

**Phänotypische und stoffwechselphysiologische
Charakterisierung von ENU- (Ethylnitrosoharnstoff-)
induzierten Mausmutanten mit gestörter
Körpergewichtsregulation**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Carola Meyer
aus Osnabrück

Marburg/Lahn, 2005

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 18.04.05 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Heldmaier
Zweitgutachter: PD Dr. Martin Klingenspor
Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.05

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON STÖRUNGEN IM ENERGIEHAUSHALT	1
1.2	KÖRPERGRÖßENABHÄNGIGKEIT PHYSIOLOGISCHER VORGÄNGE.....	2
1.3	DAS MUTAGENESEPROGRAMM DER GSF.....	4
1.4	DIE MAUSMUTANTE SMA1	7
1.4.1	<i>Art und Lage der SMA1-Mutation</i>	7
1.5	DIE MAUSMUTANTE DAVID	8
1.6	ZIELE DER ARBEIT	9
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	ZUCHT UND HALTUNG (SMA1 UND DAVID).....	11
2.1.1	<i>Haltungsbedingungen</i>	11
2.1.2	<i>Zucht</i>	11
2.1.3	<i>Zuchterfolg</i>	12
2.2	PHÄNOTYPISIERUNG (SMA1 UND DAVID).....	12
2.3	GENOTYPISIERUNG (SMA1).....	14
2.4	KÖRPERMASSE UND WACHSTUMSRATEN (SMA1 UND DAVID)	16
2.5	REPRODUKTIONSSTATUS BEI JUNGEN WEIBCHEN (SMA1)	16
2.6	KÖRPERMAßE (SMA1 UND DAVID)	16
2.7	TIERPRÄPARATIONEN (SMA1 UND DAVID)	17
2.7.1	<i>Organe</i>	17
2.7.2	<i>Bestimmung von GH, IGF-1 und Leptin im Blut (SMA1)</i>	18
2.7.3	<i>Nachweis von GH in der Hypophyse (SMA1)</i>	18
2.8	KÖRPERZUSAMMENSETZUNG (SMA1 UND DAVID).....	19
2.8.1	<i>Präparationen</i>	19
2.8.2	<i>Bestimmung des Wassergehalts</i>	20
2.8.3	<i>Körperfettextraktion mittels Soxhlet-Destillation</i>	20
2.9	FUTTERVERBRAUCHSMESSUNGEN (SMA1 UND DAVID)	20
2.10	MESSUNG DES ENERGIEVERBRAUCHS MITTELS INDIREKTER KALORIMETRIE (SMA1 UND DAVID)..	21
2.10.1	<i>Thermoneutralzone und Basalstoffwechsel</i>	22
2.10.1.1	<i>Versuchsablauf und Bestimmung von Ruhe- und Basalstoffwechselraten</i>	23
2.10.2	<i>Ermittlung der Unteren Kritischen Temperatur (T_{lc}) und der Theoretischen Körpertemperatur (T_{bth})</i>	26
2.11	REGISTRIERUNG DER KÖRPERTEMPERATUR (SMA1 UND DAVID).....	26
2.11.1	<i>Vorbereitung und Implantation der Sender</i>	27
2.11.2	<i>Auswertung</i>	28
2.12	ERSTELLUNG EINER 24 H-ENERGIEBILANZ (SMA1)	29
2.12.1	<i>Experimentelles Setup</i>	29

2.12.2	<i>Ermittlung des DEE (daily energy expenditure, täglicher Energieverbrauch)</i>	30
2.12.3	<i>Ermittlung des RMR (resting metabolic rate, Ruhestoffwechselrate) und des VO_2max_{DEE} (maximaler Sauerstoffverbrauch in 24 h)</i>	30
2.12.4	<i>Bestimmung des Energiegehalts im Futter und Kot mittels Bombenkalorimetrie</i>	30
2.12.5	<i>Assimilierte Energie, Assimilationskoeffizient und metabolisierte Energie</i>	31
2.13	ERFASSUNG DER TÄGLICHEN SPONTANAKTIVITÄT (SMA1)	31
2.14	UCP-1 (UNCOUPLING PROTEIN-1) -EXPRESSION IM BRAUNEN FETT (SMA1)	32
2.14.1	<i>Quantitativer Vergleich der mRNA-Expression von UCP-1 im interscapularen braunen Fett (iBAT)</i>	32
2.14.2	<i>UCP-1-Proteinexpression im interscapularen braunen Fett (iBAT)</i>	33
2.15	STATISTISCHE VERFAHREN	34
3	ERGEBNISSE: SMA1	36
3.1	ZUCHTERFOLG	36
3.2	HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER GENOTYPEN	37
3.3	SEXUELLE REIFUNG DER WEIBCHEN	38
3.4	KÖRPERMASSE UND WACHSTUMSRATEN	39
3.5	KÖRPERLÄNGEN	46
3.6	ORGANGEWICHTE	48
3.7	KÖRPERZUSAMMENSETZUNG UND LEPTIN-SPIEGEL.....	51
3.7.1	<i>Fettgehalt, FFDM und Wassergehalt</i>	51
3.7.2	<i>Prozentualer Fettgehalt in-vivo und fettfreie Masse (FFM)</i>	53
3.7.3	<i>Leptin-Spiegel</i>	54
3.8	FETTVERTEILUNG	55
3.9	FUTTERVERBRAUCH.....	59
3.10	RUHESTOFFWECHSELRATEN	60
3.10.1	<i>Basal und Ruhestoffwechsel</i>	60
3.10.2	<i>Schätzung der Unteren kritischen Temperatur (T_{lc}) und der Theoretischen Körpertemperatur (T_{bth})</i>	62
3.10.2.1	<i>Untere Kritische Temperatur (T_{lc})</i>	62
3.10.2.2	<i>Theoretische Körpertemperatur (T_{bth})</i>	62
3.10.3	<i>Respiratorischer Quotient (RQ)</i>	63
3.10.4	<i>Körpertemperatur</i>	64
3.10.5	<i>Wärmedurchgangszahl</i>	64
3.10.6	<i>Allometrie des Sauerstoffverbrauchs</i>	66
3.11	TAGESGANG DER KÖRPERTEMPERATUR	70
3.12	TÄGLICHER ENERGIEUMSATZ	72
3.12.1	<i>Täglicher Energieverbrauch (DEE) und RQ-Verlauf</i>	72
3.12.2	<i>Maximaler täglicher Sauerstoffverbrauch (VO_2max_{DEE})</i>	75
3.12.3	<i>Energieaufnahme</i>	76
3.12.4	<i>Energiebilanz</i>	76

3.13	TÄGLICHE SPONTANAKTIVITÄT	78
3.14	UCP-1 EXPRESSION IM INTERSCAPULAREN BRAUNEN FETT (IBAT)	79
3.15	MAKROSKOPIE DER HYPOPHYSEN UND HYPOPHYSÄRER GH-GEHALT	80
3.16	GH, IGF-1 UND GHRELIN IM BLUT	83
4	ERGEBNISSE: DAVID	85
4.1	KÖRPERMASSEN, KÖRPERLÄNGEN, WACHSTUMSRATEN UND ZUCHTERFOLG	85
4.2	KÖRPERZUSAMMENSETZUNG	88
4.3	FUTTERVERBRAUCH	89
4.4	RUHESTOFFWECHSELRATEN UND KÖRPERTEMPERATUR	90
4.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AN DER MAUSMUTANTE DAVID	93
5	DISKUSSION	94
5.1	DISKUSSION I: SMA1	94
5.1.1	<i>Wachstumshormon: Stand der Forschung</i>	94
5.1.2	<i>Vom Genotyp zum Phänotyp: SMA1</i>	97
5.1.3	<i>Warum ist die SMA1-Maus klein?</i>	98
5.1.3.1	SMA1-GH - ein dominant-negatives Protein?	105
5.1.4	<i>Wie wird die SMA1-Maus fett? Eine in-vivo-Analyse</i>	107
5.1.4.1	BMR und Körpertemperatur	108
5.1.4.2	UCP-1-Expression im interscapularen braunen Fett (iBAT)	111
5.1.4.3	24 h-Energiebilanz	112
5.1.4.4	Leptin-Spiegel und Hyperghrelinämie	115
5.1.4.5	Fazit zur Ätiologie der Adipositas in-vivo	117
5.2	DISKUSSION II: DAVID	118
5.2.1	<i>Vom Phänotyp zum Genotyp: David</i>	118
5.3	DISKUSSION III: METHODISCHE ASPEKTE DER STOFFWECHSELPHYSIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG	119
5.3.1	<i>Bestimmung des RMR</i>	119
5.3.2	<i>Die Wahl des „richtigen“ Exponenten für allometrische Beziehungen</i>	120
5.3.2.1	Beispiel 1: Der BMR/RMR von SMA1-Mäusen	121
5.3.2.2	Beispiel 2: Der Fettgehalt von David-Mäusen	122
5.3.2.3	Die Wahl der „richtigen“ Bezugsgröße für den Vergleich von in-vivo-Stoffwechselraten	123
5.3.3	<i>Empfehlungen für die stoffwechselphysiologische in-vivo-Charakterisierung von Mausmutanten</i>	124
5.4	AUSBLICK	125
6	ZUSAMMENFASSUNG	127
7	LITERATURVERZEICHNIS	130
8	ANHANG	

Abkürzungsverzeichnis

95%CI	95%-Konfidenzintervall
AS	Aminosäure
AT	<i>Adipose tissue</i> - Fettgewebe
BAT	<i>Brown adipose tissue</i> - Braunes Fettgewebe
C	<i>Thermal conductance</i> - Wärmedurchgangszahl
ddH ₂ O	H ₂ O <i>bidest</i>
DEE	<i>Daily energy expenditure</i> - täglicher Energieverbrauch
ENU	<i>Ethylnitrosourea</i> - Ethylnitrosoharnstoff
FFDM	<i>Fat free dry mass</i> - fettfreie Trockenmasse
FFM	<i>Fat free mass</i> - fettfreie Masse
gBM ^{1.0}	Gramm Körpermasse ^{1.0}
GH	<i>Growth hormone</i> - Wachstumshormon
GH-R/BP-KO	<i>Growth hormone receptor/binding protein-knockout</i>
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
KO	<i>Knock-out</i>
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
MR	<i>Metabolic rate</i> - Stoffwechselrate
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
REE	<i>Resting energy expenditure</i> - Ruheenergieverbrauch
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation</i> - Radio-Immuno-Präzipitationsassay
RQ	Respiratorischer Quotient
RT	Raumtemperatur
T _a	<i>Ambient temperature</i> - Umgebungstemperatur
T _b	<i>Body temperature</i> - Körpertemperatur
T _{bth}	Theoretische Körpertemperatur
T _{lc}	<i>Lower critical temperature</i> - Untere Kritische Temperatur
TNZ	Thermoneutralzone
UCP-1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VO ₂	Sauerstoffverbrauch
VO ₂ max _{DEE}	Maximaler Sauerstoffverbrauch in 24-h (DEE)
WAT	<i>White adipose tissue</i> - Weißes Fettgewebe
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Ein Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe führt zu einer unausgeglichener Energiebilanz, die sich bei Mensch und Tier als Adipositas (Fettsucht) oder Anorexie (Magersucht) ausdrückt (Weigle 1994; Zigman und Elmquist 2003). Nach Schätzungen ist die Entstehung von Adipositas beim Menschen zwischen 40% und 70% erblich bedingt (O'Rahilly et al. 2003) und eine Reihe von genetisch veränderten Mausmodellen hat bereits dazu beigetragen, an der Regulation des Körpergewichts beteiligte Gene, Hormone und Signalwege zu identifizieren (Übersicht bei Snyder et al. 2004).

Bei der Gen-Funktionsanalyse in der Maus handelte es sich noch bis Mitte der 80iger Jahre des letzten Jahrhunderts ausschließlich um Phänotyp-basierende Ansätze (*forward genetics*): Ein neuer erblicher Phänotyp wurde zufällig innerhalb einer Forschungspopulation entdeckt oder durch Strahlungsmutagenese erzeugt, aber Art und Lage der dem Phänotyp zugrunde liegenden genetischen Änderung(en) waren zunächst nicht bekannt. Zu den wichtigsten Vertretern natürlicher Mausmutanten mit Störungen in der Körpergewichtsregulation zählen die extrem übergewichtigen *ob/ob*- und *db/db*-Mäuse, die Leptin-defizient sind bzw. einen in seiner Funktion eingeschränkten Rezeptor exprimieren, sowie die fettleibige Agouti- (*A^y*-) Mausmutante, die das normalerweise in der Haut produzierte Agouti-Protein ektopisch exprimiert (Coleman 1978; Bultman et al. 1992; Zhang et al. 1994; Tartaglia et al. 1995; Kompendium natürlicher Mausmutanten siehe Lyon und Searle 1989).

Mit Verfügbarkeit moderner molekulargenetischer Methoden wie *knock-in*, *knock-out* (KO), *gene-trap* oder *cre-lox* wurde der Phänotyp-basierende Ansatz heute weitestgehend ersetzt durch den Genotyp-basierenden Ansatz zur Gen-Funktionsanalyse (*reverse genetics*). Dieser erlaubt eine Hypothesen-geleitete Herangehensweise, hat also den Vorteil gezielter Manipulationsmöglichkeiten im Genom. Durch z.B. einen KO des MC-4-R (Melanokortin-4-Rezeptors) konnte der oben erwähnte, fettleibige Phänotyp der natürlichen Agouti-Mausmutante rekapituliert und damit die zentrale Rolle dieses Rezeptors bzw. Signalwegs bei der Regulation der Nahrungsaufnahme bestätigt werden (Huszar et al. 1997).

1.1 Phänotypische Charakterisierung von Störungen im Energiehaushalt

Sowohl der Genotyp-basierende als auch der Phänotyp-basierende Ansatz zur Gen-Funktionsanalyse erfordern die morphologische und physiologische Charakterisierung

des betroffenen Phänotyps *in-vivo* (Barsh und Schwartz 2002). Metabolische Analysen stehen zumeist in Zusammenhang mit der Quantifizierung von Energieaufnahme und -abgabe (**Abb. 1**). In der Regel werden hierbei ausgewachsene, nicht-reproduzierende Individuen auf Abweichungen in der Körperzusammensetzung, der Nahrungsaufnahme bzw. der Assimilation sowie der Wärmeproduktion und der Körpertemperatur untersucht. Unter dem Begriff Wärmeproduktion wird dabei die Wärmeabgabe des endothermen Organismus aus dem Erhaltungsstoffwechsel, d.h. dem Basal- bzw. Ruhestoffwechsel, der Thermoregulation (Energie zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur gegenüber der Außentemperatur), dem Aktivitätsstoffwechsel und der spezifisch-dynamischen Wirkung des Futters (Verdauungswärme) verstanden (Übersicht bei Heldmaier und Neuweiler 2004). Ein Ungleichgewicht im täglichen Energiebudget kann dabei auf Seiten der Energieaufnahme als auch der Energieabgabe entstehen. So ist z.B. der fettleibige Phänotyp bei *ob/ob*-Mäusen primär auf Hyperphagie zurückzuführen, der mit einer erniedrigten Körpertemperatur einhergeht (vgl. z.B. Pelleymounter et al. 1995).

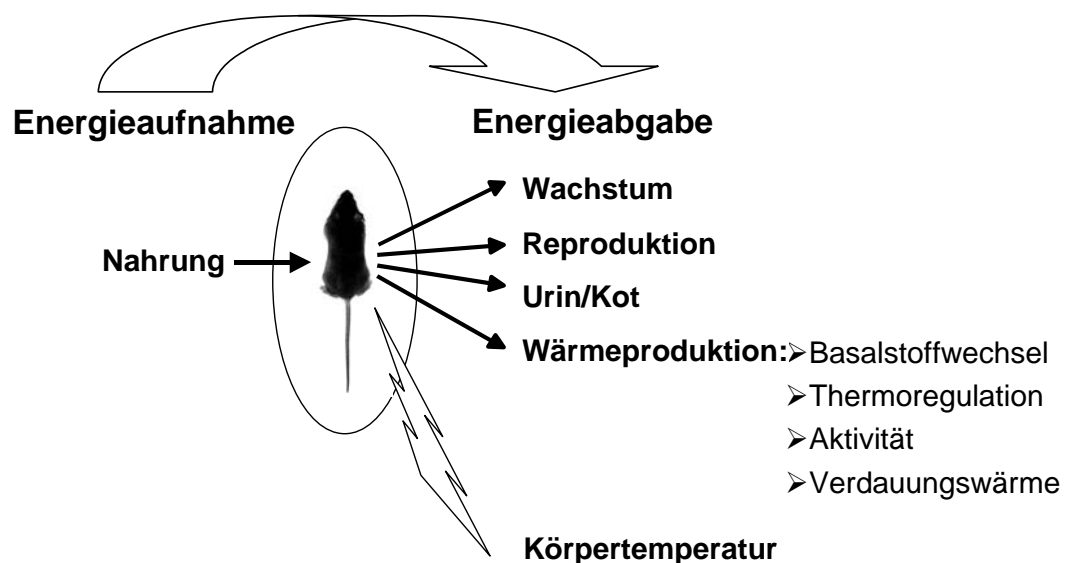


Abbildung 1: Stellgrößen des Energiehaushalts im Säugetier.

1.2 Körpergrößenabhängigkeit physiologischer Vorgänge

Ein grundlegendes Hindernis für den direkten Vergleich verschieden schwerer Gruppen (z.B. fettleibiger Phänotyp versus Wildtyp, WT) ist die Körpergrößen- bzw. Körpergewichts-Abhängigkeit physiologischer Vorgänge. Größere und schwerere Individuen haben in der Regel auch höhere Stoffwechselraten oder eine höhere Nahrungsaufnahme als kleinere, leichtere Individuen (**Abb. 2**). Um die Abhängigkeit von der Körpermasse zu berücksichtigen, erfolgt der physiologische Vergleich zwischen verschieden schweren Gruppen in der Regel auf Basis gewichtsspezifischer Raten, d.h.

z.B. der Stoffwechselrate oder der Menge aufgenommener Nahrung pro Gramm Körpermasse ($BM^{1.0}$), ohne dass dieses Verfahren weiter in Frage gestellt wird (siehe z.B. Erickson et al. 1996 und Himms-Hagen 1997).

Fettleibige *ob/ob*-Mäuse haben also pro Tier zwar höhere Stoffwechselraten als WT-Mäuse, pro Gramm Körpermasse ($gBM^{1.0}$) ausgedrückt aber ist ihre Stoffwechselrate geringer. Es wird daher angenommen, dass die Mutation im *ob*-Gen eine Erniedrigung im Stoffwechsel zur Folge hat (Pelleymounter et al. 1995). Trägt aber ein verringerter gewichtsspezifischer Basalstoffwechsel tatsächlich zur Ausprägung eines fettleibigen Phänotyps bei oder ist er Folge der erhöhten Körpermasse? Ist darüber hinaus die isometrische Annahme ($MR=a*BM^{1.0}$) für die Beziehung zwischen Körpermasse (BM) und Stoffwechselrate (MR) bei *ob/ob*-Mäusen gerechtfertigt?

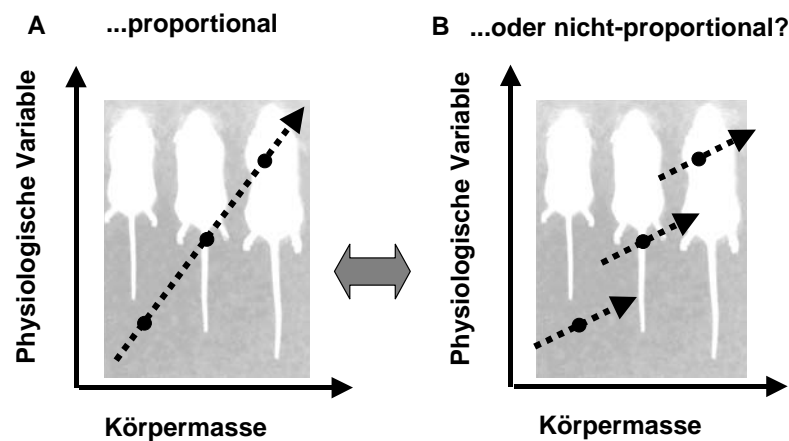


Abbildung 2: Hypothetische Mittelwerte (Kreise) einer physiologischen Variable von 3 Vergleichsgruppen: Im Mittel haben leichtere (kleinere) Tiere niedrigere physiologische Werte als größere Tiere. Kenntnis über die Zusammenhänge zwischen Körpermasse und Zielgröße (Pfeile) ermöglichen die Unterscheidung zwischen (A) proportionaler oder (B) nicht-proportionaler Änderung der Physiologie in Relation zur Körpermasse.

Verschiedene Autoren haben bereits darauf hingewiesen, dass eine universelle „Standardisierung“ z.B. pro Gramm Körpermasse nicht jeden Phänotyp mathematisch richtig quantifiziert (siehe z.B. Poehlman und Toth 1995; Packard und Bode 1999; Braeckman et al. 2002). Sie schlagen eine alternative Herangehensweise vor, welche zunächst die intraspezifischen bzw. intragenotypischen Beziehungen zwischen Körpermasse und physiologischer Kenngröße berücksichtigt (Abb. 2). Kenntnis über die zugrundeliegenden Abhängigkeiten ermöglicht dann die Unterscheidung zwischen proportionaler und nicht-proportionaler Änderung in der Physiologie, unabhängig von der Körpermasse. Als statistisches Verfahren der Wahl wird die *Analysis of Covariance* (ANCOVA) empfohlen (Packard und Bode 1999). Bei der stoffwechselphysiologischen Analyse von Mausmutanten oder von transgenen Mäusen mit gestörter

Körpergewichtsregulation wurde die ANCOVA bzw. der Regressionsansatz als Auswertungsstrategie aber bislang nur selten angewandt.

Interspezifisch stehen die Änderungen in der Physiologie/Biologie zumeist nicht in einem konstantem Verhältnis zu Änderungen in der Größe/Masse. Dieser Sachverhalt wird auch unter dem Fachbegriff „Allometrie“ zusammengefasst (*allos [gr.] = verschieden*) (Schmidt-Nielsen 1985). Allometrische Beziehungen werden im Allgemeinen durch Exponentialfunktionen der Form $y=a \cdot BM^b$ beschrieben, wobei y = (physiologische) Zielgröße, BM = Körpermasse oder Körpergewicht, b = Massenexponent und a = Massenkoeffizient. Durch log-log Transformationen lassen sich exponentielle Beziehungen in linearisierter Form darstellen ($\log y = \log a + b \cdot \log BM$) und nachfolgend mittels Regressions- und/oder Residuenanalysen im Hinblick auf mögliche Körpermassen-unabhängige Einflussgrößen bzw. Kofaktoren analysieren. Der Massenexponent [b] entspricht dann der Steigung der linearisierten Exponentialbeziehung und der Massenkoeffizient [a] dem Schnittpunkt (der Geraden) mit der y -Achse. So korrelieren interspezifisch bei Säugetieren (logarithmiert) Skelett- und Körpermasse mit $b = 1.08$, Herzfrequenz und Körpermasse mit $b = -0.25$ oder Basalstoffwechsel und Körpermasse mit Steigungen zwischen 0.66 und 0.75 (Rubner 1883; Kleiber 1961; Gillooly et al. 2001; Übersicht bei Lindstedt und Schaeffer 2002). Bei der isometrischen Beziehung handelt es sich um den Sonderfall der allometrischen Beziehung, da $b = 1.0$ ist.

1.3 Das Mutageneseprogramm der GSF

Am Institut für Experimentelle Genetik der GSF (GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, vormalig Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg), wurde ein im Rahmen des Deutschen Humanen Genom Projekts (DHGP, 1996-2004) finanziertes, großangelegtes Mutageneseprogramm in der Maus etabliert. Ziel dieses (des auch nach Ende der DHGPs weiter fortgesetzten) Programms ist die effiziente Erzeugung von Mausmutanten, die als Tiermodelle für die Erforschung genetisch bedingter Erkrankungen des Menschen, u. a. auch der Adipositas oder Anorexie dienen können (<http://www.gsf.de/ieg/groups/enu-mouse.html>; Hrabe de Angelis und Balling 1998). Zur Induktion von Mutationen werden männliche Mäuse (*Mus musculus domesticus*) vom Stamm C3HeB/FeJ mit dem „Supermutagen“ Ethylnitrosoharnstoff (*engl. ethylnitrosourea*, ENU, **Abb. 3**) behandelt (Russell et al. 1979; Russell et al. 1982).

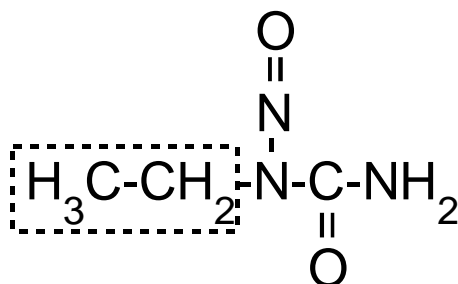


Abbildung 3: Strukturformel von Ethylnitrosoharnstoff (ENU). Die übertragbare Ethylgruppe ist hervorgehoben.

ENU wird den Mäusen im Alter von 10-14 Wochen über einen Zeitraum von 1-3 Wochen in einer wöchentlichen Dosis von 90 bzw. 160 mg*kg⁻¹ Körpergewicht subkutan injiziert (Hrabe de Angelis et al. 2000). Die mutagene Wirkung von ENU beruht auf der chemischen Eigenschaft, seine Ethylgruppe irreversibel auf Sauerstoff- und Stickstoffatome der DNA-Basen übertragen zu können (**Abb. 4**). Während der Replikation der DNA kann dies zu Fehlpaarungen im komplementären Strang führen (Noveroske et al. 2000). ENU verursacht daher hauptsächlich Punktmutationen, insbesondere A→T-Basenpaar-Austausche, aber auch kleine intragenische Läsionen (Rinchik 1991). Über die prämeiotischen Spermatogonien, die sich durch eine besonders hohe Mutationsrate auszeichnen, können diese Punktmutationen in das Genom der Spermien eingeführt werden.

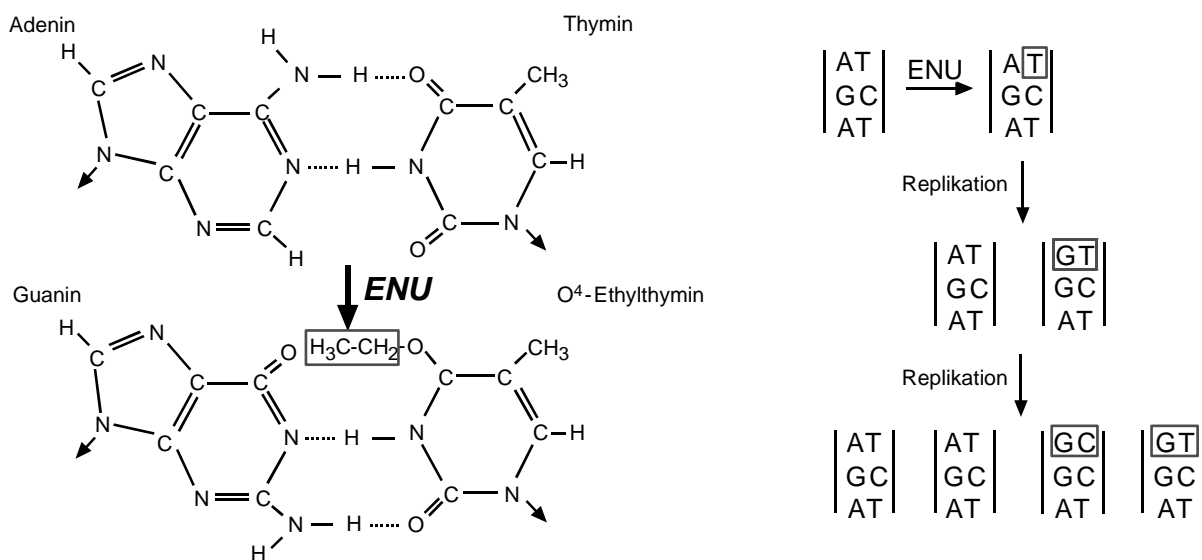


Abbildung 4: Die Wirkung von Ethylnitrosoharnstoff am Beispiel einer O⁴-Alkylierung von Thymin (verändert nach Noveroske et al. 2000).

Werden mit ENU behandelte Männchen mit unbehandelten Weibchen verpaart, lassen sich unter den Nachkommen der G1- im Fall dominanter Penetranz bzw. der G3- Generation bei rezessiver Penetranz phänotypisch von der „Norm“ abweichende Individuen identifizieren. Nach Hitotsumachi et al. (1985) wird heute in einem optimierten ENU-Regime, d.h. abhängig von der Dosis und der verwendeten Mauslinie (Weber et al. 2000), im haploiden Genom eine Mutationsrate von 1 pro 1000 bp angenommen. Bei einer geschätzten Zahl von 25000-30000 Genen bedeutet dies, dass ein mit ENU behandeltes Männchen pro haploidem Genom etwa 25-30 funktionell relevante, rezessive Mutationen vererben kann, die in einem durchschnittlichen Abstand von 42-48 cM liegen (Gunter und Dhand 2002; Waterston et al. 2002). Die Häufigkeit, mit der dominante Mutationen induziert werden, wird als deutlich niedriger eingeschätzt (Favor 1983). Erbliche, ENU-induzierte Phänotypen in der Maus sind also mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auf eine einzige (Punkt-) Mutation im Genom zurückzuführen. Art und Lage dieser ENU-induzierten Mutationen sind zunächst nicht bekannt und müssen durch nachfolgende Kartierungen identifiziert werden. Die ENU-Mutagenese stellt damit einen großangelegten Phänotyp-basierenden Ansatz zur Gen-Funktionsanalyse dar (Brown und Peters 1996).

Bei der GSF werden die Nachkommen von ENU-behandelten Tieren in vier Untersuchungseinheiten (*Screening Units*) nach standardisierten Verfahren auf einen festgelegten Katalog phänotypischer Abweichungen hin untersucht. Diese betreffen Körperbau und Körpergewicht (*Dysmorphology Screen*), Verhalten (*Behavioral Screen*), immunologische (*Immunological Screen*) sowie klinisch-chemische (*Clinical-Chemical Screen*) Parameter (Hrabe de Angelis et al. 2000). Auffällige Mäuse mit erblichem Phänotyp werden zunächst als neue „Linie“ gezüchtet. In Eigenleistung als auch in Kooperation mit anderen wissenschaftlichen Institutionen werden diese Mauslinien weitgehender phänotypisiert und die verantwortliche Mutation kartiert (siehe z.B. Graw et al. 1999; Soewarto et al. 2000; Alessandrini et al. 2001; Vreugde et al. 2002; Meyer et al. 2004). Zum Stand Mai 2004 waren mehr als 34000 Individuen der G1- und 6500 der G3- Generation standardisiert untersucht worden. Insgesamt 412 dominante und 133 rezessive Phänotypen konnten dabei identifiziert werden (H. Fuchs, GSF, *pers. Mitt.*).

Für die Regulation des Körpergewichts interessante Phänotypen werden im Dysmorphologie-Screen anhand ihres veränderten Gewichts im Vergleich zur WT-Population (C3HeB/FeJ) der GSF identifiziert. Inwieweit ein unter- bzw. übergewichtiger Phänotyp dann tatsächlich einen Adipositas- oder Anorexie-relevanten Gendefekt trägt, muss nachfolgend geklärt werden. Hierbei sind neben der Kartierung des betroffenen Gens metabolische Analysen des Phänotyps notwendig.

1.4 Die Mausmutante SMA1

Im Dezember 1997 wurde im Rahmen des Dysmorphologie-Screens der GSF (Fuchs et al. 2000) ein männliches Tier der G1-Generation identifiziert, das sich durch ein auffällig niedriges Körpergewicht im Vergleich zum WT auszeichnete. Nachfolgende Verpaarungen dieses Männchens mit WT-Weibchen bestätigten die (dominante) Erbllichkeit des Phänotyps. Da die Maus primär leichter aufgrund ihrer geringeren Körpergröße zu sein schien, wurde der Phänotyp mit SMA1 (von engl. *small*, klein) bezeichnet. Wie sich erst später im Rahmen dieser Dissertation herausstellen sollte, tritt bei der Kreuzung von zwei zwergwüchsigen (heterozygoten) SMA1-Mäusen ein dritter SMA1-Phänotyp auf (homozygot SMA1), dessen Körpergewicht und -größe noch stärker verringert ist (**Abb. 5**).

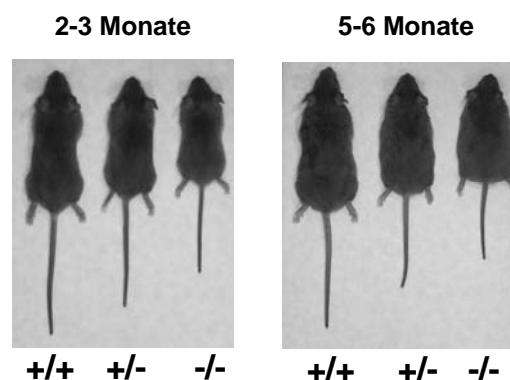


Abbildung 5: WT- (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) SMA1-Mäuse gleichen Geschlechts im Alter von 2-3 und 5-6 Monaten.

1.4.1 Art und Lage der SMA1-Mutation

Im Verlauf des Jahres 2000 gelang es Wissenschaftlern der Firma Ingenium Pharmaceuticals¹, die *Sma1*-Mutation zu kartieren. Der Phänotyp korreliert mit einer a→g-Transition (a3144→g, GenBank Nr. Z46663) im Wachstumshormon- (GH-) Gen auf dem Chromosom 11 (**Abb. 6**). Die punktuelle Änderung der DNA-Sequenz im Exon 5 führt auf Proteinebene zu einem Asp→Gly (D→G) Austausch in Position 193 des Pro-Hormons bzw. Position 167 des aktiven Hormons, es handelt sich also um eine *Missense*-Mutation. Wie ein Vergleich der Aminosäuresequenz der Maus mit homologen Abschnitten aus dem GH-Protein anderer Wirbeltiere zeigt (**Abb. 7**), liegt die betroffene Position in einem sehr konservierten Bereich im C-terminalen Ende des Moleküls.

¹ Seit Ende des Jahres 1999 ist die SMA1-Mauslinie Eigentum der Firma Ingenium Pharmaceuticals AG (<http://www.ingenium-ag.com>, Martinsried), Patent Nr. DE 100 16 083 A1.

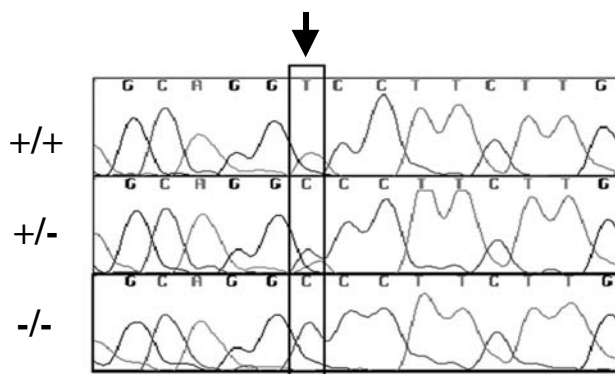


Abbildung 6: Sequenzanalyse im Exon 5 des murinen (m)GH-Gens. Abgebildet ist ein Ausschnitt aus dem nicht-codierenden DNA-Strang von 3' nach 5'. Bei Trägern der *Sma1*-Mutation ist in Position 3144 im Exon 5 (GenBank Nr. Z46663) ein a→g (5'→3') Basenpaaraustausch zu finden. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Ingenium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt.

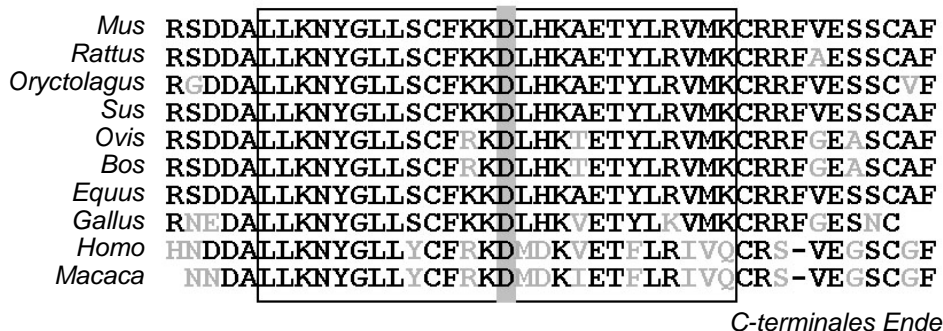
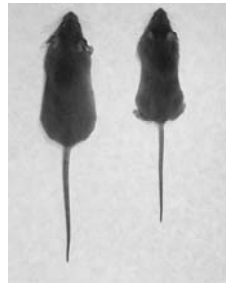


Abbildung 7: Vergleich der GH-Aminosäuresequenz bei verschiedenen Wirbeltiergattungen. Der schwarze Kasten markiert die Lage der 4. Helixdomäne im C-terminalen Ende des Proteins. Die bei SMA1-Mäusen mutierte Aminosäure (D167 = Asp167) ist grau unterlegt. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Ingenium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt.

1.5 Die Mausmutante David

Die ENU-induzierte Mausmutante „David“ wurde direkt von der Firma Ingenium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt. Auch David-Mäuse zeichnen sich durch Zwergwüchsigkeit und ein damit verringertes Körpergewicht aus (**Abb. 8**); dabei handelt es sich um ein rezessives Merkmal. Die Lage der Mutation wurde bislang auf das Chromosom 4 eingegrenzt, eine weitere Kartierung des Gendefekts erfolgte aber bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht.



WT David

Abbildung 8: WT- und (rezessiver) David-Phänotyp im Alter von 12 Wochen.

In ersten, bei Ingenium durchgeführten *in-vivo*-Fettmessungen mit der DEXA-Methode (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*, eine nicht-invasive Messung des Körperfettgehalts) hatte sich gezeigt, dass der prozentuale Anteil im Körperfett des David-Phänotyps deutlich niedriger lag als der gleichaltriger WT-Mäuse (Johannes Große, Ingenium, *pers. Mitt.*). Die David-Mausmutante wurde daher seitens der Firma Ingenium als potentielles Tiermodell für Anorexie erachtet und sollte in dieser Arbeit weiterführend stoffwechselphysiologisch untersucht werden.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Durchführung eines phänotypischen und stoffwechselphysiologischen Charakterisierungsprogramms für ENU-induzierte Mausmutanten mit gestörter Körpergewichtsregulation am Beispiel der SMA1-Mauslinie.

Da es sich bei SMA1- wie bei fast allen ENU-Mausmutanten um neue, vormals unbeschriebene und unveröffentlichte Genotypen und Phänotypen handelt, erfolgt zunächst eine allgemeine Beschreibung des Wachstums, des Reproduktionserfolgs, der Erbllichkeit und Morphologie bzw. Körperzusammensetzung der SMA1-Phänotypen. Vor Beginn dieser Arbeit lagen mit Ausnahme der Gewichtsdaten aus der SMA1-Zucht der GSF ($n=12$ Individuen mit erblichem untergewichtigem Phänotyp) keine weiteren Informationen zur Mauslinie oder zur Lage der Mutation vor.

Der weitere Teil der Arbeit widmet sich der stoffwechselphysiologischen Charakterisierung von SMA1-Mäusen. Ein wesentlicher Aspekt bestand hierbei in der Frage, wie sich bei der Untersuchung unterschiedlich großer bzw. schwerer Individuen die Körpergrößenabhängigkeit physiologischer und morphologischer Zusammenhänge (Allometrie) sinnvoll berücksichtigen lässt. Sind SMA1-Mäuse also „nur“ kleiner oder lassen sich weitere (stoffwechsel-) physiologische Eigenschaften identifizieren, die mit dem Genotyp/Phänotyp einhergehen?

Mit bekannt werden von Art und Lage der SMA1-Mutation erfolgten in Zusammenarbeit mit Ingenium Pharmaceuticals zusätzliche GH-assoziierte Untersuchungen an diesen Mäusen: Welche Erklärungshypothesen gibt es für die zwergwüchsigen SMA1-Phänotypen?

Teile des für SMA1-Mäuse entwickelten metabolischen Charakterisierungsprogramms wurden dann bei der Untersuchung von David-Mäusen eingesetzt: Worauf gründet sich die bei David postulierte Anorexie und welche Rückschlüsse auf das betroffene Gen lassen sich treffen?

In Kooperation mit der GSF und der Firma Ingenium Pharmaceuticals sollten die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen methodischen Erkenntnisse beitragen zur Optimierung der stoffwechselphysiologischen Identifikation und Phänotypisierung künftiger (ENU-induzierter) Mausmutanten, aber auch transgener Mäuse mit gestörter Körpergewichtsregulation.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zucht und Haltung (SMA1 und David)

2.1.1 *Haltungsbedingungen*

Die Mäuse wurden bei einer Temperatur von $23\pm 2^\circ\text{C}$ im klimatisierten Tierhaus des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität Marburg gehalten. Als Nahrung erhielten sie Altromin 1314 Standard-Zuchtdiät für Ratten/Mäuse (Lage, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum*. Die tägliche Photoperiode im Haltungsraum lag bei 12 h Licht : 12 h Dunkelheit (Licht an: 6:00 MEZ), die Luftfeuchtigkeit betrug ca. 40%-50%. Haltungs- und Zuchtkäfige (Typ Makrolon-II bzw. -III) wurden mit Sägespan-Einstreu und einer geringen Menge Material zum Nestbau (Zellstoff) ausgestattet und zweiwöchentlich gesäubert. Während Nahrung, Temperatur und Licht den Verhältnissen bei der GSF² entsprachen, handelte es sich im Unterschied zur GSF bzw. zu Ingenium in Marburg um einen offenen Tierstall, d.h. um nicht-spezifisch-pathogenfreie Bedingungen (*non-spf oder non-specific pathogene free*).

2.1.2 *Zucht*

Zum Aufbau der SMA1-Zucht wurden von der GSF drei (heterozygote) SMA1-Männchen sowie unbehandelte WT-Weibchen (C3HeB/FeJ) zur Verfügung gestellt. Für die David-Zucht erhielten wir von der Firma Ingenium 7 Mäuse mit David-Phänotyp sowie eine Reihe von WT-Phänotypen (+/+ oder +/-), die ebenfalls aus der Mauslinie David stammten.

In der Regel wurde ein Männchen mit 2 Weibchen verpaart. Vor dem Zusammensetzen wurden die Weibchen gewogen. Nach zumeist 2-3 Wochen wurden die Männchen von offensichtlich trächtigen Weibchen (Gewichtszunahme 5-10 g) getrennt und die Weibchen einzeln weiter in Makrolon-Käfigen vom Typ-III gehalten. Der Geburtstermin der Nachkommen (± 24 h) wurde durch tägliche Kontrolle der Zuchtkäfige am Vormittag bestimmt. Die Jungtiere wurden am 21. Lebenstag entwöhnt und in Gruppen von bis zu 4 gleichgeschlechtlichen Individuen in Haltungskäfige (Makrolon Typ-III) gesetzt. Tiere in einem Käfig sollten möglichst aus einem Wurf stammen. Bei Käfigen mit Individuen aus verschiedenen Würfen unterschied sich das Alter der Tiere möglichst nicht um mehr als

² Die Firma Ingenium nutzt Tierhaltungsräume an der GSF.

7 Tage. Jede lebende Maus erhielt mit dem 21. Lebenstag eine eigene Tiernummer. Um die Mäuse in einem Käfig individuell unterscheiden zu können, wurden sie an der ventralen Schwanzbasis mit handelsüblicher Künstler-Akrylfarbe tätowiert (1 ml-Spritze Plastikpak; 0.55x25-Kanülen, Microlance) bzw. mit einer Ohrlochzange markiert.

Da die Anzahl der Mäuse in einem Käfig den UCP-1- (*Uncoupling protein-1*) Gehalt im braunen Fett (BAT, *brown adipose tissue*) und dadurch die zitterfreie Wärmebildung beeinflussen kann (Himms-Hagen und Villemure 1992), wurden alle Versuchstiere für metabolische Analysen mindestens 2 Wochen vor Durchführung der Experimente einzeln gehalten (Makrolon-Käfig Typ-II). Die in Experimente eingeschlossenen Tiere waren zuvor nicht in der Zucht verwendet worden.

2.1.3 Zuchterfolg

Für die Auswertung wurden die Nachkommen aus 201 Zuchtpaaren der SMA1- bzw. 71 Zuchtpaaren der David-Mauslinie in der Marburger Kolonie systematisch erfasst. Da das Alter der Weibchen und die Dauer der Verpaarung den Zuchterfolg mitbestimmt und damit Genotyp-Effekte überlagern kann, wurden für die Auswertung des Zuchterfolgs nur Zuchtpaare berücksichtigt, die maximal 46 Tage verpaart waren und in denen die Weibchen zwischen 56 und 200 Tage alt waren. Insgesamt 137 SMA1-Zuchtpaare (118 Zucht-Weibchen) und 43 David-Zuchtpaare (37 Zucht-Weibchen) wurden in die Auswertung eingeschlossen. Als Zuchterfolg wurden Würfe mit mindestens einem überlebenden Jungtier am Tag 21 gewertet. Als „Abort“ bzw. „Infantizid“ wurde bezeichnet, wenn bei Blutspuren im Käfig in Kombination mit starkem Gewichtsverlust (> 5 g) des Zucht-Weibchens oder (Teilen) toter Juveniler im Käfig keine überlebenden Nachkommen mehr aus dem Zuchtpaar hervorgingen. In der Kategorie „Zuchtpaare ohne Nachkommen“ resultierte auch nach 46 Tagen Haltung mit einem Männchen keine Trächtigkeit (= keine überproportionale Gewichtszunahme des Weibchens oder Geburt).

2.2 Phänotypisierung (SMA1 und David)

Im Rahmen des Dysmorphologie-Screens der GSF werden Nachkommen von ENU-behandelten Tieren zu definierten Zeitpunkten (Alter) gewogen und ihr Gewicht verglichen mit dem einer empirisch ermittelten, internen Standard-Wachstumskurve für den Mausstamm C3HeB/FeJ (Fuchs et al. 2000). Mäuse, deren Gewicht an einem Wägetag um mehr als das Doppelte der Standardabweichung vom Erwartungswert der Standardkurve abweicht, werden in wiederholten Abständen gewogen. Zeigt sich eine Persistenz des (Gewichts-) Phänotyps und ist das Merkmal erblich, wird die Maus als

potentieller Träger einer ENU-induzierten Mutation erachtet, welche die Körpermasse beeinflusst. Durch weitere Zucht wird der Phänotyp auf dem Hintergrund des C3HeB/FeJ-Stamms als neue Mauslinie etabliert.

Da eine Genotypisierung der SMA1-Mäuse zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich war, mussten alle Mäuse der SMA1-Zucht zunächst anhand ihres Körpergewichts zugeordnet werden. Zu diesem Zeitpunkt war auch der homozygote Phänotyp noch nicht bekannt. Da die WT-Mäuse der Marburger Zucht im Mittel eine ähnliche Körpermasse wie die WT-Mäuse bei der GSF hatten (Daten nicht dargestellt), war es prinzipiell möglich, auch die Mäuse in Marburg anhand ihres Gewichts auf Basis der von der GSF publizierten Standardkurve (Fuchs et al. 2000) als „WT“ oder „SMA1“ zu phänotypisieren.

Für die Bestimmung eines optimalen Phänotypisierungszeitpunkts wurden in einem ersten Zuchtansatz die Nachkommen von (heterozygoten) männlichen SMA1-Mäusen und WT-Weibchen wöchentlich gewogen. Die Nachkommen aus diesen Zuchtpaaren spalteten sich in eine normalgewichtige und eine untergewichtige Gruppe auf (**Abb. 9**).

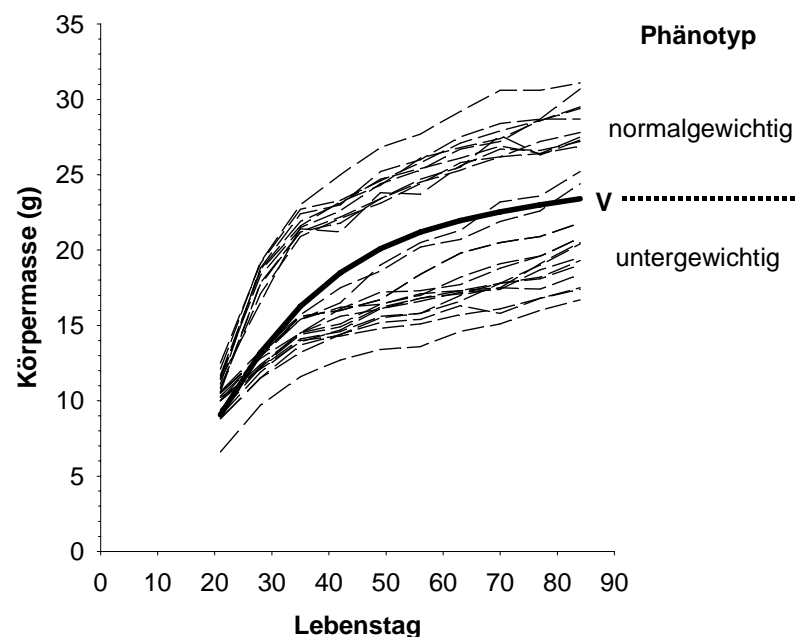


Abbildung 9: Wachstumskurven von n=30 männlichen Nachkommen aus Verpaarungen von *Sma1/+*-Männchen mit *+/-*-Weibchen von Tag 21 bis Tag 84. Die durchgezogene Linie markiert die altersabhängige Phänotypisierungsschwelle (v) für untergewichtige Mäuse nach Fuchs et al. (2000).

Da der maximale mittlere Gewichtsunterschied in der 6. Lebenswoche auftrat und zu diesem Zeitpunkt der niedrigste Anteil an falsch-positiven SMA1-Phänotypen zu erwarten war, wurde der Stichtag für die Phänotypisierung auf das Gewicht am $42. \pm 1$ Lebensstag gelegt. Nach der von der GSF publizierten Standardkurve für den Mausstamm

C3HeB/FeJ ergaben sich für den Phänotyp „untergewichtig“ am Tag 42 ± 1 die in **Tab. 1** aufgeführten Schwellenwerte.

Tabelle 1: Phänotypisierung von untergewichtigen (SMA1- oder David-) Mäusen anhand ihrer Körpermasse am Stichtag $42. \pm 1$ Lebenstag nach Fuchs et al. (2000).

Lebenstag	♂	♀
	Körpermasse \leq	Körpermasse \leq
41	18.2 g	14.8 g
42	18.4 g	15.0 g
43	18.7 g	15.2 g

Mit Kartierung der SMA1-Mutation konnte dieses quantitative Verfahren ersetzt werden durch das qualitative Verfahren der Genotypisierung (siehe Abschnitt 2.3). Damit entfiel auch die Notwendigkeit, homozygote und heterozygote SMA1-Mäuse anhand ihrer Körpermasse unterscheiden zu können.

Für die Phänotypisierung von David-Mäusen, deren Gendefekt unbekannt ist, konnten die in Tab. 1 aufgeführten Schwellenwerte übernommen werden. Alle Nachkommen aus der David-Mauslinie wurden daher ebenfalls am Stichtag 42 ± 1 anhand ihrer Körpermasse phänotypisiert. In der vorliegenden Arbeit fasst also die Gruppenbezeichnung „David“ bzw. „WT“ Mäuse rein aufgrund ihres Gewicht-Phänotyps an diesem Lebenstag zusammen. Da es sich bei der Zwergwüchsigkeit von David um ein rezessives Merkmal handelt, können die untersuchten WT-Phänotypen genotypisch entweder $+/+$ oder $+/-$ sein.

2.3 Genotypisierung (SMA1)

Träger der *Sma1*-Mutation lassen sich genotypisch mittels *PCR-* (*Polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) gekoppeltem Restriktionsverdau von genomischer DNA identifizieren. Diese wurde aus etwa 0.5-1 cm langen Stücken der Schwanzspitze durch ethanolische Fällung von mit Proteinase-K (Sigma) verdautem Gewebe (55°C , 0.5 mg/ml, 0.5 ml pro Schwanzspitze) isoliert wie beschrieben unter <http://www.jax.org/resources/documents/imr/protocols>. 100 ng genomischer DNA wurden für die nachfolgende PCR (Invitrogen rekombinante Taq-Polymerase aus *E.coli*) eingesetzt. Mittels der Primer 5' - TCG GAC CGT GTC TAT GAG AAA - 3' (*forward*) und 5' - GCT TCC AGG AAC AAG ATT GAC A - 3' (*reverse*), lässt sich ein 621 bp langer Abschnitt aus dem GH-Gen amplifizieren, der Teile des Exons 4 und des Exons 5 enthält (40 Zyklen; 60 s Denaturierung bei 94°C , 60 s Annealing bei 55°C , 180 s Elongation bei

72°C, Endvolumen 50 µl). 16 µl des PCR-Produkts wurden für einen Restriktionsverdau mit 10 U *AvaII* (NEB) eingesetzt. Die resultierenden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem 0.5 µg/ml Ethidiumbromid-Agarosegel (1.5%) aufgetrennt und unter UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht (**Abb. 10**).

Das PCR-Amplikon (621 bp) enthält insgesamt 5 Schnittstellen für das Restriktionsenzym *AvaII*. Die resultierenden Fragmentgrößen betragen 2, 25, 173, 184 und 237 bp. Trägern der *Sma1*-Mutation fehlt die 4. Schnittstelle in mindestens einem Allel, so dass anstelle des 184 bp- und 237 bp- ein insgesamt 421 bp großes Fragment entsteht, durch das sich SMA1-Mäuse identifizieren lassen. Die bei allen Genotypen auftretende ca. 180 bp lange Bande besteht beim +/+ Allel aus dem 173 bp- und 184 bp-Fragment, die mit dieser Auflösung geleelektrophoretisch nicht auftrennbar sind, beim *Sma1*-Träger dagegen nur aus dem 173 bp-Fragment. Die Unterscheidung zwischen heterozygot SMA1 und homozygot SMA1 beruht somit auf dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit der 237 bp-Bande. Die 2 bp- bzw. 25 bp-Bande sind im Gel nicht zu detektieren.

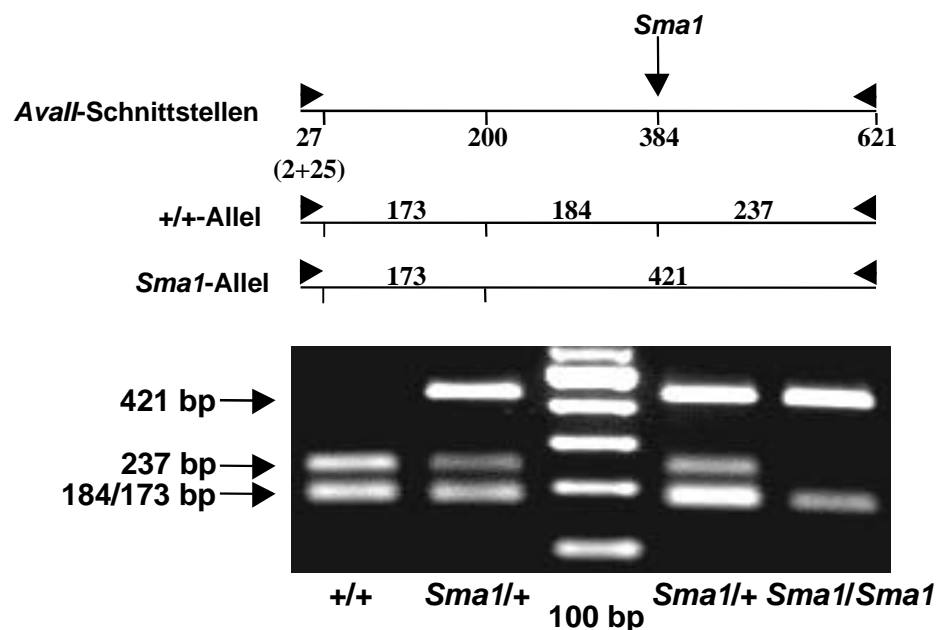


Abbildung 10: Genotypische Unterscheidung von SMA1- und WT-Mäusen mittels Restriktionsverdau (*AvaII*) eines 621 bp großen PCR-Amplikons aus dem GH-Gen. Bei homozygoten Trägern der *Sma1*-Mutation fehlt die 237 bp-Bande, heterozygote SMA1-Mäuse besitzen sowohl die 421 bp-Bande aus dem SMA1- als auch die 237 bp-Bande aus dem +/+ Allel.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit verwendeten Mäuse der SMA1-Mauslinie (n=519) wurden alle nach diesem Verfahren genotypisiert. Begrifflich werden homo- und heterozygote SMA1-Genotypen nachfolgend auch als „SMA1-Mäuse“ zusammengefasst.

2.4 Körpermasse und Wachstumsraten (SMA1 und David)

Um das Wachstum von SMA1- und David-Mäusen individuell verfolgen zu können, wurden Nachkommen aus Verpaarungen von [*Sma1/+* x *Sma1/+*]- bzw. [WT-Phänotyp x David-Phänotyp]-Mäusen vom 7. bis zum 84. und 21.-84. (SMA1) bzw. 7.-70. Lebenstag (David) alle 7 ± 1 Tage gewogen (Kern 449-47, $d = \pm 0.1$ g). Das Gewicht wurde immer vormittags zwischen 8:30 und 11:00 MEZ bestimmt. Am 7. Tag wurden den noch fellfreien Jungtieren Farbmarkierungen mit einem handelsüblichen Filzschreiber (Edding) an den Extremitäten und am Schwanz angebracht. Diese wurden alle zwei Tage kontrolliert und ggf. erneuert. Nach etwa 10 Tagen wurden sie ersetzt durch Fellschnitte bzw. Akrylfarbtätowierungen an der Schwanzbasis (siehe Abschnitt 2.12).

2.5 Reproduktionsstatus bei jungen Weibchen (SMA1)

Störungen in der Hypophysen-Wachstumshormonachse korrelieren sowohl bei Maus und Mensch mit verspäteter Pubertät (Bartke et al. 1999; Hull und Harvey 1999). Anhand der Öffnung der Vagina lässt sich der Zeitpunkt der Geschlechtsreife bei Mäusen bestimmen und kann so als Maß für die sexuelle Reife eines Weibchens herangezogen werden. Während die Vagina bei präpubertalen Mäusen verwachsen ist, öffnet sie sich mit Beginn der Geschlechtsreife. In der Regel erfolgt dies im Alter von ca. 4 Wochen, je nach Haltungsbedingungen und Mausstamm (Silver 1995). Weibliche Mäuse aus [*Sma1/+* x *Sma1/+*]- sowie [*Sma1/Sma1* x *Sma1/Sma1*]-Verpaarungen wurden nach dem Absetzen (Tag 21) täglich auf den Öffnungsstatus der Vagina hin überprüft. Für die Auswertung wurde die Vagina als „offen“ erachtet, wenn dieser Status an mindestens 3 aufeinander folgenden Tagen registriert wurde. Dabei lagen die Ergebnisse vom Vortag bei der täglichen Inspektion der Mäuse nicht vor. Die individuelle Untersuchungsreihenfolge (Liste der Tiernummern) wurde täglich geändert.

2.6 Körpermaße (SMA1 und David)

Die Körpervermessung der Mäuse erfolgte am 56 ± 1 Lebenstag. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Fluothan (Zeneca) betäubt. Einige Tropfen des flüssigen Narkotikums wurden auf ein Stück Filterpapier geträufelt und dieses in eine geschlossene Küvette (ca. 0.5 l) gelegt, in der sich das Versuchstier befand. Sobald die Maus betäubt war (innerhalb von wenigen Sekunden), wurde sie aus der Küvette genommen, auf den Rücken gelegt, ausgestreckt, und mit einem Lineal ($d = \pm 1$ mm) die Körperlänge (mm) als Entfernung Nasenspitze-Anus, sowie die Schwanzlänge gemessen. Hierauf wurde das Tier

umgedreht und mit einer Schieblehre ($d = \pm 0.1$ mm) die Kopflänge (mm) als Entfernung Kopfansatz (Schädel)-Nasenspitze sowie die Tarsuslänge (mm) als Entfernung Ferse-längste Zehe (ohne Krallen) des rechten Hinterfußes ermittelt.

Der gesamte Vorgang dauerte nicht länger als 30 s. Innerhalb weniger Minuten waren die Mäuse wieder bei Bewusstsein.

2.7 Tierpräparationen (SMA1 und David)

Es wurden zwei Altersgruppen präpariert: 10-12 Wochen (= „3 Monate“) alte Mäuse und ca. 5-6 Monate (= „5 Monate“) alte Mäuse. Alle Präparationen wurden vormittags zwischen 9:00 und 12:00 MEZ durchgeführt. Die Tiere wurden unter CO_2 narkotisiert und anschließend durch einen Schnitt der *Vena cava inferior* getötet.

2.7.1 Organe

Organe zur Isolation von RNA oder Proteinen wurden herauspräpariert, gewogen (Kern-PB, $d = \pm 0.001$ g bzw. Kern-ABJ, $d = \pm 0.0001$ g) und unmittelbar darauf in 1.5 ml-Schraubdeckelcups (Sarstedt) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Analyse wurden alle Proben bei -70°C aufbewahrt.

