Insgesamt waren die Ergebnisse der Körpertemperatur bei den BALB/c- und C57BL/6-Mäusen unter allen Haltungsbedingungen signifikant höher als bei den db/db und ob/ob-Mäuse (Mann-Whitney U-test:  $p < 0,002$ ). Nach Fettdiät-Fütterung zeigten die BALB/c- und db/db-Mäuse eine signifikant höhere Körpertemperatur in 0,5 l gegenüber 6 l Einstreu (BALB/c: Scheffe-Test:  $p = 0,022$ ; db/db; Mann-Whitney U-test:  $p = 0,021$ ).



**Abbildung 48:** Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 49:** Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

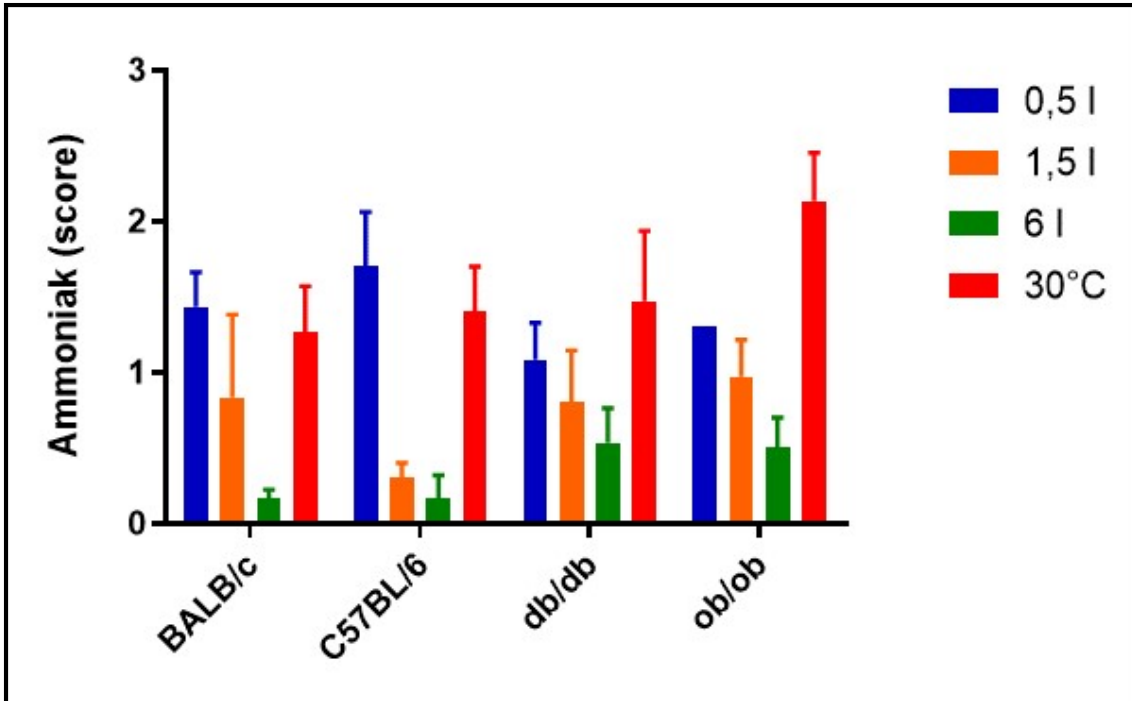
### 4.2.10 Ammoniak

In Abbildung 50 sind die Mittelwerte der Ammoniakwerte in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

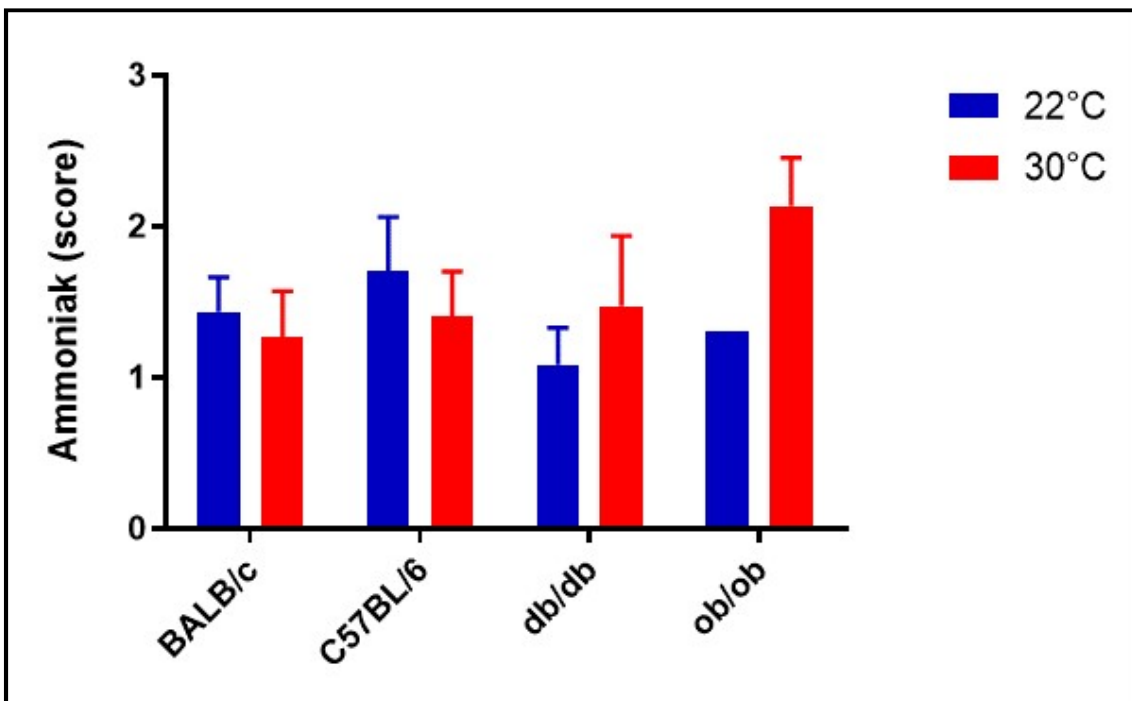
Nach Fettdiät-Fütterung hatten alle Mäusestämme gegenüber der Standarddiät-Fütterung geringere Ammoniakkonzentrationen. Ein signifikanter Unterschied ergab sich bei allen in 0,5 l Einstreu (22°C) gehaltenen Gruppen (BALB/c u. db/db: Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,046$ ; C57BL/6: ANOVA:  $p=0,037$ ; ob/ob: ANOVA:  $p=0,026$ ) und für die 30°C gehaltenen C57BL/6-Mäuse (Kruskal-Wallis H-Test:  $p=0,046$ ).

Die Einstreutiefe hat einen deutlichen Einfluss. Die Haltungsguppen mit 6 l Einstreutiefe zeigten bei allen Mäusestämmen die signifikant geringsten Werte. Je mehr Einstreu vorhanden war, desto geringer war die Ammoniakkonzentration und die Ergebnisse zeigten bei den BALB/c-, C57BL/6- und db/db-Mäusen zwischen 0,5 l (22°C) und 6 l einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney U-test: BALB/c: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p=0,043$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,046$ ; C57BL/6: 0,5 l (22°C) vs. 1,5 l:  $p=0,050$ ; 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p=0,050$ ; db/db: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p=0,050$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p=0,046$ ).

Zwischen 22°C- und 30°C-Haltungstemperatur ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (siehe Abbildung 51).



