

**Bundesministerium für Bildung und Forschung
Abschlussbericht**

**zum Vorhaben
Ätiologie, Pathophysiologie und Prävention einer überschießenden
Körperfettzunahme nach Gewichtsreduktion –
Vermeidung des JoJo-Effektes in der Behandlung von Übergewicht**

Förderkennzeichen: 01EA1336

Laufzeit: 01.06.2010 – 30.07.2013

Teilprojekt 1

**Einfluss einer Diät mit niedrigem Glykämischen Index nach
Gewichtsreduktion auf das *catch-up fat* Phänomen beim Menschen**

Teilprojekt 2

**Zusammenhang zwischen Redoxstatus, Inflammation,
Insulinresistenz, adaptiver Thermogenese und dem *catch-up fat*
Phänomen in transgenen Mäusen**

Teilprojekt 3

**Bedeutung evolutionärer konservierter Stoffwechselwege des
catch-up fat Phänomens**

**Prof. Dr. Manfred J. Müller
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde
Abteilung Humanernährung**

I. Kurze Darstellung

I.1 und I.2 Aufgabenstellung und Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Teilprojekt 1:

Das *catch-up fat* Phänomen ist eine evolutionär konservierte physiologische Reaktion, die nach einer Energierestriktion und nachfolgender Gewichtszunahme auftritt. Das Phänomen ist durch eine nachhaltige Drosselung der Thermogenese und ein verzögertes „Wiederaufholen“ der Körperproteinmasse im Vergleich zur Körperfettmasse charakterisiert. Klinisch entspricht das *catch-up fat* Phänomen dem sog. *weight cycling* in der Behandlung übergewichtiger Patienten und ist zu einem erhöhten kardiometabolischen Risiko assoziiert. Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines wissenschaftlich fundierten Konzeptes für einen nachhaltigen Erfolg einer Gewichtsreduktionsdiät. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die eigentliche therapeutische Herausforderung nicht in der Gewichtsabnahme selbst, sondern in der hohen Rückfallquote und damit dem fehlenden nachhaltigen Erfolg einer Gewichtsreduktion besteht. Nach der Hypothese des Antrags führen neuroendokrine und metabolische Anpassungen nach einer Gewichtsreduktion zu einer vulnerablen Phase, in der metabolisch eine präferentielle Repletion der Fettspeicher stattfindet. Diese Stoffwechselanpassungen äußern sich in einer vermehrten Insulinsensitivität, einer Drosselung des Energieverbrauchs und einer vermehrten Kohlenhydratverbrennung auf Kosten einer geringeren Fettoxidation und begünstigen nicht nur eine erneute Gewichtszunahme, sondern erklären auch das erhöhte kardiometabolische Risiko des in unserer heutigen affluenten Gesellschaft häufig praktizierten *Weight Cyclings* oder *YoYo-Dietings*.

Im *Teilprojekt 1* wurden in einer umfangreichen und kontrollierten Humanstudie Untersuchungen zu Art, Genese und gesundheitlichen Auswirkungen der Stoffwechselanpassung nach Gewichtsreduktion durchgeführt sowie deren nutritive Beeinflussung durch die Modifikation der Glykämischen Last untersucht.

Teilprojekt 2:

Ziel des Arbeitspaketes 2 war es, die zugrundeliegenden Mechanismen des *catch-up fat* Phänomens mit Augenmerk auf oxidativen Status, unter Berücksichtigung des ApoE-Genotyps, zu erforschen.

Die Abteilung Lebensmittelwissenschaft hat bereits Studien im Bereich der Thematik Stressresponse und anti-inflammatorische Eigenschaften durchgeführt. In diesem Kontext werden Testsysteme mit zunehmender biologischer Komplexität eingesetzt, wie in vitro-Assays, verschiedene Zellkulturmodelle, die in der Arbeitsgruppe bereits gut etabliert sind. Des Weiteren sind bereits einige Fütterungsstudien mit dem ApoE3/ApoE4-Mausmodell durchgeführt worden. Zur besseren

Phänotypisierung der Labormäuse wurde im Rahmen des Versuchsvorhabens ein System für die indirekte Kalorimetrie angeschafft, um Parameter des Energiemetabolismus zu erfassen. Darüber hinaus konnte, durch die Kooperation mit einer anderen Arbeitsgruppe, das bildgebende Verfahren der micro-Computertomografie zur differentiellen in vivo Bestimmung des Fettgewebes eingesetzt werden.

Teilprojekt 3:

Die Aufgabe für dieses Teilprojekt im Rahmen des Gesamtprojekts war auf mehrere Schwerpunkte verteilt, die von Bedeutung für den Erfolg dieses Gesamtprojektes waren. Das TP3 hat den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modell eingesetzt, um einerseits grundlegende wissenschaftliche Fragestellungen zur Genexpression zu bearbeiten, die mit dem Ziel des Gesamtprojekts verknüpft waren, und andererseits das catch-up Fett Phänomen (CFP) auf physiologischer, zellulärer und molekularer Ebene gezielt in *C. elegans* zu untersuchen und die erhobenen Daten aus der Maus (TP2) und vom Menschen (TP1) im Sinne eines translationalen Ansatzes zu kontextualisieren.

Das Vorhaben war eng eingebettet in das Gesamtprojekt „A low glycemic index diet as prevention of the catch-up fat phenomenon“. Um den translationalen Ansatz erfolgreich bearbeiten zu können, war eine stringente Kooperation mit den TPs 1&2 notwendig. Die Voraussetzungen auf fachlicher und logistischer Seite konnten durch erhebliche Anstrengungen im Bereich der Probenlogistik optimiert werden.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Teilprojekt 1:

Bei jungen gesunden Männern wurde ein Weight Cycle induziert. Hierfür wurde eine kalorische Überernährung, gefolgt von einer Kalorienrestriktions- und *Refeeding*-Phase durchgeführt ($\pm$ 50-60% des Energiebedarfs). Während der Gewichtsab- und Wiederzunahme erfolgte eine Einteilung in Diätgruppen mit unterschiedlicher Kohlenhydrat (KH)-Menge und unterschiedlichem Glykämischen Index (GI). Das Studienprotokoll ist in **Abbildung 1** dargestellt. In der Refeeding-Phase ergeben sich somit 4 Diätgruppen, die sich im Hinblick auf die Glykämische Last (KH-Menge x Glykämischer Index) unterscheiden. Der Energiebedarf jedes Probanden wurde mithilfe der Messung des Ruheenergieverbrauchs (indirekte Kalorimetrie) und einem Aktivitätsfaktor von 1,4 (Physical Activity Level für geringe, vorwiegend sitzende körperliche Aktivität; entspricht ca. 5000 Schritten/Tag) ermittelt. Alle Lebensmittel wurden für jeden Probanden individuell zusammengestellt und zubereitet und unter Aufsicht am Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde verzehrt. Die

Probanden hielten sich 6-Wochen lang von morgens (8:00 Uhr) bis abends (18:00) am Institut auf. Nach jeder Diätphase wurden die Insulinsensitivität (HOMA-Index, Matsuda-Index, hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp), Blutdruck, Blutfette, der Energieverbrauch (Ruheenergieverbrauch, Glukose-induzierte Thermogenese, körperliche Aktivität, Energieverbrauch für niedrige körperliche Aktivität) sowie die Körperzusammensetzung (Fettmasse, Magermasse, Leberfett) gemessen.

Für die Untersuchungen wurde die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel eingeholt. Alle Probanden erhielten eine individuelle und ausführliche Aufklärung durch die Studienleitung und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme.

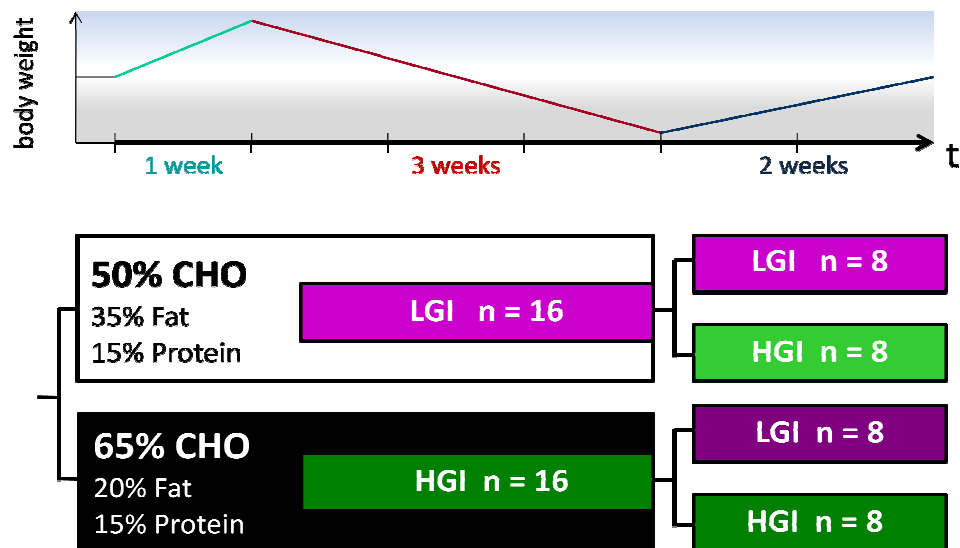


Abbildung 1 Darstellung des Studienprotokolls

(CHO = Kohlenhydrate; LGI= low glycemic index diet; HGI = high glycemic index diet)

Die praktische Durchführung der 6-wöchigen Interventionsstudie erfolgte aus Kapazitätsgründen in Etappen mit jeweils 8 Probanden (4 aus dem HGI und 4 aus dem LGI-Studienarm) in den Frühjahrs- oder Sommersemesterferien. Für die vollständige Untersuchung aller 32 Probanden wurden daher 2 Jahre benötigt. Jeder 6-wöchigen Intervention ging eine umfangreiche Rekrutierungsphase voraus. Die übrige Projektzeit wurde mit Vorbereitungen zur Studie bzw. der Messung der Blut- und Urinproben sowie der statistischen Auswertung und der Veröffentlichung der Daten zugebracht.

Ernährungsintervention

Der Energiebedarf des Studienteilnehmers wurde in den ersten 3 Tagen vor Beginn der Intervention ermittelt (Run-In Phase). Der Energieverbrauch des Körpers wurde in Ruhe gemessen (Erklärung der Messung des Ruheenergieverbrauchs siehe unten) und 40% als Bedarf für leichte körperliche Aktivität (PAL 1,4) hinzuaddiert. In der 3-wöchigen Kalorienrestriktionsphase betrug die Kalorienrestriktion 50% des Bedarfs. Dies soll an einem Beispiel verdeutlicht werden: Liegt der tägliche Energiebedarf bei 2500 kcal, so essen die Probanden während der 3-wöchigen Kalorienrestriktionsphase 50% weniger, d.h. nur 1250 kcal/Tag. In der Überernährungsphase werden 50% des Energiebedarfs mehr verzehrt. Dies entspricht bei 2500 kcal Energiebedarf einer Verzehrsmenge von 3750 kcal/Tag. Da in einem kg Körpergewicht Energie von etwa 7700 kcal gespeichert sind (unter der Annahme, dass dieses kg zu 79% aus Fett und zu 21% aus Magermasse besteht, n. Wishnofsky-Regel 1958), wurden im Verlauf der Studie nur geringe Schwankungen des Körpergewichts von ca. 1-2 kg Gewichtszunahme in der Überernährungsphase, ca. 4-5 kg Gewichtsabnahme in der Kalorienrestriktionsphase und 3 kg Gewichtswiederzunahme in der Realimentationsphase erwartet. Die Probanden sollten am Studienende wieder ihr Ausgangsgewicht erreichen.

Die Nährstoffzufuhr in der Unter- und Überernährungsphase bestand bei den ersten 16 Probanden zu 50% aus Kohlenhydraten, zu 35% aus Fett und zu 15% aus Eiweiß und bei den zweiten 16 Probanden zu 65% aus Kohlenhydraten, zu 20% aus Fett und zu 15% aus Eiweiß. Während der Über- und Unterernährungsphasen wurden alle Lebensmittel vom Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde kostenlos zur Verfügung gestellt. Während dieser Phasen durften keine zusätzlichen Lebensmittel verzehrt werden.

Die Studienteilnehmer nahmen während der 3-wöchigen Kalorienrestriktionsphase täglich 3 Mahlzeiten zu sich, wobei 2 Mahlzeiten aus einer ähnlich schmeckenden, flüssigen Formuladiät bestanden (Vital Protein Creme Royal oder Trinknahrung Pur, Insulean GmbH & Co. KG, Essen). Die Mahlzeiten unterscheiden sich in der Wirkung auf den Blutzucker, dem sogenannten Glykämischen Index (GI), eine Probandengruppe wurde mit einer Diät mit hohem GI ernährt (schneller Blutzuckeranstieg), die andere mit einer Diät mit niedrigem GI (langsamer Anstieg des Blutzuckerspiegels). Da für viele natürliche Lebensmittel Unterschiede in den GI-Angaben bestehen, wurden diese speziellen diätetischen Produkte mit eindeutig definiertem GI eingesetzt. In jeder Diätphase wurde die Hälfte der Kalorienzufuhr über diese Formulaprodukte gedeckt. Die Formulamahlzeiten wurden mit Milch (3,5 % Fett) zubereitet und mit Maltodextrin 19 (hoher GI) oder Saccharose (niedriger GI) ergänzt. Die Insulean-Diätprodukte unterliegen der Diätverordnung des deutschen Lebensmittelrechts und enthalten einen vorgeschriebenen Anteil an Nährstoffen, der eine ausreichende Versorgung z.B. mit Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen bei gleichzeitig

niedriger Kalorienzufuhr sicherstellt. Sie enthalten dann im Durchschnitt jeweils pro Portion 250-270 kcal, 15 g Eiweiß, 33 g Kohlenhydrate und 7 g Fett. In der Praxis wurden die Diäten durch eine Mischkost-Mahlzeit (mit hohem bzw. niedrigem GI) ergänzt. Die Mahlzeiten wurden in einem Abstand von etwa vier Stunden verzehrt. Darüber hinaus wurde kalorien- und koffeinfreie Flüssigkeit nach Wunsch getrunken.

Differenzierte Untersuchungen zum Stoffwechsel und Ernährungszustand

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die erhobenen Untersuchungsparameter und die jeweiligen Messzeitpunkte. Die Methodik zur Messung der Untersuchungsparameter wird anschließend ausführlich erläutert.

Tabelle 1 Übersicht über Untersuchungsparameter und Messzeitpunkte

Run In	Überernährung 1 Woche	Kalorienrestriktion 3 Wochen	Realimentation 2 Wochen			
Tage	T0	T1	T2	T3		
<u>Methode</u>	<u>Messparameter</u>		<u>Messzeitpunkt</u>			
			T0	T1	T2	T3
Körperwaage	Gewicht		x	x	x	x
Messlatte	Größe		x			
Air-Displacement Plethysmographie	Fettmasse, Fett-freie Masse		x	x	x	x
Bioelektrische Impedanzanalyse	Fettmasse, Magermasse		x	x	x	x
Magnetresonanz- Tomographie	Körperfettverteilung		x			x
Spiroergometrie	Aerobe Fitness		x			x
3 Tage Ernährungsprotokoll	Erfassung der habituellen Ernährung (→ Berechnung von Makronährstoff- verzehr, Mikronährstoff-zufuhr, GI)		x			
Indirekte Kalorimetrie	Ruheenergieverbrauch (→ Bestimmung des Energiebedarfs)		x	x	x	x
Hyperinsulinämischer euglykämischer clamp	Insulinsensitivität, Glukose-induzierte Thermogenese		x			x
Oraler Glukosetoleranztest	Insulinsensitivität		x	x	x	x

Blutabnahme	Lipidprofil, Schilddrüsenhormone, Insulin, Adiponektin- und Leptinspiegel	x	x	x	x
Herzfrequenzvariabilität		x	x	x	x
EKG		x			
Fettgewebsbiopsie				x	x

Täglich während der gesamten Studie gemessene Zielgrößen

Gewicht, Ruhe-Blutdruck, Stickstoffausscheidung und Katecholaminausscheidung im 24h-Urin, Flüssigkeitsbilanz, körperliche Aktivität mittels Schrittzähler (Sensewear-Armband)

Körperzusammensetzung mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) und Air-Displacement Plethysmographie

Die Magnetresonanz-Tomographie (MRT) ermöglicht eine Bestimmung des Körperfettanteils, der Magermasse, des Organfettgehaltes sowie der Volumina von viszeralem und subkutanem Fettgewebe. Es besteht keine Strahlenbelastung. Probanden mit Implantaten und Klaustrophobie wurden von der Studie ausgeschlossen. Die mit der semi-automatischen Auswertungs-Software (SliceOmatic, Tomovision) segmentierten Gewebeflächen wurden zu einer Summe addiert und im Anschluss durch die Multiplikation mit der jeweiligen Schichtdicke in Volumenwerte umgewandelt. Volumina von viszeralem und abdominal subkutanem Fettgewebe wurden mit einer Schichtdicke von 10 mm in Atemanhaltetechnik von der Lungenbasis (Th 10) bis hinunter ins kleine Becken zu den Femurköpfen bestimmt und wie o.g. segmentiert (Bosy-Westphal et al. 2009).

Die Air-Displacement Plethysmographie ist eine nicht-invasive Methode zur Bestimmung der Fettmasse und Fett-freien Masse aus der Körperdichte (Masse/Volumen). Das Volumen wurde durch Luftverdrängung in einer Messkammer ermittelt. Das Körpergewicht wurde auf einer Waage bestimmt.

Ruheenergieverbrauch und Substratoxidation: Die kontinuierliche Messung des Sauerstoffverbrauchs und der CO₂-Produktion mittels indirekter Kalorimetrie erfolgte im Liegen morgens nüchtern (nach 10-stündiger Nahrungskarenz) über ein offenes Haubensystem (Vmax spectra, SensorMedics Deutschland GmbH, Waldbüttelbrunn) unter thermoneutralen Bedingungen im klimatisierten Stoffwechsel-Labor. Die Messdauer betrug 40min. Die ersten 15min der Messung wurden verworfen. Die Berechnung der Kohlenhydrat- und Fettoxidation erfolgte durch VO₂, VCO₂ unter Berücksichtigung der Stickstoffausscheidung für die Proteinoxidation. Die Messung der 24-h-

Stickstoffausscheidung erfolgte mittels Chemoluminiszenzanalyse. Der Ruheenergieverbrauch wurde nach der Formel von Weir (1949) berechnet. Die Berechnung des Nicht-Protein-Respiratorischen Quotienten ermöglichte eine Aussage über die Höhe der Fett- und Kohlenhydratoxidation. Der Energieverlauf wurde zusätzlich nach einem oralen Glucosetoleranztest (oGTT) zur Erfassung der Glucose-induzierten Thermogenese bestimmt.