Gewebe für histologische Analysen bei der Firma Ingenium wurden direkt in 0.1 M PBS - 4% Paraformaldehyd (pH 7.4) überführt. Nach 2 Tagen wurde das Medium erneuert und nach weiteren 2 Tagen Fixierung wurden die Proben mit 1xPBS (pH 7.4) gewaschen. Bis zur weiteren Aufarbeitung (Versand) wurden sie bei 4°C in Saccharose (18%) gelagert.

Folgende Organe wurden präpariert³:

Nicht-Fettgewebe: Gehirn (Schnitt caudal der *Medulla oblongata*), Herz, Hoden, Hypophyse, Leber, Milz, Nieren.

Fettgewebe: Axillares weißes Fett (aWAT), epididymales (eWAT); inguinale (iWAT, Einheit aus inguinalem, dorsolumbalem und glutealem Depot), mesenteriales (mWAT) und perirenales (pWAT) weißes Fett, interscapuläres braunes Fett (iBAT).

³ Die Organpräparationen und -wägungen erfolgten z.T. im Zusammenhang mit der am FB Biologie der Philipps-Universität Marburg angefertigten Diplomarbeit von Stefanie Roemheld (2002).

2.7.2 Bestimmung von GH, IGF-1 und Leptin im Blut (SMA1)

Das Abdomen der Maus wurde ventral geöffnet und hierauf das Zwerchfell durchtrennt. Nach Schnitt der *Vena cava inferior* und des Herzens wurden etwa 0.3-0.5 ml des sich im Brustkorb sammelnden venösen Bluts mit einer Einwegspritze (1 ml, Plastikpak) aufgenommen. Die Spritze war zuvor mit einer 0.9% NaCl - 0.1 M EDTA-Lösung (pH 7.0) ausgespült worden. Das Blut wurde zunächst in ein EDTA-beschichtetes Röhrchen (1 ml, Kabe) überführt, und sofort auf Eis gestellt. Zur Plasmagewinnung wurden die Röhrchen mit einer Kühlzentrifuge bei 8500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein 1.5 ml-Eppendorf-Cup überführt und bis zur Analyse bei -70°C tiefgefroren. Von jedem präparierten Tier standen so je nach Körpergröße zwischen 0.1-0.3 ml Plasma zur Verfügung. Die Blutentnahmen erfolgten immer zwischen 9:00 und 12:00 MEZ.

Die Bestimmung von IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) und des Leptingehalts im Plasma wurde bei der Firma Ingenium durchgeführt. Für die Detektion von Maus-IGF-1 wurde ein kommerziell erhältlicher EIA (*Enzyme Immuno Assay*; DSL #10-2900) verwendet, für Maus-Leptin ein ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay*; Crystal Chem. Inc.).

Auch die GH-Bestimmungen erfolgten zunächst mittels eines ELISAs (Amersham) gegen Ratten-GH (rGH) bei der Firma Ingenium, allerdings wurde die Kreuzreaktivität des Antikörpers nach einem Wechsel der Antikörper-Charge bezweifelt (E. Cornali, Fa. Ingenium, *pers. Mitt.*). Leider reichte das z.T. bereits verwendete Probenmaterial dann nicht mehr für eine erneute Analyse aus. Daher wurden retro-orbital-gewonnene Plasmaproben einer weiteren Gruppe von Mäusen von der Firma Ingenium für externe GH- und Ghrelin- (= *Growth hormone secretagogue*, GHS) Analysen verwendet. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Dr. M. Tschöp am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (Dife) in Potsdam-Rehbrücke. GH wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs (IBL-Hamburg GmbH), und Ghrelin mit einem Radioimmunassay gegen Ratte/Maus-Ghrelin (Phoenixpeptide) bestimmt.

2.7.3 Nachweis von GH in der Hypophyse (SMA1)

Zur Bestimmung des hypophysären GH-Gehalts von WT- und SMA1-Mäusen wurde ein Western Blot durchgeführt. Die schockgefrorenen Hypophysen wurden zunächst in 12 µl RIPA-Puffer mit einem Ultra-Turrax (45 s) auf Eis homogenisiert und das Homogenat für weitere 15 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert (RIPA-Puffer: 50 mM Tris - HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.25% Na-desoxycholat, 1 mM EDTA; zusätzlich frisch: 1 mM Na₃VO₄ (Natriumorthovanadat) sowie 1 mM PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid). Nach Zentrifugation bei 14000 g (10 min, 4°C) wurden 2 µl

des Überstands für 4 min bei 100°C in 2 µl Denaturierungspuffer (60 mM Tris - HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 5% Dithiothreitol (Sigma), 0.01% Bromphenolblau) denaturiert. Anschließend wurden 2 µl des Gemisches mit 15%-SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat–Polyacrylamidgel Elektrophorese, Laemmli et al. 1970) aufgetrennt und nachfolgend auf Nitrozellulose (HybondC, Amersham) übertragen. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers und zur Fixierung der Proteine an die Membran wurden die Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau-S, 3% Trichloressigsäure) kurz gefärbt. Die Gele wurden mehrere Stunden mit Coomassie-Blau-Lösung (Coomassie-Brilliant-Blau 0.035%, 40% Methanol, 10% Eisessig) eingefärbt, um die Vollständigkeit des Proteintransfers zu überprüfen.

GH wurde mittels eines im Kaninchen gewonnenen polyklonalen Antikörpers gegen Ratte (anti-rGH) detektiert (1:90000), der über das US-NHPP (Dr. A. F. Parlow, *US-National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, Torrance, USA) bezogen wurde. Vorbereitend für die Antikörperdetektion wurden die Blots zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 4°C in einer Blocking-Solution geschwenkt (5% Slim-Fast® (w/v), 0.1% Tween 20, in PBS (pH 7.4)). Hierauf wurden die Blots viermal für 5 min mit Waschpuffer (10% SDS, 1% Triton-X-100, 0.05% Tween 20, in PBS (pH 7.4)) gewaschen. Die Kopplung an eine zweite Antikörperreaktion über eine Ziege anti-Kaninchen-IgG-HRPO (*Horseradish peroxidase*, DAKO, 1:10000) ermöglichte die immunologische Detektion des Zielproteins (hier: GH) mittels Chemolumineszenz. Hierzu wurden die Blots nach der Inkubation (2 h RT) mit dem zweiten Antikörper erneut viermal für 5 min gewaschen und dann für weitere 5 min in einer Peroxid/Luminol-Lösung (Supersignal® Substrate, Pierce) geschwenkt. Die so behandelten Blots wurden in Folie eingeschlagen und auf Röntgenfilm (Kodak) exponiert. Die Intensität der Lichtsignale auf dem Blot ist proportional zur Menge des gebundenen zweiten Antikörpers und damit der GH-Proteinmenge. Eine Quantifizierung des GH-Gehalts erfolgte mit der *Image-Station* (Kodak, 440CF).

2.8 Körperzusammensetzung (SMA1 und David)

2.8.1 Präparationen

Die Präparationen fanden morgens zwischen 9:00 und 12:00 MEZ statt. Die Mäuse wurden gewogen, mittels CO₂ narkotisiert und durch Schnitt der *Vena cava inferior* getötet. Hierauf wurden etwa 0.3-0.5 ml Blut (Verfahren wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben), das Gehirn und die Hypophyse (SMA1) für die weiterführende Untersuchungen bei der Firma Ingenium entfernt. Für die Genotypisierung wurden jeweils

zwei Stücke vom Schwanz (ca. 0.5 cm) abgeschnitten und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt. Der GI-Trakt wurde ebenfalls entfernt. Der so behandelte Kadaver wurde erneut gewogen und in Krepp-Papier eingeschlagen. Die Extraktionsmasse einer Maus im Versuch entspricht daher dem Gewicht des toten Tieres ohne Gehirn, GI-Trakt und Schwanzspitze.

2.8.2 Bestimmung des Wassergehalts

Die in Filterpapier eingewickelten Kadaver wurden bis zur Gewichtskonstanz (14 Tage) bei 50-60°C getrocknet. Der Wassergehalt eines Tieres ergibt sich aus Differenz des getrockneten Kadavers zum Gewicht vor der Trocknung.

2.8.3 Körperfettextraktion mittels Soxhlet-Destillation

Die Extraktion des Körperfetts aus den endgetrockneten Kadavern erfolgte mittels Chloroform (CHCl_3) in einer Soxhlet-Anlage (Prinzip der Destillation). Hierfür wurden pro Durchgang jeweils 2 in Filterpapier eingewickelte und endgetrockneten Kadaver in einen Soxhlet-Zylinder (500 ml) gesteckt. Das Chloroform wurde in einem darunter befindlichen Rundkolben zum Sieden gebracht und der aufsteigende Chloroform-Dampf in einem aufgesetzten Rückflusskühler kondensiert. Das heruntertropfende Chloroform tränkte die im Soxhlet-Zylinder befindlichen Proben und löste so das Fett aus den Kadavern. Hatte der Chloroform-Spiegel im Zylinder den Ansatzpunkt einer Überlaufkapillare erreicht, lief jener leer und das mit extrahiertem Fett angereicherte, nunmehr dunkler gefärbte Chloroform gelangte zurück in den Rundkolben. Wenn der Zyklus von Neuem begann, wurde aufgrund des niedrigeren Siedepunkts von Chloroform (62°C) im Vergleich zu Fett (>200°C) jeweils nur wieder Chloroform verdampft.

Der Körperfettgehalt errechnete sich aus der Differenz zwischen dem Gewicht eines Tieres nach Trocknung und dem Gewicht der fettfreien Trockenmasse (FFDM, *fat free dry mass*) nach 16 h Extraktion im Soxhlet-Zylinder. Wie nachfolgende Kontroll-Extraktionen bereits einmal extrahierter Proben ergeben hatten, gewährleistete dieses Zeitintervall eine vollständige Entfettung der Mausekadaver.

Die Fettfreie Masse (FFM) entspricht der Differenz zwischen dem Lebendgewicht eines Tieres und der mittels Soxhlet-Extraktion bestimmten Fettmasse.

2.9 Futterverbrauchsmessungen (SMA1 und David)

Zur Bestimmung des Futterverbrauchs wurden die Mäuse einzeln in Makrolonkäfigen vom Typ-II gehalten. Alle Tiere erhielten eine einheitliche Menge Sägespan-Einstreu von

150 g. Die Futtermessungen fanden im Haltungsraum bei $23\pm 2^\circ\text{C}$ Umgebungstemperatur statt. Vor Beginn der Registrierung (Tag 0) wurden die Mäuse gewogen und eine abgewogene Menge Futter (Altromin 1314, ca. 200 g) in die Raufe des Käfigdeckels gegeben. Das für die Verbrauchsmessungen neu eingesetzte Futter war zuvor für eine Woche im Haltungsraum gelagert worden (Freuchtigkeitsadaptation). Der kumulative Futtermessung wurde durch Wiegen der Raufe nach 7 Tagen bestimmt. Für die Auswertung entspricht das Körpergewicht einer Maus dem gemittelten Körpergewicht vor und nach der Messung.

2.10 Messung des Energieverbrauchs mittels indirekter Kalorimetrie (SMA1 und David)

Die Stoffwechselraten wurden mittels indirekter Kalorimetrie in einem offenen respirometrischen System gemessen. Der Grundaufbau der Anlage entspricht dem bei Heldmaier und Steinlechner (1981) beschriebenen Setup.

Zur Messung wurden die Mäuse einzeln in Plastikküvetten gesetzt und in einen Klimaprüfschrank (Weiss, 500 SD) überführt, in dem die Lufttemperatur mit einer Genauigkeit von $d = \pm 0.5^\circ\text{C}$ geregelt wurde. Die Küvetten (max. 6 pro Messdurchgang) wurden mit Hilfe von druckfrei arbeitenden Membranpumpen (TRS 220, Schego) kontinuierlich mit Pressluft durchströmt. Vor der Analyse wurde die abgeführte Luft aus den Küvetten durch elektrische Kühlfallen (MC Cooler, EPC) getrocknet. Über ein System von computergesteuerten Magnetventilen wurde in Messintervallen von 1-6 min⁴ die Luft einer Massenflussmessung (Tylan FM 360, Mykrolis) und anschließend der Gasanalyse zugeführt. Die Bestimmung von CO₂-Produktion und O₂-Verbrauch einer Maus erfolgte mit Zwei-Kanal-Gasanalytoren (Advance Optima Uras14, Hartmann & Braun, ABB-Ltd. bzw. O₂ Analysator S3A-II, Ametek) mit einer Genauigkeit von $d = \pm 0.001 \Delta\text{Vol}\%$. Beide Geräte vergleichen dabei in jedem Messintervall den Gasgehalt der Luft nach Passage einer Messküvette mit der Vergleichsluft aus dem Klimaschrank. Über ein Interface (MDP 8280) wurden die Messgrößen computergestützt aufgezeichnet (Ruf 1991). Die Kalibrierung der Analytoren erfolgte mit einer Gasmischpumpe (Wösthoff, Modell 1 G27/3a). Vor und nach jeder Messung wurde das Gewicht der Tiere mit einer Waage (Sartorius, $d = \pm 0.1 \text{ g}$) bestimmt.

⁴ Da immer nur die Luft einer Küvette pro Messintervall (i.d.R. 60 s) der Gasanalyse zugeführt werden kann, ist die Auflösung abhängig von der Anzahl parallel gemessener Küvetten (z.B. 6 Küvetten = alle 6 Minuten ein Messwert etc.)

Auf Basis der Gas-Differenz in Vol% und der Flussrate⁵ lässt sich der Sauerstoffverbrauch (VO_2) bzw. die Kohlendioxidproduktion (VCO_2) eines Tieres in der Küvette wie nachfolgend berechnen:

$$\text{GL. (1) } VO_2 [\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}] = \Delta \text{Vol\%O}_2 * \text{Fluss} [\text{l} \cdot \text{h}^{-1}] * 10$$

$$\text{GL. (2) } VCO_2 [\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}] = \Delta \text{Vol\%CO}_2 * \text{Fluss} [\text{l} \cdot \text{h}^{-1}] * 10$$

Die Wärmeproduktion (HP, *heat production*) berechnet sich aus dem VO_2 [$\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$] nach folgender Gleichung (Heldmaier 1975):

$$\text{GL. (3) } HP [\text{mW}] = (4.44 + 1.43 * RQ) * VO_2 \text{ bzw.}$$

$$HP [\text{kJ} \cdot 24\text{h}^{-1}] = (4.44 + 1.43 * RQ) * VO_2 * 0.0864$$

wobei RQ (Respiratorischer Quotient) = VCO_2/VO_2 .

Begrifflich werden Wärmeproduktion und Sauerstoffverbrauch oft synonym unter dem Begriff Stoffwechselrate (MR, *metabolic rate*) bezeichnet, da die Energieausbeute pro Liter verbrauchten Sauerstoffs (ca. $20 \text{ kJ} \cdot \text{l O}_2^{-1}$) nur geringfügig vom oxidativen Substrat (RQ) abhängt.

Bei paralleler Registrierung von Körpertemperatur (T_b), Außentemperatur (T_a) und Stoffwechselrate (MR) lässt sich die Wärmedurchgangszahl (C, *conductance*) nach folgender Gleichung berechnen:

$$\text{GL. (4) } C [\text{mW} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}] = MR [\text{mW}] * (T_b - T_a)^{-1}$$

In der Regel wird die Wärmedurchgangszahl gewichtsspezifisch [in $\text{mW} \cdot ^\circ\text{C}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] angegeben.

2.10.1 Thermoneutralzone und Basalstoffwechsel

Nach dem *Glossary of Thermal Biology (The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences (IUPS Thermal Commission) 1987)* definiert sich der Basalstoffwechsel (BMR, *basal metabolic rate*) als stabile Stoffwechselrate eines postabsorptiven, normothermen, in Ruhe befindlichen (nicht schlafenden) Tieres in Thermoneutralität. Als Thermoneutralzone (TNZ) wird ein Außentemperaturbereich bezeichnet, an dem keine über den Ruhestoffwechsel = Basalstoffwechsel

⁵ Um die Flussrate vor Passage der Tierküvette zu berechnen, wurden die (erst nach Passage der Küvette) gemessenen Flüsse mittels des RQ korrigiert. Dieses Verfahren berücksichtigt also die durch das Tier verursachten Änderungen im Gasgehalt der Messluft (Erhöhung im CO_2 , Erniedrigung im O_2).

hinausgehende Energie zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur aufgebracht werden muss (**Abb. 11**). Die Lage der TNZ und der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs in Kälte sind ein Maß für die thermoregulatorische Wärmeproduktion und die Isolation eines endothermen Tieres (Scholander et al. 1950).

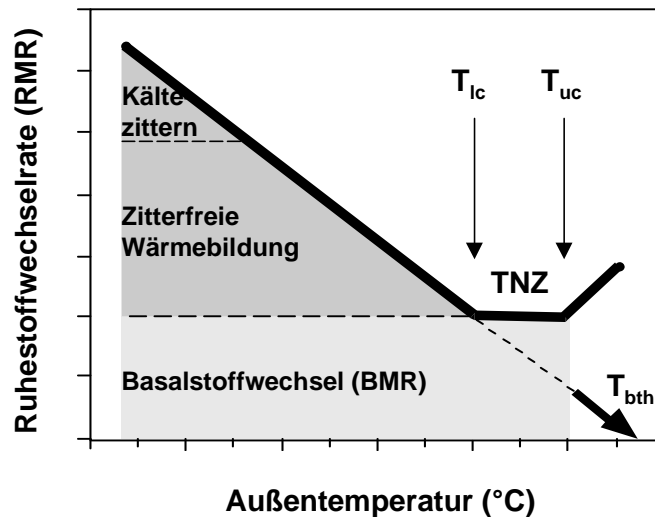


Abbildung 11: SCHOLANDER-Modell der Thermoregulation (Scholander et al. 1950) verändert nach Heldmaier und Neuweiler (2004). Der BMR entspricht dem RMR in Thermoneutralität. T_{1c}: Untere Kritische Temperatur, T_{uc}: Obere Kritische Temperatur der Thermoneutralzone (TNZ), T_{bth}: Theoretische Körpertemperatur.

2.10.1.1 Versuchsablauf und Bestimmung von Ruhe- und Basalstoffwechselraten

Pro Messtag wurde jeweils eine Maus in einer Messkuvette von 1,8 l getestet. Der Sauerstoffverbrauch und die CO₂-Produktion in der Messkuvette wurden in 60 s-Intervallen registriert. Die Mäuse wurden immer morgens zwischen 7:00 und 8:00 MEZ in den Klimaschrank eingesetzt. Eine Messung dauerte ca. 8 h, wobei den Tieren im weiteren Tagesverlauf weder Futter noch Wasser zur Verfügung stand. Während der Messung wurde die Maus durch ein Fenster in der Tür des Klimaschranks beobachtet und ihr Verhalten protokolliert (Maus körperlich aktiv oder inaktiv = ruhend).

Zur Bestimmung der Thermoneutralzone und des Ruhestoffwechsels wurde die Maus einer Reihe von verschiedenen Außentemperaturen (T_a) ausgesetzt. Nach einer 2- bis 3-stündigen Adaptation bei 30°C wurden die folgenden Temperaturen eingestellt (±1°C): 28, 24, 20, 15, 30, 32 und 36°C (36°C wurde bei der Mauslinie David nicht gemessen), wobei der Gaswechsel bei jeder Temperaturstufe mindestens 30 min und maximal 90 min lang registriert wurde. Es handelte sich jeweils um die Küvetteninnentemperatur, die mit einem am Innendach der Kuvette befindlichen Kupfer-Konstantan Thermoelement monitoriert und aufgezeichnet wurde (d = ±0,1°C). Bei jedem Temperaturwechsel erfolgte

ein Nullpunktabgleich der Gasanalyse durch manuelles Umschalten (Dreiweghahn-System in den Abluftschläuchen vor der Kühlfalle) auf einen 2. Messkanal ohne Tier (Leerküvette).

Da der $\dot{V}O_2$ das Produkt aus der Flussrate und der Differenz im Gasgehalt in Vol% ist (vgl. Gleichung 1 und 2), verhält sich bei konstantem $\dot{V}O_2$ die absolute Differenz im Sauerstoffgehalt [Vol%] der Messluft umgekehrt proportional zur Flussrate, d.h. je größer der Fluss, desto kleiner die Differenz. Eine Erniedrigung im Fluss kann also die höheren relativen Schwankungen im Vol% bei niedrigem $\dot{V}O_2$ bzw. $\dot{V}CO_2$ kleinerer Tiere kompensieren. Bei Mäusen mit einem Gewicht <15 g wurde daher eine Flussrate von ca. $30 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ eingestellt, bei allen anderen (schwereren) Tieren ca. $45 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$.

Bei einem Teil der Mäuse wurde parallel zur Stoffwechselformung die Körperkerntemperatur mit implantierten, temperatursensitiven Sendern registriert (siehe Abschnitt 2.11). Bei mit Temperatursendern implantierten Mäusen wurde in allen Berechnungen und Abbildungen das Gewicht des Tieres abzüglich des Sendergewichts zugrunde gelegt. Eine typische Verlaufskurve für Sauerstoffverbrauch, Körpertemperatur und Wärmedurchgangszahl ist in **Abb. 12** dargestellt.

Für die Praxis der Bestimmung des Ruhestoffwechsels bei Säugetieren gibt es keine einheitlichen methodischen Vorschriften, und die Abgrenzung der „Ruhephase“ liegt dabei im Ermessen der versuchsdurchführenden Person. In vielen Arbeiten definiert sich der RMR als minimaler Sauerstoffverbrauch eines nicht aktiven Tieres, bestimmt während der zirkadianen Ruhephase in Messintervallen von 1-10 min bei konstanter Umgebungstemperatur. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde „ruhend“ gleichgesetzt mit „nicht körperlich aktiv“. Wie in der Originalregistrierung in **Abb. 13** beispielhaft illustriert wird, zeigten aber ruhende Mäuse (jedes Genotyps/Phänotyps) bei konstanter Außentemperatur ($<28^\circ\text{C}$) variable Stoffwechselraten und Körpertemperaturen: Die sich einem Aktivitätsschub anschließende Ruhephase war stets gekennzeichnet durch einen kurzzeitigen, ca. 10-minütigen Abfall im Sauerstoffverbrauch und nachfolgend der Körpertemperatur. Nach Erreichen minimaler Stoffwechselraten steigerten die weiterhin „inaktiven“ Mäuse ihren Sauerstoffverbrauch wieder bis auf ein Plateau, das mit Erreichen minimaler Körpertemperaturen korrelierte. Dieses Plateau im Sauerstoffverbrauch dauerte ca. 10-15 min und wurde immer beendet durch einen erneuten Aktivitätsschub und damit verbundenem Anstieg im Sauerstoffverbrauch.

Als Ruhestoffwechselrate pro Temperaturstufe (mindestens 20 min Adaptation) wurde daher in dieser Arbeit nicht die niedrigste absolute Stoffwechselrate, sondern der mittlere Sauerstoffverbrauch einer ruhenden Maus über 10-minütige Plateaus (= 10 Messwerte) mit niedrigstem mittleren Sauerstoffverbrauch gewählt. Die so bestimmten

Ruhestoffwechselraten korrelierten mit dem Zeitpunkt, an dem die Mäuse minimale Körpertemperaturen und Wärmedurchgangszahlen bei gegebener Außentemperatur verteidigten (vgl. Abb. 12). Mathematisch entspricht der so definierte Ruhestoffwechsel dem niedrigsten mittleren Sauerstoffverbrauch über 10 aufeinanderfolgende VO_2 -Messwerte und niedrigstem Variationskoeffizienten ($VC = 100 \cdot VO_2^{-1} \cdot SD_{VO_2}$). Je niedriger also der VC, desto stabiler der VO_2 der Maus.

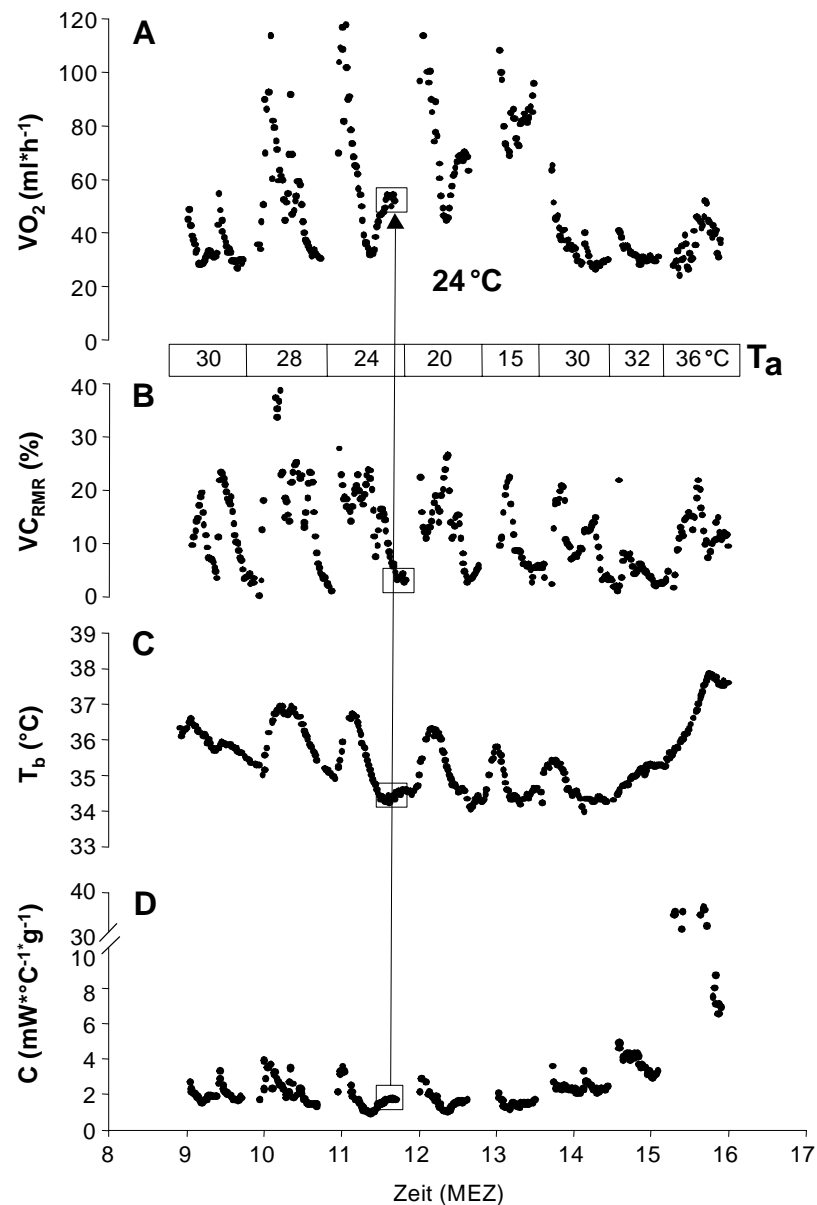


Abbildung 12: Originalregistrierung (A) des Sauerstoffverbrauchs (VO_2), (B) der Körpertemperatur (T_b) und der Wärmedurchgangszahl (C) einer Maus (*Sma1/+*) bei verschiedenen Außentemperaturen. Pfeil und Kasten illustrieren korrespondierende Werte bei 24°C. In (B) ist der Variationskoeffizient (VC_{RMR}) für den VO_2 über 10 aufeinanderfolgende Messwerte (= 10 min) dargestellt.

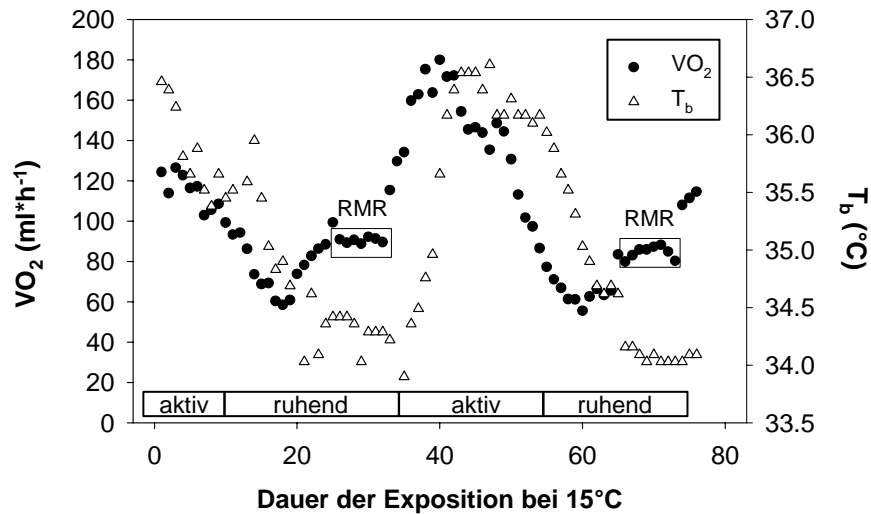


Abbildung 13: Plastizität des Sauerstoffverbrauchs (VO_2) und der Körpertemperatur (T_b) einer Maus (+/+) bei 15°C. Plateaus mit stabilem Sauerstoffverbrauch während der Ruhephase (eingekastelt) korrelieren mit niedrigsten Körpertemperaturen und entsprechen dem RMR bei 15°C.

2.10.2 Ermittlung der Unteren Kritischen Temperatur (T_{lc}) und der Theoretischen Körpertemperatur (T_{bth})

Über das in **Abb. 11** dargestellte SCHOLANDER-Modell der Thermoregulation lassen sich für jeden endothermen Organismus die Kenngrößen Untere Kritische Temperatur (T_{lc}) und Theoretische Körpertemperatur (T_{bth}) ermitteln. Die T_{lc} markiert das untere Ende der Thermoneutralzone und entspricht mathematisch dem Schnittpunkt des BMR mit der Regression zwischen der Außentemperatur und dem Ruhestoffwechsel in Kälte. Extrapoliert man mittels linearer Regression über den Außentemperaturbereich in Kälte auf die Abszisse, lässt sich die T_{bth} ermitteln, d.h. über den Wärmeverlust in Kälte eine Voraussage über die geschätzte Körperkerntemperatur machen.

2.11 Registrierung der Körpertemperatur (SMA1 und David)

Die Körpertemperatur wurde einerseits rektal (David), andererseits mittels implantierbarer, temperatursensitiver Sender (SMA1) registriert (Mini-Mitter, Modell X/XM).

Die Rektalmessung erfolgte mit einem Fühler (C 856-1, Ahlborn, $\varnothing = 2$ mm) der an einen Therm (2241-NTC, Ahlborn, $d = \pm 0.1^{\circ}C$) angeschlossen war und 15 mm in das Rektum eingeschoben wurde. Die Rektaltemperatur entspricht dem nach 30 s erreichten stabilen Temperaturwert. Die Messung wurde zwischen 8:00 und 10:00 MEZ durchgeführt.

Die Mini-Mitter werden intraperitoneal platziert und senden in Abhängigkeit von der Außentemperatur ein amplitudenmoduliertes Mittelwellensignal, das sich mit einem herkömmlichen Radio als Klicksignal hörbar machen und aufzeichnen lässt (Ruf und Heldmaier 1987). Die Temperatur des Senders T [°C] ist umgekehrt proportional zum Impulsabstand t [ms] und berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{GL. (5) } T = A + B * \ln(t) \quad (d = \pm 0.1^\circ\text{C})$$

2.11.1 Vorbereitung und Implantation der Sender

Zunächst wurden die Sender in Plastikkapseln verpackt und in einer Mischung aus Bienenwachs und Paraffin (Elvax®) wasserdicht eingebettet. Die fertigen Sender waren etwa 10 mm lang bei einem Durchmesser von ca. 7 mm und hatten ein Gewicht von 1.4-1.7 g, das entspricht den in **Tab. 2** angegebenen Prozentsätzen im Körpergewicht für jeden Genotyp. Bei den Sendern homozygoter SMA1-Mäusen wurde auf die Plastikkapsel verzichtet, um Größe und Gewicht zu minimieren. Stattdessen wurden die Sender vor der Paraffineinbettung in Parafilm® eingewickelt.

Zur Ermittlung der senderspezifischen Koeffizienten [A] und [B] wurde jeder Sender in einem Wasserbad (Julabo F10) einer aufsteigenden Reihe von 10 Temperaturstufen zwischen 20°C und 40°C ($d = \pm 0.1^\circ\text{C}$) ausgesetzt. Nach 15 min Adaptation wurde der Intervallabstand zwischen zwei Signalen mittels Intervallzähler (Rhode & Schwartz, FET 100) bei jeder Temperaturstufe registriert. Über den linearen Zusammenhang ($r^2 > 0.99$) zwischen Körpertemperatur und dem Logarithmus des Intervallabstands lassen sich die Koeffizienten A und B der Gleichung (5) für jeden Sender schätzen.

Zur Implantation der Sender wurden die Mäuse mit Ketaminhydrochlorid (Ketavet® 150 mg/kgBM i.p., Pharmacia) narkotisiert. Zusätzlich wurden die Mäuse unter einer Atemmaske mit Frischluft und im Bedarfsfall mit 1-2 Vol% Halothan (Fluothane®, Zeneca) beatmet. Die Operation erfolgte am auf dem Rücken liegenden Tier. Zunächst wurde das Abdomen mit handelsüblicher Enthaarungscreme (Pilca) enthaart. Dann wurde in der Mitte des Abdomens ein ca. 1 cm langer longitudinaler Schnitt durch die äußere Bauchdecke geführt. Hierauf wurde das Peritoneum seitlich der *Linea alba* geöffnet und der Sender zwischen den Darmschlingen in der Bauchhöhle platziert. Die Schnitte wurden mit 4-5 Knoten vernäht (Catgut bzw. Malin 5/0 USP) und die Wunde mit Jodpulver (P-S, Coopers) desinfiziert. Eine Operation dauerte etwa 30 min pro Maus und innerhalb von 1-2 h waren die Tiere wieder wach und mobil. Nach etwa 2 Wochen hatten die Mäuse wieder ein stabiles Körpergewicht erreicht. Erst nach dieser Rekonvaleszenzzeit wurden sie in den Versuchen eingesetzt. Bei WT- und heterozygoten SMA1- wurden nur

männliche Mäuse implantiert, unter den homozygoten SMA1-Mäusen befanden sich zwei weibliche Tiere. Alle Tiere wurden einzeln in Makrolonkäfigen (Typ-II) gehalten.

Für die experimentelle Durchführung der Implantationen lag eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Antrag Nr. MR 171 - Nr. 06/2000).

Tabelle 2: Gewicht des Mini-Mitters in % Körpergewicht des Versuchstiers. Angegeben sind Mittelwerte und Spannbreiten.

	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>
n	6	5	5
Körpergewicht (g) vor OP	27.6 (22.5-33.5)	19.5 (18.1-20.8)	13.0 (11.2-15.4)
Sendergewicht in % Körpergewicht	6.1 (4.8-7.9)	8.3 (7.4-8.7)	11.8 (9.7-13.2)

2.11.2 Auswertung

Die Radiosignale eines implantierten Mini-Mitters wurden mit unter dem Käfig platzierten Antennen empfangen, über ein Radio verstärkt und das analoge Signal einem A/D Wandler zugeführt, der an einen PC angeschlossen war. Die Datenabfrage und Erfassung jedes Messkanals erfolgte mit dem von T. RUF und B. LOVEGROVE entwickelten Programm „*datcon.exe*“ in *Quick-Basic*. Alle 6 min erfolgte eine Registrierung der Körpertemperatur jedes Messkanals, so dass insgesamt 240 Werte pro Tier und Tag möglich waren. Die Registrierungen erfolgten über einen Zeitraum von 10 Tagen (= 2400 Messwerte pro Tier), wobei die ersten 3 Tage nicht in die Auswertung eingingen. Für die Auswertung der Körpertemperaturverläufe über 7 Tage wurden zunächst die Originalregistrierungen im Hinblick auf für normotherme Mäuse unphysiologische Körpertemperaturwerte ($T_b < 32^\circ\text{C}$ und $T_b > 38^\circ\text{C}$) sowie Ausreißer (Körpertemperatursprünge zwischen zwei Messpunkten von $> 2^\circ\text{C}$) überprüft und diese Datenpunkte von der Auswertung ausgeschlossen. Einzelne Ausreißer bzw. unphysiologische Werte sind die mathematische Folge von Empfangsstörungen des eigentlichen Mini-Mitter-Signals (Ruf und Heldmaier 1987), die vom System ebenfalls in eine Körpertemperatur umgerechnet werden. Die Anzahl der identifizierten Fehlwerte während der 10-tägigen Messung betrug bei allen Genotypen im Mittel 30%, in einem Fall (heterozygote SMA1) jedoch 54%. Daher wurde in einem nächsten Schritt aus den Originaldaten das geglättete Mittel aus 10 aufeinanderfolgenden Werten errechnet (= Stundenmittel). Dieses Verfahren kann zwar die täglichen Extremwerte (Minima und Maxima) um bis zu 0.5°C dämpfen, liefert aber für jede Maus die gleiche Anzahl von auswertbaren Messpunkten. Für den Vergleich der Genotypen wurde aus den so errechneten geglätteten Datenpunkten das Minimum,

das Maximum und der Median der Körpertemperatur jeder Maus pro Tag aus 7 aufeinander folgenden Messtagen getrennt nach Licht- und Dunkelphase bestimmt und gemittelt.

2.12 Erstellung einer 24 h-Energiebilanz (SMA1)

Die tägliche Energiebilanz eines nicht wachsenden, nicht reproduzierenden Tieres lässt sich aus der Differenz zwischen Energieaufnahme (Energiegehalt der täglich assimilierten Nahrung) und seiner Energieabgabe (Wärmeproduktion) bestimmen. Bei einem sich energetisch im Gleichgewicht befindlichen, nicht wachsenden und nicht reproduzierenden Organismus sollten die beiden Faktoren im Verhältnis 1:1 stehen. Bei einer positiven Energiebilanz ist die Energieaufnahme zugunsten der Energieabgabe erhöht, bei einer negativen Energiebilanz erniedrigt.

2.12.1 Experimentelles Setup

Die Mäuse wurden einzeln für 96 h (= 4 Tage) in Makrolonkäfigen vom Typ-II gehalten (5 l), die gleichzeitig als Messküvetten für die indirekte Kalorimetrie ausgerüstet waren. Anstelle von Einstreu saßen die Mäuse auf einem Gitterboden, so dass Kot und Futterreste aufgefangen werden konnten. Als Rückzugsmöglichkeit erhielten sie einen umgedrehten Blumentopf. Die Tiere hatten Wasser *ad libitum* und eine abgewogene Menge Futter (ca. 30 g) zur Verfügung. Für die Messungen wurde eine Außentemperatur von 27-28°C gewählt. Diese Temperatur liegt geringfügig (1-3°C) unterhalb der Thermoneutralzone von Labormäusen, so dass die Tiere direkt aus dem Haltungsraum, d.h. ohne weitere Temperaturakklimatisation in die Messung eingebracht werden konnten. Die Küvetten wurden mit einer einheitlichen Flussrate von 50-60 l·h⁻¹ mit Frischluft durchströmt, die Bestimmung von CO₂ und O₂ erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.10 beschrieben. Pro Messdurchgang wurden 3-5 Tiere verschiedener Genotypen parallel gemessen. Eine weitere Küvette mit Futter und Wasser, aber ohne Tier, wurde immer zur Nullpunktkorrektur der Analysatoren mitregistriert. Von jeder Küvette wurde alle 6 min ein O₂- bzw. CO₂-Messwert bestimmt, so dass insgesamt 240 Werte pro Tag und Kanal vorlagen. Die Futtermessung und Kotsammlung erfolgte kumulativ über alle 4 Tage, die Stoffwechselformung am 2. oder 3. Tag. Nach dem 4. Tag, also nach 96 h wurden die Mäuse wieder zurück in ihre Haltungs Käfige im Tierhaus überführt.

2.12.2 Ermittlung des DEE (daily energy expenditure, täglicher Energieverbrauch)

Aus dem alle 6 min gemessenen VO_2 ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$) wurde jeweils ein Stundenmittel aus 10 aufeinanderfolgenden Messwerten errechnet. Die Summe der 24 Stundenmittel im VO_2 ergibt den täglichen Sauerstoffverbrauch. Die täglich verbrauchte Energie (DEE) in $\text{kJ}\cdot 24\text{ h}^{-1}$ errechnet sich über Gleichung (3) (Abschnitt 2.10) und dem mittleren RQ des Messtages.

2.12.3 Ermittlung des RMR (resting metabolic rate, Ruhestoffwechselrate) und des $\text{VO}_2\text{max}_{\text{DEE}}$ (maximaler Sauerstoffverbrauch in 24 h)

Der RMR aus der 24 h-Messung wurde als niedrigster Mittelwert im Sauerstoffverbrauch ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$) über 18 min (3 Messwerte) ermittelt. Analog hierzu wurde der $\text{VO}_2\text{max}_{\text{DEE}}$ ($\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$) als höchster Mittelwert im Sauerstoffverbrauch aus einem 18 min-Intervall bestimmt.

Die Konversion des RMR in die tägliche Wärmeproduktion durch den Ruhestoffwechsel (REE, *resting energy expenditure*) erfolgte gemäß Gleichung (3) (Abschnitt 2.10), hierbei wurde der dem RMR korrespondierende mittlere RQ verwendet.

2.12.4 Bestimmung des Energiegehalts im Futter und Kot mittels Bombenkalorimetrie

Die Futter- und Kotreste wurden nach Abschluss der Messung gesammelt und gewogen ($d = \pm 0.001\text{g}$). Über das Futter in der leeren Referenzküvette jedes Messdurchgangs konnte bei Bedarf eine Feuchtigkeitskorrektur des Gewichts des Futters aus den Messküvetten erfolgen. Die Kotreste sowie einige Futterpellets zur Bestimmung des Energiegehalts wurden bis zur Analyse zunächst bei -20°C aufbewahrt.

Der Energiegehalt von Futter und Kot wurde mit einem Verbrennungskalorimeter (C7000, IKA) bestimmt. Dabei handelt es sich um ein sog. „trockenes“ Kalorimeter, d.h. die Temperaturerhöhung nach Verbrennung einer Probe wird direkt im Aufschlussgefäß („Bombe“) gemessen. Die Verbrennung selbst erfolgt nach elektrischer Zündung unter hohem Druck (30 bar) in einer Atmosphäre reinen Sauerstoffs. Vor dem eigentlichen Messdurchgang wird das Gerät zunächst mit Benzoesäure (Sigma, Brennwert: $26650\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) kalibriert. Über die bei der Probenverbrennung resultierende Temperaturerhöhung der Bombe und das Probengewicht kann auf den unbekanntem Energiegehalt einer Probe zurückgeschlossen werden.

Vor der Analyse wurden alle Kotproben für 8 Tage bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Etwa 0.5 g Kot einer Maus wurden mit einer elektrischen Kaffeemühle fein gemahlen und zu Tabletten gepresst. Diese wurden in den Verbrennungstiegel der

Bombe gelegt und verbrannt. Der Energiegehalt des Kots jeder Maus wurde doppelt bestimmt und der gemittelte Wert mit dem Trockengewicht des Kots multipliziert. Das Futter wurde ebenfalls bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, zunächst mit einem Hammer grob zerkleinert, hierauf ebenfalls mit der Mühle fein gemahlen, und für die Analyse zu Tabletten von je ca. 0.5 g gepresst.

2.12.5 Assimilierte Energie, Assimilationskoeffizient und metabolisierte Energie

Aus der Differenz im Energiegehalt des aufgenommenen Futters und dem Energiegehalt des Kots lässt sich die vom Tier täglich assimilierte Energie und der Assimilationskoeffizient (Anteil der assimilierten Energie aus dem aufgenommenen Futter in %) berechnen. Für die Berechnung der metabolisierten Energie wurde ein 2%iger Energieverlust über den Urin angenommen (Drozd und Weiner 1975) und bei der Kalkulation der Energiebilanz berücksichtigt.

2.13 Erfassung der täglichen Spontanaktivität (SMA1)

Die Spontanaktivität einzelner Mäuse im Haltungskäfig wurde mit passiven Infrarot-Bewegungsmeldern (PIR, Conrad Elektronik, Modell 190319) registriert. Hierfür wurden die im Versuch überwachten Mäuse einzeln in Makrolonkäfigen (Typ-II) gehalten. Sie erhielten eine abgewogene Menge Sägespä-Einstreu (100 g), jedoch keinen Zellstoff zum Nestbau. Der Bereich des Käfigs unterhalb der mit Futter gefüllten Raufe wurde durch eine Plexiglas-Trennwand so abgetrennt, dass der auf dem Käfigdeckel angebrachte Bewegungsmelder eine offene Fläche von ca. 18 cm x 18 cm erfassen konnte und die Maus trotzdem ungehinderten Zugang zum Futter hatte.

Die Bewegungsmelder reagieren auf zeitliche Änderungen der Infrarotstrahlung in bestimmten Bereichen eines Raumes. Mittels einer Multilinse (Fresnell-Linse, \varnothing 24 mm) werden unterschiedliche Raumausschnitte (sog. Keulen oder empfindliche Zonen) in einem Erfassungsbereich von maximal 5 m und einem Erfassungswinkel von vertikal 60° und horizontal 100° auf den pyroelektrischen Sensor des Bewegungsmelders abgebildet. Durchquerte eine Maus den Erfassungsbereich, verursachte sie innerhalb der empfindlichen Zonen eine zeitliche Änderung des Infrarot-Strahlungsflusses. Diese wurde von den Elementen des Sensors empfangen, in ein Ausgangssignal von ca. 0.2 V umgewandelt und an eine angeschlossene Registrier-Einheit (A/D-Wandler und PC) weitergeleitet. Über das *Quick-Basic*-Programm *datcon.exe* (T. RUF und B. LOVEGROVE) wurden die in 6 min registrierten Signale (max. 360) aufsummiert und gespeichert. Pro Tag und Tier konnten also maximal 360*240 Signale erfasst werden.

2.14 UCP-1 (Uncoupling protein-1) -Expression im braunen Fett (SMA1)

2.14.1 Quantitativer Vergleich der mRNA-Expression von UCP-1 im interscapularen braunen Fett (iBAT)

Das iBAT stammte von 3 und 5 Monate alten Mäusen, die vor der Präparation mindestens 2 Wochen einzeln in Makrolonkäfigen (Typ-II) bei Raumtemperatur ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) gehalten worden. Die Gesamt-RNA aus dem iBAT wurde isoliert nach einem modifizierten Protokoll basierend auf Chomczynski und Sacchi (1987)⁶.

Zunächst wurden die tief gefrorenen Gewebe (gesamtes Depot) mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel) für 30 s in 1.2 ml TRIzol® (Life Technologies) homogenisiert. TRIzol enthält Guanidinisothiocyanat, mit dem RNasen inaktiviert werden, sowie Phenol (pH 4-5). Nach 5-minütiger Inkubation (RT) wurde kurz zentrifugiert (2500 g, 4°C , 5 min), die wässrige Phase abgenommen und in 240 μl Chloroform überführt. Nach kurzem Vortexen und anschließender kurzer Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (12000 g, 4°C , 15 min). Die obere, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und in 600 μl 100% Isopropanol für 20 min bei RT gefällt. Durch Zentrifugation bei 12000 g (4°C , 15 min) wurde die RNA pelletiert. In einem zusätzlichen Reinigungsschritt wurde die RNA in 600 μl SOLD - 7.2% - Mercaptoethanol-Lösung gelöst (15 min), und anschließend nochmals in 600 μl Isopropanol (100%) für 20 min bei -20°C gefällt. Die RNA wurde erneut pelletiert (12000 g, 4°C , 15 min) und das Pellet in 75% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in (0.1% v/v) DEPC- (Diethylpyrocarbonat-) behandeltem ddH₂O resuspendiert (63°C , 20 min). Bis zur weiteren Verwertung wurden die Proben bei -70°C gelagert. Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch (260 nm, Gene Quant II, Pharmacia Biotech).

Es wurden insgesamt 2 Northern Blots nach Standardprotokoll angefertigt (von Praun et al. 2001). Dabei wurden die Proben (10 μg RNA pro Probe) der beiden Versuchsgruppen jeweils zur Hälfte auf 2 Gele aufgetragen und geblottet. Ein Standard aus RNA aus dem braunen Fett einer kälteexponierten WT-Maus diente als Referenz zur Korrektur von möglichen Unterschieden in der Hybridisierungsqualität zwischen den beiden Blots. Die Blots wurden gleichzeitig hybridisiert.

⁶ Die Isolierung und die Übertragung der elektrophoretisch aufgetrennten RNA auf Nitrozellulosemembran erfolgte im Zusammenhang mit der am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg angefertigten Diplomarbeit von Stefanie Roemheld (2002).

Die Blots wurden zunächst mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert, die einem 1.10 kb mit [α - 32 P]dATP-markierten Hamster- (*Phodopus sungorus*-) UCP-1-cDNA-Fragment entsprach. Nach Exposition auf Röntgenfilm bzw. Phosphor-Screen (Storm 860, Molecular Dynamics) wurden die Blots zur Dehybridisierung mit siedend heißem 0.1 x SSC (0.5% SDS) übergossen und bei 60°C für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert; anschließend wurde mit 0.1 x SSC gewaschen. Nachfolgend wurde auf dem selben Blot eine weitere Hybridisierung mit einem 1.14 kb mit [α - 32 P]dATP markierten β -Actin-cDNA-Fragment (*Mus musculus*) durchgeführt. Die Hybridisierungen erfolgten jeweils über 24 h bei 63°C nach Standardprotokoll (von Praun et al. 2001). Die UCP-1- und β -Actin-mRNA-Hybridisierungssignale wurden quantitativ mit dem Programm *Array Vision* (Version 6.0) ausgewertet. Die UCP-1-Signalintensitäten wurden mittels der korrespondierenden β -Actin-Signalintensitäten im Hinblick auf Unterschiede im RNA-Gehalt pro Probe normalisiert.

2.14.2 UCP-1-Proteinexpression im interscapularen braunen Fett (iBAT)

Der quantitative Vergleich der UCP-1-Proteinexpression erfolgte bei einer Gruppe 5 Monate alter männlicher Mäuse durch immunologische Detektion auf Western Blots. Zur Isolation von Gesamtprotein aus dem braunen Fett wurde das gefrorene Gewebe (ca. 50 mg) in 150 μ l RIPA-Puffer zunächst mit einem Ultra-Turrax (30 s) auf Eis homogenisiert und das Homogenat für weitere 15 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert (RIPA-Puffer: 50 mM Tris - HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet-P40, 0.25% Na-desoxycholat, 1 mM EDTA; zusätzlich frisch: 1 mM Na₃VO₄ (Natriumorthovanadat) sowie 1 mM PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid). Nach Zentrifugation bei 14000 g (für 10 min bei 4°C) wurde die wässrige, fettfreie Lösung des Unterstands abpipettiert. Die Quantifizierung des Proteingehalts im Homogenat erfolgte photometrisch mit dem BCA-Proteinassay (Pierce). 20 μ g Gesamtprotein wurden hierauf kurz (4 min) bei 100°C in Denaturierungspuffer (vgl. Abschnitt 2.7.3) denaturiert, mittels 12%-SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend auf Nitrozellulose übertragen (HybondC, Amersham) (Laemmli et al. 1970). Blots und Gele wurden dann wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben weiterbehandelt. Die immunologische Detektion von UCP-1 in den Proben erfolgte mittels eines im Kaninchen gewonnenen Antikörpers gegen Hamster-UCP-1 (1:10000; 1-2 h bei RT).

Der Vergleich der Signalintensitäten zwischen den Genotypen erfolgte auf Basis der Filme (Schwärzungsgrad der UCP-1-Banden) mit dem Programm *Scion Image* (Scion Corporation). Es wurden insgesamt 3 Blots mit jeweils 6 Proben analysiert. Hierbei waren

pro Blot jeweils 2 Individuen jedes Genotyps aufgetragen. Der quantitative Vergleich zwischen den Genotypen ergab sich aus dem gemittelten x-fachen Unterschied in der Signalintensität der homozygoten bzw. heterozygoten Proben jedes Blots im Vergleich zum Mittelwert der Wildtyp-Expression (100%).

2.15 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse wurden in der Regel zunächst beschreibend in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) für jeden Genotyp (SMA1) bzw. Phänotyp (David) angegeben. Bei der Mauslinie David wurden diese mittels t-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Phänotypen untersucht. Sofern nicht anders angegeben erfolgte bei der Mauslinie SMA1 der Vergleich von Gruppenmittelwerten (Genotyp) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA). In nachfolgenden multiplen Gruppenvergleichen wurde eine α -Korrektur nach BONFERRONI berücksichtigt.

Um entscheiden zu können, ob sich Unterschiede zwischen den Geno- bzw. Phänotypen allein durch die verringerte Körpermasse erklären lassen oder ob eine darüber hinausgehende Variation existiert, die mit dem Gendefekt zusammenhängen könnte, wurde zunächst die den Zielgrößen unterliegende Beziehung zur Körpermasse geschätzt. Die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen wurde mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten (r^2) angegeben. Mit Bezug auf Smith (1984) wurden die Regressionen mit Ausnahme der Stoffwechselraten und der Körperlängen nach der Methode der *Least Square Regression* von nicht- \log_{10} -transformierten Daten ermittelt. Konnten signifikante Zusammenhänge zwischen Körpermasse und Zielgröße nachgewiesen werden und unterschieden sich die Steigungen der Regressionsgeraden zwischen den Gruppen nicht signifikant (überlappende Konfidenzintervalle, 95%CI), wurde eine Varianzanalyse unter Adjustierung mit der Kovariate Körpermasse durchgeführt. Bei signifikanter ANCOVA erfolgten multiple *post-hoc* Gruppenvergleiche (SMA1) nach BONFERRONI und eine Quantifizierung des Unterschieds zwischen den Genotypen. (Mittelwert \pm Standardfehler, SE (*standard error*) bzw. 95% Konfidenzintervall, 95%CI).

Die T_{bth} , die T_{lc} und die täglichen Körpertemperaturmittel wurden mit nicht-parametrischen Verfahren auf signifikante Unterschiede zwischen den Geno- bzw. Phänotypen getestet (FRIEDMANN-Test (SMA1) bzw. U-Test (David)). Multiple *post-hoc*-Vergleiche (SMA1) erfolgten hier mit dem DUNN-Test.

Mittels χ^2 - (Chi²-) Anpassungstest wurden gemessene Häufigkeiten auf Abweichung von Erwartungswerten getestet.

Das Signifikanzniveau wurde in allen Fällen auf $p < 0.05$ festgesetzt. Unterschiedliche Symbole (Buchstaben) in Abbildungen und Tabellen markieren signifikante Unterschiede zwischen den Geno- bzw. Phänotypen. Allerdings dienen die schließenden Testverfahren lediglich der Untermauerung der in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse. Die parametrischen Auswertungen wurden mit der Statistik-Software *SPSS* 10.0 (SPSS Inc.), die nicht-parametrischen Analysen mit *SigmaStat* 2.0 (Jandel Scientific) durchgeführt. Die Häufigkeitsverteilungen wurden mit *Statistica* 5.1 (Statsoft Inc.) erstellt.

3 ERGEBNISSE: SMA1

3.1 Zuchterfolg

Wie aus **Tab. 3** zu ersehen ist, führen alle beschriebenen Kombinationen elterlicher Genotypen zu überlebenden Jungtieren am Tag 21. Allerdings ist die Erfolgsrate der Zucht nicht unbeeinflusst vom Genotyp der Parentalgeneration: Bei einem Drittel aller [*Sma1/Sma1* x *Sma1/Sma1*]-Zuchtpaare werden die Nachkommen tot geboren oder sterben unmittelbar nach der Geburt (1.-2. Lebenstag). Alle toten Juvenilen wurden innerhalb der ersten 48 h gefunden, und bis auf eine Ausnahme, die als Zuchterfolg gewertet wurde, gab es in diesen Würfen keine weiteren überlebenden Juvenilen mehr. Zuchtpaare unter Beteiligung heterozygoter SMA1-Männchen haben zu einem höheren Prozentsatz keine Nachkommen.

Tabelle 3: Zuchterfolg (%) verschiedener elterlicher Kombinationen von SMA1- und WT-Mäusen. In Klammern: Anzahl der Zuchtpaaren aus N=137 Zuchtpaaren (118 Weibchen).

Genotyp des Zuchtpaares (♂x♀)	n	mit lebenden Nachkommen	Abort/ Infantizid	keine Nachkommen
+/+ x +/+	24	83.3% (20)	4.2% (1)	12.5% (3)
<i>Sma1</i> /+ x +/+	45	66.7% (30)	13.3% (6)	20.0% (9)
+/+ x <i>Sma1</i> /+	7	85.7% (6)	-	14.3% (1)
<i>Sma1</i> /+ x <i>Sma1</i> /+	41	75.6% (31)	4.9% (2)	19.5% (8)
<i>Sma1/Sma1</i> x <i>Sma1/Sma1</i>	20	65.0% (13)	30.0% (6)	5.0% (1)

Wie **Tab. 4** illustriert, ist die Wurfgröße abhängig vom Genotyp des Weibchens. Dies wird nicht nur in der mittleren Anzahl, sondern auch in der maximalen Zahl der Nachkommen deutlich. Je kleiner und leichter das mütterliche Tier (Genotyp), desto geringer der Zuchterfolg. Eine Ausnahme in dieser Reihung bilden die Würfe aus [+/-Männchen x *Sma1*/+-Weibchen], allerdings ist die Stichprobengröße hier vergleichsweise gering. Die Tragzeit scheint unbeeinflusst vom Genotyp des Weibchens und entspricht mit 21-23 Tagen dem Erwartungswert für Mäuse (Silver 1995).

Tabelle 4: Einfluss des elterlichen Genotyps auf die Wurfgröße

Genotyp Zuchtpaar (♂x♀)	n	Wurfgröße			Tragzeit (Tage) [#]		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max
+/+ x +/+	20	3	6	10	20	22	46
<i>Sma1</i> /+ x +/+	30	3	6	9	20	22	38
+/+ x <i>Sma1</i> /+	6	3	5-6	7	20	21-22	31
<i>Sma1</i> /+ x <i>Sma1</i> /+	31	1	4	6	20	23	34
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i> x <i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	13	2	3	4	20	23	42

#Tragzeit: Zeitintervall von der Zuchtpaarbildung bis zur Geburt der Nachkommen.

3.2 Häufigkeitsverteilung der Genotypen

Die Häufigkeitsverteilungen unter den Genotypen stehen im Einklang mit den Erwartungswerten für einen dominanten Erbgang nach MENDEL (Tab. 5).

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung der Genotypen aus N=79 Zuchtpaaren verschiedener Kombinationen an elterlichen Genotypen. n= Anzahl der Individuen.

Genotyp Zuchtpaar (♂x♀)	Genotyp Nachkommen	n	beobachtet (%)	erwartet (%)	p
<i>Sma1</i> /+ x +/+ (n=36)	+/+	88	47.3	50.0	0.46
	<i>Sma1</i> /+	98	52.7	50.0	
+/+ x <i>Sma1</i> /+ (n=6)	+/+	15	48.4	50.0	0.86
	<i>Sma1</i> /+	16	51.6	50.0	
<i>Sma1</i> /+ x <i>Sma1</i> /+ (n=37)	+/+	44	29.5	25.0	0.21
	<i>Sma1</i> /+	76	51.0	50.0	
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	29	19.5	25.0	

Homozygote SMA1-Mäuse aus [*Sma1*/+ x *Sma1*/+]-Verpaarungen treten zwar zu einem geringeren Prozentsatz auf, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant abweichend von 25% (p=0.21; $\chi^2=3.081$, df=2). Möglicherweise deutet sich aber eine Pathologie des homozygoten Genotyps an, die erst bei genügend hoher Stichprobe signifikant wird. Da postnatal nie selektiv homozygote Juvenile aus [*Sma1*/+ x *Sma1*/+]-Kombinationen tot aufgefunden wurden, müßte es sich um einen pränatalen Effekt handeln.

Die Verteilung der Geschlechter beträgt unter allen Genotypen etwa 50%:50% (Daten nicht gezeigt).

3.3 Sexuelle Reifung der Weibchen

Insgesamt 42 Weibchen aus 18 Würfen wurden auf ihren Reproduktionsstatus hin untersucht. **Abb. 14** stellt den Anteil der Mäuse mit offener Vagina in Abhängigkeit vom Alter als KAPLAN-MEIER-Plot dar. Deutlich ist zu erkennen, dass homozygote SMA1-Weibchen bei der Öffnung der Vagina älter sind als WT- bzw. heterozygote Weibchen. Während alle untersuchten heterozygoten SMA1- und WT-Weibchen bis spätestens zu Beginn der 5. Woche eine offene Vagina aufweisen (**Tab. 6**), kann dieser als Teil des sexuellen Reifungsprozesses zu erachtende Status bei homozygoten SMA1-Mäusen bis zum Erreichen der 8. Lebenswoche eintreten. Es lässt sich kein Unterschied zwischen WT und heterozygoten SMA1-Mutanten nachweisen, im Vergleich zu WT-Mäusen haben heterozygote SMA1-Weibchen sogar die Tendenz zu kürzeren Reifungszeiten bis zur Öffnung der Vagina.