**Abbildung 50:** Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 51:** Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

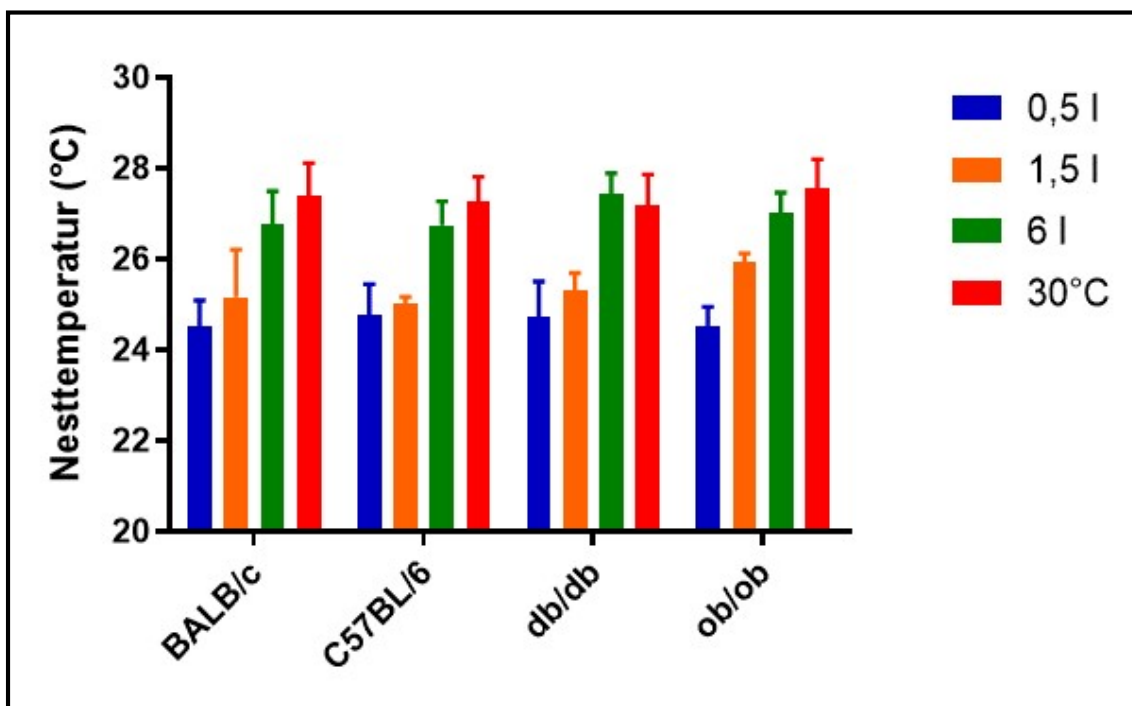
#### 4.2.11 Nesttemperatur

In Abbildung 52 sind die Mittelwerte der Nesttemperatur in Form eines Balkendiagramms zusammenfassend dargestellt.

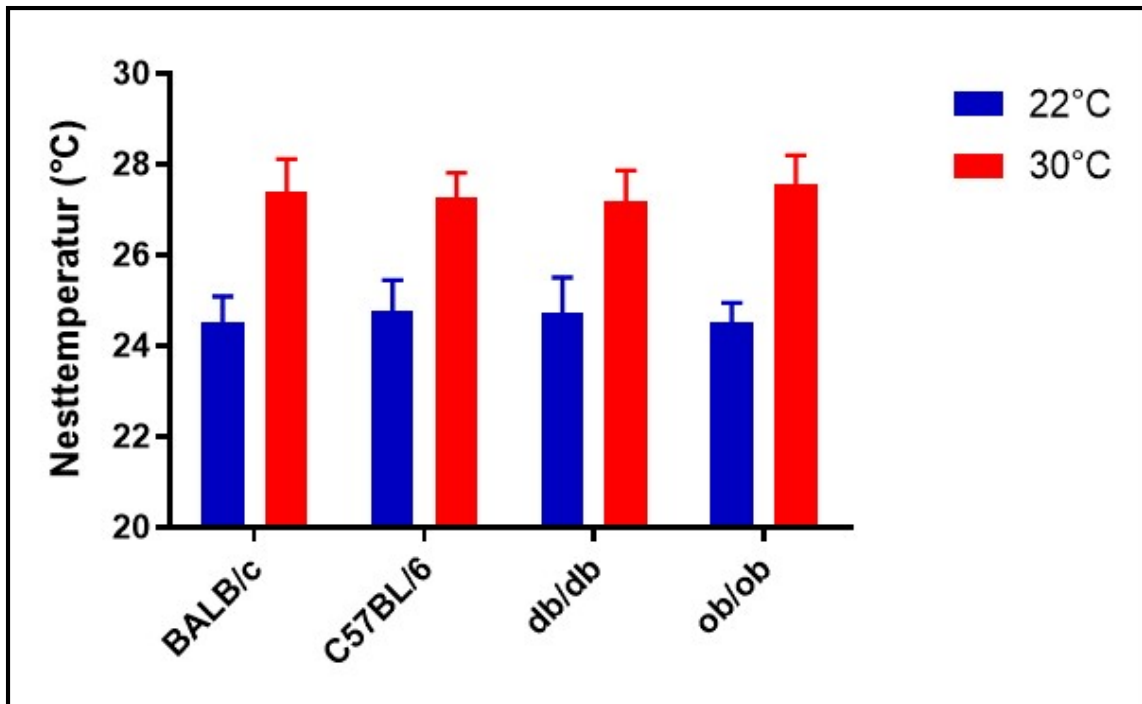
Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Fett- und Standarddiätfütterung.

Alle Mäusestämme zeigten nach Standarddiät-Fütterung signifikant höhere Nesttemperaturen bei 30°C- vs. 22°C-Haltung (ANOVA:  $p < 0,015$ ) (siehe Abbildung 53).

Die Haltungsgruppe mit 6 l Einstreutiefe zeigte bei 22°C-Haltungstemperatur bei allen Mäusestämmen signifikant höhere Nesttemperaturen gegenüber 0,5 l (Scheffe-Test: BALB/c: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p = 0,039$ ; C57BL/6: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p = 0,009$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p = 0,016$ ; db/db: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p = 0,003$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p = 0,012$ ; ob/ob: 0,5 l (22°C) vs. 6 l:  $p = 0,001$ ; 1,5 l vs. 6 l:  $p = 0,036$ ; 0,5 l (22°C) vs. 1,5 l:  $p = 0,011$ ).



**Abbildung 52:** Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen



**Abbildung 53:** Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert  $\pm$  SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l)

### 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Kältestress bei Mäusen durch unterschiedliche Einstreutiefen oder Erhöhung der Umgebungstemperatur reduziert werden kann und sich somit das Wohlbefinden der Mäuse erhöhen lässt. Außerdem wurde untersucht, ob und wenn ja bei welchem Tiermodell sich die Induzierbarkeit eines Diabetes Typ 2 durch höhere Umgebungstemperaturen (mehr Einstreu) ändert. Dadurch ließe sich die Translatibilität von Mausmodellen des Diabetes Typ 2 erhöhen (3R-Refinement). Für die Untersuchungen wurden männliche BALB/cAnNRJ-, C57BL/6JRj-, db/db- (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J) und ob/ob- (B6.Cg-Lepob/J) Mäuse verwendet. Die Tiere wurden in stammhomogenen Vierergruppen in Typ-III-Käfigen gehalten. Im Rahmen dieses Versuchs wurden die Tiere bei  $22\pm 2^\circ\text{C}$  auf drei verschiedenen Einstreuvolumina (0,5 l, 1,5 l und 6 l) und bei  $30\pm 2^\circ\text{C}$  gehalten. Jede Haltungsgruppe wurde mit Standarddiät und Fettdiät gefüttert.

#### 5.1 UCP1, braunes Fettgewebe und freie Fettsäuren

Braunes Fettgewebe nimmt eine zentrale Rolle bei der Wärmeproduktion durch UCP1-Geneexpression ein. Dieser thermoregulatorische Prozess wird im braunen Fettgewebe durch die Kälte aktiviert (CANON et al. 2004). Bei Kälte ist die UCP1-regulierte zitterfreie Wärmebildung im BAT die Hauptquelle der Wärmeproduktion. Die Aktivierung von UCP1 erfolgt über das sympathische Nervensystem durch die Freisetzung von Noradrenalin, das an auf den Fettzellen lokalisierte  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren bindet.

Normalerweise werden Mäuse bei einer Umgebungstemperatur zwischen  $20\text{-}24^\circ\text{C}$  gehalten, allerdings zeigen Wahlversuche, dass Labormäuse ihre eigene metabolische Thermoneutralzone bevorzugten (GORDON 1985). Die Thermoneutralzone für die meisten Mausstämme liegt bei  $30\text{-}32^\circ\text{C}$  (GORDON et al. 1993). Somit sind Mäuse in der konventionellen Haltung im Regelfall einem kontinuierlichen Kältestress ausgesetzt, dieser kann besonders immunologische oder pharmakologische Studien maßgeblich beeinflussen (KARP 2012). Es war auch sinnvoll zu prüfen, ob eine erhöhte Einstreutiefe Einfluss auf die empfundene Umgebungstemperatur haben kann (FREYMANN 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte die UCP1-Expression, im interskapulären braunen Fettgewebe, bei  $30^\circ\text{C}$  im Gegensatz zu  $22^\circ\text{C}$  in allen Gruppen eine deutliche Abnahme. Die UCP1-Expression war bei der normalen Haltungstemperatur ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) in

verschiedenen Einstreuivolumen sehr unterschiedlich. Außerdem, im Vergleich zu den BALB/c- und C57BL/6-Mäusen, zeigten die db/db- und ob/ob-Mäuse einen signifikant niedrigeren UCP1-Gehalt bei 30°C.