Messung der aeroben Fitness mittels Spiroergometrie: Die aerobe Kapazität wurde mittels eines submaximalen Stufenprotokolls auf einem Laufband (T 170 D Med, Cosmed, Italien) ermittelt. Nach einer 3-minütigen Aufwärmphase bei einer Geschwindigkeit von 3km/h wurde sowohl die Geschwindigkeit als auch der Steigungsgrad des Laufbandes alle 3 Minuten kontinuierlich erhöht. Die O₂-Aufnahme zu den Zeitpunkten der aeroben bzw. anaeroben Schwelle (ermittelt durch die Spiroergometrie-Software) gab Aufschlüsse über den Fitnesszustand des Probanden. Das Monitoring der Herzfrequenz erfolgte über ein Belastungs-EKG. Abbruchkriterien waren ein RQ > 1 (anaerobe Schwelle) sowie das vorzeitige Erreichen der maximalen Herzfrequenz. Die Probanden wurden durch das Tragen eines Tragegurt-Geschirrs in besonderem Maße abgesichert.

Erfassung der körperlichen Aktivität und Berechnung des Energiebedarfs: Der 24h-Energieverbrauch der Probanden wurde berechnet, nachdem der individuelle Ruheenergieverbrauch gemessen wurde. Es wird ein Physical Activity Level von 1,4 zugrunde gelegt (24h-Energieverbrauch = REE x 1,4). Die körperliche Aktivität der Probanden wurde von 8.00-18.00 Uhr durch Aufenthalt in der Metabolic Unit des Instituts standardisiert. Für den Rest des Tages wurde ein maximaler Output des Bewegungsmessers festgelegt. Sportliche Aktivitäten waren während der gesamten Studiendauer nicht gestattet. Die körperliche Aktivität wurde über den Zeitraum des Untersuchungsprotokolls mittels Schrittzähler, Temperatursensor und Messung der Hautleitfähigkeit (Sensewear Pro Armband) erfasst.

Sympathikotonus: Die Messung der SNS-Aktivität erfolgte durch die Bestimmung der Adrenalin- und Noradrenalinausscheidung im 24h-Urin, der täglich im Verlauf der Studie gesammelt wurde sowie über die Messung der Herzfrequenzvariabilität.

Hormonspiegel: Zur Analyse der Blutzucker- und Insulinspiegel, der Blutfette sowie von Schilddrüsenhormonen, Hormonen aus dem Fettgewebe (Leptin, Adiponektin) und Transaminasen (Leberenzyme) wurden jedem Studienteilnehmer während des Studienprotokolls mehrmals (T0, T1, T2, T3, s. Abb. 1) nüchtern jeweils ca. 25ml Blut abgenommen. Die Messung von Insulin und Leptin sowie der Schilddrüsenhormone (fT3, fT4, TSH) im Serum erfolgte mit Standardassays. Schilddrüsenhormone beeinflussen den Energieverbrauch des Körpers. Ihre Konzentration kann nach einer Unterernährung vorübergehend sinken bzw. bei Überernährung ansteigen und somit Veränderungen im Energieverbrauch erklären. Während der 6-Wöchigen Studiendauer wurden jedem Studienteilnehmer insgesamt ca. 500 ml Blut abgenommen.

Messung des Blutdrucks: Die Messung von systolischem und diastolischem Blutdruck erfolgte nach Riva Rocci täglich unmittelbar im Anschluss an eine 10-minütige Ruhephase mit Hilfe einer Oberarmmanschette.

Hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp: Der euglykämische Clamp gilt als Goldstandard zur Beschreibung der peripheren Insulinsensitivität. Es wird untersucht, wieviel Glukose notwendig ist, um eine definierte Menge Insulin, die intravenös verabreicht wird, auszugleichen. Für die Untersuchung wurde eine Vene des Handrückens für die Blutentnahmen und eine antebrachiale Vene des anderen Armes für die Glukose- und Insulininfusion punktiert. Es wurden flexible Venenverweilkanülen verwendet. Insulin wird in einer Standard-Dosis von 1mU Insulin/kg/min konstant über 120 min i.v. infundiert. Die Plasmakonzentration von Insulin wird so von basalen Spiegeln von etwa 10µU/l auf 50–100 mU/l (= 350–700 pmol/l) angehoben. Während der Insulininfusion wurden die Konzentrationen der Plasmaglukose durch eine variable und Computer-/Algorithmen-gesteuerte Glukoseinfusion auf dem Ausgangswert von etwa 80mg/dl konstant gehalten. Dazu wurden alle 1-5 min die Glukosespiegel im Blut bestimmt und dann durch die variable Glukoseinfusionsrate auf den Zielwert (=d.h. auf den Nüchtern- oder Ausgangswert; z.B. 80 mg% oder 4.4 mmol/l) korrigiert. Die Anpassung der Glukoseinfusionsrate erfolgte unter Zuhilfenahme eines Algorithmus (Software). Es wird ein Clamp-System der Firma EKF Diagnostic verwendet. Unter den Bedingungen der „euglykämischen Hyperinsulinämie“ entspricht die infundierte Glukosemenge plus der endogenen Glukoseproduktionsrate (= die hepatische plus renale Glukoseproduktion) dem Glukoseverbrauch des gesamten Körpers. Unter der Standardbedingung des „euglykämischen clamps“ ist die endogene Glukoseproduktionsrate bei Gesunden (nahezu) vollständig unterdrückt, d.h. die Glukoseinfusionsrate entspricht nach Korrektur um Schwankungen des Plasmaglukosespiegels dem Verbrauch der Glukose. Die Glukoseverbrauchsrate M (= Glucose metabolized) ist ein Maß für die Insulinempfindlichkeit des ganzen Körpers. Die Untersuchung mittels hyperinsulinämischem euglykämischem Clamp erfolgte morgens nüchtern und dauerte insgesamt ca. 3 Stunden. Im Anschluss an die Untersuchung (d.h. nach Beendigung der Insulininfusion) wurde eine Glukoseinfusion noch 45min lang fortgeführt. Anschließend erhielten die Probanden eine kohlenhydratreiche Mahlzeit. Die Probanden wurden auf die Möglichkeit eines Blutzuckerabfalls hingewiesen und instruiert, bei entsprechenden Symptomen zuckerhaltige Lebensmittel zu verzehren. Eine Packung Dextro-Energen Traubenzucker wird jedem Probanden mit auf den Weg gegeben. Die Probanden wurden darauf hingewiesen, dass die aktive Teilnahme am Straßenverkehr ca. 3h nach der Untersuchung verboten ist und am Untersuchungstag kein Sport getrieben werden darf.

Oraler Glukosetoleranztest (oGTT): Mit Hilfe dieses Zuckerbelastungstest wurde die Ganzkörper-Insulinsensitivität durch die Messung der Empfindlichkeit nach Nahrungsaufnahme gegenüber dem

körpereigenen Insulin bestimmt. Über einen peripheren Venenzugang mittels einer Braunüle wurden die Glukose- und Insulinspiegel in regelmäßigen Abständen (nach 30, 60, 90, 120 und 180 min) nach einer oralen Glukosegabe gemessen.

Kontinuierliche interstitielle Glukosemessung und 24h Ernährungsprotokoll: Der Verzehr aller ausgeteilten Lebensmittel wurde in einem Protokollheft mit Angabe der Uhrzeit notiert. Nicht verzehrte Lebensmittel wurden dem Untersucher zur Rückwaage zurückgebracht. Das FreeStyle Navigator System® von Abbott ermöglichte die kontinuierliche interstitielle Glukosemessung (ein Messwert pro Minute, d.h. 1.440 Messwerte am Tag). Sender und Empfänger sind wasserdicht und bis auf eine Tauchtiefe von 1 Meter getestet. Duschen, Baden, Schwimmen und Sport sind ohne Einschränkungen möglich. Die kontinuierliche interstitielle Glukosemessung erfolgte zu 2 Zeitpunkten des Untersuchungsprotokolls jeweils 5 Tage lang. Die Computergestützte Auswertung der Ernährungsprotokolle erfolgte mithilfe des Programms EbisPro.

Fettgewebsbiopsie: Im Verlauf der Studie (zu T2 und T3) wurde eine Nadelbiopsie des subkutanen Fettgewebes durchgeführt. Die Technik der subkutanen Nadelbiopsie erlaubt durch ein wenig traumatisches Verfahren die Entnahme von 0,5 bis 2,0 g Fettgewebe. Die Fettgewebsbiopsie wurde wie folgt durchgeführt: Nach Sterilisation und Lokalanästhesie der Bauchhaut seitlich unterhalb des Bauchnabels, wurde eine Strausskanüle mit 2 mm Durchmesser in das Fettgewebe eingeführt. Sterile Kochsalzlösung wurde durch eine aufgesetzte Spritze instilliert und wieder aspiriert, dadurch werden kleine Fettgewebestückchen gesammelt. Dieser Vorgang wurde 6-8x wiederholt, bis eine ausreichende Menge Fettgewebe gesammelt wurde. Abschließend wurde die überschüssige Kochsalzlösung durch vorsichtiges Drücken aus dem subkutanen Gewebe entfernt und die Wunde mit einem Steristrip verschlossen. Aus dem erhaltenen Material wurde RNA isoliert. Hierfür wurde das mittels Nadelbiopsie entnommene Fettgewebe dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, und dann in Portionen zu 0,5 g eingefroren. Im Labor des Else Kröner Fresenius Zentrums für Ernährungsmedizin der TU München, Freising-Weihenstephan (Dr. T. Skurk, Prof Dr. H. Hauner) erfolgte die Isolierung von RNA und Proteinen nach Standardprotokollen. Mittels real-time RT-PCR wurde die Expression von Genen der Regulation der Lipogenese und Adipogenese nachgewiesen und quantifiziert.

Statistische Analyse

Querschnittsvergleiche z.B. zwischen verschiedenen Diätformen wurden bei Adjustierung um Kovariablen als Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Longitudinale Untersuchungen baseline vs. Kalorienrestriktion und Realimentation wurden entsprechend mit einer ANOVA für Messwertwiederholungen auf Signifikanz getestet. Bei einem Stichprobenumfang von 36 Personen (18 pro Diätform) bestand eine 80%-ige statistische Power, einen Unterschied von 15% mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nachzuweisen.

Teilprojekt 2:

Nach zuvor durchgeführter Literaturrecherche, Planung und Anschaffung der Geräte zur indirekten Kalorimetrie wurde zunächst die Pilotstudie mit männlichen C57BL/6J-Mäusen durchgeführt. Diese Pilotstudie hatte das Ziel die bisher in der Arbeitsgruppe nicht eingesetzte Techniken (indirekte Kalorimetrie, micro-Computertomografie) zu etablieren und die Studiendauer und Diazoxiddosis zu überprüfen. Nach Durchführung der Pilotstudie, Erhebung und Auswertung relevanter Ergebnisse erfolgte die Planung und Durchführung der Studie mit männlichen ApoE-transgenen Mäusen.

Teilprojekt 3:

Zu Beginn der Förderperiode (bzw. davor) wurden die Abläufe der einzelnen Projektunterbereiche geplant. Bereits vor Projektbeginn wurde eine Methode entwickelt und etabliert, die es erlaubt, Lipidtropfen (Lipid droplet, LD) im lebenden Wurm abzubilden. Das BODIPY 493/503-basierte Protokoll führt zur fluoreszensoptischen Darstellung der Fettspeicher von *C. elegans* und konserviert die native Morphologie der LD. Im Laufe des Projektes wurde diese Methode weiter entwickelt und derart optimiert, so dass eine Quantifizierung des Gesamtlipidgehaltes bei fixierten Würmern ermöglicht werden konnte. Ein weiteres Messverfahren ermöglichte die quantitative Erfassung der Körperzusammensetzung und der Volumina der Tiere mittels einer modifizierten Durchflußcytometrie-Methode. Zudem wurde für die Genexpressionsanalysen zunächst die RNA-Isolation aus den verschiedenen Proben (Mensch, Maus, *C. elegans*) etabliert. Diese Analyse dient der Beurteilung der RNA-Qualität. Das bereits in unserer Abteilung etablierte Protokoll zur Analyse der Genexpression wurde entsprechend der Anforderungen an dieses Projekt adaptiert und optimiert. Insgesamt konnten somit alle geplanten Untersuchungen zur Fragestellung des CFP am Fadenwurm mit den hier erarbeiteten Methoden durchgeführt werden.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Teilprojekt 1:

Vor Studienbeginn wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. **Der Glykämische Index (GI)** ist ein Maß zur Charakterisierung der Wirkung eines kohlenhydrathaltigen Lebensmittels auf den Blutzuckerspiegel. Lebensmittel, die durch einen niedrigen GI zu einem geringeren Blutzuckeranstieg führen, induzieren auch eine geringere Insulinsekretion. Diäten mit einem niedrigen GI wie die "Logi-Diät" oder die "Glyx-Diät" erfreuen sich in der Bevölkerung einer großen Popularität. Epidemiologische Befunde legen nahe, dass eine Ernährung mit niedrigem GI vor kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes schützt (Livesey et al. 2008). Konfirmative

Interventionsstudien fehlen jedoch noch weitgehend. Es gibt erste Hinweise darauf, dass der wesentliche Vorteil einer Ernährung mit niedrigem GI in einer verbesserten Regulation des Körpergewichts liegen könnte (Abate et al. 2008). So zeigen aktuelle Ergebnisse der internationalen DIOGENES Studie den protektiven Effekt eines niedrigen GI (in Kombination mit einem hohen Proteingehalt der Nahrung) im Hinblick auf den Gewichtserhalt nach einer Reduktionsdiät (Larsen et al. 2010). Diese Studie weist jedoch nur geringe Unterschiede im GI zwischen den Diätgruppen auf und lässt darüber hinaus offen, ob dieser Effekt über eine Verbesserung der Appetitregulation (d.h. eine geringere Nahrungsaufnahme, Brand-Miller et al. 2002) zu erklären ist, oder durch eine positive Beeinflussung der Stoffwechselanpassungen während der Gewichtsreduktion erklärt wird. Letzteres wird durch Befunde unterstützt, die eine höhere nahrungsabhängige Thermogenese (d.h. einen höheren Energieverbrauch für Verdauung, Resorption und Speicherung von Nährstoffen) und eine höhere Fettoxidation nach dem Verzehr einer Niedrig-GI im Vergleich zu einer Hoch-GI Diät zeigen (Scazzina et al. 2010).

Eine typisch „westliche“ Ernährungsweise ist durch einen hohen Verzehr an kohlenhydratreichen Lebensmitteln mit hohem GI (z.B. Kartoffeln, Frühstückscerealien und Weißmehlprodukten) gekennzeichnet. Diese führen zu einem schnellen Blutzucker- und damit einem schnellen Insulinstieg, welcher wiederum eine vermehrte postprandiale Kohlenhydratoxidation auf Kosten einer geringeren Fettoxidation (und Hemmung der Lipolyse) zur Folge hat. Aufgrund der niedrigen Verbrennung werden Fette so vermehrt nicht-oxidativ verstoffwechselt. Lebensmittel mit einem hohen GI verändern somit die Partitionierung von Makronährstoffen zugunsten einer vermehrten Fettspeicherung und begünstigen eine positive Energiebilanz (d.h. einer Gewichtszunahme). Der Verzehr von Lebensmitteln mit niedrigem GI ist dagegen invers zum Body Mass Index assoziiert (Bazzano et al. 2001, Murakami et al. 2007) und schützte in einer prospektiven Studie vor Gewichtszunahme (Hare-Bruun et al. 2006). Auch führte eine Reduktionsdiät mit niedrigem GI zu einem größeren Gewichtsverlust im Vergleich zu einer äquivalenten Kontrolldiät mit hohem GI (Slabber et al. 1994; Spieth et al. 2000; McMillan-Price et al. 2006; Warren et al. 2003; Abate et al. 2008; Lerer-Metzger et al. 1996). Ein Cochrane Review kam daher zu dem Schluss, dass übergewichtige und adipöse Patienten hinsichtlich der Gewichts- und Fettabnahme sowie im Hinblick auf die Verbesserung der Blutfettwerte mehr profitieren, wenn sie eine Diät mit niedrigem GI einhalten. Ein geringerer postprandialer Anstieg des Insulinspiegels ist ein gut dokumentiertes Charakteristikum einer Niedrig-GI Diät (Livesey et al. 2008) und vermutlich im Wesentlichen für den positiven Effekt auf die Gewichtsregulation verantwortlich. Dies wird auch dadurch erklärt, dass eine Interaktion zwischen Insulinspiegeln und anderen neuroendokrinen Faktoren besteht, die bei der Regulation der Energiebilanz eine Rolle spielen (z.B. der Aktivität des Sympathischen Nervensystems und den Leptinspiegeln). Der Nutzen einer Diät mit einem niedrigen GI bzw. einer niedrigen

Glykämischen Last für die Regulation des Stoffwechsels und des Körpergewichts wurde jedoch bislang nicht unter kontrollierten Bedingungen bei gesunden Probanden untersucht.

Literatur

Abate, I, Parra, D, Martinez, JA. Energy-restricted diets based on a distinct food selection affecting the glycemic index induce different weight loss and oxidative response. *J. Clin. Nutr.* 2008, 27, 545-551

Abate, I, Parra, D, Martinez, JA. Energy-restricted diets based on a distinct food selection affecting the glycemic index induce different weight loss and oxidative response. *J. Clin. Nutr.* 2008, 27, 545-551

Bazzano LA, He J, Ogden LG, et al. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med* 2001;161:2573e8.

Bosy-Westphal A, Kossel E, Goele K, Blöcker T, Lagerpusch M, Later W, Heller M, Glüer C-C, Müller MJ. Association of cardiac fat with liver fat and insulin sensitivity after diet-induced weight loss in overweight nondiabetic women. *Obesity* 2010; 18(11):2111-7.

Brand-Miller J, Holt SHA, Pawlak DB, McMillan J. Glycemic index and obesity. *Am J Clin Nutr* 2002;76(suppl):281S-5S.

Hare-Bruun H, Flint A, Heitmann BL. Glycemic index and glycemic load in relation to changes in body weight, body fat distribution, and body composition in adult Danes. *Am J Clin Nutr* 2006;84:871e9

Larsen TM, Dalskov SM, van Baak M, Jebb SA, Papadaki A, Pfeiffer AF, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Kunešová M, Pihlsgård M, Stender S, Holst C, Saris WH, Astrup A; Diet, Obesity, and Genes (Diogenes) Project. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N Engl J Med* 2010 Nov 25;363(22):2102-13.

Lerer-Metzger M, Rizkalla SW, Luo J, et al. Effects of long-term lowglycemic index starchy food on plasma glucose and lipid concentrations and adipose tissue cellularity in normal and diabetic rats. *Br J Nutr* 1996;75:723–32.

Livesey G, Taylor R, Hulshof T, Howlett J. Glycemic response and health – a systematic review and meta-analysis: relations between dietary glycemic properties and health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2008;87(suppl):258S-68S

McMillan-Price J, Petocz P, Atkinson F, et al. Comparison of 4 diets of varying glycemic load on weight loss and cardiovascular risk reduction in overweight and obese young adults: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2006;166:1466e75.

Murakami K, Sasaki S, Okubo H, Takahashi Y, Hosoi Y, Itabashi M. Dietary fiber intake, dietary glycemic index and load, and body mass index: a cross-sectional study of 3931 Japanese women aged 18e20 years. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:986e95.

Scazzina F, DelRio D, Benini L, Melegari C, Pellegrini N, Marazzan E, Brighenti F. The effect of breakfasts varying in glycemic index and glycemic load on dietary induced thermogenesis and respiratory quotient. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; doi:10.1016/j.numecd.2009.08.008 epub ahead of print.