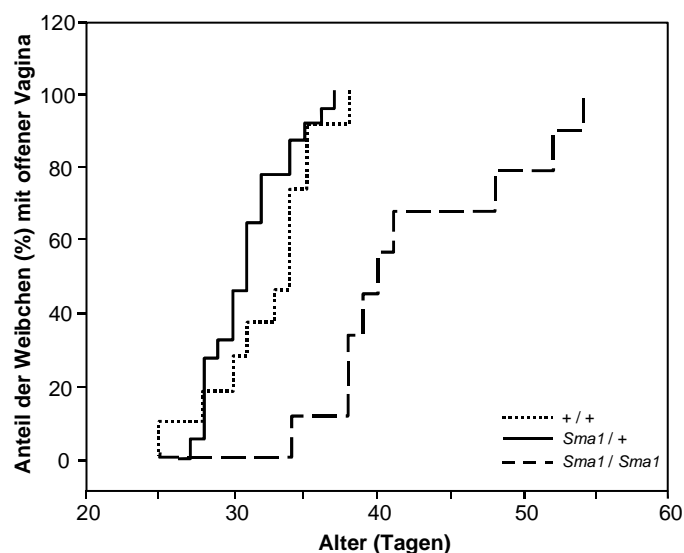


Abbildung 14: Alter bis zur Öffnung der Vagina (KAPLAN-MEIER-PLOT) als Maß für die sexuelle Reifung von weiblichen WT- und SMA1-Weibchen (n=11-22).

Tabelle 6: Medianes Lebensalter (Tage) von weiblichen WT- und SMA1-Mäusen bei der Öffnung der Vagina als Maß für die sexuelle Reifung, die bei homozygoten SMA1 später eintritt ($p < 0.001$, $\chi^2 = 33.401$).

Genotyp	n	Median (Tag)	95%CI	Min-Max (Tag)
+/+	11	34	32-36	25-38
Sma1/+	22	31	30-32	27-37
Sma1/Sma1	9	40	37-43	34-54

3.4 Körpermasse und Wachstumsraten

In **Abb. 15** und **Abb. 16** sind die Häufigkeitsverteilungen der Körpergewichte von WT-, heterozygoten und homozygoten SMA1- Männchen bzw. Weibchen aus verschiedenen Kombinationen elterlicher Genotypen im Alter von 6 Wochen, 10 Wochen und 5-6 Monaten dargestellt. Während z.B. männliche WT-Mäuse im geschlechtsreifen Adultzustand (2-3 Monaten = 70 Tage) eine Körpermasse von ca. 28 g haben, wiegen heterozygote SMA1-Männchen durchschnittlich etwa 19 g und homozygote SMA1-Männchen sogar nur ca. 13 g. Die mittleren Gewichtsunterschiede zwischen den Genotypen bestehen bis mindestens zum Alter von 5-6 Monaten und persistieren vermutlich lebenslang (optischer Eindruck anhand der Mausekolonie). Allerdings verbreitert sich die Spanne intragenotypischer Gewichte mit zunehmendem Alter.

Der Geschlechterdimorphismus in der Körpermasse zeigt sich nicht nur bei WT- sondern auch bei heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen.

Angesichts der deutlichen Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen ließen sich auf Basis des Phänotypisierungskriteriums Körpermasse am Tag 41-43 (6 Wochen) Träger des *Sma1*-Allels mit einer Sicherheit (Sensitivität) von 95.8% identifizieren, WT-Mäuse sogar mit 99%iger Sicherheit (Spezifität). Homozygote SMA1-Männchen würden bei einem Schwellenwert von ≤ 13.0 g am Tag 42 ± 1 zu 96.8% „richtig“ phänotypisiert, heterozygote SMA1-Männchen mit 96.8% Sicherheit. Bei den Weibchen würde die Irrtumswahrscheinlichkeit zum Schwellenwert ≤ 11.3 g am Tag 42 ± 1 jeweils ca. 3.0% betragen. Der (Gewichts-) Phänotyp am Tag 42 ± 1 bietet also ein handliches Kriterium zur Unterscheidung der Genotypen.

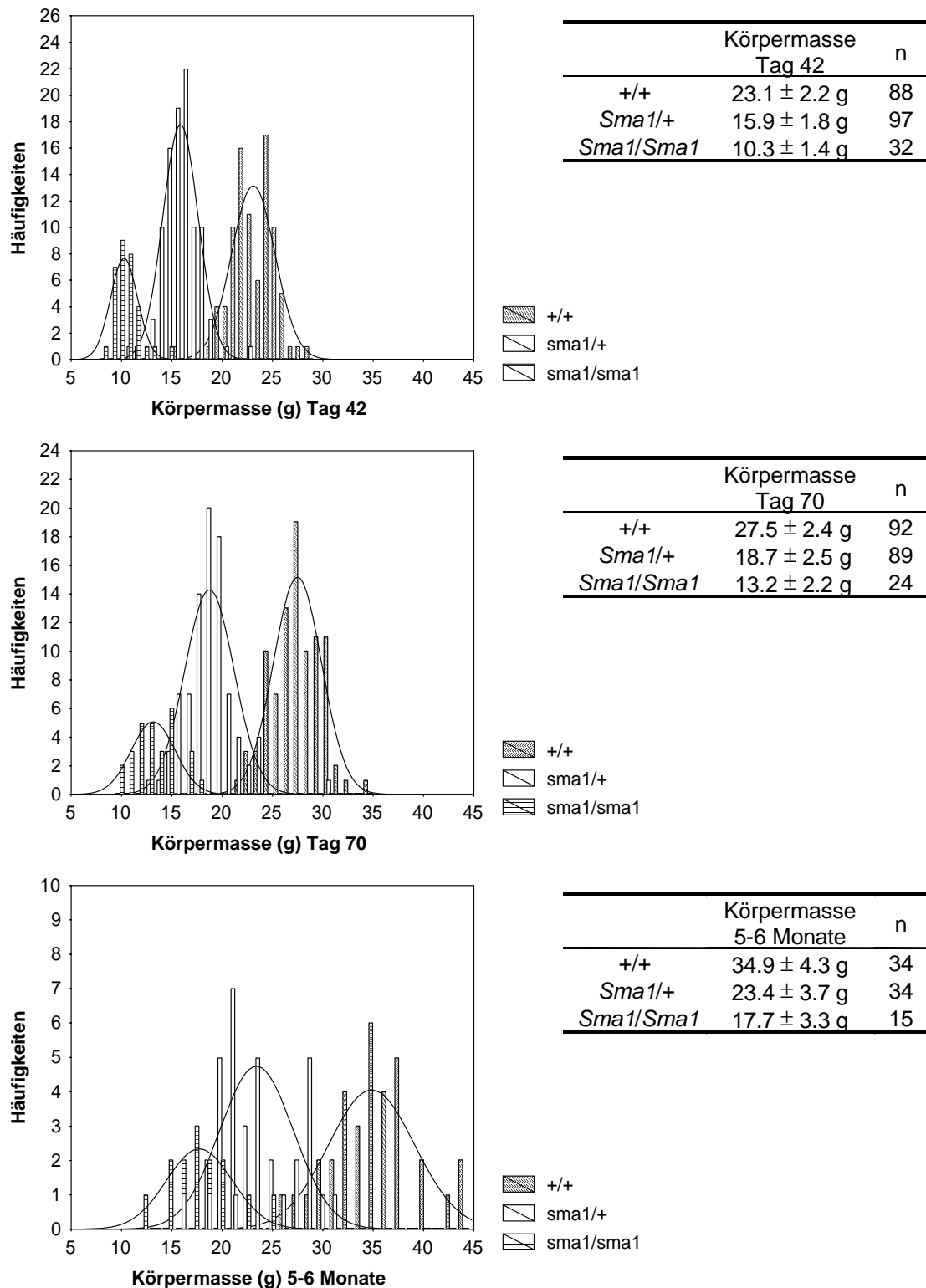


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilungen der Körpermasse von männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 42 (±1) Tagen, 70 (±1) Tagen und 5-6 Monaten (Tag 140-187).

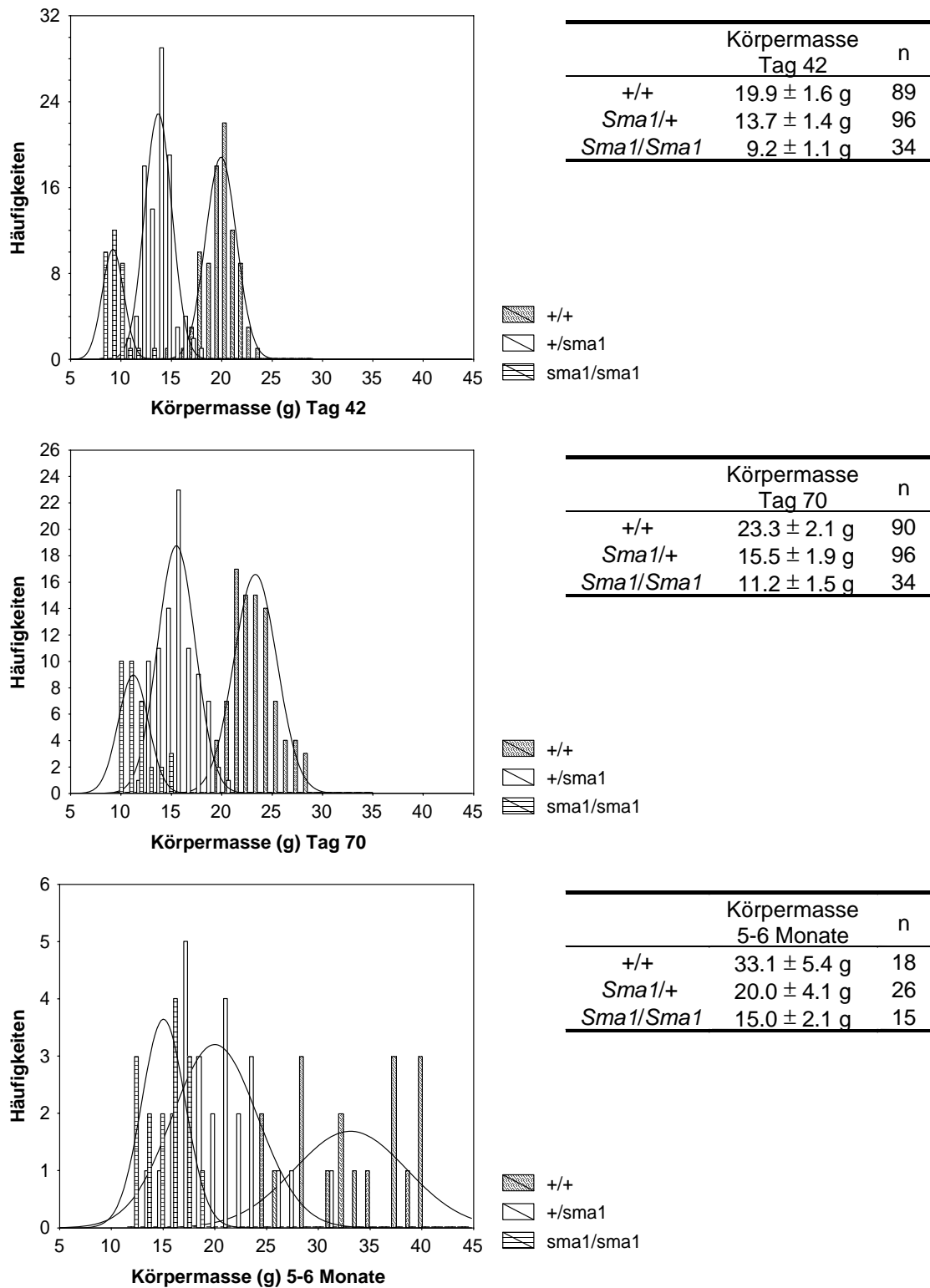


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilungen der Körpermasse von weiblichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 42 (±1) Tagen, 70 (±1) Tagen und 5-6 Monaten (Tag 140-187).

Wie sich in den Wachstumskurven und den Wachstumsraten (**Abb. 17**) zeigt, ist der peripubertale Wachstumsschub, der bei WT-Mäusen normalerweise zwischen der 3. und 4. Lebenswoche einsetzt, reduziert bei heterozygoten und praktisch nicht vorhanden bei homozygoten SMA1-Mäusen. Statistisch unterscheidet sich die Wachstumsrate bei homozygoten SMA1-Weibchen zwischen Tag 21 und Tag 28 nicht von der zwischen Tag 63 und Tag 70 ($p=0.63$, $n=10$). Bei homozygoten SMA1-Männchen ist die Wachstumsrate bei 10 Wochen alten Tieren zwar signifikant niedriger im Vergleich zur Wachstumsrate zwischen Tag 21 und Tag 28 ($p=0.03$, $n=11$), die mittlere Differenz beträgt aber nur 0.28 g (95%CI: 0.03-0.53 g). Die Wachstumsraten homozygoter SMA1-Mäuse sind also während der ersten 10-12 Lebenswochen praktisch konstant. Die postpubertären Wachstumsraten (Tag 49 bis Tag 70) sind bei allen Genotypen ähnlich und betragen ca. 0.8-0.9 g/Woche (Männchen) bzw. ca. 0.5-0.7 g/Woche (Weibchen).

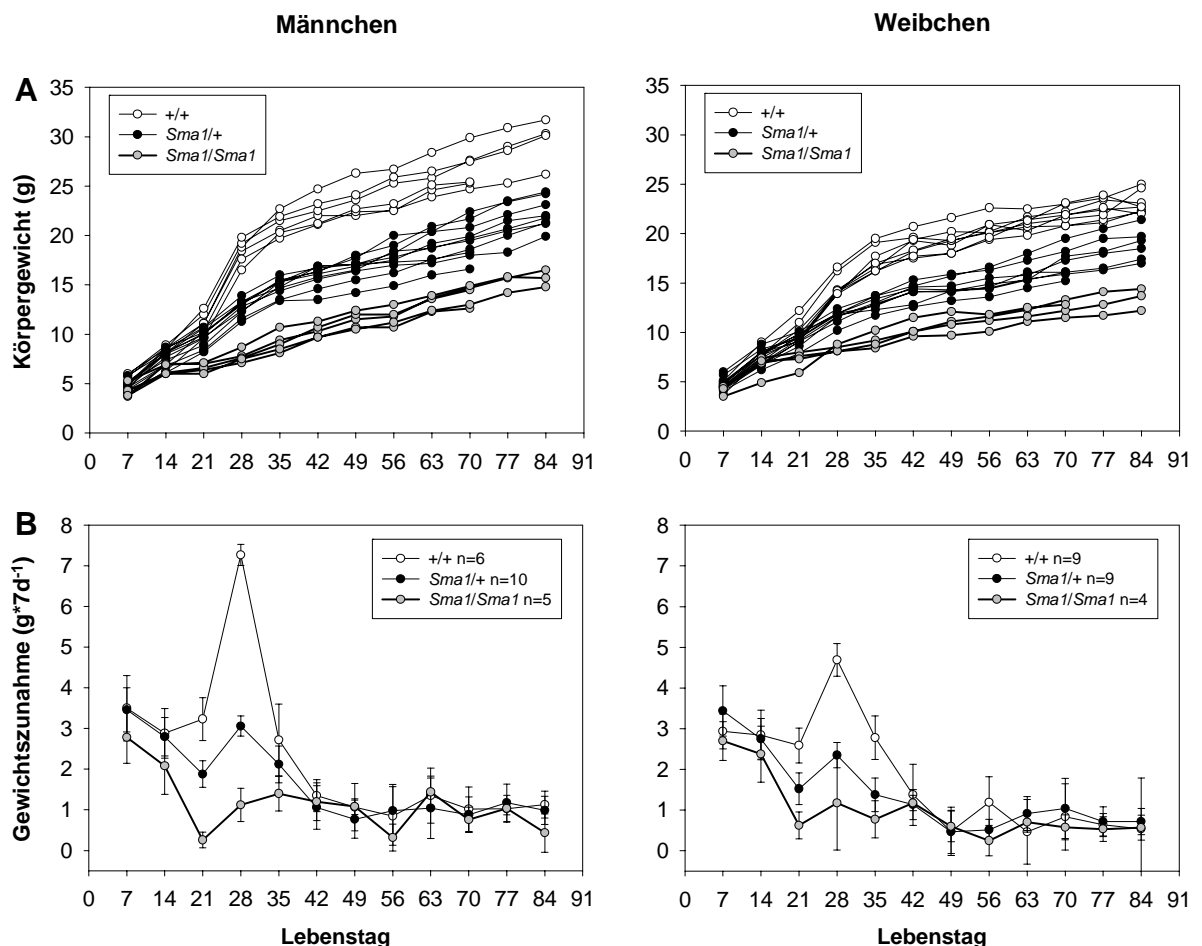


Abbildung 17: (A) Wachstumskurven und (B) kumulative Gewichtszunahme (7 Tage) von männlichen und weiblichen Nachkommen aus $n=12$ [*Sma1/+* x *Sma1/+*]-Zuchtpaaren von Tag 7 bis Tag 84 (Tag 70). Als Ausgangsgewicht (Tag 0) in (B) wurde eine einheitliche Körpermasse von 1.5 g angenommen (siehe auch Text).

Bereits am Tag 7 zeichnen sich die homozygoten SMA1-Mäuse als Leichteste ihres Wurfes aus (**Abb. 18**). Im Mittel ist die Körpermasse homozygoter SMA1-Mäuse am Tag 7 (Männchen: 3.7-5.3 g, n=5; Weibchen: 3.5-4.5 g, n=4) aber nicht signifikant verschieden von der Körpermasse heterozygoter SMA1-Mäuse (Männchen: 4.0-5.8 g, n=10, Weibchen: 4.1-6.0 g, n=9) oder WT-Mäuse (Männchen: 4.0-6.0 g, n=6; Weibchen: 3.7-5.1 g, n=9). Mittelwerts-Analysen wie **Abb. 17 A** und **B** können allerdings mögliche (geringe) Unterschiede zwischen den Genotypen angesichts des nachweisbaren Einflusses der Wurfgröße auf die Körpermasse von Juvenilen (vgl. **Abb. 18** und **19**) bei geringer Stichprobengröße statistisch nicht detektieren. Nicht-systematische Wägungen einzelner Jungtiere am Tag 1 deuten darauf hin, dass das Geburtsgewicht sowohl von WT- als auch von homozygoten SMA1-Mäusen bei etwa 1.1-1.6 g liegt (n=4 Individuen pro Genotyp aus verschiedenen Würfen ähnlicher Wurfgrößen) und damit gleich oder nur geringfügig verschieden ist. Ab Tag 14 lässt sich bei den Männchen ein Unterschied im mittleren Gewicht von WT- und SMA1-Mäusen erstmals signifikant nachweisen, bei Weibchen ab der dritten Lebenswoche.

Während sich der Effekt der Wurfgröße auf das Gewicht der Jungtiere eines Wurfs bis spätestens zum Tag 42 nivelliert (**Abb. 19**), weist eine genauere Analyse der Gewichtsdaten auf einen möglichen zusätzlichen Einfluss des Genotyps der Mutter auf die Körpermasse der Nachkommen hin: Bei gleichem Geschlecht liegen am Tag 21 die Körpermassen von WT- und heterozygoten SMA1-Jungmäusen aus Würfen von SMA1-Weibchen unter denen der Jungmäuse aus Würfen von WT-Weibchen, unabhängig vom Genotyp des Männchens. In **Abb. 19** ist dies beispielhaft für männliche WT-Mäuse aus verschiedenen Zuchtpaar-Kombinationen dargestellt. Tatsächlich sind bei diesem Genotyp Männchen und Weibchen aus Zuchtpaar-Kombinationen von [+/-Männchen x *Sma1*/+-Weibchen] bzw. [*Sma1*/+-Männchen x *Sma1*/+-Weibchen] nicht nur im Mittel am Tag 21 (nicht dargestellt, da hier zusätzliche Effekte der Wurfgröße den Mittelwert beeinflussen, vgl. **Abb. 19**), sondern auch noch am Tag 42 bzw. Tag 70 (nur Männchen) leichter als WT-Mäuse aus [+/- x +/-] oder [*Sma1*/+-Männchen x +/-Weibchen]-Zuchtpaaren (**Tab. 7**). Die absoluten Unterschiede sind allerdings gering und führen nicht zu einer statistisch (mittels KOLMOGOROV-SMIRNOV-Anpassungstest) nachweisbaren Abweichung von der Normalverteilung in den Häufigkeitsverteilungen der Gewichte von WT-Mäusen. Für heterozygote SMA1-Mäuse konnte dagegen am Tag 42 bzw. Tag 70 kein Einfluss des maternalen Genotyps mehr auf das mittlere Gewicht der Nachkommen festgestellt werden (vgl. **Tab. 7**).

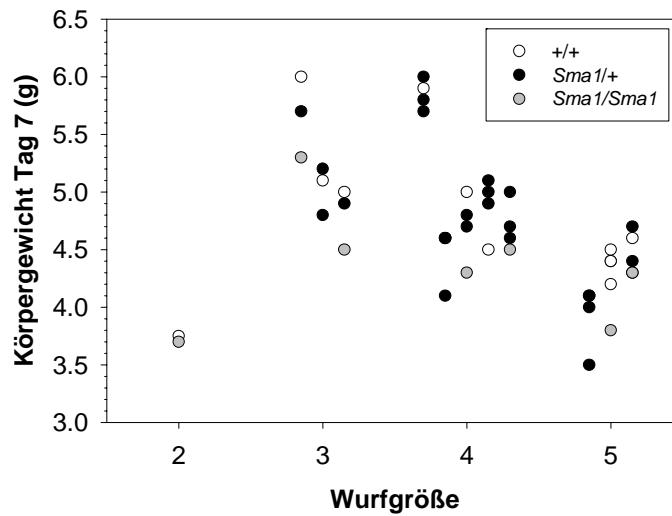


Abbildung 18: Zusammenhang von Körpermasse und Wurfgröße (n=12 Würfe) von WT- und SMA1-Mäusen am 7. Lebenstag. Homozygote SMA1-Mäuse zeichnen sich bereits am Tag 7 als leichteste ihres Wurfes aus, WT-Mäuse sind aber nicht immer die schwersten Individuen.

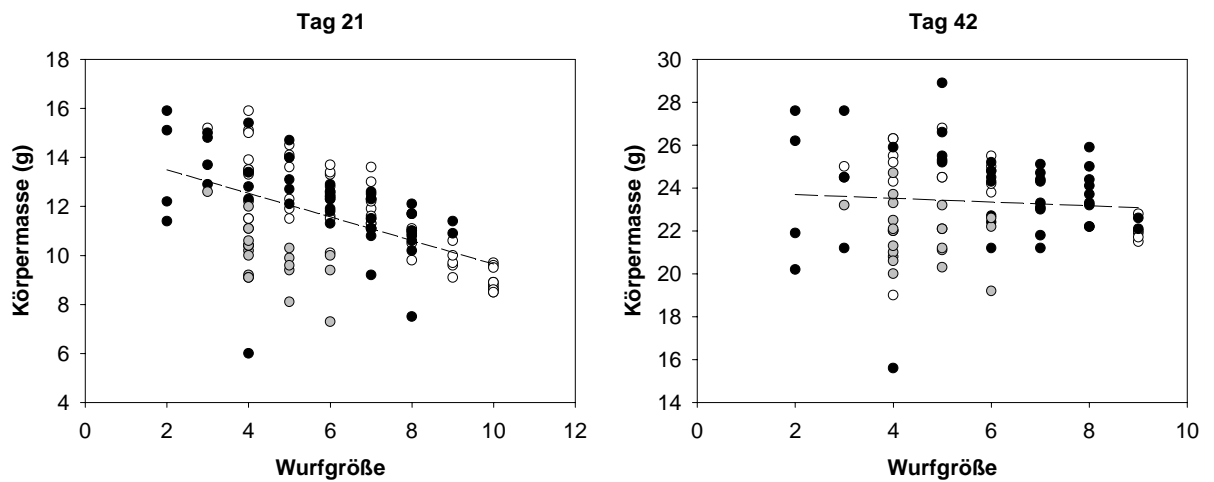


Abbildung 19: Abhängigkeit der Körpermasse männlicher +/+ Mäuse von der Wurfgröße am Tag 21 ($r^2=0.27$, $p<0.001$, $N=124$) bzw. Tag 42 ($p>0.05$, $N=82$). Die gestrichelten Linien visualisieren die (linearen) Zusammenhänge. Die Symbole illustrieren verschiedene Kombinationen von Genotypen [$\text{♂} \times \text{♀}$]: weiß: [$+/+ \times +/+$]; schwarz: [$Sma1/+ \times +/+$]; grau: [$Sma1/+ \times Sma1/+$].

Tabelle 7: Mittlere Körpermasse (g) von WT- und heterozygoten SMA1-Mäusen aus verschiedenen Zuchtpaar-Kombinationen am Tag 42 (A) und (B) am Tag 70. a,b,c: p<0.05. In Klammern angegeben: Anzahl der Individuen.

(A) Körpermasse Tag 42

Genotyp	Genotyp des Zuchtpaares (♂x♀)				
	+/+ x +/+	<i>Sma1</i> /+ x +/+	+/+ x <i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> /+ x <i>Sma1</i> /+	
Männchen	+/+	24.0±1.6 ^a (16)	22.8±1.1 ^{a,c} (9)	21.2±1.3 ^{b,c} (7)	21.9±1.3 ^{b,c} (17)
	<i>Sma1</i> /+	-	15.2±1.2 (13)	15.2±1.0 (6)	15.3±1.3 (23)
Weibchen	+/+	20.0±2.1 ^a (18)	20.1±0.7 ^a (15)	17.0±1.7 ^b (4)	18.5±1.0 ^b (15)
	<i>Sma1</i> /+	-	13.5±1.3 (10)	12.8±1.4 (5)	13.4±1.2 (25)

(B) Körpermasse Tag 70

Genotyp	Genotyp des Zuchtpaares (♂x♀)				
	+/+ x +/+	<i>Sma1</i> /+ x +/+	+/+ x <i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> /+ x <i>Sma1</i> /+	
Männchen	+/+	28.5±2.0 ^a (16)	27.7±1. ^{a,c} (9)	25.7±2.3 ^{b,c} (7)	25.7±1.8 ^{b,c} (17)
	<i>Sma1</i> /+	-	18.3±2.4 (13)	19.6±2.0 (6)	18.3±2.3 (23)
Weibchen	+/+	24.3±2.1 ^a (18)	22.7±0.9 ^{b,c} (15)	20.4±1.1 ^b (4)	21.6±1.1 ^{b,c} (15)
	<i>Sma1</i> /+	-	15.1±2.0 (10)	15.9±2.4 (5)	15.5±2.0 (25)

Zusammenfassung

Träger des *Sma1*-Allels zeigen eine deutliche Störung im postnatalen Wachstum, insbesondere während der Pubertät (Tag 21- Tag 35). Im Alter von 2-3 Monaten führt dies zur Verringerung der Körpermasse um ~30% bei heterozygoten und um ~50% bei homozygoten SMA1- im Vergleich zu WT-Mäusen. Die Gewichtsunterschiede zwischen den Genotypen persistieren vermutlich lebenslang und betreffen beide Geschlechter. Männliche Mäuse sind bei allen Genotypen schwerer als weibliche Mäuse.

Das mittlere Geburtsgewicht und die Wachstumsraten in den ersten zwei Wochen unterscheiden sich nicht zwischen den Genotypen. Allerdings zeichnen sich homozygote SMA1-Mäuse ab Tag 7 als Leichteste unter den Individuen eines Wurfs aus. Im Mittel

sind sie aber ohne Adjustierung für die Anzahl der Jungtiere eines Wurfes frühestens ab Tag 14 statistisch signifikant leichter.

Die Wachstumsraten von homozygoten SMA1-Mäusen sind ab einem Alter von 3 Wochen praktisch konstant und entsprechen den Wachstumsraten postpubertärer WT-Mäuse.

Im Alter von 3 Wochen korreliert die Körpermasse der Jungmäuse negativ mit der Wurfgröße. Der Genotyp der Mutter hat dabei möglicherweise einen zusätzlichen Einfluss auf die Körpermasse ihrer Nachkommen: Am Tag 21 und noch nachweisbar bis Tag 42 sind +/-Nachkommen aus [+/-Weibchen x *Sma1*/+ Männchen]-Zuchtpaaren schwerer als die +/-Nachkommen von heterozygoten SMA1-Weibchen aus vergleichbaren Wurfgrößen. Bei *Sma1*/+-Mäusen ist der Effekt nur im Alter von 3 Wochen zu erkennen. Männliche WT-Nachkommen von SMA1-Mäusen sind sogar im Adultzustand (Tag 70) noch geringfügig leichter.

3.5 Körperlängen

Im Alter von 8 Wochen sind Träger des *Sma1*-Allels nicht nur leichter, sondern auch kleiner (**Tab. 8**). Diese Reduktion in der Größe bzw. Länge zeigt sich in allen gemessenen Körperteilen. In ihrer Körperlänge (Kopf-Rumpf) sind die Weibchen aller Genotypen kürzer als die Männchen ($p < 0.001$), allerdings ist der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen bei homozygoten SMA1-Mäusen knapp nicht signifikant (t-Test: $p < 0.1$). In den übrigen Parametern lässt sich bei allen Genotypen statistisch kein Geschlechterdimorphismus nachweisen.

Wie in **Abb. 20** dargestellt, korreliert die Kopf-Rumpf-Länge innerhalb der Genotypen mit der Körpermasse ($0.342 \leq r^2 \leq 0.718$, alle $p < 0.01$). Im Anhang (Tab. I) sind die Gleichungen für den geschätzten linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse und Körperlänge für jeden Genotyp aufgeführt. Anhand der Parallelverschiebung der Regressionsgeraden für jeden Genotyp ist zu erkennen, dass die Körperlängen von SMA1-Mutanten nicht-proportional mit der Körpermasse reduziert sind. Bei gleicher Körpermasse (15.6 g) ist die Kopf-Rumpf-Länge einer heterozygoten SMA1- etwa 4.7 mm (95%CI: 2.0-7.3 mm) kürzer als die einer WT-Maus; die homozygote SMA1-Maus ist um 9.9 ± 2.0 mm kürzer (95%CI: 6.0-13.9 mm, $p < 0.001$). Der Unterschied zwischen homozygoten und heterozygoten SMA1-Mäusen beträgt etwa 5.2 mm (95%CI: 2.6-7.9 mm, $p < 0.001$). Wie man anhand der großen Konfidenzintervalle sehen kann, ist aber diese Schätzung nicht zuletzt auch aufgrund der großen Variabilität in den Körperlängen bei den homozygoten

SMA1-Mäusen unpräzise. Insbesondere die beiden sehr kleinen Individuen (<70 mm) beeinflussen hier maßgeblich die Steigung der Regressionsgeraden.

Tabelle 8: Mittlere Körperlängen in mm (\pm SD) von 8 Wochen alten WT- und SMA1-Nachkommen aus [*Sma1*/+ x *Sma1*/+]-Verpaarungen. a,b,c: $p < 0.05$ für den Vergleich der Längen innerhalb der Geschlechter.

	Männchen			Weibchen		
	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>
	n=15	n=22	n=9	n=10	n=27	n=11
Kopf-Rumpf	95.8 \pm 1.7 ^a (92-98)	84.1 \pm 2.0 ^b (80-87)	74.0 \pm 3.0 ^c (70-79)	92.1 \pm 2.1 ^a (89-96)	81.8 \pm 2.1 ^b (77-87)	70.8 \pm 5.0 ^c (61-76)
Schwanz	83.9 \pm 3.4 ^a (74-89)	75.0 \pm 2.7 ^b (69-79)	62.2 \pm 2.9 ^c (58-68)	82.9 \pm 3.5 ^a (79-90)	74.2 \pm 3.0 ^b (67-79)	64.5 \pm 2.9 ^c (60-71)
Tarsus	18.7 \pm 0.5 ^a (17.6-19.6)	18.2 \pm 0.3 ^b (17.5-19.0)	16.7 \pm 0.3 ^c (16.4-17.1)	18.3 \pm 0.4 ^a (17.8-19)	17.9 \pm 0.6 ^b (16.6-19.2)	16.7 \pm 0.5 ^c (15.6-17.4)
Kopf	24.7 \pm 0.5 ^a (24.0-26.2)	23.2 \pm 0.5 ^b (22.2-24.0)	21.1 \pm 0.3 ^c (20.7-21.6)	24.4 \pm 0.3 ^a (24.0-25.0)	22.9 \pm 0.5 ^b (22.0-23.7)	21.1 \pm 0.4 ^c (20.5-22.0)

Auch die Schwanz-, Kopf- und Tarsuslängen korrelieren bei allen Genotypen mit der Körpermasse ($0.087 \leq r^2 \leq 0.258$, $0.052 \leq p \leq 0.001$, je nach Variable und Genotyp). Mit Ausnahme der Schwanz- und Tarsuslängen bei homozygoten SMA1-Mäusen sind die Zusammenhänge alle signifikant ($p < 0.05$). Auf eine weitere Auswertung im Hinblick auf quantitative Unterschiede zwischen den Genotypen wurde hier aber verzichtet, da die Messungenauigkeiten im Vergleich zu den Unterschieden zwischen den Genotypen zu groß wären, um sie mit dieser Stichprobe zu detektieren. Die Schwanzlänge ist ähnlich der Kopf-Rumpf-Länge nicht-proportional mit der Körpermasse reduziert (vgl. Abb 20).

Zusammenfassung

Im Alter von 8 Wochen sind SMA1-Mäuse nicht nur leichter, sondern auch kleiner (kürzer) als ihre WT-Geschwister. Die naso-anale Länge von SMA1-Mäusen ist nicht-proportional zur Körpermasse erniedrigt, wobei ein abgestufter Unterschied von ca. 5-6 mm zwischen Genotypen gleicher Körpermasse zu beobachten ist. SMA1-Mäuse sind also entweder zu klein für ihre Körpermasse oder zu schwer für ihre Größe.

Während die WT- und heterozygoten SMA1-Weibchen deutlich kleiner sind als die Männchen, ist ein Geschlechterdimorphismus in der Körperlänge bei homozygoten SMA1-Mäusen statistisch nicht nachweisbar, auch wenn sie tendenziell etwas leichter als die Männchen sind.

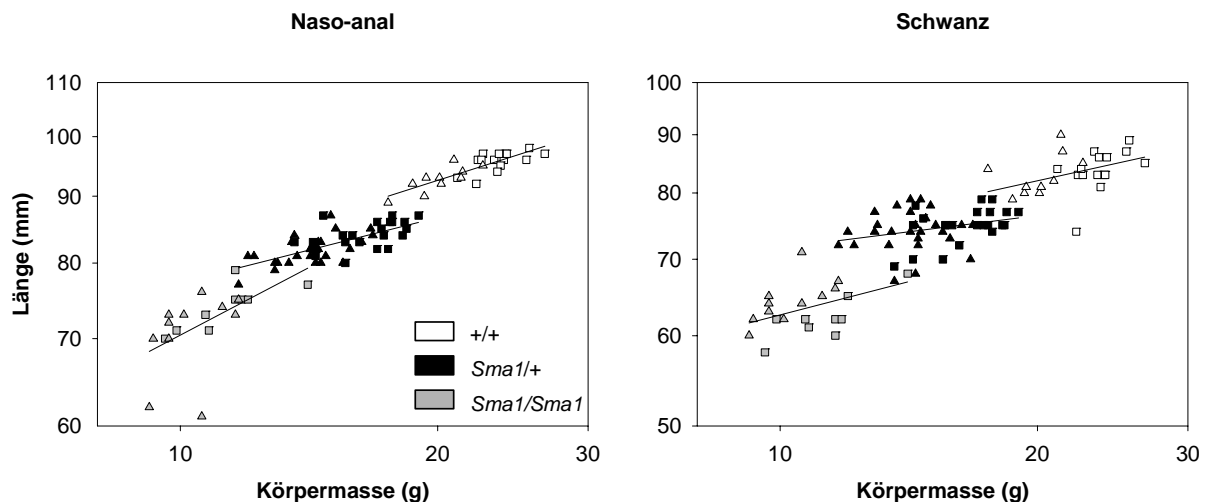


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Körpermasse und Länge (naso-anal bzw. Schwanz) von WT- (n=25) und SMA1- (n=49 *Sma1/+* bzw. n=20 *Sma1/Sma1*) Mäusen aus [*Sma1/+* x *Sma1/+*]-Verpaarungen im Alter von 8 Wochen. Quadrate: Männchen, Dreiecke: Weibchen

3.6 Organgewichte

Im Alter von 3 Monaten sind alle daraufhin untersuchten Organe bei SMA1- im Mittel leichter als bei WT-Mäusen, wobei heterozygote SMA1-Mäuse jeweils intermediäre Organgewichte zeigen. (Tab. 9). Zwischen 3 und 5 Monaten erhöhen sich beim WT die Gewichte der Organe, mit Ausnahme des Gehirns, welches in seiner Masse nahezu unverändert bleibt. Die Organe heterozygoter 5 Monate alter SMA1-Mäuse sind unverändert bis leicht erhöht in ihrer Masse im Vergleich zu 3 Monate alten Tieren, bei homozygoten SMA1-Mäusen ist ein statistisch signifikanter Unterschied (Zunahme) im Nieren- und Herzgewicht festzustellen (t-Test: $p=0.001$ für Herz, $p=0.002$ für Niere).

Abb. 21 stellt die Abhängigkeit der Organgewichte von der Körpermasse dar. In Tab. II im Anhang sind die Korrelations- und Regressionskoeffizienten für die in Abb. 18 dargestellten Zusammenhänge aufgeführt. Da sich die Steigungen der Geradengleichungen für die geschätzten, linearen Beziehungen zwischen Körpermasse und Organgewicht jedes Genotyps zwischen den 3 und 5 Monate alten Tieren nicht signifikant unterschieden, wurde hier nur nach Genotyp ausgewertet (n=10-12). Während Hoden-, Milz-, Leber- und Nierenmasse bei allen Genotypen signifikant mit der Körpermasse korrelieren, kann bei keiner Gruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen Körpermasse und Gehirngewicht nachgewiesen werden. Für das Herzgewicht ergibt sich nur bei heterozygoten SMA1-Mäusen keine signifikante Korrelation mit der Körpermasse. Anhand der Abbildungen bzw. Regressionskoeffizienten wird deutlich, dass

bei allen Genotypen die Organgewichte mit ähnlichen Steigungen vom Körpergewicht abhängen.

Tabelle 9: Mittlere Körpermassen (BM) und Körperlängen sowie Gewichte verschiedener Organe von männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten. Aufgeführt sind Mittelwerte (\pm SD).a,b,c: $p < 0.05$, getrennt nach Alter.

	3 Monate			5 Monate		
	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>
	n=7	n=6	n=5	n=5	n=6	n=5
Alter (Tage)	81 (72-86)	84 (79-86)	74 (64-74)	151 (146-160)	149 (146-150)	156 (149-160)
BM (g) (Min-Max)	25.9 \pm 2.5 ^a (21.5-28.7)	18.1 \pm 3.0 ^b (13.7-21.8)	11.6 \pm 1.8 ^c (9.6-14.4)	36.3 \pm 5.5 ^a (30.5-44.5)	21.3 \pm 3.6 ^b (17.9-28.1)	17.2 \pm 1.9 ^c (15.2-20.0)
Länge (mm) (Min-Max)	97.7 \pm 3.2 ^a (91-100)	84.7 \pm 3.3 ^b (80-89)	71.8 \pm 2.2 ^c (70-75)	104.0 \pm 2.4 ^a (102-108)	88.7 \pm 1.5 ^b (87-91)	79.6 \pm 2.1 ^c (77-82)
Gehirn (g)	0.455 \pm 0.017 ^a	0.417 \pm 0.035 ^b	0.364 \pm 0.015 ^c	0.464 \pm 0.020 ^a	0.412 \pm 0.015 ^b	0.374 \pm 0.016 ^c
Hoden (g)	0.198 \pm 0.023 ^a	0.176 \pm 0.027 ^b	0.117 \pm 0.016 ^c	0.229 \pm 0.024 ^a	0.175 \pm 0.018 ^b	0.133 \pm 0.011 ^c
Milz (g)	0.070 \pm 0.085 ^a	0.043 \pm 0.006 ^b	0.029 \pm 0.004 ^c	0.088 \pm 0.018 ^a	0.047 \pm 0.006 ^b	0.036 \pm 0.006 ^b
Leber (g)	1.373 \pm 0.143 ^a	0.795 \pm 0.134 ^b	0.530 \pm 0.035 ^c	1.706 \pm 0.282 ^a	0.747 \pm 0.065 ^b	0.608 \pm 0.083 ^b
Niere (g)	0.500 \pm 0.072 ^a	0.307 \pm 0.059 ^b	0.158 \pm 0.018 ^c	0.638 \pm 0.133 ^a	0.321 \pm 0.039 ^b	0.227 \pm 0.024 ^b
Herz (g)	0.115 \pm 0.007 ^a	0.087 \pm 0.015 ^b	0.047 \pm 0.004 ^c	0.138 \pm 0.018 ^a	0.081 \pm 0.008 ^b	0.066 \pm 0.008 ^b

Die Resultate der ANCOVA für den Faktor Genotyp sind in **Abb. 22** dargestellt. Es wurden nur die Organe mit signifikanter Abhängigkeit vom Körpergewicht berücksichtigt, d.h. Hoden, Leber, Milz und Nieren. Bei gleicher Körpermasse (21.9 g) wäre die geschätzte mittlere Masse von Hoden, Leber, Milz und Nieren einer WT-Maus signifikant erhöht zur geschätzten Masse dieser Organe bei den SMA1-Mutanten. Insbesondere die Leber wäre bei den SMA1-Mäusen deutlich leichter (95%CI für die Differenz zum WT: *Sma1/+*: 0.281-0.631 g; *Sma1/Sma1*: 0.280-0.552 g). Nur im Nierengewicht resultierte zusätzlich signifikanter ein Unterschied zwischen den homozygoten und heterozygoten SMA1-Mäusen, so dass die Nieren heterozygoter SMA1-Mäuse bei gleicher Körpermasse intermediäre Masse hätten.

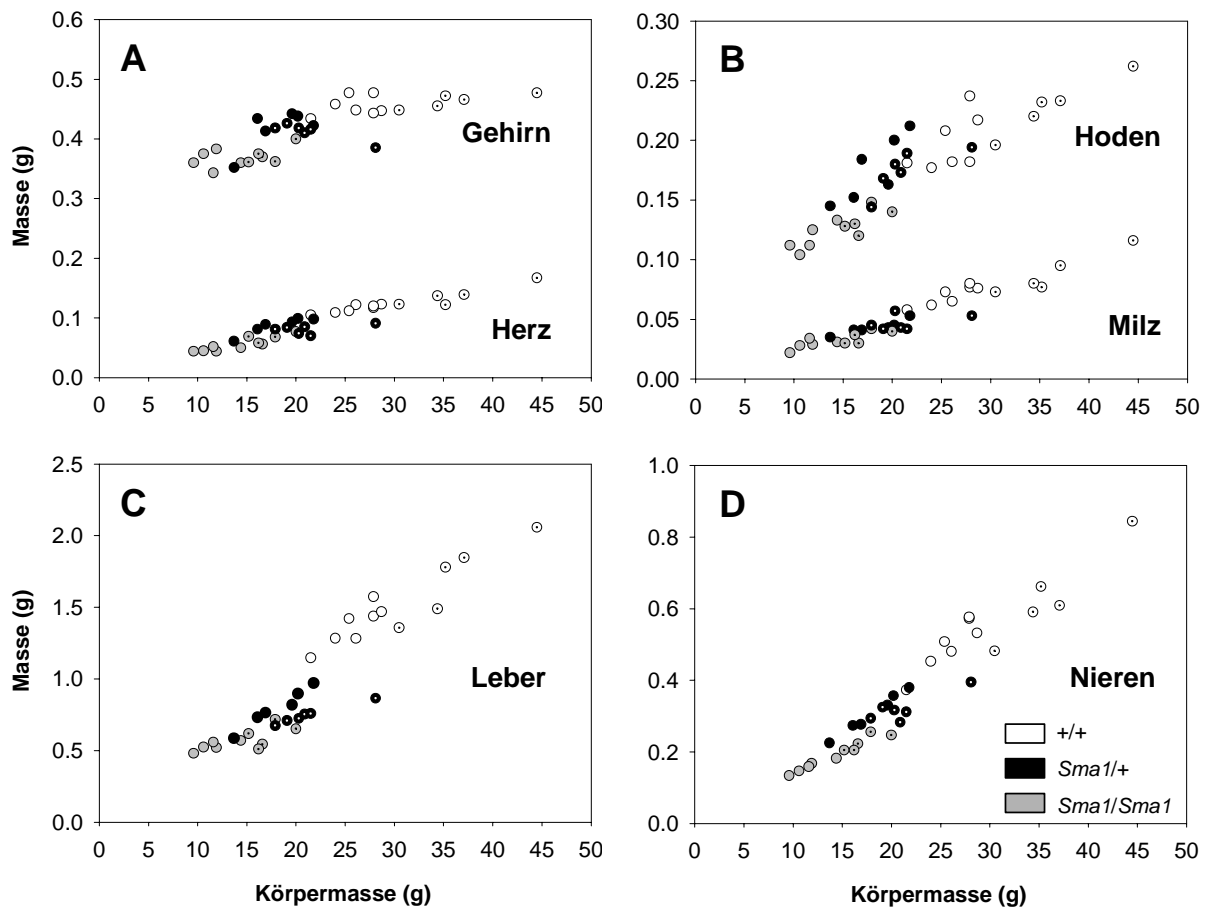


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen Körpermasse und Organgewichten bei männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 (ausgefüllte Symbole) und 5 Monaten (Symbole mit Punkt). $n=5-7$ pro Genotyp und Alter.

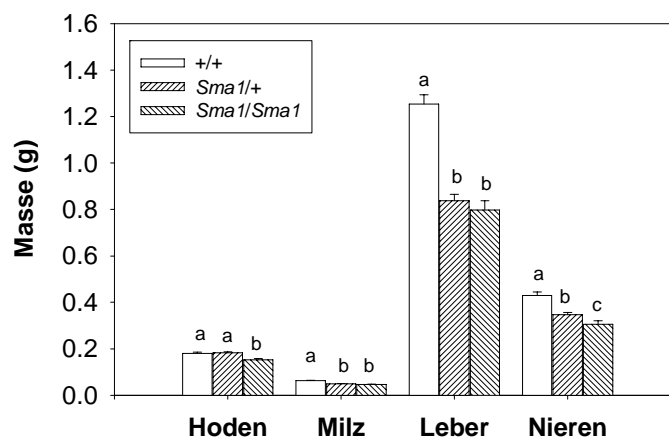


Abbildung 22: Geschätzte Masse von Leber, Niere, Hoden und Herz von WT- und SMA1-Mäusen (3-5 Monate) unter Adjustierung auf eine gemeinsame Körpermasse (21.9 g) mittels ANCOVA. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE. a,b, c: $p<0.05$.

Zusammenfassung

SMA1-Mäuse haben leichtere und kleinere Organe als WT-Mäuse, wobei heterozygote SMA1-Mäuse intermediäre Organgewichte zeigen. Die vergleichbaren Steigungen, mit denen Organe und Körpermasse innerhalb der Genotypen korrelieren deuten darauf hin, dass die generelle interspezifische Abhängigkeit im Gewicht eines Organs von der Körpermasse auch bei SMA1-Mutanten gewahrt bleibt.

Es zeigt sich ein Effekt des Genotyps auf das Hoden-, Milz-, Leber und Nierengewicht, der sich nicht allein durch die Unterschiede in der Körpermasse der Genotypen erklären lässt. Milz, Leber und Niere sind bei den SMA1-Mutanten nicht-proportional kleiner, wobei nur bei der Niere ein Unterschied zwischen heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen nachweisbar ist. Die Hoden sind nur bei homozygoten SMA1-Mäusen nicht-proportional verringert in der Masse. Das Gehirn korreliert bei allen Genotypen nicht mit der Körpermasse.

3.7 Körperzusammensetzung und Leptin-Spiegel

Mittels Trocknung und Soxhlet-Extraktion wurden die Kompartimente Wasser, fettfreie Trockenmasse (FFDM, *fat free dry mass*) bzw. fettfreie Masse (FFM, *fat free mass*) und Körperfettgehalt für alle Genotypen im Alter von 3 und 5 Monaten bestimmt. Von einem Teil der hier präparierten Mäuse konnte der Leptingehalt im Plasma gemessen werden.

3.7.1 Fettgehalt, FFDM und Wassergehalt

In **Tab. 10** sind Körperlängen und -massen (lebendes Tier bzw. Masse des Tieres vor Extraktion = ohne Gehirn und GI-Trakt) sowie Fett, FFDM und Wasser getrennt nach Genotyp und Alter aufgeführt.

SMA1-Mäuse sind leichter und kleiner und der Unterschied in der Körperlänge bzw. -masse spiegelt sich in der reduzierten FFDM wieder, wobei in Übereinstimmung mit dem zwergwüchsigen Phänotyp heterozygote SMA1-Mäuse eine intermediäre FFDM haben. Mit zunehmendem Alter nimmt die FFDM zu, wobei die absolute Zunahme bei homozygoten SMA1-Mäusen niedriger ist (~0.3 g) als bei WT- und heterozygoten SMA1-Mäusen (~1.0-1.2 g). Der Wassergehalt ist bei älteren Tieren nicht wesentlich verändert im Vergleich zu jüngeren Tieren.

Ältere Mäuse aller Genotypen haben mehr Fett als jüngere. Die mittlere Körperfett-Gesamtmenge von SMA1-Mäusen ist aber sowohl im Alter von 3 als auch von 5 Monaten nicht signifikant verschieden von WT-Mäusen. Die Mutanten besitzen also statistisch die gleiche Menge Fett in einem kleineren Körper und sind damit als hochgradig adipös

anzusehen. Allerdings ist der Mittelwert im Fett der homozygoten 3 Monate alten SMA1-Mäuse stark beeinflusst durch ein Tier mit extrem hohem Fettgehalt (8.3 g). Schließt man dieses Individuum nicht in die Auswertung ein, ist der Fettgehalt von homozygoten SMA1-Mäusen in diesem Alter im Mittel niedriger (2.2 ± 0.6 g) als bei WT- und heterozygoten SMA1-Mäusen.

Tabelle 10: Körpermasse (BM) und Körperlängen, sowie Fettanteil, FFDM und Wassergehalt von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten. Aufgeführt sind Mittelwerte (\pm SD) sowie Spannbreiten (Min-Max). a,b,c: $p < 0.05$ getrennt für jede Altersgruppe.

	3 Monate			5 Monate		
	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>
	n=14 (7♂/7♀)	n=12 (6♂/6♀)	n=11 (6♂/5♀)	n=12 (6♂/6♀)	n=15 (9♂/6♀)	n=11 (6♂/5♀)
Alter (Tage)	79 (71-85)	78 (70-84)	82 (75-90)	167 (162-173)	169 (161-181)	170 (154-190)
Länge (mm)	98 (92-102)	83 (77-90)	73 (70-80)	99 (93-103)	85 (80-91)	79 (74-83)
BM (g) lebend	27.5 ± 3.6^a (22.0-34.9)	18.9 ± 2.8^b (15.4-24.2)	12.2 ± 2.8^c (9.2-19.9)	$30.7^a \pm 3.8$ (24.3-36.3)	20.9 ± 4.9^b (13.2-30.0)	17.5 ± 3.7^c (12.7-24.3)
BM (g) Extraktion [#]	23.2 ± 3.5^a (18.2-30.3)	16.0 ± 2.6^b (12.7-20.9)	10.0 ± 2.6^c (7.6-17.4)	$27.3^a \pm 3.8$ (20.8-32.9)	18.3 ± 4.6^b (11.7-27.2)	15.1 ± 3.5^c (10.6-22.6)
Fett (g)	3.6 ± 1.6^a (1.7-7.7)	4.1 ± 1.8^a (2.3-7.4)	2.8 ± 1.9^a (1.1-8.3)	5.0 ± 2.1^a (1.4-8.2)	5.9 ± 3.1^a (1.9-11.9)	6.2 ± 2.7^a (3.0-11.2)
FFDM (g)	5.3 ± 0.7^a (4.2-6.5)	2.5 ± 0.4^b (2.0-3.2)	1.8 ± 0.2^c (1.5-2.4)	6.5 ± 0.7^a (5.4-7.7)	3.5 ± 0.6^b (2.4-4.9)	2.1 ± 0.4^c (1.6-2.8)
Wasser (g)	14.3 ± 1.5^a (11.5-16.4)	9.3 ± 0.7^b (8.3-10.6)	5.5 ± 0.5^c (4.9-6.7)	15.8 ± 1.3^a (14.1-17.6)	8.6 ± 1.1^b (7.2-10.6)	6.8 ± 0.9^c (5.3-7.7)

[#] ohne Gehirn und GI-Trakt.

Wie in **Abb. 23** dargestellt, besteht bei allen Genotypen ein starker linearer Zusammenhang zwischen Körpermasse und Körperfett bzw. Körpermasse und fettfreier Masse (Anhang Tab. IV). Auch FFDM und Wasser korrelieren zumeist ähnlich stark mit der Körpermasse (ohne Abbildung; siehe Anhang Tab. III). Mittels der geschätzten Beziehungen ist es also im Prinzip möglich, die Körperzusammensetzung einer WT- oder SMA1-Maus (C3HeB/FeJ) im Alter von 3-5 Monaten allein durch Wägung vorherzusagen. Bei gleicher Körpermasse (18.6 g) hätte eine heterozygote SMA1- im Alter von 3 Monaten etwa 4.8 g (95%CI: 4.4-5.3 g) mehr Fett und eine homozygote SMA1-Maus etwa 7.1 g (95%CI: 6.5-7.7 g) mehr Fett als eine WT-Maus. Im Alter von 5 Monaten bewegen sich die absoluten Unterschiede zum WT-Genotyp in ähnlichen Größenordnungen, d.h. zwischen den beiden Zeitpunkten erfolgt die Änderung in der Körperzusammensetzung

bei allen Genotypen in vergleichbaren Raten (pro Gramm zugelegte Körpermasse ca. 60% Fett, 30% Wasser und 10% FFDM).

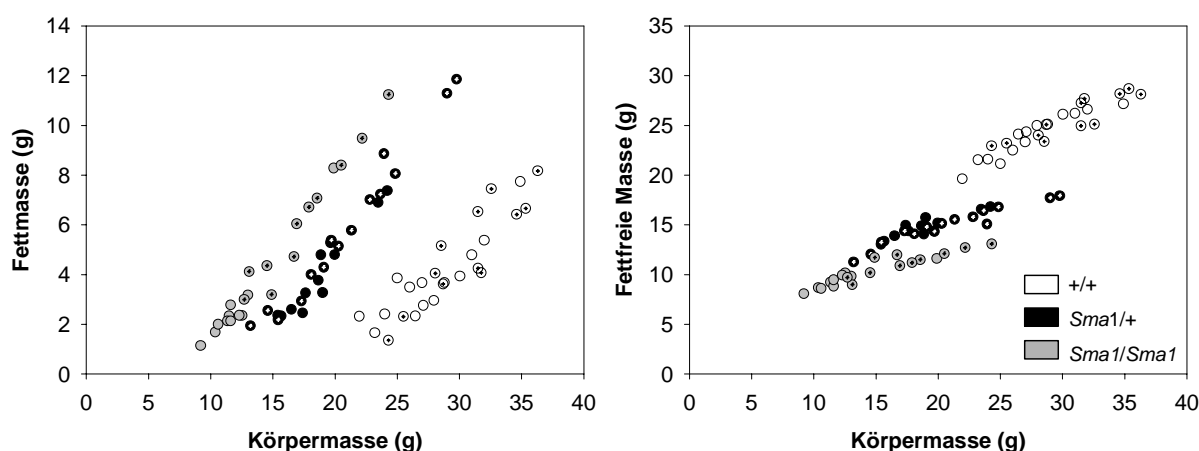


Abbildung 23: Beziehung zwischen Körpermasse (Lebendgewicht) und Fettmasse sowie Körpermasse und fettfreier Masse von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten (ausgefüllte Symbole) und 5 Monaten (Punkt im Symbol). n=11-15 pro Genotyp. Regressionsgleichungen und Korrelationskoeffizienten siehe Anhang Tab. IV.

3.7.2 Prozentualer Fettgehalt in-vivo und fettfreie Masse (FFM)

Mit 21%-22% liegt der prozentuale Fettgehalt von SMA1- im Alter von 3 Monaten bereits deutlich höher als der von WT-Mäusen. Bedingt durch den dramatischen Anstieg im Körperfettgehalt bei homozygoten SMA1-Mäusen steigt der prozentuale Anteil auf über 30%, einzelne Individuen bestehen sogar zu über 40% aus Fett (**Tab. 11**).

Tabelle 11: Prozentualer Fettgehalt und fettfreie Masse (FFM) von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten. Aufgeführt sind Mittelwerte (\pm SD) sowie Spannbreiten (Min-Max). a,b,c: $p < 0.05$ getrennt für jede Altersgruppe.

	3 Monate			5 Monate		
	+/+	Sma1/+	Sma1/Sma1	+/+	Sma1/+	Sma1/Sma1
	n=14	n=12	n=11	n=12	n=15	n=11
BM (g) lebend	27.5 \pm 3.6 ^a (22.0-34.9)	18.9 \pm 2.8 ^b (15.4-24.2)	12.2 \pm 2.8 ^c (9.2-19.9)	30.7 \pm 3.8 ^a (24.3-36.3)	20.9 \pm 4.9 ^b (13.2-30.0)	17.5 \pm 3.7 ^c (12.7-24.3)
Fett (g)	3.6 \pm 1.6 ^a (1.7-7.7)	4.1 \pm 1.8 ^a (2.3-7.4)	2.8 \pm 1.9 ^a (1.1-8.3)	5.0 \pm 2.1 ^a (1.4-8.2)	5.9 \pm 3.1 ^a (1.9-11.9)	6.2 \pm 2.7 ^a (3.0-11.2)
FFM (g)	23.9 \pm 2.3 ^a (19.6-27.2)	14.8 \pm 1.2 ^b (13.0-16.8)	9.4 \pm 1.0 ^c (8.1-11.6)	25.7 \pm 1.5 ^a (23.0-28.7)	15.0 \pm 1.9 ^b (11.3-18.0)	11.3 \pm 1.3 ^c (9.0-13.1)
% Fett	12.9 \pm 3.8 ^a (7.16-22.2)	21.6 \pm 5.8 ^b (14.9-30.5)	21.2 \pm 7.5 ^b (12.4-41.6)	15.8 \pm 5.4 ^a (5.6-22.9)	26.5 \pm 8.5 ^b (14.1-39.8)	34.2 \pm 7.9 ^c (21.4-46.2)

3.7.3 Leptin-Spiegel

Von einem Teil der hier präparierten Mäuse wurden die Leptin-Spiegel im Plasma gemessen (Tab. 12). Anhand der großen Standardabweichungen wird deutlich, dass die Leptin-Spiegel bereits innerhalb der Genotypen stark streuen. Wie in Abb. 24 dargestellt, korrelieren die Leptin-Spiegel mit dem Körperfettgehalt, so dass diese Abhängigkeit einen Großteil der Variabilität erklärt. Die Beziehung zwischen Körperfett und Plasma-Leptin fällt bei allen Genotypen auf eine ähnliche Regression.

Tabelle 12: Mittlere Körpermasse (BM), Fettmasse und Plasma-Leptin (jeweils \pm SD) von WT- und SMA1-Mäusen.

	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	
	3 Monate	3 Monate	3 Monate	5 Monate
	n=13	n=12	n=3	n=6
BM (g)	27.5 \pm 3.7	19.3 \pm 2.7	11.8 \pm 0.6	19.5 \pm 3.6
Fett (g)	3.5 \pm 1.7	4.4 \pm 1.7	2.3 \pm 0.1	7.8 \pm 2.5
Leptin (ng/ml)	3.0 \pm 2.9	3.5 \pm 2.3	2.3 \pm 0.4	9.5 \pm 4.9

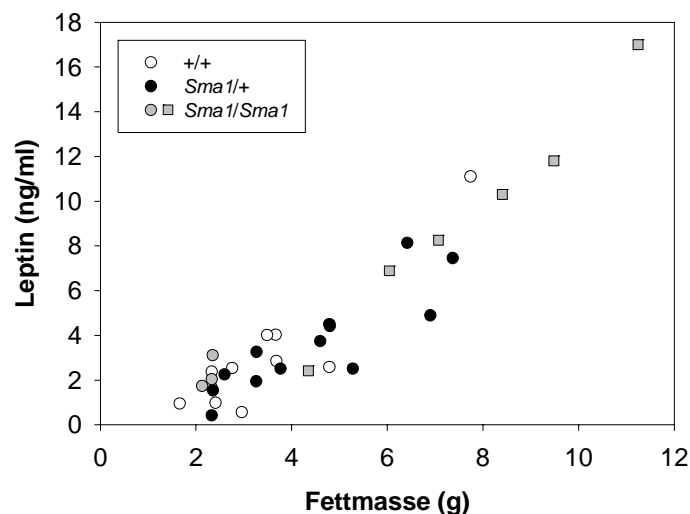


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen Plasma-Leptin und Körperfett von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten (Kreise) bzw. 5 Monaten (Quadrate, nur *Sma1*/*Sma1*). $r^2=0.88$, $p<0.001$; $n=9-13$ pro Genotyp.

Zusammenfassung

Auch in der Körperzusammensetzung bleibt die generelle interspezifische (WT-) Abhängigkeit von der Körpermasse bei SMA1-Mutanten gewahrt. Korrespondierend zu den verringerten Körperlängen der Mutanten ist die FFDM und der Wassergehalt, also die

FFM von SMA1-Mäusen nicht-proportional mit der Körpermasse reduziert. Der Körperfettgehalt von SMA1-Mäusen ist damit im Vergleich zu WT-Mäusen nicht-proportional erhöht mit der Körpermasse, d.h. die SMA1-Mutanten (*Sma1/+* als auch *Sma1/Sma1*) werden extrem fettleibig. Die Leptin-Spiegel korrelieren mit dem Körperfettgehalt, wobei die Beziehungen zwischen Leptin-Spiegel und Körperfett bei allen Genotypen auf einer gemeinsamen Regression zu liegen scheinen.