Die negative Korrelation der BAT-Menge mit der UCP1-Expression bei BALB/c- und C57BL/6-Mäusen lässt sich mit der Aktivität des BAT erklären. Um die Reduktion der BAT-Aktivität bei 30°C in diesem Zusammenhang zu verifizieren, müssten bei diesen Tieren jedoch weitere, funktionale Untersuchungen zur BAT-Aktivität, beispielsweise in Form von PET-Scans, durchgeführt werden.

Bisherige Studien berichten, dass Übergewicht zu einer erhöhten Menge an FFA im Plasma führt (OPIE u. WALFISH 1963). In unserem Versuch war die Konzentration von FFA im Plasma aller Mäusestämme, die mit Fettdiät gefüttert worden sind, bei 30°C signifikant höher als bei der laborüblichen Haltungstemperatur (22±2°C). Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Fettdiät zeigten nur die C57BL/6-Mäuse mit Standarddiät-Fütterung eine signifikante Erhöhung von freien Fettsäuren bei 30°C. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass Mäuse bei 22±2°C Haltungstemperatur die freien Fettsäuren aus dem zirkulierenden Blut in das braune Fettgewebe aufnehmen, wo diese aufgrund der kälteinduzierten Aktivierung des Gewebes als Substrate für die Wärmeengewinnung genutzt werden (vgl. BARTELT et al. 2011). Dadurch kann die Konzentration der freien Fettsäure im Plasma sinken.

### **5.2 Glukosetoleranz, Blutglukose und Plasmainsulin**

Während Typ-1-Diabetes durch Verlust der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas entsteht, wird Typ-2-Diabetes als relative Insulinresistenz bzw. Insulinunempfindlichkeit bezeichnet. Von allen Diabetes-Erkrankungen entfallen ca. 90% auf Typ-2-Diabetes (SIKARIS 2004).

Als Folge der Insulinresistenz wird Glukose nicht mehr abgebaut und verbleibt im Blut, wodurch immer mehr Insulin produziert wird, um die Glukose abzubauen und die hohe Glukosekonzentration zu reduzieren. Diese ständig steigende Insulinproduktion schwächt die  $\beta$ -Zellen und kann diese dauerhaft beschädigen. Schließlich wird der Patient hyperglykämisch und mit Typ-2-Diabetes diagnostiziert.

Für die Untersuchung der Glukoseverstoffwechslung wurde neben wöchentlicher Bestimmung von Blutglukosespiegeln und Plasmainsulinspiegeln am Ende des Versuches ein Glukosetoleranztest durchgeführt.

Der Mausstamm C57BL/6 hat sich in der Vergangenheit oft relativ resistent gegenüber Diabetesentwicklung gezeigt. So weisen db/db-Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund nur einen milden Diabetes auf (COLEMAN 1992) und auch ob/ob-Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund zeigen nur eine schwache Hyperglykämie (YAMAUCHI et al. 2001). Bei den Mäusen, die innerhalb oder nahe ihrer Thermoneutralzone ( $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) gehalten werden, wird sich das sympathische Verhalten reduzieren (SWOAP et al. 2008), so dass die verschiedenen Arten der Glukosebehandlung beeinflusst werden können (NONOGAKI 2000). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die BALB/c-, db/db- und ob/ob-Mäuse nach einer Fettdiätfütterung bei  $30^{\circ}\text{C}$  tendenziell zu einer insgesamt niedrigeren Blutglukose und höherem Plasmainsulin neigen (Abb. 35, 36, 38). Außerdem zeigten die C57BL/6-Mäuse nach einer Fettdiätfütterung bei  $30^{\circ}\text{C}$  einen höheren Plasmainsulin- und Blutglukosespiegel. Die C57BL/6-, db/db- und ob/ob-Mäuse zeigen nach einer Fettdiätfütterung bei  $30^{\circ}\text{C}$  sowie nach Applikation des Glukose-Bolus eine tendenziell verbesserte Aufnahme von Glukose im Gewebe, was durch die verringerten Blutglukosekonzentrationen deutlich wird. Im Gegensatz zur Fettdiät zeigten die db/db- und ob/ob-Mäuse nach Standarddiätfütterung tendenziell niedrigere orale Glukosetoleranz-Ergebnisse bei  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Interessanterweise waren die beobachteten Temperatureffekte auf OGTT stamm- und diätspezifisch und traten sehr unterschiedlich auf, während es bei Kontrollgruppen (C57BL/6 und BALB/c mit Standarddiätfütterung) keinen Effekt gab. Bisherige Studien zur Kälteakklimatisation oder akuten Kälteexposition bei Nagern berichten häufig von verbessertem diätinduziertem Diabetes, erhöhter Glukosetoleranz sowohl bei diabetischen als auch nicht-diabetischen Tiermodellen und reduzierten Plasmainsulinspiegeln, was wohl auf einen erhöhten metabolischen Bedarf aufgrund von Zittern und nicht zitternder Thermogenese zurückzuführen ist (SMITH u. DAVIDSON 1982; VALLERAND et al. 1983, 1986). In diesem Zusammenhang haben wir bei db/db- und ob/ob-Mäusen nach Standarddiätfütterung eine leichte und teilweise-signifikante Zunahme von oraler Glukosetoleranz bei  $22^{\circ}\text{C}$  beobachtet. Jedoch gab es keine Abnahme des Plasmainsulinspiegels. Vergleichbare Ergebnisse zeigen auch die Studie von GASPARETTI (z.B. 2003). Aus dieser Studie ist bekannt, dass bei kälteexponierten Tieren eine verminderte Insulinsekretion auftritt. Bei Kälte-Exposition verringert ein

erhöhter Sympathikotonus die Insulinsekretion aus den Pankreasinseln (GASPARETTI et al. 2003; GILON u. HENQUIN, 2001). Weiterhin zeigten die Studien von SMITH (1982) und VALLERAND (1987), dass die Kälteexposition, trotz einer geringeren Insulinsekretion, häufig zu einer erhöhten Glukoseverwertung für die Thermogenese führt (SMITH u. DAVIDSON 1982; VALLERAND et al. 1987).

Die Gruppenhaltung und das Vorhandensein von Nestmaterial können den von den Mäusen erfahrenen thermischen Stress verringern, was echte Auswirkungen von Kältestress auf den Glukosestoffwechsel verhindern kann (GASKILL et al. 2013). Andererseits berichten frühere Studien, dass das Nestmaterial und Kuschn die Temperatur der Mikroumgebung jeweils nur um 1°C erhöht (GORDON et al. 1998; GORDON 2004). In diesem Zusammenhang zeigten diese Studien leichte und teilweise signifikante Unterschiede in der Nesttemperatur zwischen verschiedenen Einstreutiefen.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass der Plasmainsulinspiegel, der Blutglukosespiegel sowie die Glukosetoleranz von der Umgebungstemperatur beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse können jedoch bei Tiermodellen unterschiedlich sein und können daher zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

### **5.3 Körpergewicht, Futter- und Wasserverbrauch**

Während dieser Versuchsreihe wurden das Körpergewicht, der Futter- und Wasserverbrauch wöchentlich kontrolliert und dokumentiert.

Die Fütterung mit Fettdiät führte bei allen Mäusestämmen im Vergleich zur Fütterung mit Standarddiät zu einer Zunahme des Körpergewichts, obwohl der Futterverbrauch bei den fettdiätgefütterten Mäusen geringer war. Die BALB/c-, C57BL/6- und ob/ob-Mäuse zeigten tendenziell eine geringere und die db/db-Mäuse eine erhöhte Wasseraufnahmen bei Fettdiätfütterung.

Bei thermoneutraler Haltungstemperatur entwickeln die Mäuse ein höheres Körpergewicht als in einer zu kalten Umgebung (GORDON 2004). Unsere Studien haben diese Resultate teilweise bestätigt. Ein signifikant größeres Körpergewicht zeigten C57BL/6-Mäuse mit der Fettdiätfütterung, db/db-Mäuse zeigten auch tendenziell höhere Körpergewichte bei 30°C. Außerdem zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass die verschiedenen Einstreutiefen teilweise signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht, die Wasser- und Futteraufnahme haben. Jedoch korrelieren Einstreutiefe und Körpergewicht nicht immer miteinander.

### 5.4 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde einmal wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr durch die implantierten Transponder mittels eines Transponderlesegeräts (ScanFlex AFX-100, Allflex®, Vitré, France) gemessen und dokumentiert. Um eine mögliche stressbedingte Temperaturerhöhung minimal zu halten wurde die Körpertemperaturmessung immer als erstes vor dem Wiegen und Käfigwechsel durchgeführt (KLEIN 2002).