Slabber M, Barnard HC, Kuyl JM, Dannhauser A, Schall R. Effects of a low-insulin-response, energy-restricted diet on weight loss and plasma insulin concentrations in hyperinsulinemic obese females. *Am J Clin Nutr* 1994;60:48–53.

Spieth LE, Harnish JD, Lenders CM, et al. A low-glycemic index diet in the treatment of pediatric obesity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154:947–51.

Warren JM, Henry CJ, Simonite V. Low glycemic index breakfasts and reduced food intake in preadolescent children. *Pediatrics* 2003;112:414.

Teilprojekt 2:

Ein häufiges Problem nach einer erfolgten Gewichtsreduktion ist es, dieses aufrecht zu erhalten. Aufgrund hoher Rückfallquoten (erneute Gewichtszunahme) und der damit verbundenen Konsequenzen für die Gesundheit, wie z.B. Bluthochdruck (Guagnano et al. 2000), erhöhtes Risiko für Herzattacken und Schlaganfall, etc. (French et al., 1997; Vergnaud et al. 2008), besteht vermehrt Bedarf, die der Gewichtsreduktion zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, um mögliche therapeutische Maßnahmen entwickeln zu können. Studien an Nagern haben gezeigt, dass es während einer Gewichtsreduktion, infolge verminderter Futteraufnahme, zu einer Abnahme im Gesamtenergieverbrauch kommt (Crescenzo et al. 2010). Dies wird insbesondere durch eine Reduktion des Ruheenergieverbrauches hervorgerufen. Erfolgt eine „Refeeding“-Phase mit uneingeschränktem Zugang zum Futter, so steigt der Gesamtenergieverbrauch sukzessiv über einen längeren Zeitraum an, während die Energieaufnahme (kJ/Tag) vom ersten Tag des „Refeedings“ an auf einem hohen Niveau verweilt. Daraus resultieren Energieimbancen während des „Refeedings“, die die Zunahme insbesondere der Fettmasse begünstigen (catch-up fat) (MacLean et al. 2004). Das Verhältnis zwischen Lipidoxidation und –speicherung wird durch das „Refeeding“ zugunsten der Fettspeicherung verschoben. Zusätzlich konnte eine erhöhte de novo Lipogenese nachgewiesen werden (Crescenzo et al. 2010). Es wird angenommen, dass durch das catch-up fat Phänomen vermehrt Entzündungsproteine von Fettzellen sezerniert werden und somit das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen steigt. In Folge einer Gewichtsreduktion kommt es neben der Verminderung an Fettmasse auch zu einer Abnahme der Glukose- und Insulinkonzentration im Blut (Weyer et al. 2000). Bei einer Gewichtszunahme kommt es zu Hyperinsulinämie und einer erhöhten Leptinsekretion, was zu verminderter Insulin- und Leptinsensitivität (Haas et al. 2005) und vermehrter Fettspeicherung im Fettgewebe führen kann. Eine Ernährung mit hohem glykämischen Index reguliert die Expression von Enzymen der Lipidsynthese, wie z.B. ACC (Acetyl-CoA-carboxylase) hoch und derer der Lipidoxidation, wie CPT1 (Carnitin-Palmitoyltransferase 1) herunter (Brand-Miller et al. 2002). Deshalb wird vermutet, dass nach erfolgter Gewichtsreduktion eine Diät mit geringem glykämischen Index einer überschießenden Fettmassezunahme entgegen wirken kann.

Im Mausmodell kann durch Zugabe von Diazoxid zu einer Diät mit hohem GI der Effekt einer Diät mit niedrigem GI pharmakologisch simuliert werden. Diazoxid ist ein Agonist des K⁺-ATP-Kanals, führt dadurch zu einer Hyperpolarisation der Zelle und hemmt somit die Insulinsekretion. Der Einsatz von Diazoxid beim Nagetier führt, neben einer reduzierten Futteraufnahme und Gewichtszunahme, u.a.

zur Verbesserung der Insulinsensitivität, des Lipidprofils und Steigerung der β_3 -adrenergen Funktion (Alemzadeh et al. 2008; Surwit et al. 2000).

Neben den Auswirkungen des catch-up fat Phänomens auf den Glukose- und Insulinstoffwechsel, kommt es ebenfalls zur vermehrten Bildung und Sekretion von Entzündungsmarkern und in diesem Zusammenhang zu einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos.

Da das catch-up fat Phänomen mit erhöhtem oxidativen und inflammatorischen Stress assoziiert wird, gehen wir davon aus, dass es Unterschiede in der Ausprägung dieses Phänomens zwischen ApoE3- und ApoE4-Trägern geben könnte. In der Literatur gibt es bereits Hinweise, dass ApoE4- und ApoE3-Träger unterschiedlich auf diätetische Regime reagieren können (Boesch-Saadatmandi et al. 2009). Nach einem Pilotversuch in C57BL/6J Mäusen zur Etablierung des catch-up fat Phänomens, der indirekten Kalorimetrie und der wirksamen Diazoxidmenge, sollen die Auswirkungen des weight cyclings in ApoE3 und ApoE4 transgenen Mäusen untersucht werden

Literatur

- Alemzadeh R., Karlstad M.D., Tushaus K., Buchholz M., 2008. Diazoxide enhances metabolic rate and fat oxidation in obese Zucker rats. *Metabolism Clinical and Experimental* 57, 1597-1607.
- Boesch-Saadatmandi C., Wolfram S., Minihane A.M., Rimbach G., 2009. Effect of apoE genotype and dietary quercetin on blood lipids and TNF-alpha levels in apoE3 and apoE4 targeted gene replacement mice. *British Journal of Nutrition* 101, 1440-1443.
- Brand-Miller J.C., Holt S.H.A., Powlak D.B., McMillan J., 2002. Glycemic index and obesity. *American journal of clinical Nutrition* 76 (1), 281-285.
- Crescenzo R., Bianco F., Falcone I., Prisco M., Dulloo A.G., Liverini G., Iossa S., 2010. Hepatic mitochondrial energetics during catch-up fat after caloric restriction. *Metabolism Clinical and Experimental* 59, 1221-1230.
- French S.A., Folsom A.R., Jeffrey R.W., Zheng W., Mink P.J., Baxter J.E., 1997. Weight variability and incident disease in older women: the Iowa Women's Health Study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 21, 217-223.
- Guagnano M.T., Ballone E., Pace-Palitti V., Vecchia R.D., D'Orazio N., Manigrasso M.R., Merlitti D., Sensi S., 2000. Risk factors for hypertension in obese women. The role of weight cycling. *European Journal of Clinical Nutrition* 54, 356-360.
- Haas V., Onur S., Paul T., Nutzinger D.O., Bosy-Westphal A., Hauer M., Brabant G., Klein H., Müller M.J., 2005. Leptin and body weight regulation in patients with anorexia nervosa before and during weight recovery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81 (4), 889-896.
- MacLean P.S., Higgins J.A., Johnson G.C., Fleming-Elder B.K., Donahoo W.T., Melanson E.L., Jill J.O., 2004. Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287, 1306-1315.
- Surwit R.S., Dixon T.M., Petro A.E., Daniel K.W., Collins S., 2000. Diazoxide restores β_3 -adrenergic receptor function in diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 141, 3630-3637.

Vergnaud A.C., Bertrais S., Oppert J.M., Maillard-Teyssier L., Galan P., Hercberg S., Czernichow S., 2008. Weight fluctuations and risk for metabolic syndrome in an adult cohort. *International Journal of Obesity* 32, 315-321.

Weyer C., Hanson K., Bogardus C., Pratley R.E., 2000. Long-term changes in insulin action and insulin secretion associated with gain, loss, regain and maintenance of body weight. *Diabetologia* 43, 36-46.

Teilprojekt 3:

Das Projekt basierte auf dem damaligen Stand der Wissenschaft. Darauf aufbauend konnten die Systeme und Protokolle implementiert werden, die dem Stand der Technik entsprachen. Das galt besonders für die quantitative Bestimmung der Körpermasse und der Körperzusammensetzung bei verschiedenen *C. elegans*-Stämmen. Technologisch war es insofern sehr anspruchsvoll, als dass ein derartig hoher Durchsatz der zu testenden verschiedenen DR (dietary restriction)-Systeme im Wildtyp und verschiedenen Mutanten des Fadenwurms bislang noch von keiner Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. In Bezug auf die Analyse der Körperzusammensetzung, die durch DR spezifisch modifiziert wird, haben wir modernste Ansätze an die Gegebenheiten von *C. elegans* adaptiert und die Untersuchungen mittels der von uns etablierten Färbe-Technologie durchgeführt.

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Teilprojekt 1:

Die Isolierung der DNA aus den Fettgewebsbiopsien sowie die Analyse der Genexpression erfolgte in Kooperation mit Dr. Thomas Skurk und Prof. Hans Hauner (Else Kröner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar).

Die Analytik von Endotoxin im Plasma erfolgte in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Ina Bergheim, (Institut für Ernährungsforschung, Friedrich-Schiller-Universität Jena).

Die Analyse der Körperzusammensetzung mithilfe von Bildgebung (Magnetresonanztomographie) erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Heller und Prof. Dr. Claus-Christian Glüer (Klinik für Diagnostische Radiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

Teilprojekt 2:

Die Durchführung der micro-Computertomografie (mi-CT) erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC) des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins in Kiel unter Leitung von Prof. Dr. C. Glüer. Darüber hinaus erfolgte eine intensive Zusammenarbeit mit den anderen Teilprojekten des Projekts „Catch-up fat“. Der Austausch und die

kritische Auseinandersetzung mit den gewonnen Ergebnissen zwischen den einzelnen Teilprojekten war von zentraler Bedeutung für den Erfolg des Vorhabens.

Teilprojekt 3:

Eine sehr intensive Zusammenarbeit mit den anderen Teilprojekten des Projekts „Catch-up fat“ war von zentraler Bedeutung für den Erfolg des Vorhabens. Die Analyse sowie die anschließende bioinformatische Zusammenführung der verschiedenen Daten konnte nur durch eine stringent koordinierte Zusammenarbeit der o.a. TPs erreicht werden.

II Eingehende Darstellung

Hinweis zur Wahrung berechtigter Interessen der Zuwendungsempfänger

Um noch ausstehende Veröffentlichungen nicht zu gefährden, bitten wir darum, die nachfolgend dargestellten Ergebnisse vertraulich zu behandeln.

II.1 Erzielte Ergebnisse

Teilprojekt 1:

Eine basale Charakterisierung der Probanden ist in **Tabelle 2** dargestellt. Probanden der verschiedenen Interventionsgruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich ihres Alters und des Ernährungszustandes.

Tabelle 2 Basale Charakterisierung der Probanden stratifiziert nach Interventionsgruppen.

	50% CHO		65% CHO		ANOVA ¹ <i>p-value</i>
	LGI (n = 8)	HGI (n = 8)	LGI (n = 8)	HGI (n = 8)	
age [y]	27.6 ± 4.2	26.0 ± 4.1	23.1 ± 3.1	25.3 ± 3.2	0.13
BMI [kg/m ²]	22.8 ± 1.6	23.1 ± 1.8	23.8 ± 2.6	24.2 ± 2.0	0.55
FM [%bw]	17.3 ± 6.4	17.6 ± 6.3	19.5 ± 4.8	16.6 ± 6.8	0.81
FFM [kg]	63.8 ± 6.4	61.9 ± 9.7	63.1 ± 5.7	66.5 ± 8.3	0.67

1 differences between groups were tested by one-way ANOVA

Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 3 für alle 4 Interventionsgruppen gezeigt. Alle 4 Refeeding-Diäten unterscheiden sich signifikant in der Glykämischen Last und im Ballaststoffanteil während der Glykämische Index innerhalb der HGI- und LGI-Gruppen nicht unterschiedlich ist und sich die Kohlenhydratzufuhr innerhalb der 50%- und der 65% CHO-Gruppen nicht unterscheidet.

Tabelle 3 Vergleich von Kohlenhydratzufuhr, Glykämischem Index, Glykämischer Last und Ballaststoffgehalt zwischen den Diätgruppen

	50% CHO		65% CHO	
	LGI	HGI	LGI	HGI
CHO [g/d]	481 ± 28^a	481 ± 67^a	634 ± 74^b	647 ± 65^b
Glycemic index	40 ± 3^a	74 ± 3^b	42 ± 2^a	74 ± 2^b
Glycemic load [g/d]	192 ± 13	378 ± 15	273 ± 13	494 ± 17
fiber [g/1000 kcal]	65 ± 5^a	27 ± 4^b	82 ± 7	33 ± 6^b

Means not sharing a common superscript are significantly different from each other

¹ GI veröffentlichten internationalen GI Tabellen entnommen, GI der Kost berechnet nach FAO/WHO, FAO Food Nutr Pap. 1998;66:1-140

² CHO und fiber berechnet mittels PRODI® ³ GL berechnet nach Liu S et al, Am J Clin Nutr 2000; 71:1455-1461

Die Studienteilnehmer nahmen in der Kalorienrestriktion -2,63 ± 0,54kg Fettmasse ab und in der anschließenden Realimentation 1,20 ± 0,63kg Fettmasse wieder zu (beides p<0,001). Der Einfluss der Diäten auf die interstitielle Glykämie im Tagesverlauf ist in **Abbildung 2** für die LGI und HGI Gruppen mit 50% Kohlenhydratzufuhr und in **Abbildung 3** für die LGI und HGI Gruppen mit 65% Kohlenhydratzufuhr, sowie vergleichend für alle 4 Gruppen in **Abbildung 4 a)** dargestellt. **Abbildung 4 b)** zeigt die Beziehung zwischen interstitieller Glykämie im Tagesverlauf und dem mittels Lebensmitteltabellen berechneten GL (GI veröffentlichten internationalen GI Tabellen entnommen, GI der Kost berechnet nach FAO/WHO, FAO Food Nutr Pap. 1998;66:1-140).

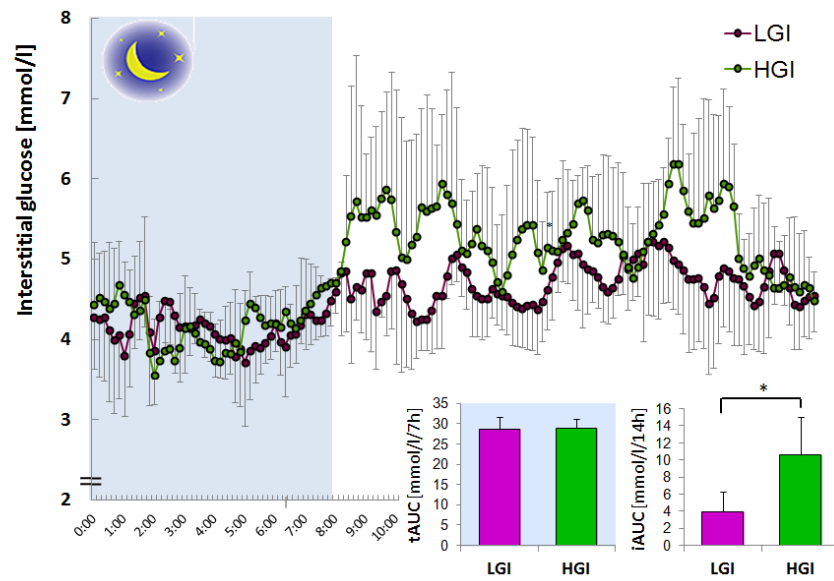


Abbildung 2 Interstitielle Glykämie im Tagesverlauf (als totale und inkrementale Fläche unter der Kurve) bei Probanden mit 50% Kohlenhydratzufuhr und High vs. Low-GI Diät.

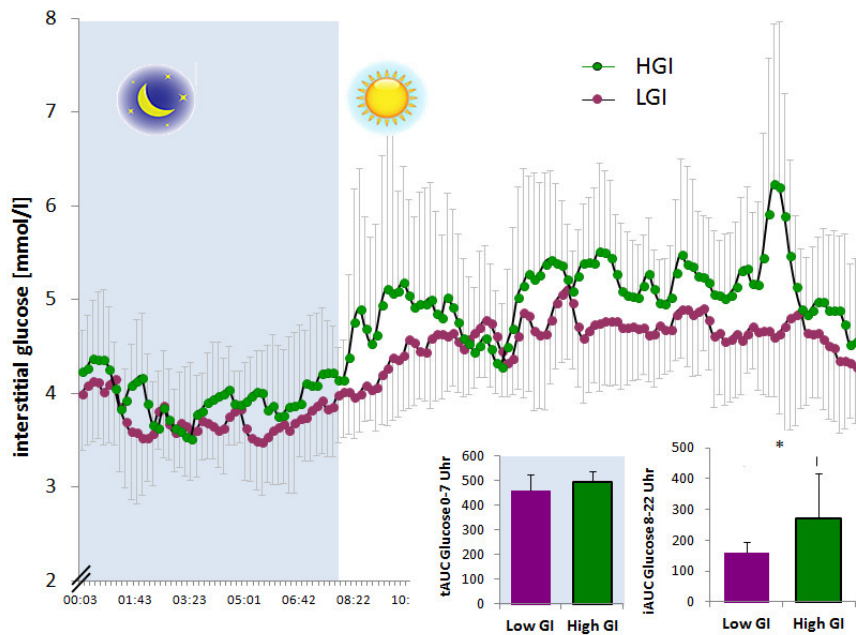


Abbildung 3 Interstitielle Glykämie im Tagesverlauf (als totale und inkrementale Fläche unter der Kurve) bei Probanden mit 65% Kohlenhydratzufuhr und High vs. Low-GI Diät.

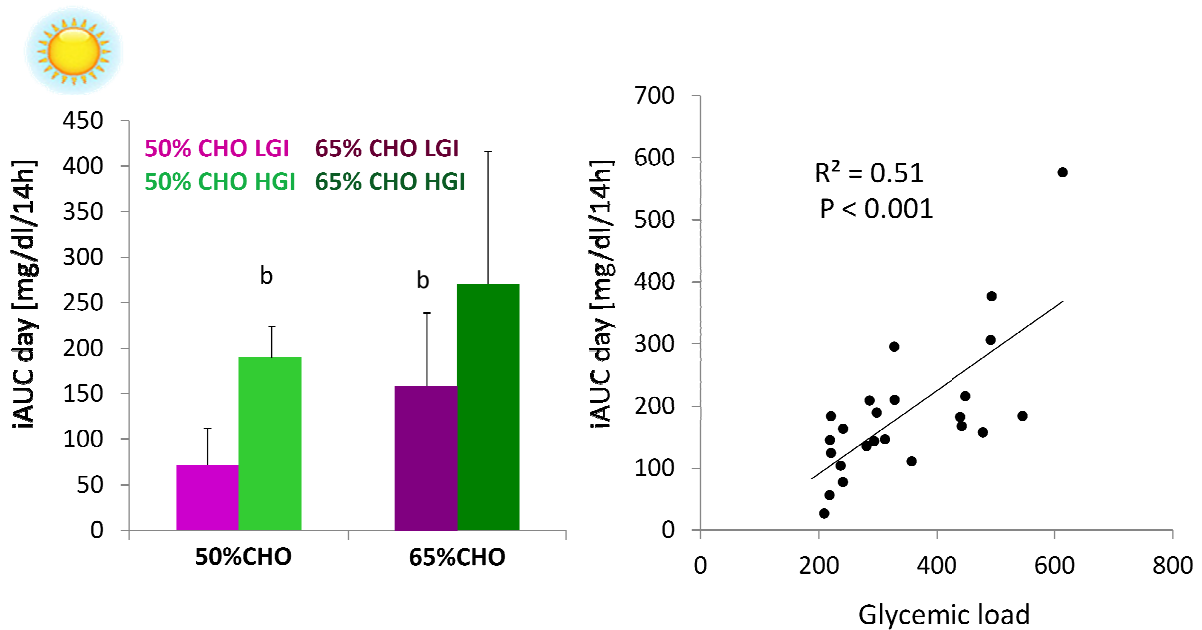


Abbildung 4 a) Vergleich der mittleren inkrementalen Fläche unter der interstitiellen Glukosekurve im Tagesverlauf (kein signifikanter Unterschied zwischen 50%CHO-HGI und 65%CHO-LGI). b) Korrelation zwischen der inkrementalen Fläche unter der interstitiellen Glukosekurve im Tagesverlauf und der Glykämischen Last der Diät (bestimmt über Lebensmitteltabellen).