Die Ausprägung der Adipositas bei SMA1-Mäusen zeigt eine starke individuelle Variation. Einzelne homozygote und heterozygote SMA1-Mäuse sind auch im Alter von 5 Monaten (noch) vergleichsweise schlank. Die intragenotypische Variation im prozentualen Fettgehalt kann beim homozygoten Genotyp bis zu 25 g betragen.

Im Mittel ist der absolute Fettgehalt der heterozygoten SMA1-Mäuse bereits im Alter von 3 Monaten nicht signifikant verschieden vom Fettgehalt der WT-Mäuse. Im Alter von 5 Monaten haben alle Genotypen etwa vergleichbare Mengen an Körperfett (5-6 g).

3.8 Fettverteilung

Während sich mittels Fettextraktion der Gesamtfettanteil der Mäuse bestimmen lässt, wurden nachfolgend in gezielten Präparationen einzelne Fettdepots im Hinblick auf ihren Anteil an der Körpermasse untersucht: Betrifft die Steigerung im Körperfettgehalt alle Fettdepots?

Tabelle 13: Mittlere Gewichte definierter Fettdepots (\pm SD) von männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten. iWAT: Inguinales weißes Fett; eWAT: Epididymales weißes Fett; mWAT: Mesenteriales weißes Fett; pWAT: Perirenales weißes Fett; aWAT: Axillares weißes Fett; iBAT: Interscapulares braunes Fett.

	3 Monate			5 Monate		
	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>
	n=7	n=6	n=5	n=5	n=6	n=5
BM (g)	25.9 \pm 2.5 ^a	18.1 \pm 3.0 ^b	11.6 \pm 1.8 ^c	36.3 \pm 5.5 ^a	21.3 \pm 3.6 ^b	17.2 \pm 1.9 ^c
iWAT (g)	0.467 \pm 0.160 ^a	0.593 \pm 0.189 ^a	0.545 \pm 0.253 ^a	1.370 \pm 0.241 ^a	1.336 \pm 0.542 ^a	1.410 \pm 0.235 ^a
eWAT (g)	0.328 \pm 0.131 ^a	0.333 \pm 0.161 ^a	0.143 \pm 0.067 ^a	1.186 \pm 0.361 ^a	0.732 \pm 0.341 ^b	0.493 \pm 0.151 ^b
mWAT (g)	0.405 \pm 0.112 ^a	0.388 \pm 0.100 ^a	0.227 \pm 0.071 ^b	0.849 \pm 0.214 ^a	0.466 \pm 0.130 ^b	0.372 \pm 0.097 ^b
pWAT (g)	0.121 \pm 0.048 ^a	0.135 \pm 0.070 ^a	0.060 \pm 0.027 ^a	0.414 \pm 0.136 ^a	0.253 \pm 0.120 ^b	0.186 \pm 0.062 ^b
aWAT (g)	0.170 \pm 0.068 ^a	0.266 \pm 0.111 ^a	0.150 \pm 0.084 ^a	0.517 \pm 0.213 ^a	0.327 \pm 0.149 ^a	0.348 \pm 0.138 ^a
iBAT (g)	0.061 \pm 0.012 ^a	0.070 \pm 0.017 ^a	0.055 \pm 0.015 ^a	0.117 \pm 0.020 ^a	0.079 \pm 0.020 ^b	0.087 \pm 0.013 ^b
Summe (g)	1.553 \pm 0.171 ^a	1.784 \pm 0.252 ^a	1.181 \pm 0.226 ^a	4.453 \pm 0.487 ^a	3.193 \pm 0.522 ^a	2.895 \pm 0.299 ^a

Tab. 13 illustriert das mittlere Gewicht jedes der untersuchten Fettdepots bei 3 und 5 Monate alten Mäusen. Etwa 40-50% im Gesamtfett (vgl. Tab. 11) sind auf die hier präparierten Depots zurückzuführen.

Im Alter von 3 Monaten ist die mittlere Masse fast aller Depots statistisch nicht signifikant verschieden zwischen den Genotypen. Allerdings sind die Fettdepots homozygoter SMA1-Mäuse mit Ausnahme des inguinalen Fetts tendenziell leichter. Bei Mäusen im Alter von 5 Monaten sind alle Depots schwerer. In diesem Alter ist die mittlere Masse der meisten Fettdepots von heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen statistisch signifikant niedriger als von WT-Mäusen. Ausnahmen bilden das aWAT und insbesondere das iWAT, das bei allen Genotypen die gleiche Masse hat.

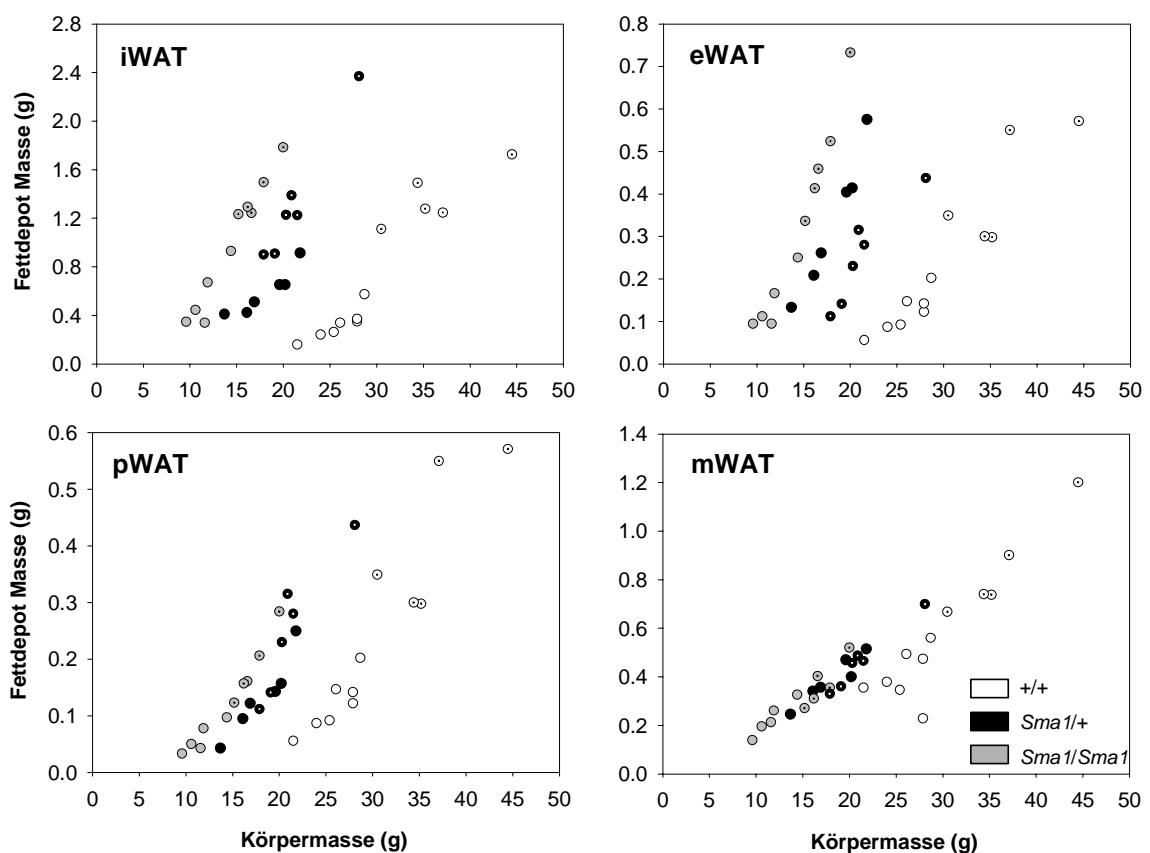


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen Körpermasse und Depotmasse ausgewählter Fettgewebe von männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 (ausgefüllte Symbole) und 5 Monaten (Symbole mit Punkt). n=5-7 pro Genotyp und Alter. iWAT: Inguinales weißes Fett; eWAT: Epididymales weißes Fett; pWAT: Perirenales weißes Fett; mWAT: Mesenteriales weißes Fett. Regressionsgleichungen siehe Anhang Tab. V.

Ein Großteil der intragenotypischen Variation im Gewicht eines Depots lässt sich allein durch die Variation in der Körpermasse erklären (**Abb. 25**). Innerhalb der Genotypen korrelieren die Gewichte der verschiedenen Depots hochsignifikant mit der Körpermasse

($0.733 \leq r^2 \leq 0.968$, alle $p < 0.001$). Tabelle V im Anhang stellt die Regressionsgeraden für den geschätzten linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse und jedem Fettdepot getrennt nach Genotyp dar. Während es zwar Unterschiede in den Steigungen zwischen den einzelnen Depots gibt, sind die intergenotypischen Steigungen nicht signifikant verschieden voneinander. Diese Parallelverschiebungen für den Zusammenhang zwischen Depotmasse und Körpermasse innerhalb eines Fettdepots bedeuten, dass alle präparierten Fettdepots bei Mutanten überproportional mit der Körpermasse vergrößert sind und spiegeln damit die Befunde im Gesamtfettgehalt aus Abschnitt 3.7.1 wider.

In **Abb. 26** sind die ANCOVA-adjustierten Genotyp-Unterschiede in der Masse der einzelnen Fettdepots quantifiziert. Insbesondere die Einheit aus inguinalem, glutealen und dorsolumbalem Fettdepot (= inguinales Depot, iWAT) hat die größte Zunahme in der Masse, dagegen zeigt das mesenteriale Depot (mWAT) die geringsten Unterschiede. Bei gleicher Körpermasse hätte eine homozygote SMA1-Maus etwa 3.6 g (95%CI: 2.9-4.3 g), eine heterozygote SMA1-Maus dagegen 2.6 g (95%CI: 2.0-3.2 g) mehr Fett als eine WT-Maus, allein aufgrund der hier präparierten Depots. Dies erklärt etwa 50% des Unterschieds im (ANCOVA-geschätzten) Gesamtfettgehalt bei gleicher Masse (Abschnitt 3.7.2).

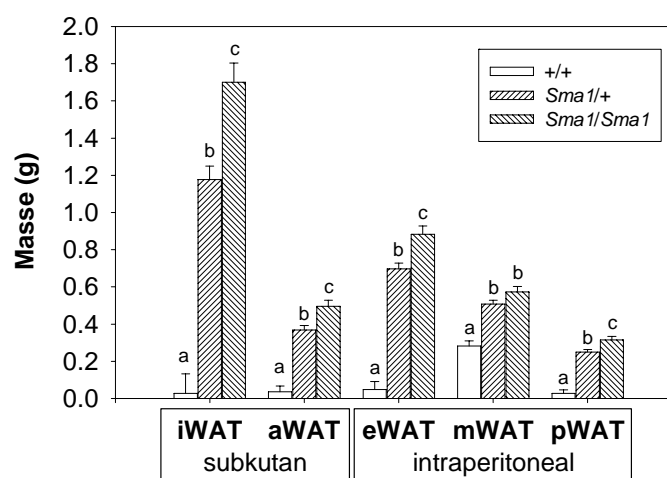


Abbildung 26: Geschätzte mittlere Fettdepotmasse (\pm SE) von WT- und SMA1-Mäusen unter Adjustierung auf eine Körpermasse von 21.9 g mittels ANCOVA. a,b,c: $p < 0.05$. iWAT: Inguinales weißes Fett; aWAT: Axillares weißes Fett; eWAT: Epididymales weißes Fett; mWAT: Mesenteriales weißes Fett; pWAT: Perirenales weißes Fett.

Auch das iBAT, dem im Unterschied zum weißen Fett physiologisch eine Rolle bei der zitterfreien Wärmebildung und nicht primär bei der Fettspeicherung zukommt, ist bei Mutanten überproportional vergrößert (**Abb. 27**). Dies weist darauf hin, dass der Adipositas von SMA1 ein Mechanismus zugrunde liegen könnte, der weiße und braune

Fettzellen in gleichem Maße beeinflusst. Da aber eine mögliche Hyperplasie bzw. Hypertrophie des (i)BAT auch in Zusammenhang mit Anpassungsleistungen dieses Gewebes an eine gestiegene Thermogenesekapazität verbunden sein könnte, muss dieser Aspekt im Zusammenhang mit den Untersuchungen aus Abschnitt 3.10 diskutiert werden.

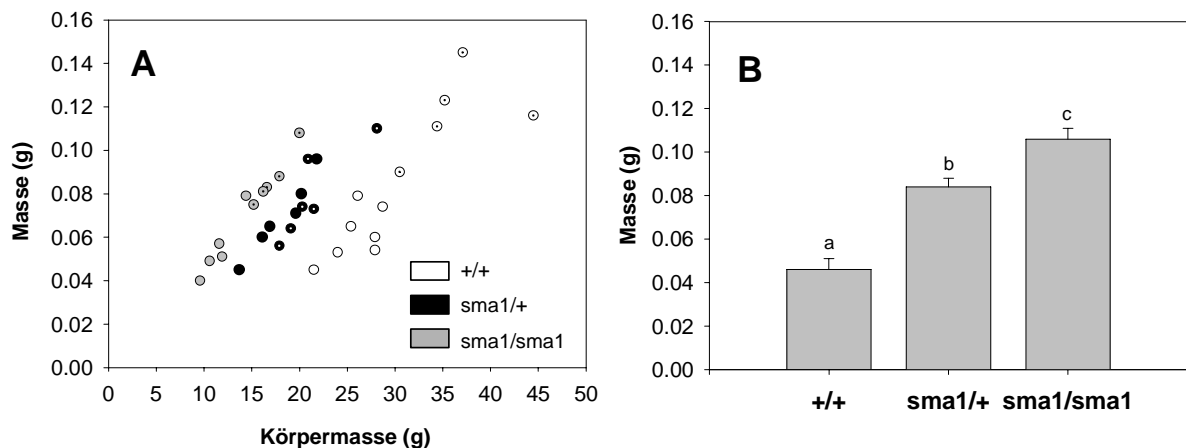


Abbildung 27: (A) Zusammenhang zwischen Körpermasse und Masse des interscapularen braunen Fetts (iBAT) von männlichen WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 (ausgefüllte Symbole) und 5 Monaten (Symbole mit Punkt). n=5-7 pro Genotyp und Alter. (B) Geschätzte mittlere iBAT-Depotmasse (±SE) von +/+, *Sma1/+* und *Sma1/Sma1*-Mäusen unter Adjustierung auf eine Körpermasse von 21.9 g mittels ANCOVA.

Zusammenfassung

Intragenotypisch korreliert das Gewicht aller untersuchten Fettdepots hochsignifikant mit der Körpermasse. Die Masse der einzelnen Fettdepots ist bei SMA1-Mäusen überproportional mit der Körpermasse erhöht, wobei die Einheit aus inguinalem, glutealem und dorsolumbalem Depot sowie das epididymale Fettgewebe die stärkste überproportionale Gewichtszunahme, das mesenteriale Fettgewebe die geringste Gewichtszunahme zeigt. Die Veränderungen im Gewicht der Fettdepots betreffen auch das braune Fettgewebe, welches bei Mutanten ebenfalls überproportional vergrößert ist.

Die hier präparierten Fettdepots stellen ca. 40-50% im Gesamtfett der Mäuse dar und erklären etwa 50% des ANCOVA-geschätzten Unterschieds im Körperfettgehalt zwischen den Genotypen.

3.9 Futterverbrauch

Kleinere (SMA1-) Mäuse haben im Mittel einen geringeren Futterverbrauch (**Tab. 14**). Wie in **Abb. 28** dargestellt, ist im Alter von 3 Monaten der Futterverbrauch von SMA1-Mäusen proportional mit der Körpermasse reduziert. Ein Ungleichgewicht im Energiehaushalt auf seiten der Energieaufnahme (Hyperphagie) scheint daher in diesem Alter als Ursache für den erhöhten Körperfettgehalt auszuschneiden. Auch im Alter von 5 Monaten ist der Futterverbrauch von *Sma1*-Trägern reduziert. Im Mittel unterscheidet sich in diesem Alter die Futteraufnahme von heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen nicht mehr signifikant, so dass hier eine mögliche Hyperphagie zum Ausdruck kommen könnte, die beim homozygoten Genotyp mit der (späteren) Erhöhung im absoluten Fettgehalt korreliert (vgl. Abschnitt 3.7.1).

Tabelle 14: Körpermassen (BM) und täglicher Futterverbrauch (\pm SD) von WT- und SMA1-Mäusen bei 23°C im Haltungskäfig. a,b,c: $p < 0.05$ für den Vergleich der Genotypen in jeder Altersgruppe.

	3 Monate			5 Monate		
	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>
	n=13 (8♂/5♀)	n=17 (10♂/7♀)	n=14 (6♂/(♀))	n=23 (14♂/9♀)	n=21 (13♂/8♀)	n=17 (10♂/7♀)
BM (g)	26.2 \pm 3.1	16.7 \pm 2.1	12.7 \pm 1.4	31.6 \pm 4.7	21.0 \pm 3.5	16.1 \pm 2.0
Futter (g*d ⁻¹)	4.2 \pm 0.4 ^a	2.9 \pm 0.3 ^b	2.4 \pm 0.3 ^c	3.6 \pm 0.5 ^a	2.6 \pm 0.4 ^b	2.5 \pm 0.5 ^b

Der Zusammenhang zwischen Körpermasse und Futterverbrauch ist zwar auch im Alter von 5 Monaten hochsignifikant ($r^2=0.519$, $p < 0.001$, $n=61$), aber schwächer als bei 3 Monate alten Tieren ($r^2=0.872$, $p < 0.001$, $n=44$). Dies gründet sich auch auf die relativ hohe residuale Streuung des Futterverbrauchs innerhalb der Genotypen. Mit zunehmendem Alter scheint die Energieaufnahme bei Mäusen variabler reguliert zu sein.

Zusammenfassung

Im Alter von 3 Monaten ist der Futterverbrauch bei SMA1-Mäusen proportional zur Körpermasse reduziert. Auch im Alter von 5 Monaten ist die Futteraufnahme von SMA1-geringer als von WT-Mäusen. Allerdings haben die homozygoten SMA1-Mäuse in diesem Alter trotz ihrer geringeren Körpermasse einen ähnlichen Futterverbrauch wie die heterozygoten SMA1-Mäuse; sie zeigen also möglicherweise eine Hyperphagie. Diese könnte einen Beitrag zu der sich zwischen diesen Zeitpunkten stärkeren relativen Gewichtszunahme bei homozygoten SMA1-Mäusen leisten.

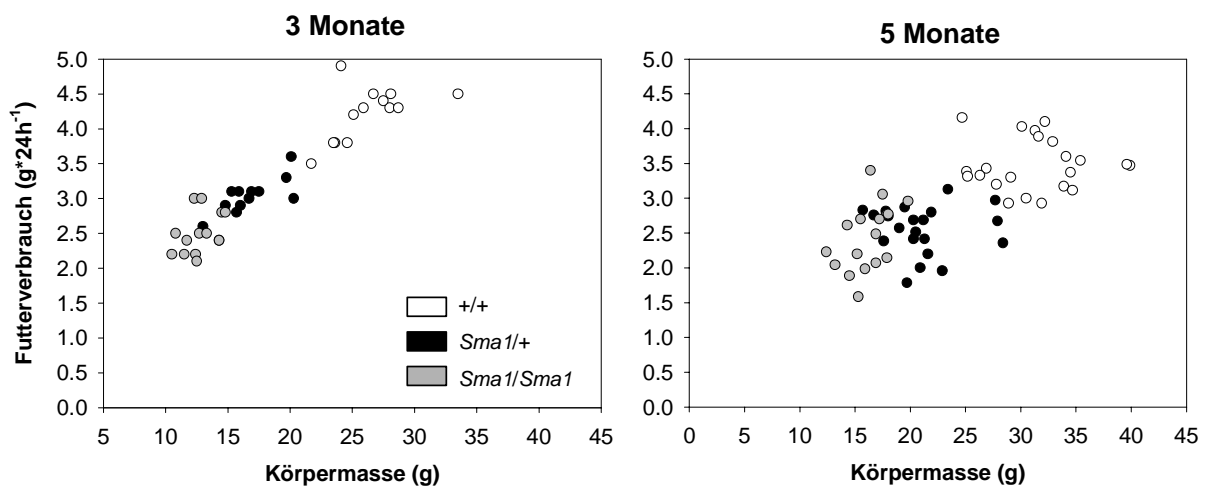


Abbildung 28: Zusammenhang zwischen Körpermasse und dem täglichen Futterverbrauch von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten (n=13-17 pro Genotyp) und 5 Monaten (n=17-23 pro Genotyp) bei 23°C im Haltungskäfig.

3.10 Ruhestoffwechselraten

3.10.1 Basal und Ruhestoffwechsel

SMA1- wie auch WT-Mäuse zeigen einen Anstieg im Sauerstoffverbrauch mit sinkender Umgebungstemperatur. Wie in **Abb. 29** illustriert, liegt der mittlere Sauerstoffverbrauch von SMA1-Mäusen bei allen gemessenen Außentemperaturen niedriger als der von WT-Mäusen, wobei heterozygote SMA1-Mäuse einen intermediären Sauerstoffverbrauch haben. Im Bereich von 30°C bis 32°C erreicht der Sauerstoffverbrauch bei allen Genotypen ein Plateau niedrigster Werte, das dem Basalstoffwechsel (BMR) entspricht (**Tab. 15**) und die Lage der Thermoneutralzone markiert. Bei 36°C steigt der Sauerstoffverbrauch wieder signifikant an, da die Mäuse einerseits aktiv (= energieverbrauchend) versuchen, Hitze abzugeben (Verhaltensänderungen wie flach Ausstrecken und Einspeicheln) und andererseits immer wieder nach Fluchtwegen aus der Küvette suchen, d.h. nicht mehr so ausgeprägte Ruhephasen zeigen. Eine Außentemperatur von 36°C liegt also bei allen Genotypen bereits oberhalb der Thermoneutralzone. Bei einer Außentemperatur von 28°C ist der Sauerstoffverbrauch von heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen signifikant höher als bei 30°C, der von WT-Mäusen dagegen noch nicht ($p < 0.1$, Friedmann-Test mit *post-hoc*-Test nach DUNN).

Der kältebedingte Anstieg in der thermoregulatorischen Wärmeproduktion ist bei WT-Mäusen am steilsten und bei homozygoten SMA1-Mäusen am flachsten. Die Form der

Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Außentemperatur zeigt bei allen Genotypen eine Übereinstimmung mit dem SCHOLANDER-Konzept der Thermoregulation (Abb. 11) und erlaubt eine Schätzung der Unteren Kritischen Temperatur sowie der Theoretischen Körpertemperatur (**Abb. 30**).

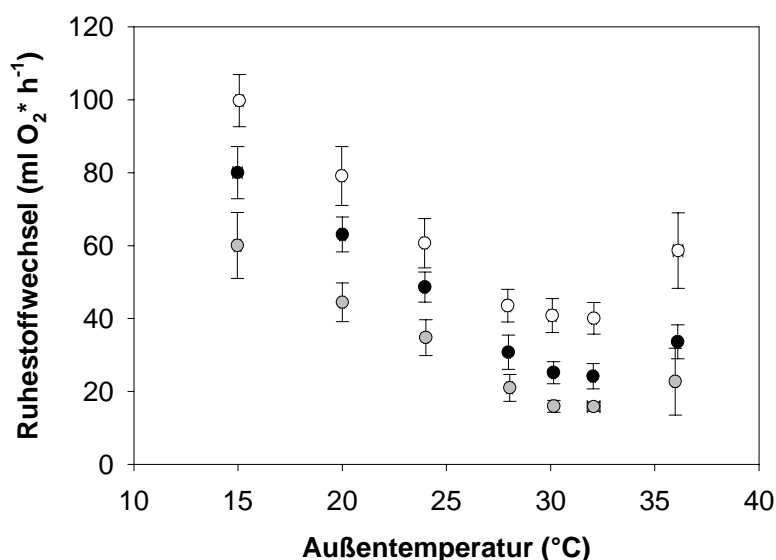


Abbildung 29: Mittlere Ruhestoffwechselraten \pm SD von WT- und SMA1-Mäusen im Außentemperaturbereich von 15-36°C. Weiße Symbole: +/+ (n=12); schwarze Symbole: *Sma1/+* (n=11); graue Symbole: *Sma1/Sma1* (n=9).

Tabelle 15: Alter und mittlere Körpergewichte während der RMR-Messung (jeweils \pm SD und Min-Max), sowie mediane Untere Kritische Temperaturen (T_{ic}) und Theoretische Körpertemperaturen (T_{bth} , jeweils incl. Min-Max) von männlichen WT- und SMA1-Mäusen. Die T_{bth} wurde geschätzt aus dem Zusammenhang zwischen Außentemperatur und Sauerstoffverbrauch ($15^{\circ}\text{C} \leq T_a \leq 28^{\circ}\text{C}$). a,b,c: $p < 0.05$.

	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>
	n=12	n=11	n=9
Alter (Min-Max, Tage)	75-84	74-87	74-98
Körpermasse (g)	27.8 \pm 2.8 ^a	18.2 \pm 1.7 ^b	10.9 \pm 1.2 ^c
BMR (ml O ₂ *h ⁻¹)	40.4 \pm 4.4 ^a	24.7 \pm 3.1 ^b	15.9 \pm 1.4 ^c
Mediane T_{ic} (°C)	28.7 ^a (27.2-30.6)	29.8 ^b (28.5-32.8)	30.0 ^b (28.6-34.5)
Mediane T_{bth} (°C)	37.7 ^a (36.4-39.2)	36.7 ^a (35.6-37.4)	36.0 ^b (34.7-36.4)

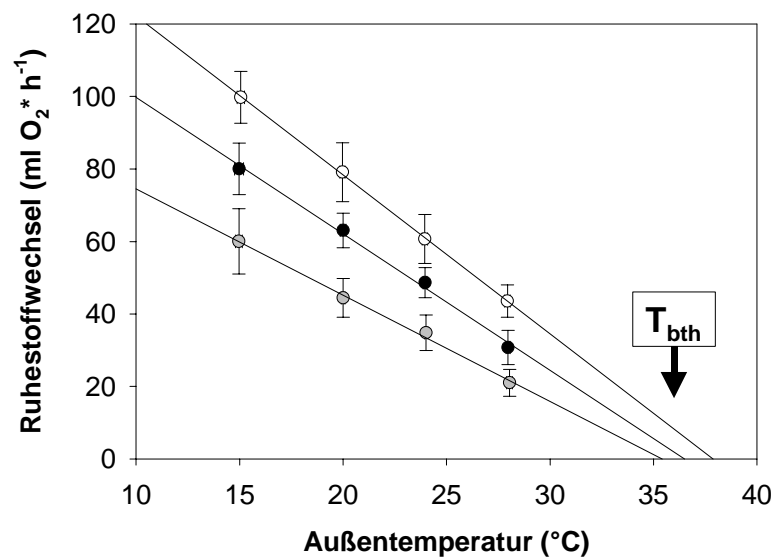


Abbildung 30: Extrapolation der theoretischen Körpertemperatur (T_{bth}) von WT- und SMA1-Mäusen aus dem Ruhestoffwechsel in Kälte ($15^{\circ}\text{C} \leq T_a \leq 28^{\circ}\text{C}$). Weiße Symbole: $+/+$ ($n=12$); schwarze Symbole: $Sma1/+$ ($n=11$), graue Symbole: $Sma1/Sma1$ ($n=9$). Ergebnisse siehe Tabelle 15.

3.10.2 Schätzung der Unteren kritischen Temperatur (T_{lc}) und der Theoretischen Körpertemperatur (T_{bth})

3.10.2.1 Untere Kritische Temperatur (T_{lc})

Über alle Genotypen gibt es einen schwachen Zusammenhang zwischen der Körpermasse der Mäuse und ihrer T_{lc} : Je kleiner ein Tier, desto höher die Außentemperatur, bei der thermoregulatorische Wärmeproduktion einsetzen muss, um die normotherme Körpertemperatur aufrecht zu halten ($r^2=0.264$, $p<0.005$, $n=32$). Wie Tab. 15 zeigt, ist die mittlere T_{lc} bei SMA1-Mäusen erniedrigt im Vergleich zu WT-Mäusen. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied in der T_{lc} zwischen heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen nachweisen.

3.10.2.2 Theoretische Körpertemperatur (T_{bth})

Für die Auswertung wurde für jede Maus die Beziehung zwischen Außentemperatur (T_a) und dem Sauerstoffverbrauch in Kälte (15, 20, 24 und 28°C) mittels linearer Regression auf die Abszisse extrapoliert (vgl. Abb. 29). Auch bei WT-Mäusen wurde die 28°C -Messung eingeschlossen, da hier der Sauerstoffverbrauch nur knapp nicht-signifikant erhöht war im Vergleich zu Thermoneutralität ($p<0.1$). Es ergibt sich ein Unterschied in

der zu verteidigenden Körpertemperatur zwischen den Genotypen, wobei $T_{\text{bth } +/+} > T_{\text{bth } Sma1/+} > T_{\text{bth } Sma1/Sma1}$ (Tab. 15). Statistisch ist nur der Unterschied (Erniedrigung von ca. 1.5°C) in der T_{bth} von homozygoten SMA1- im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant ($p < 0.05$, KRUSKAL-WALLIS ANOVA mit *post-hoc*-Test nach DUNN).

3.10.3 Respiratorischer Quotient (RQ)

Der RQ zeigt bei allen Genotypen die typische Absenkung kälteexponierter, normothermer Säugetiere (**Abb. 31**). Ausgehend von Werten um etwa 0.90 in Thermoneutralität fällt der RQ bei 15°C T_a auf etwa 0.80-0.85. Die Absenkung des RQ in Kälte (15°C im Vergleich zu $\geq 30^\circ\text{C}$) ist signifikant (je $p < 0.05$) und Ausdruck der Rekrutierung von Energie über den verstärkten oxidativen Abbau von Fett (Brody 1994). Die Genotypen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres RQ (-Verlaufs) während der Messung.

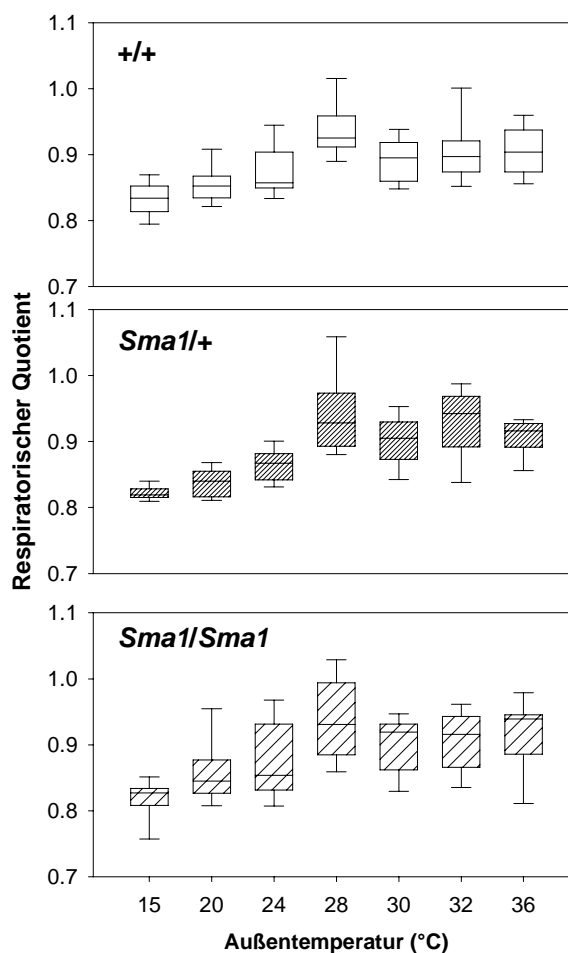


Abbildung 31: Abhängigkeit des RQ von der Außentemperatur bei WT- und SMA1-Mäusen (n=9-11 pro Genotyp). Dargestellt sind *Box-und Whisker-Plots* (5%-95%-Perzentil).

3.10.4 Körpertemperatur

Bei insgesamt 5 WT-, 5 heterozygoten SMA1- und 2 homozygoten SMA1-Mäusen wurde während der Stoffwechsellmessung bei verschiedenen Außentemperaturen zeitgleich (Δt : 40 s) die Körperkerntemperatur registriert (vgl. Abb. 12). Wie **Abb. 32 A** illustriert, ist die Körpertemperatur bei allen Genotypen keine feste Größe, sondern abhängig von der Außentemperatur. Während die Mäuse bei 36°C hypertherm werden, erreichen sie mit zunehmender Kälteexposition immer niedrigere Werte, die bis zu 2°C unterhalb der Körpertemperatur bei Thermoneutralität liegen können.

Bei Außentemperaturen von $24^{\circ}\text{C} \leq t_a \leq 32^{\circ}\text{C}$ liegen die Körpertemperaturen der SMA1-Mäuse zumeist tiefer als die der WT-Mäuse, wobei die homozygoten SMA1-Mutanten niedrigste Werte zeigen (bis $33^{\circ}\text{C} T_b$). Bei Außentemperaturen $< 24^{\circ}\text{C}$ ist dagegen kein deutlicher Unterschied in den Körpertemperaturen zu erkennen.

3.10.5 Wärmedurchgangszahl

Auch die Wärmedurchgangszahl (*Conductance*, C in $\text{mW}^{\circ}\text{C}^{-1}$ bzw. $\text{mW}^{\circ}\text{C}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) ist bei verschiedenen Außentemperaturen keine konstante Größe (**Abb. 32 B und C**). Zwischen 32°C und 24°C haben alle Genotypen niedrigste Wärmedurchgangszahlen. Bei 36°C erreicht die Wärmedurchgangszahl höchste Werte; dies ist Ausdruck der verstärkten Wärmeabgabe, die bei Hitzestress erfolgt um Hyperthermie entgegen zu wirken. Unterhalb von 20°C steigen die Wärmedurchgangszahlen bei allen Genotypen wieder an. Dieser Anstieg in Kälte ist zurückzuführen auf den Einsatz des wärmeproduzierenden Kältezitterns, das bei allen Genotypen ab dieser Außentemperatur zu beobachten war. Während die Mäuse in moderater Kälte $24^{\circ}\text{C} \leq t_a \leq 32^{\circ}\text{C}$ durch ihre kugelförmige, ruhige Körperhaltung die Wärmeabgabe optimal minimieren, gelingt ihnen dies beim Einsatz von Kältezittern nicht mehr im selben Maße, so dass ein Anstieg in der Wärmedurchgangszahl die Folge ist.

Im gesamten Temperaturbereich von $32-15^{\circ}\text{C}$ ist die gewichtsspezifische Wärmedurchgangszahl von SMA1-Mäusen höher als die der WT-Mäuse, und selbst in Thermoneutralität liegen die Wärmedurchgangszahlen der beiden homozygoten Tiere am höchsten (Abb. 32 B). Absolut gesehen ist aber der Wärmedurchgang bei den SMA1-Mutanten niedriger (Abb. 32 C). Dies korrespondiert mit dem flacheren Anstieg der Stoffwechselsteigerung in Abb. 29.

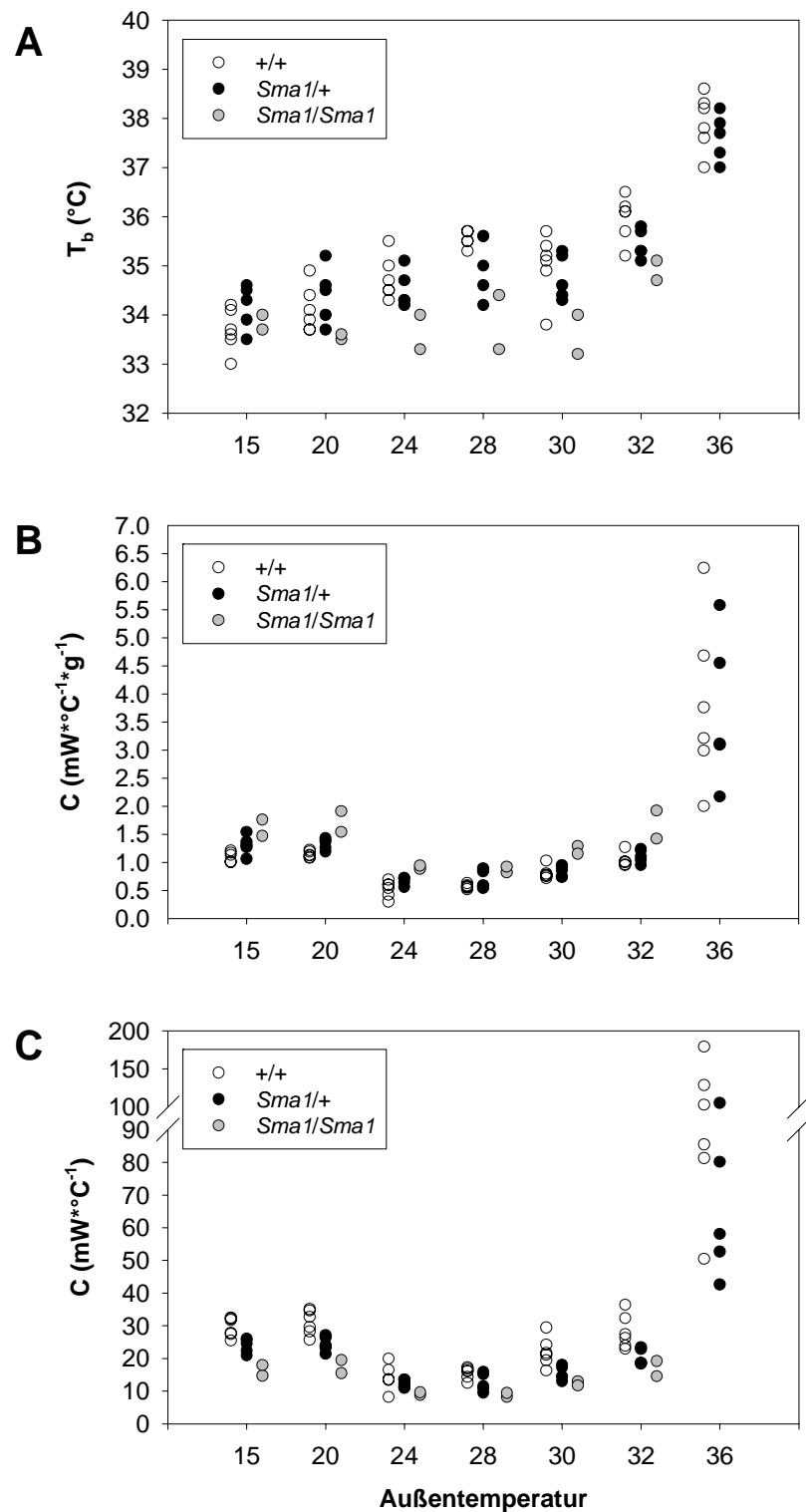


Abbildung 32: (A) Körpertemperatur, (B) gewichtsspezifische Wärmedurchgangszahl (C , *Conductance*) und (C) absoluter Wärmedurchgang von ruhenden WT- und SMA1-Mäusen bei verschiedenen Außentemperaturen im Bereich von 15-36°C. +/+ : n=6; *Sma1/+* : n=5; *Sma1/Sma1* : n=2.

3.10.6 Allometrie des Sauerstoffverbrauchs

Abb. 33 illustriert die allometrische Betrachtung der Ruhestoffwechselraten bei verschiedenen Außentemperaturen.

SMA1-Mäuse haben im Mittel niedrigere Stoffwechselraten und diese Reduktion scheint bei allen Temperaturstufen proportional mit der verringerten Körpermasse zu sein. In Tabelle VI im Anhang sind die Koeffizienten und Konfidenzintervalle für die resultierenden, geschätzten Zusammenhänge getrennt nach Genotyp und Außentemperatur aufgeführt.

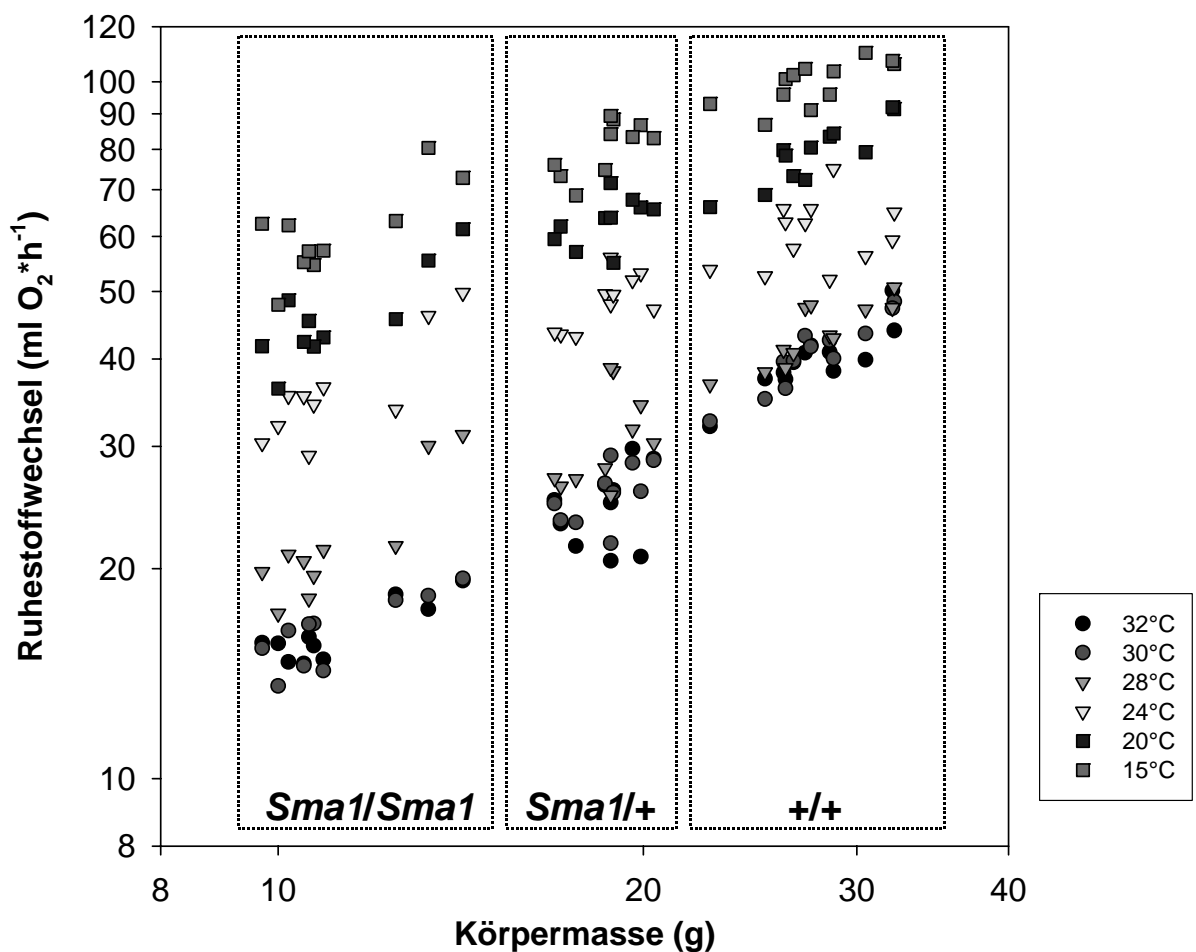


Abbildung 33: Zusammenhang zwischen Außentemperatur (15-32°C) und Ruhestoffwechselraten von männlichen WT- und SMA1-Mäusen (n=9-13 pro Genotyp). Die Messung bei 36°C (= oberhalb der Thermoneutralzone) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

In Thermoneutralität (BMR, 30-32°C T_a) überlagern die Konfidenzintervalle der Steigungen für die Beschreibung des linearen Zusammenhangs zwischen Körpermasse

und Stoffwechselrate bei allen Genotypen die Steigung (Massenexponent) $b=1$ (Isometrie). Mit zunehmender Kälte verringert sich die Steigung (Abflachung).

Für eine quantitative Aussage über mögliche Unterschiede in den Ruhestoffwechselraten zwischen den Genotypen wurden die Daten aus Thermoneutralität (mittlere Stoffwechselrate aus 30°C und 32°C) und 15°C ausgewählt (**Abb. 34**). In beiden Fällen lassen sich signifikante intragenotypische Zusammenhänge bei nicht signifikant verschiedenen Steigungen (überlappende Konfidenzintervalle) nachweisen.

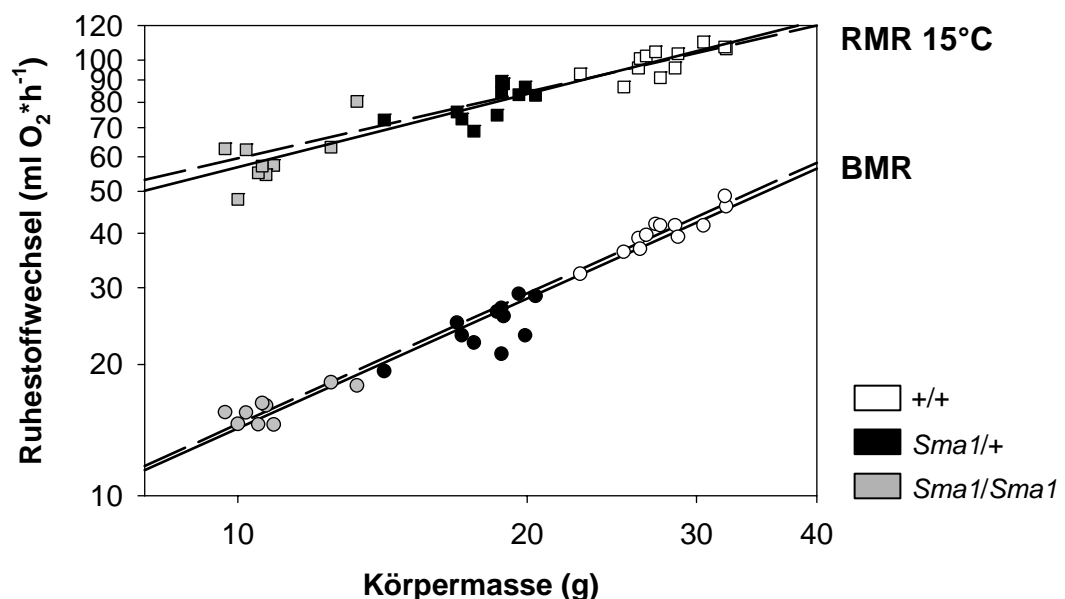


Abbildung 34: BMR und RMR bei 15°C (RMR15) in Abhängigkeit von der Körpermasse (BM) bei WT- und SMA1-Mäusen (n=9-13 pro Genotyp). Die durchgezogenen Regressionen beschreiben den linearen Zusammenhang über alle Mäuse (n=32) in Thermoneutralität ($\log\text{BMR}=0.162+0.992*\log\text{BM}$) bzw. bei 15°C ($\log\text{RMR15}=1.195+0.559*\log\text{BM}$), die gestrichelten Regressionen extrapolieren den Zusammenhang für WT-Mäuse in Bereiche niedrigerer Körpermasse ($\log\text{BMR}=0.159+1.003*\log\text{BM}$; $\log\text{RMR15}=1.204+0.509*\log\text{BM}$).

Um Einflüsse des Genotyps auf den BMR/RMR vom Einfluss der Körpergröße bzw. Masse zu trennen, wurden die gleichen Daten mit 3 Auswertungsstrategien analysiert: 1. Vergleich der absoluten Stoffwechselraten pro Tier ($\text{ml O}_2*\text{h}^{-1}$), 2. Vergleich der gewichtsspezifischen Stoffwechselrate ($\text{ml O}_2*\text{g}^{-1}$). Darüber hinaus erfolgte als 3. Methode ein Vergleich der auf ein gemeinsames Körpergewicht adjustierten Stoffwechselraten (ANCOVA). Den ANCOVAs wurden die Regressionen der WT-Mäuse zugrunde gelegt (vgl. Abb. 34). Die Ergebnisse der drei Analysen sind in **Abb. 35** dargestellt.

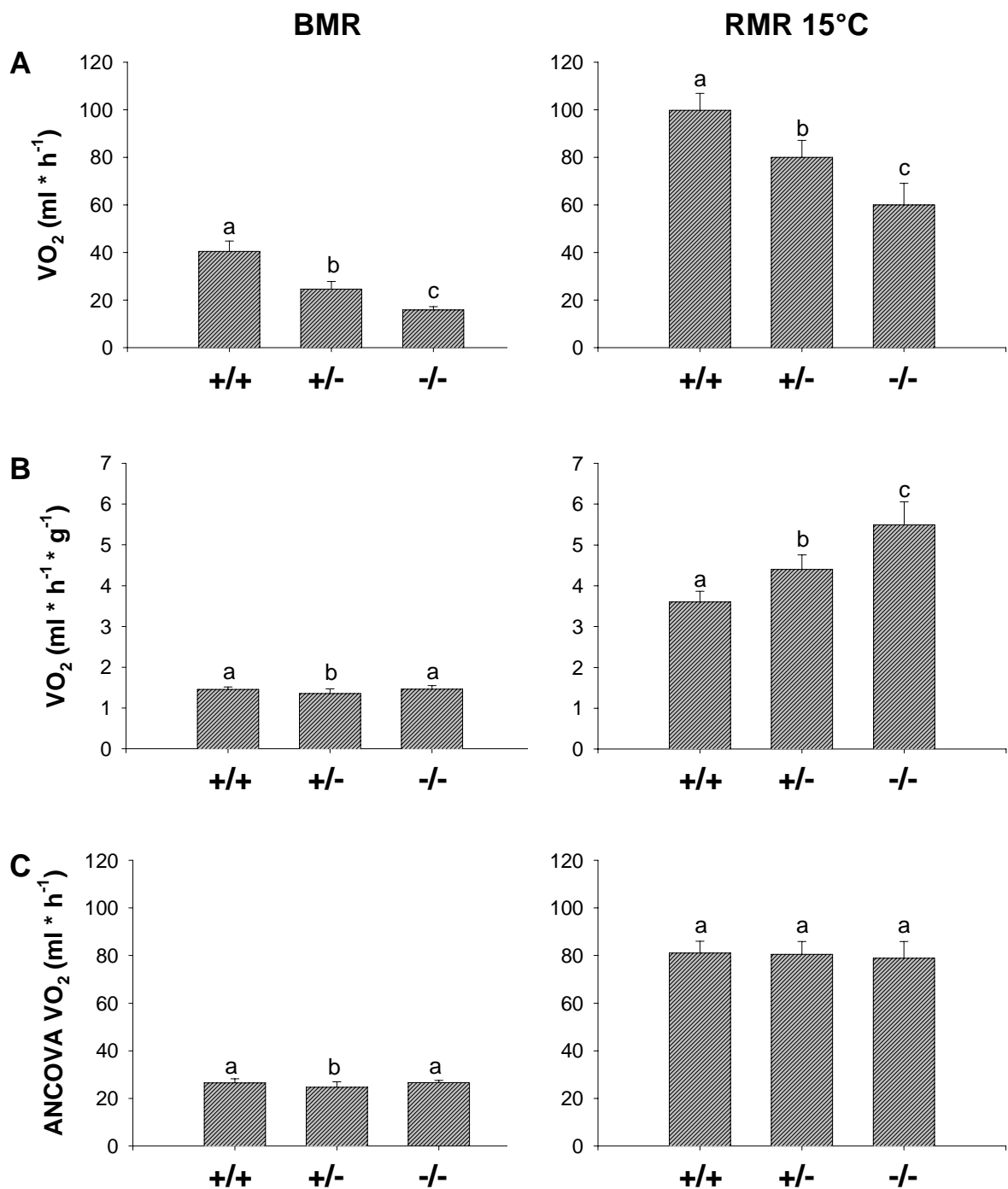


Abbildung 35: Vergleich der Ruhestoffwechselraten (VO_2 , Mittelwerte \pm SE) in Thermoneutralität (BMR) und bei 15°C (RMR 15°C) von WT- (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) SMA1-Mäusen (n=9-13 pro Genotyp): (A) absolut, (B) gewichtsspezifisch, (C) ANCOVA-adjustiert auf eine Körpermasse von 19.1 g.

Wie bereits erwähnt, haben SMA1-Mäuse sowohl in Thermoneutralität, als auch bei 15°C niedrigere Ruhestoffwechselraten (Abb. 35 A). Der Unterschied im BMR zwischen WT- und heterozygoten SMA1-Mäusen beträgt im Mittel etwa $15 \text{ ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$, der BMR

homozygoter SMA1-Mäuse liegt weitere $10 \text{ ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1}$ darunter. Dagegen sind die absoluten Sauerstoffverbrauchsraten sowie die Unterschiede zwischen den Genotypen in Kälte höher. Gewichtsspezifisch ausgedrückt ist der BMR bei allen Genotypen ähnlich (Abb. 35 B), aber der gewichtsspezifische RMR (15°C) ist bei SMA1-Mutanten deutlich erhöht. Sie müssen also eine deutlich höhere thermoregulatorische Leistung erbringen, um ihre Körpertemperatur bei 15°C aufrecht zu halten. Während WT-Mäuse ihre Stoffwechselraten auf das 3.6-Fache (95%CI: 3.4-3.8) ihres BMR erhöhen, müssen heterozygote SMA1- ihren Sauerstoffverbrauch 4.4-fach (95%CI: 4.2-4.6) und homozygote SMA1-Mäuse sogar 5.5-fach (95%CI: 5.1-5.9) steigern.

Die für eine Masse von 19.1 g adjustierte Schätzung des Sauerstoffverbrauchs (ANCOVA, Abb. 35 C) liefert sowohl in Thermoneutralität als auch bei 15°C praktisch identische Stoffwechselraten bei allen Genotypen, d.h. sowohl BMR als auch RMR der Mutanten sind proportional mit der Körpermasse reduziert. Dabei ist die in Abb. 35 C (bzw. auch in Abb. 35 B) gezeigte minimale Erniedrigung im BMR bei heterozygoten SMA1-Mäusen vermutlich eine statistische Folge (Ausreißer) bedingt durch zwei heterozygote Individuen, die einen im Verhältnis zur Körpermasse extrem niedrigen BMR zeigten (vgl. auch Abb. 34).

Zusammenfassung

Der Anstieg im Sauerstoffverbrauch mit sinkender Außentemperatur sowie die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung eines regulierten Körpertemperatursollwerts zeugen von intakter Thermoregulation bei allen Genotypen. SMA1-Mäuse haben im Bereich von 32°C bis 15°C proportional zur Körpermasse erniedrigten Basal- und Ruhestoffwechselraten. Der Exponent der Exponentialfunktion für die Beschreibung der Abhängigkeit des Basalstoffwechsels von der Körpermasse aller Genotypen ist praktisch 1 ($b=0.992$, 95%CI: 0.921-1.062, $p<0.001$, $n=32$). Die gewichtsspezifische Stoffwechselrate ist unter diesen Umständen bei allen Genotypen gleich (ca. $1.45 \text{ ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \text{ g}^{-1}$). In Kälte verringert sich der Exponent signifikant und die Steigung wird flacher (15°C : $b=0.559$, 95%CI: 0.488-0.630; $p<0.001$, $n=32$). SMA1-Mäuse müssen dann eine höhere Steigerung ihrer (basalen) Stoffwechselrate aufbringen, um ihre Körpertemperatur zu verteidigen. Der Faktor für diese Steigerung drückt sich in der gewichtsspezifischen Stoffwechselrate bei 15°C aus, die bei SMA1- signifikant höher ist als bei WT-Mäusen.

Die kombinierten Auswertungsstrategien zeigen, dass SMA1-Mutanten niedrigere Stoffwechselraten haben und dass diese tatsächlich proportional mit der Körpermasse erniedrigt sind. Allerdings müssen kleinere SMA1-Mäuse relativ mehr Energie aufbringen, um ihre Körpertemperatur unterhalb thermoneutraler Außentemperaturen zu verteidigen.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ist die Körpertemperatur der Mäuse nicht stabil, sondern schwankt zwischen 33-38°C. Alle Genotypen zeigen eine Absenkung in der Körpertemperatur in Kälte von bis zu 2°C im Vergleich zu Thermoneutralität. Entsprechend den theoretischen Erwartungen aus Abschnitt 3.10.2.2 haben SMA1- im Vergleich zu WT-Mäusen im Temperaturbereich von 32-20°C eine Tendenz zu niedrigeren Körpertemperaturen.

Auch die Wärmedurchgangszahl ist abhängig von der Außentemperatur, wobei niedrigste Werte bei allen Genotypen im Bereich moderater Kälte (24-28°C T_a) auftreten und maximale Werte unter Hitzestress (36°C T_a) erreicht werden. Die gewichtsspezifische Wärmedurchgangszahl ist bei SMA1- höher als bei WT-Mäusen, im Einklang mit einem relativ höheren Wärmeverlust bedingt durch das ungünstigere Oberflächen-Volumenverhältnis bei kleineren Tieren.

3.11 Tagesgang der Körpertemperatur

Da die Körpertemperatur von Mäusen eine hohe Plastizität aufweist, die sowohl bei gleicher Umgebungstemperatur (vgl. Abb. 13) als auch bei sich ändernder Umgebungstemperatur zum Ausdruck kommt (vgl. Abb. 12), wurde in einem zweiten Ansatz der Tagesgang der Körpertemperatur von WT- und SMA1-Mäusen unter normaler Haltungsbedingung (23°C) mittels intraperitoneal implantierter Temperatursender registriert.

Abb. 36 stellt exemplarisch Profile des Tagesgangs der Körpertemperatur von WT- und SMA1-Mäusen über 5 Tage dar. Alle Genotypen zeigen den für nachtaktive Säugetiere typischen zirkadianen Tagesgang der Körpertemperatur mit höchsten Werten zu Beginn der Dunkelphase (18:00 MEZ) und niedrigsten Werten in den Morgenstunden (6:00 MEZ = Licht an).

Wie bereits in den 24 h-Profilen zu erkennen, liegt die mittlere Körpertemperatur von homozygoten SMA1-Mäusen während des gesamten Tagesverlaufs unter der von WT- als auch von heterozygoten SMA1-Mäusen (+/+ : 36.1°C^a; *Sma1*/+ : 35.7°C^{a,b}; *Sma1/Sma1*: 35.1°C^b; $p=0.002$). Heterozygote SMA1-Mäuse haben zwar eine intermediäre Körpertemperatur, allerdings ist der Unterschied zu den beiden anderen Genotypen nicht signifikant.

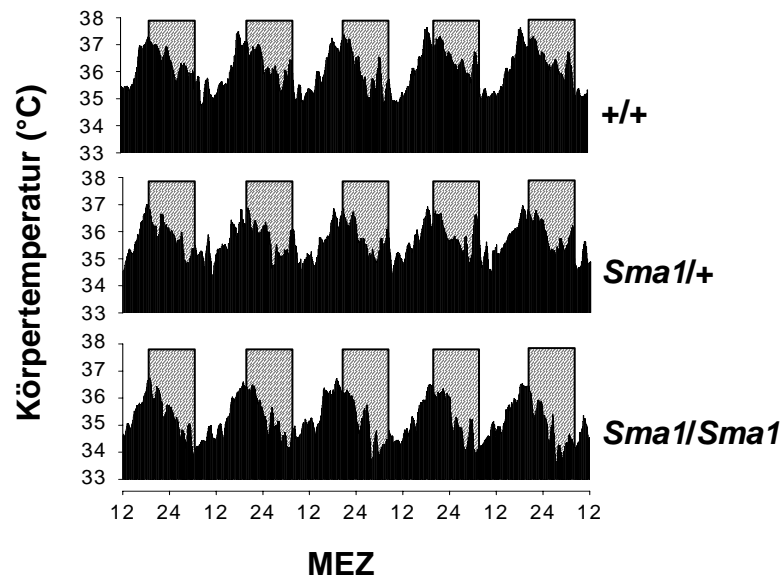


Abbildung 36: Individuelle Originalregistrierungen des Tagesgangs der Körpertemperatur von WT- und SMA1-Mäusen über 5 Tage. Die grauen Felder markieren die Lage der Dunkelphase.

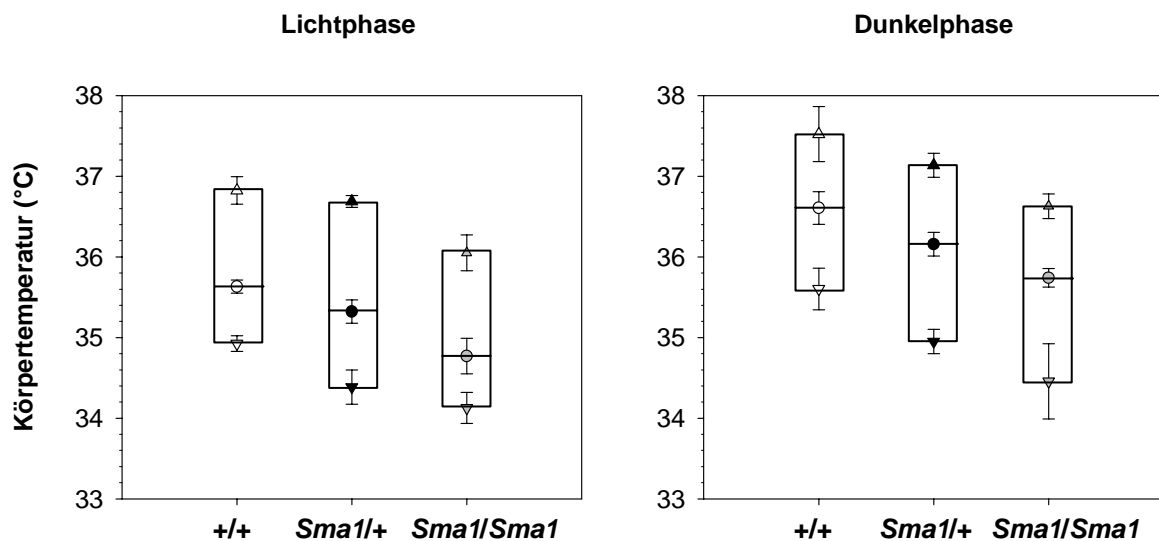


Abbildung 37: Tägliche Minima (∇), Maxima (Δ) und mittlere Körpertemperaturen (○) von WT- und SMA1-Mäusen (n=5-6 pro Genotyp) getrennt nach Licht- und Dunkelphase.