Die Regulation der Körpertemperatur und des Körpergewichts findet im Hypothalamus in der präoptischen Region statt (MORRISON et al. 2008, MORRISON u. NAKAMURA 2011). Die Studien von EHRHARDT (2008) berichten, dass Mäuse mit einer niedrigeren Körpertemperatur disponierter für ein erhöhtes Körpergewicht oder Adipositas sind. Erhöhter Energieverbrauch kann andererseits der Entwicklung von Adipositas entgegenwirken. Ein mögliches Beispiel ist der Inzuchtstamm SWR/J, bei dem die Mäuse unter 6 untersuchten Inzuchtstämmen die höchste Körpertemperatur zeigten (EHRHARDT 2008). Gleichzeitig waren sie resistent gegenüber diätinduzierter Adipositas (HESSE et al. 2010). Hingegen waren Mäuse des Inzuchtstamms AKR/J nicht resistent gegenüber diätinduzierter Adipositas und zeigten keine Auffälligkeiten der Körpertemperatur (EHRHARDT 2008, HESSE et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Körpertemperatur bei db/db- und ob/ob-Mäusen im Gegensatz zu BALB/c- und C57BL/6-Mäuse signifikant geringer ist. Die BALB/c- und C57BL/6-Mäuse zeigten nach Standarddiätfütterung als Kontrollgruppe eine signifikant niedrigere Körpertemperatur bei 30°C- vs. 22°C-Haltung, während die db/db- und ob/ob-Mäuse eine signifikant höhere Körpertemperatur bei 30°C zeigten. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die C57BL/6-Mäuse mit der Fettdiätfütterung, als sogenanntes DIO-Model, im Gegensatz zur Standarddiätfütterung eine signifikant erhöhte Körpertemperatur bei 30°C-Haltung aufwiesen.

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass die Körpertemperatur bei diabetischen-Mäusestämmen (db/db und ob/ob) signifikant geringer war, aber dass ein erhöhtes Körpergewicht nicht zwangsläufig mit einer niedrigeren Körpertemperatur einhergeht.

### 5.5 Nesttemperatur und Ammoniak

Während dieser Versuchsreihe wurden einmal wöchentlich zwischen 9:00 und 11:00 Uhr die Nesttemperatur mittels eines Stabthermometers und die Ammoniak-konzentration

mittels Gasprüfrohre gemessen. Bisherige Studien haben gezeigt, dass Mäuse höhere Einstreutiefen präferieren und die angebotenen Nestmaterialien die Mikroumgebungstemperatur geringfügig ändern (GORDON 2004, FREYMANN 2014). Bei unserer Studie wurde die Nesttemperatur gemessen, um zu erfahren, wie die Einstreutiefe die Nesttemperatur beeinflusst und welchen Effekt sie auf die Ergebnisse hat. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Nesttemperaturen bei Einstreutiefen von 0,5 l und 6 l sowie bei 1,5 l und 6 l bei 22°C signifikant unterschiedlich waren. Die Werte haben sich von der Einstreutiefe 0,5 l zur Einstreutiefe 6 l um bis zu 3°C geändert. Andererseits haben sich die Werte von der Einstreutiefe 1,5 l zur Einstreutiefe 6 l um 1-2°C geändert.

Über den Effekt auf die Nesttemperatur hinaus ist die Einstreutiefe auch wichtig für die Ammoniakkonzentration, die durch das Urinieren der Tiere im Käfig entsteht. Da ab einer bestimmten Konzentration das Ammoniak gesundheitsschädliche Auswirkungen hat, ist es sinnvoll, eine ausreichende Einstreutiefe in der Tierhaltung einzusetzen (FREYMANN 2014). Bei unserer Studie wurden die Käfige bei den Kontrollgruppen einmal wöchentlich und bei den diabetischen Mäusemodellen (db/db und ob/ob) wegen erhöhter Urinausscheidung alle zwei Tage gewechselt. Die Ammoniak-Messung erfolgte bei den Kontrollgruppen wöchentlich bei Käfigwechsel und bei den diabetischen Mäusemodellen (db/db und ob/ob) auch einmal wöchentlich bei Käfigwechsel, nach zweitägigem Aufenthalt der Tiere auf dem Einstreu.

Die Ammoniak-Messwerte haben bei den unterschiedlichen Einstreutiefen teilweise signifikant abgenommen. Je niedriger die Einstreutiefe war, umso höher war der Ammoniak-Wert. Darüber hinaus zeigten die BALB/c- und C57BL/6-Mäuse tendenziell niedrigere Werte bei 30°C im Vergleich zu 22°C mit 0,5 l Einstreu. Im Vergleich war dies bei den db/db- und ob/ob-Mäuse umgekehrt. Die Werte waren hier bei 30°C im Vergleich zu 22°C mit 0,5 l Einstreu tendenziell höher.

### **5.6 Schlussfolgerung**

Die Untersuchungen zeigten, dass Haltungsbedingungen, wie Umgebungstemperatur, Einstreutiefe und Fettdiät-Fütterung den Plasmainsulinspiegel, den Blutglukosespiegel sowie die Glukosetoleranz bei den untersuchten Mäusemodellen beeinflussen. Dies kann maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse pharmakologischen Studien haben. Deshalb

müssen die Haltungsbedingungen standardisiert werden, um zukünftige Studien im Bereich der Diabetes-Forschung zu vereinheitlichen. Damit kann auch die Tieranzahl in den Studien reduziert werden. Welche Haltungsbedingungen für die Diabetes-Forschung optimal sind, kann man mit der vorliegenden Arbeit nicht genau feststellen. Dazu müssten Studien mit Diabetes-Wirkstoffen durchgeführt werden, um optimale Haltungsbedingungen festzulegen. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die UCP1-Genexpression im iBAT bei empfohlener Haltungstemperatur ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ) bei allen Tiermodellen höher war. Somit erklärten sich die Ergebnisse: die Haltungstemperatur von  $22\pm 2^\circ\text{C}$  führt sowohl bei Standardtiermodellen als auch bei den diabetischen Mäusemodellen, wie db/db und ob/ob, zu einem Kältestress. So dass die Tiere mehr Energie für die Thermoregulation benötigen und dies zum erhöhtem Stoffwechsel führen kann.

Das Einstreuvolumen hat die Ammoniak-Werte im Käfig stark beeinflusst. Die Ergebnisse legten dar, dass eine größere Einstreumenge das Wohlbefinden von Mäusen verbessern kann, da die Nesttemperatur und Ammoniakkonzentration sich von den verschiedenen Einstreutiefen stark beeinflussen lassen. Um die negative Wirkung von Ammoniak auf das Wohlbefinden und die Gesundheit der Tiere zu reduzieren, muss ein hohes Einstreuvolumen gegeben sein. Die Standardisierung eines bestimmten Einstreuvolumens im Rahmen einschlägiger wissenschaftlicher Studien wäre sinnvoll.

## 6 Zusammenfassung

Abdullah Kandira

### **Einfluss der Haltungsbedingungen auf die Entwicklung von Diabetes Typ 2 in verschiedenen Mausmodellen**

Um menschliche Stoffwechselkrankheiten zu untersuchen, werden Mäuse als Tiermodelle verwendet, aber Experimente werden typischerweise bei empfohlener (ETS 123) Haltungstemperatur durchgeführt, die weit unterhalb der thermoneutralen Zone der Tiere liegt und zu erhöhter Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch führt. In der vorliegenden Studie habe ich untersucht, wie die Umgebungstemperatur die Entwicklung des Typ2-Diabetes und die Insulin-Resistenz bei Kontroll- und adipösen männlichen Mäusen beeinflusst. Erwachsene männliche BALB/c-, C57BL/6-, db/db- und ob/ob-Mäuse wurden 12 Wochen lang bei  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  und  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  sowie auf unterschiedlichen Einstreutiefen (0,5 l, 1,5 l und 6 l) gehalten und entweder mit Standard- oder Fettdiät gefüttert.

Während der Studie wurde wöchentlich Blut zur Messung von Plasmainsulin und Blutglukose entnommen sowie über einen subkutan implantierten Transponder die Körpertemperatur gemessen. Darüber hinaus wurden das Körpergewicht, die Futter- und Wasseraufnahme, die Nesttemperatur und die Käfigammoniak-Konzentration ermittelt. Zum Ende des Versuches wurde den Mäusen 12-15 Stunden lang das Futter entzogen, bevor ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt wurde. Danach wurde Blut zur Bestimmung der freien Fettsäuren und der Aktivität des braunen Fettgewebes entnommen.