II.1.1 Einfluss einer kontrollierten Kalorienrestriktion und Realimentation auf die Aktivität des Sympathischen Nervensystems bei gesunden Männern – Assoziation zum Stoffwechsel und Blutdruck

Das Sympathische Nervensystem (SNS) spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Energiebilanz, Stoffwechsel und kardiovaskulärem System. Die Beziehung zwischen SNS-Aktivität und Adipositas ist jedoch umstritten. Eine Störung der SNS-Aktivität könnte sowohl Ursache als auch Auswirkung von Adipositas sein.

Es wurde das Verhalten der SNS-Aktivität bei Veränderungen der Energiebilanz sowie der Einfluss der SNS-Aktivität auf die Körpergewichtsregulation untersucht. Hierfür wurde ein kontrolliertes „nutritives Stressmodell“ in Form eines „Weight cycles“ bei gesunden Normalgewichtigen unter Berücksichtigung der kardialen und der „Gesamtkörper“-SNS-Aktivität durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Einfluss der SNS-Aktivität auf die Stoffwechselfparameter Leptin und Insulin, die Ruheherzfrequenz und den Blutdruck betrachtet.

Nach kalorischer Überernährung (*Overfeeding* und *Refeeding*) wurde ein Anstieg und nach Kalorienrestriktion (CR) eine Drosselung sowohl der kardialen als auch der „Gesamtkörper“-SNS-Aktivität beobachtet. Der Gesamtenergieverbrauch wurde mithilfe von 24h-Herzfrequenzmessung

oder Indirekter Kalorimetrie in Kombination mit dem Sensewear® Armband gemessen. Die mithilfe des Energieverbrauchs und der Energieaufnahme berechnete Energiebilanz war am Studienende rechnerisch positiv. Im Vergleich dazu war die über die Veränderungen in der Körperzusammensetzung gemessene Energiebilanz negativ. Diese Diskrepanz zwischen beiden Energiebilanzen entspricht der „verloren gegangenen Energie“, die sich nicht in Änderungen der Körperzusammensetzung manifestiert hat. Diese korrelierte jedoch nicht mit Veränderungen der SNS-Aktivität. Die Diskrepanz zwischen den Energiebilanzen könnte jedoch auch methodische Ursachen haben: Beide Methoden zur Messung des Gesamtenergieverbrauchs können den AEE unter der Bedingung einer geringen körperlichen Aktivität unterschätzen. Auf der anderen Seite könnte die Fettmassen- und damit die Kalorienzunahme im RF durch die EchoMRI®-Methode unterschätzt worden sein, da diese nicht wie erwartet eine überproportionale Zunahme der Fettmasse gezeigt hat.

Eine individuelle Normalisierung der Gewichts- und Fettmassenveränderungen offenbarte einen Einfluss der SNS-Aktivität auf die Körpergewichtsregulation. Eine geringere Gewichtszunahme im RF korrelierte mit einem höheren Anstieg der SNS-Aktivität und wurde anteilig über die SNS-vermittelten Anpassungen des adjustierten Ruheenergieverbrauchs und der energetischen Effizienz nach CR erklärt.

Insulin- und Leptinspiegel, systolischer und diastolischer Blutdruck sowie die Ruheherzfrequenz sanken während CR. Im RF stiegen alle Parameter bis auf den Blutdruck wieder an. Es konnte ein marginaler Einfluss der SNS-Aktivität auf Veränderungen im Blutdruck und der Herzfrequenz, nicht aber auf die Insulin- und Leptinspiegel festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigte das „nutritive Stressmodel“ einen Einfluss der Energiebilanz auf die SNS-Aktivität. Interindividuelle Unterschiede in der SNS-Aktivität hatten dabei einen Einfluss auf die Körpergewichtsregulation und hämodynamische Risikoparameter (Blutdruck und Herzfrequenz) bei jungen, gesunden, nicht-adipösen Probanden. Eine geringe SNS-Aktivität kann somit ein Risiko für eine positive Energiebilanz und die Entstehung von Übergewicht sein, während eine chronisch positive Energiebilanz durch eine Erhöhung der SNS-Aktivität zum Adipositas-assoziierten kardiovaskulären Risiko beitragen könnte.

II.1.2 Metabolische Flexibilität- Bedeutung für die Regulation des Körpergewichts

Der Begriff „Metabolische Flexibilität“ bezeichnet die Fähigkeit die Makronährstoffoxidation an die -verfügbarkeit anzupassen. Es wurde die Bedeutung der *Metabolischen Flexibilität* für die Gewichtsveränderung und die Partitionierung der Gewichtsveränderung in Fett- und Magermasse während kontrollierter Kalorienrestriktion und Realimentation untersucht.

32 gesunde Männer (Alter $26,0 \pm 3,9$ Jahre; BMI $23,4 \pm 2,0 \text{ kg/m}^2$) nahmen an einer kontrollierten Ernährungsintervention teil. Das Studienprotokoll umfasste 1 Woche Überernährung, 3 Wochen Kalorienrestriktion und 2 Wochen Realimentation mit einer Energiezufuhr von je $\pm 50\%$ des Energiebedarfs. Es wurden zwei Interventionsgruppen gebildet, deren Kost sich in der Makronährstoffrelation unterschied (L-CHO, n=16: 50%, 35%, 15%; H-CHO, n=16: 65%, 20%, 15% Kohlenhydrate, Fette, Proteine). *Metabolische Flexibilität* wurde definiert als (i) Veränderung der basalen Kohlenhydratoxidation (Δ Nüchtern-Respiratorischer Quotient, RQ) während Kalorienrestriktion/Realimentation, (ii) Kapazität die Kohlenhydratoxidation im oralen Glukosetoleranztest zu erhöhen (incremental area under the RQ-curve, iAUC-RQ) und (iii) Differenz zwischen nüchtern und steady state RQ im hyperinsulinämischen Clamp (Δ RQ-Clamp). Veränderungen der Körperzusammensetzung wurden mittels EchoMRI gemessen.

Die Studienteilnehmer nahmen in der Kalorienrestriktion $-2,63 \pm 0,54 \text{ kg}$ Fettmasse ab und in der anschließenden Realimentation $1,20 \pm 0,63 \text{ kg}$ wieder zu (beides $p < 0,001$). Δ RQ betrug in der Kalorienrestriktion $-0,14 \pm 0,05$ und in der Realimentation $0,11 \pm 0,05$ (beides $p < 0,001$). Die iAUC-RQ lag zum Ende der Kalorienrestriktion bei $0,18 \pm 0,14$ und zum Ende der Realimentation bei $0,12 \pm 0,10$. Δ RQ-Clamp betrug zu Studienbeginn $0,07 \pm 0,11$ und zu Studienende $-0,01 \pm 0,07$. Die L-CHO und H-CHO Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Änderungen in der Fettmasse, Δ RQ, Δ RQ-Clamp und der iAUC-RQ nach der Kalorienrestriktion. Die iAUC-RQ war jedoch nach der Realimentation in der L-CHO Gruppe höher ($0,18 \pm 0,09$ vs. $0,05 \pm 0,06$, $p < 0,001$). Die *Metabolische Flexibilität* hatte keinen Einfluss auf die Veränderungen der Körperzusammensetzung in der Kalorienrestriktionsphase. Während der Realimentation war die Zunahme der Fettmasse in der H-CHO Gruppe mit Δ RQ ($r=0,72$, $p < 0,01$) und in der L-CHO Gruppe mit Δ iAUC-RQ ($r=0,58$, $p=0,02$) assoziiert.

Intra-individuelle Unterschiede in der *Metabolischen Flexibilität* hatten einen Einfluss auf die Partitionierung der Gewichtszunahme in der Realimentation. Eine hohe *Metabolische Flexibilität* führte zu einer höheren Fettmassenzunahme.

II.1.3 Einfluss der Energiebilanz, des Glykämischen Indexes und der Kohlenhydratmenge auf die Insulinsensitivität bei gesunden jungen Männern

Es wurde der Einfluss von i) kontrollierten, konsekutiven Phasen von Überernährung, Kalorienrestriktion und *Refeeding* ($\pm 50\text{-}60\%$ des Energiebedarfs) sowie ii) Variationen in KH-Menge und Glykämischen Index (GI) während des *Refeedings* auf Veränderungen der Insulinsensitivität und assoziierte Risikofaktoren untersucht.

Die Auslenkung der Energiebilanz für 1-3 Wochen bewirkte signifikante Veränderungen in der Insulinwirkung: Kalorienrestriktion verbesserte, Überernährung und *Refeeding* verschlechterten die Nüchtern- und postprandiale Insulinsensitivität. Gleichzeitig kam es zu kompensatorischen Veränderungen in der Insulinsekretion. Die Abnahme der Insulinsensitivität im *Refeeding* konnte durch den Verzehr von niedrig-glykämischen, ballaststoffreichen Lebensmitteln, vor allem bei niedriger KH-Aufnahme (niedrige glykämische Last), verringert werden. Sowohl ein hoher GI als auch eine hohe KH-Zufuhr erhöhten die postprandialen Glukosespiegel im Tagesverlauf. Eine hohe KH-Zufuhr führte außerdem zu einem Anstieg des Leberfetts und der Nüchtern-Triglyzeridspiegel. Beide waren am Ende des Gewichtszyklus erhöht und invers zur Insulinsensitivität assoziiert.

Während des hyperkalorischen *Refeedings* hatte eine ballaststoffreiche, niedrig-glykämische Ernährung bei moderater KH-Zufuhr (niedrige glykämische Last) günstige Effekte auf das Blutzuckerprofil, die Insulinsensitivität und den Leberstoffwechsel. Eine hohe Flexibilität der Insulinsensitivität und -sekretion unter den verschiedenen Ernährungsbedingungen war zudem mit einer größeren Gewichtszunahme assoziiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Verzehr von Nahrungsmitteln, die reich an Ballaststoffen sind und einen niedrigen GI haben, nicht nur zur Prävention von metabolischen Risikofaktoren, sondern auch zur langfristigen Gewichtsregulation beitragen kann. Ein besseres Verständnis zum Einfluss der Ernährung auf die Stoffwechselregulation während des *Refeedings* trägt letztlich zur Prävention chronischer Krankheiten wie z.B. Adipositas, Typ-2-Diabetes und koronare Herzerkrankungen bei.

II.1.4 Endokrine Determinanten der Veränderungen von Insulinsensitivität und Insulinsekretion während eines weight cycles

Insulinsensitivität (IS) und Insulinsekretion adaptieren sowohl an eine positive als auch eine negative Energiebilanz und sind an der Regulation des Körpergewichts beteiligt. Mögliche Einflussfaktoren auf diese Veränderungen bei Über- und Unterernährung normalgewichtiger, gesunder Probanden sind wenig bekannt. Zu Beginn, so wie nach Kalorienrestriktion und Refeeding wurden IS (basal: HOMA-IR, postprandial: Matsuda-ISI), Insulinsekretion (Stumvoll-Index, $tAUC_{Ins/Glc}$) und mögliche hormonelle Einflussfaktoren (GLP-1, Ghrelin, Leptin, Adiponektin, Schilddrüsenhormone und Catecholaminausscheidung) bestimmt. Durch die Kalorienrestriktion verbesserte sich die IS und die Insulinsekretion nahm ab. Refeeding führte zu einer Normalisierung der Werte. Die Veränderungen der Leptin- (ΔCR), Adiponektin-, fT3- und TSH- (ΔRF) und Ghrelin-Spiegel (ΔCR , ΔRF) korrelierten mit den Veränderungen der IS, während Veränderungen des Leptin/Adiponektin-Ratios und fT4-Spiegels ($\Delta Refeeding$) mit dem Anstieg der Insulinsekretion korrelierten, (r-Werte zwischen -0,52 und 0,62, $p < 0.05$). 80% der Varianz der postprandialen IS wurden durch die Veränderungen der Ghrelin- und

fT3-Spiegel erklärt. 32% der Varianz der Insulinsekretion wurden durch Veränderungen von Leptin/Adiponektin und fT4 erklärt. Der Abfall der IS während einer Realimentation wird damit anteilig durch sinkende Ghrelin- und steigende fT3-Spiegel erklärt. Der Anstieg der Insulinsekretion korreliert negativ mit der Veränderung des Leptin/Adiponektin-Ratios und dem Abfall von fT4. Ein Manuskript zu dieser Thematik ist in Vorbereitung.

II.1.5 Einfluss der Glykämischen Last auf die Partitionierung von Fett- und Magermasse während eines Weight Cycles

Die Gewichtszunahme im Refeeding war in der 65%CHO-HGI Gruppe signifikant höher als in den anderen Diätgruppen (vgl. **Abbildung 6** und **Tabelle 4**). Darüber hinaus bestand eine Tendenz für eine höhere Fettzunahme in dieser Gruppe (1.7 ± 0.6 vs. 1.0 ± 0.6 kg, $p < 0.05$ bei Vergleich der Untergruppen mit der niedrigsten und höchsten glykämischen Last in einem t-test).

Es bestand die Hypothese, dass sich die glykämischen Last während der Gewichtsab- und zunahme unterschiedlich auf die Gewichts- und Fettzunahme im Refeeding auswirkt. Dies ist dadurch begründet, dass eine Diät mit einer hohen glykämischen Last den Abfall des Insulin- und Leptinspiegels während einer Reduktionsdiät abschwächen könnte, während der überschießende Anstieg dieser Hormone im Refeeding durch eine Kost mit niedriger glykämischer Last vermindert werden kann. Eine „antizyklische Ernährung“ könnte somit der metabolischen und endokrinen Adaptation bei Gewichtsabnahme und in der darauf folgenden Gewichts-Haltephase entgegenwirken und damit den nachhaltigen Diäterfolg verbessern. Übereinstimmend mit dieser Hypothese zeigte sich in einer stufenweisen Regressionsanalyse, dass die glykämische Last während Kalorienrestriktion ein positiver Prädiktor (39% erklärte Varianz) und die glykämische Last während des Refeedings ein negativer Prädiktor der Proteinzunahme (berechnet über die Stickstoffbilanz) im Refeeding war (60% erklärte Varianz des Gesamtmodells). Die Bedeutung einer solchen „antizyklischen Diät“ für die Regulation des Körpergewichts nach einer Gewichtsabnahme muss zukünftig in weiteren Studien mit größerer statistischer Power näher untersucht werden.

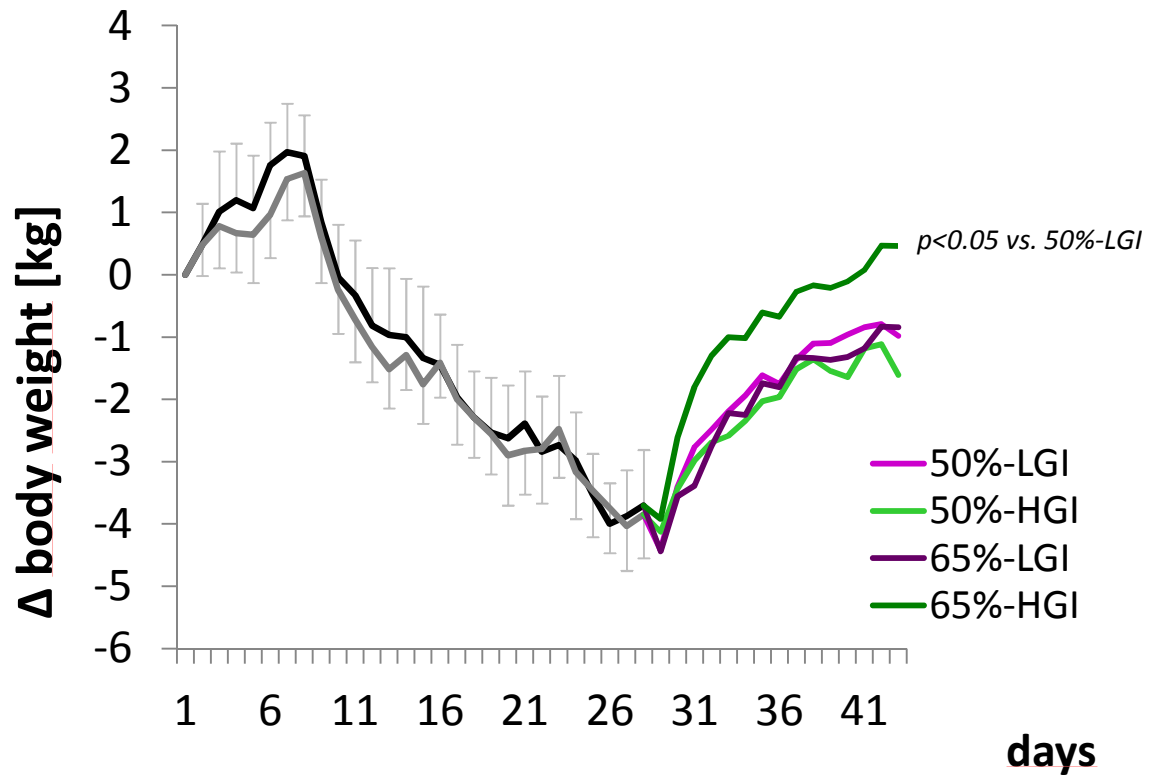


Abbildung 6 Veränderung des Körpergewichts im Studienverlauf stratifiziert nach Diätgruppen

Tabelle 4 Vergleich von Veränderungen des Körpergewichts und der Fettmasse (FM) während der Realimentationsphase zwischen den Interventionsgruppen

	50% CHO		65% CHO	
	LGI (n = 8)	HGI (n = 8)	LGI (n = 8)	HGI (n = 8)
Δ weight [kg]	+3.4 ± 1.1	+2.5 ± 1.1	+3.6 ± 1.0	+4.4 ± 0.6
Δ FM [kg]	+1.0 ± 0.6	+1.1 ± 0.7	+1.0 ± 0.4	+1.7 ± 0.6

Regain in body weight was affected by CHO ($p < 0.01$) and GI x CHO interaction ($p < 0.05$). (*RM-ANOVA, independent factors GI and CHO*) Subjects with 65%CHO diet gained more body weight compared with 50%CHO diet ($p < 0.05$) particularly with HGI meals ($p < 0.01$). No significant between-group differences were observed for fat mass.