Abb. 37 stellt die mittlere Körpertemperatur, sowie Minima und Maxima für jeden Genotyp getrennt nach Licht- (12 h) und Dunkelphase (12 h) dar. Das 95%CI für die geschätzte mittlere Differenz in der mittleren Körpertemperatur zwischen WT- und homozygoten SMA1-Mäusen beträgt 0.7-1.1°C während der Licht- bzw. 0.6-1.0°C während der Dunkelphase. Auch in den täglichen bzw. nächtlichen Maxima und Minima spiegelt sich die signifikante Reduktion der Körpertemperatur bei (homozygoten) SMA1-Mäusen in

ähnlichen Größenordnungen wider. Die tägliche Amplitude der Körpertemperaturfluktuation (Differenz in der Temperatur zwischen täglichen Minima und nächtlichen Maxima) beträgt 2.1-3.1°C (+/+), 2.5-3.0°C (*Sma1/+*) bzw. 2.3-2.8°C (*Sma1/Sma1*) und ist damit nicht signifikant verschieden zwischen den Genotypen ($p=0.348$).

Zusammenfassung

In Übereinstimmung mit den theoretischen Voraussagen aus Abschnitt 3.10.2 lässt sich unter normalen Haltungsbedingungen bei homozygoten SMA1-Mäusen ein signifikant niedrigerer Körpertemperatursollwert im Vergleich zu WT-Mäusen von ca. 0.9°C (95%CI: 0.7-1.1°C) feststellen. Heterozygote SMA1-Mäuse zeigen eine Tendenz zu intermediär reduzierten Körpertemperaturen (0.4°C; 95%CI: 0.2-0.6°C), die Unterschiede zu WT- bzw. homozygoten SMA1-Mäusen sind allerdings nicht signifikant. Die zirkadiane Rhythmik der Körpertemperatur scheint bei SMA1-Mutanten unverändert.

3.12 Täglicher Energieumsatz

3.12.1 Täglicher Energieverbrauch (DEE) und RQ-Verlauf

Der tägliche Energieverbrauch (DEE) von 5 Monate alten WT- und SMA1-Mäusen wurde bei einer durchschnittlichen Außentemperatur von 27.5°C (Käfiginnentemperatur), also 1-3°C unterhalb der Thermoneutralzone der Mäuse ermittelt. Diese Außentemperatur sollte einerseits die thermoregulatorische Komponente für den täglichen Energieverbrauch minimieren und andererseits bei physischer Aktivität der Tiere keinen Hitzestress erzeugen.

Unter den gewählten Bedingungen haben WT-Mäuse das in **Abb. 38** gezeigte tagesperiodische Profil des Sauerstoffverbrauchs. Während der Licht- und der Dunkelphase sind Spitzen im Sauerstoffverbrauch zu erkennen, denen eine ultradiane Rhythmik von ca. 1-2 h zugrunde zu liegen scheint. Entsprechend den geringeren Körpermassen sind die Sauerstoffverbrauchsraten bei homozygoten und heterozygoten SMA1-Mäusen niedriger als bei WT-Mäusen.

Bei 5 (2 WT-, 1 heterozygote SMA1-, 2 homozygote SMA1-Mäuse) der insgesamt $n=36$ in den Versuch eingebrachten Mäuse musste die Messung vorzeitig abgebrochen werden, da die Tiere extremen Gewichtsverlust zeigten (>10%). Dieser (reversible) Gewichtsverlust gründete sich auf Dehydration. Offensichtlich hatten diese Mäuse die im Käfig befindlichen Wasserflaschen nicht angenommen.

Tab. 16 gibt einen Überblick über Alter, Körpermasse und deren Änderung von den $n=31$ auswertbaren Versuchstieren.

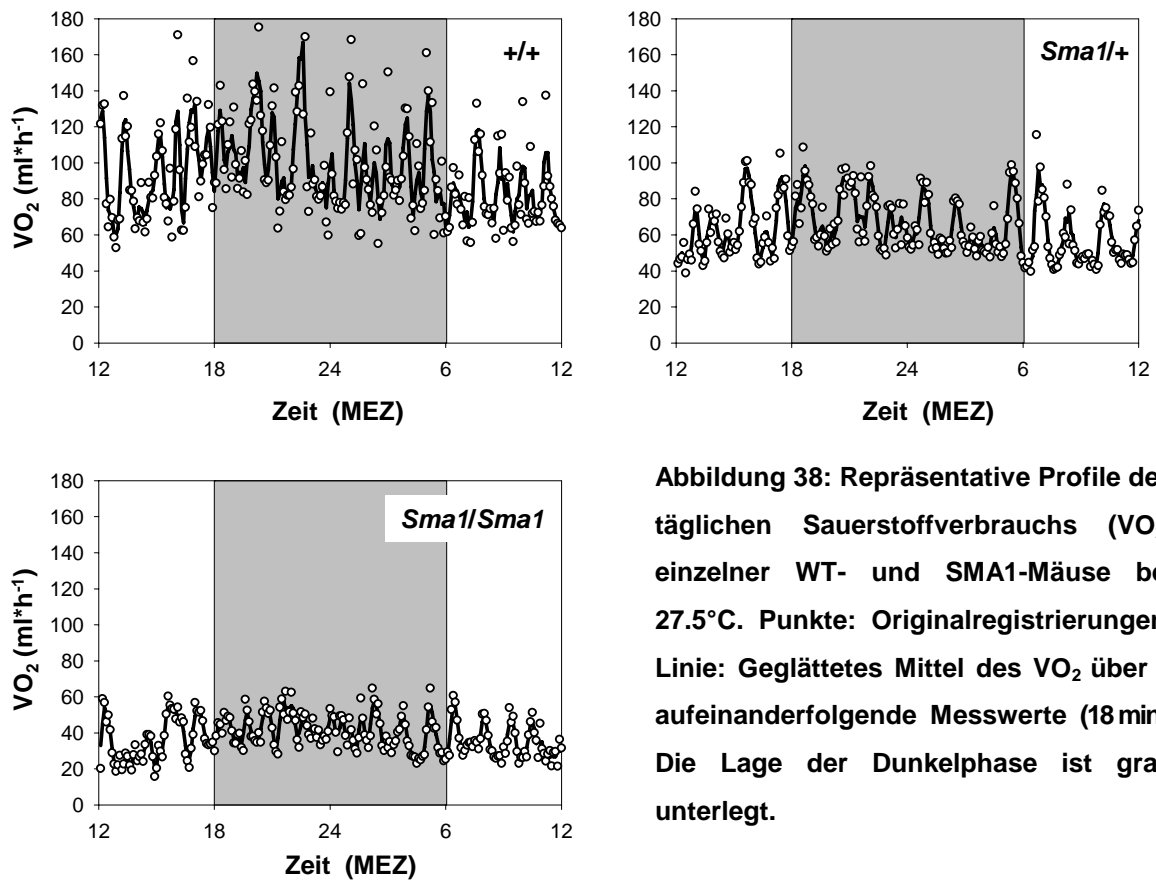


Abbildung 38: Repräsentative Profile des täglichen Sauerstoffverbrauchs (VO_2) einzelner WT- und SMA1-Mäuse bei 27.5°C . Punkte: Originalregistrierungen, Linie: Geglättetes Mittel des VO_2 über 3 aufeinanderfolgende Messwerte (18 min). Die Lage der Dunkelphase ist grau unterlegt.

Tabelle 16: Alter, mittlere Körpermasse und Gewichtsänderung ($\pm\text{SD}$ incl. Min-Max) der WT- und SMA1-Mäuse bei Bestimmung des täglichen Energieverbrauchs ($27.5^\circ\text{C } T_a$).

	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>
	n=10 (4♂/6♀)	n=14 (8♂/6♀)	n=7 (3♂/4♀)
Alter (Min-Max, Tage)	156-159	156-179	170-176
Körpermasse (g) Tag 0	30.5 ± 3.6 (25.0-37.1)	21.7 ± 4.6 (15.4-30.0)	15.7 ± 1.8 (12.5-17.6)
4 d Gewichtsänderung (g)	-0.7 ± 1.2 (-3.2-0.3)	-0.5 ± 0.9 (-2.2-0.8)	0.5 ± 0.6 (-0.5-1.3)

Der mittlere tägliche Energieverbrauch der WT-Mäuse ist etwas mehr als doppelt so hoch wie der von homozygoten SMA1-Mäusen (**Abb. 39 A**). Heterozygote SMA1-Mutanten haben im Mittel einen intermediären Energieverbrauch, die Unterschiede zwischen den Genotypen sind hochsignifikant. Das Geschlecht hat in dieser Gruppe keinen nachweisbaren Einfluss auf den DEE. Zwischen 53% und 55% der Gesamtenergie in

24 h (nicht signifikant verschieden für den Vergleich zwischen den Genotypen) wurde während der 12-stündigen Dunkelphase verbraucht.

Abb. 39 B stellt den Zusammenhang zwischen der Körpermasse und dem täglichen Energieverbrauch dar. Über alle Genotypen hinweg lässt sich der Zusammenhang beschreiben durch $\log\text{DEE}=0.252+0.924*\log\text{BM}$ (95%CI[b]: 0.742-1.104); $r^2=0.788$; $p<0.001$, $n=31$). Während die Korrelation zwischen Körpermasse und dem DEE bei heterozygoten SMA1-Mäusen hochsignifikant ist, erreicht der Zusammenhang bei WT-Mäusen knapp nicht das Signifikanzniveau und bei homozygoten SMA1-Mäusen ist keine Korrelation festzustellen.

Wie in Abb. 39 B deutlich wird, ist die Reduktion des DEE bei SMA1-Mäusen nicht-proportional zur Körpermasse, d.h. heterozygote SMA1- haben bei gleicher Masse einen um ca. 15 kJ niedrigeren DEE als WT-Mäuse. Gegenüber dem WT ist der DEE von homozygoten SMA1-Mäusen um weitere 10 kJ niedriger (insgesamt also 25 kJ).

Wie erwartet, ist auch der REE zwischen den Genotypen signifikant verschieden (jeweils $p<0.001$), d.h. bei WT- am höchsten und bei homozygoten SMA1-Mäusen am niedrigsten (**Abb. 40 A**). Der REE korreliert über alle Genotypen hinweg mit der Körpermasse ($\log\text{REE}=0.060+0.917*\log\text{BM}$, 95%CI[b]: 0.72-1.113; $r^2=0.760$, $p<0.001$, $n=31$) (**Abb. 40 B**). Innerhalb der Genotypen ist der Zusammenhang für WT- und heterozygote SMA1-Mäuse signifikant, nicht aber für homozygote SMA1-Mäuse. Der REE ist ähnlich dem DEE nicht-proportional mit der Körpermasse reduziert. Der DEE entspricht dem 1.5-1.6 - Fachen des REE (+/+ : 1.62; *Sma1*/+ : 1.54, *Sma1*/*Sma1*: 1.59; $p=0.271$), d.h. das Verhältnis DEE zu REE ist bei allen Genotypen gleich.

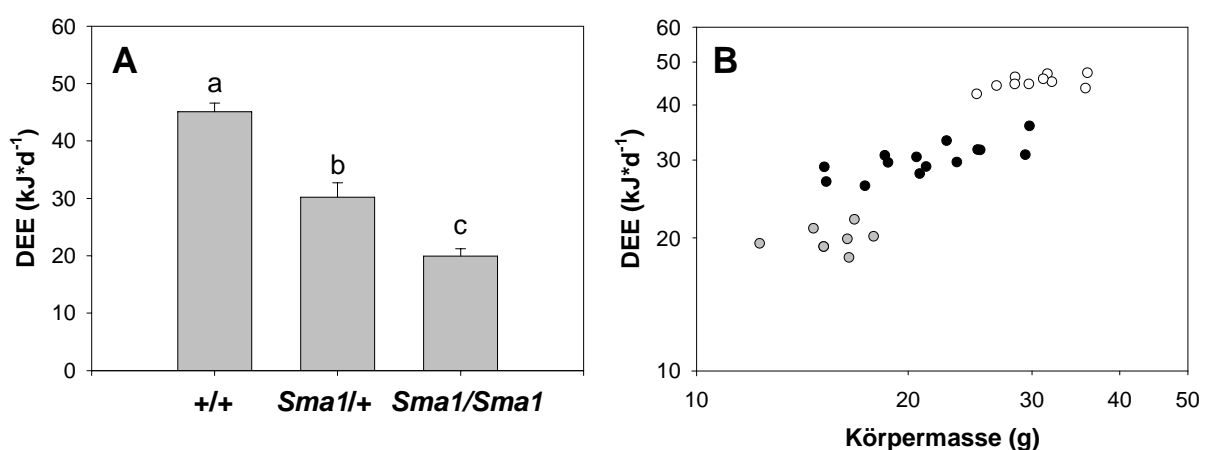


Abbildung 39: (A) Täglicher Energieverbrauch (DEE) und (B) Zusammenhang zwischen Körpermasse und DEE von WT- und SMA1-Mäusen bei 27.5°C. +/+ (weiße Symbole): $r^2=0.261$, $p=0.131$, $n=10$; *Sma1*/+ (schwarze Symbole): $r^2=0.552$, $p<0.002$, $n=14$; *Sma1*/*Sma1* (graue Symbole): $r^2=0.024$, $p=0.741$, $n=7$. a,b,c: $p<0.05$.

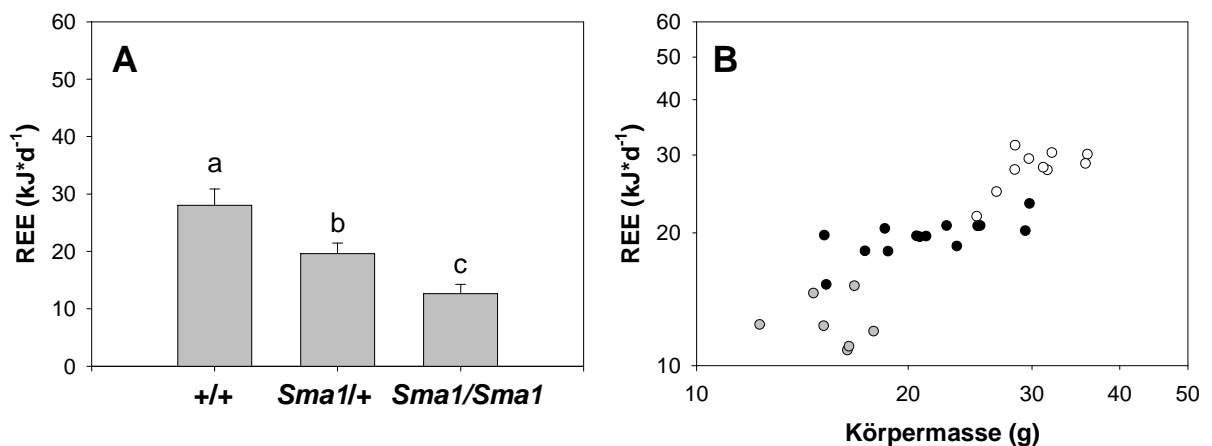


Abbildung 40: (A) Täglicher Ruheenergieverbrauch (REE) und (B) Zusammenhang zwischen Körpermasse und REE von WT- und SMA1-Mäusen bei 27.5°C. +/+ (weiße Symbole): $r^2=0.435$, $p=0.038$, $n=10$; *Sma1/+* (schwarze Symbole): $r^2=0.489$, $p<0.005$, $n=14$; *Sma1/Sma1* (graue Symbole): $r^2=0.018$, $p=0.733$, $n=7$. a,b,c: $p<0.05$.

3.12.2 Maximaler täglicher Sauerstoffverbrauch ($VO_{2max_{DEE}}$)

Wie der DEE und der REE ist auch der $VO_{2max_{DEE}}$ ist abhängig vom Genotyp bzw. der Körpermasse (Abb. 41 A und Abb. 41 B).

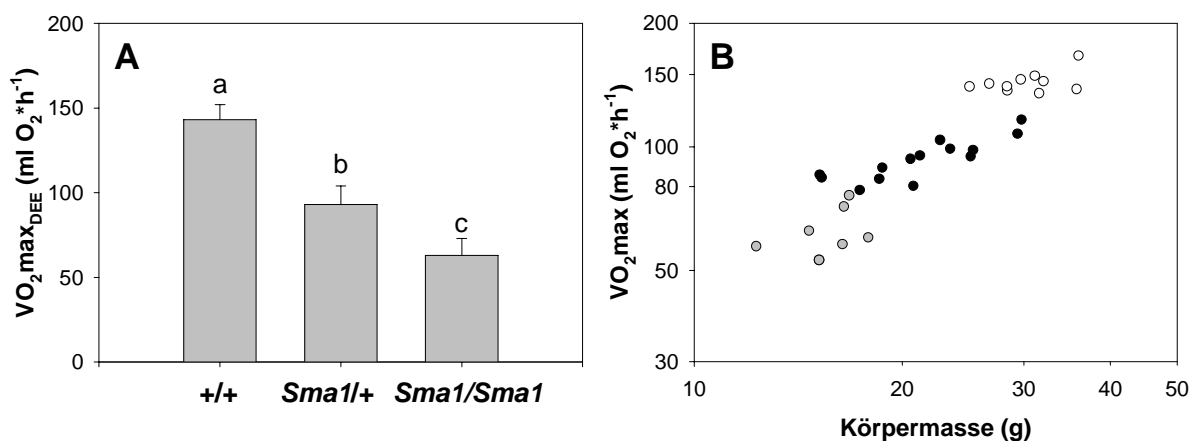


Abbildung 41: (A) Maximaler Sauerstoffverbrauch und (B) Zusammenhang zwischen Körpermasse und $VO_{2max_{DEE}}$ von WT- und SMA1-Mäusen bei 27.5°C. +/+ (weiße Symbole): $r^2=0.425$, $p=0.041$; $n=10$, *Sma1/+* (schwarze Symbole): $r^2=0.706$, $p<0.001$, $n=14$; *Sma1/Sma1* (graue Symbole): $r^2=0.161$, $p=0.373$, $n=7$. a,b,c: $p<0.05$.

Über alle drei Genotypen hinweg korrelieren maximale Stoffwechselrate und Körpermasse signifikant. Die linearisierte Beziehung lässt sich beschreiben durch: $\log VO_{2max_{DEE}}=0.850+0.935*\log BM$ (95%CI[b]: 0.846-1.024, $r^2=0.939$, $p<0.001$, $n=31$).

Das Verhältnis zwischen $VO_2\max_{DEE}$ ($ml \cdot O_2 \cdot h^{-1}$) und RMR ($ml \cdot O_2 \cdot h^{-1}$) beträgt bei allen Genotypen etwa 2.4 (+/+ : 2.6, *Sma1*/+ : 2.4; *Sma1*/*Sma1*: 2.6; $p=0.152$).

3.12.3 Energieaufnahme

Während der 24-stündigen Messung haben die Mäuse die in **Tab. 17** aufgeführten durchschnittliche Mengen an Futter verbraucht. Die pro Tag verbrauchten Mengen an Futter im Stoffwechselkäfig sind bei allen Genotypen etwas geringer als die in Abschnitt 3.9 (Tab. 14) bei 23°C im Haltungsraum gemessenen. Dies war zu erwarten, da Futterreste berücksichtigt werden konnten. Auffällig ist, dass trotz niedrigerer Körpermasse homozygote SMA1- etwa ähnliche Mengen an Futter wie heterozygote SMA1-Mäuse verbrauchen bzw. vergleichbare Mengen an Kot ausscheiden (Tab. 17). Innerhalb der Genotypen sind Futterverbrauch und Kotproduktion hochsignifikant miteinander korreliert (**Abb. 42**) und alle Genotypen liegen auf einer gemeinsamen Regression. Entsprechend ist der Assimilationskoeffizient mit ca. 77%-80% nicht-signifikant verschieden zwischen den Genotypen.

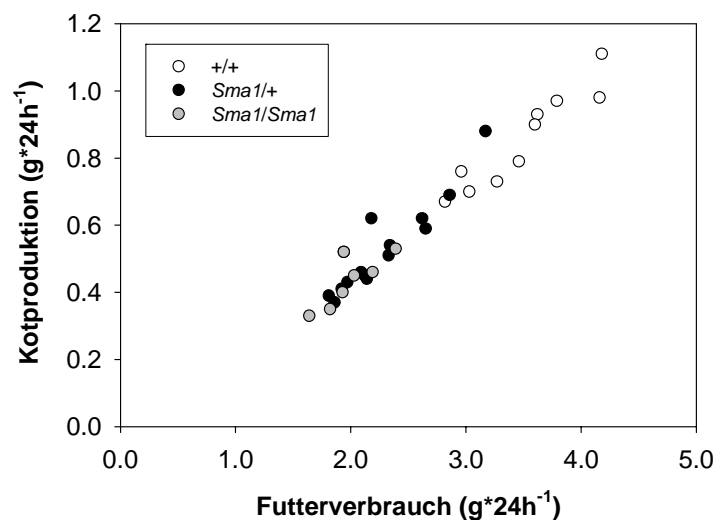


Abbildung 42: Zusammenhang zwischen täglichem Futterverbrauch und der Kotproduktion (Trockenmasse) von WT- und SMA1-Mäusen bei 27.5°C ($p < 0.001$ für jeden Genotyp). $n=7-14$.

3.12.4 Energiebilanz

Stellt man die verbrauchte Energie in $kJ \cdot 24h^{-1}$ der metabolisierten Energie gegenüber, so zeigt sich, dass WT- und heterozygote SMA1-Mäuse eine ausgeglichene Energiebilanz haben, d.h. es wurde im selben Maß Energie aus der Nahrung assimiliert bzw. metabolisiert wie über Wärme abgegeben wurde (**Tab. 17**). Homozygote SMA1-Mäuse

haben dagegen eine eindeutig positive Energiebilanz, d.h. während des Experiments wurde etwa 30% mehr Energie aufgenommen als abgegeben. Die positive Energiebilanz von homozygoten SMA1-Mäusen geht einher mit einer signifikanten Erhöhung des RQ auf mittlere Werte von >1.

Tabelle 17: 24 h-Energiebilanz bei WT- und SMA1-Mäusen (27.5°C)

	+/+	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>	
	n=10	n=14	n=7	p ANOVA
Körpermasse (g)	30.5±3.6 ^a	21.7±4.6 ^b	15.7±1.8 ^c	<0.001
DEE (kJ*24h ⁻¹)	45.08±1.54 ^a	30.20±2.50 ^c	19.95±1.29 ^b	<0.001
Median 24h RQ (Min-Max)	0.96 ^a (0.9-1.00)	0.96 ^a (0.89-1.05)	1.07 ^b (1.01-1.22)	<0.001 ¹⁾
Futtermverbrauch (g*24h ⁻¹) ²⁾	3.49±0.47 ^a	2.29±0.40 ^b	1.99±0.25 ^b	<0.001
aufgenommene Energie (kJ*24h ⁻¹) ³⁾	60.67±8.26 ^a	39.79±6.99 ^b	34.59±4.28 ^b	<0.001
Kot Trockenmasse (g*24h ⁻¹)	0.85±0.14 ^a	0.53±0.14 ^b	0.43±0.08 ^b	<0.001
Energiegehalt Kot (kJ*g ⁻¹)	16.18±0.23	16.22±0.30	16.28±0.34	0.788
Energiegehalt Kot (kJ*24h ⁻¹)	13.79±2.33 ^a	8.57±2.29 ^b	7.08±1.24 ^b	<0.001
assimilierte Energie (kJ*24h ⁻¹)	46.87±6.12 ^a	31.23±4.89 ^b	27.52±3.34 ^b	<0.001
Assimilationskoeffizient (%)	77.3±1.4	78.7±2.3	79.6±2.2	0.079
metabolisierte Energie ⁴⁾ (kJ*24h ⁻¹)	45.94±5.99 ^a	30.61±4.79 ^b	26.96±3.27 ^b	<0.001
Energiebilanz ⁵⁾	1.01±0.13 ^a	1.01±0.18 ^a	1.36±0.24 ^b	<0.001

1) KRUSKAL-WALLIS ANOVA

2) Wassergehalt: 6%

3) Energiegehalt Futter (Trockengewicht): 18.5 kJ*g⁻¹

4) 2% Energieverlust über den Urin eingerechnet

5) Verhältnis Metabolisierte Energie/DEE

Zusammenfassung

Bei Außentemperaturen von fast thermoneutral sind DEE, REE und VO₂max_{DEE} von SMA1-Mäusen nicht-proportional mit der Körpermasse erniedrigt. Die geschätzte Reduktion im DEE zwischen den Genotypen beträgt bei gleicher Körpermasse etwa 10-15 kJ pro Tag und könnte eine Erklärung für die bei SMA1-Mäusen in diesem Alter (5 Monate) manifeste Adipositas bieten. Darüber hinaus ist der Futtermverbrauch von homozygoten SMA1-Mäusen deutlich höher als man es aufgrund der geringeren Körpermasse erwarten würde, sie sind also hyperphag. Dies führt bei diesem Genotyp zu einem relativen Überschuss von metabolisierter Energie und geht einher mit einer Erhöhung des mittleren RQ auf Werte >1, der Ausdruck von de-novo Fettsynthese sein könnte. Im Vergleich zu WT- und heterozygoten SMA1- haben homozygote SMA1-Mäuse

ihre Körpermasse während der 4-tägigen Messung im Mittel geringfügig erhöht, die Zunahme ist aber nicht signifikant ($p=0.09$).

3.13 Tägliche Spontanaktivität

Die tägliche Spontanaktivität wurde über eine Woche hinweg im Haltungskäfig bei 23°C registriert. In **Abb. 43** sind repräsentative Originalregistrierungen von WT- und SMA1-Mäusen dargestellt. Von Tag zu Tag kann die Summe der täglichen Spontanaktivität intraindividuell von 5-27% variieren; diese Variation ist unabhängig vom Genotyp. Die mittlere tägliche Spontanaktivität sowie die Körpermasse und das Alter der Versuchstiere sind in **Tab. 18** aufgeführt. Während heterozygote SMA1- und WT-Mäuse eine ähnliche mittlere Spontanaktivität zeigen, sind homozygote SMA1-Mäuse deutlich weniger aktiv. Der Anteil der nächtlichen Aktivitätsereignisse an der täglichen Gesamtaktivität beträgt bei allen Genotypen etwa 78%.

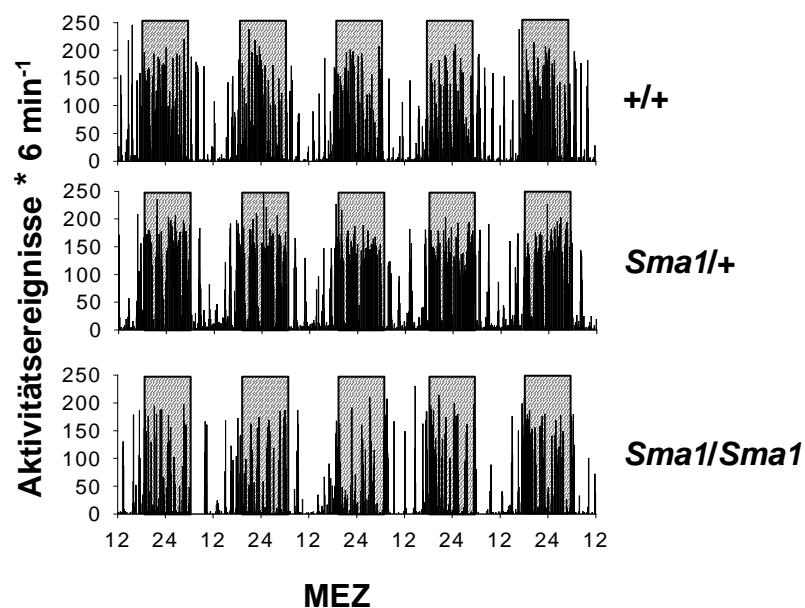


Abbildung 43: Originalregistrierung der täglichen Spontanaktivität (Summe der Aktivitätsereignisse $\cdot 6 \text{ min}^{-1}$) von WT- und SMA1-Mäusen im Haltungskäfig bei 23°C mittels passiven Infrarot-Bewegungsmeldern. Die grauen Balken markieren die Lage der Dunkelphase (12 h).

Innerhalb der Genotypen korrelieren Körpermasse und Gesamtaktivität, d.h. je schwerer eine Maus desto niedriger ihre Gesamtaktivität (**Abb. 44**). Dieser Zusammenhang trifft vermutlich für beide Geschlechter zu (vgl. Abb. 44). Darüber hinaus scheinen bei gleicher Masse SMA1- weniger aktiv als WT-Mäuse zu sein, wobei heterozygote SMA1-Mäuse

intermediär liegen. Auf eine quantitative Auswertung mit ANCOVA wurde aber angesichts der großen Streuungen verzichtet.

Tabelle 18: Alter, Körpermasse (\pm SD), Summe der mittleren Aktivitätsereignisse \cdot 24 h⁻¹ (incl. Min-Max) und Anteil der Nachtaktivität (incl. Min-Max) von WT- und SMA1-Mäusen im Haltungskäfig bei 23°C. In Klammern: Min-Max. a,b,c: $p < 0.05$.

	+/+	<i>Sma1</i> /+	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>
	n=11 (6♂;5♀)	n=21 (8♂;13♀)	n=8 (5♂;3♀)
Alter (Tage)	124 (109-140)	117 (109-138)	129 (113-140)
Körpermasse (g)	30.6 \pm 5.4	18.0 \pm 3.8	12.7 \pm 2.5
Summe Aktivitätsereignisse/24h	12 000 ^a (7517-17015)	11881 ^a (7029-22037)	6675 ^b (3943-12646)
% Aktivität Dunkelphase	76 ^a (67-84)	81 ^a (62-93)	76 ^a (69-86)

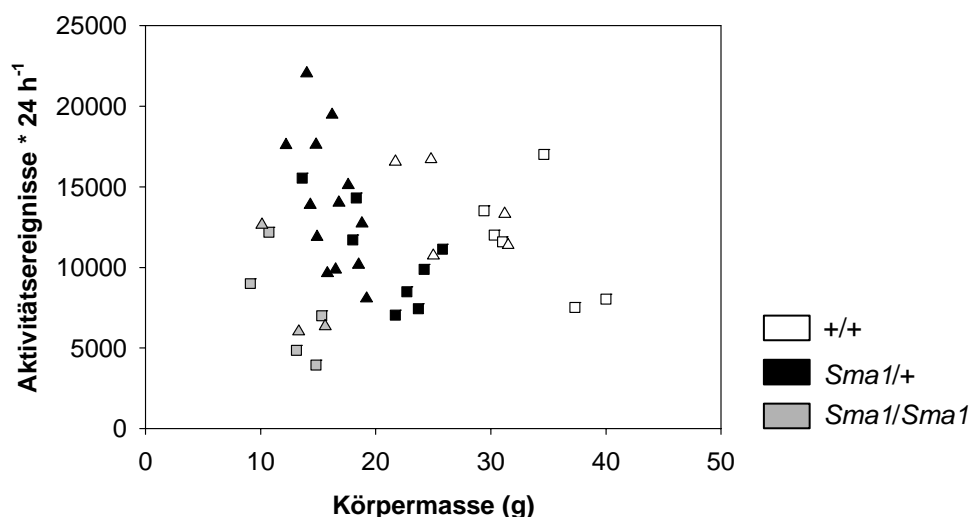


Abbildung 44: Zusammenhang zwischen Körpermasse und Summe der täglichen Aktivitätsereignisse bei WT- und SMA1-Mäusen. +/+: $r^2=0.38$, $p=0.042$, $n=11$; ***Sma1*/+:** $r^2=0.45$, $p < 0.001$, $n=21$; ***Sma1*/*Sma1*:** $r^2=0.51$, $p=0.034$, $n=8$. Quadrate: Männchen, Dreiecke: Weibchen.

3.14 UCP-1 Expression im interscapularen Braunen Fett (iBAT)

In **Abb. 45 A** sind die mittels Northern-Detektion ermittelten Signalintensitäten der UCP-1-mRNA im iBAT von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten dargestellt. Dabei handelt es sich um die in Tab.13 aufgeführten Gewebeproben. Es lässt sich kein Unterschied in der UCP-1-mRNA-Expression zwischen den Genotypen feststellen. Auch

die UCP-1-Proteinexpression (**Abb 45 B**) im iBAT unterscheidet sich nicht zwischen den Genotypen ($p=0.824$).

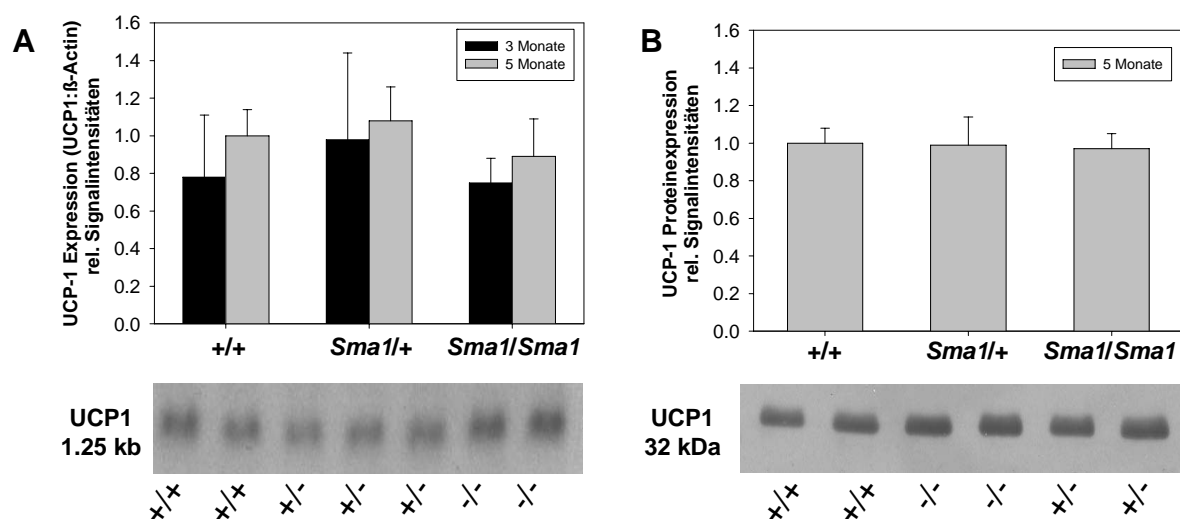


Abbildung 45: (A) Quantitativer Vergleich der UCP-1-mRNA-Expression im interscapularen braunen Fett von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten ($n=5-7$ pro Genotyp und Alter). (B) Quantitativer Vergleich der UCP-1-Proteinexpression im interscapularen braunen Fett von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 5 Monaten ($n=4$ pro Genotyp).

3.15 Makroskopie der Hypophysen und hypophysärer GH-Gehalt

Die Hypophysen von WT- und SMA1-Mäusen wurden im Alter von 2-3 Monaten entnommen. Wie alle präparierten Organe mit Ausnahme des Fetts sind auch die Hypophysen von heterozygoten SMA1-Mäusen in ihrer Größe und ihrem Gewicht intermediär zu den Hypophysen homozygoter SMA1-Mäuse (**Tab. 19**). Makroskopisch zeigt sich darüber hinaus eine deutliche, nicht-proportionale Reduktion der Größe des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) im Vergleich zum Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) (**Abb. 46**). Die Hypophysenvorderlappen der SMA1-Mutanten erscheinen dabei im Vergleich zu WT-Adenohypophysen durchsichtig.

Tabelle 19: Mediane Masse (incl. Min-Max) der Hypophysen von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 2-3 Monaten.

	+/+	Sma1/+	Sma1/Sma1
	n=5	n=6	n=6
Masse (mg)	1.5	1.0	0.6
(Min-Max)	(1.4-2.1)	(0.5-1.9)	(0.2-0.9)

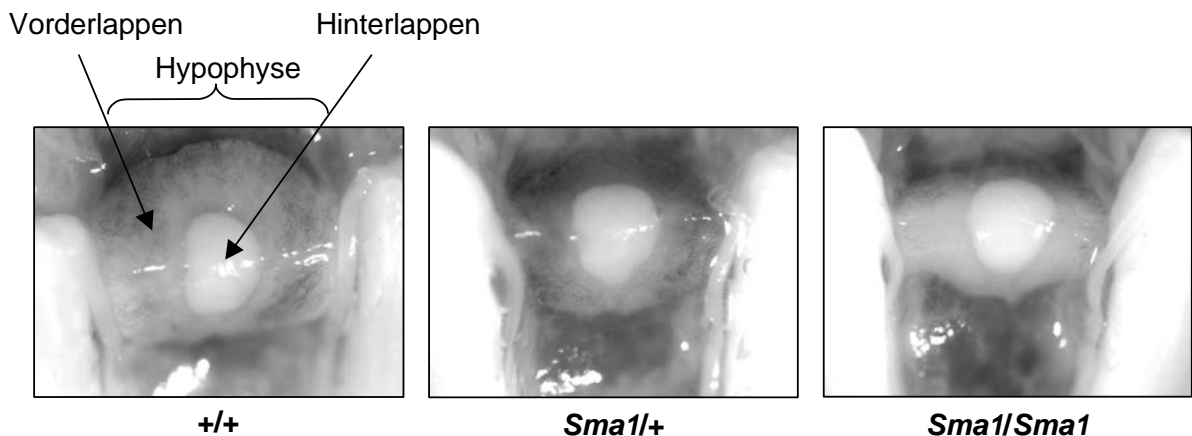


Abbildung 46: Dorsale Ansicht der Hypophysen von WT- und SMA1-Mäusen *in-situ*. Bei SMA1-Mäusen ist der Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) im Verhältnis zum Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse) reduziert. Die Fotos wurden mit freundlicher Genehmigung von Ingenium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt.

Mittels des vom NIDDK zur Verfügung gestellten Antikörpers gelang die immunologische Detektion von GH in Hypophysenhomogenaten von Ratte und Maus (**Abb. 47**). Bereits auf der Nitrozellulosemembran ist nach Anfärbung mit Ponceau in der Region von ~22 kDa bei allen Wildtypen eine Bande zu erkennen, die auch in Höhe des bGH-Standards liegt.

Qualitativ ist der Gehalt an hypophysärem GH im Alter von 2-3 Monaten bereits bei heterozygoten SMA1-Mäusen deutlicher reduziert, als es aufgrund der verringerten Hypophysenmasse zu erwarten wäre. Bei homozygoten SMA1-Mäusen wird GH sehr schwach exprimiert (**Abb. 48**). Die geschätzte relative Expression von GH bei Mutanten beträgt in diesem Blot etwa ~32% (*Sma1/+*) bzw. < 5% (*Sma1/Sma1*) im Vergleich zur GH-Expression bei WT-Mäusen (100%).

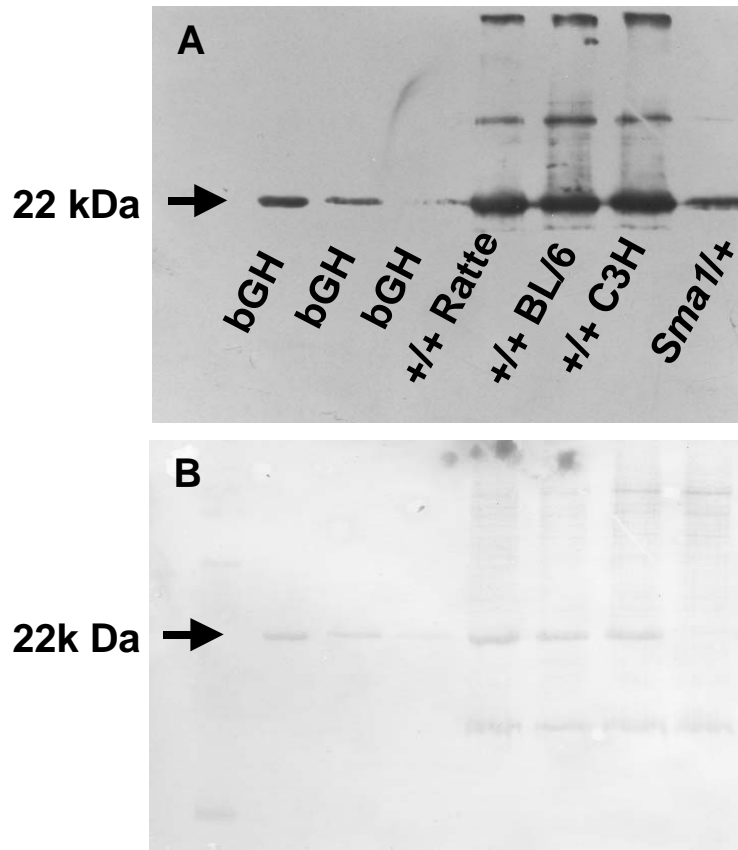


Abbildung 47: (A) Immunologische Detektion von GH in Hypophysenhomogenaten von Ratte (Sprague-Dawley) und Maus (BL/6 bzw. C3HeB/FeJ) mittels Western-Blot. Als Referenz wurde ein Standard von Rinder-GH (bGH) in verschiedenen Konzentrationen (v. l. n. r. : 1 μ g, 0.5 μ g, 0.3 μ g) aufgetragen. Die prominente GH-Bande bei ~22 kDa ist bei allen Wildtypen (Ratte wie Maus) bereits auf der mit Ponceau gefärbten Nitrozellulose-Membran (B) zu erkennen, nicht aber bei der heterozygoten SMA1-Maus (ganz rechts)

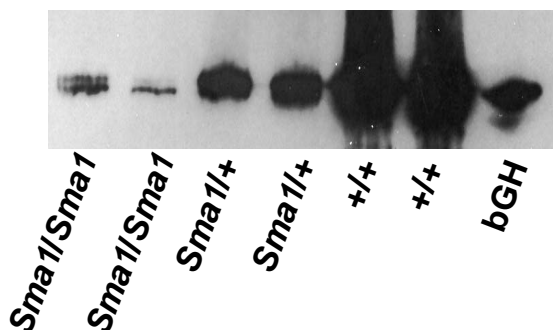


Abbildung 48: Immunologische Detektion von GH in Hypophysenhomogenaten von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 2-3 Monaten. bGH: Referenzprobe aus 1 μ g Rinder-GH (bGH, 22 kDa).

3.16 GH, IGF-1 und Ghrelin im Blut

Die Ergebnisse der GH- und IGF-1-Analysen 3 Monate alter Mäuse sind in **Abb. 49** dargestellt. Aufgrund der geringen Stichprobengröße und der z.T. starken Streuungen wurde nicht nach Männchen und Weibchen unterschieden.

Erwartungsgemäß zeigen WT-Mäuse die höchsten IGF-1- und GH-Spiegel im Plasma. Homozygote SMA1-Mäuse haben die geringsten Plasma-IGF-1-Werte und nicht detektierbares GH. Im Einklang mit dem semidominanten Phänotyp haben heterozygote SMA1-Mäuse intermediäre Plasma IGF-1-Spiegel, wobei bei ihnen die Reduktion im Plasma-IGF-1 im Vergleich zu WT-Mäusen mehr als 50% beträgt. Überraschenderweise ist auch bei ihnen kein GH im Plasma nachweisbar (nur zwei von 8 Proben heterozygoter SMA1-Mäuse lagen oberhalb der Nachweisgrenze von 0.63 ng/ml).

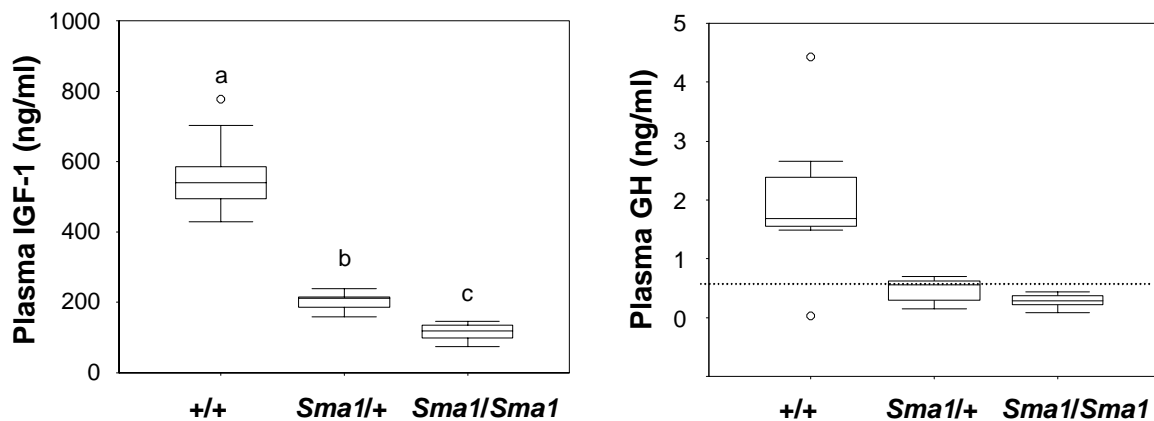


Abbildung 49: Plasma-GH- (n=7-8 pro Genotyp) und IGF-1-Spiegel (n=10-13 pro Genotyp) WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten (IGF-1 (*Sma1/Sma1*): 3 und 5 Monaten). Die Boxen markieren Median, 25% und 75%-Perzentil sowie Minimum und Maximum. Die Kreise illustrieren Ausreißer (Abweichung von den Quartilen beträgt mehr als das 1.5-Fache des Interquartilbereichs = Boxlänge). Die gestrichelte Linie markiert die untere Nachweisgrenze des GH-ELISAs (0.63 ng/ml). a,b,c: $p < 0.05$ (KRUSKAL-WALLIS ANOVA mit *post-hoc*-Test nach DUNN).

Die im Blut zirkulierenden Ghrelin-Spiegel zeigen ebenfalls eine Abhängigkeit vom Genotyp ($p=0.004$, KRUSKAL-WALLIS ANOVA) (**Abb. 50**): Im Vergleich zu den WT-Mäusen haben homozygote SMA1-Mäuse signifikant erhöhtes Ghrelin. Heterozygote SMA1-Mäuse haben intermediäre Ghrelin-Spiegel, die nicht verschieden von denen der WT-Mäuse sind und sich nur knapp nicht-signifikant unterscheiden von den Werten der heterozygoten SMA1-Mäuse ($p=0.06$).

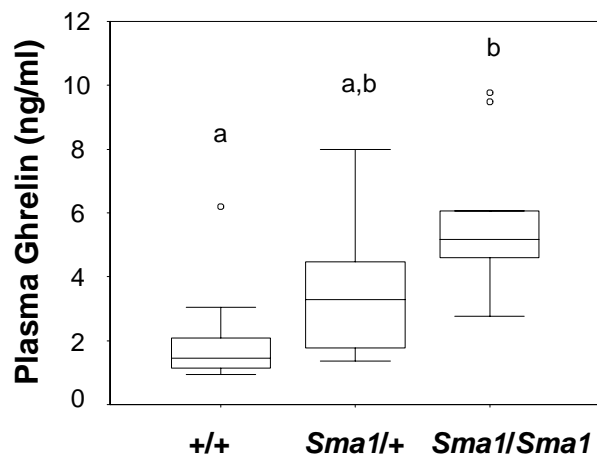


Abbildung 50: Plasma-Ghrelin-Spiegel von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten. n=9-13 pro Genotyp. a,b: $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis-ANOVA mit *post-hoc*-Test nach Dunn). Erklärung der Boxen und Symbole siehe Abb. 49.

4 ERGEBNISSE: DAVID

4.1 Körpermassen, Körperlängen, Wachstumsraten und Zuchterfolg

David-Phänotypen zeichnen sich durch Zwergwüchsigkeit aus, die zu einer verringerten Körpermasse führt (**Tab. 20**). Hierbei sind David-Weibchen sowohl kürzer als auch leichter als David-Männchen.

Tabelle 20: Körpermassen (BM) und -längen (\pm SD incl. Min-Max) von 10-12 Wochen alten WT- und David-Mäusen. a,b: $p < 0.05$ für den Vergleich der Körpermassen bzw. -längen zwischen den Genotypen jedes Geschlechts.

	Männchen		Weibchen	
	WT	David	WT	David
	n=14	n=8	n=10	n=8
BM (g)	30.3 \pm 3.3 ^a (25.6-35.6)	18.4 \pm 1.5 ^b (16.3-20.7)	26.4 \pm 3.24 ^a (22.9-33.2)	16.9 \pm 1.1 ^b (15.5-18.2)
Kopf-Rumpf (mm)	100.4 \pm 2.6 ^a (97-104)	86.9 \pm 3.0 ^b (83-91)	99.6 \pm 3.6 ^a (91-103)	88.4 \pm 2.9 ^b (83-91)

Die Nachkommen aus verschiedenen Zuchtpaarkombinationen von David- und WT-Mäusen (+/+ als auch +/- aufgrund ihrer Abstammung) spalten sich in zwei distinkte Gewichtgruppen auf (= David und WT, **Abb. 51**). Es gibt keinen offensichtlichen Hinweis auf einen intermediären Phänotyp. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei genügend hoher Anzahl an Nachkommen aus [+/>+ x +/-]-Zuchtpaaren (geringe) Unterschiede zwischen WT-Phänotypen in Größe oder Gewicht nachweisbar werden, die mit dem Genotyp (+/>+ oder +/-) korrelieren.

Bereits am Tag 7 sind David-Mäuse optisch anhand ihrer verringerten Körpergröße unter den Nachkommen eines Wurfes zu erkennen, unabhängig von der Wurfgröße. Auch das Körpergewicht von David-Phänotypen ist schon am Tag 7 mit 3.4 \pm 0.4 g (n=18) signifikant niedriger als das Gewicht der WT-Phänotypen (5.4 \pm 0.7 g; n=27). Bis zum Alter von 10 Wochen und auch darüber hinaus liegen die Gewichte von David-Mäusen immer unter denen vergleichbar alter WT-Mäuse (Abb. 52). Ähnlich wie bei SMA1- ist auch bei David-Mäusen der peripubertale Wachstumsschub reduziert. Nach der Pubertät, ab einem Alter von 5-6 Wochen, unterscheiden sich die Wachstumsraten zwischen WT- und David-Mäusen dann nicht mehr signifikant voneinander.

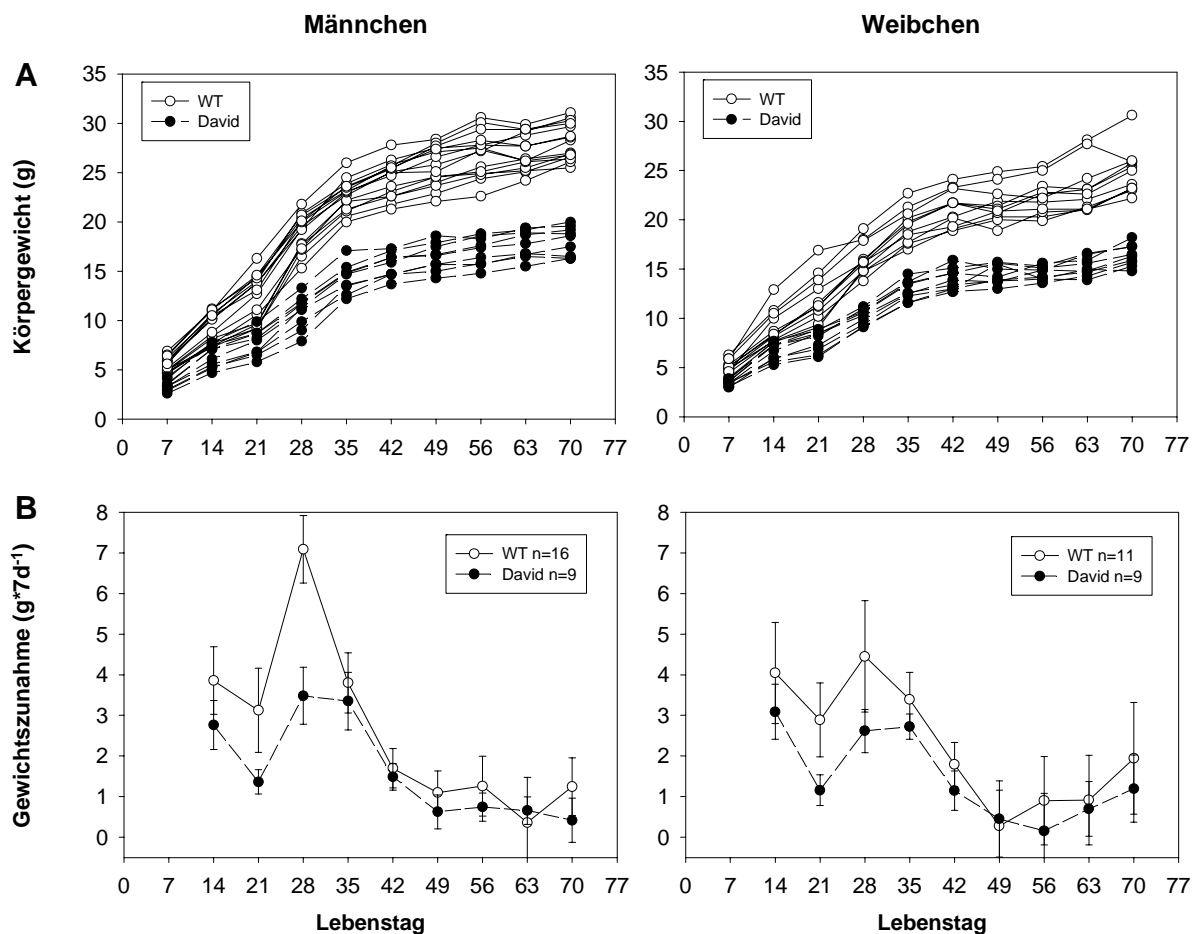


Abbildung 51: (A) Wachstumskurven und (B) kumulative Gewichtszunahme (7 Tage) von männlichen und weiblichen WT- bzw. David-Phänotypen. Die Mäuse stammen aus n=2 [WT x David]-Zuchtpaaren und n=5 [WT x WT]-Zuchtpaaren sowie n=2 [David x David]- Zuchtpaaren (alle WT-Männchen in den Zuchtpaaren sind +/- aufgrund der Abstammung).

[WT x WT]-Zuchtpaare haben die größten Chancen auf lebenden Nachkommen, aber nur ca. 30% der Zuchtpaare aus [WT-Männchen x David-Weibchen] haben überlebenden Nachwuchs. Insgesamt ist der Fortpflanzungserfolg unter Beteiligung von David-Phänotypen geringer als bei WT-Zuchtpaaren, und auch die Wurfgröße ist kleiner (**Tab. 21** und **Tab. 22**). Die Tragzeit scheint unbeeinflusst vom Phänotyp des Weibchens.

Die Häufigkeit, mit der WT- und David-Phänotypen unter den Nachkommen von [(aufgrund ihrer Abstammung heterozygoten) WT x David] -Zuchtpaaren auftreten, weicht nicht signifikant von den nach Mendel zu erwartenden Zahlenverhältnissen ab (**Tab. 23**).

Tabelle 21: Zuchterfolg verschiedener Kombinationen von David- und WT-Mäusen. In Klammern: Anzahl der Zuchtpaare aus N=43 Zuchtpaaren (37 Weibchen).

Phänotyp des Zuchtpaares (♂x♀)	n	mit lebenden Nachkommen	Abort/ Infantizid	keine Nachkommen
WT [‡] x WT [†]	7	85% (6)	15% (1)	-
WT [‡] x David	13	31% (4)	8% (1)	61% (8)
David x WT [‡]	15	60% (9)	7% (1)	33% (5)
David x David	8	50% (4)	50% (4)	-

† +/- oder +/- aufgrund der Abstammung

‡ +/- aufgrund der Abstammung

Tabelle 22: Einfluss des elterlichen Phänotyps auf die Wurfgröße.

Phänotyp Zuchtpaar (♂x♀)	n	Wurfgröße			Tragzeit (Tage) [#]		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max
WT [‡] x WT [†]	6	4	6	9	20	20-21	23
WT [‡] x David	4	4	4-5	5	21	22	36
David x WT [‡]	9	2	3	7	19	23-24	33
David x David	4	2	4-5	6	21	22	23

[#]Tragzeit: Zeitintervall von der Zuchtpaarbildung bis zur Geburt.

† +/- oder +/- aufgrund der Abstammung

‡ +/- aufgrund der Abstammung

Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung der Phänotypen aus N=17 Zuchtpaaren von David- und WT-Mäusen. Die hier aufgeführten WT-Mäuse in den Zuchtpaaren sind aufgrund ihrer Abstammung alle (+/-).

Phänotyp Zuchtpaar (♂x♀)	Phänotyp Nachkommen	n	beobachtet (%)	Erwartet (%)	p
WTx David (n=4)	WT	8	42	50	>0.05
	David	11	58	50	
David x WT (n=9)	WT	18	51	50	>0.05
	David	17	49	50	
WT x WT (n=4)	WT	26	76	75	>0.05.
	David	6	23	25	

4.2 Körperzusammensetzung

In **Tab. 24** sind Körperlängen und mittels Trocknung und Soxhlet-Extraktion bestimmte Fettmasse, FFDM und Wassergehalt von WT- und David-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten aufgeführt. Die verringerte Körpermasse spiegelt sich in allen Parametern wider. Sowohl bei WT- als auch bei David-Phänotypen korrelieren Körpermasse und Fettgehalt, FFDM und Wassergehalt ($0.759 \leq r^2 \leq 0.937$; $p \leq 0.002$). Die Korrelationen umfassen die kumulierten Daten von beiden Altersgruppen, da die 5 Monate alten Mäuse jeweils in der Verlängerung der Regression der 3 Monate alten Mäuse liegen (Regressionsgleichungen siehe Anhang Tab. VII und VIII). Wie in **Abbildung 52 A und B** zu erkennen, ist die Fettmasse bei David-Mäusen nicht wie ursprünglich erwartet überproportional verringert, sondern liegt in der Verlängerung der WT-Regression bzw. sogar geringfügig darüber. FFDM und Wassergehalt liegen als Funktion der Körpermasse bei WT- und David-Mäusen jeweils auf ähnlichen Regressionen (**Abb. 52 C und D**).

Tabelle 24: Körperzusammensetzung von WT- und David-Mäusen Alter von 3 und 5 Monaten. Aufgeführt sind Mittelwerte (\pm SD) sowie Spannbreiten (Min-Max). a,b: $p < 0.05$ getrennt für jede Altersgruppe. Der prozentuale Anteil von Fett bezieht sich auf das Lebendgewicht (BM lebend) der Mäuse .

	3 Monate		5 Monate	
	WT	David	WT	David
	n=9	n=6	n=7	n=3
Alter (Tage)	80 (77-83)	78 (71-79)	168 (167-169)	162 (160-164)
Länge (mm)	98 (95-102)	85 (83-87)	103 (99-105)	79 (74-83)
BM (g) lebend	28.1 \pm 4.1 ^a (23.1-35.6)	17.4 \pm 1.6 ^b (15.5-19.9)	33.4 \pm 3.5 ^a (27.1-37.4)	20.6 \pm 1.7 ^b (18.8-22.1)
BM (g) Extraktion [#]	24.4 \pm 3.7 ^a (19.8-31.4)	14.5 \pm 1.6 ^b (12.6-17.0)	29.2 \pm 3.4 ^a (23.4-33.0)	17.7 \pm 1.5 ^b (16.1-19.1)
Fett (g)	3.5 \pm 1.9 ^a (1.8-7.6)	1.2 \pm 0.2 ^b (0.9-1.4)	5.7 \pm 1.9 ^a (2.6-7.8)	2.1 \pm 0.3 ^b (1.9-2.4)
% Fett	11.8 \pm 4.4 ^a (7.2-21.8)	6.9 \pm 0.8 ^b (5.7-8.2)	16.9 \pm 4.3 ^a (8.7-21.4)	10.2 \pm 0.8 ^b (9.4-11.0)
FFM (g)	24.7 \pm 2. ^a (21.0-29.0)	16.2 \pm 1.5 ^b (14.4-18.5)	27.6 \pm 1.7 ^a (25.8-29.6)	18.5 \pm 1. ^b (16.9-19.7)
FFDM (g)	5.6 \pm 0.7 ^a (4.5-6.7)	3.2 \pm 0.4 ^b (2.7-3.8)	6.4 \pm 0.6 ^a (5.6-7.0)	4.0 \pm 0.4 ^b (3.6-4.3)
Wasser (g)	15.3 \pm 1.3 ^a (13.3-17.1)	6.9 \pm 0.8 ^b (5.7-8.2)	17.1 \pm 1.0 ^a (15.5-18.2)	11.5 \pm 0.9 ^b (10.6-12.3)

[#] ohne Gehirn und GI-Trakt.