Insgesamt konnten wir bei der Studie feststellen, dass die UCP1-Genexpression im iBAT bei allen Tiermodellen bei empfohlener Haltungstemperatur höher war. Die Umgebungstemperatur beeinflusste den Plasmainsulinspiegel, den Blutglukosespiegel sowie die Glukosetoleranz bei den Mäusen. Diese Beeinflussung ändert sich nach Standard- und Fettdiätfütterung sowie stammspezifisch. Beispielsweise zeigen C57BL/6- und db/db-Mäuse höhere Plasmainsulinspiegel bei  $30^{\circ}\text{C}$ , während sie mit Fettdiät gefüttert werden. Die Körpertemperatur war bei db/db- und ob/ob-Mäusen geringer als bei nicht-diabetischen Mäusestämmen, allerdings korrelierte ein erhöhtes Körpergewicht

nicht zwangsläufig mit einer niedrigeren Körpertemperatur. Die Umgebungstemperatur beeinflusste auch das Körpergewicht und die Futter- und Wasseraufnahme.

Die Nesttemperatur und Ammoniakkonzentration lassen sich von den verschiedenen Einstreutiefen stark beeinflussen. Darüber hinaus hat sich die Nesttemperatur von der Einstreutiefe 0,5 l zur Einstreutiefe 6 l um bis zu 3°C erhöht und je niedriger die Einstreutiefe war, umso höher war der Ammoniak-Wert.

## 7 Summary

Abdullah Kandira

### **Influence of housing conditions on the development of type 2 diabetes using various mouse models**

Mice are frequently used as animal models for the investigation of human metabolic diseases, therefore the experiments are typically carried out at recommended housing temperatures (ETS 123), which are far below the thermoneutral zone of mice, leading to an increased food intake and energy expenditure. In this study I investigated the influence of the ambient temperature and its effects on the development of type 2 diabetes and insulin resistance in male control mice and male obese mice. Adult male BALB/c-, C57BL/6-, db/db- and ob/ob-mice were housed for 12 weeks at a temperature of  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , with various bedding volumes (0.5 l, 1.5 l and 6 l) and were fed with either a standard or high fat-diet.

During the study blood was sampled for plasma-insulin and blood-glukose determination, and the body temperature was measured via subcutaneous implanted transponders once a week. In addition body weight, food and water intake, body temperature and cage ammonic concentration was ascertained. At the end of the experiment the animals were kept for 12-15 hours of fasting before an oral glukose tolerance test was performed. Afterwards, blood was sampled for the determination of free fatty acids and the brown adipose tissue was removed.

From the data it can be concluded that the uncoupling-protein-1 (UCP1)-gene expression in iBAT was higher in all mice strains at standard laboratory housing temperature. The ambient temperature affected the plasma insulin levels, blood glukose levels and oral glukose tolerance in the mice. This influence changed according to standard and high-fat diet as well as to strain. For example increased plasma insulin levels at  $30^{\circ}\text{C}$  were found in C57BL/6- and db/db-mice, when fed with a high-fat diet. Body temperature was lower in db/db and ob/ob m in comparison to non-diabetic mouse strains, however, an increased body weight did not always correlate with lower body temperature. The ambient temperature also affected body weight and food and water intake.

The nest temperature and ammoniac concentration was strongly influenced by the bedding depth. Furthermore, the nesting temperature increased maximally by 3°C with in a bedding-volume range of 0.5 l to 6 l. A decrease of the volume of bedding resulted in an increase in the ammoniac concentration.

## 8 Literaturverzeichnis

AZZU, V. u. M. D. BRAND (2010):

The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins.  
Trends in Biochemical Sciences 35(5), 298-307

BARTELT, A., O. T. BRUNS, R. REIMER, H. HOHENBERG, H. ITTRICH, K. PELDSCHUS, M. G. KAUL, U. I. TROMSDORF, H. WELLER, C. WAURISCH, A. EYCHMÜLLER, P. L. S. M. GORDTS, F. RINNINGER, K. BRUEGELMANN, B. FREUND, P. NIELSEN, M. MERKEL u. J. HEEREN (2011):

Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance.  
Nat. Med. 17(2), 200-205

BERG, F., U. GUSTAFSON u. L. ANDERSSON (2006):

The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation of poor thermoregulation in piglets.  
PLoS Genet. 2(8), e129

BIRBRAIR, A., T. ZHANG, Z. M. WANG, M. L. MESSI, G. N. ENIKOLOPOV, A. MINTZ u. O. DELBONO (2013):

Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation.  
Stem Cells and Dev. 22(16), 2298-2314

BODEN, G. (2011):

Obesity, insulin resistance and free fatty acids.  
Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 18(2), 139-143

BÖHME, H., J. DIMIGEN, S. GEROLD, A. HAEMISCH, R. LÜBBE, S. OTT, M. SCHEER, P. P. TSAI u. P. CLAUSING (2007):

Tiergerechte Haltung: Labormäuse.

Ausschuss für tiergerechte Labortierhaltung.

[http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/hal\\_maushaltung.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/hal_maushaltung.pdf)

BOSTRÖM, P., J. WU, M. P. JEDRYCHOWSKI, A. KORDE, L. YE, J. C. LO, K. A. RASBACH, E. A. BOSTRÖM, J. H. CHOI, J. Z. LONG, S. KAJIMURA, M. C. ZINGARETTI, B. F. VIND, H. TU, S. CINTI, K. HOJLUND, S. P. GYGI u. B. M. SPIEGELMAN (2012):

A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis.

Nature. 481(7382), 463-468

BRÜNNING, J. C., D. GAUTAM, D. J. BURKS, J. GILLETTE, M. SCHUBERT, P. C. ORBAN, R. KLEIN, W. KRONE, D. MÜLLER-WEILAND u. C. R. KAHN (2000):

Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction.

Science. 289(5487), 2122-2125

BUSCH, M., S. CHOURBAJI, P. DAMMANN, S. GEROLD, A. HAEMISCH, P. JIRKOF, P. OEHLERT, A. OSTERKAMP, S. OTT, S. PETERS, K. SPEKL, P. P. TSAI u. B. LANGEN (2014):

Tiergerechte Haltung von Labormäusen.

Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung.

[http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierhaltung/hal\\_201408\\_Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierhaltung/hal_201408_Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf)

BUSIELLO, R. A., S. SAVARESE u. A. LOMBARDI (2015):

Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism.

Front. Physiol. 6, 36

CANNON, B., u. J. NEDERGAARD (2004):

Brown adipose tissue: function and physiological significance.

Physiol. Rev. 84(1), 277-359

CANNON, B., u. J. NEDERGAARD (2011):

Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies.

J. Exp. Biol. 214, 242-253

CHEN, Y., F. SIEGEL, S. KIPSCHULL, B. HAAS, H. FRÖHLICH, G. MEISTER u. A. PFEIFER (2013):

miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit.

Nat. Commun. 4, 1769

CHRISTEN, P., R. JAUSSE, R. BENOIT (2015):

Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 210-217

COLEMAN, D. L. (1992):

The influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes (db) locus in the mouse. VI: Hepatic malic enzyme activity is associated with diabetes severity.

Metabolism. 41(10), 1134-1136.

CONSIDINE, R. V., E. L. CONSIDINE, C. J. WILLIAMS, M. R. NYCE, S. A. MAGOSIN, T. L. BAUER, E. L. ROSATO, J. COLBERG u. J. F. CARO (1995):

Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity.

J. Clin. Invest. 95(6), 2986-2988

CONSIDINE, R. V., E. L. CONSIDINE, C. J. WILLIAMS, M. R. NYCE, P. ZHANG, I. OPENTANOVA, J. P. OHANNESIAN, J. W. KOLACZYNSKI, T. L. BAUER, J. H. MOORE u. J. F. CARO (1996):

Mutation screening and identification of a sequence variation in the human OB gene coding region.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 220, 735-739

CYPESS, A. M., S. LEHMAN, G. WILLIAMS, I. TAL, D. RODMAN, A. B. GOLDFINE, F. C. KUO, E. L. PALMER, Y. H. TSENG, A. DORIA, G. M. KOLODNY u. C. R. KAHN (2009):

Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans.  
N. Engl. J. Med. 360(15), 1509-1517

ECKERT, R., D. RANDALL, W. BURGGREN u. K. FRENCH (2000):

Tierphysiologie.

3. Auflage

Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 767-849

EHRHARDT, N. (2008):

Metabolische Phänotypisierung von Mausmutantenlinien im Rahmen des Metabolischen Labors der Deutschen Mauslinik.

Marburg, Philipps-Univ., Diss.

FENZL, A., F. W. KIEFER (2014):

Brown adipose tissue and thermogenesis.

Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 19(1), 25–37

FERRECCHIA, C. E., K. JENSEN u. R. VAN ANDEL (2014):

Intracage ammonia levels in static and individually ventilated cages housing C57BL/6 mice on 4 bedding substrates.

J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 53(2), 146-151.