Teilprojekt 2:

II.1.1 Pilotversuch mit männlichen C57BL/6J-Mäusen

Im Rahmen des Pilotversuches mit männlichen C57BL/6J Mäusen wurden die indirekte Kalorimetrie, zur Bestimmung des Energieumsatzes, und die micro-Computertomografie (micro-CT), zur Analyse der Körperzusammensetzung, etabliert. Darüber hinaus wurden, gemäß Versuchplan, Genexpressionsanalysen, Messungen des oxidativen/antioxidativen Status sowie Hormonbestimmungen durchgeführt.

Studiendesign

Über den gesamten Zeitraum wurden die Mäuse mit einem fettangereicherten Futter, mit 21% Butterfett und 0,2% Cholesterol, gefüttert, sogenannte „Western type diet“. Zunächst wurden alle Tiere für den Zeitraum von einer Woche ad libitum gefüttert (T0). Anschließend wurden die Tiere in zwei Gruppen mit gleichem Ausgangsgewicht aufgeteilt (Weight-Matching). Während die Kontrollgruppe (A) weiterhin uneingeschränkten Zugang zum Futter hatte, wurde die zweite Gruppe (B) restriktiv gefüttert. Dies entsprach 70% der von der Kontrollgruppe verzehrten Futtermenge des Vortages. Nach dreiwöchiger Futterrestriktion erfolgte eine Refeedingphase ohne (C) und mit Zusatz von Diazoxid (D) über zwei Wochen. Insgesamt wurde die Phase der Futterrestriktion und des Refeedings im Vergleich zum ursprünglichen Antrag zeitlich etwas verlängert.

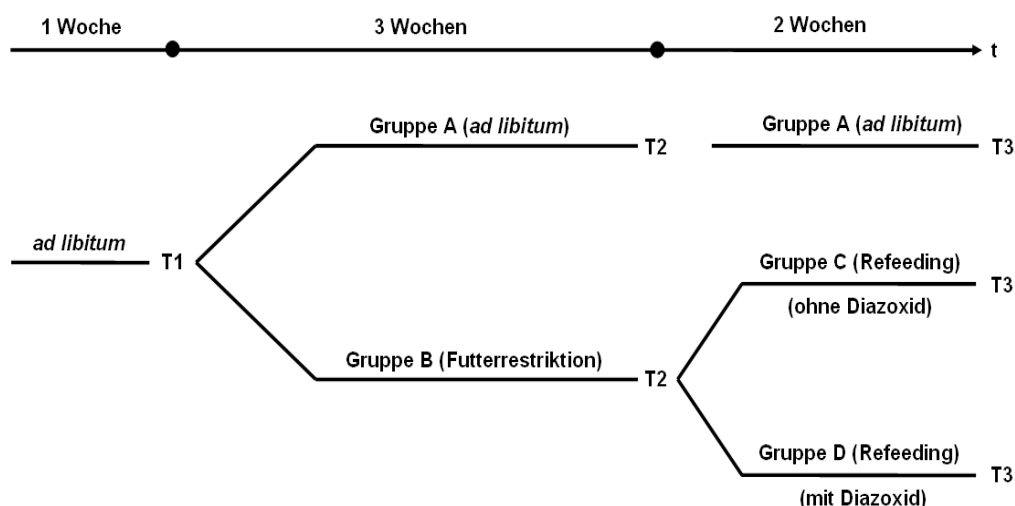


Abbildung 1 Studiendesign des Pilotversuches mit männlichen C57BL/6J Mäusen. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde den Mäusen ein fettangereichertes Futter (21% Butterfett, 0,2% Cholesterol) verabreicht. Während der Phase der Futterrestriktion bekamen die Mäuse 70% der von der Kontrollgruppe A verzehrten Futtermenge des Vortages. Die Refeeding-Phase erfolgte mit und ohne Zusatz von Diazoxid zum Futter.

Körpergewichtsentwicklung und -zusammensetzung

Die Tiere der Kontrollgruppe A haben über den gesamten Versuchszeitraum sukzessive an Körpergewicht (KG) zugenommen ($\Delta\text{KG} +10,5 \text{ g}$), während die Futterrestriktion erwartungsgemäß zu einer Körpergewichtsabnahme ($\Delta\text{KG} -1,8 \text{ g}$) gegenüber des Ausgangsgewichts führte. Das anschließende Refeeding führte zu einer Zunahme des Körpergewichts in den Gruppen C ($\Delta\text{KG} +6,2 \text{ g}$) und D ($\Delta\text{KG} +3,2 \text{ g}$), jedoch in unterschiedlichem Ausmaß in Abhängigkeit von der Zugabe an Diazoxid. Allerdings konnte nach zweiwöchigem Refeeding keine „überschießende“ Körpergewichtszunahme für die Gruppen C und D im Vergleich zur Gruppe A gezeigt werden (Abbildung 2). Das Körpergewicht der Refeedinggruppen war weiterhin signifikant geringer im Vergleich zur Gruppe A.

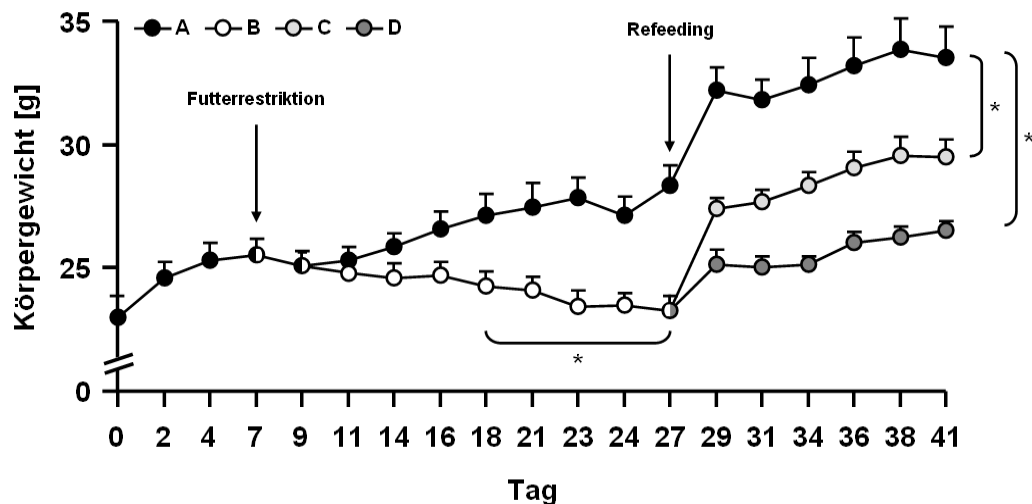


Abbildung 2 Entwicklung des Körpergewichts [g] nach einer Woche *ad libitum* Fütterung, drei Wochen Futterrestriktion und zwei Wochen Refeeding mit und ohne Diazoxid. 7 bis 9 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion; C, Refeeding ohne Diazoxid; D, Refeeding mit Diazoxid. Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

In Zusammenarbeit mit dem Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC, Leitung Prof. Dr. C. Glüer) wurde die micro-Computertomografie (micro-CT) als nicht-invasive Methode zur Analyse der Körperzusammensetzung, insbesondere der Erfassung von subkutanem und viszeralem Fettgewebe, durchgeführt. Die dreiwöchige Futterrestriktion führte zu einer signifikanten absoluten Volumenveränderung (Gruppe B) an viszeralem und subkutanem Fettgewebe (Abbildung 3). Das Refeeding über zwei Wochen führte in der Gruppe C zu einem leichten Anstieg des Volumenanteils, jedoch bleibt der Anteil an subkutanem und viszeralem Fettgewebe hinter der Kontrollgruppe A zurück. Gruppe D nimmt auch im weiteren Verlauf des Refeedings, trotz Körpergewichtszunahme, sowohl an subkutanem als auch viszeralem Fettgewebe weiterhin ab.

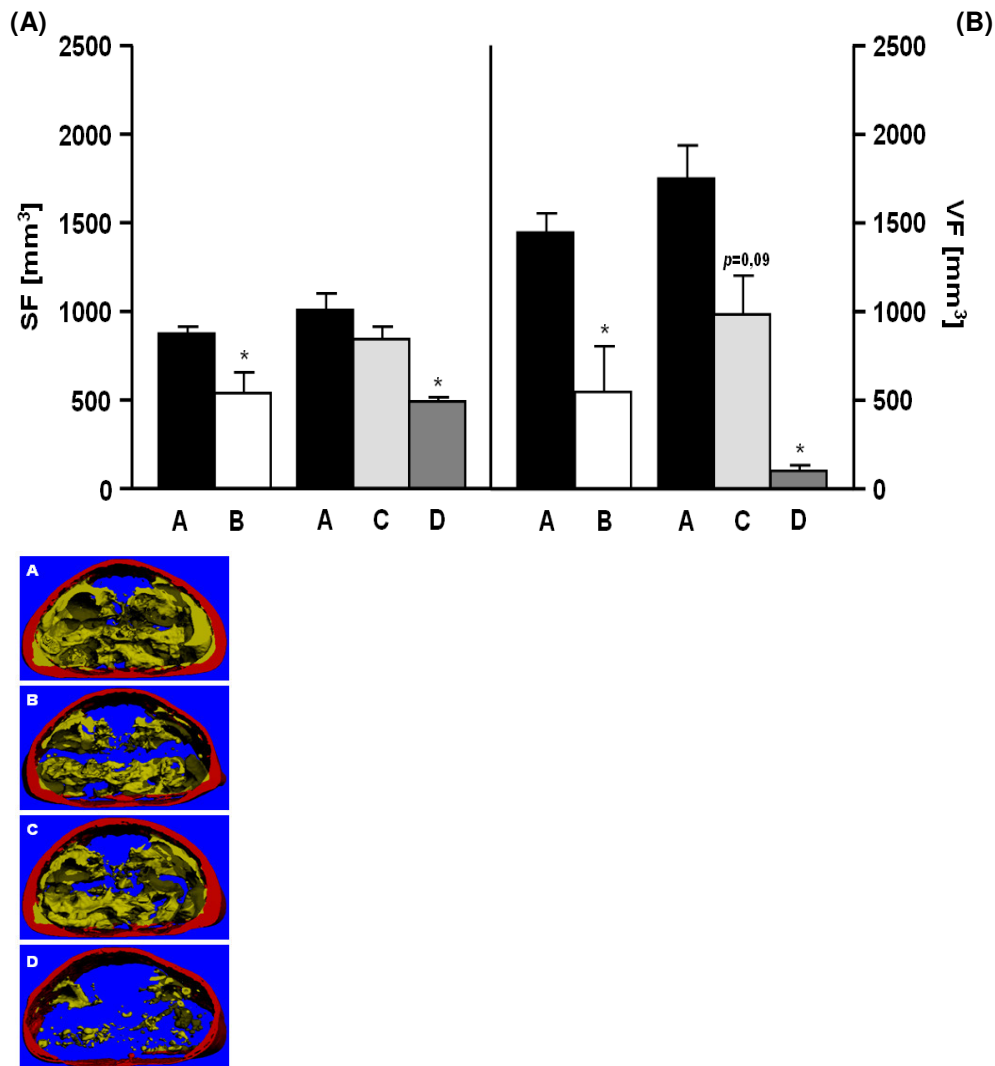


Abbildung 3 (A) Volumenanteil an subkutanem (SF) und viszeralem (VF) Fettgewebe in männlichen C57BL/6J-Mäusen gemessen mittels micro-Computertomografie (micro-CT). (B) Repräsentative micro-CT-Aufnahme jeweils einer Maus aus den Interventionsgruppen A, B, C und D. Die rote Markierung beschreibt das subkutane und die gelbe Markierung das viszerale Fettgewebe. 3 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion; C, Refeeding ohne Diazoxid; D, Refeeding mit Diazoxid. Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Der berechnete prozentuale Anteil an Fettgewebe und fettfreier Masse, das heißt bezogen auf das Körpergewicht, verhält sich jedoch anders als die zuvor gezeigten Daten der absoluten Volumenveränderung (Tabelle 1). Demnach hat die Futterrestriktion keinen signifikanten Einfluss auf das subkutane ($p = 0,13$) und nur einen marginal signifikanten Effekt auf das viszerale Fettgewebe ($p = 0,07$). Lediglich in der Interventionsgruppe D sind die signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe A weiterhin deutlich zu erkennen.

Tabelle 1 Prozentualer Anteil an fettfreier Masse (FFM), Fettmasse (FM), subkutanem (SF) und viszeralem Fettgewebe (VF) nach dreiwöchiger Futterrestriktion und zweiwöchigem Refeeding in männlichen C57BL/6J-Mäusen.

	<i>Restriktion</i>		<i>Refeeding</i>		
	A	B	A	C	D
<i>Körperzusammensetzung [%]</i>					
FFM	92,5 ± 0,34	95,7 ± 1,33	91,4 ± 0,64	94,0 ± 0,83	97,4 ± 0,11 [*]
FM	7,48 ± 0,34	4,26 ± 1,33	8,60 ± 0,64	6,03 ± 0,83	2,57 ± 0,11 [*]
SF	2,83 ± 0,07	2,16 ± 0,35	3,14 ± 0,20	2,79 ± 0,20	1,89 ± 0,08 [*]
VF	4,64 ± 0,27	2,10 ± 0,99	5,45 ± 0,44	3,24 ± 0,66	0,68 ± 0,14 [*]

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Refeeding-Phase nach erfolgter Futterrestriktion zu keiner „überschießenden“ Zunahme des Fettgewebes führt.

Energiemetabolismus

Die Erfassung von Parametern des Energiestoffwechsels erfolgte mittels indirekter Kalorimetrie (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Die Mäuse wurden für 48 Stunden in eigens für die Messung vorgesehenen Käfigen gehalten, die den O₂-Verbrauch und die CO₂-Produktion erfassen. Zunächst wurden die Mäuse für 24 Stunden an die neue Umgebung adaptiert, sodass die in den darauffolgenden 24 Stunden erhaltenen Daten zur Auswertung genutzt wurden. Die O₂/CO₂-Werte (%) wurden zur Berechnung des respiratorischen Quotienten (RQ) und des Energieverbrauches (EV) herangezogen. Der RQ und EV berechnen sich wie folgt:

$$\text{RQ} = \text{VCO}_2 / \text{VO}_2$$

$$\text{EV [kJ/(h*kg}^{0,75}\text{)]} = [(3,941 * \text{VO}_2 + 1,106 * \text{VCO}_2) / 1000] * 4,186.$$

Sowohl die Futterrestriktion als auch das Refeeding haben keinen signifikanten Einfluss auf den 24h-RQ (Abbildung 4A). Das heißt, dass durch die unterschiedlichen Interventionen möglicherweise keine Veränderung in Bezug auf die Nutzung von Hauptnährstoffen zur Energiegewinnung erfolgt. Der über 24 Stunden ermittelte Energieverbrauch (Abbildung 4B) zeigt für die Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe A eine signifikante Abnahme, insbesondere während der Nachtphase, in derer die Mäuse aktiv sind. Nach erfolgtem Refeeding sind keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen zu verzeichnen.

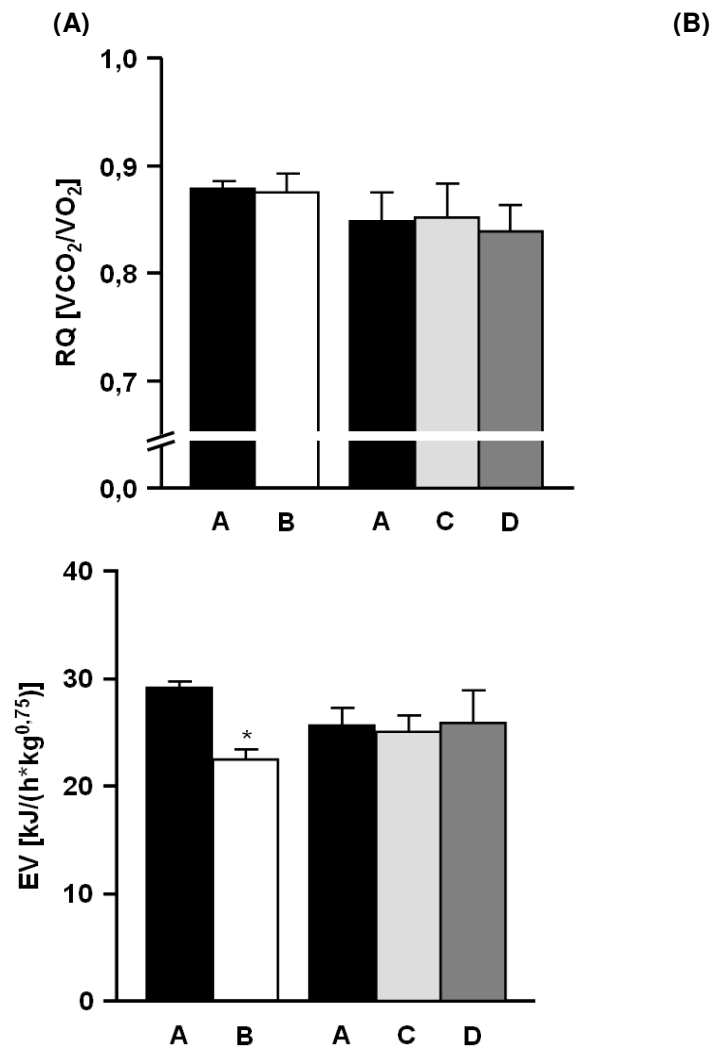


Abbildung 4 (A) Respiratorischer Quotient (RQ [VCO₂/VO₂]) und (B) Energieverbrauch (EV [kJ/(h*kg^{0.75})]) ermittelt über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels indirekter Kalorimetrie. 3 Tiere pro Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion; C, Refeeding ohne Diazoxid; D, Refeeding mit Diazoxid. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. **p*<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Plasmaparameter

Mithilfe von ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) und Assay Kits wurden die Konzentrationen verschiedener metabolischen Parameter, wie Leptin, Adiponektin, Glukose und Insulin im Plasma bestimmt. Leptin und Adiponektin sind Adipokine, die im Fettgewebe gebildet und in das Blut sezerniert werden. In Abhängigkeit vom Körperfettanteil variiert die zirkulierende Konzentration von Leptin und Adiponektin, wobei mit abnehmendem Fettanteil die Konzentration an Adiponektin zunimmt und jene von Leptin abnimmt. Im Zusammenhang mit Übergewicht wird häufig eine erhöhte Blutglukosekonzentration und verminderte Insulinspiegel gemessen, die auf eine Insulinresistenz hindeuten können. Die jeweiligen Konzentrationen der Plasmaparameter sind in der

Tabelle 2 aufgeführt. Gruppe B zeigt signifikante Veränderungen bei den Parametern M und N und dem, aus Beiden, berechnetem Ratio. Nach dem Refeeding sind in der Gruppe fast alle Effekte wieder aufgehoben, in der Gruppe D sind weiterhin Plasmaparameter M und das M/N-Ratio signifikant verändert. Die Parameter O und P sind weder durch die Futterrestriktion noch durch das Refeeding signifikant beeinflusst.

Tabelle 2 Konzentration verschiedener metabolischer Parameter gemessen im Plasma männlicher C57BL/6J-Mäuse nach drei Wochen Futterrestriktion und zwei Wochen Refeeding.