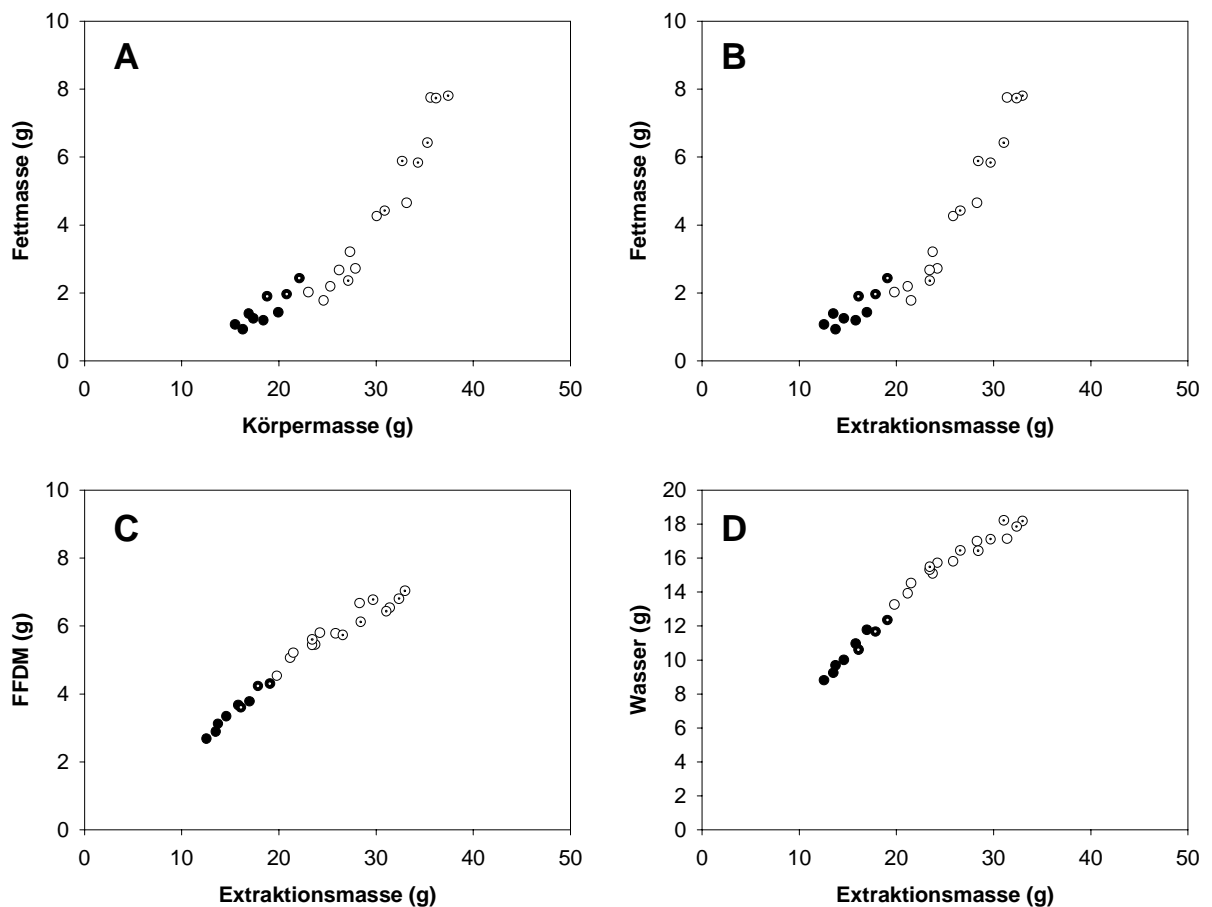


Abbildung 52: Beziehung zwischen (A) Körpermasse (lebende Maus) und Fettmasse, (B-D) Körpermasse vor Extraktion (Körpermasse ohne Gehirn und GI-Trakt) und Fettmasse, FFDM bzw. Wasser von WT- und David-Mäusen im Alter von 3 Monaten (ausgefüllte Symbole) und 5 Monaten (Punkt im Symbol). Weisse Kreise: WT-, schwarze Kreise: David-Mäuse. n=3-9 pro Gruppe.

4.3 Futterverbrauch

Der Futterverbrauch von David-Mäusen liegt sowohl im Alter von 3 als auch im Alter von 5 Monaten unter dem vergleichbar alter WT-Mäuse (**Tab. 25**). Die Reduktion im Futterverbrauch ist nicht nachweisbar abweichend von der Proportionalität mit der Körpermasse (**Abb. 53**). Aufgrund der hohen Streuungen und damit verbundenen schwachen Korrelationen ($0.03 \leq r^2 \leq 0.40$; nur für WT-Mäuse jeder Altersgruppe $p < 0.05$) ist hier aber keine sichere Aussage möglich.

Tabelle 25: Körpermassen (BM) und täglicher Futterverbrauch (\pm SD) von WT- und David-Mäusen bei 23°C im Haltungskäfig. a,b: $p < 0.05$ für den Vergleich der Phänotypen in jeder Altersgruppe.

	3 Monate		5 Monate	
	WT	David	WT	David
	n=33 (18♂/15♀)	n=14 (6♂/8♀)	n=31 (22♂/9♀)	n=11 (4♂/7♀)
BM (g)	26.6 \pm 0.6 ^a	17.1 \pm 0.3 ^b	33.6 \pm 0.7 ^b	19.5 \pm 0.4 ^b
Futter (g*24h ⁻¹)	5.0 \pm 0.1 ^a	3.9 \pm 0.7 ^b	4.5 \pm 0.1 ^a	3.1 \pm 0.1 ^b

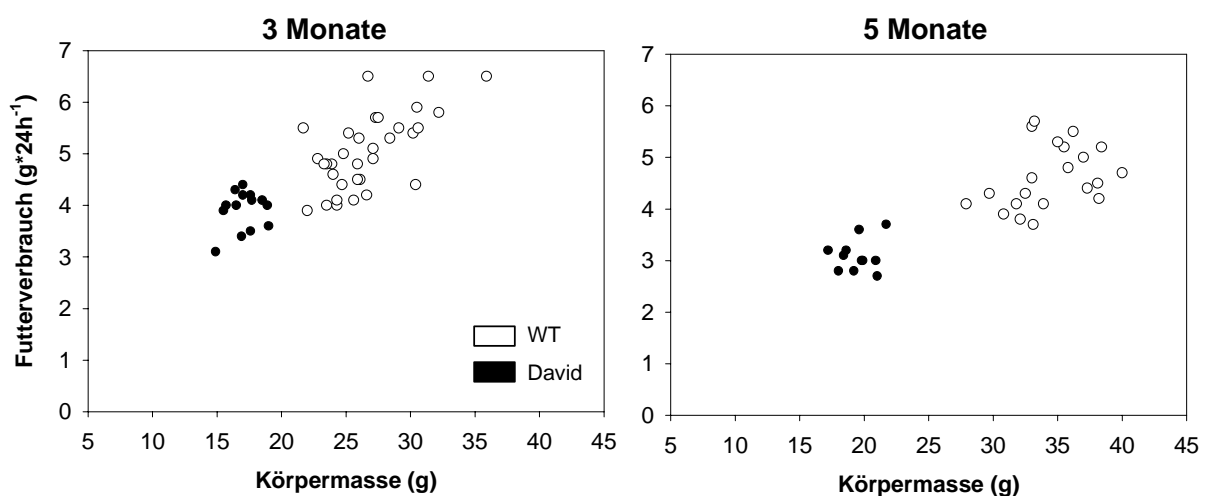


Abbildung 53: Zusammenhang zwischen der Körpermasse und dem täglichen Futterverbrauch von WT- und David-Mäusen bei 23°C im Haltungskäfig (n=11-33 pro Gruppe).

4.4 Ruhestoffwechselraten und Körpertemperatur

Auch männliche David-Mäuse zeigen intakte Thermoregulation im Temperaturbereich von 15-32°C (**Abb. 54**). Die Thermoneutralzone liegt bei WT-Mäusen zwischen 28°C und 32°C, bei David-Mäusen im Bereich von 30-32°C. BMR und RMRs von David-Mäusen sind immer niedriger als von WT-Mäusen.

Die T_{lc} von David-Mäusen liegt höher als die von WT-Mäusen, der Unterschied ist aber knapp nicht signifikant ($p=0.093$, U-Test) (**Tab. 26**). Die Extrapolation der linearen Beziehung zwischen Außentemperatur und dem Sauerstoffverbrauch in Kälte (24-15°C bei WT-, 28-15°C bei David-Mäusen) auf die Abszisse ergibt eine T_{bth} von 38.8°C bei WT- und 36.3°C bei David-Mäusen; auch diese Werte sind nicht signifikant verschieden voneinander ($p=0.394$, U-Test). An einer anderen Gruppe von männlichen Mäusen im Haltungsraum

wurde mittels Rektalfühler ebenfalls kein Unterschied in der Körpertemperatur gemessen (Mediane T_{rektal} WT: 36.5°C (n=11); David: 36.6°C (n=5)).

Der RQ-Verlauf während der BMR/RMR- Messung unterscheidet sich nicht zwischen den Phänotypen (Daten nicht abgebildet).

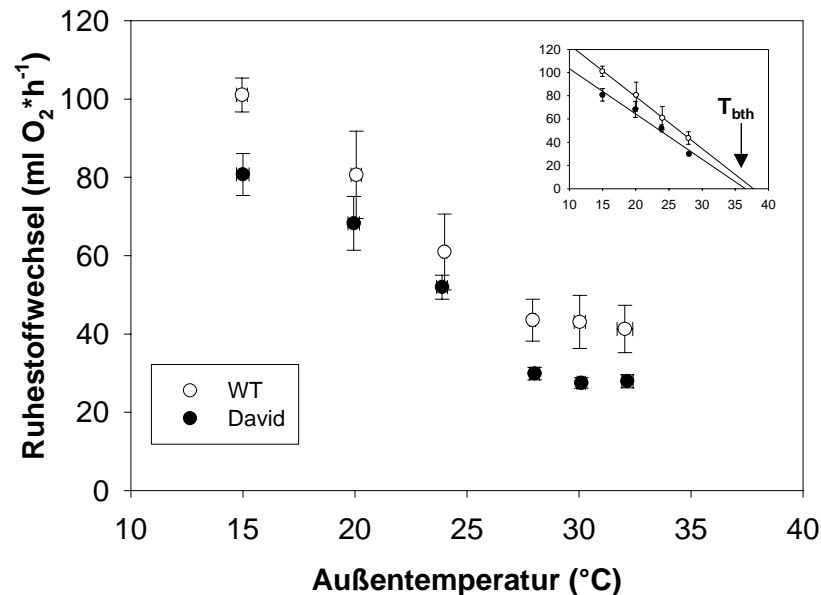


Abbildung 54: Mittlere Ruhestoffwechselraten (\pm SD) von WT- und David-Mäusen (je n=6) im Außentemperaturbereich von 15-32°C, sowie Extrapolation der Theoretischen Körpertemperatur T_{bth} für jeden Phänotyp (eingefügte Abbildung).

Die Stoffwechselraten von David-Mäusen sind vermutlich proportional mit der Körpermasse reduziert (**Abb. 55**), allerdings ist dies bedingt durch die geringe Stichprobe nicht statistisch nachweisbar. Die Regressionsgeradengleichung für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse und BMR der WT-Mäuse lautet $\log\text{BMR}=0.330+0.885*\log\text{BM}$ (95%CI[b]: 0.088-1.682; $r^2=0.704$, $p=0.037$). Die Steigung ist nicht verschieden von 1, aber auch nicht verschieden von 0.75. Mit Ausnahme der 28°C-Messung ($r^2=0.698$, $p=0.031$) sind die übrigen Zusammenhänge zwischen Körpermasse und RMR nicht signifikant. Bei David-Mäusen ist der Zusammenhang zwischen Körpermasse und BMR/RMR bei keiner Außentemperatur signifikant. Auf eine weiterführende vergleichende Analyse wurde daher verzichtet.

Tabelle 26: Alter, Körpermasse, Gewichtsverlust während der Ruhestoffwechsellmessung (jeweils \pm SD und Min-Max), sowie mediane Untere Kritische Temperatur (T_{lc}) und Theoretische Körpertemperatur (T_{bth}) jeweils incl. Min-Max von WT- und David-Mäusen. a,b: $p < 0.05$.

	WT	David
	n=6	n=6
Alter (Min-Max, Tage)	70-81	74-91
Körpermasse (g)	29.3 \pm 4.0 ^a (24.9-35.7)	17.8 \pm 1.4 ^b (16.1-19.7)
BMR (ml O ₂ *h ⁻¹)	42.6 \pm 5.9 ^a	28.8 \pm 1.2 ^a
Mediane T_{lc} (°C)	25.6 ^a (24.2-27.7)	27.4 ^{a#} (26.2-28.5)
Mediane T_{bth} (°C)	38.8 ^a (31.8-45.3)	36.7 ^a (34.1-38.9)

$p < 0.1$

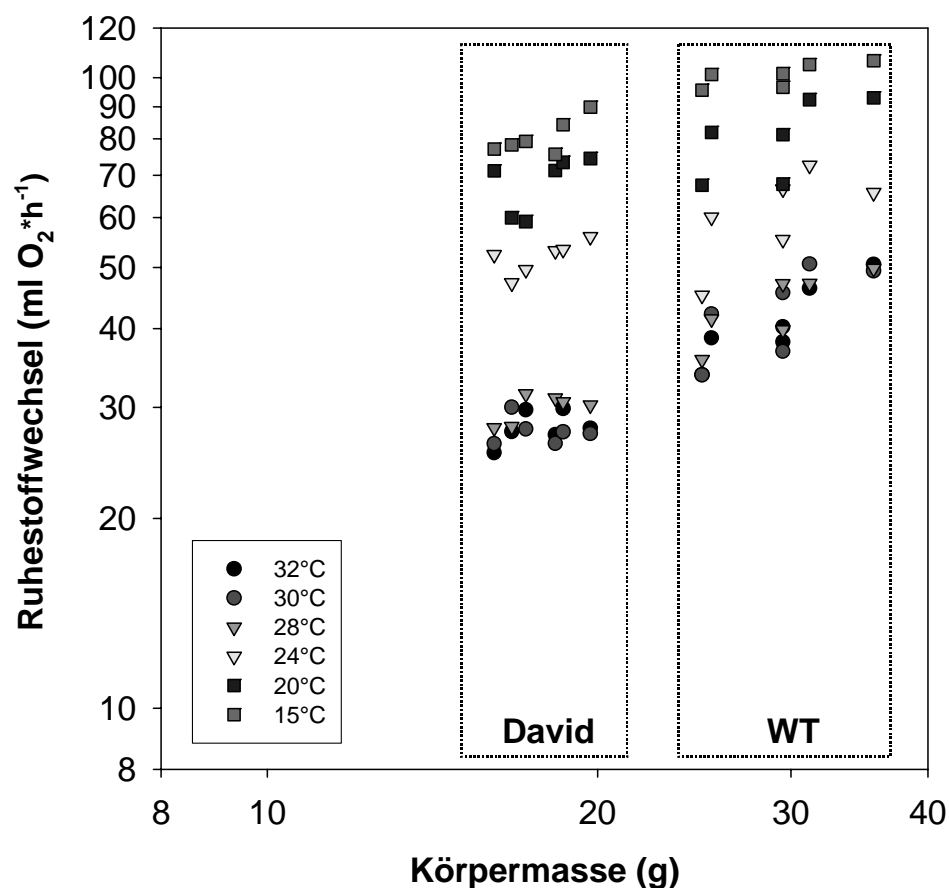


Abbildung 55: Abhängigkeit des Ruhestoffwechsels von der Außentemperatur (15-32°C) bei WT- und David-Mäusen (je n=6). Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit Abbildung 33 (SMA1-Ruhestoffwechselraten) sind die Achsenskalierungen erweitert.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse an der Mausmutante David

David-Mäuse zeichnen sich durch rezessiv vererbten Zwergwuchs aus, der bereits am Tag 7 zu erkennen ist. Darüber hinaus ist der Wachstumsschub während der Pubertät bei David-Phänotypen reduziert. Im adulten Zustand (3 Monate) sind David-Mäuse etwa 5-6 mm kürzer als WT-Mäuse gleichen Alters und wiegen ca. 17-20 g. Weibchen sind kürzer und leichter als Männchen. David-Mutanten sind fertil und haben lebenden Nachkommen bei normaler Tragzeit, allerdings ist der Zuchterfolg (Anzahl der Zuchtpaare mit Nachkommen, sowie die Wurfgröße) geringer als bei WT-Mäusen.

Die Körperzusammensetzung von David-Mäusen (FFM, FFDM, Wasser und Fettgehalt) ist annähernd proportional mit der Körpermasse verringert. Sie sind nicht hyperphag.

David-Mäuse zeigen intakte Thermoregulation im Bereich von 32-15°C und ihre T_{lc} ist geringfügig höher als die von WT-Mäusen. Ein Unterschied in der Körpertemperatur konnte nicht festgestellt werden. Hinsichtlich der Körpergewichtsabhängigkeit der Ruhestoffwechselraten bei verschiedenen Außentemperaturen scheinen David-Mäuse nicht von den Regressionen der WT-Mäuse abzuweichen.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ENU-induzierten Mauslinien SMA1 und David phänotypisch charakterisiert. Der SMA1-Gendefekt wurde mittlerweile kartiert und ist auf eine Punktmutation im GH-Gen zurückzuführen, dagegen sind Art und Lage der David-Mutation bis heute nicht bekannt. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Identifikation möglicher Änderungen im *in-vivo*-Stoffwechsel der beiden Mauslinien. Eine Störung im Energiehaushalt wäre SMA1-Mutanten möglicherweise auf die Punktmutation im GH-Gen zurückzuführen. Die metabolische Charakterisierung der Mauslinie David könnte dagegen erste Hinweise auf den durch die ENU-Mutagenese gestörten Signalweg liefern.

Die Diskussion besteht aus drei thematischen Blöcken: Der erste Teil widmet sich der phänotypischen Charakterisierung der SMA1-Mauslinie vor dem Hintergrund der Punktmutation im GH-Gen: Welche Erklärungshypothesen gibt es für den Phänotyp? Sind SMA1-Mäuse „nur“ kleiner? Im zweiten Teil werden die an David-Mäusen gewonnenen Ergebnisse kurz diskutiert: Handelt es sich bei dieser Mausmutante um ein neues Tiermodell für Anorexie? Im dritten Teil der Diskussion werden dann auf Basis der hier erhobenen Daten methodische Aspekte der metabolischen Charakterisierung verschieden großer oder schwerer Gruppen behandelt und Empfehlungen für die stoffwechselphysiologische *in-vivo*-Charakterisierung von (Maus-) Mutanten mit gestörter Körpergewichtsregulation gegeben.

5.1 Diskussion I: SMA1

5.1.1 Wachstumshormon: Stand der Forschung

GH ist ein ~22 kDa großes Peptidhormon von 191 (Mensch) bzw. 190 (Maus) Aminosäuren (AS), dem die dominante Rolle für das postnatale, longitudinale Wachstum im Säugetier zugesprochen wird. Patienten und Tiere mit GH-Defizienz oder -Resistenz entwickeln Zwergwuchs, während GH-Überproduktion zu Gigantismus und Akromegalie⁷ führt (Übersicht bei Kopchick und Andry 2000). GH wird fast ausschließlich von den somatotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und dort dimerisiert in Form von $(\text{Zn}^{2+} \bullet \text{GH})_2$ -Komplexen in sekretorischen Vesikeln gespeichert (Cunningham

⁷ Akromegalie: Selektive Größenzunahme der Akren (Nasen, Ohren, Kinn, Hände, Füße, knorpelige Thoraxanteile) bedingt durch hypophysäre GH-Hypersekretion, oft tumorbedingt.

et al. 1991a). Die Ausschüttung von GH ins Blut erfolgt in pulsatilen Episoden (Finkelstein et al. 1972; Tannenbaum und Martin 1976).

GH vermittelt seine anabolen Wirkungen über den GH-R, ein fast ubiquitär lokalisierter, transmembraner Rezeptor aus der Familie der Klasse-I-Hämatopoietin- oder Zytokin-/GH-/Prolaktin-Rezeptoren. Für die erfolgreiche Signaltransduktion muss ein GH-Molekül sequentiell zwei Rezeptormoleküle binden (Cunningham et al. 1991b; De Vos et al. 1992), da erst diese GH-vermittelte Rezeptordimerisierung ($\text{GH} \cdot (\text{GH-R})_2$) die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (über die Phosphorylierung von *Janus-Kinase-2*; JAK-2) ermöglicht (Übersicht bei Piwien-Pilipuk et al. 2002).

Der wichtigste Mediator des GH-vermittelten Wachstums ist IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*), auch Somatomedin genannt. Salmon und Daughaday (1957) konnten zeigen, dass eine GH-Applikation im isolierten Knorpelgewebe hypophysectomierter Ratten die Sulfat-Inkorporation nicht im selben Maße stimulierte wie *in-vivo*-injiziertes Rinder-GH (bGH) und postulierten daher die Existenz eines unbekanntes, GH-abhängigen Mittlers (Somatomedin) auf Zielzellen. 1982 gelang die Stimulation des *in-vivo*-Längenwachstums bei hypophysectomierten Ratten durch IGF-1 (Schoenle et al. 1982). Nach der Somatomedin-Hypothese sollte das aus der Hypophyse ausgeschüttete GH die Freisetzung von IGF-1 aus der Leber stimulieren, welches dann seine anabolen Wirkungen auf Zielzellen ausübt (Übersicht bei Butler und Le Roith 2001). Dabei wurden aber zusätzliche, direkte Wirkungen von GH auf Zielgewebe nicht ausgeschlossen.

Wie man heute weiß, wird die IGF-1-Transkription auch in extrahepatischen Zielzellen direkt durch GH stimuliert, wobei das Zytokin sowohl autokrin als auch parakrin wirkt. Darüber hinaus konnte auch eine direkte, IGF-unabhängige Wirkung von GH auf die Differenzierung von Adipozyten (Morikawa et al. 1982) und Chondrozyten (Isaksson et al. 1987) nachgewiesen werden. Nach der *Dual-Effektor*-Theorie (Isaksson et al. 1982) sollte GH die Differenzierung von Vorläuferzellen stimulieren, während dem durch GH freigesetzten IGF-1 eine mitogene Wirkung auf diese Zellen zugesprochen wurde. Eine Reihe von neueren Untersuchungen, so z. B. der Befund, dass bei IGF-1-KO-Mäusen die Chondrozyten-Proliferation normal zu sein scheint (Wang et al. 1999) hat dazu geführt, dass auch die *Dual-Effektor*-Theorie einer differenzierteren Betrachtungsweise weichen musste. Es ist weiterhin unklar, welche Prozesse direkt GH- oder IGF-1-abhängig sind und welche spezifische Rolle das im Blut zirkulierende IGF-1 für das Wachstum spielt (Sjogren et al. 1999; Le Roith et al. 2001; Butler und Le Roith 2001).

Das im Plasma zirkulierende GH, aber auch IGF-1 reguliert die GH-Sekretion aus der Hypophyse durch negative Rückkopplung zur Hypophyse bzw. zum Hypothalamus (**Abb. 56**) (Berelowitz et al. 1981; Tannenbaum et al. 1983; Wallenius et al. 2001).

Patienten oder Tiere mit GH-Resistenz und Zwergwuchs, bedingt durch einen Defekt im GH-R oder diesem nachgeschalteten intrazellulären Signalwegen (Laron Syndrom, (Laron et al. 1966; Hull und Harvey 1999; Laron 2002); haben in der Regel niedrige bis undetektierbare IGF-1-Spiegel im Blut. Dies stimuliert die GH-Ausschüttung aus der Hypophyse und führt somit zu abnormal hohen GH-Spiegeln im Blut.

Die zentrale Regulation der hypophysären GH-Bildung und -Freisetzung erfolgt primär über die hypothalamischen Neuropeptide GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*, auch GRF (*Growth Hormone Releasing Factor* oder Somatoliberin) und Somatostatin (SST), auch GHIF (*Growth Hormone Inhibiting Factor*) genannt. Während GHRH die Transkription und damit die Bildung von GH in der Hypophyse stimuliert, inhibiert SST die GH-Ausschüttung aus den somatotrophen Zellen (Tannenbaum 1991). Menschen und Mäuse mit Mutationen im GHRH-Rezeptor (GHRH-R) haben praktisch kein GH im Plasma (GH-Defizienz) und zeichnen sich daher ebenfalls durch Zwergwüchsigkeit aus (Wajnrajch et al. 1996; Carakushansky et al. 2003).

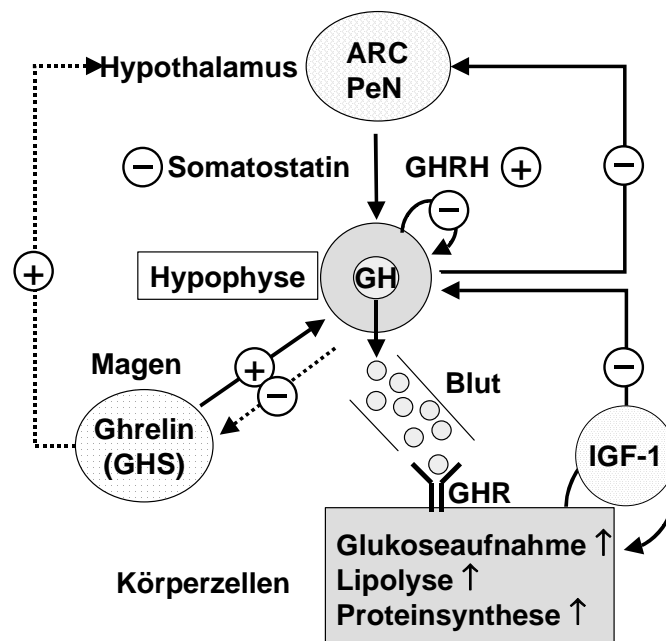


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Steuerung des Wachstums beim Säugetier. ARC: Nucleus arcuatus, PeN: Nucleus periventriculatus. Erläuterungen siehe Text.

Mit Ghrelin (GHS, *Growth Hormone Secretagogue*) wurde 1999 ein weiterer potenter Stimulator der hypophysären GH-Ausschüttung entdeckt (Kojima et al. 1999). Das Hormon wird von den endokrinen Zellen des Magens ins Blut sezerniert, aber auch im Hypothalamus und in der Hypophyse exprimiert. Ghrelin wird neben seiner fördernden Wirkung auf die hypophysäre GH-Freisetzung eine Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme zugesprochen: Die Plasma-Ghrelin-Spiegel sind preprandial erhöht

und postprandial erniedrigt, und systemische (i.p.) sowie zentrale (i.c.v.) Ghrelin-Administration stimuliert die Nahrungsaufnahme und führt zu einer Erhöhung des Körperfettgehalts bei Ratten (Tschöp et al. 2000; Wren et al. 2000; Nakazato et al. 2001). Ghrelin könnte daher *den* Vermittler für die endogene Balance von Nahrungsaufnahme und Wachstum darstellen (Übersicht bei Inui et al. 2004).

5.1.2 Vom Genotyp zum Phänotyp: SMA1

Phänotypisch zeigen Träger der *Sma1*-Mutation charakteristische Merkmale, die bei Mensch und Nager Folge einer Störung der Hypophysen-Wachstumshormonachse sind: Sich spätestens mit der Pubertät manifestierender Zwergwuchs, der mit einer verringerten fettfreien Masse und kleineren Organen einher geht, abdominale Fettleibigkeit sowie verspätete sexuelle Reifung (Letzteres nur bei *Sma1/Sma1*) (Zhou et al. 1997; Bartke et al. 1999; Hull und Harvey 1999). Auch eine erniedrigte Körpertemperatur scheint bei den daraufhin untersuchten Mausmodellen die Folge einer Störung in der GH-Achse zu sein (Tab. 29, S. 110), wobei diese Beobachtung für den Menschen bislang nicht beschrieben wurde.

Tabelle 27: GH-assoziiertes, erbliches Zwergwuchs bei Ratte und Maus

	SDR-Ratte (<i>spontaneous dwarf rat</i>)	Lewis-Zwergratte	Ames-/Snell-Zwergmaus	Little Maus	SMA1-Maus
Symbol	<i>dr</i>	<i>dw</i>	<i>df</i> bzw. <i>dw</i>	<i>lit</i>	<i>Sma1</i>
genetische Ursache	GH-Leseraster Mutation (1 bp)	nicht bekannt	prop-1- bzw. pit-1-Locus-Mutation	GHRH-R-Punktmutation	GH-Punktmutation
primärer Defekt	fehlerhaftes Spleissen der GH-mRNA	verringerte GH-Sekretion (<90% WT)	keine GH-, PRL-, TSH-Zellen in Hypophyse	defekter GHRH-R	defektes GH-Protein
Erblichkeit	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal rezessiv	autosomal semidominant
Körpermasse (%WT)	30-40%	30-50%	30%	70%	60-70% (+/-) 40-50% (-/-)

Im Unterschied zu allen bislang bekannten nicht-transgenen, zwergwüchsigen Nager-Modellen mit Störungen in der GH-Achse handelt es sich aber bei SMA1 nicht um ein rezessives, sondern um ein semidominantes Merkmal, d.h. heterozygote Individuen zeigen intermediären Zwergwuchs (**Tab. 27**). Diese Tatsache ist umso bemerkenswerter, als dass z.B. bei der GH-defizienten SDR-Ratte, die ebenfalls eine Mutation im GH-Gen trägt, keine Haploinsuffizienz vorliegt, also ein intaktes GH-Gen ausreicht, um den WT-

Phänotyp im heterozygoten Zustand ausprägen (Okuma und Kawashima 1980; Takeuchi et al. 1990). Auch transgene Mäuse mit GHR/BP-KO (GH-Resistenz) besitzen im heterozygoten Zustand einen (fast) normal großen Phänotyp (Zhou et al. 1997). Diese Befunde deuten bereits darauf hin, dass es sich beim SMA1-Phänotyp nicht um eine einfache Gen-Dosis-Beziehung handelt.

Im Einklang mit dieser Vermutung spiegelt sich die Semidominanz des Phänotyps (verringerte BM, Länge und FFM) nicht in den gemessenen Plasma-GH-Werten wider, denn die hier gemessenen GH-Spiegel sowohl bei 3 Monate alten heterozygoten als auch homozygoten SMA1-Mäusen liegen an der Schwelle der Nachweisgrenze bzw. darunter. Darüber hinaus sind die IGF-1-Plasmaspiegel bei heterozygoten SMA1-Mäusen im Vergleich zur Länge, FFM und BM subintermediär reduziert. (**Tab. 28**). Diese Befunde bei SMA1-Mäusen stehen in Widerspruch zur Annahme, dass IGF-1 bei Mensch und Tier in Abhängigkeit vom GH-Plasmaspiegel das Längenwachstum steuert. Für die Erklärung des SMA1-Phänotyps kommt damit dem heterozygoten Genotyp eine Schlüsselrolle zu.

Tabelle 28: Prozentuale Verringerung im Längenwachstum, der Körpermasse (BM), der fettfreier Masse (FFM), im Plasma-IGF-1 und im Plasma-GH von 2-3 Monate alten SMA1-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (=100%). Die Reduktion ist bei heterozygoten SMA1 in allen Parametern subintermediär zu WT- und heterozygoten SMA1-Mäusen (Ratio>0.50).

	<i>Sma1/+</i>	<i>Sma1/Sma1</i>	Ratio [<i>Sma1/+</i>]/[<i>Sma1/Sma1</i>]
Länge	16%	25%	0.64
BM	31%	56%	0.55
FFM	38%	61%	0.62
Plasma-GH	< 70% (n.d.)	< 70% (n.d.)	-
GH Hypophyse	68%	< 95%	0.75
IGF-1	63%	79%	0.80

n.d.: nicht detektierbar.

5.1.3 Warum ist die SMA1-Maus klein?

SMA1-Mäuse besitzen einen Defekt im GH-Gen, niedrige bis nicht detektierbare Blut-GH-Spiegel und erniedrigte IGF-1-Spiegel, die grundsätzlich auf eine Störung des GH-vermittelten Signalwegs zur Expression von IGF-1 schließen lassen. Hierbei könnte prinzipiell sowohl die Bildung, Speicherung, als auch die Sekretion des GH aus den somatotrophen Zellen gestört sein. Darüber hinaus könnte aber zusätzlich die Bindung von SMA1-GH an seinen Rezeptor zu einer eingeschränkten intrazellulären Signaltransduktion in Zielzellen führen. Da GH von Wirbeltieren, so auch von Maus

(mGH, *murine growth hormone*) und Mensch (hGH-1, *human growth hormone*) hohe Sequenzidentität (62%) bzw. Sequenzähnlichkeit (73%) besitzen (NCBI-Blast von mGH NP_032143 und hGH NP_CAA00065), lassen sich zur funktionellen Bewertung der SMA1-Mutation auch Erkenntnisse aus Untersuchungen bzw. Pathologien des besser untersuchten, menschlichen GH-1 heranziehen.

Die 191 AS des hGH-1 wie auch die 190 AS des mGH bilden ein Monopeptid, dessen Sekundärstruktur durch vier antiparallele Alpha-Helices charakterisiert ist und das u.a. durch zwei intrazelluläre Disulfidbrücken stabilisiert wird (Abdel-Meguid et al. 1987; De Vos et al. 1992). Für die wirksame Bindung von GH an seinen Rezeptor bzw. die GH-vermittelte Rezeptordimerisierung sind zwei Bindestellen im GH-Molekül nötig: Bindungsstelle 1 (hGH) besteht aus einer längeren Sequenz von 21 AS (Position 54-74), hinzu kommen noch ein Bereich im C-terminalen Ende der Helix 4 (AS 167-191) sowie einzelne Aminosäurereste in der Region zwischen Helix 1 und 2; Bindestelle 2 liegt im C-terminalen Ende des Proteins in der dritten Helixdomäne (AS 107-128) (Cunningham und Wells 1989; De Vos et al. 1992). Störungen in der Bindung des ersten oder des zweiten Rezeptormoleküls können zu GH-Resistenz und Zwergwuchs führen (Kowarski et al. 1978; Takahashi et al. 1997; Kopchick et al. 2002).

Der *Sma1*-Basenpaaraustausch liegt zwar in unmittelbarer Nähe von für die Rezeptorbindung (Bindestelle 1) kritischen AS in der vierten Helix, allerdings wurde die spezifische (homologe) Position bislang nicht mit einer Rolle bei der Rezeptorbindung in Verbindung gebracht. In allen, die GH-Bindung und Signaltransduktion beeinträchtigenden Fällen wäre aber als Antwort des Körpers eine Erhöhung im hypophysären GH- bzw. Plasma-GH-Gehalt zu erwarten. Die Tatsache, dass sowohl der GH- Gehalt in der Hypophyse als auch die GH-Spiegel von heterozygoten und homozygoten SMA1 reduziert sind bzw. an der Nachweisgrenze liegen, spricht daher gegen eine SMA1-bedingte GH-Resistenz und befürwortet eine periphere GH-Defizienz.

Innerhalb der sekretorischen Vesikel in den somatotrophen Zellen der Hypophyse liegt GH in dimerisierter Form von $(\text{Zn}^{2+} \bullet \text{GH})_2$ -Komplexen vor, die zu einer Stabilisierung des Proteins beitragen und darüber hinaus eine Rolle bei der kontrollierten Sekretion spielen (Cunningham et al. 1991a). D169 (hGH) ist aber nach den vorliegenden Erkenntnissen nicht an der Zink-vermittelten Oligomerisation von hGH beteiligt, so dass eine direkte Beeinträchtigung der Zn^{2+} -vermittelten hypophysären Speicherung durch den SMA1-Aminosäureaustausch auszuschließen ist.

Modellierungen und Analysen der Proteinstruktur von menschlichem GH haben dagegen gezeigt, dass der Aminosäure D169 (homolog zu D167 bei der Maus) eine Rolle bei der intramolekularen Stabilisierung des Hormons zukommt (**Abb. 57**) (De Vos et al. 1992).

Das O δ 1 von D169 formt eine Wasserstoffbrückenbindung sowohl mit dem O γ des S55 als auch mit dem N ϵ 1 von W86. Eine weitere, schwächere, hydrophobe Interaktion assoziiert das O δ 2 von D169 mit dem N ζ von K172. Wie Sequenzvergleiche auf Proteinebene von verschiedenen Wirbeltierspezies ergeben haben, sind alle genannten Aminosäuren sehr konserviert. Ist die Tertiärstruktur des GH-Moleküls durch Austausch des hydrophilen D zum hydrophoben G zerstört, könnte dies eine Destabilisierung des Proteins mit nachfolgender Inaktivität bzw. Degradation zur Folge haben. Tatsächlich wurde bereits auf der Suche nach potentiellen GH-R Interaktionsstellen mittels Alanin-Mutagenese die der Maus homologe Position D169 (D169A) des menschlichen GH ausgetauscht (Cunningham und Wells 1989). Das so modifizierte Protein konnte nicht in *E. coli* exprimiert werden (<2% WT-hGH). Auch bei der Firma Ingenium durchgeführte Versuche, das mutierte SMA1-GH in verwertbaren Mengen in *E. coli* zu exprimieren, schlugen fehl (Bericht von Christian Schneider-Fresenius, Ingenium, März 2002).

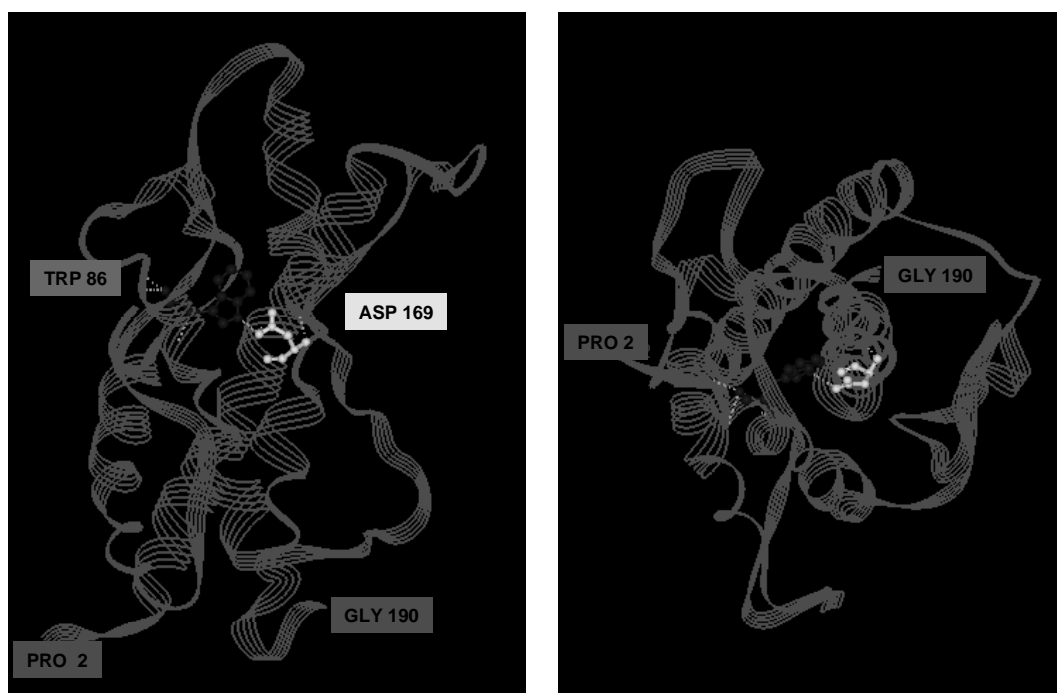


Abbildung 57: Modell des hGH (SwissProt Nr. P01241) in zwei verschiedenen Ansichten. ASP D169 (blau; homolog zu mGH D167) und TRP W86 (gelb; homolog zu mGH TRP W86) bilden eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung, die möglicherweise für die richtige Faltung und damit Stabilität des Proteins essentiell ist (siehe auch Text).

Von der Firma Ingenium durchgeführte histologische Analysen der Hypophysen von 3 Monate alten WT- und SMA1-Mäusen (**Abb. 58 A-C**) stützen die Hypothese, dass der hypophysäre GH-Gehalt bei SMA1-Mäusen verringert ist als Folge einer reduzierten

Anzahl an somatotrophen Zellen. Im intakten Organ (Mensch) stellen die somatotrophen Zellen einen Anteil von 50% dar (Binder et al. 2001), sie sind in Übersichtsgewebefärbungen deutlich anhand ihrer azidophilen Granula zu erkennen. Eine Reduktion des Proteingehalts und der Zellzahl könnte zur nicht-proportionalen Reduktion des Hypophysenvorderlappens bzw. der Transparenz dieses Gewebes führen.

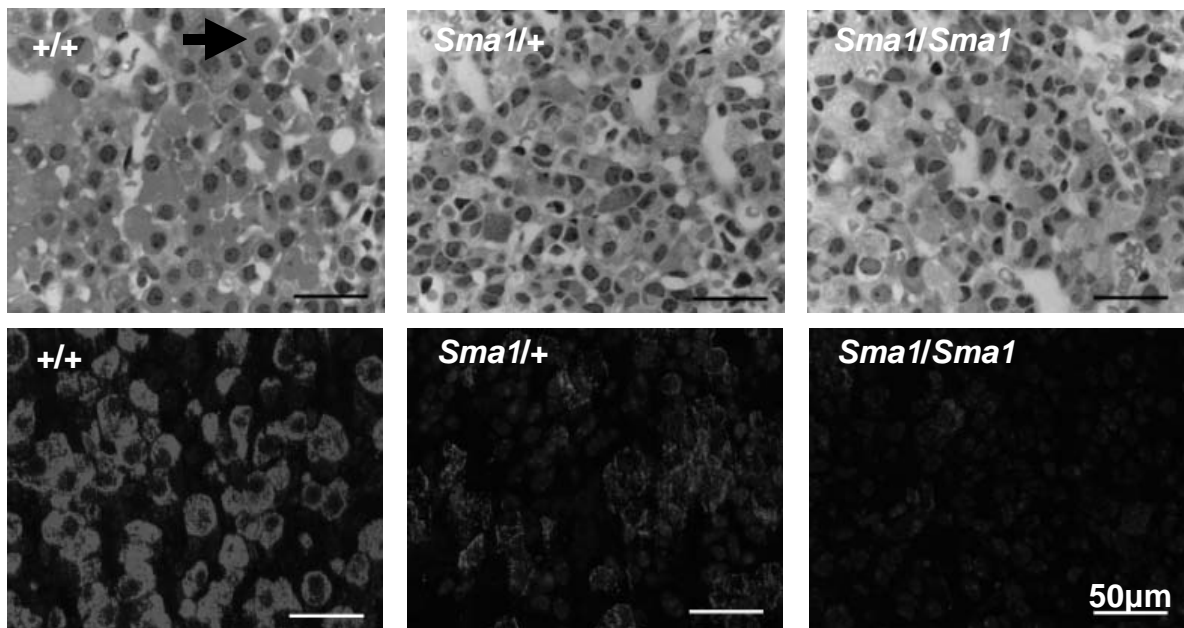


Abbildung 58: Histologie des Hypophysenvorderlappens von 3 Monate alten WT- und SMA1-Mäusen. Obere Reihe: Eosin-Hämatoxylin-Färbung. Der Pfeil markiert eine typische somatotrophe Zelle. Untere Reihe: GH-Immunhistochemie (anti-mGH; Diagnostic International GmbH; 1h, 1:500). Im *Sma1/Sma1*-Präparat sind nur einzelne GH-immunreaktive Zellen zu sehen. Vergrößerung jeweils 400x. Die Aufnahmen wurden mit freundlicher Genehmigung von Ingenium Pharmaceuticals zur Verfügung gestellt.

Im Unterschied zu den Plasma-GH-Werten, aber in Einklang mit den Western-Blot-Analysen des hypophysären GH-Gehalts, ist in den immunhistologischen Präparaten eine deutliche Abstufung der GH-Immunreaktivität zwischen heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen zu erkennen (**Abb. 58 D-F**). In der Tat scheint sich die minimale GH-Immunreaktivität in den Hypophysen von homozygoten SMA1-Mäusen auf distinkte Bereiche zu beschränken, die vermutlich einzelnen Zellkörpern zuzuordnen sind. In Untersuchungen zum Regenerationspotential somatotropher Zellen in Hypophysen transgener Mäuse, die eine HSV1- (*Herpes Simplex-Virus 1*-) Thymidinkinase gekoppelt an den GH-Promotor exprimierten, konnte nach Behandlung mit synthetischen Nucleosiden gezeigt werden, dass eine Subpopulation von somatolaktotrophen

Stammzellen ein über die Pubertät hinausgehendes Differenzierungspotential besitzt. Nach Absetzen der Nucleosid-Behandlung, die zunächst zum Absterben der somatotrophen Zellen und zu Zwergwüchsigkeit führte, erfolgte eine Repopulation der Hypophysen in den transgenen Tieren (Borrelli et al. 1989). Die lokal begrenzte GH-Immunfärbung bei homozygoten SMA1-Mäusen könnte Ausdruck einzelner, differenzierter somatotropher Zellen sein, die als Antwort auf die Defizienz an somatotrophen Zellen und GH-Protein aus dem Stammzellpool der Hypophyse neu hervorgegangen sind.

Während also bei homozygoten SMA1-Mutanten die periphere GH-Defizienz mit einer dramatischen Reduktion des GH-Sekretionspotentials der Hypophyse einherzugehen scheint, korrelieren die Plasma-GH-Spiegel heterozygoter SMA1-Mäuse nicht mit den histologischen Befunden und ebenfalls nicht mit dem Ausmaß der Zwergwüchsigkeit.

Ein methodisches Problem für Bewertung des Grades der postulierten GH-Defizienz anhand der hier gewonnenen Plasma-GH-Spiegel stellt die Tatsache dar, dass das Hormon pulsatil ins Blut sekretiert wird (Finkelstein et al. 1972; Tannenbaum und Martin 1976). Männliche und weibliche Ratten oder Mäuse unterscheiden sich darüber hinaus hinsichtlich des Musters, mit dem die tägliche Ausschüttung von GH aus der Hypophyse erfolgt. Während das 24 h-Profil bei männlichen Individuen gekennzeichnet ist durch eine starke Amplitude mit alle 3-5 Stunden (Ratte) bzw. 2 Stunden (Maus) auftretenden Spitzenwerten und dazwischenliegenden, niedrigen bis nicht-detektierbaren Spiegeln, haben weibliche Tiere durchschnittlich höhere Plasma-GH-Spiegel mit niedrigen Ausschüttungspulsen (Eden 1979; Waxman et al. 1991). Dieses Muster der pulsatilen GH-Ausschüttung spielt eine wichtige Rolle für den Sexualdimorphismus, u. a. werden die Wachstumsraten (Gewichtszunahme), aber auch die Ausstattung der Leber mit verschiedenen Enzymen des Cytochrom-P450- (CYP-) Systems geschlechtsspezifisch reguliert (Übersicht bei Schwartz 2001). Wie Waxman et al. (1991) zeigen konnte, ist für die „Vermännlichung“ der Leber die Dauer der Zwischenpuls-Phase und nicht die GH-Amplitude entscheidend. Durch kontinuierliche GH-Gabe, z.B. mit osmotischen Minipumpen, lässt sich die Leber männlicher Nager „verweiblichen“ (Norstedt 1982; Waxman et al. 1991). Tannenbaum et al. konnten nachweisen, dass das männliche Muster der GH- Ausschüttung sich *in-vivo* in der STAT-5- (*Signal transducer and activator of transcription-5*-) Bindung an die DNA von Rattenhepatozyten widerspiegelt (Tannenbaum et al. 2001). Unterbindet man die dem GH-Rezeptor nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktion in der Leber durch einen gewebsspezifischen KO im STAT-5b-Gen, nivellieren sich die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen in der Körpergröße und -masse (verringert bei KO-Männchen), in der Expression

der P450_{15 α} -Hydroxylase und im Prolaktin-Rezeptor (erhöht bei KO-Männchen) (Udy et al. 1997).

Die Untersuchungen zum GH-Ausschüttungsmuster männlicher Ratten haben gezeigt, dass zu entsprechenden Entnahmezeitpunkten, bedingt durch die starke Amplitude in der Sekretion, praktisch kein GH nachweisbar sein kann (Tannenbaum und Martin 1976). Bei den im Rahmen dieser Dissertation präparierten Mäusen wurde nicht nach Geschlecht und genauem Zeitpunkt der Blutabnahme stratifiziert. Es ist daher möglich, dass SMA1-Mäuse trotz scheinbarer peripherer GH-Defizienz eine signifikante GH-Ausschüttung haben, die mit dem hier gezeigten Ansatz nicht zum Ausdruck kommt. Da heterozygote im Vergleich zu homozygoten SMA1-Mäusen erhöhte IGF-1-Spiegel haben, müsste dann davon ausgegangen werden, dass ein *Sma1*-GH-Gen-Dosis-Effekt auf niedrigem Niveau herrscht.

Zwei Beobachtungen stützen die Vermutung, dass bei heterozygoten SMA1-Mäusen nicht nur GH im Blut nachweisbar sein sollte, sondern auch das pulsatile Muster der GH-Ausschüttung „richtig“ erfolgt bzw. vom Körper interpretiert wird. Zum einen zeigt sich der Geschlechterdimorphismus in der Körperlänge und -masse, d.h. Männchen werden größer und schwerer als Weibchen (Übersicht bei Gatford et al. 1998). Darüber hinaus ist nach ersten Untersuchungen bei heterozygoten SMA1- wie auch bei WT-Mäusen ein deutlicher Geschlechterdimorphismus in der MUP- (*Major Urinary Protein*-) Expression im Urin nachweisbar (**Abb. 59**). MUP bezeichnet eine Klasse von globulären Proteinen mit einer Molekülmasse von ~20 kDA, die in der Leber synthetisiert und mit dem Urin ausgeschieden werden; sie kodieren die Individualerkennung bei Mäusen (Hurst et al. 2001). Der MUP-Gehalt im Urin männlicher Mäuse ist normalerweise etwa 3-10-fach höher als der von weiblichen Tieren und dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern wird abhängig vom pulsatilen GH-Sekretionsmuster ausgeprägt (Finlayson et al. 1963; Norstedt und Palmiter 1984).

Bei totaler peripherer GH-Defizienz, so z.B. bei *lit/lit*-Mäusen, existiert kein Geschlechterdimorphismus in der Körperlänge und -masse, der MUP-Exkretion im Urin und der MUP-mRNA-Expression in der Leber (Eicher und Beamer 1976; Norstedt und Palmiter 1984). Auch bei homozygoten SMA1-Mäusen ist praktisch kein MUP-Protein im Urin nachweisbar, was vermutlich in der schwerwiegenderen GH-Defizienz dieses Genotyps begründet liegt. Allerdings zeigt sich im Unterschied zu *lit/lit*-Mäusen bereits ab einem Alter von 6 Wochen ein deutlicher Unterschied in der Körpermasse zwischen Männchen und Weibchen. Auch in ihrer Länge sind die Weibchen tendenziell kürzer. Diese Befunde sind vor dem Hintergrund der postulierten GH-Defizienz dieses Genotyps überraschend. Es könnte daher möglich sein, dass auch bei homozygoten SMA1-Mäusen

(mutiertes) GH in geringer Menge pulsatil ins Blut ausgeschüttet wird und biologische Aktivität ausübt.

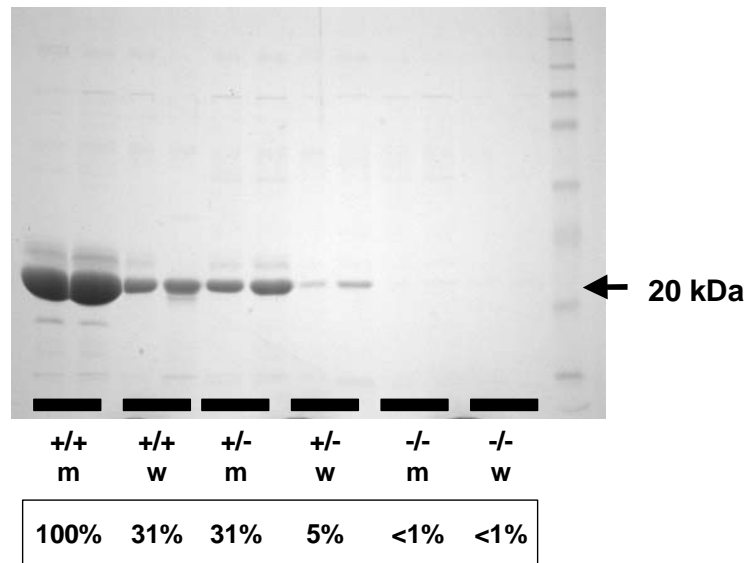


Abbildung 59: Major Urinary Protein (MUP, ~20 kDa) im Urin von männlichen (m) und weiblichen (w) WT- und SMA1-Mäusen. Jeweils 2 µl Urin wurden mittels SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Prozentangaben beziehen sich auf die relative Intensität des MUP-Signals im Vergleich zu den WT- (+/+) Männchen.

Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen von Shapiro et al. (1989), die zeigen konnten, dass bei männlichen Ratten eine bis zu 90%ige Reduktion in der GH-Puls-Amplitude noch die Aufrechterhaltung der männlichen CYP2C11- (P450_{2α}-Hydroxylase-) Expression ermöglichte. Auch die Lewis-Zwergratte (vgl. Tab. 27) besitzt einen noch unkartierten Gendefekt, der zu einer 90-95%igen Reduktion des im Blut zirkulierenden GH führt, ohne dass dies den Geschlechterdimorphismus im Hinblick auf die Expression von P450-Enzymen oder der Körpermasse beeinflusst (Charlton et al. 1988; Bullock et al. 1991). Trotzdem muss bei heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen aber davon ausgegangen werden, dass während der Pubertät bzw. postnatal *nicht* die für die Ausprägung des normalen Phänotyps ausreichende Menge an peripherem GH bzw. IGF-1 gebildet wird und die Mäuse daher zwergwüchsig sind.

Im Vergleich zu anderen publizierten Daten sind die hier gemessenen GH-Spiegel der WT-Mäuse äußerst niedrig: Bei einmaliger Blutentnahme werden in der Literatur Werte zwischen 2-20 ng/ml angegeben, wobei im Mittel ca. 10 ng/ml erreicht werden. Dagegen liegen die hier gewonnenen IGF-1-Plasmaspiegel mit 400-900 ng/ml im publizierten Bereich für die adulte Maus (vgl. z.B. Cheng et al. 1983; Chen et al. 1991; Donahue und Beamer 1993; Zhou et al. 1997; Yakar et al. 1999).

5.1.3.1 SMA1-GH - ein dominant-negatives Protein?

Einen Hinweis auf die mögliche Ursache der Semidominanz des zwergwüchsigen Phänotyps von SMA1 liefern die vom Menschen bekannten Krankheitsbilder. Wachstumsstörungen verursacht durch GH-Defizienz werden mit einer Inzidenz von 1:4000 bis 1:10000 Geburten diagnostiziert. In der Regel lassen sich betroffene Patienten durch exogene GH-Gabe therapieren (Cogan et al. 1994). Etwa 5-30% dieser Wachstumsstörungen haben eine erbliche Komponente, die zu 10-15% Folge von Mutationen bzw. Deletionen im menschlichen GH-1-Gen sind. Je nach Schweregrad der GH-Defizienz und Erblichkeit werden diese Krankheitsbilder als sog. IGHD-I bzw. -II (*Isolated Growth Hormone Deficiency Typ-I bzw. -II*) bezeichnet (Procter et al. 1998; Binder 2002). Während es sich bei den im Vergleich häufigeren IGHD-IA und -IB jeweils um ein rezessives Krankheitsbild handelt, wird IGHD-II dominant vererbt, d.h. bereits heterozygote Träger des Allels zeichnen sich durch Zwergwüchsigkeit aus. In der Mehrzahl der bislang beschriebenen Fälle liegt die Ursache für IGHD-II in Mutationen, die dazu führen, dass eine 5'-Spleißstelle im Intron 3 des hGH-1-Gens nicht erkannt und das Exon 3 übersprungen wird (Übersicht bei Binder 2002; Ryther et al. 2003). Die meisten Patienten mit IGHD-II exprimieren daher eine 17.5-kDa-Isoform des hGH-1-Proteins (del32-71-GH), dem die durch das Exon 3 codierte Aminosäuresequenz fehlt, und das nur zu sehr geringen Mengen im Plasma nachweisbar ist. Da auch eine der beiden intramolekularen Disulfidbrücken durch diese Deletion betroffen ist (Cys 53 - Cys 165), wurde zunächst spekuliert, dass intermolekulare Disulfidbrücken via Cys 165 multimere GH-Aggregate bilden, welche die GH-Sekretion unterbinden. Transfektionsexperimente mit WT- und del32-71-C165A-GH zeigten aber, dass der unpaare Cystein-Rest nicht für die Sekretionsstörung verantwortlich ist (Lee et al. 2000).

Von Robinson und Mitarbeitern wurde 2003 ein Transgen hergestellt, welches die Sequenz für die Exon-3-deletierte Form des menschlichen Proteins (Δ_{exon3} hGH) trägt und das sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* in den Hypophysen von Mäusen exprimiert wurde (McGuinness et al. 2003). In Zellkulturversuchen anderer Autoren an neuroendokrinen Zelllinien hatte sich zuvor bereits gezeigt, dass die Koexpression von WT-hGH und der mutanten 17.5-kDa-Isoform die GH-Sekretion in das Medium hemmt. (Hayashi et al. 1999; Lee et al. 2000). Die mit Δ_{exon3} hGH transfizierten Zellen zeigten keine GH-Immunreaktivität und wiesen auffällige morphologische Änderungen auf, so z.B. von Vakuolen durchsetztes Plasma, keine GH-haltigen Granula oder Sekretionsvesikel, fragmentierte Zellkerne sowie deformierten Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien. Die (heterozygoten) transgenen Mäuse zeichneten sich durch Zwergwuchs, Hypoplasie des Hypophysenvorderlappens, stark reduzierte Anzahl an

somatotrophen Zellen und dramatisch reduzierten hypophysären GH-Gehalt aus (McGuinness et al. 2003). Aus den kombinierten Befunden schlossen die Autoren, dass es sich bei der Exon-3-deletierten Form des hGH um ein dominant-negatives Protein handelt, welches einerseits die Speicherung des endogenen WT-GH beeinflusst, und andererseits über pathologische Speicherdimere (WT-GH: $\Delta_{\text{exon}3}$ hGH bzw. $\Delta_{\text{exon}3}$ hGH: $\Delta_{\text{exon}3}$ hGH) oder deren Abbauprodukte zur Zerstörung der somatotrophen Zellen und damit zu GH-Defizienz und Zwergwuchs führt.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen phänotypischen Daten und den o.g. Diskussionspunkten lässt sich ein Modell für die Ausprägung des semidominanten, zwergwüchsigen SMA1-Phänotyps entwickeln. Dem Modell liegen eine Reihe von Annahmen zugrunde, die in geeigneten Hypothesen-basierenden, experimentellen Ansätzen zu testen wären:

Die SMA1-Mutation führt zu einer dominant-negativen Form des Proteins, welches falsch gefaltet bzw. instabil ist und zu pathologischen GH-Dimeren (WT-GH:SMA1-GH oder SMA1-GH:SMA1-GH) in der Hypophyse führt. Mit Beginn der Pubertät kann beim heterozygoten im Unterschied zum homozygoten *Sma1*-Genotyp durch die Speicherung und Sekretion von funktionell aktivem Protein aus dem WT-Allel und den noch intakten Zellen der Hypophyse ein Teil des Längenwachstums aufrechterhalten werden. Es ist aber zu erwarten, dass bereits bei diesem Genotyp die GH-Sekretion ins Blut suboptimal ist, so dass über IGF-1 bzw. die hypothalamische Rückkopplung (vgl. Abb. 56) eine weitere Stimulation der GH-Bildung und -Sekretion erfolgen sollte. So ist sowohl bei der *lit/lit*-Maus, der Lewis-Zwergratte, der SDR-Ratte als auch der Ames-Zwergmaus die GHRH-Expression im Hypothalamus erhöht (Frohman et al. 1989; Mizobuchi et al. 1991; Kamegai et al. 1998; Hurley et al. 1998). Auch die von McGuinness et al. (2003) hergestellten transgenen Mäuse zeigen eine erniedrigte hypothalamische SST- und eine erhöhte GHRH-Expression. Von SMA1-Mäusen liegen bislang keine publizierten GHRH- oder SST-Expressionsdaten vor, allerdings sind die Ghrelin-Spiegel im Plasma erhöht, was im Einklang mit dem Versuch einer Steigerung der GH-Freisetzung stehen könnte.

Hierdurch würde bei heterozygoten SMA1-Mäusen sowohl die Expression des hypophysären WT-GH als auch die der mutierten Form verstärkt. Die Akkumulation von pathologischen GH-Dimeren in den Speichergranula, im Proteasom und/oder dem ER führt zur Degeneration von mehr und mehr somatotrophen Zellen, so dass das Sekretionspotential der heterozygoten Hypophyse trotz maximaler Stimulation nie das einer WT-Maus erreicht. Die längerfristigen Folgen für den heterozygoten Phänotyp sind eine Hypoplasie der Hypophyse mit reduziertem GH-Gehalt in den Somatotrophen und reduzierte GH-Ausschüttung ins Blut, so dass das Längenwachstum vorzeitig zum

Erliegen kommt und der intermediäre zwergwüchsige Phänotyp resultiert. Bei der weiteren Erforschung heterozygoter SMA1-Mäuse wäre damit eine zusätzliche, zeitliche Komponente in der Entwicklung des Phänotyps zu berücksichtigen.