FREYMANN, J. (2014):

Einstreutiefen- und Nestmaterialpräferenzen von Labormäusen in Gruppenhaltung.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

FREYMANN, J., P. TSAI, H. STELZER u. H. HACKBARTH (2015):

The amount of cage bedding preferred by female BALB/c and C57BL/6 mice.

Lab. Animal 44(1), 17-22

FREYMANN, J., P. TSAI, H. STELZER, R. MISCHKE u. H. HACKBARTH (2017):

Impact of bedding volume on physiological and behavioural parameters in laboratory mice.

Lab. Animal 51(6), 601-612

FRISCHMUTH, K. (2002):

Struktur und Funktionsanalysen der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 (hUCP1, hUCP2 und hUCP3).

München, Diss.

GAMBLE, M. R., G. CLOUGH (1976):

Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium.

Lab. Animal 10, 93-104

GASKILL, B. N., S. A. ROHR, E. A. PAJOR, J. R. LUCAS u. J. P. GARNER (2009):

Some like it hot: Mouse temperature preferences in laboratory housing.

Appl. Anim. Behav. Sci. 116, 279-285

- GASKILL, B. N., J. R. LUCAS, E. A. PAJOR u. J. P. GARNER (2011):  
Working with what you've got: Changes in thermal preference and behavior in mice with  
or  
without nesting material.  
J. Therm. Biol. 36, 1193-1199
- GASKILL, B. N., C. J. GORDON, E. A. PAJOR, J. R. LUCAS, J. K. DAVIS u. J. P.  
GARNER (2012):  
Heat or Insulation: Behavioral Titration of Mouse Preference for Warmth or Access to a  
Nest.  
Plos One 7, 1-11
- GASKILL, B. N., C. J. GORDON, E. A. PAJOR, J. R. LUCAS, J. K. DAVIS u. J. P.  
GARNER (2013):  
Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology.  
Physiol. Behav. 110, 87-95
- GASPARETTI, A. L., C. T. DE SOUZA, M. PEREIRA-DA-SILVA, R. L. OLIVEIRA,  
M. J. SAAD, E. M. CARNEIRO u. L. A. VELLOSO (2003):  
Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in  
Rattus norvegicus.  
J. Physiol. 552, 149-162
- GILON, P. u. J. C. HENQUIN (2001):  
Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-  
cell function.  
Endocr. Rev. 22, 565-604
- GIRALT, M. u. F. VILLARROYA (2013):  
White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions.  
Endocrinology. 154(9), 2992-3000
- GORDON, C. J. (1985):  
Relationship between autonomic and behavioral thermoregulation in the mouse.  
Physiol. Behav. 34, 687-690
- GORDON, N. J., D. J. SALMOND u. A. F. M. SMITH (1993):  
A novel approach to nonlinear/non-Gaussian Bayesian state estimation.  
IEE. proceedings-F 140(2), 107-113
- GORDON, C. J., P. BECKER u. J. S. ALI (1998):  
Behavioral thermoregulatory responses of single- and group-housed mice.  
Physiol. Behav. 65, 255-262
- GORDON, C. J. (2004):  
Effect of cage bedding on temperature regulation and metabolism of group-housed female  
mice.  
Comp. Med. 54, 63-68

GOSPODARSKA, E., P. NOWIALIS u. L. P. KOZAK (2015):  
Mitochondrial turnover: a phenotype distinguishing brown adipocytes from interscapular brown adipose tissue and white adipose tissue.  
J. Biol. Chem. 290, 8243-8255

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2011)  
Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th Edition.  
National Academies Press, Washington, S. 48  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54046/>

HARMS, M. u. P. SEALE (2013):  
Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential.  
Nat. Med. 19(10), 1252-1263

HEIKKINEN, S., C. A. ARGMANN, M. CHAMPY u. J. AUWERX (2007):  
Evaluation of Glucose Homeostasis. In: Current protocols in molecular biology.  
John Wiley and Sons, New York 29B.3.1-29B.3.22

HESSE, D., M. DUNN, G. HELDMAIER, M. KLINGENSPOR u. J. ROZMAN (2010):  
Behavioural mechanisms affecting energy regulation in mice prone or resistant to diet-induced obesity.  
Physiol. Behav. 99(3), 370-380

HIMMS-HAGEN, J., J. CUI, E. JR. DANFORTH, D. J. TAATJES, S. S. LANG, B. L. WATERS u. T. H. CLAUS (1994):  
Effect of CI-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats.  
Am. J. Physiol. 266(4 Pt 2), 1371-1382

JASTROCH, M., S. WUERTZ, W. KLOAS u. M. KLINGENSPOR (2005):  
Uncoupling protein 1 in fish uncover an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis.  
Physiol. Genomics 22, 150-156

KAHN, B. B., J. S. FLIER (2000):  
Obesity and insulin resistance.  
J. Clin. Invest. 106(4), 473-481

KAJIMURA, S., P. SEALE u. B. M. SPEGELMAN (2010):  
Transcriptional control of brown fat development.  
Cell Metab. 11(4), 257-262

KARP, C. L. (2012):  
Unstressing intemperate models: how cold stress undermines mouse modeling.  
J. Exp. Med. 209(6), 1069-1074

KIM, J. K., O. GAVRILOVA, Y. CHEN, M. L. REITMAN u. G. I. SHULMAN (2000):  
Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice.  
J. Biol. Chem. 275(12), 8456-8460.

KIRCHNER, J. (2010):

Präferenzen in Gruppen gehaltener Labormäuse für verschiedene Einstreustrukturen undmaterialien.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

KLEIN, M. (2002):

Beeinflussung der Thermoregulation bei den Versuchsnagern Ratte und Maus unter verschiedenen Haltungsbedingungen.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

KÖNIGSHOFF, M. u. T. BRANDENBURGER (2012):

Kurzlehrbuch Biochemie.

Georg Thieme, Verlag, Stuttgart, S. 181

KOKOLUS, K. M., M. L. CAPITANO, C. T. LEE, J. W. ENG, J. D. WAIGHT, B. L.

HYLANDER, S. SEXTON, C. C. HONG, C. J. GORDON, S. I. ABRAMS u. E. A.

REPASKY (2013):

Baseline tumor growth and immune control in laboratory mice are significantly influenced by

subthermoneutral housing temperature.

Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 20176-20181

KURTZ, A., H. C. PAPE, R. KLINKE u. S. SILBERAGL (2009):

Physiologie.

George Thieme, Verlag, Stuttgart, S. 22-23

LABBE, S. M., A. CARON, I. BAKAN, M. LAPLANTE, A. C. CARPENTIER, R. LECOMTE, D. RICHARD (2015):

In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis.

FASEB J. 29(5), 2046-2058

LAEGER, T., T. M. HENAGAN, D. C. ALBARDO, L. M. REDMAN, G. A. BRAY, R.

C. NOLAND, H. MÜNZBERG, S. M. HUTSON, T. W. GETTYS, M. W. SCHWARTZ

u. C. D. MORRISON (2014):

FGF21 is an endocrine signal of protein restriction.

J. Clin. Invest. 124(9), 3913-3922

LAFRANCE, L., G. LAGACÉ u. D. ROUTHIER (1980):

Free fatty acid turnover and oxygen consumption. Effects of noradrenaline in nonfasted and nonanesthetized cold-adapted rats.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 58, 797-804

LIANG, H. u. W. WARD (2006):

PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism.

Adv. Physiol. Educ. 30(4), 145-151

LIN, C. S. u. M. KLINGENBERG (1980):

Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria.

FEBS Lett. 113(2), 299-303

LO, K. A., L. SUN (2013):

Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes.

Biosci. Rep. 33(5), 711-719

LONCAR, D. (1991):

Convertible adipose tissue in mice.

Cell Tissue Res. 266(1), 149-161

LURF, P. (2013):

Vorkommen und Verteilungsunterschiede von braunem Fettgewebe bei Erwachsenen, in Bezug auf kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen sowie bei Krebserkrankungen.

Graz, Med. Univ., Diss.

MAHER, R. L., S. M. BARBASH, D. V. LYNCH, S. J. SWOAP (2015):

Group housing and nest building only slightly ameliorate the cold stress of typical housing in female C57BL/6J mice.

Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 308, R1070-R1079

MANN, A., A. THOMPSON, N. ROBBINS u. A. L. BLOMKALNS (2014):

Localization, identification, and excision of murine adipose depots.

J. Vis. Exp. (94), 52174

MEMARZADEH, F. (1998):

Ventilation desing handbook on animla research facilities using static microisolators.

Volume 1

National Institutes of Health, Bethesda, MD

MORRISON, S. F., K. NAKAMURA u. C. J. MADDEN (2008):

Central control of thermogenesis in mammals.

Exp. Physiol. 93(7), 773-797

MORRISON, S. F. u. K. NAKAMURA (2011):

Central neural pathways for thermoregulation.