	<i>Restriktion</i>		<i>Refeeding</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
Parameter					
M [ng/mL]	7,63 ± 1,32	4,40 ± 1,20 [*]	17,5 ± 2,17	11,2 ± 3,85	2,30 ± 0,49 [*]
N [µg/mL]	3,64 ± 0,17	4,45 ± 0,22 [*]	3,97 ± 0,16	4,46 ± 0,17	4,64 ± 0,54
Ratio M/N [ng/µg]	2,04 ± 0,29	0,98 ± 0,25 [*]	4,47 ± 0,62	2,49 ± 0,87 [*]	0,53 ± 0,13 [*]
O [mmol/L]	9,06 ± 0,87	11,1 ± 1,60	12,7 ± 1,23	9,56 ± 1,69	10,5 ± 1,66
P [µU/mL]	8,53 ± 1,68	6,57 ± 1,73	6,60 ± 0,72	5,73 ± 0,72	9,02 ± 1,52
Index	3,30 ± 0,76	3,44 ± 1,11	3,71 ± 0,51	2,44 ± 0,50	6,37 ± 1,87

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

„Stress“-Biomarker

Zur Bestimmung von oxidativen Stress wurde ein Marker für Lipidperoxidation herangezogen und sowohl in der Leber als auch im Muskel bestimmt. Die Abbildung 5 zeigt, dass die Futterrestriktion weder in der Leber noch im Muskel einen Einfluss auf die Oxidation von Lipiden hat. Das sich an die Futterrestriktion anschließende zweiwöchige Refeeding zeigt ebenfalls in der Interventionsgruppe C keine Effekte in beiden Geweben, während es in der Interventionsgruppe D zu einer signifikanten Zunahme der hepatischen Lipidperoxidation und zu einer Abnahme im Muskel kommt. Die hepatischen Daten könnten einen möglichen negativen Effekt von Diazoxid, in Hinblick auf vermehrte oxidative Schädigungen, implizieren.

(A)

(B)

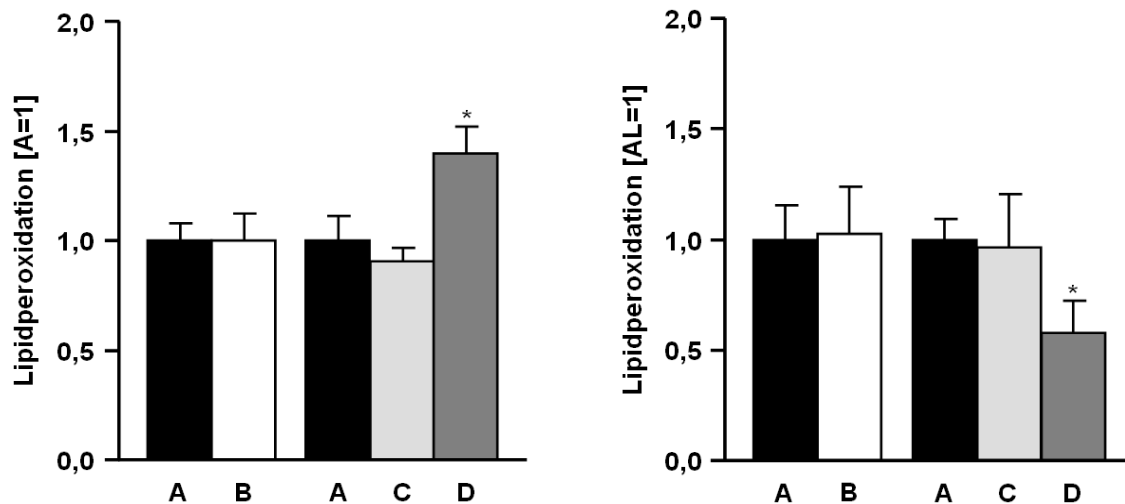


Abbildung 5 Bestimmung der Lipidperoxidation in (A) Leber und (B) Muskel nach dreiwöchiger Futterrestriktion und zweiwöchigem Refeeding. 7 bis 9 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion; C, Refeeding ohne Diazoxid; D, Refeeding mit Diazoxid. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Neben Lipiden können auch Proteine z.B. durch oxidativen Stress geschädigt werden, die entsprechend durch zelleigene Systeme abgebaut werden können. Es gibt im Wesentlichen zwei Systeme, die für den Abbau von z.B. nicht mehr benötigten Enzymen, missgefalteten oder oxidierten Proteinen, oder Zellorganellen zuständig sind. Die Abbildung zeigt, dass die kurzfristige Futterrestriktion zu keinen veränderten Proteinabbauprozessen führt.

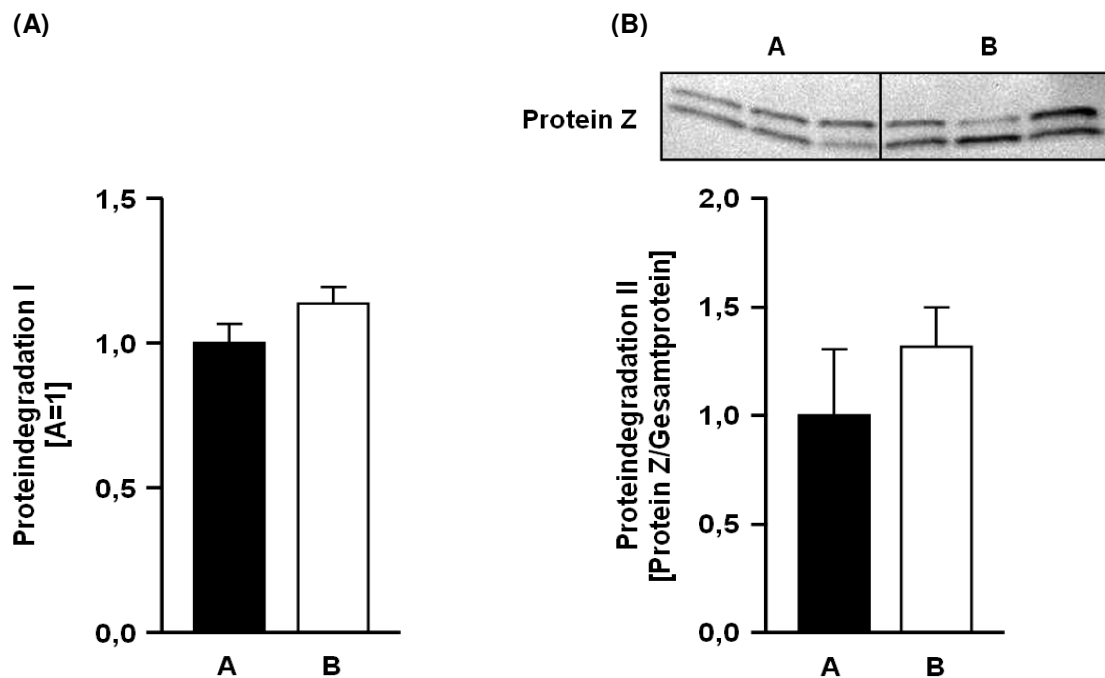


Abbildung 6 Systeme des Proteinabbaus. (A) System I enzymatisch gemessen in Lebergewebe, (B) System II erfasst mittels Western Blot und anschließender densitometrischer Auswertung. 7 bis 9 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion; C, Refeeding ohne Diazoxid; D, Refeeding mit Diazoxid. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben.

Enzymatisches antioxidatives und detoxifizierendes Abwehrsystem

Mithilfe der quantitativen Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden die mRNA-Spiegel verschiedener antioxidativer und detoxifizierender Enzyme, wie z.B. Catalase, Superoxiddismutasen, Hämoxygenase, bestimmt.

In der Gruppe B konnten nach dreiwöchiger Intervention keinen signifikanten Veränderungen in der hepatischen Genexpression der gemessenen Enzyme gezeigt werden. Im anschließenden Refeeding konnte lediglich in der Interventionsgruppe D eine veränderte Expression der Gene U und Z gemessen werden, während alle anderen Gene keine signifikanten Unterschiede zur Gruppe A aufwiesen (Tabelle 3).

Tabelle 3 Relative mRNA-Level antioxidativer und detoxifizierender Enzyme gemessen mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in der Leber von männlichen C57BL/6J-Mäusen nach drei Wochen Futterrestriktion und zwei Wochen Refeeding. Die mRNA-Level der Zielgene wurden auf den Houskeeper β -actin bezogen.

Gen	Restriktion		Refeeding		
	A	B	A	C	D
U	1,00 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,07	0,91 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,09*
V	1,00 $\pm$ 0,34	0,66 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,14	0,71 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,16
W	1,00 $\pm$ 0,11	1,14 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,12	0,86 $\pm$ 0,19
X	1,00 $\pm$ 0,08	1,23 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,09	1,07 $\pm$ 0,20
Y	1,00 $\pm$ 0,33	0,75 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,39	0,69 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,17
Z	1,00 $\pm$ 0,33	0,99 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,19	0,94 $\pm$ 0,12	1,99 $\pm$ 0,30*

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. 7 bis 9 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Im Muskel konnten ebenfalls keine signifikanten Effekte einer Futterrestriktion auf die Expression Enzyme des antioxidativen und detoxifizierenden Abwehrsystems nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der statistisch signifikant erhöhten Gen B-Expression in der Interventionsgruppe D, war die Expression der anderen Gene durch das Refeeding nicht signifikant beeinflusst (Tabelle 4).

Tabelle 4 Relative mRNA-Level antioxidativer Enzyme gemessen mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) im Muskel von männlichen C57BL/6J-Mäusen nach drei Wochen Futterrestriktion und zwei Wochen Refeeding. Die mRNA-Level der Zielgene wurden auf den Houskeeper β -2-Mikroglobulin bezogen.

<i>Gen</i>	<i>Restriktion</i>		<i>Refeeding</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
W	1,00 $\pm$ 0,21	0,79 $\pm$ 0,16	1,00 $\pm$ 0,18	1,02 $\pm$ 0,23	0,94 $\pm$ 0,12
X	1,00 $\pm$ 0,20	0,88 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,21	1,35 $\pm$ 0,20	1,98 $\pm$ 0,34*
Y	1,00 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,15	1,28 $\pm$ 0,13
Z	1,00 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,20	1,23 $\pm$ 0,20

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. 7 bis 9 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Interventionszeitraumes.

Aufgrund der Tatsache, dass weder das „catch-up fat“-Phänomen noch signifikante Effekte auf molekularer Ebene durch das Refeeding dargestellt werden konnten, wurde im Nachfolgenden Augenmerk auf die Effekte der Futterrestriktion gelegt.

Mitochondriale Biogenese

Die mitunter wichtigste Funktion von Mitochondrien ist die Bereitstellung von ATP als Energiequelle. Dies erfolgt über die Elektronentransportkette, welche aus fünf Komplexen besteht. Beim Elektronentransfer kommt es gleichzeitig zum Protonentransport aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum, wodurch eine protonenmotorische Kraft induziert wird. Diese ist letztendlich für die Bildung von ATP an Komplex V zuständig. Als Nebeneffekt der ATP-Bildung durch die Elektronentransportkette kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die jedoch in niedrigen Konzentrationen vielmehr als Signalübermittler fungieren sollen. In einer Studie von Nisoli et al. (2005) wird beschrieben, dass Futterrestriktion (bzw. kalorische Restriktion) den Anteil an Mitochondrien in diversen Organen, wie Gehirn, Leber und Herz, erhöht. Dies äußerte sich in einer induzierten Expression von Transkriptionsfaktoren assoziiert mit mitochondrialer Biogenese und erhöhter Konzentration einiger Atmungskettenkomplexe. Hancock et al. (2011) hinterfragt dies jedoch, da Futterrestriktion den Bedarf an Substratoxidation aufgrund verminderter Substratverfügbarkeit reduziert und somit keine erhöhte mitochondriale Biogenese impliziert. Unsere gemessenen Daten zeigen keine signifikant induzierte Expression von Transkriptionsfaktoren und Genen, die mit der mitochondrialen Biogenese assoziiert sind.

Tabelle 5 Relative mRNA-Level von Genen mitochondrialer Biogenese gemessen mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in der Leber von männlichen C57BL/6J-Mäusen nach drei Wochen Futterrestriktion und zwei Wochen Refeeding. Die mRNA-Level der Zielgene wurden auf den Housekeeper β -actin bezogen.

	A	B
Gen		
R	1,00 $\pm$ 0,27	2,00 $\pm$ 0,57
S	1,00 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,17
T	1,00 $\pm$ 0,32	1,01 $\pm$ 0,17

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. 7 Tiere je Fütterungsgruppe.

Ebenfalls konnte keine erhöhte Proteinkonzentration der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe nach erfolgter Futterrestriktion nachgewiesen werden (Abbildung 7, Tabelle 6).

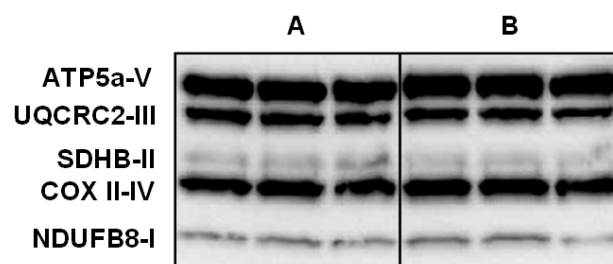


Abbildung 7 Repräsentativer Mito-Profile OXPHOS Western Blot in Leberhomogenaten männlicher C57BL/6J-Mäusen nach drei Wochen Futterrestriktion. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion.

Tabelle 6 Densitometrische Auswertung des MitoProfile OXPHOS Western Blotes in Leberhomogenaten männlicher C57BL/6J-Mäuse nach drei Wochen Futterrestriktion.

	A	B
Komplex		
I (NDUF8)	1,00 $\pm$ 0,14	1,14 $\pm$ 0,17
II (SDHB)	1,00 $\pm$ 0,14	1,19 $\pm$ 0,25
III (UQCRC2)	1,00 $\pm$ 0,10	1,22 $\pm$ 0,18
IV (COX II)	1,00 $\pm$ 0,07	1,17 $\pm$ 0,14
V (ATP5a)	1,00 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,11

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. 7 Tiere je Fütterungsgruppe.

Die Pilotstudie hat uns die Möglichkeit geben, die indirekte Kalorimetrie und die micro-Computertomografie in der Arbeitsgruppe zu etablieren und des Weiteren das Studiendesign für den Versuch mit ApoE-transgenen Mäusen zu überprüfen. Die Ergebnisse dieses Teils haben gezeigt, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein catch-up fat Effekt durch das Refeeding im Anschluss

an eine dreiwöchige Futterrestriktion nachgewiesen werden konnte. Die kurzfristige Futterrestriktion führte zu erwarteten phänotypischen Veränderungen (Reduktion des Körpergewichts, Verminderung der Fettmasse (subkutan und viszeral), Verbesserung einiger Plasmaparameter), jedoch konnten keine deutlichen Veränderungen auf molekularer Ebene beobachtet werden.

II.1.2 Futterrestriktionsversuch mit männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen

Im Rahmen des Hauptversuches wurde der Effekt einer Futterrestriktion in Abhängigkeit vom ApoE-Genotyp untersucht. Dafür wurde das Mausmodell der ApoE3- und ApoE4-transgenen Maus verwendet.

Studiendesign

Die Tiere wurden zunächst für zwei Wochen an ein fettangereichertes Futter (21% Butterfett, 0,2% Cholesterol) adaptiert. Anschließend wurden sowohl die ApoE3- als auch die ApoE4-transgenen Mäuse in jeweils zwei Gruppen mit gleichem Ausgangsgewicht unterteilt (Weight-Matching). Gruppe A erhielt über den weiteren Zeitverlauf weiterhin uneingeschränkten Zugang zum Futter (*ad libitum*). Gruppe B wurde sukzessive an eine 30%-ige Futterrestriktion herangeführt. Das heißt, dass das Futterangebot, bemessen am Futterverbrauch der *ad libitum* Gruppe, jede Woche um 5% reduziert wurde. Ab dem Erreichen der 30%-igen Futterrestriktion wurden die Mäuse für weitere 6 Monate restriktiv gefüttert (Abbildung 8).

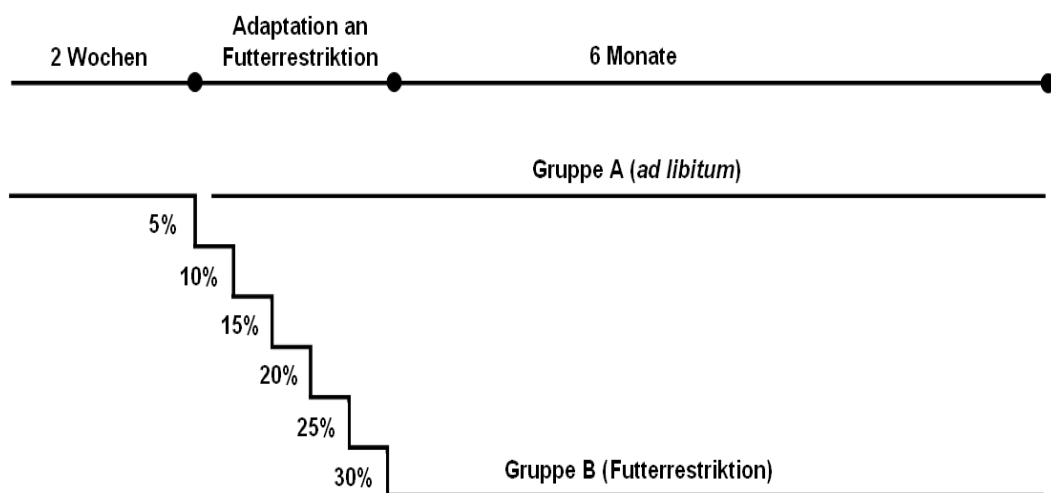


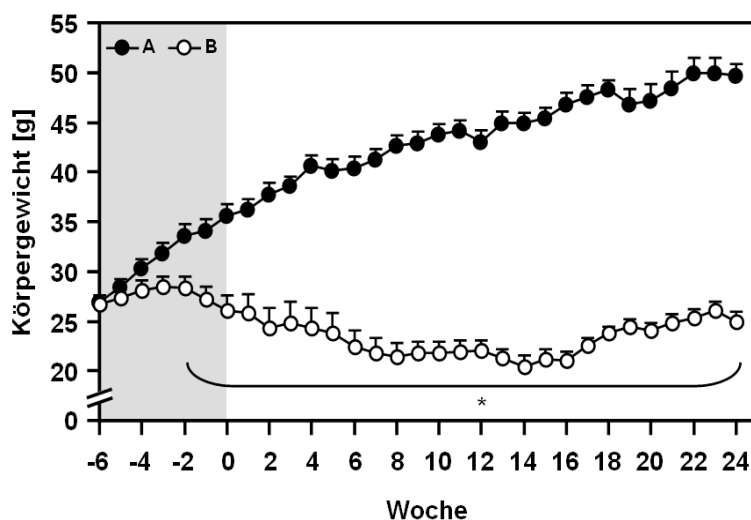
Abbildung 8 Studiendesign des Hauptversuches mit männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde ein fettangereichertes Futter (21% Butterfett, 0,2% Cholesterol) verabreicht. Während der Restriktionsphase bekamen die Mäuse der Gruppe B 30% weniger Futter im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Mäusen der Gruppe A.