Beim homozygoten Genotyp dagegen muss in diesem Szenario von einer mit der Pubertät beginnenden Pathologie der Hypophyse und damit verbundener stärkerer Störung in der GH-Bildung und -Sekretion ausgegangen werden. Dies drückt sich phänotypisch in den unveränderten Wachstumsraten aus.

5.1.4 Wie wird die SMA1-Maus fett? Eine in-vivo-Analyse

Neben seiner Wirkung auf das postnatale Längenwachstum hat GH eine bekannte lipolytische Aktivität. Patienten und Tiere mit gestörter Hypophysen-GH-Achse zeigen daher in der Regel einen (moderat) adipösen Phänotyp, insbesondere im Bereich des Rumpfes. Auf zellulärer Ebene ist zwar die Anzahl der Fettzellen reduziert, aber ihr Volumen größer; diese Fettleibigkeit ist durch GH-Gabe therapierbar (Bonnet et al. 1974). GH stellt allerdings kein generelles Therapeutikum zur Reduktion des Körperfettgehalts dar, obwohl die GH-Spiegel bei Adipositas erniedrigt sind (Shadid und Jensen 2003).

Bei SMA1-Mäusen ist das posteriore subkutane Fettgewebe, d.h. die Einheit aus inguinalem, dorsolumbalen und glutealem Depot am stärksten von der überproportionalen Vergrößerung betroffen. Auch bei der Ratte führt eine induzierte GH-Defizienz zu Zwergwüchsigkeit, die mit einer Reduktion im Gewicht des viszeralen Fetts zugunsten der subkutanen Depots einhergeht (Flint und Gardner 1993). Ebenso zeichnen sich die erst vor kurzem daraufhin untersuchten zwergwüchsigen GH-R/BP-KO- und die einen GH-Antagonisten überexprimierenden bGH-G119K-Mäuse durch einen erhöhten Körperfettgehalt aus, der insbesondere aus der Vergrößerung der subkutanen Depots resultiert (Berryman et al. 2004). Die Unterschiede in der Responsivität einzelner Depots gegenüber GH hängen möglicherweise mit der unterschiedlichen Dichte von GH-Rs in Adipozyten zusammen: Bei der Ratte z.B. ist die GH-Rezeptordichte des subkutanen Fetts etwa doppelt so hoch wie die des retroperitonealen Fettgewebes (LaFranchi et al. 1985). GH-Mangel könnte daher zu einer vergleichsweise stärkeren Hypertrophie (durch verringerte Lipolyse) des subkutanen Fettgewebes führen. Auch eine Depot-spezifische Verringerung der (GH-vermittelten Steuerung der) Aktivität der Hormon-Sensitiven-Lipase (HSL) wäre denkbar (Übersicht bei Nam und Markus 2000).

Nach den aktuellen Vorstellungen ist Adipositas die Folge einer unausgeglichener Energiebilanz, also einer Störung zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe zugunsten der Energieaufnahme (positive Energiebilanz). Da der zwergwüchsige SMA1-Phänotyp mit einer Erhöhung im Körperfettgehalt einhergeht, stellt sich die Frage nach

der Ätiologie dieser Adipositas *in-vivo*: Lässt sich mittels der phänotypischen Charakterisierung ein Ungleichgewicht im Energiehaushalt feststellen? Zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Stellgrößen (vgl. Abb. 1) gehörten BMR, Körpertemperatur, tägliche Spontanaktivität, Futtermittelverbrauch und Assimilation sowie der tägliche Energieverbrauch (DEE). Darüber hinaus wurden die UCP-1-Expression im braunen Fett und die Leptin- sowie Ghrelin-Spiegel im Plasma untersucht.

5.1.4.1 BMR und Körpertemperatur

In der Regel sind ca. 30% des täglichen Energieverbrauchs eines endothermen Tieres dem Basalstoffwechsel zuzuschreiben (Übersicht bei Hulbert und Else 2000). Änderungen im BMR oder in der Körpertemperatur können daher einen erheblichen Einfluss auf die tägliche Energiebilanz haben. Homozygote Träger des *Mahogany* Allels (*mg*) in der Maus (Dinulescu et al. 1998; Nagle et al. 1999) oder transgene Mäuse, die UCP-3 im Skelettmuskel überexprimieren (Clapham et al. 2000), haben im Vergleich zu WT-Kontrollen höhere Basal- bzw. Ruhestoffwechselraten, die mit Resistenz gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas einhergehen. Auf der anderen Seite wird eine Erniedrigung in der (gewichtsspezifischen) Stoffwechselrate und der Körpertemperatur bei z. B. *ob/ob*- oder UCP-1-DTA- (Diphtheria Toxin A-) Mäusen mit der Ausprägung von Fettleibigkeit in Verbindung gebracht (Pelleymounter et al. 1995; Klaus et al. 1998).

Nach Rubner (1883) ist zu erwarten, dass kleinere Tiere allein aufgrund ihrer im Vergleich zur Körpermasse relativ größeren Körperoberfläche einen erhöhten Wärmeverlust haben. Dies äußert sich in höheren T_{ic} s, aber auch in einer erhöhten (gewichtsspezifischen) Wärmedurchgangszahl (Hart 1960). Die stärkere x-fache Erhöhung der thermoregulatorischen Wärmeproduktion, die erhöhte (relative) Wärmedurchgangszahl sowie die signifikant höhere Lage der Thermoneutralzone belegen, dass die kleineren SMA1-Mäuse einen energetischen Nachteil haben. Es ist daher zunächst erstaunlich, dass die hier bestimmten BMRs und RMRs proportional mit dem Körpergewicht erniedrigt sind.

Untersuchungen zur Beziehung zwischen der Körperzusammensetzung und der Stoffwechselleistung von Vertebraten haben darüber hinaus gezeigt, dass verschiedene Organe unterschiedliche Beiträge zum Basalstoffwechsel eines Tieres leisten. Insbesondere Herz, Leber, Niere, Gehirn und Dünndarm zählen zu den stoffwechselaktivsten Geweben, dagegen wird Fettgewebe als metabolisch inert angesehen (Field et al. 1939; Rolfe und Brown 1997). Interspezifisch lassen sich bei Vögeln etwa 50% der Variabilität im BMR durch Unterschiede im Herz- und im Nierengewicht erklären (Daan et al. 1990). In einer von Konarzewski und Diamond (1995) publizierten Analyse zur Beziehung zwischen Körperzusammensetzung und dem BMR

bei verschiedenen Inzucht-Mausstämmen konnten ebenfalls ca. 50% der Variabilität im BMR auf die Masse von Leber, Niere, Herz und Dünndarm zurückgeführt werden, die zusammen nur etwa 17% des Körpergewichts ausmachten. Da die stoffwechselaktiven Gewebe bei kleineren Tieren einen relativ höheren Anteil an der Körpermasse bzw. fettfreien Masse haben, sollte ihr Beitrag zum Gesamtstoffwechsel ebenfalls größer sein als bei größeren Tieren (Krebs 1950; McMahon 1973; Heusner 1982, Wang et al. 2000). Legt man die im Zusammenhang mit dieser Arbeit gewonnenen Beziehungen zwischen Fettmasse (Soxhlet-Extraktion) und Körpermasse (Anhang Tab. IV) zugrunde und schätzt den Anteil der fettfreien Masse für die im BMR untersuchten Mäuse (Abschnitt 3.10), resultierte bei homo- und heterozygoten SMA1-Mäusen eine nicht-proportionale Erhöhung des BMR mit verringerter FFM (**Abb. 60**). Aus dieser Perspektive erfolgt also die Entwicklung der Fettleibigkeit bei SMA1-Mäusen sogar vor dem Hintergrund relativ höherer energetischer Kosten.

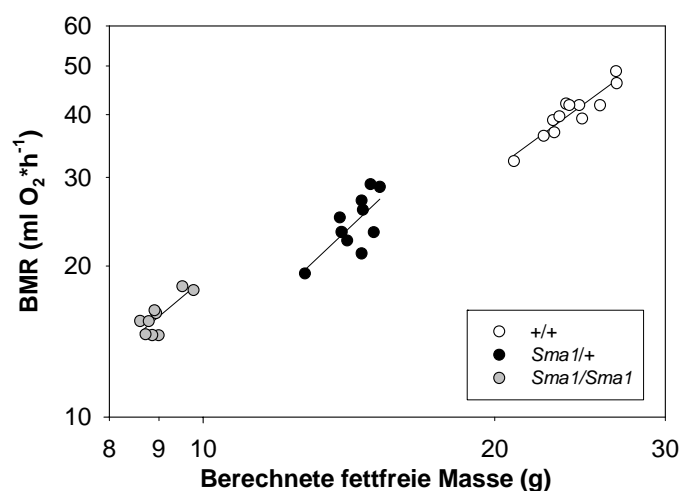


Abbildung 60: Zusammenhang zwischen geschätzter fettfreier Masse und dem BMR von 3 Monate alten WT- und SMA1-Mäusen (aus Abschnitt 3.10). Die fettfreie Masse wurde aus der Differenz zwischen der Körpermasse (Lebendgewicht [g]) und der Fettmasse nach Anhang Tab. IV berechnet⁸.

Klaus et al. (1998) konnten zeigen, dass fettleibige UCP-1-DTA- (Diphtheria Toxin A-) Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren eine um 0.9°C niedrigere Körpertemperatur

⁸ Der im Rahmen eines Laborpraktikums von Valeska Schwarz (FB Biologie/Tierphysiologie, Universität Marburg) mittels DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*) bestimmte *in-vivo*-Fettgehalt (FettDEXA) einer Gruppe von WT- und SMA1-Mäusen (n=32; 3 Monate alt) korrelierte mit dem auf Basis der Körpermasse berechneten Fettgehalt lt. Anhang Tab. IV mit $r^2=0.86$ (FettDEXA = 0.90 * BM - 0.02; p<0.001).

besitzen. Eine Erniedrigung der Körpertemperatur um 1°C hat ein geschätztes tägliches Energiesparpotential von ca. 5-10% des BMR unter normalen Haltungsbedingungen (23°C), da sich der Gradient zwischen Außentemperatur und Körpertemperatur verringert. Bei unveränderter Assimilation kann dies also langfristig die Ausprägung einer Adipositas ermöglichen. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit haben SMA1-Mäuse eine um etwa 0.4°C (heterozygot) bzw. 0.9°C (homozygot) niedrigere Körpertemperatur als WT-Mäuse. Damit bietet sich nicht nur eine potentielle Erklärung für das Erreichen einer positiven Energiebilanz, sondern es bestätigt sich auch der bereits bekannte Trend zur erniedrigten Körpertemperatur bei Störungen in der GH-Achse bei der Maus (**Tab. 29**).

Tabelle 29: Körpertemperatur bei Mausmodellen mit GH-Defizienz und -Resistenz

	Snell-Zwergmaus	Ames-Zwergmaus	Laron-Maus	Little-Maus	SMA1-Maus
Symbol	<i>dw</i>	<i>df</i>		<i>lit</i>	<i>Sma1</i>
Gendefekt	<i>pit-1</i> -Locus Mutation	<i>prop-1</i> -Locus Mutation	GHR/BP-KO	GHRH-R-Punktmutation	GH-Punktmutation
primärer Defekt	keine GH-, PRL-, TSH-Zellen in Hypophyse	keine GH-, PRL-, TSH-Zellen in Hypophyse	GH-Resistenz	Defekter GHRH-R	Defektes GH-Protein
Plasma-GH	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	erhöht	nicht nachweisbar	reduziert bis nicht nachweisbar
IGF-1	↓	↓	↓	↓	↓
TSH/T ₄	↓	↓	(↓)	unverändert	?
Adipositas	+	+	+	+	+
T _b -Erniedrigung	1°C*	1.5°C [#]	0.4°C [#]	?	0.4 (<i>Sma1/+</i>) [#] 0.9°C (<i>Sma1/Sma1</i>) [#]
Referenz T _b	Schonholz 1949	Hunter et al. 1999	Hauck et al. 2001	?	diese Arbeit
Plasma-Ghrelin	?	(↑)	unverändert	?	↑
Referenz Ghrelin		A. Bartke, <i>pers. Mitt.</i>	Nass et al. 2004		diese Arbeit

?: nicht bekannt; *Rektalfühler; #Mini-Mitter

Die verringerte Körpertemperatur von SMA1-Mausmutanten könnte aber auch indirekt, d.h. Folge der Erniedrigung in der täglichen Spontanaktivität sein. Wie die Registrierung der Bewegungsaktivität der Mäuse zeigt, sind unter normalen Haltungsbedingungen homozygote SMA1- deutlich weniger aktiv als heterozygote SMA1- und WT-Mäuse. Es wäre dann zu erwarten, dass sich die verringerte Spontanaktivität insbesondere in niedrigeren T_b-Maxima während der Dunkelphase (Aktivitätsphase) widerspiegelt. Dies ist nicht der Fall, vielmehr stützen die vorliegenden Ergebnisse eine Gesamt-

Sollwertverstellung der Körpertemperatur. Es lässt sich daher spekulieren, dass die hier gemessenen, proportional niedrigeren Stoffwechselraten von SMA1-Mäusen möglicherweise eine Kombination aus erhöhter Wärmeproduktion in stoffwechselaktiven Geweben (Gesamtheit der fettfreien Masse), kompensiert durch niedrigeren Energieverbrauch über einen verringerten Körpertemperatursollwert reflektieren.

5.1.4.2 UCP-1-Expression im interscapularen braunen Fett (iBAT)

Unter chronischer Kältebelastung zeigen Mäuse eine Vergrößerung der BAT-Gewebemasse durch Hyperplasie und Hypertrophie sowie eine Erhöhung der Expression von UCP-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (Übersicht bei Klingenspor 2003). Nach Schätzungen ist die UCP1-vermittelte Thermogenese bei Kälteakklimatisation für bis zu 60-70% der kälteinduzierten, zitterfreien Wärmebildung verantwortlich (Heldmaier und Buchberger 1985).

Obwohl das iBAT bei SMA1-Mäusen relativ zum Körpergewicht größer und schwerer ist, scheint dies nach den vorliegenden Ergebnissen nicht mit einer differentiellen Änderung auf UCP-1-Expressionsebene im Vergleich zu WT-Mäusen einherzugehen. Dieser Befund ist zunächst überraschend, da Mäuse bereits unteraltungsbedingungen (23°C) chronisch kälteakklimatisiert sind und man auf Basis der Ruhestoffwechselraten (Abschnitt 3.10) erwarten könnte, dass SMA1-Mäuse eine höhere UCP-1-Expression zeigen. Eine Erklärung für die Abweichung von der Erwartung könnte in der vergleichsweise moderaten und chronischen Kältebelastung liegen, der die Mäuse beialtungsbedingungen ausgesetzt sind: Eine stärkere Rekrutierung der BAT-Thermogenese muss sich dann nicht notwendigerweise in einer (mittels Western Blot nachweisbaren) überproportionalen Steigerung der UCP-1-Expression von SMA1-Mutanten ausdrücken. Andere Regulationsmechanismen, wie z.B. die Änderung in der mitochondrialen GDP-Bindung oder die Steigerung der Cytochrom-Oxidase-Expression bzw. deren Aktivität könnten zu einer höheren Kapazität der zitterfreien Wärmebildung im BAT der Mutanten führen (Übersicht bei Cannon und Nedergaard 2004), ohne dass die UCP-1-Expression selbst messbar beeinflusst ist (vgl. z.B. Jennings et al. 1986).

Im Hinblick auf eine mögliche Interaktion von UCP-1 und GH sind unter den zwergwüchsigen Mausmodellen bislang nur die einen GH-Antagonist überexprimierenden transgenen bGH-G119K-Mäuse sowie die GH-resistenten GHR/BP-KO-Mäuse untersucht (Li et al. 2003). Die Autoren konnten zeigen, dass die auch bei diesen Mäusen zu beobachtende relative Vergrößerung des iBAT einherging mit einer Erhöhung in der UCP-1-mRNA-Expression. Da die UCP-1-Expression bei zugleich untersuchten,

transgenen, bGH-überexprimierenden riesenwüchsigen Mäusen erniedrigt war wurde spekuliert, dass GH einen negativer Regulator der UCP-1-Expression darstellen könnte. Die an SMA1-Mutanten vorliegenden Befunde stehen nicht im Einklang mit dieser Hypothese, da keine Änderung in der UCP-1-Expression festgestellt wurde. Eine explorative Analyse der RNA-Menge im braunen Fett ergab darüber hinaus keinen Unterschied im relativen Gesamt-RNA-Gehalt dieses Gewebes zwischen den Genotypen (3 Monate alte Mäuse: +/+ : $1.3 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$, *Sma1*/+ : $1.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mg}$, *Sma1/Sma1*: $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$; und 5 Monate alte Mäuse: +/+ : $0.9 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, *Sma1*/+ : $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ und *Sma1/Sma1*: $1.0 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$; ($p=0.38$ (Genotyp); $p=0.01$ (Alter); $p=0.27$ (Genotyp x Alter); ANOVA $p=0.08$). Gekoppelt mit der unveränderten UCP-1 Expression spricht dies zunächst für vergleichbare Zellzahlen und nicht für (kältebedingte) Proliferation und Hypertrophie bei SMA1-Mäusen. Die relative Vergrößerung der iBAT-Masse steht daher möglicherweise nicht in ursächlichem Zusammenhang mit einer erhöhten Thermogenesefähigkeit, sondern könnte auch das Ergebnis eines „anti-lipolytischen“ Effekts sein, der als Folge des GH-Mangels zu einer globalen Vergrößerung aller Fettdepots (und damit auch des iBAT) von SMA1-Mutanten führt. Für eine weitere Diskussion wären hier histologische Analysen des BAT und WAT kombiniert mit Messungen des DNA-Gehalts und der Fettzellgröße (Durchmesser) nötig.

5.1.4.3 24 h-Energiebilanz

Wie in Abschnitt 3.12.1 gezeigt, haben SMA1-Mäuse bei fast thermoneutraler Außentemperatur einen Genotyp-abhängigen, nicht-proportional reduzierten täglichen Energieverbrauch (DEE), d.h. bei 27.5°C Umgebungstemperatur würde eine heterozygote SMA1-Maus pro Tag etwa 15 kJ und eine homozygote SMA1-Maus etwa 25 kJ weniger Energie als eine WT-Maus gleichen Körpergewichts verbrauchen. Es ist aber davon auszugehen, dass dieser Unterschied unter normalen Haltungsbedingungen (23°C) etwas geringer ausfällt, da zusätzliche thermische Belastungen für die kleineren Mäuse zu erwarten sind. Trotzdem bietet eine Erniedrigung im täglichen Energieverbrauch Potential für die Ausprägung bzw. Aufrechterhaltung der Adipositas bei SMA1-Mäusen. Dies könnte z.B. über das Einsparen von Energie durch verringerte Aktivität erreicht werden (Abschnitt 3.13). Eine stärkere Reduktion in der Spontanaktivität von homozygoten SMA1-Mäusen könnte allerdings auch in Zusammenhang mit dem relativ höheren Körperfettgehalt dieser Tiere stehen und wäre damit die Folge der Adipositas.

Die nicht-proportionale Erniedrigung in der täglichen Wärmeproduktion spiegelt sich auch im REE (und auch im $VO_{2max_{DEE}}$) wider. Unter der Annahme, dass der REE die tägliche Wärmeproduktion aus dem RMR aufsummiert, hätte man auf Basis der Messungen in Abschnitt 3.10.6 (RMR) erwarten müssen, dass der DEE proportional mit der Körpermasse reduziert ist. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin begründet liegen, dass bei allen Genotypen im Alter von 5 Monaten der Fettanteil mit 5-6 g noch höher liegt als im Alter von 3 Monaten (Alter bei der RMR-Messung). Wie in Abschnitt 5.1.4.1 bereits erwähnt, wird Fettgewebe im Unterschied zu fettfreier Masse nur eine geringe metabolische Aktivität zugesprochen. Nach Schätzungen beträgt beim Menschen die Ruhestoffwechselrate von Fettgewebe nur etwa $4.5 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (ca. 5% REE) im Vergleich zu $200\text{-}240 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ von Leber und Gehirn (Klaus 2004, Wang et al. 2000). Bei der allometrischen Betrachtung (sowohl DEE, REE bzw. $VO_{2max_{DEE}}$ versus Körpermasse) hätte also die Fettkomponente primär einen Einfluss auf die Körpermasse (x-Achse) und damit auf die Steigungen. Dies könnte bedeuten, dass unter annähernd thermoneutralen Bedingungen der geringere tägliche Energieverbrauch von SMA1-Mäusen nicht die Erklärung, sondern Ausdruck der Adipositas ist. Legt man die aus den Messungen der Körperzusammensetzung gewonnenen Regressionsgeraden für Fett zugrunde und schätzt die fettfreie Masse (FFM) der im Versuch verwendeten Mäuse ($FFM \text{ [g]} = \text{Körpermasse [g]} - \text{abzüglich geschätzter Fettmasse [g]}$; Anhang Tab. IV), resultieren die in **Abb. 61 A** gezeigten Zusammenhänge.

Eine explorative Analyse (ANCOVA) zur Quantifizierung des Unterschieds im DEE bei gleicher fettfreier Masse ergäbe dann aber weiterhin einen hochsignifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0.001$) auf den DEE: Bei gleicher fettfreier Masse resultierte eine geschätzte stufenweise Reduktion im DEE ($DEE_{WT} > Sma1/+ > Sma1/Sma1$) von jeweils etwa 5-6 kJ (**Abb. 61 B**). Damit erklärten sich bei gleicher Körpermasse ca. 50% des Unterschieds im DEE allein durch die veränderte Körperzusammensetzung. Die anderen 50% könnten tatsächlich eine metabolische Folge der GH-Defizienz sein, die damit zu einer positiven Energiebilanz beiträgt. Aufgrund der Stichprobengröße und der nicht-signifikanten Korrelationen (vgl. Abb 61 A) muss diese Hypothese in geeigneten Experimenten (z.B. DEE-Bestimmung bei jüngeren Tieren in Thermoneutralität und bei 23°C , ggf. auch bei GH-behandelten WT- und SMA1-Mäusen) erneut getestet werden. Tschöp et al. (2000) konnten nach zweimaliger Injektion von bGH ($8 \text{ mg} \cdot \text{kgBM}^{-1}$) bei WT-Mäusen keine Änderung im täglichen Gesamtenergieverbrauch feststellen, allerdings war der Energieverbrauch während der Lichtphase leicht (signifikant) erhöht.

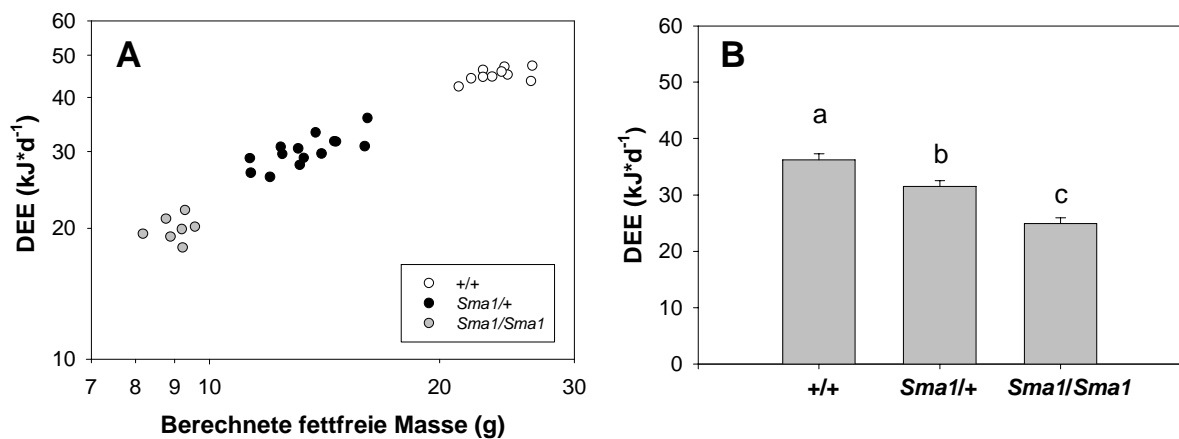


Abbildung 61: (A) Zusammenhang zwischen fettfreier Masse und DEE von WT- und SMA1-Mäusen bei 27.5°C: +/+ (weiße Symbole): $r^2=0.250$, $p=0.141$, $n=10$; *Sma1/+* (schwarze Symbole): $r^2=0.557$, $p<0.001$, $n=14$; *Sma1/Sma1* (graue Symbole): $r^2=0.024$, $p=0.740$, $n=7$. Die fettfreie Masse wurde geschätzt aus dem Körpergewicht (g) abzüglich der berechneten Fettmasse (g) mittels der Regressionsgeraden in Tab. IV im Anhang. (B) ANCOVA-geschätzter täglicher Energieverbrauch bei gleicher fettfreier Masse (14.7 g). a,b,c: $p<0.05$.

In Übereinstimmung mit Überlegungen zur funktionellen Beziehung zwischen REE und DEE (bzw. BMR und FMR (*field metabolic rate*) in Freilandmessungen) bei Endothermen stellt der REE bei allen Genotypen einen konstanten Anteil am täglichen Energieverbrauch dar (Drent und Daan 1980, Daan et al. 1990; Ricklefs et al. 1996), und die (unstandardisierten) Residuen zwischen Körpermasse und DEE bzw. Körpermasse und REE sind hochsignifikant korreliert ($r^2=0.75$, $p<0.001$). Allerdings fällt der Anteil des hier gemessenen REE am DEE mit 60% vergleichsweise hoch aus. Aus Stoffwechselfmessungen im Freiland unter Einsatz von doppelt markiertem Wasser (D_2O^{18}) wird geschätzt, dass der BMR etwa 30% des FMR (DEE) ausmacht (Meerlo et al. 1997; Speakman et al. 2003a). Diese Diskrepanz zum Anteil des BMR könnte die Folge der im Vergleich zum Haltungsraum wärmeren Umgebung während der Messung sein: Möglicherweise haben die Mäuse (aller Genotypen) zur Vermeidung von Hyperthermie die Gesamtmenge ihrer (nächtlichen) Aktivität und damit den Sauerstoffverbrauch reduziert (vgl. z.B. Walters et al. 2000). Wie in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, sind die Mäuse im Haltungskäfig bei 23°C klar nachtaktiv (70%-80% der täglichen Aktivität wurden nachts registriert) und dies sollte sich auch in den Stoffwechsel-Profilen der 24 h-Messungen niederschlagen.

Auf Seiten der Energieaufnahme haben homozygote und heterozygote SMA1-Mäuse im Alter von 3 Monaten einen proportional niedrigeren Futtermittelverbrauch. Im Alter von 5

Monaten aber ist die Futtermittelaufnahme bei homozygoten SMA1-Mäusen erhöht und vergleichbar mit der Futtermittelaufnahme heterozygoter SMA1-Mäuse. Die daraufhin vermutete Hyperphagie 5 Monate alter homozygoter SMA1-Mäuse zeigt sich auch während der 24 h-Stoffwechselformel und erklärt die positive Energiebilanz, die bei diesem Genotyp während der 24 h-Messung bestimmt wurde. Diese geht einher mit einer signifikanten Erhöhung des RQ, der eine *de-novo* Fettsynthese widerspiegeln könnte (vgl. Brody 1994), allerdings kann keine signifikante Zunahme des Körpergewichts während der 4-tägigen Messung nachgewiesen werden. Da 1 g Fett einen Energiegehalt von ca. 38 kJ besitzt (Brody 1994), aber nur ein geschätzter Energieüberschuss von insgesamt ~24 kJ resultierte, reichte das im Experiment gewählte Zeitintervall vermutlich nicht für eine signifikante Zunahme im Körpergewicht (durch *de-novo*-Fettsynthese) aus.

Bei heterozygoten SMA1-Mäusen kann keine Hyperphagie und keine Änderung im RQ festgestellt werden. Da der absolute Fettgehalt von heterozygoten im Vergleich zu homozygoten SMA1-Mäusen bereits im Alter von 3 Monaten ähnlich mit dem von WT-Mäusen ist (Tab. 10), könnte es sein, dass ein offensichtliches Ungleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und Nahrungsabgabe beim heterozygoten Genotyp in einem früheren Altersfenster (< 3 Monate) messbar wird.

5.1.4.4 *Leptin-Spiegel und Hyperphagie*

Das primär vom weißen Fettgewebe exprimierte und im Blut zirkulierende Leptin (ob-Protein) spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme (Übersicht bei Sahu 2004). Leptin-Mangel oder eine Beeinträchtigung der Sensitivität hypothalamischer Zentren der Nahrungsaufnahme gegenüber diesem anorektischen Hormon (Leptin-Resistenz) führt zu Adipositas, u.a. durch Hyperphagie, aber auch durch eine erniedrigte Körpertemperatur und verringerte Aktivität (Friedman und Halaas 1998). Der Beitrag, den der Stoffwechsel zur Ausprägung des fettleibigen Phänotyps leistet ist dagegen umstritten, da der metabolische Vergleich zwischen z. B. fettleibigen *ob/ob*-Mäusen und WT-Kontrollen aufgrund der veränderten Körperzusammensetzung und -masse der Mutanten problematisch ist (Erickson et al. 1996, Himms-Hagen 1997; Breslow et al. 1999).

Da die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Leptin-Spiegel von SMA1-Mäusen mit dem Körperfett korrelieren und die Werte von WT- und SMA1-Mäusen auf einer gemeinsamen Regression liegen (Abb. 24), bestätigt sich zunächst der Befund, dass Leptin die Körperfettmenge reflektiert (Maffei et al. 1995; Klingenspor et al. 2000), und zwar unabhängig vom Genotyp. Angesichts des dramatisch erhöhten Körperfettgehalts wäre

es aber durchaus denkbar, dass SMA1-Mäuse Leptin-resistent sind und einen in Bezug auf ihre Körpergröße zu hohen Körperfettsollwert anstreben bzw. regulieren.

Für die Entwicklung der Adipositas von (homozygoten) SMA1-Mäusen könnten auch die erhöhten Plasma-Ghrelin-Spiegel eine Rolle spielen. So konnten Tschöp et al. (2000) nachweisen, dass periphere Ghrelin-Injektionen bei WT-Mäusen Fettleibigkeit induzierte, die mit Hyperphagie und einer Erhöhung des RQ einherging. Es wird daher spekuliert, dass Ghrelin die Fettoxidation zugunsten des Kohlehydratstoffwechsels reduziert. Im Einklang mit dieser Hypothese zeigten die von Wortley et al. (2004) generierten Ghrelin-KO-Mäuse unter fettreicher Diät eine überproportionale Erniedrigung im RQ. Da die Ghrelin-Spiegel und die Energiebilanzen in der vorliegenden Arbeit nicht an den selben Individuen bestimmt wurden und auch die Altersfenster der jeweiligen Bestimmung unterschiedlich waren, ist ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Hyperghrelinämie und der Adipositas von (homozygoten) SMA1-Mäusen bedingt durch Hyperphagie und der Erhöhung im RQ aber zunächst reine Spekulation.

Yasuda et al. (2003) konnten zeigen, dass eine zentrale Ghrelin-Infusion die Aktivität der (sympathischen) Innervierung und damit die zitterfreie Wärmebildung im braunen Fett von Ratten reduziert: Nach etwa 10 min sank nicht nur die Aktionspotential-Frequenz, sondern auch die iBAT-Temperatur um 0,5°C für etwa 20-30 min. Eine GH-Infusion bewirkte dagegen nach etwa 30 min einen signifikanten Anstieg in der Impulsfrequenz im iBAT (es erfolgte keine Messung der iBAT-Temperatur nach der GH-Behandlung). Lawrence et al. (2002) untersuchten die Wirkung von GHRP-6 (*Growth hormone releasing peptide-6*, ein synthetischer Ghrelin-Agonist) und Ghrelin-Injektionen (einmalig i.c.v.) auf die Aktivierung hypothalamischer Nuclei, die in Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme stehen. U.a. bestimmten sie die Futteraufnahme, aber auch die Körpertemperatur bei den so behandelten Ratten. Auch diese Autoren konnten zeigen, dass die Ghrelin-/GHRP-6-induzierte Stimulation der Nahrungsaufnahme mit einer kurzfristigen (ca. 1 h dauernden) Erniedrigung in der Körperkerntemperatur von ca. 1°C einherging. Möglicherweise ist daher auch die bei SMA1-Mäusen beobachtete Hyperghrelinämie, und weniger die GH-Defizienz an sich Ursache für die beobachtete Reduktion in der Körpertemperatur.

Wren et al. (2000) wiesen nach, dass die Serum-TSH-Spiegel bei Ratten nach i.c.v. Ghrelin-Administration erniedrigt waren. Darüber hinaus geht sowohl induzierter Hypothyroidismus bei WT-Ratten als auch GH-Defizienz bei zwergwüchsigen SDR-Ratten mit Hyperghrelinämie im Plasma und erhöhter Ghrelin-mRNA-Expression im Magen einher (Caminos et al. 2002). Es wäre also auch denkbar, dass eine durch Ghrelin

verursachte Reduktion in der Schilddrüsenfunktion die erniedrigte Stoffwechselrate und die dadurch verringerte Körpertemperatur zur Folge hat.

Interessanterweise zeichnen sich mit Ausnahme von Patienten mit Prader-Willi-Syndrom⁹ die bisher daraufhin untersuchten Adipositas-Tiermodelle und menschlichen Krankheitsbilder durch eine Erniedrigung im Plasma-Ghrelin aus (Cummings et al. 2002; Haqq et al. 2003). Bei der SMA1-Mausmutante handelt es sich damit um den ersten adipösen, (Plasma-) hyperghrelinämischen Phänotyp im Tiermodell (Meyer et al. 2004).

5.1.4.5 Fazit zur Ätiologie der Adipositas *in-vivo*

Homozygote und heterozygote SMA1-Mäuse zeigen einen Genotyp-abhängigen, erniedrigten täglichen Energieverbrauch im Vergleich zu WT-Mäusen gleicher Körpermasse. Darüber hinaus konnten bei 5 Monate alten *Sma1/Sma1*-Mäusen Hyperphagie (positive Energiebilanz), eine geringere tägliche Spontanaktivität und eine Erhöhung im RQ festgestellt werden. Bei diesem Genotyp waren im Alter von 3 Monaten die Ghrelin-Spiegel signifikant erhöht und die Körpertemperatur um fast 1°C erniedrigt. Trotz thermoregulatorischer Nachteile aufgrund ihrer geringeren Körpergröße haben also homozygote SMA1-Mäuse ein messbares Potential für die Ausprägung einer positiven Energiebilanz und damit verbundener Fettleibigkeit. Heterozygote SMA1-Mäuse haben zwar intermediär reduzierte Ghrelin-Spiegel und Körpertemperaturen, aber kein offensichtliches Ungleichgewicht in der Tages-Energiebilanz.

Mit den hier durchgeführten Untersuchungen lässt sich damit die Ätiologie der Adipositas von SMA1-Mäusen nur partiell aufspüren. Zur Erklärung des metabolischen (fettleibigen) Phänotyps *in-vivo* wäre möglicherweise die Erstellung einer Lebens-Energiebilanz, wie z.B. von Speakman et al. (2003b) an verschiedenen großen Hunderassen durchgeführt, gekoppelt mit *in-vivo*-Fettmessungen ein besserer Ansatz. Darüber hinaus ist es sehr wahrscheinlich, dass ein besonders deutliches Ungleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel bei heterozygoten (ggf. auch bei homozygoten) SMA1-Mäusen in einem frühen Altersfenster (< 3 Monate) nachweisbar ist, da heterozygote SMA1-Mäuse bereits in diesem Alter ähnliche Mengen an Körperfett besitzen wie die WT-Mäuse. Die bei SMA1-Mäusen im Alter von 3 Monaten im Fett gespeicherten Energie könnte z.B. Energiereserven darstellen, die vor bzw. während der

⁹ Prader-Willi-Syndrom zählt mit einer Prävalenz von 1:10 000 zur häufigsten Form erblich bedingter Adipositas beim Menschen und zeichnet sich u.a. durch Minderwuchs (GH Defizienz), Hyperphagie und Fortpflanzungsstörung aus.

Pubertät akkumuliert aber aufgrund der GH-Defizienz nicht für Wachstumsprozesse „abgerufen“ wurden. Vor dem Hintergrund der GH-Mutation ist die Energetik des Wachstums bzw. des Nicht-Wachstums ein wesentlicher Faktor, der die Leistungen eines Standard-Charakterisierungsprogramms für Stoffwechselstörungen ausgewachsener Mäuse letztlich überschreitet.

5.2 Diskussion II: David

5.2.1 Vom Phänotyp zum Genotyp: David

Trotz ihrer verringerten Körpergröße und -masse haben David-Phänotypen keine offensichtlichen Pathologien. Im Unterschied zu SMA1-Mäusen scheint es sich beim David-Phänotyp um eine Mausmutante mit proportional verringerter Körperzusammensetzung zu handeln, ggf. ist ihr Fettgehalt sogar leicht erhöht. David-Mäuse sind also sicher nicht „anorektisch“ oder zu schlank für ihre Masse. Auch im Hinblick auf Stoffwechselraten, Körpertemperatur und Futteraufnahme liegen David-Mäuse im Bereich der Erwartungswerte für WT-Mäuse geringer Körpermasse.

Auf Basis der hier erhobenen Daten lassen sich nur einige wenige Spekulationen über das betroffene Gen von David anstellen:

1. Auch wenn keine Körpergewichte an neugeborenen David-Mäusen erhoben wurden, sind David-Mäuse bereits am Tag 7 optisch von ihren WT-Geschwistern zu unterscheiden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass der David-Gendefekt von Geburt an bzw. pränatal zu einer erkennbaren Verringerung in der Körpergröße und -masse führt.
2. Ähnlich wie bei SMA1-Mäusen ist auch der peripubertale Wachstumsschub von David-Phänotypen dramatisch verringert. Da z.B. IGF-1 sowohl bei der Vermittlung des postnatalen Längenwachstums als auch bei der Entwicklung des Embryos eine Rolle spielt (Liu et al. 2000) ist davon auszugehen, dass David-Mäuse erniedrigte IGF-1-Spiegel haben. Ein ENU-induzierter KO von IGF-1 ist allerdings auszuschließen, da das Gen auf Chromosom 10 liegt (<http://www.informatics.jax.org/>).

Um sich dem Genotyp weiter zu nähern, würde sich auch für diese Mausmutanten eine Untersuchung der Hypophysen-GH-Achse anbieten. David könnte sich hierbei als ein interessantes Mausmodell für die Untersuchung von Störungen der normalen Entwicklung von Organgröße und Körpergröße herausstellen.

5.3 Diskussion III: Methodische Aspekte der stoffwechselphysiologischen Charakterisierung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der SMA1-Mauslinie erstmals die phänotypische, metabolische Charakterisierung einer ENU-induzierten Mausmutante mit veränderter Körpermasse und Körperzusammensetzung durchgeführt. Auch wenn die Ätiologie der Adipositas *in-vivo* letztlich nicht vollständig erklärt werden konnte, lassen sich aber aus den hier durchgeführten Experimenten einige wichtige methodische Aspekte für die metabolische Charakterisierung von Tiermodellen mit gestörter Körpergewichtsregulation ableiten.

5.3.1 Bestimmung des RMR

In der Praxis entspricht der RMR der niedrigsten Stoffwechselrate des ruhenden, postabsorptiven Tieres, gemessen während der Exposition einer konstanten Außentemperatur (vgl. z.B. Selman et al. 2001). Die hier durchgeführten Versuche mit paralleler Registrierung der Körpertemperatur zeigen deutlich, dass Mäuse im Temperaturbereich von 24-15°C im ruhenden Zustand keine stabile Stoffwechselrate haben, sondern beständig thermoregulieren. Auch die Körpertemperatur hat eine „normotherme“ Plastizität von bis zu 3°C.

Eine explorative Auswertung über die in Experiment 3.10 eingeschlossenen WT-Mäuse nach dem Verfahren der niedrigsten Stoffwechselrate zur Bestimmung des RMR ergäbe die in **Abb. 62** dargestellten Werte in Kälte. Die so erhaltenen Stoffwechselraten sind deutlich niedriger als die mittels „Plateau-Verfahren“ in dieser Arbeit bestimmten RMRs. Bei z.B. 15°C Außentemperatur würde der mittlere RMR um bis zu 46% (mindestens aber 20%) geringer geschätzt. Aus den niedrigeren RMRs und der dadurch verringerten Steigung der Regression über die RMRs in Kälte resultierten unphysiologische T_{bths} von ca. 48°C.

Die Annahme, dass die niedrigste MR pro Temperaturstufe dem RMR entspricht, kann also im Fall der Maus die Stoffwechselrate dramatisch unterschätzen. Der absolute Betrag des Unterschieds ist (im Bereich von 24-15°C) temperaturabhängig, d.h. je niedriger die Außentemperatur, desto höher die Fehlschätzung. Als Konsequenz für die Praxis der RMR-Bestimmung ist daher zu empfehlen, den RMR als Plateau niedrigsten Sauerstoffverbrauchs mit niedrigstem Variationskoeffizienten zu bestimmen. Die dem RMR als Mittelwert zugrunde liegenden, aufeinanderfolgenden Messwerte sollten ein Zeitintervall von 8-12 min abdecken.

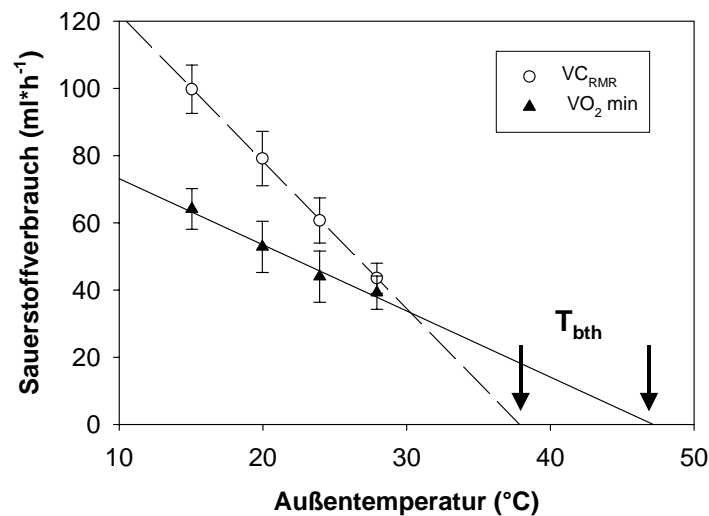


Abbildung 62: SCHOLANDER-Modell für die Beziehung zwischen Außentemperatur und Ruhestoffwechsel von WT-Mäusen (n=12) in Abhängigkeit von der Methode der RMR-Bestimmung. Der RMR wurde entweder bestimmt aus dem Plateau niedrigster Sauerstoffverbrauchswerte über 10 min (VC_{RMR} , weiße Symbole, vgl. Abb. 30) oder als niedrigste Stoffwechselrate ($VO_{2\min}$, schwarze Symbole) je Temperaturstufe. Die Regressionen extrapolieren auf die x-Achse und damit auf die Theoretische Körpertemperatur (T_{bth} in °C, Pfeile).

5.3.2 Die Wahl des „richtigen“ Exponenten für allometrische Beziehungen

Wie einleitend erwähnt (Abschnitt 1.2), zeigen die meisten physiologischen Vorgänge und Parameter nicht nur eine Variation, die mit der Körpergröße oder -masse korreliert, sondern diese Körpergrößenabhängigkeit ist auch zumeist nicht isometrisch d.h. Massenexponenten bzw. Steigungen der linearisierten Exponentialfunktionen weichen signifikant ab von $b = 1$ (Schmidt-Nielsen 1985).

Da es sich bei SMA1- und David-Mäusen um Mutanten mit verringerter Körpermasse handelte, war bereits vor Beginn der phänotypischen Charakterisierung zu erwarten, dass sich ein (unbekannter) Teil der Variabilität in den metabolischen Zielgrößen dieser Arbeit allein durch Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Genotypen erklären lässt. Hiermit stellte sich in dieser Arbeit die Herausforderung, direkte physiologische Einflüsse des Genotyps unterscheiden zu können von Unterschieden, die rein durch das (verringerte) Körpergewicht bedingt sind. Sind SMA1- bzw. David-Mäuse „nur“ kleiner? Für die Beantwortung dieser scheinbar einfachen Frage ist die ausschließliche Analyse von Mittelwerten nicht hilfreich (siehe Abb. 2).

Eine weit verbreitete Möglichkeit zur Vergleichbarkeit körpergewichtsabhängiger Größen besteht in der Standardisierung pro Gramm Körpermasse ($BM^{1.0}$). Für sinnvolle Vergleiche setzt diese „Korrektur“ allerdings voraus, dass die Beziehung zwischen der abhängigen Variable und der Körpermasse einer isometrischen Beziehung folgt, die auch durch den Nullpunkt geht. In der Exponentialfunktion bedeutet dies, dass $b = 1$, so dass $y = a \cdot BM$. Die Änderung in der Biologie/Physiologie in Abhängigkeit von der Masse folgt also in diesem (Sonder-) Fall einer konstanten Rate (*iso*, gr. gleich). Viele exponentielle Funktionen zur Beschreibung von körpergewichtsabhängigen Variablen erfüllen nicht diese Voraussetzung, so dass das Verfahren der Standardisierung pro Einheit Körpermasse je nach Stärke der Abweichung von $b = 1$ zu Fehlschlüssen führen kann. Gleiches gilt für die „Standardisierung“ körpergewichtsabhängiger Variablen mittels Prozentangaben, da auch dieses Verfahren impliziert, dass der Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Zielgröße isometrisch verläuft und darüber hinaus die y-Achse im Nullpunkt schneidet (Tanner 1949). Eine Fehleinschätzung kann auch bei der globalen „Standardisierung“ der Stoffwechselrate zur $BM^{0.75}$ (nach Kleiber 1961) resultieren, da die intraspezifischen Exponenten z.T. signifikant von dem für interspezifische Vergleiche ermittelten $b = 0.75$ abweichen (Heusner 1982; Hayssen und Lacy 1985). Die folgenden zwei Beispiele sollen derartige Fehlerpotentiale anhand der Daten aus dieser Arbeit illustrieren.

5.3.2.1 Beispiel 1: Der BMR/RMR von SMA1-Mäusen

Im Fall des BMR von SMA1-Mäusen konnte für die Beziehung zur Körpermasse eine isometrische Abhängigkeit ($b = 1$) nachgewiesen werden. Der hier für C3HeB/FeJ-Mäuse geschätzte Massenexponent liegt in einem für Labormäuse publizierten Bereich (0.72-1.10, je nach Mausstamm, vgl. Hart 1960; Heldmaier und Neuweiler 2004), weicht aber signifikant ($p < 0.005$) von dem von Kleiber (1961) für interspezifische Abhängigkeiten publizierten $b = 0.75$ ab.

Würde also $b = 0.75$ verwendet, wäre bei SMA1-Mäusen der „metabolische“ BMR niedriger als bei WT-Mäusen (+/+ : $3.34 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}(\text{BM}^{0.75})^{-1}$; *Sma1*/+ : $2.79 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}(\text{BM}^{0.75})^{-1}$, *Sma1/Sma1*: $2.65 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}(\text{BM}^{0.75})^{-1}$, $p < 0.001$), wobei sich heterozygote und homozygote SMA1-Mäuse nicht signifikant unterscheiden würden. Aufgrund dieses Ergebnisses hätte man spekulieren können, dass der (erniedrigte) BMR einen Beitrag zur Adipositas von SMA1 leistet. Diese Schlussfolgerung wäre aber nicht richtig.

Wie nämlich in Abb. 34 gezeigt, ist der BMR von SMA1-Mäusen proportional mit der Körpermasse erniedrigt. Da die Konfidenzintervalle für die Steigungen in den drei Gruppen überlappen, d.h. nicht verschieden von $b=1$ sind, ergibt sich bei allen Genotypen

die gleiche gewichtsspezifische Stoffwechselrate von ca. $1.45 \text{ ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Abb. 34 und dem Resultat der ANCOVA (Abb. 35 C). Tatsächlich ist also hier die gewichtsspezifische (basale) Stoffwechselrate ($\text{ml O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, also $b=1$) die allometrisch (=isometrisch) korrekte, körperrgewichtsunabhängige Beschreibung.

In diesem (Sonder-) Fall entspricht die gewichtsspezifische ($\text{BM}^{1.0}$) Stoffwechselrate in Kälte (gewichtsspezifischer RMR) der x-fachen Erhöhung des Stoffwechsels über den BMR hinaus (vgl. Abb. 35 C), obwohl die Steigung für die Beziehung zwischen RMR und Masse eine Tendenz zur Abflachung hat, d.h. verschieden von $b=1$ ist (vgl. Abb. 33 und Anhang Tab. VI). Biologisch bedeutet dies für kleinere SMA1-Mäuse, dass sie im Vergleich zu WT-Mäusen ihre Stoffwechselleistung vielfach mehr steigern müssen, um ihre Körpertemperatur bei 15°C Außentemperatur verteidigen zu können. Das Ergebnis der ANCOVA stützt damit die Schlussfolgerung, dass dieser thermoregulatorische Nachteil allein in der niedrigen Körpermasse begründet liegt.

Für die stoffwechselphysiologische Charakterisierung (nicht nur von Mausmutanten) ist daher zu empfehlen, Ruhestoffwechselraten an den selben Tieren sowohl in Thermoneutralität als auch in Kälte bzw. bei Haltungstemperatur (= moderate Kälte) durchzuführen und vor der Berechnung gewichtsspezifischer Stoffwechselraten zunächst eine „allometrische“ Darstellung der Messdaten zu wählen, d.h. die (Form der) Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Körpermasse zu prüfen. Für einen sinnvollen, biologisch aussagekräftigen Vergleich der Physiologie verschiedener Gruppen kann die „richtige Adjustierung“, also die Wahl des Massenexponenten mit entscheidend sein.

5.3.2.2 Beispiel 2: Der Fettgehalt von David-Mäusen

Der David-Phänotyp wurden zunächst seitens der Firma Ingenium Pharmaceuticals als potentiell Modell für Anorexie erachtet, da sich gezeigt hatte, dass der prozentuale Anteil im Körperfett dieses Phänotyps deutlich niedriger liegt als der gleichaltriger WT-Mäuse (7% statt 12%, vgl. Tab. 24).

Tatsächlich beruht die Annahme eines überproportional reduzierten Fettgehalts auf einem mathematischen Fehlschluss, auch wenn David-Mäuse absolut gesehen eine geringere Menge an Körperfett besitzen: Erwartet man auch bei David-Mäusen einen Fettgehalt von 12%, unterstellt man eine isometrische Beziehung zwischen Körpermasse und Fettmasse, die den Nullpunkt schneidet. In der gemessenen Beziehung zwischen Körpermasse und Fettmasse liegen David und WT-Mäuse zwar auf ähnlichen Regressionen, aber diese schneiden die y-Achse signifikant abweichend von Null. vgl.

Abb. 52 und Anhang Tab. VIII). Als Folge überschätzt die Extrapolation aus dem WT-Bereich die zu erwartende Fettmenge einer kleineren Maus (Packard und Bode 1999). Bei korrekter Extrapolation entlang der gemessenen Regressionen entsprechen die bei David gemessenen („nur“) ~7% Körperfett dem normalen Fettgehalt einer Maus im Körpergewichtsbereich von 15-20 g, ggf. haben David-Mäuse sogar einen geringfügig höheren Fettgehalt. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Untersuchung der Mausmutante David als potentiell Modell für gestörte Körpergewichtsregulation (Anorexie) nicht weiter verfolgt.

5.3.2.3 Die Wahl der „richtigen“ Bezugsgröße für den Vergleich von *in-vivo*-Stoffwechselraten

Wie bereits in Abschnitt 5.1.4.1 erläutert, wird Fett im Unterschied zu fettfreier Masse eine relativ geringe Stoffwechselleistung zugesprochen. Mit dieser Begründung ließe sich anstelle der Körpermasse auch die fettfreie Masse als biologisch relevanter Faktor für die Erklärung von Variationen im BMR heranziehen. Untersuchungen von Scott et al. (1996) an Rotschenkeln (*Tringa totanus*), die den Vorteil der einen (BM) gegenüber der anderen (FFM) Perspektive zu ermitteln versuchten, stützen ebenfalls die dominante Rolle der FFM für die Erklärung der intraspezifischen der Variation im BMR. Intraindividuell, d.h. in wiederholten Messungen während des Winters, erbrachte aber die Fettmasse die höchste Korrelation mit dem BMR. Auf Basis ihrer Untersuchungen zur Beziehung zwischen Körperfett und Ruhestoffwechsel bei domestizierten Schafen schloss dagegen McNiven (1984), dass der Fettgehalt einen erheblichen Beitrag zur Stoffwechselrate leistet. Auch Klaus (2004) hat darauf hingewiesen, dass Fett beim übergewichtigen Phänotyp (Mensch) sowohl direkt, aufgrund seiner Masse, als auch indirekt über eine mit der Adipositas einhergehende Erhöhung in der fettfreien Masse einen Einfluss auf die Stoffwechselleistung hat. Für die stoffwechselphysiologische Charakterisierung stellt sich also weiterhin die Frage nach der biologisch sinnvollen körperlichen Bezugsgröße für metabolische *in-vivo*-Analysen.

Der Vergleich im BMR zwischen heterozygoten SMA1-Mäusen (Modelle „klein und adipös“) und David-Phänotypen (Modell „klein und nicht adipös“) könnte zu dieser Diskussion beitragen. **Tab. 30** stellt die im Rahmen der metabolischen Charakterisierung an David- und heterozygoten SMA1-Mausmutanten erhobenen BMR-Daten gegenüber: Der BMR von David-Mäusen ist gegenüber dem BMR heterozygoter SMA1-Mäusen erhöht, obwohl beide die gleiche Körpermasse haben. Allerdings sind die beiden zwergwüchsigen Phänotypen völlig unterschiedlich zusammengesetzt.

Aus den Körperfettanalysen lässt sich mittels der in Anhang VIII aufgeführten Regressionen die fettfreie Masse der David-Phänotypen schätzen. Diese ist bei David-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten SMA1-Mäusen im selben Verhältnis erhöht wie der BMR. Unter der Annahme, dass David physiologisch-morphologisch die proportional kleinere Version der WT-Maus ist, stützen die in Tab. 30 aufgeführten Zahlenverhältnisse die Hypothese, dass der metabolische Anteil der Fettmasse am BMR tatsächlich gering bis vernachlässigbar ist.

Tabelle 30: Körpermasse (BM), BMR und geschätzte FFM von männlichen *Sma1/+* und David-Mäusen im Alter von 3 Monaten.

	David n=6	<i>Sma1/+</i> n=11	p	Quotient David/SMA1
BMR (ml O ₂ *h ⁻¹)	27.7±1.2	24.7±3.1	<0.05	1.12
BM (g)	17.8±1.4	18.3±1.7	n.s.	0.98
FFM (g) [#]	16.4±1.1	14.4±0.7	<0.001	1.14

[#] geschätzt aus Anhang Tab. VIII

Eine sichere Aussage ist aber auch mit diesem Datensatz nicht möglich, u.a. weil die Zusammenhänge zwischen BM bzw. FFM und BMR bei David-Mäusen statistisch nicht signifikant sind. Dies liegt auch in der geringen Stichprobengröße für David begründet.

In einem metabolischen Charakterisierungsprogramm, das Unterschiede in der Stoffwechselrate verschieden schwerer und zusammengesetzter (Mäuse-) Gruppen aufdecken will, sollten daher zunächst immer zusätzliche Bestimmungen der Körperzusammensetzung erfolgen und die Abhängigkeit des Stoffwechsels von der fettfreien Masse an den selben Tieren analysiert werden.

5.3.3 Empfehlungen für die stoffwechselphysiologische in-vivo-Charakterisierung von Mausmutanten

Auf Basis der hier vorliegenden Ergebnisse und Erfahrungen lassen sich folgende Empfehlungen für die Durchführung stoffwechselphysiologischer Charakterisierungsprogramme ableiten:

1. Physiologische (potentiell allometrische) Zielgrößen sollten grundsätzlich in Relation zur Körpermasse und ergänzend zur fettfreien Masse analysiert werden. So lassen sich Abweichungen von der Proportionalität feststellen und mit ANCOVA test-statistisch quantifizieren, die beim alleinigen Vergleich von Gruppenmittelwerten u. U. nicht zu detektieren sind.

2. Ruhestoffwechselraten sollten an denselben Individuen sowohl in Thermoneutralität (BMR) als auch in Kälte (z.B. Haltungstemperatur) bestimmt werden.
3. Die Angabe von gewichtsspezifischen Stoffwechselraten kann zu Fehlschlüssen führen, wenn ein Massenexponent zugrunde gelegt wird, der den Zusammenhang mit der Masse nicht korrekt beschreibt (z.B. $BM^{0.75}$ statt $BM^{1.0}$ etc. oder FFM^b). Für die Wahl des „richtigen“ Exponenten [b] sollte daher zuvor eine „allometrische Darstellung“ (Regressionsanalyse) der Daten gewählt werden.
4. Prozentangaben sind zwar grundsätzlich als beschreibende Angaben zulässig, sollten aber für eine vergleichende Bewertung z.B. bei Gruppen mit verschiedenen schweren Phänotypen nicht universell Verwendung finden. Auch hier empfiehlt sich zunächst eine „allometrische Darstellung“, um biologische Fehlinterpretationen im Hinblick auf den Phänotyp zu vermeiden.

5.4 Ausblick

Angesichts der weltweiten Zunahme der Adipositas und mit ihr einhergehender Begleit- bzw. Folgeerkrankungen (z.B. Diabetes, Hypertonie etc.) besteht großer Bedarf an der Aufklärung von Signalwegen, die im Zusammenhang mit der Regulation des Körpergewichts stehen. Regelmäßig werden in medizinisch-biologischen Fachzeitschriften neue Mausmodelle vorgestellt, bei denen eine Störung in der Körpergewichtsregulation bzw. im Stoffwechsel vermutet wird und die metabolisch analysiert wurden.

In Deutschland wird seit dem Jahr 2001 im Rahmen des NGFN (Nationalen Genomforschungsnetzes, www.rzpd.de/ngfn) eine „Mausklinik“ (*German Mouse Clinic*, www.mouseclinic.de) an der GSF finanziert, in der Mausmutanten (ENU-induziert oder transgen) im großen Stil phänotypisch charakterisiert werden. U.a. wird hier ein stoffwechselphysiologisches Labor betrieben, in dem im Hochdurchsatzverfahren (ca. 3000 Mäuse pro Jahr, R. Elvert *pers. Mitt.*) Mausmutanten nach standardisierte Routinen auf Abweichungen in ihrem Energiestoffwechsel untersucht werden können.

Die (Mausklinik der) GSF ist auch Mitglied des seit dem Jahr 2002 von der EU-geförderten Forschungskonsortiums EUMORPHIA (*European Union Mouse Research for Public Health and Industrial Application*). Diese Plattform hat nicht nur das Ziel der phänotypischen Charakterisierung von Mausmodellen, sondern fördert auch die Entwicklung und Implementierung von Standardprotokollen (*Standard Operation Protocols*; SOPs) für die phänotypische Analyse. Im *European Comprehensive First Line Phenotyping Protocol* (e-ECFLP) sind diese Protokolle online verfügbar

(www.eumorphia.org/servlet/ECFLP). Hier finden sich bereits detaillierte Anweisungen für einige metabolische Untersuchungen wie z.B. Messungen der Rektaltemperatur oder der Futteraufnahme. Vor dem Hintergrund der Vielzahl an metabolischen Studien und Studienansätzen ist die Etablierung von (weltweit anerkannten) Standardprotokollen für die phänotypische Charakterisierung ein begrüßenswerter Schritt, der nicht zuletzt eine laborübergreifende Vergleichbarkeit von Messdaten sowie Meta-Analysen erlaubt. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sollte aber neben den technisch-methodischen Aspekten der Praxis (Messprotokoll) auch die Bewertung der Daten unter dem Blickwinkel der Allometrie Berücksichtigung finden, um mögliche Fehlinterpretationen für die (metabolische) Relevanz eines Phänotyps/Gendefekts zu vermeiden.

Bei SMA1 ist zwar nicht „das“ hypothalamische Adipositas-Gen betroffen, aber auch dieses Mausmodell wird fettleibig über noch zu klärende Mechanismen an der Schnittstelle zwischen Wachstum und Energiestoffwechsel. Der SMA1-Phänotyp ist aber vor allem aus endokrinologischer Sicht interessant: Tatsächlich handelt es sich um das bislang einzige nicht-transgene Mausmodell mit Störung der GH-Achse, das in zwei Phänotypen (heterozygot und homozygot SMA1) zum Ausdruck kommt. Diese Besonderheit der SMA1-Mausmutante eröffnet die Möglichkeit zur Durchführung künftiger Hypothesen-basierender Experimente zur Untersuchung von GH-assoziierten Themenkomplexen, so. z.B. der Speicherung und Sekretion von Peptidhormonen, der Rolle von Ghrelin bei der Körpergewichtsregulation und des Wachstums, sowie der Sensenzforschung.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der ENU-Mutagenese und nachfolgenden phänotypischen Charakterisierung handelt es sich um einen am Phänotyp-orientierten, nicht Hypothesen-basierenden Ansatz zur Gen-Funktionsanalyse (*forward genetics*). In dieser Arbeit erfolgte eine phänotypische und stoffwechselphysiologische Charakterisierung der bislang unbeschriebenen, zwergwüchsigen ENU-induzierten Mauslinien SMA1 und David. SMA1-Mäuse tragen eine a→g-Transition im Exon 5 des GH-Gens, der auf Proteinebene zu einem D→G Austausch in Position 193 des Präproteins bzw. 167 des fertigen Proteins führt. Art und Lage der für den David-Phänotyp verantwortlichen Mutation sind bis heute unbekannt. Der David-Phänotyp wurde aufgrund seines geringen Körperfettgehalts (%) als mögliches Tiermodell für Anorexie (Magersucht) erachtet.