Front. Biosci. Landmark Ed. 16, 74-104

MOUNT, L. E. (1968):

The climatic physiology of the pig.

Edward Arnold, London

MÜLLER W. u. S. FRINGS (2009):

Tier- und Humanphysiologie.

4. Auflage

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 255

MUNIYAPPA, R., S. LEE, H. CHEN u. M. J. QUON (2008):

Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 294(1), E15-26

NEDERGAARD, J., T. BENGTSSON u. B. CANNON (2007):

Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 293(2), E444-452

NIKI, T., H. MORI, Y. TAMORI, M. KISHIMOTO-HASHIRAMOTO, H. UENO, S. ARAKI, J. MASUGI, N. SAWANT, H. R. MAJITHIA, N. RAIS, M. HASHIRAMOTO, H. TANIGUCHI u. M. KASUGA (1996):

Human obese gene: molecular screening in Japanese and Asian Indian NIDDM patients associated with obesity.

Diabetes. 45, 675-678.

NONOGAKI, K. (2000):

New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism.

Diabetologia. 43(5), 533-549

OPIE, L. H. u. P. G. WALFISH (1963):

Plasma free fatty acid concentrations in obesity.

N. Engl. J. Med. 268, 757-760

PARK, A., W. K. KIM u. K. H. BAE (2014):

Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells.

World J. Stem Cells. 6(1), 33-42

PORTET, R., M. C. LAURY, R. BERTIN, C. SENAULT, M. T. HLUSZKO, L. CHEVILLARD u. J. LE BLANC (1974):

Hormonal stimulation of substrate utilization in brown adipose tissue of cold acclimated rats.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 147, 807-812

RANDLE, P. J., P. B. GARLAND, C. N. HALES u. E. A. NEWSHOLME (1963):

The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.

Lancet 1(7285), 785-789

REHNER, G. u. H. DANIEL (2010):

Biochemie der Ernährung.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 518-519

ROSELL, M., M. KAFOROU, A. FRONTINI, A. OKOLO, Y. W. CHAN, E. NIKOLOPOULOU, S. MILLERSHIP, M. E. FENECH, D. MACINTYRE, J. O. TURNER, J. D. MOORE, E. BLACKBURN, W. J. GULLICK, S. CINTI, G. MONTANA, M. G. PARKER u. M. CHRISTIAN (2014):

Brown and white adipose tissues: Intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice.

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 306(8), 945-964.

ROSENBAUM, M. D., S. VANDEWOUDE u. T. E. JOHNSON (2009):  
Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment.  
*J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48, 763-773

ROSENWALD, M., A. PERDIKARI, T. RÜLICHE u. C. WOLFRUM (2013):  
Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes.  
*Nat. Cell Biol.* 15(6), 659-667

ROTHER, E., B. F. BELGARDT u. J. C. BRÜNING (2006):  
Neuroendokrine Kontrolle des Energiestoffwechsels.  
*Neuroforum*, B. 12, H. 3, S. 234-239

ROTHWELL, N. J., M. J. STOCK (1989):  
Surgical removal of brown fat results in rapid and complete compensation by other depots. *Am. J. Physiol.* 257(2 Pt 2), 253-258

SANCHEZ-GURMACHES, J., C. M. HUNG, C. A. SPARKS, Y. TANG, H. LI u. D. A. GUERTIN (2012):  
PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors.  
*Cell Metab.* 16(3), 348-362

SCHULZ T. J., P. HUANG, T. L. HUANG, R. XUE, L. E. MCDOUGALL, K. L. TOWNSEND, A. M. CYPESS, Y. MISHINA, E. GUSSONI u. Y. H. TSENG (2013):  
Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat.  
*Nature.* 495(7441), 379-383

SIKARIS, K. A. (2004):  
The clinical biochemistry of obesity.  
*Clin. Biochem. Rev.* 25(3), 165-181

SMITH, O. L., u. S. B. DAVIDSON (1982):  
Shivering thermogenesis and glucose uptake by muscles of normal or diabetic rats.  
*Am. J. Physiol.* 242(1), R109-115

SMITH, E., J. D. STOCKWELL, I. SCHWEITZER, S. H. LANGLEY u. A. L. SMITH (2004):  
Evaluation of cage micro-environment of mice housed on various types of bedding materials.  
*Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 43, 12-17

SOBOTTA, J. u. U. WELSCH (2005):  
Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie.  
2. Auflage.  
Urban & Fischer

SWOAP, S. J., C. LI, J. WESS, A. D. PARSONS, T. D. WILLIAMS u. J. M. OVERTON (2008):

Vagal tone dominates autonomic control of mouse heart rate at thermoneutrality.  
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 294(4), H1581-1588

TROIKE

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adipocyte\\_types.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Adipocyte_types.jpg)

VALLERAND, A. L., J. LUPIEN u. L. J. BUKOWIECKI (1983):

Interactions of cold exposure and starvation on glucose tolerance and insulin response.  
Am. J. Physiol. 245(6), E575-581

VALLERAND, A. L., J. LUPIEN u. L. J. BUKOWIECKI (1986):

Cold exposure reverses the diabetogenic effects of high-fat feeding.  
Diabetes. 35(3), 329-334

VALLERAND, A. L., F. PERUSSE u. L. J. BUKOWIECKI (1987):

Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake.  
Am. J. Physiol. 253, 179-186

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D., J. W. VANHOMMERIG, N. M. SMULDERS, J. M. DROSSAERTS, G. J. KEMERINK, N. D. BOUVY, P. SCHRAUWEN u. G. J. TEULE (2009):

Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.  
N. Engl. J. Med. 360(15), 1500-1508

VESELL, E. S., C. M. LANG, W. J. WHITE, G. T. PASSANANTI, R. N. HILL, T. L. CLEMENS, D. K. LIU u. W.D. JOHNSON (1976):

Environmental and genetic factors affecting the response of laboratory animals to drugs.  
Fed. Proc. 35(5), 1125-1132

VIRTANEN, K. A., M. E. LIDELL, J. ORAVA, M. HEGLIND, R. WESTEREGREN, T. NIEMI, M. TAITTONEN, J. LAINE, N. J. SAVISTO, S. ENERBÄCK u. P. NUUTILA (2009):

Functional brown adipose tissue in healthy adults.  
N. Engl. J. Med. 360(15), 1518-1525

VOGELWEID, C. M., K. A. ZAPIEN, M. J. HONIGFORD, L. LI, H. LI u. H. MARSHALL (2011):

Effects of a 28-day cage-change interval on intracage ammonia levels, nasal histology, and perceived welfare of CD1 mice.  
J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. 50(6), 868-878

WANDREY, F., R. SAVCHER, D. SCHMID, F. SUTER u. F. ZÜLLI (2016):

Eine neue Art des Fettverbrennend gegen Cellulite und Fettpolster.  
Sofw Journal 142

WEISS, J., J. MAES u. K. NEBENDAHL (2003):

Haltung von Haus- und Versuchstieren

In: Haus- und Versuchstierpflege.

2. Auflage

Enke Verlag, Stuttgart, S. 199-201

WU, J., P. BOSTRÖM, L. M. SPARKS, L. YE, J. H. CHOI, A. H. GIANG, M. KHANDEKAR, K. A. VIRTANEN, P. NUUTILA, G. SCHAART, K. HUANG, H. TU, W. D. VAN MARKEN LICHTENBELT, J. HOEKS, S. ENERBÄCK, P. SCHRAUWEN u. B. M. SPIEGELMAN (2012):

Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human.

Cell. 150(2), 366-376

YAHAV, S. (2004):

Ammonia affects performance and thermoregulation of male broiler chickens.

Anim. Res. 53, 289-293

YAMAUCHI, C., S. FUJITA, T. OBARA u. T. UEDA (1983):

Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intakes, and hematology in mice.

Exp. Anim. 32, 1-11

YAMAUCHI, T., J. KAMON, H. WAKI, Y. TERAUCHI, N. KUBOTA, K. HARA, Y. MORI, T. IDE, K. MURAKAMI, N. TSUBOYAMA-KASAOKA, O. EZAKI, Y. AKANUMA, O. GAVRILOVA, C. VINSON, M. L. REITMAN, H. KAGECHIKA, K. SHUDO, M. YODA, Y. NAKANO, K. TOBE, R. NAGAI, S. KIMURA, M. TOMITA, P. FROGUEL u. T. KADOWAKI (2001):

The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity.

Nat. Med. 7, 941-946.

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

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.