Gewichtsentwicklung

Alle Gruppen hatten mit Beginn der Intervention ein ähnliches Ausgangsgewicht ohne signifikante Unterschiede (Mittelwert = $26,9 \pm 0,03$ g). Das bedeutet sowohl für die Gruppen A und B innerhalb eines Genotyps als auch zwischen den Genotypen.

Nach Beendigung der 6-monatigen Futterrestriktion wurde sowohl bei den ApoE3- als auch den ApoE4-transgenen Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und Gruppe B in Bezug auf das Körpergewicht (KG) festgestellt (ApoE3: A = $49,7 \pm 1,10$ g, B = $25,1 \pm 0,84$ g, $p = 0,00$; ApoE4: A = $47,2 \pm 2,38$ g, B = $24,3 \pm 0,78$ g, $p = 0,00$).

(A) ApoE3



(B) ApoE4

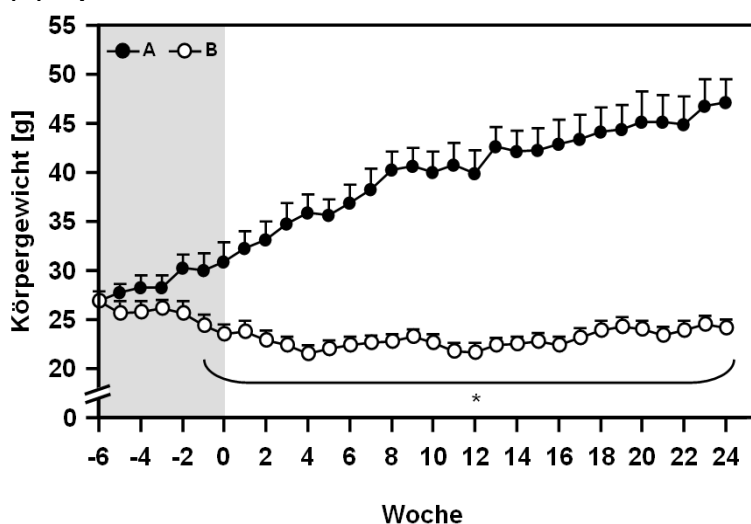


Abbildung 9

Entwicklung des Körpergewichts [g] von männlichen (A) ApoE3- und (B) ApoE4-transgenen Mäusen über insgesamt 30 Wochen, einschließlich einer 6-wöchigen sukzessiven Verminderung des Futterangebotes (graue Schattierung). A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des jeweiligen Genotyps.

Vergleicht man das Ausmaß der Körpergewichtsänderung (Abbildung 10) der jeweiligen Intervention zwischen dem ApoE3- und ApoE4-Genotyp, so können sowohl nach *ad libitum* Fütterung (Δ KG ApoE3 = $+22,8 \pm 1,45$ g; Δ KG ApoE4 = $20,8 \pm 1,65$ g; $p = 0,386$) als auch Futterrestriktion (Δ KG ApoE3 = $-1,8 \pm 0,85$ g; Δ KG ApoE4 = $-2,7 \pm 0,98$ g; $p = 0,494$) keine signifikanten Unterschiede in

der Körpergewichtszu- und -abnahme festgestellt werden. Das heißt, dass die Körpergewichtsveränderung unabhängig vom Genotyp erfolgte.

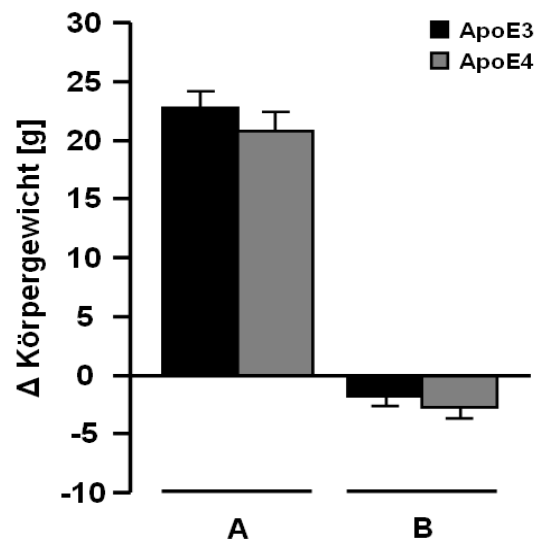


Abbildung 10 Körpergewichtsveränderungen [Δ g] nach 6-monatiger *ad libitum* Fütterung und Futterrestriktion bei männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*, B, Futterrestriktion. Alle Daten sind als Mittelwerte + SEM angegeben.

Indirekte Kalorimetrie

Simultan zum Pilotversuch wurde auch hier die indirekte Kalorimetrie zur Erfassung von Veränderungen im Nährstoff- und Energiemetabolismus durchgeführt.

Die berechneten Daten zum respiratorischen Quotienten (RQ) und Energieverbrauch (EV) wurden zum einen zwischen *ad libitum* und Futterrestriktion innerhalb des ApoE-Genotyps miteinander verglichen, und zum anderen erfolgte der Vergleich zwischen den ApoE-Genotypen nach *ad libitum* Fütterung und Futterrestriktion.

Die Futterrestriktion führt bei den ApoE3-transgenen Mäusen zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden im RQ (Abbildung 11A), während bei den ApoE4-transgenen Mäusen in der Dunkelphase (Daten nicht gezeigt) und nach 24 Stunden die Mäuse unter Futterrestriktion einen signifikanten verminderten RQ zeigen (Abbildung 11B). Dies lässt vermuten, dass diese Mäuse infolge des verminderten Nahrungsangebotes eine veränderte Nutzung von Hauptnährstoffen zur Energiegewinnung aufweisen. Vergleicht man die ApoE3- mit den ApoE4-transgenen Mäusen nach *ad libitum* Fütterung, so haben die ApoE4-Mäuse einen statistisch signifikant höheren RQ ($p = 0,00$). Bei den Mäusen, die eine Futterrestriktion erhalten haben, wurde kein Unterschied ($p = 0,92$) in Abhängigkeit vom Genotyp festgestellt.

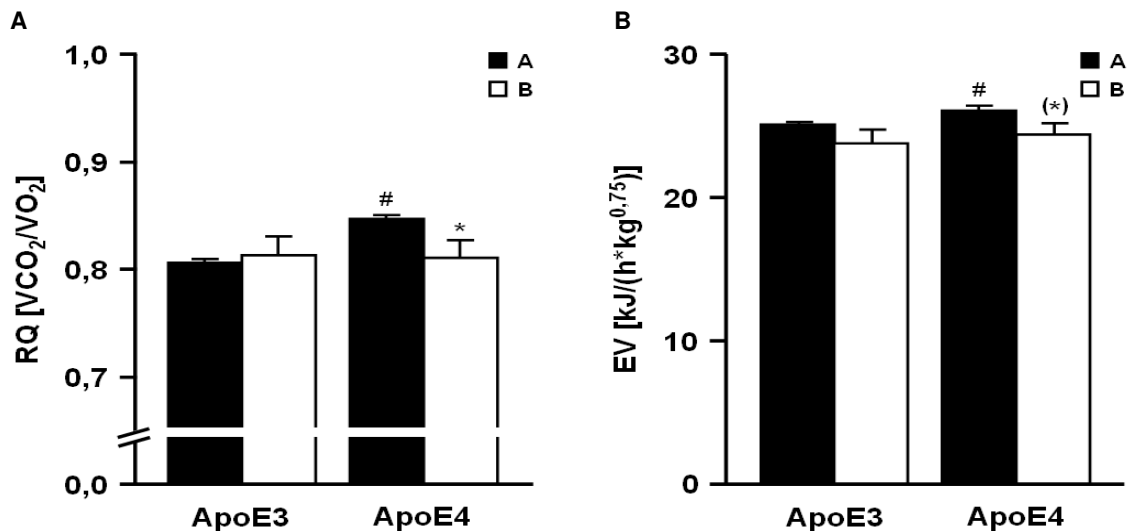


Abbildung 11 (A) Respiratorischer Quotient (RQ [VCO₂/VO₂]) und (B) Energieverbrauch (EV [kJ/(h*kg^{0.75})]) in männlichen ApoE-transgenen Mäusen ermittelt mittels indirekter Kalorimetrie über einen Zeitraum von 24 Stunden. 3 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion. Alle Daten sind als Mittelwerte + SEM angegeben. **p*<0,05, (*)*p*<0,1 im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps; [#]*p*<0,05 im Vergleich zum ApoE3-Genotyp.

Für den EV zeigen sich sowohl bei ApoE3- als auch ApoE4-transgenen Mäusen über einen Zeitraum von 24 Stunden keine statistisch signifikanten Unterschiede nach erfolgter Futterrestriktion (ApoE4 ist marginal signifikant). Bei detaillierter Betrachtung der Daten für die Hell- und Dunkelphase (Daten nicht gezeigt) zeigen restriktiv gefütterte ApoE3- und ApoE4-transgene Mäuse in der Dunkelphase einen erwarteten signifikant verminderten EV.

Ad libitum gefütterte ApoE3- und ApoE4-Mäuse unterscheiden sich signifikant im Energieverbrauch (*p* = 0,04), während nach erfolgter Futterrestriktion keine signifikanten Unterschiede (*p* = 0,63) zu erkennen sind.

Micro-Computertomografie

Die Futterrestriktion über sechs Monate führte zu einer signifikanten Verminderung des absoluten Volumenanteils an subkutanem als auch viszeralem Fettgewebe sowohl bei ApoE3- als auch ApoE4-transgenen Mäusen. Die Abnahme an Fettgewebe ist jedoch vom Genotyp unabhängig (Abbildung 12).

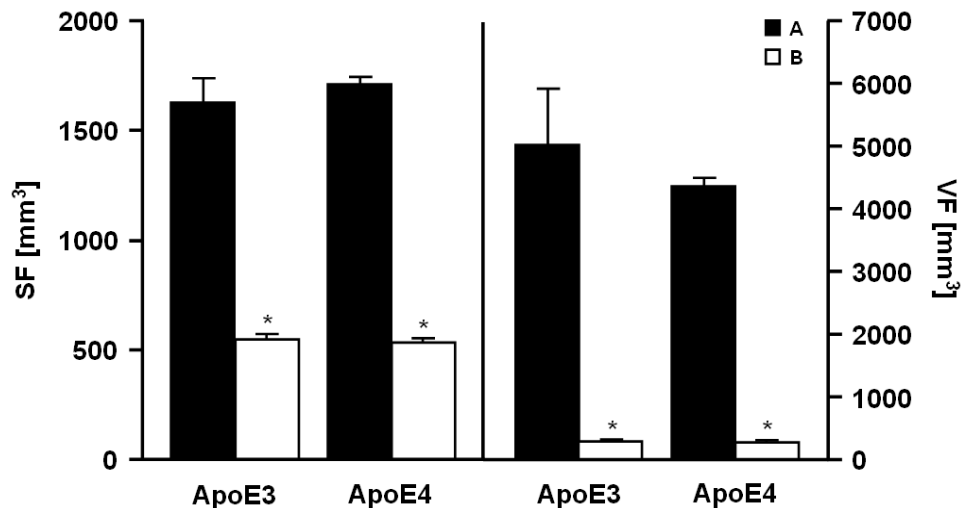


Abbildung 12 Subkutanes (SF) und viszerale (VF) Fettgewebe in männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen gemessen mittels micro-Computertomografie. 3 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps.

Ebenfalls verändert sich der prozentuale Anteil an Fettmasse (FM) und fettfreier Masse nach Futterrestriktion bei beiden Genotypen, ist aber auch hier vom Genotyp unabhängig (Tabelle 7).

Tabelle 7 Prozentualer Anteil an fettfreier Masse (FFM), Fettmasse (FM), subkutanem (SF) und viszeralem Fettgewebe (VF) nach 6-monatiger Futterrestriktion in männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen.

	ApoE3		ApoE4	
	A	B	A	B
Körperzusammensetzung [%]				
FFM	86,8 ± 1,60	96,8 ± 0,14*	87,1 ± 0,25	96,8 ± 0,20*
FM	13,2 ± 1,60	3,19 ± 0,14*	12,9 ± 0,25	3,16 ± 0,20*
SF	3,26 ± 0,13	2,11 ± 0,07*	3,65 ± 0,17	2,08 ± 0,06*
VF	9,96 ± 1,49	1,09 ± 0,12*	9,28 ± 0,13	1,08 ± 0,14*

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps.

Plasmaparameter

Erwartungsgemäß führte die 6-monatige Futterrestriktion zur Verbesserung diverser metabolischer Parameter, wie z.B. Glukose, Insulin, Leptin und Adiponektin. Simultan zu den vorhergehenden Ergebnissen gibt es keine Unterschiede zwischen dem ApoE3- und ApoE4-Genotyp.

Tabelle 8 Konzentration verschiedener metabolischer Parameter gemessen im Plasma männlicher ApoE3- und ApoE4-transgener Mäuse nach 6-monatiger Futterrestriktion.

	ApoE3		ApoE4	
	A	B	A	B
Parameter				
M [ng/mL]	84,8 ± 7,55	1,49 ± 0,32*	84,2 ± 11,4	1,85 ± 0,55*
N [µg/mL]	8,89 ± 0,64	12,0 ± 1,42	9,66 ± 0,97	13,0 ± 1,28
Ratio M/N	9,73 ± 1,00	0,14 ± 0,02*	9,09 ± 1,62	0,16 ± 0,05*
O [mmol/L]	15,3 ± 0,88	8,17 ± 0,25*	15,8 ± 1,19	8,10 ± 0,61*
P [µU/mL]	88,4 ± 15,1	13,1 ± 0,49*	77,4 ± 18,3	14,7 ± 0,64*
Index	58,7 ± 8,53	4,76 ± 0,27*	53,9 ± 13,3	5,33 ± 0,54*

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps.

„Stress“ am endoplasmatischen Retikulum (ER)

Ungefaltete Proteine und andere Trigger, wie z.B. oxidativer Stress induzieren ER-Stress. Daraus resultiert in der Regel eine induzierte Expression von ER-Chaperonen, mit deren Hilfe die Proteine gefaltet werden, und ER-assoziierte Degradationsmechanismen. Eben durch solche induzierten Mechanismen scheint ein moderater Level an ER-Stress protektiv zu sein. Die Futterrestriktion hatte keine nennenswerten signifikanten Effekte auf die Expression von ER-Stress assoziierten Genen und auch zwischen den Genotypen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 9 Relative mRNA-Level von Genen, die mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind, gemessen mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in der Leber von männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen nach sechs Monaten Futterrestriktion. Die mRNA-Level der Zielgene wurden auf den Mittelwert der Houskeeper EF-2 und 18S bezogen.

	ApoE3		ApoE4	
	A	B	A	B
Parameter				
Gen Q	1,20 ± 0,12	1,22 ± 0,42	0,99 ± 0,08	1,61 ± 0,91
Gen R	1,26 ± 0,09	0,78 ± 0,04*	1,14 ± 0,13	0,91 ± 0,13
Gen S	1,12 ± 0,05	1,06 ± 0,09	1,15 ± 0,13	1,46 ± 0,37
Gen T	1,36 ± 0,16	0,96 ± 0,09	1,28 ± 0,24	1,01 ± 0,16

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps.

Ebenfalls konnte kein signifikanter Effekt der 6-monatigen Futterrestriktion, sowie zwischen den Genotypen, auf den Abbau von Proteinen festgestellt werden (Abbildung 13).

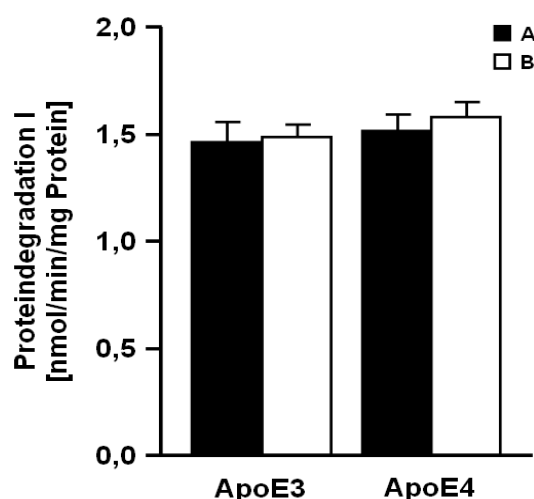


Abbildung 13 System I des Proteinabbaus enzymatisch gemessen in Lebergewebe von männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion. Alle Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben.

Enzymatisches antioxidatives und detoxifizierendes Abwehrsystem

Um Zellen vor etwaigen Schädigungen durch oxidativen Stress zu schützen, gibt es ein komplexes System aus antioxidativen und detoxifizierenden Enzymen, wie z.B. Catalase, Superoxiddismutasen, Glutathionperoxidasen, Hämoxygense. Mithilfe der qRT-PCR wurden die mRNA-Level verschiedener zum Abwehrsystem dazugehöriger Enzyme bestimmt. Die Intervention führt zu einer signifikanten Reduktion der Expressionslevel von Gen U beim ApoE3-Genotyp und Gen X sowohl bei ApoE3- als auch ApoE4. Alle anderen mRNA-Level sind nicht signifikant verändert. Im Vergleich zwischen den Genotypen gibt es weitestgehend keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Expression von Gen Y war bei den ApoE4-Mäusen nach der Intervention signifikant gegenüber ApoE3 erhöht.

Tabelle 10 Relative mRNA-Level antioxidativer und detoxifizierender Enzyme gemessen mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) in der Leber von männlichen ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen nach 6 Monaten Futterrestriktion. Die mRNA-Level der Zielgene wurden auf den Mittelwert der Houskeeper EF-2 und 18S bezogen.

	ApoE3		ApoE4	
	A	B	A	B
Komplex				
Gen U	0,91 ± 0,06	0,62 ± 0,06*	1,05 ± 0,16	0,63 ± 0,12
Gen V	1,29 ± 0,08	1,16 ± 0,04	1,39 ± 0,20	1,38 ± 0,12
Gen W	1,42 ± 0,15	0,81 ± 0,01*	1,11 ± 0,14	0,61 ± 0,10*
Gen X	1,77 ± 0,10	0,62 ± 0,16*	1,40 ± 0,16	1,23 ± 0,88
Gen Y	1,05 ± 0,05	1,03 ± 0,07	1,33 ± 0,16	1,43 ± 0,11 [#]
Gen Z	0,90 ± 0,09	0,76 ± 0,07	1,13 ± 0,18	0,97 ± 0,19

Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps. [#] $p < 0,05$ im Vergleich zum ApoE3-Genotyp.

Mitochondriale Biogenese

Die densitometrische Auswertung des MitoProfile OXPHOS Western Blotes ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen dem ApoE3- und dem ApoE4-Genotyp (Abbildung 14, Tabelle 11). Jedoch ist die Proteinkonzentration des Atmungskettenkomplexes I bei beiden Genotypen signifikant nach erfolgter Futterrestriktion erhöht. Im Gegensatz zur Pilotstudie, in derer nach der dreiwöchigen Futterrestriktion keine Veränderungen gezeigt werden konnte, scheint die längerfristige Restriktion einen deutlicheren Effekt zu haben. Jedoch sollten hier die unterschiedlichen Mausstämme berücksichtigt werden.