Primäres Ziel der Arbeit war die Durchführung eines phänotypischen und stoffwechselphysiologischen Charakterisierungsprogramms für ENU-induzierte Mausmutanten mit gestörter Körpergewichtsregulation am Beispiel der SMA1-Maus. Sind SMA1-Mäuse „nur“ kleiner? Welche Erklärungshypothesen gibt es für den Phänotyp? Neben einer allgemeinen morphologischen Beschreibung wurden ausgewählte Stellgrößen des Energiehaushalts von Säugetieren *in-vivo* untersucht (Wärmeproduktion, Körpertemperatur und Assimilation). Teile des für die SMA1-Mauslinie etablierten Phänotypisierungsprogramms wurden nachfolgend für die Untersuchung von David-Mäusen eingesetzt: Handelt es sich bei dieser Mutante um ein Mausmodell für Anorexie? Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen methodischen Erkenntnisse sollten darüber hinaus zur Etablierung und Optimierung stoffwechselphysiologischer Charakterisierungsroutinen beitragen, die im Zusammenhang mit der Untersuchung von (potentiellen) Tiermodellen der Anorexie (Magersucht) und Adipositas (Fettleibigkeit) stehen.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zeichnen sich SMA1-Mäuse durch semidominanten Zwergwuchs aus. Im adulten Zustand (3 Monate) sind heterozygote SMA1-Mäuse ca. 18-20 g schwer und homozygote ca. 12-14 g; dies ist auf die Reduktion (heterozygot SMA1) bzw. das völlige Ausbleiben (homozygot SMA1) des (GH-induzierten) peripubertalen Wachstumsschubs zurückzuführen. SMA1-Mäuse werden spätestens im Alter von 5 Monaten fettleibig, so dass einzelne Tiere einen prozentualen Körperfettgehalt von bis zu 45% zeigen können. Absolut gesehen besitzen die Mutanten dann (fast) die gleiche Menge Fett in einem kleineren Körper (ca. 5-6 g). Die Adipositas betrifft alle untersuchten Fettdepots, und die Leptin-Spiegel korrelieren mit dem Körperfett. In Übereinstimmung mit der verringerten Körperlänge und -masse ist die fettfreie Masse bei SMA1-Mäusen reduziert. Die Mäuse sind im Alter von 3 Monaten trotz verschiedener

Körperzusammensetzung nicht hyperphag und zeigen proportional mit dem Körpergewicht verringerte Ruhestoffwechselraten.

Im Alter von 5 Monaten lässt sich eine nicht-proportional mit dem Körpergewicht einhergehende Reduktion im Energieverbrauch von SMA1-Mutanten nachweisen, auch die tägliche Spontanaktivität ist überproportional verringert. In der Energiebilanz 5 Monate alter Tiere sind darüber hinaus bei homozygoten SMA1-Mäusen der RQ und die Futteraufnahme erhöht. Auch die Körpertemperatur ist bei homozygoten um ca. 0.9°C, bei heterozygoten SMA1-Mäusen um ca. 0.4°C reduziert. Diese Faktoren könnten dazu beitragen, dass beim homozygoten Genotyp eine positive Energiebilanz mit nachfolgender Adipositas resultiert. Auf der anderen Seite haben SMA1-Mäuse thermoregulatorische Nachteile aufgrund ihrer geringeren Körpergröße, die sich in Kälte in einer relativ höheren Steigerung der Stoffwechselraten, erhöhten Wärmedurchgangszahlen und einer höheren Lage der Thermoneutralzone ausdrückt. Die UCP-1-Expression im braunen Fett ist allerdings unbeeinflusst.

Die Hypophysen von SMA1-Mäusen zeigen eine nicht-proportionale Hypotrophie des Vorderlappens und reduzierten GH-Gehalt. Die Plasma GH-Spiegel liegen bei heterozygoten und homozygoten SMA1-Mäusen unterhalb der Nachweisgrenze, dagegen sind die IGF-1-Spiegel reduziert und korrelieren mit der Körperlänge. Die Ghrelin-Spiegel im Plasma sind leicht (heterozygot SMA1) bis signifikant erhöht (homozygot SMA1), im Einklang mit einer erhöhten Stimulation der hypophysären GH-Freisetzung. Möglicherweise handelt es sich beim SMA1-Protein um ein dominant negatives GH, dass die Sekretion von GH aus den somatotrophen Zellen der Hypophyse stört und nachfolgend zu einer Degradation der Somatotrophen führt. Die SMA1-Maus könnte ein attraktives Tiermodell für weiterführende Untersuchungen zu Themengebieten wie z.B. Altern, der Speicherung und Sekretion von Peptidhormonen sowie der Rolle von Ghrelin bei Wachstum und Körpergewichtsregulation darstellen.

Bei der metabolischen Analyse von verschiedenen schweren Tieren (z.B. Mutante versus Wildtyp) ist die Allometrie physiologischer Vorgänge zu berücksichtigen. Ignoriert man die spezifischen Abhängigkeiten von der Körpermasse, können Fehleinschätzungen des metabolischen Phänotyps resultieren. Tatsächlich beruhte die für David-Mäuse postulierte Anorexie auf einem derartigen Fehlschluss. Nach den vorliegenden Untersuchungen führt der Gendefekt bei David-Mutanten zu proportionalem Zwergwuchs. Es ergibt sich kein Hinweis auf eine negative Energiebilanz.

Auf Basis der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen lassen sich folgende Empfehlungen für die Durchführung und Bewertung stoffwechselphysiologischer Charakterisierungsprogramme ableiten:

1. Physiologische (und damit potentiell allometrische) Zielgrößen sollten grundsätzlich in Relation zur Körpermasse und ergänzend zur fettfreien Masse analysiert werden. So lassen sich Abweichungen von der Proportionalität feststellen und quantifizieren, die beim alleinigen Vergleich von Gruppenmittelwerten u. U. nicht zu detektieren sind.
2. Ruhestoffwechselraten sollten an denselben Individuen sowohl in Thermoneutralität (BMR) als auch in Kälte bestimmt werden.
3. Die Angabe von gewichtsspezifischen Stoffwechselraten kann zu Fehlschlüssen führen, wenn ein Massenexponent zugrunde gelegt wird, der den Zusammenhang mit der Masse nicht korrekt beschreibt (z.B. $BM^{0.75}$ statt $BM^{1.0}$ etc. oder FFM^b). Für die Wahl des „richtigen“ Exponenten [b] sollte daher zuvor eine allometrische Darstellung (Regressionsanalyse) der Daten gewählt werden.
4. Prozentangaben sind zwar grundsätzlich als beschreibende Angaben zulässig, sollten aber für eine vergleichende Bewertung z.B. bei Gruppen mit verschiedenen schweren Phänotypen nicht universell Verwendung finden. Auch hier empfiehlt sich zunächst eine Regressionsanalyse, um biologische Fehlinterpretationen im Hinblick auf den Phänotyp zu vermeiden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ABDEL-MEGUID, S. S., H. S. SHIEH, W. W. SMITH, H. E. DAYRINGER, B. N. VIOLAND UND L. A. BENTLE. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84:6434-6437.
- ALESSANDRINI, F., T. JAKOB, A. WOLF, E. WOLF, R. BALLING, M. HRABE DE ANGELIS, J. RING UND H. BEHRENDT. 2001. ENU mouse mutagenesis: generation of mouse mutants with aberrant plasma IgE levels. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124:25-28.
- BARSH, G. S. UND M. W. SCHWARTZ. 2002. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat. Rev. Genet.* 3:589-600.
- BARTKE, A., V. CHANDRASHEKAR, D. TURYN, R. W. STEGER, L. DEBELJUK, T. A. WINTERS, J. A. MATTISON, N. A. DANILOVICH, W. CROSON, D. R. WERNING UND J. J. KOPCHICK. 1999. Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:113-123.
- BERELOWITZ, M., M. SZABO, L. A. FROHMAN, S. FIRESTONE, L. CHU UND R. L. HINTZ. 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212:1279-1281.
- BERRYMAN, D. E., E. O. LIST, K. T. COSCHIGANO, K. BEHAR, J. K. KIM UND J. J. KOPCHICK. 2004. Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling. *Growth Horm. IGF. Res.* 14:309-318.
- BINDER, G. 2002. Isolated Growth Hormone Deficiency and the GH-1 Gene: Update 2002. *Horm. Res.* 58 Suppl 3:2-6.
- BINDER, G., E. KELLER, M. MIX, G. G. MASSA, W. H. STOKVIS-BRANTSMA, J. M. WIT UND M. B. RANKE. 2001. Isolated GH deficiency with dominant inheritance: new mutations, new insights. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86:3877-3881.
- BONNET F, M. VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX, R. EACKELS UND P. MALVAUX. 1974. Subcutaneous adipose tissue and lipids in blood in growth hormone deficiency before and after treatment with human growth hormone. *Pediatr. Res* 8:800-805.
- BORRELLI, E., R. A. HEYMAN, C. ARIAS, P. E. SAWCHENKO UND R. M. EVANS. 1989. Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 339:538-541.
- BRAECKMAN, B. P., K. HOUTHOOFD UND J. R. VANFLETEREN. 2002. Assessing metabolic activity in aging *Caenorhabditis elegans*: concepts and controversies. *Aging Cell* 1:82-88.
- BRODY, T. 1994. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press, San Diego.

- BROWN, S. D. UND J. PETERS. 1996. Combining mutagenesis and genomics in the mouse-closing the phenotype gap. *Trends. Genet.* 12:433-435.
- BRESLOW, M. J., K. MIN-LEE, D. R. BROWN, V. P. CHACKO, D. PALMER, UND D. E. BERKOWITZ. 1999. Effect of leptin deficiency on metabolic rate in ob/ob mice. *Am. J. Physiol.* 276:E443-E449.
- BULLOCK, P., B. GEMZIK, D. JOHNSON, P. THOMAS UND A. PARKINSON. 1991. Evidence from dwarf rats that growth hormone may not regulate the sexual differentiation of liver cytochrome P450 enzymes and steroid 5 alpha-reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:5227-5231.
- BULTMAN, S. J., E. J. MICHAUD UND R. P. WOYCHIK. 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell.* 71:1195-1204.
- BUTLER, A. UND D. LE ROITH. 2001. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol* 63:141-164.
- CAMINOS, J. E., L. M. SEOANE, S. A. TOVAR, F. F. CASANUEVA, UND C. DIEGUEZ. 2002. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* 147:159-163.
- CANNON, B. UND J. NEDERGAARD. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84:277-359.
- CARAKUSHANSKY, M., A. J. WHATMORE, P. E. CLAYTON, S. M. SHALET, H. K. GLEESON, D. A. PRICE, M. A. LEVINE UND R. SALVATORI. 2003. A new missense mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor gene in familial isolated GH deficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 148:25-30.
- CHARLTON, H. M., R. G. CLARK, I. C. ROBINSON, A. E. GOFF, B. S. COX, C. BUGNON UND B. A. BLOCH. 1988. Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J. Endocrinol.* 119:51-58.
- CHEN, W. Y., M. E. WHITE, T. E. WAGNER UND J. J. KOPCHICK. 1991. Functional antagonism between endogenous mouse growth hormone (GH) and a GH analog results in dwarf transgenic mice. *Endocrinology.* 129:1402-1408.
- CHENG, T. C., W. G. BEAMER, J. A. PHILLIPS, III, A. BARTKE, R. L. MALLONEE UND C. DOWLING. 1983. Etiology of growth hormone deficiency in little, Ames und Snell dwarf mice. *Endocrinology* 113:1669-1678.
- CHOMCZYNSKI, P. UND N. SACCHI. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

- CLAPHAM, J. C., J. R. ARCH, H. CHAPMAN, A. HAYNES, C. LISTER, G. B. MOORE, V. PIERCY, S. A. CARTER, I. LEHNER, S. A. SMITH, L. J. BEELEY, R. J. GODDEN, N. HERRITY, M. SKEHEL, K. K. CHANGANI, P. D. HOCKINGS, D. G. REID, S. M. SQUIRES, J. HATCHER, B. TRAIL, J. LATCHAM, S. RASTAN, A. J. HARPER, S. CADENAS, J. A. BUCKINGHAM, M. D. BRAND UND A. ABUIN. 2000. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature* 406:415-418.
- COGAN, J. D., J. A. PHILLIPS, III, S. S. SCHENKMAN, R. D. MILNER UND N. SAKATI. 1994. Familial growth hormone deficiency: a model of dominant and recessive mutations affecting a monomeric protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 79:1261-1265.
- COLEMAN, D. L. 1978. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 14:141-148.
- CUMMINGS, D. E., K. CLEMENT, J. Q. PURNELL, C. VAISSE, K. E. FOSTER, R. S. FRAYO, M. W. SCHWARTZ, A. BASDEVANT, UND D. S. WEIGLE. 2002. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat. Med.* 8:643-644.
- CUNNINGHAM, B. C., M. G. MULKERRIN UND J. A. WELLS. 1991A. Dimerization of human growth hormone by zinc. *Science* 253:545-548.
- CUNNINGHAM, B. C., M. ULTSCH, A. M. DE VOS, M. G. MULKERRIN, K. R. CLAUSER UND J. A. WELLS. 1991B. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825.
- CUNNINGHAM, B. C. UND J. A. WELLS. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine- scanning mutagenesis. *Science* 244:1081-1085.
- DAAN, S., D. MASMAN UND A. GROENEWOLD. 1990. Avian basal metabolic rates: their association with body composition and energy expenditure in nature. *Am. J. Physiol.* 259:R333-R340.
- DE VOS, A. M., M. ULTSCH UND A. A. KOSSIAKOFF. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312.
- DINULESCU, D. M., W. FAN, B. A. BOSTON, K. MCCALL, M. L. LAMOREUX, K. J. MOORE, J. MONTAGNO UND R. D. CONE. 1998. Mahogany (mg) stimulates feeding and increases basal metabolic rate independent of its suppression of agouti. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:12707-12712.
- DONAHUE, L. R. UND W. G. BEAMER. 1993. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and

- insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *J. Endocrinol.* 136:91-104.
- DRENT, R. H. UND S. DAAN. 1980. The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea* 68:225-252.
- DROZDZ, A. UND J. WEINER. 1975. Some Bioenergetic Parameters of Wild Ruminants. *Pol. ecol. Stud.* 1:85-101.
- EDEN, S. 1979. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105:555-560.
- EICHER, E. M. UND W. G. BEAMER. 1976. Inherited ateliotic dwarfism in mice. Characteristics of the mutation, little, on chromosome 6. *J. Hered.* 67:87-91.
- ERICKSON, J. C., G. HOLLOPETER UND R. D. PALMITER. 1996. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science.* 274:1704-1707.
- FAVOR, J. 1983. A comparison of the dominant cataract and recessive specific-locus mutation rates induced by treatment of male mice with ethylnitrosourea. *Mutat. Res.* 110:367-382.
- FIELD, J., H. S. BELDING UND A. W. MARTIN. 1939. An analysis of the relation between basal metabolism and summated tissue respiration in the rat. 1. The post-pubertal albino rat. *J. Cell. Comp. Physiol.* 14:143-157.
- FINKELSTEIN, J. W., H. P. ROFFWARG, R. M. BOYAR, J. KREAM UND L. HELLMAN. 1972. Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 35:665-670.
- FINLAYSON, J. S., M. POTTER UND C. R. RUNNER. 1963. Electrophoretic variation and sex dimorphism of the major urinary protein complex in inbred mice: a new genetic marker. *J. Natl. Cancer Inst.* 31:91-107.
- FLINT, D. J. UND M. J. GARDNER. 1993. Influence of growth hormone deficiency on growth and body composition in rats: site-specific effects upon adipose tissue development. *J. Endocrinol.* 137:203-211.
- FROHMAN, M. A., T. R. DOWNS, P. CHOMCZYNSKI UND L. A. FROHMAN. 1989. Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient lit/lit mouse. *Mol. Endocrinol.* 3:1529-1536.
- FRIEDMAN, J. M. UND J. L. HALAAS. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395:763-770.
- FUCHS, H., K. SCHUGHART, E. WOLF, R. BALLING UND M. HRABE DE ANGELIS. 2000. Screening for dysmorphological abnormalities--a powerful tool to isolate new mouse mutants. *Mamm. Genome* 11:528-530.

- GATFORD, K. L., A. R. EGAN, I. J. CLARKE UND P. C. OWENS. 1998. Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. *J. Endocrinol.* 157:373-389.
- GILLOOLY, J. F., J. H. BROWN, G. B. WEST, V. M. SAVAGE UND E. L. CHARNOV. 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science* 293:2248-2251.
- GRAW, J., M. JUNG, J. LOSTER, N. KLOPP, D. SOEWARTO, C. FELLA, H. FUCHS, A. REIS, E. WOLF, R. BALLING UND M. HRABE DE ANGELIS. 1999. Mutation in the betaA3/A1-crystallin encoding gene *cryba1* causes a dominant cataract in the mouse. *Genomics* 62:67-73.
- GUNTER, C. UND R. DHAND. 2002. Human biology by proxy. *Nature* 420:509.
- HAQQ, A. M., I. S. FAROOQI, S. O'RAHILLY, D. D. STADLER, R. G. ROSENFELD, K. L. PRATT, S. H. LAFRANCHI, UND J. Q. PURNELL. 2003. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin. Endocrinol. Metab* 88:174-178.
- HART, J. S. 1960. Energy metabolism during exposure to cold. *Fed Proc* 19:15-19.
- HAUCK, S. J., W. S. HUNTER, N. DANILOVICH, J. J. KOPCHICK UND A. BARTKE. 2001. Reduced levels of thyroid hormones, insulin und glucose, and lower body core temperature in the growth hormone receptor/binding protein knockout mouse. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 226:552-558.
- HAYASHI, Y., M. YAMAMOTO, S. OHMORI, T. KAMIJO, M. OGAWA UND H. SEO. 1999. Inhibition of growth hormone (GH) secretion by a mutant GH-I gene product in neuroendocrine cells containing secretory granules: an implication for isolated GH deficiency inherited in an autosomal dominant manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84:2134-2139.
- HAYSEN, V. UND R. C. LACY. 1985. Basal metabolic rates in mammals: taxonomic differences in the allometry of BMR and body mass. *Comp. Biochem. Physiol. A* 81:741-754.
- HELDMAIER, G. 1975. Metabolic and thermoregulatory responses to heat and cold in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J. Comp. Physiol.* 102:115-122.
- HELDMAIER, G. UND A. BUCHBERGER. 1985. Sources of heat during nonshivering thermogenesis in Djungarian hamsters: a dominant role of brown adipose tissue during cold adaptation. *J. Comp. Physiol [B]* 156:237-245.
- HELDMAIER, G. UND G. NEUWEILER. 2004. Vergleichende Tierphysiologie, Band II: Vegetative Physiologie. Springer Verlag, Heidelberg.

- HELDMAIER, G. UND S. STEINLECHNER. 1981. Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. *J. Comp. Physiol.* 142:429-437.
- HEUSNER, A. A. 1982. Energy metabolism and body size. I. Is the 0.75 mass exponent of Kleiber's equation a statistical artifact? *Respir. Physiol.* 48:1-12.
- HIMMS-HAGEN, J. 1997. On raising energy expenditure in ob/ob mice. *Science.* 276:1132-1133.
- HIMMS-HAGEN, J. UND C. VILLEMURE. 1992. Number of mice per cage influences uncoupling protein content of brown adipose tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200:502-506.
- HITOTSUMACHI, S., D. A. CARPENTER UND W. L. RUSSELL. 1985. Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82:6619-6621.
- HRABE DE ANGELIS, M. UND R. BALLING. 1998. Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat. Res.* 400:25-32.
- HRABE DE ANGELIS, M. H., H. FLASWINKEL, H. FUCHS, B. RATHKOLB, D. SOEWARTO, S. MARSCHALL, S. HEFFNER, W. PARGENT, K. WUENSCH, M. JUNG, A. REIS, T. RICHTER, F. ALESSANDRINI, T. JAKOB, E. FUCHS, H. KOLB, E. KREMMER, K. SCHAEBLE, B. ROLLINSKI, A. ROSCHER, C. PETERS, T. MEITINGER, T. STROM, T. STECKLER, F. HOLSBOER, T. KLOPSTOCK, F. GEKELER, C. SCHINDEWOLF, T. JUNG, K. AVRAHAM, H. BEHRENDT, J. RING, A. ZIMMER, K. SCHUGHART, K. PFEFFER, E. WOLF UND R. BALLING. 2000. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat. Genet.* 25:444-447.
- HULBERT, A. J. UND P. L. ELSE. 2000. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu. Rev. Physiol.* 2000:62:207-35.
- HULL, K. L. UND S. HARVEY. 1999. Growth hormone resistance: clinical states and animal models. *J. Endocrinol.* 163:165-172.
- HUNTER, W. S., W. B. CROSON, A. BARTKE, M. V. GENTRY UND C. J. MELISKA. 1999. Low body temperature in long-lived Ames dwarf mice at rest and during stress. *Physiol. Behav.* 67:433-437.
- HURLEY, D. L., B. E. WEE UND C. J. PHELPS. 1998. Growth hormone releasing hormone expression during postnatal development in growth hormone-deficient Ames dwarf mice: mRNA in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 68:201-209.
- HURST, J. L., C. E. PAYNE, C. M. NEVISON, A. D. MARIE, R. E. HUMPHRIES, D. H. ROBERTSON, A. CAVAGGIONI UND R. J. BEYNON. 2001. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414:631-634.

- HUSZAR, D., C. A. LYNCH, V. FAIRCHILD-HUNTRESS, J. H. DUNMORE, Q. FANG, L. R. BERKEMEIER, W. GU, R. A. KESTERSON, B. A. BOSTON, R. D. CONE, F. J. SMITH, L. A. CAMPFIELD, P. BURN UND F. LEE. 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 88:131-141.
- INUI, A., A. ASAKAWA, C. Y. BOWERS, G. MANTOVANI, A. LAVIANO, M. M. MEGUID UND M. FUJIMIYA. 2004. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 18:439-456.
- ISAKSSON, O. G., J. O. JANSSON UND I. A. GAUSE. 1982. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216:1237-1239.
- ISAKSSON, O. G., A. LINDAHL, A. NILSSON UND J. ISGAARD. 1987. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr. Rev.* 8:426-438.
- JENNINGS, G., D. RICHARD, UND P. TRAYHURN. 1986. Effect of caging singly or in groups of different sizes on the thermogenic activity of interscapular brown adipose tissue in mice. *Comp. Biochem. Physiol. A* 85:583-586.
- KAMEGAI, J., I. WAKABAYASHI, K. MIYAMOTO, T. G. UNTERMAN, R. D. KINEMAN UND L. A. FROHMAN. 1998. Growth hormone-dependent regulation of pituitary GH secretagogue receptor (GHS-R) mRNA levels in the spontaneous dwarf Rat. *Neuroendocrinology* 68:312-318.
- KLAUS, S. 2004. Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr. Drug Targets.* 5:241-250.
- KLAUS, S., H. MÜNZBERG, C. TRÜLOFF UND G. HELDMAIER. 1998. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am. J. Physiol.* 274:R287-93.
- KLEIBER, M. 1961. *The fire of life*. John Wiley and Sons Inc., New York; London.
- KLINGENSPOR, M., H. NIGGEMANN, UND G. HELDMAIER. 2000. Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J. Comp. Physiol. [B]* 170:37-43.
- KLINGENSPOR, M. 2003. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp. Physiol.* 88:141-148.
- KOJIMA, M., H. HOSODA, Y. DATE, M. NAKAZATO, H. MATSUO UND K. KANGAWA. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
- KONARZEWSKI, M. UND J. DIAMOND. 1995. Evolution of basal metabolic rate and organ masses in laboratory mice. *Evolution* 49:1239-1248.

- KOPCHICK, J. J. UND J. M. ANDRY. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* 71:293-314.
- KOPCHICK, J. J., C. PARKINSON, E. C. STEVENS UND P. J. TRAINER. 2002. Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocr. Rev.* 23:623-646.
- KOWARSKI, A. A., J. SCHNEIDER, E. BEN GALIM, V. V. WELDON UND W. H. DAUGHADAY. 1978. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47:461-464.
- KREBS, H. A. Body size and tissue respiration. 1950. *Biochim. Biophys. Acta* 4:249-269.
- LAEMMLI, U. K., F. BEGUIN UND G. GUJER-KELLENBERGER. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* 47:69-85.
- LAFRANCHI, S., C. E. HANNA, T. TORRESANI, E. SCHOENLE UND R. ILLIG. 1985. Comparison of growth hormone binding and metabolic response in rat adipocytes of epididymal, subcutaneous, and retroperitoneal origin. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 110:50-55.
- LARON, Z. 2002. Growth hormone insensitivity (Laron syndrome). *Rev. Endocr. Metab Disord.* 3:347-355.
- LARON, Z., A. PERTZELAN UND S. MANNHEIMER. 1966. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? *Isr. J. Med. Sci.* 2:152-155.
- LAWRENCE, C. B., A. C. SNAPE, F. M. BAUDOIN UND S. M. LUCKMAN. 2002. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143:155-162.
- LE ROITH, D., L. SCAVO UND A. BUTLER. 2001. What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol. Metab.* 12:48-52.
- LEE, M. S., M. P. WAJNRAJCH, S. S. KIM, L. P. PLOTNICK, J. WANG, J. M. GERTNER, R. L. LEIBEL UND P. S. DANNIES. 2000. Autosomal dominant growth hormone (GH) deficiency type II: the Del32-71-GH deletion mutant suppresses secretion of wild-type GH. *Endocrinology* 141:883-890.
- LI, Y., J. R. KNAPP UND J. J. KOPCHICK. 2003. Enlargement of interscapular brown adipose tissue in growth hormone antagonist transgenic and in growth hormone receptor gene-disrupted dwarf mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 228:207-215.
- LINDSTEDT, S. L. UND SCHAEFFER, P. J. 2002. Use of allometry in predicting anatomical and physiological parameters of mammals. *Lab. Anim.* 36:1-19

- LIU, J. L., S. YAKAR UND D. LEROITH. 2000. Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223:344-351.
- LYON, M. F. UND A. G. SEARLE. 1989. *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. Oxford University Press, Oxford.
- MAFFEI, M., J. HALAAS, E. RAVUSSIN, R. E. PRATLEY, G. H. LEE, Y. ZHANG, H. FEI, S. KIM, R. LALLONE, S. RANGANATHAN, P. A. KERN UND J. M. FRIEDMAN. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1:1155-1161.
- MCGUINNESS, L., C. MAGOULAS, A. K. SESAY, K. MATHERS, D. CARMIGNAC, J. B. MANNEVILLE, H. CHRISTIAN, J. A. PHILLIPS, III UND I. C. ROBINSON. 2003. Autosomal dominant growth hormone deficiency disrupts secretory vesicles in vitro and in vivo in transgenic mice. *Endocrinology* 144:720-731.
- MCMAHON, T. 1973. Size and shape in biology. *Science* 179:1201-1204.
- MCNIVEN, M. A. 1984. The effect of body fatness on energetic efficiency and fasting heat production in adult sheep. *Br. J. Nutr.* 51:297-304.
- MEERLO, P., L. BOLLE, G. H. VISSER, D. MASMAN UND S. DAAN. 1997. Basal metabolic rate in relation to body composition and daily energy expenditure in the field vole, *Microtus agrestis*. *Physiol. Zool.* 70:362-369.
- MEYER, C. W., D. KORTHAUS, W. JAGLA, E. CORNALI, J. GROSSE, H. FUCHS, M. KLINGENSPOR, S. ROEMHELD, M. TSCHÖP, G. HELDMAIER, M. H. DE ANGELIS UND M. NEHLS. 2004. A novel missense mutation in the mouse growth hormone gene causes semidominant dwarfism, hyperghrelinemia, and obesity. *Endocrinology* 145:2531-2541.
- MIZOBUCHI, M., M. A. FROHMAN, T. R. DOWNS UND L. A. FROHMAN. 1991. Tissue-specific transcription initiation and effects of growth hormone (GH) deficiency on the regulation of mouse and rat GH-releasing hormone gene in hypothalamus and placenta. *Mol. Endocrinol.* 5:476-484.
- MORIKAWA, M., T. NIXON UND H. GREEN. 1982. Growth hormone and the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell* 29:783-789.
- NAKAZATO, M., N. MURAKAMI, Y. DATE, M. KOJIMA, H. MATSUO, K. KANGAWA UND S. MATSUKURA. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
- NAGLE, D. L., S. H. MCGRAIL, J. VITALE, E. A. WOOLF, B. J. DUSSAULT, JR., L. DIROCCO, L. HOLMGREN, J. MONTAGNO, P. BORK, D. HUSZAR, V. FAIRCHILD-HUNTRESS, P. GE, J. KEILTY, C. EBELING, L. BALDINI, J. GILCHRIST, P. BURN, G. A. CARLSON,

- UND K. J. MOORE. 1999. The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity. *Nature*. 398:148-152.
- NAM, S. Y. UND C. MARCUS. 2000. Growth hormone and adipocyte function in obesity. *Horm. Res.* 53 Suppl 1:87-97.
- NASS, R., J. LIU, P. HELLMANN, K. T. COSCHIGANO, B. GAYLINN, D. E. BERRYMAN, J. J. KOPCHICK UND M. O. THORNER. 2004. Chronic changes in peripheral growth hormone levels do not affect ghrelin stomach mRNA expression and serum ghrelin levels in three transgenic mouse models. *J. Neuroendocrinol.* 16:669-675.
- NORSTEDT, G. 1982. A comparison between the effects of growth hormone on prolactin receptors and estrogen receptors in rat liver. *Endocrinology* 110:2107-2112.
- NORSTEDT, G. UND R. PALMITER. 1984. Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell* 36:805-812.
- NOVEROSKE, J. K., J. S. WEBER UND M. J. JUSTICE. 2000. The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm. Genome* 11:478-483.
- O'RAHILLY, S., I. S. FAROOQI, G. S. YEO UND B. G. CHALLIS. 2003. Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology* 144:3757-3764.
- OKUMA, S. UND S. KAWASHIMA. 1980. Spontaneous dwarf rat. *Exp. Anim.* 29:301.
- PACKARD, G. C. UND A. M. BODE. 1999. The use of percentages and size-specific indices to normalize physiological data for variation in body size: wasted time, wasted effort? *Comp. Biochem. Physiol. A* 122:37-44.
- PELLEYMOUNTER, M. A., M. J. CULLEN, M. B. BAKER, R. HECHT, D. WINTERS, T. BOONE UND F. COLLINS. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543.
- PIWIEN-PILIPUK, G., J. S. HUO UND J. SCHWARTZ. 2002. Growth hormone signal transduction. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15:771-786.
- POEHLMAN, E. T. UND M. J. TOTH. 1995. Mathematical ratios lead to spurious conclusions regarding age- and sex-related differences in resting metabolic rate. *Am. J Clin. Nutr.* 61:482-485.
- PROCTER, A. M., J. A. PHILLIPS, III UND D. N. COOPER. 1998. The molecular genetics of growth hormone deficiency. *Hum. Genet.* 103:255-272.
- RICKLEFS, R. E., M. KONARZEWSKI UND S. DAAN. 1996. The relationship between basal metabolic rate and daily energy expenditure in birds and mammals. *Am. Nat* 147 (6):1047-1071.
- RINCHIK, E. M. 1991. Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends. Genet.* 7:15-21.

- ROLFE, D. F. S. UND G. C. BROWN. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77(3):731-758.
- RUBNER, M. 1883. Über den Einfluss der Körpergröße auf Stoff und Kraftwechsel. *Z. Biol.* 19:535-562.
- RUF, T. 1991. Torpor beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) und der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*): Saisonalität, Tagesperiodik, Energetik. Dissertation am FB Biologie Philipps-Universität Marburg.
- RUF, T. UND G. HELDMAIER. 1987. Computerized body temperature telemetry in small animals: use of simple equipment and advanced noise suppression. *Comput. Biol Med.* 17:331-340.
- RUSSELL, W. L., P. R. HUNSICKER, G. D. RAYMER, M. H. STEELE, K. F. STELZNER UND H. M. THOMPSON. 1982. Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:3589-3591.
- RUSSELL, W. L., E. M. KELLY, P. R. HUNSICKER, J. W. BANGHAM, S. C. MADDUX UND E. L. PHIPPS. 1979. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5818-5819.
- RYTHER, R. C., L. M. MCGUINNESS, J. A. PHILLIPS, III, C. T. MOSELEY, C. B. MAGOULAS, I. C. ROBINSON UND J. G. PATTON. 2003. Disruption of exon definition produces a dominant-negative growth hormone isoform that causes somatotroph death and IGHD II. *Hum. Genet.* 113:140-148.
- SAHU, A. 2004. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 145:2613-2620.
- SALMON, W. D., JR. UND W. H. DAUGHADAY. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 49:825-836.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1985. *Scaling: why is animal size so important?* Oxford University Press.
- SCHOENLE, E., J. ZAPF, R. E. HUMBEL UND E. R. FROESCH. 1982. Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* 296:252-253.
- SCHOLANDER, P. F., R. HOCK, V. WALTERS UND L. IRVING. 1950. Adaptation to cold in arctic and tropical mammals and birds in relation to body temperature insulation and basal metabolic rate. *Biol. Bull.* 99:259-271.
- SCHONHOLZ, D. H. 1949. Temperature studies in dwarf mice. *Anat. Rec.* 105:605.
- SCHWARTZ, J. 2001. Editorial: pulsatile hormone patterns governing transcription factor function. *Physiology of episodic GH secretion. Endocrinology* 142:4595-4598.

- SCOTT, I., MITCHELL P.I. UND EVANS P.R. 1996. How does the variation in body composition affect the basal metabolic rate of birds? *Funct. Ecol.* 10:307-313.
- SELMAN, C., T. K. KORHONEN, L. BUNGER, W. G. HILL UND J. R. SPEAKMAN. 2001. Thermoregulatory responses of two mouse *Mus musculus* strains selectively bred for high and low food intake. *J. Comp. Physiol. [B]* 171:661-668.
- SHADID, S. UND M. D. JENSEN. 2003. Effects of growth hormone administration in human obesity. *Obes. Res.* 11:170-175.
- SHAPIRO, B. H., J. N. MACLEOD, N. A. PAMPORI, J. J. MORRISSEY, D. P. LAPENSON UND D. J. WAXMAN. 1989. Signalling elements in the ultradian rhythm of circulating growth hormone regulating expression of sex-dependent forms of hepatic cytochrome P450. *Endocrinology* 125:2935-2944.
- SILVER L.M. 1995. *Mouse Genetics. Concepts and Applications.* Oxford University Press.
- SJOGREN, K., J. L. LIU, K. BLAD, S. SKRTIC, O. VIDAL, V. WALLENIUS, D. LEROITH, J. TORNELL, O. G. ISAKSSON, J. O. JANSSON UND C. OHLSSON. 1999. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:7088-7092.
- SMITH, R. J. 1984. Allometric scaling in comparative biology: problems of concept and method. *Am. J. Physiol.* 246:R152-R160.
- SNYDER, E. E., B. WALTZ, L. PERUSSE, Y. C. CHAGNON, S. J. WEISNAGEL, T. RANKINEN UND C. BOUCHARD. 2004. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes. Res.* 12:369-439.
- SOEWARTO, D., C. FELLA, A. TEUBNER, B. RATHKOLB, W. PARGENT, S. HEFFNER, S. MARSCHALL, E. WOLF, R. BALLING UND M. HRABE DE ANGELIS. 2000. The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm. Genome* 11:507-510.
- SPEAKMAN, J. R., T. ERGON, R. CAVANAGH, K. REID, D. M. SCANTLEBURY UND X. LAMBIN. 2003A. Resting and daily energy expenditures of free-living field voles are positively correlated but reflect extrinsic rather than intrinsic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100:14057-14062.
- SPEAKMAN, J. R., A. VAN ACKER UND E. J. HARPER. 2003B. Age-related changes in the metabolism and body composition of three dog breeds and their relationship to life expectancy. *Aging Cell* 2:265-275.
- TAKAHASHI, Y., H. SHIRONO, O. ARISAKA, K. TAKAHASHI, T. YAGI, J. KOGA, H. KAJI, Y. OKIMURA, H. ABE, T. TANAKA UND K. CHIHARA. 1997. Biologically inactive growth hormone caused by an amino acid substitution. *J. Clin. Invest.* 100:1159-1165.

- TAKEUCHI, T., H. SUZUKI, S. SAKURAI, H. NOGAMI, S. OKUMA UND H. ISHIKAWA. 1990. Molecular mechanism of growth hormone (GH) deficiency in the spontaneous dwarf rat: detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinology* 126:31-38.
- TANNENBAUM, G. S. 1991. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 372:5-16.
- TANNENBAUM, G. S., H. K. CHOI, W. GURD UND D. J. WAXMAN. 2001. Temporal relationship between the sexually dimorphic spontaneous GH secretory profiles and hepatic STAT5 activity. *Endocrinology* 142:4599-4606.
- TANNENBAUM, G. S., H. J. GUYDA UND B. I. POSNER. 1983. Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 220:77-79.
- TANNENBAUM, G. S. UND J. B. MARTIN. 1976. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98:562-570.
- TANNER, J. M. 1949. Fallacy of per-weight and per-surface area standards, and their relation to spurious correlation. *J. Appl. Physiol.* 2:1-15.
- TARTAGLIA, L. A., M. DEMBSKI, X. WENG, N. DENG, J. CULPEPPER, R. DEVOS, G. J. RICHARDS, L. A. CAMPFIELD, F. T. CLARK UND J. DEEDS. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271.
- THE COMMISSION FOR THERMAL PHYSIOLOGY OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES (IUPS THERMAL COMMISSION). 1987. Glossary of terms for thermal physiology. Second edition. *Pflugers Arch.* 410:567-587.
- TSCHÖP, M., D. L. SMILEY UND M. L. HEIMAN. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
- UDY, G. B., R. P. TOWERS, R. G. SNELL, R. J. WILKINS, S. H. PARK, P. A. RAM, D. J. WAXMAN UND H. W. DAVEY. 1997. Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:7239-7244.
- VON PRAUN, C., M. BURKERT, M. GESSNER UND M. KLINGENSPOR. 2001. Tissue-specific expression and cold-induced mRNA levels of uncoupling proteins in the Djungarian hamster. *Physiol. Biochem. Zool.* 74:203-211.
- VREUGDE, S., A. ERVEN, C. J. KROS, W. MARCOTTI, H. FUCHS, K. KURIMA, E. R. WILCOX, T. B. FRIEDMAN, A. J. GRIFFITH, R. BALLING, M. HRABE DE ANGELIS, K. B. AVRAHAM UND K. P. STEEL. 2002. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat. Genet.* 30:257-258.

- WAJNRAJCH, M. P., J. M. GERTNER, M. D. HARBISON, S. C. CHUA, JR. UND R. L. LEIBEL. 1996. Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse. *Nat. Genet.* 12:88-90.
- WALLENIUS, K., K. SJOGREN, X. D. PENG, S. PARK, V. WALLENIUS, J. L. LIU, M. UMAERUS, H. WENNBO, O. ISAKSSON, L. FROHMAN, R. KINEMAN, C. OHLSSON UND J. O. JANSSON. 2001. Liver-derived IGF-I regulates GH secretion at the pituitary level in mice. *Endocrinology* 142:4762-4770.
- WALTERS, T. J., K. L. RYAN, L. M. TATE UND P. A. MASON. 2000. Exercise in the heat is limited by a critical internal temperature. *J. Appl. Physiol* 89:799-806.
- WANG, J., J. ZHOU UND C. A. BONDY. 1999. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J.* 13:1985-1990.
- WANG, Z., S. HESHKA, D. GALLAGHER, C. N. BOOZER, D. P. KOTLER UND S. B. HEYMSFIELD. 2000. Resting energy expenditure-fat-free mass relationship: new insights provided by body composition modeling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 279:E539-E545.
- WATERSTON, R. H., K. LINDBLAD-TOH, E. BIRNEY, J. ROGERS, J. F. ABRIL, P. AGARWAL, R. AGARWALA, R. AINSCOUGH, M. ALEXANDERSSON, P. AN, S. E. ANTONARAKIS, J. ATTWOOD, R. BAERTSCH, J. BAILEY, K. BARLOW, S. BECK, E. BERRY, B. BIRREN, T. BLOOM, P. BORK, M. BOTCHERBY, N. BRAY, M. R. BRENT, D. G. BROWN, S. D. BROWN, C. BULT, J. BURTON, J. BUTLER, R. D. CAMPBELL, P. CARNINCI, S. CAWLEY, F. CHIAROMONTE, A. T. CHINWALLA, D. M. CHURCH, M. CLAMP, C. CLEE, F. S. COLLINS, L. L. COOK, R. R. COPLEY, A. COULSON, O. COURONNE, J. CUFF, V. CURWEN, T. CUTTS, M. DALY, R. DAVID, J. DAVIES, K. D. DELEHAUNTY, J. DERI, E. T. DERMITZAKIS, C. DEWEY, N. J. DICKENS, M. DIEKHANS, S. DODGE, I. DUBCHAK, D. M. DUNN, S. R. EDDY, L. ELNITSKI, R. D. EMES, P. ESWARA, E. EYRAS, A. FELSENFELD, G. A. FEWELL, P. FLICEK, K. FOLEY, W. N. FRANKEL, L. A. FULTON, R. S. FULTON, T. S. FUREY, D. GAGE, R. A. GIBBS, G. GLUSMAN, S. GNERRE, N. GOLDMAN, L. GOODSTADT, D. GRAFHAM, T. A. GRAVES, E. D. GREEN, S. GREGORY, R. GUIGO, M. GUYER, R. C. HARDISON, D. HAUSSLER, Y. HAYASHIZAKI, L. W. HILLIER, A. HINRICHS, W. HLAVINA, T. HOLZER, F. HSU, A. HUA, T. HUBBARD, A. HUNT, I. JACKSON, D. B. JAFFE, L. S. JOHNSON, M. JONES, T. A. JONES, A. JOY, M. KAMAL, E. K. KARLSSON, D. KAROLCHIK, A. KASPRZYK, J. KAWAI, E. KEIBLER, C. KELLS, W. J. KENT, A. KIRBY, D. L. KOLBE, I. KORF, R. S. KUCHERLAPATI, E. J. KULBOKAS, D. KULP, T. LANDERS, J. P. LEGER, S. LEONARD,

- I. LETUNIC, R. LEVINE, J. LI, M. LI, C. LLOYD, S. LUCAS, B. MA, D. R. MAGLOTT, E. R. MARDIS, L. MATTHEWS, E. MAUCELI, J. H. MAYER, M. MCCARTHY, W. R. MCCOMBIE, S. MCLAREN, K. MCLAY, J. D. MCPHERSON, J. MELDRIM, B. MEREDITH, J. P. MESIROV, W. MILLER, T. L. MINER, E. MONGIN, K. T. MONTGOMERY, M. MORGAN, R. MOTT, J. C. MULLIKIN, D. M. MUZNY, W. E. NASH, J. O. NELSON, M. N. NHAN, R. NICOL, Z. NING, C. NUSBAUM, M. J. O'CONNOR, Y. OKAZAKI, K. OLIVER, E. OVERTON-LARTY, L. PACHTER, G. PARRA, K. H. PEPIN, J. PETERSON, P. PEVZNER, R. PLUMB, C. S. POHL, A. POLIAKOV, T. C. PONCE, C. P. PONTING, S. POTTER, M. QUAIL, A. REYMOND, B. A. ROE, K. M. ROSKIN, E. M. RUBIN, A. G. RUST, R. SANTOS, V. SAPOJNIKOV, B. SCHULTZ, J. SCHULTZ, M. S. SCHWARTZ, S. SCHWARTZ, C. SCOTT, S. SEAMAN, S. SEARLE, T. SHARPE, A. SHERIDAN, R. SHOWNKEEN, S. SIMS, J. B. SINGER, G. SLATER, A. SMIT, D. R. SMITH, B. SPENCER, A. STABENAU, N. STANGE-THOMANN, C. SUGNET, M. SUYAMA, G. TESLER, J. THOMPSON, D. TORRENTS, E. TREVASKIS, J. TROMP, C. UCLA, A. URETA-VIDAL, J. P. VINSON, A. C. VON NIEDERHAUSERN, C. M. WADE, M. WALL, R. J. WEBER, R. B. WEISS, M. C. WENDL, A. P. WEST, K. WETTERSTRAND, R. WHEELER, S. WHELAN, J. WIERZBOWSKI, D. WILLEY, S. WILLIAMS, R. K. WILSON, E. WINTER, K. C. WORLEY, D. WYMAN, S. YANG, S. P. YANG, E. M. ZDOBNOV, M. C. ZODY UND E. S. LANDER. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- WAXMAN, D. J., N. A. PAMPORI, P. A. RAM, A. K. AGRAWAL UND B. H. SHAPIRO. 1991. Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:6868-6872.
- WEBER, J. S., A. SALINGER UND M. J. JUSTICE. 2000. Optimal N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) doses for inbred mouse strains. *Genesis*. 26:230-233.
- WEIGLE, D. S. 1994. Appetite and the regulation of body composition. *FASEB J* 8:302-310.
- WORTLEY, K. E., K. D. ANDERSON, K. GARCIA, J. D. MURRAY, L. MALINOVA, R. LIU, M. MONCRIEFFE, K. THABET, H. J. COX, G. D. YANCOPOULOS, S. J. WIEGAND UND M. W. SLEEMAN. 2004. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101:8227-8232.
- WREN, A. M., C. J. SMALL, H. L. WARD, K. G. MURPHY, C. L. DAKIN, S. TAHERI, A. R. KENNEDY, G. H. ROBERTS, D. G. MORGAN, M. A. GHATEI UND S. R. BLOOM. 2000.

- The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325-4328.
- YAKAR, S., J. L. LIU, B. STANNARD, A. BUTLER, D. ACCILI, B. SAUER UND D. LEROITH. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96:7324-7329.
- YASUDA, T., T. MASAKI, T. KAKUMA UND H. YOSHIMATSU. 2003. Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* 349:75-78.
- ZHANG, Y., R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONE, L. LEOPOLD UND J. M. FRIEDMAN. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.
- ZHOU, Y., B. C. XU, H. G. MAHESHWARI, L. HE, M. REED, M. LOZYKOWSKI, S. OKADA, L. CATALDO, K. COSCHIGAMO, T. E. WAGNER, G. BAUMANN UND J. J. KOPCHICK. 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13215-13220.
- ZIGMAN, J. M. UND J. K. ELMQUIST. 2003. Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144:3749-3756.

8 ANHANG

Tabelle I: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse (BM [g]) und (A) Kopf-Rumpf-Länge [mm] bzw. (B) Schwanzlänge [mm] von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 8 Wochen (\log_{10} transformierte Daten).

A: Kopf-Rumpf-Länge

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
+/+	25	$y=0.21*BM+1.70$	0.15-0.26	0.72	<0.001
<i>Sma1</i> /+	49	$y=0.17*BM+0.03$	0.12-0.22	0.48	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	20	$y=0.34*BM+1.50$	0.11-0.58	0.34	0.007

B: Schwanzlänge

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
+/+	25	$y=0.17*BM+1.70$	0.01-0.32	0.169	0.042
<i>Sma1</i> /+	49	$y=0.01*BM+1.76$	0.01-0.19	0.194	0.040
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	20	$y=0.194*BM+1.60$	0.00-0.39	0.007	0.052

Tabelle II: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse [g] und dem Gewicht ausgewählten Organe [g] bei WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3-5 Monaten.

	Genotyp	n	Regression	95% CI Steigung (b)	r ²	p
Gehirn	+/+	12	y=0.001*BM+0.423	0.000-0.003	0.262	0.089
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.001*BM+0.404	-0.004-0.005	0.006	0.818
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.002*BM+0.339	-0.001-0.005	0.202	0.193
Hoden	+/+	12	y=0.004*BM+0.104	0.002-0.005	0.688	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.004*BM+0.095	0.001-0.007	0.448	0.017
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.003*BM+0.078	0.001-0.005	0.686	0.003
Milz	+/+	12	y=0.002*BM+0.011	0.002-0.003	0.850	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.001*BM+0.021	0.000-0.002	0.483	0.012
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.001*BM+0.012	0.001-0.002	0.646	0.005
Leber	+/+	12	y=0.038*BM+0.373	0.027-0.048	0.856	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.019*BM+0.396	0.004-0.035	0.429	0.021
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.015*BM+0.347	0.003-0.028	0.522	0.018
Niere	+/+	12	y=0.017*BM+0.042	0.012-0.022	0.851	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.011*BM+0.089	0.006-0.016	0.725	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.012*BM+0.021	0.010-0.014	0.944	<0.001
Herz	+/+	12	y=0.002*BM+0.052	0.002-0.003	0.882	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	12	y=0.001*BM+0.055	-0.001-0.003	0.210	0.134
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	10	y=0.003*BM+0.013	0.002-0.004	0.780	<0.001

Tabelle III: SMA1: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse (BM [g] ohne Gehirn und GI-Trakt) und Körperfett [g], fettfreier Trockenmasse (FFDM [g]) (C) Wasser [g] von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten.

A: Fett

Genotyp	3 Monate					5 Monate				
	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p
+/+	14	y=0.40*BM-5.65	0.28-0.52	0.81	<0.001	12	y=0.52*BM-9.26	0.39-0.66	0.88	<0.001
<i>Sma1</i> /+	12	y=0.65*BM-6.34	0.53-0.78	0.93	<0.001	15	y=0.67*BM-6.27	0.60-0.73	0.98	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.73*BM-4.54	0.66-0.79	0.99	<0.001	11	y=0.75*BM-5.10	0.61-0.89	0.94	<0.001

B: FFDM

Genotyp	3 Monate					5 Monate				
	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p
+/+	14	y=0.19*BM-0.82	0.14-0.25	0.84	<0.001	12	y=0.17*BM-1.90	0.11-0.23	0.78	<0.001
<i>Sma1</i> /+	12	y=0.10*BM-0.95	0.01-0.19	0.40	0.028	15	y=0.12*BM-1.35	0.09-0.15	0.81	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.09*BM-0.90	0.06-0.11	0.89	<0.001	11	y=0.06*BM-1.25	-0.02-0.13	0.17	0.112

C: Wasser

Genotyp	3 Monate					5 Monate				
	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p
+/+	14	y=0.41*BM-4.84	0.30-0.51	0.86	<0.001	12	y=0.31*BM-7.36	0.20-0.42	0.81	<0.001
<i>Sma1</i> /+	12	y=0.25*BM-5.34	0.17-0.32	0.83	<0.001	15	y=0.22*BM-4.92	0.16-0.27	0.60	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.18*BM-3.63	0.14-0.23	0.91	<0.001	11	y=0.20*BM-3.85	-0.07-0.32	0.86	0.005

Tabelle IV: SMA1: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen (A) Körpermasse (Lebendgewicht, BM [g]) und Körperfett [g], sowie (B) Körpermasse (Lebendgewicht, BM [g]) und fettfreier Masse (FFM [g]) von WT- und SMA1-Mäusen im Alter von 3 und 5 Monaten.

A: Fett

Genotyp	3 Monate					5 Monate				
	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
+/+	14	$y=0.38 \cdot BM-6.93$	0.26-0.51	0.78	<0.001	12	$y=0.49 \cdot BM-10.1$	0.32-0.67	0.79	<0.001
<i>Sma1</i> /+	12	$y=0.60 \cdot BM-7.06$	0.48-0.71	0.94	<0.001	15	$y=0.63 \cdot BM-7.27$	0.57-0.70	0.97	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	$y=0.68 \cdot BM-5.46$	0.58-0.72	0.97	<0.001	11	$y=0.70 \cdot BM-6.10$	0.58-0.82	0.95	<0.001

B: FFM

Genotyp	3 Monate					5 Monate				
	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
+/+	14	$y=0.62 \cdot BM+6.93$	0.49-0.74	0.90	<0.001	12	$y=0.51 \cdot BM+10.1$	0.33-0.69	0.80	<0.001
<i>Sma1</i> /+	12	$y=0.40 \cdot BM+7.06$	0.29-0.52	0.87	<0.001	15	$y=0.37 \cdot BM+7.27$	0.30-0.43	0.92	<0.001
<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	$y=0.32 \cdot BM+5.46$	0.23-0.42	0.87	<0.001	11	$y=0.30 \cdot BM+6.10$	0.18-0.43	0.78	<0.001

Tabelle V: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse [g] und dem Gewicht definierter Fettdepots [g] von WT und SMA1-Mäusen im Alter von 3-5 Monaten.

	Genotyp	n	Regression	95% CI Steigung (b)	r ²	p
iWAT	+/+	12	y=0.073*BM-1.371	0.055-0.091	0.895	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.138*BM-1.750	0.091-0.185	0.810	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.147*BM-1.145	0.124-0.171	0.962	<0.001
eWAT	+/+	12	y=0.076*BM-1.600	0.063-0.088	0.947	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.088*BM-1.193	0.068-0.108	0.904	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.062*BM-0.570	0.050-0.073	0.953	<0.001
mWAT	+/+	12	y=0.040*BM-0.612	0.029-0.050	0.872	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.031*BM-0.192	0.025-0.038	0.929	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.030*BM-0.138	0.021-0.040	0.874	<0.001
pWAT	+/+	12	y=0.025*BM-0.520	0.018-0.032	0.870	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.029*BM-0.381	0.022-0.037	0.878	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.023*BM-0.207	0.018-0.028	0.943	<0.001
aWAT	+/+	12	y=0.032*BM-0.657	0.023-0.042	0.850	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.032*BM-0.324	0.019-0.044	0.760	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.040*BM-0.324	0.024-0.055	0.817	<0.001
iBAT	+/+	12	y=0.004*BM-0.045	0.002-0.006	0.733	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	10	y=0.005*BM-0.019	0.003-0.006	0.815	<0.001
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	12	y=0.006*BM-0.017	0.005-0.007	0.968	<0.001

Tabelle VI: Regressionskoeffizienten für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse (BM [g]) und Sauerstoffverbrauch (MR [ml O₂*h⁻¹]) logMR=loga+b*logBM von WT und SMA1-Mäusen bei verschiedenen Außentemperaturen.

T _a	Genotyp	n	log a	95%CI (log a)	p	b	95%CI (log b)	r ²	p
30-32	+/+	12	0.159	-0.249-0.567	0.406	1.003	0.720-1.268	0.862	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	11	0.247	-0.595-1.088	0.524	0.907	0.239-1.575	0.647	0.013
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.522	0.074-0.970	0.009	0.654	0.222-1.086	0.597	0.009
32	+/+	12	0.275	-0.259-0.809	0.278	0.919	0.549-1.290	0.754	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	11	0.355	-0.745-1.454	0.484	0.814	-0.059-1.687	0.331	0.064
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.588	0.150-1.025	0.016	0.590	0.169-1.011	0.610	0.013
30	+/+	12	0.005	-0.367-0.465	0.799	1.082	0.793-1.370	0.875	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	11	0.154	-0.553-0.860	0.635	0.988	0.427-1.549	0.683	0.003
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.450	-0.191-1.092	0.141	0.724	0.106-1.342	0.523	0.028
28	+/+	12	0.379	-0.167-0.924	0.153	0.873	0.494-1.251	0.725	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	11	1.007	-0.348-2.62	0.127	0.378	-0.697-1.454	0.066	0.447
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.006	-0.781-0.891	0.881	1.218	0.412-2.023	0.646	0.009
24	+/+	12	1.337	0.277-2.397	0.018	0.308	-0.427-1.043	0.080	0.372
	<i>Sma1</i> /+	11	1.348	0.583-2.113	0.003	0.268	-0.339-0.875	0.100	0.344
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.589	-0.240-1.417	0.137	0.916	0.117-1.714	0.512	0.030
20	+/+	12	0.598	0.109-1.087	0.021	0.901	0.562-1.240	0.778	<0.001
	<i>Sma1</i> /+	11	1.444	0.776-2.112	0.001	0.282	-0.249-0.812	0.138	0.260
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.816	0.075-1.556	0.035	0.800	0.097-1.514	0.501	0.033
15	+/+	12	1.204	0.740-1.789	<0.001	0.509	0.145-0.872	0.493	0.011
	<i>Sma1</i> /+	11	1.165	0.524-1.805	0.003	0.585	0.077-1.093	0.430	0.028
	<i>Sma1</i> / <i>Sma1</i>	9	0.767	-0.133-1.667	0.084	0.972	0.105-1.840	0.501	0.033

Tabelle VII: Geradengleichungen für den linearen Zusammenhang zwischen Körpermasse (BM [g] ohne Gehirn und GI-Trakt) und Körperfett [g], Fettfreier Trockenmasse (FFDM [g]) und (C) Wasser [g] von WT und David-Mäusen im Alter von 3-5 Monaten.

A: Fett

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
WT	16	$y=0.46*BM-9.40$	0.39-0.52	0.94	<0.001
David	9	$y=0.20*BM-2.20$	0.10-0.29	0.76	0.002

B: FFDM

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
WT	16	$y=0.15*BM-1.38$	0.13-0.17	0.92	<0.001
David	9	$y=0.25*BM-1.10$	0.19-0.31	0.93	<0.001

C: Wasser

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r^2	p
WT	16	$y=0.31*BM-6.70$	0.26-0.36	0.93	<0.001
David	9	$y=0.54*BM-0.57$	0.41-0.67	0.93	<0.001

Tabelle VIII: Geradengleichungen für den Zusammenhang zwischen (A) Körpermasse (Lebendgewicht, BM [g]) und Fettmasse [g] sowie (B) Körpermasse (Lebendgewicht, BM [g]) und fettfreier Masse (FFM [g]) von WT und David-Mäusen im Alter von 3-5 Monaten.

A: Fett

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p
WT	16	y=0.496*BM-9.396	0.388-0.523	0.94	<0.001
David	9	y=0.196*BM-2.107	0.097-0.299	0.76	0.002

B: FFM

Genotyp	n	Regression	95%CI Steigung (b)	r ²	p
WT	16	y=0.544*BM+0.396	0.477-0.612	0.96	<0.001
David	9	y=0.804*BM+2.107	0.706-0.903	0.98	<0.001

Danksagung

Prof. Gerhard Heldmaier und Dr. Martin Klingenspor bin ich zutiefst dankbar, dass sie mir die Möglichkeit zur Anfertigung einer Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe gegeben haben, und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Die Arbeit wurde z.T. in Kooperation mit Ingenium Pharmaceuticals durchgeführt (Emmanuelle Cornali und Johannes Große), denen ich für die gute Zusammenarbeit danken möchte.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für das stimulierende, hilfsbereite und immer humorvolle Umfeld. Im Speziellen möchte ich danken: Tatjana Schneider für ihre Unterstützung und immer souveränen Ratschläge im Labor, Diana Kruhl und Gabor Szerensi für ihre technische Assistenz, sowie Jeanne Philipps, Regina Löchel und Daniela Gerber für die hervorragende Arbeit in der Tierpflege.

Herzlichen Dank an Manu fürs Korrekturlesen, und natürlich an „Dr.“ RWB für seine unerschöpfliche Geduld, Unterstützung und Motivationskunst. *Last not least* ein inniges Dankeschön an meinen Sohn Tim, der während des Zusammenschreibens in mir, und nach seiner Geburt in sich ruhte.

Wissenschaftlicher Werdegang

- 18.09.1969: Geboren in Osnabrück
- 1975 - 1979: Besuch der Gutenbergschule (Grundschule) in Dieburg
- 1979 - 1985: Besuch der Goetheschule (Gymnasium) in Dieburg
- 1985 - 1988: Besuch der Alfred-Delp-Schule (gymnasiale Oberstufe) in Dieburg. Abschluß mit Abitur
- 1989 - 1996: Studium der Biologie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe Prof. W. Arnold (Verhaltensökologie). Thema der Diplomarbeit: Die Rolle der Photoperiode bei der jahreszeitlichen Anpassung von *Apodemus flavicollis* (Gelbhalsmaus) und *Apodemus sylvaticus* (Waldmaus)
- 1997 - 1999: Betreuerin klinischer Therapiestudien im Bereich Studienmanagement am Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg, Leitung Prof. H. Schäfer
- seit Sept. 1999: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe Prof. G. Heldmaier (Tierphysiologie)
- seit Mai 2004: Elternzeit

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

- C. W. E. Meyer, D. Korthaus, W. Jagla, E. Cornali, J. Grosse, H. Fuchs, M. Klingenspor, S. Roemheld, M. Tschöp, G. Heldmaier, M. Hrabé de Angelis und M. Nehls: A novel Missense Mutation in the Mouse Growth Hormone Gene causes semidominant Dwarfism, Hyperghrelinemia, and Obesity. *Endocrinology*. 2004;145(5):2531-41.
- C. W. E. Meyer, M. Klingenspor, J. Rozman, und G. Heldmaier: Gene or Size: Metabolic Rate and Body Temperature in Obese Growth Hormone Deficient Dwarf Mice. *Obesity Research* 2004; 12 (9):1509-1518

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

Phänotypische und stoffwechselfysiologische Charakterisierung von ENU-
(Ethylnitrosoharnstoff-) induzierten Mausmutanten mit gestörter Körpergewichtsregulation

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Datum/Ort

Unterschrift