Nature. 372(6505), 425-432

## 9 Rechtsgrundlagenverzeichnis

TIERSCHUTZGESETZ (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 141 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist

Stand: Neugefasst durch Bek. v. 18.5.2006 I 1206, 1313;

zuletzt geändert durch Art. 141 G v. 29.3.2017 I 626

<http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/>

RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 276, S.33 vom 20.10.2010

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:de:>

[PDF](#)

European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986):

APPENDIX A OF THE EUROPEAN CONVENTION FOR THE PROTECTION OF VERTEBRATE ANIMALS USED FOR EXPERIMENTAL AND OTHER SCIENTIFIC PURPOSES (ETS NO. 123) Guidelines for accommodation and care of animals (Article 5 of the convention) approved by the multilateral consultation

Strasbourg, 15 June 2006

<https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123>

**10 Abkürzungsverzeichnis**

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriophosphat
BAT	Braunes Fettgewebe
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
cBAT	Constitutive brown adipose tissue
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREBP	cAMP-responsive-element-binding protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FFA	Freie Fettsäuren
FGF21	Fibroblast growth factor 21
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriophosphat
GTT	Glukosetoleranztest
H <sup>+</sup>	Proton
iBAT	Interskapuläres braunes Fettgewebe
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
IRS-2	Insulin receptor substrate 2
Min.	Minute
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Hydrogen
NE	Norepinephrine
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PASW	Predictive Analysis Software
PET	Positronen Emissions Tomographie
PKA	Protein Kinase A
PPARgamma	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRDM16	PR domain containing 16
PGC-1alpha	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
rBAT	Recruitable brown adipose tissue
RNA	Ribonukleinsäure
RPL37a	Ribosomal protein L37a
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standard deviation
SPF	Specific-Pathogen-Free
Std.	Stunde
TG	Triglycerides
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TLE3	Transducin-like enhancer protein 3
UCP1	Entkopplerprotein 1
u.	Und
vs.	Versus
WAT	Weißes Fettgewebe

## 11 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Die Grundprinzipien für die Wärmeproduktion im braunen Fettgewebe .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung von Fettgewebedepots in der Maus.....	10
<b>Abbildung 3:</b> Morphologie von drei verschiedenen Adipozyten.....	12
<b>Abbildung 4:</b> Einstreutiefe in Typ III Makrolon® Käfig mit 0,5 l, 1,5 l, 6 l Einstreu.....	20
<b>Abbildung 5:</b> Studiendesign.....	20
<b>Abbildung 6:</b> UCP1-Expression in iBAT (Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs 30°C-Haltung (0,5 l) .....	30
<b>Abbildung 7:</b> UCP1-Expression in iBAT (Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	30
<b>Abbildung 8:</b> Die Gesamt-BAT-Masse (g, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei in allen Haltungsbedingungen .....	31
<b>Abbildung 9:</b> Die Gesamt-BAT-Masse (g, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	32
<b>Abbildung 10:</b> Freie Fettsäuren vom Endblut (mmol/l, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	33
<b>Abbildung 11:</b> Freie Fettsäuren des Endbluts (mmol/l, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	33
<b>Abbildung 12:</b> Orale Glukosetoleranz (mmol/l, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	34
<b>Abbildung 13:</b> Plasmainsulinspiegel in den ersten fünf Wochen ( $\mu$ g/l, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	35
<b>Abbildung 14:</b> Plasmainsulinspiegel in den letzten fünf Wochen ( $\mu$ g/l, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	36
<b>Abbildung 15:</b> Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen in allen Haltungsbedingungen .....	37
<b>Abbildung 16:</b> Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	37
<b>Abbildung 17:</b> Gewichtsentwicklungen von Woche 1 bis Woche 10 (g, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen.....	38
<b>Abbildung 18:</b> Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	39
<b>Abbildung 19:</b> Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	39
<b>Abbildung 20:</b> Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusemodellen bei allen Haltungsbedingungen .....	41
<b>Abbildung 21:</b> Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	41
<b>Abbildung 22:</b> Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	42
<b>Abbildung 23:</b> Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	42
<b>Abbildung 24:</b> Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 ( $^{\circ}$ C, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	43

<b>Abbildung 25:</b> Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	44
<b>Abbildung 26:</b> Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	45
<b>Abbildung 27:</b> Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	46
<b>Abbildung 28:</b> Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	47
<b>Abbildung 29:</b> Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert ± SD) bei mit Standarddiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	47
<b>Abbildung 30:</b> UCPI-Expression in iBAT (Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	49
<b>Abbildung 31:</b> UCPI-Expression in iBAT (Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	49
<b>Abbildung 32:</b> Die Gesamt-BAT-Masse (g, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	50
<b>Abbildung 33:</b> Die Gesamt-BAT-Masse (g, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	51
<b>Abbildung 34:</b> Freie Fettsäuren gemessen im Tötungsblut (mmol/l, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	52
<b>Abbildung 35:</b> Freie Fettsäuren gemessen im Tötungsblut (mmol/l, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	53
<b>Abbildung 36:</b> Orale Glukosetoleranz (mmol/l, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	54
<b>Abbildung 37:</b> Plasma Insulinspiegel in der ersten 5 Wochen (µg/l, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	55
<b>Abbildung 38:</b> Plasma Insulinspiegel in der letzten 5 Wochen (µg/l, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen und 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	55
<b>Abbildung 39:</b> Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	57
<b>Abbildung 40:</b> Mittelwert der Blutglukose von Woche 1 bis Woche 10 (mg/dl, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	57
<b>Abbildung 41:</b> Gewichtsentwicklungen von Woche 1 bis Woche 10 (g, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen.....	59
<b>Abbildung 42:</b> Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	59
<b>Abbildung 43:</b> Körpergewichte am Versuchsende (g, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	60
<b>Abbildung 44:</b> Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	61
<b>Abbildung 45:</b> Der wöchentliche Futtermittelverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert ± SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	62
<b>Abbildung 46:</b> Der wöchentliche Wasserverbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert ± SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	62

<b>Abbildung 47:</b> Der wöchentliche Wasserbrauch (g/Maus/Woche, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	63
<b>Abbildung 48:</b> Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert $\pm$ SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	64
<b>Abbildung 49:</b> Mittelwert der Körpertemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	64
<b>Abbildung 50:</b> Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert $\pm$ SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	66
<b>Abbildung 51:</b> Mittelwert der Ammoniakmessung von Woche 1 bis Woche 10 (Kategorien, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l) .....	66
<b>Abbildung 52:</b> Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert $\pm$ SD) bei mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei allen Haltungsbedingungen .....	67
<b>Abbildung 53:</b> Mittelwert der Nesttemperatur von Woche 1 bis Woche 10 (°C, Mittelwert $\pm$ SD) in mit Fettdiät gefütterten Mäusen bei 22°C- (0,5 l) vs. 30°C-Haltung (0,5 l).....	68

## 12 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Ansicht der Gruppenverteilung pro Mausstamm .....	21
<b>Tabelle 2:</b> Score sheet für die Ammoniakmessung.....	23
<b>Tabelle 3:</b> Komponenten und Volumina für die cDNA Synthese.....	25
<b>Tabelle 4:</b> Programmeinrichtung der Thermocyclerbedingungen.....	26
<b>Tabelle 5:</b> Komponenten und dazugehörigen Volumina.....	27
<b>Tabelle 6:</b> Programmeinstellung für die PCR im Light Cycler 480.....	28

## 13 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Hackbarth für die Überlassung des Themas und freundliche Unterstützung.

Ausserdem gilt mein Dank Frau Dr. Ping Ping Tsai für Ihre Hilfestellungen, besonders bei den statistischen Auswertungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Jennifer Freymann für ihre Mithilfe.

Für die freundliche Unterstützung bedanke ich mich bei den Sanofi-Laboren in Leitung von Dr. Dieter Schmoll und Dr. Uwe Schwahn.

Im Besonderen gilt mein Dank dem „*Sanofi-In Vivo Pathology Support-Team*“, Petra Scherer, Alexandra Mohr, Anastasia Klinghammer, Andrea Gaab, Barbara Gennat, Hans Ulrich Dreisbach und Stefan Mappes, für die Unterstützung bei der Sektion.

Dem gesamten „*Sanofi-In Vivo Facility Operation-Team*“, besonders Gerhard Lodder und Hans-Peter Jost danke ich für die kollegiale Unterstützung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Team „*Sanofi-In Vivo Research Support*“, Birgit Alka, Diana Ströbel, Rainer Gallus-Müller, Silvia Skrinjaric-Schulz, Ulrike Simon und Ute Obenauer, für die gute und zahlreiche Unterstützung sowie angenehme Zusammenarbeit.

Meiner Chefin Frau Dr. Gabi Itter danke ich außerordentlich für das Ermöglichen dieser Arbeit und für ihre tolle Unterstützung über die Zeit.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Frau, Aysun Kandira, für ihr Verständniss und ihre liebevolle Unterstützung.