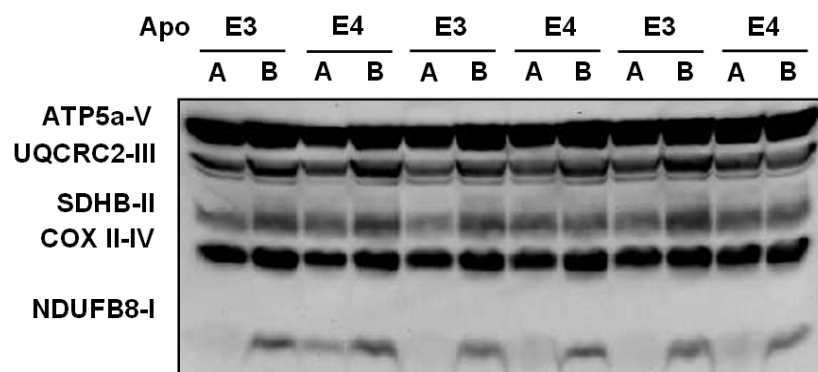


Abbildung 14 Repräsentativer MitoProfile OXPHOS Western Blot in Leberhomogenaten männlicher ApoE3- und ApoE4-transgener Mäuse nach 6 Monaten Futterrestriktion. A, *ad libitum*; B, Futterrestriktion.

Tabelle 11 Densitometrische Auswertung des MitoProfile OXPHOS Western Blotes in Leberhomogenaten männlicher ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen nach 6 Monaten Futterrestriktion.

	ApoE3		ApoE4	
	A ¹	B ¹	A ¹	B ¹
Parameter				
I (NDUF8)	0,36 ± 0,07	1,41 ± 0,22*	0,71 ± 0,19	1,61 ± 0,11*
II (SDHB)	2,56 ± 0,36	3,39 ± 0,54	3,25 ± 0,33	3,43 ± 0,40
III (UQCRC2)	4,28 ± 1,15	5,33 ± 0,83	3,97 ± 0,39	5,11 ± 0,50
IV (COX II)	9,16 ± 1,74	10,3 ± 0,93	8,16 ± 0,96	9,13 ± 0,20
V (ATP5a)	16,1 ± 2,18	16,6 ± 1,27	15,3 ± 1,51	15,7 ± 0,95

Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben. 5 bis 6 Tiere je Fütterungsgruppe. ¹ Alle Werte müssen mit dem Faktor 10⁷ multipliziert werden. **p*<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe A des selbigen Genotyps.

Teilprojekt 3:

In dem TP wurden zunächst Genexpressionsanalysen durchgeführt, um evolutionär konservierte Gene zu identifizieren, die für das CFP von Relevanz sind. Hierdurch konnten Kandidatengene identifiziert werden, die im weiteren Projektverlauf einer funktionellen Analyse zugeführt wurden. Hierfür wurden im ersten Schritt die Genexpressionsdaten aus *C. elegans* systematisch ausgewertet. Es wurden im Larvenstadium 1.606 Gene identifiziert, im adulten Wurm sind 13.299 Gene unter Nahrungsrestriktion reguliert. Im nächsten Schritt wurden die Gene herausgefiltert, die unter verschiedenen Bedingungen der Nahrungsrestriktion (Dietary Restriction (DR)), im Larvenstadium und im adulten Wurm signifikant reguliert sind. Hierdurch konnten 119 Gene identifiziert werden. Diese Gene wurden mit Hilfe der GO-Terminologie funktionell annotiert

Weiterhin wurden die identifizierten *C. elegans*-Gene mit denen aus Maus und Mensch hinsichtlich ihrer Homologie miteinander verglichen. Hierfür wurde ein bioinformatischer Algorithmus verwendet, der auf der Grundlage von Homologievergleichen eine speziesübergreifende Orthologiematrix verwendet. Dabei werden auch Genfamilien berücksichtigt. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurden mehr als 20 evolutionär konservierte Gene identifiziert, die im Kontext des CFP von Relevanz sind.

Basierend auf den Genexpressionsanalysen wurden *C. elegans* Stämme zudem ausführlich phänotypisiert. Hierzu wurden auch Analysen zur Geschlechtsspezifität durchgeführt. Es erfolgten außerdem weitere Genexpressionsanalysen, die sich aus den Phänotypisierungen ergaben. Die ursprünglich formulierten Hypothesen haben sich im Laufe des Projektes größtenteils bestätigt. Bezüglich der Genexpression (z. B. Lectin-Gene) konnten weitere Hypothesen formuliert werden, die zur Erklärung des CFP beitragen.

Es ist gelungen, das CFP in *C. elegans* zu rekapitulieren. Für diese Untersuchungen wurde ein standardisiertes Nahrungsrestriktions (DR)-Protokoll entwickelt, das auf einer Verdünnungsreihe der bakteriellen Nahrungsquelle auf Festmedium und auf der Verwendung einer konstanten Anzahl von Würmern beruht. Um die Methode zu validieren, wurde die Wirkung auf bereits gut untersuchte DR-Parameter, wie die Lebensdauer und die pharyngeale Pumprate untersucht. Moderate als auch drastische DR führten zu einer erhöhten Lebensdauer. Es wurde zudem gezeigt, dass die Verminderung der Nahrungsmenge nicht durch eine eventuell erhöhte Pumprate kompensiert wird. Des Weiteren wurde der Einfluss von DR auf die Bildung des Alterungspigments Lipofuscin untersucht. Spektrofluorometrische und fluoreszenz-mikroskopische Analysen ergaben, dass DR im

Vergleich zur ad libitum Bedingung zu einer verminderten Ansammlung des Alterungspigments in adulten Würmern führte.

Um den Einfluss von DR auf die Körperzusammensetzung zu untersuchen, wurde der Triglycerid- sowie der Proteingehalt bestimmt und das Verhältnis der Fettmasse zur fettfreien Masse berechnet. Sowohl moderate als auch drastische DR führten zu einer Zunahme der Fett- zur fettfreien Masse in Larven und in adulten Würmern. Die fixative Färbung der lipid droplets zeigte, dass DR zu einer deutlichen Vergrößerung der Fettspeicher in intestinalen und hypodermalen Zellen führte. In den Larvenstadien L2 und L4 waren vergrößerte lipid droplets in beiden Zelltypen in großer Anzahl nachweisbar. Im Unterschied dazu wurden im adulten Stadium vergrößerte Fettspeicher hauptsächlich in der Hypodermis nachgewiesen. Die quantitative Analyse von BODIPY 493/503 gefärbten lipid droplets ergab, dass der Volumenanteil der großen lipid droplets (größer als 50 μm^3) am Volumen aller lipid droplets in restriktiv ernährten L2 und L4 Larven um das fünf- bis sechsfache höher war als in ad libitum ernährten Tieren.

Weiterhin wurde das DR-Protokoll angewendet, um zu prüfen, ob das CFP auch transgenerational nachweisbar ist. Hierzu wurden Männchen einer DR ausgesetzt und anschließend mit Hermaphroditen verpaart. Danach wurde der Fettgehalt der resultierenden Nachkommen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass das CFP auch in der F1-Generation nachweisbar ist (Miersch et al., 2012)

Die skizzierten Untersuchungen wurden weiterhin mit einer Reihe von Mutanten durchgeführt. Hierzu gehören z. B. fat, srebp, sams, daf, him, lon. Mutanten sind in ihrer Körperzusammensetzung teilweise deutlich verändert und weisen phänotypische Merkmale auf, die an das CFP erinnern. Hierdurch konnten Hypothesen zu den Mechanismen des CFP abgeleitet werden. Weiterhin wurde das CFP im Hinblick auf Geschlechtspezifität untersucht. Hierzu war es notwendig, Hermaphroditen und Männchen zunächst vergleichend im Hinblick auf ihre Körperzusammensetzung zu untersuchen. Unter ad libitum Bedingungen zeigten beide Geschlechter ein ähnliches Verhältnis von Fettmasse zur fettfreien Masse, obwohl Männchen über 50 % kleiner sind als Hermaphroditen. Im Gegensatz dazu, wiesen Männchen einen 2-fach geringeren RNA Gehalt auf. Biochemische und NMR-basierte Methoden zeigten weiterhin, dass Männchen höhere Trehalose aber niedrigere Glukose Werte im Vergleich zu Hermaphroditen besitzen. Diese Geschlechtsunterschiede spiegelten sich deutlich auf Genexpressionsebene wieder. Gene von Schlüsselenzymen der Glykolyse und der Trehalosesynthese wurden in Männchen höher exprimiert als in Hermaphroditen. Das Gen der Phosphofruktokinase (C50F4.2) zeigte dabei mit einer 29-fach höheren Expression in Männchen einen deutlichen

Unterschied zu Hermaphroditen. Die weitere Analyse der Genexpressionsdaten identifizierte 285 Gene spezifisch für Männchen und 160 Gene spezifisch für Hermaphroditen. Innerhalb dieser Gene fanden sich viele Transkriptionsfaktoren und C-Typ Lektine. Besonders auffällig war, dass von allen C-Typ Lektinen in *C. elegans* über 35 % höher in Männchen exprimiert wurden.

Unter Nahrungsrestriktion (NR) konnte in Hermaphroditen wie auch in Männchen ein relativer Anstieg der Fettmasse und eine Vergrößerung der Fetttröpfchen festgestellt werden. Beide Geschlechter reduzierten ihre Körpermasse und ihren Proteingehalt mit wesentlich deutlicheren Effekten in Hermaphroditen. Das CFP konnte somit in beiden Geschlechtern von *C. elegans* nachgeahmt werden. Zusätzlich war der RNA-Gehalt in Hermaphroditen deutlich abgesenkt, während bei den Männchen keinerlei Veränderungen messbar waren. Mit Hilfe einer Anreicherungsanalyse der Genexpressionsdaten konnte gezeigt werden, dass es unter NR zu einer verminderten Expression von Embryogenese-Genen in Hermaphroditen kommt. Außerdem blieb die unter ad libitum beobachtete Absenkung der Transkriptspiegel von spermien-spezifischen Genen unter NR Bedingungen aus.

Insgesamt konnten die geplanten Arbeiten im Berichtszeitraum vollständig abgeschlossen werden. Es wurden wichtige Befunde zur Genexpression des CFP erhoben. Hervorzuheben ist die Verknüpfung der Genexpressionsdaten mit den phänotypischen Analysen.

II.2 Darstellung der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Teilprojekt 1:

Ein bedeutender Posten waren die Personalkosten für wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeiter. Des Weiteren wurde ein Teil der bewilligten Personalmittel aufgrund der aufwendigen Humanstudie und der damit einhergehenden intensiven Probandenbetreuung für Hiwis umgewidmet. Sowohl im Hinblick auf die Gehaltszahlungen als auch auf die verbrauchten Sachmittel (wie Laborbedarf, Lebensmittel, Untersuchungsmaterial und Analytikskosten) entsprechen die für den Projektzeitraum von 3 Jahren geplanten und anschließend bewilligten Summen einander. Die Ausgaben wurden entsprechend des Antrages getätigt.

Teilprojekt 2:

Die bewilligten Mittel sind primär für die entstandenen Kosten durch das mit der Bearbeitung des Projektes betrauten qualifizierten Personals sowie für Sachmittel angefallen. Mit Beginn des

Projektes wurde die indirekte Kalorimetrie (Investition) zur Erhebung von Daten des Energiestoffwechsels angeschafft (eine weitere Nutzung ist auch für nachfolgende Projekte möglich). Alle übrigen Kosten sind, gemäß Versuchsplan, für Verbrauchsmaterialien angefallen (z.B. Western-Blot-Antikörper, ELISA, Kits und Primer zur Durchführung von PCRs). In der Summe sind die für den gesamten Projektzeitraum geplanten und beantragten Kosten eingehalten worden.

Teilprojekt 3:

Eine wichtige Position waren die Ausgaben für die Verbrauchsmittel, die entsprechend der Planung und der experimentellen Ansätze verauslagt wurden. Wichtige Posten waren hier Microarrays sowie Materialien (z. B. Medien, Plastikwaren, biochemische Kits) für die umfangreichen *C. elegans* Experimente. Eine weitere wichtige Position bezog sich auf die Einstellung eines Postdoktoranden für die Projektlaufzeit. Es wurde ein Postdoktorand eingestellt, der über die notwendigen Erfahrungen und Kenntnisse im Bereich der Molekularbiologie und *C. elegans* Forschung verfügte, um das Projekt zu realisieren. Insgesamt wurden die Ausgaben entsprechend der Antragstellung getätigt.

II.3 Darstellung der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Teilprojekt 1:

Für alle durchgeführten Untersuchungen am Menschen wurde die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel eingeholt. Es wurden nur Interventionen durchgeführt, die im Sinne der Beantwortung der Fragestellung wichtig waren. Die differenzierte Analyse der Körperzusammensetzung war dabei als primäre Zielgröße vorrangig. Der Einsatz von NMR (nuclear magnetic resonance) ermöglichte die sehr präzise, valide und dabei nicht-invasive Messung kleiner Veränderungen der Körperzusammensetzung (Fett- und Magermasse) im Studienverlauf. Die Analyse der Körperfettverteilung und des Leberfettgehaltes erfolgte in einem konventionellen MRT. Sekundäre Zielgrößen wie die metabolische Adaptation (SNS-Aktivität, Insulinsensitivität, metabolische Flexibilität und adaptive Thermogenese) wurden mit etablierten Goldstandardverfahren gemessen (z.B. indirekte Kalorimetrie, hyperinsulinämischer euglykämischer Clamp, OGTT). Alle genannten Methoden wurden wie beantragt durchgeführt.

Teilprojekt 2:

Die durchgeführten Arbeiten sowie die dafür verwendeten Ressourcen, sowohl materiell als auch personell, waren notwendig und angemessen, um das Projekt erfolgreich durchführen und abschließen zu können. Die im Rahmen dieses Projektes gewonnen Erkenntnisse eines jeden

einzelnen Teilprojektes, haben zum Erfolg des Gesamtprojektes beigetragen. Des Weiteren ergeben sich hierdurch neue Grundlagen für zukünftige Forschungsvorhaben.

Teilprojekt 3:

Im Rahmen der Projektarbeit hat sich gezeigt, dass die geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen waren um das geplant Projekt erfolgreich abschließen zu können. Wie in dem Ergebnisbericht ausführlich dargelegt, haben alle Projektbereiche zum Erfolg des Gesamtkonsortiums beigetragen. Das galt insbesondere für die Anwendung des translationalen Ansatzes. Diese sehr umfangreichen Arbeiten waren Grundlage für andere Projekte des Konsortiums und können Einfluss auf spätere Verwertungsoptionen haben.

II.4 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Teilprojekt 1:

Die Ergebnisse des Teilprojekts 1 sind direkt auf Ernährungsempfehlungen übertragbar. Diese richten sich sowohl an übergewichtige und adipöse Gesunde, die Gewicht abnehmen wollen, als auch an Patienten mit Typ 2 Diabetes. In letzterem Fall sind die Ergebnisse des Projektes bereits in eine aktuelle Übersichtsarbeit zu modernen Ernährungskonzepten bei Typ 2 Diabetes eingeflossen (Anja Bosy-Westphal und Manfred J Müller, Moderne Ernährungskonzepte bei Typ 2 Diabetes, Diabetologe 2014;10:115–121):

Eine kontrollierte Ernährungsintervention zum Einfluss des GI/GL auf die Blutzuckerregulation hat im Vergleich zu epidemiologischen Studien weniger methodische Nachteile da sie die Ernährung genau vorgeben kann. Um die Bedeutung der Ernährung für die Entstehung von metabolischen Risiken bei Gesunden zu untersuchen muss jedoch eine Art „nutritives Stressmodell“ wie z.B. eine kalorische Unter- oder Überernährung ausgeübt werden. In einer kontrollierten Ernährungsstudie wurde der Einfluss von Variationen in Kohlenhydratmenge und GI auf Veränderungen der Insulinsensitivität während der *Realimentation* nach einer Gewichtsabnahme bei gesunden normalgewichtigen Probanden untersucht. Sowohl der überwiegende Verzehr von Lebensmitteln mit einem höheren GI als auch eine hohe Kohlenhydratzufuhr erhöhten die postprandialen Glukosespiegel im Tagesverlauf signifikant. Die Abnahme der Insulinsensitivität im *Refeeding* konnte durch den Verzehr von niedrig-glykämischen, ballaststoffreichen Lebensmitteln, vor allem bei einer niedrigen glykämische Last, verringert werden. Eine hohe Kohlenhydratzufuhr (65% der Energiezufuhr) führte außerdem zu einem Anstieg des Leberfetts und der Nüchtern-Triglyzeridspiegel. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine niedrige glykämische Last Insulinsensitivität und Insulinbedarf bei Gesunden günstig beeinflusst.

Ein niedriger GI ist geeignet, die Glukosetoleranz und das Körpergewicht bei Frauen, die einen Gestationsdiabetes in der Anamnese haben, zu verbessern (Shyam S et al. (2013) Nutr J 24;12:68.). Eine niedrig GI/GL-Diät war sowohl in der Women's Health Study als auch in Langzeitstudien zu niedrigeren CRP-Spiegeln bzw. einem günstigeren Lipidprofil assoziiert (Schwingshackl L and Hoffmann G (2013) Nutr Metab Cardiovasc Dis 23(8):699-706. Levitan EB et al. (2008) Metabolism 57:437-443.). Ein niedriger GI bzw. eine hohe Ballaststoffzufuhr sind insbesondere bei einer hohen Kohlenhydrataufnahme von Bedeutung, da sie nicht nur dem Anstieg des postprandialen Blutzuckers sondern auch des Nüchtern-Triglyzeridspiegels entgegen wirken (Gannon MC et al. (2003) Am J Clin Nutr 78:734-41). Die positiven Effekte des GI/GL-Konzeptes werden teilweise durch einen hohen Ballaststoffgehalt verstärkt (Goff LM et al. (2013). Nutr Metab & Cardiovasc Dis 23:1-10.), sind jedoch anteilig unabhängig von den positiven Wirkungen der Ballaststoffe (Burger KN et al. (2012) PLoS One 7(8):e43127. Livesey G et al. (2013) Am J Clin Nutr 97(3):584-96. Qi L et al. (2005). Diabetes Care 28(5):1022-1028). Neben dem Fett- und Proteingehalt eines Lebensmittels ist vor allem der Ballaststoffgehalt ein wesentlicher Faktor, der den postprandialen Anstieg des Blutzuckers vermindert. Im Gegensatz zum Fettgehalt hat ein hoher Ballaststoffgehalt jedoch einen Nutzen für den Glukosestoffwechsel. Durch die enge Beziehung zwischen GI und Ballaststoffgehalt von kohlenhydratreichen Lebensmitteln ist die Unterscheidung zwischen GI und Ballaststoffen mehr von akademischem Interesse als von praktischer Relevanz in der Ernährungsberatung. Für eine pragmatische Verbindung der GI- und Ballaststoffkonzepte in der Beratung spricht auch, dass dadurch eher ungünstige, niedrig glykämische Zucker oder Zuckeraustauschstoffe wie Fruktose und Sorbit nicht empfohlen werden.

Teilprojekt 2:

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien liefern neue Erkenntnisse in Hinblick auf die Effekte einer kurzfristigen Futterrestriktion per se und einer langfristigen Futterrestriktion in Abhängigkeit vom ApoE-Genotyp. Darauf aufbauend können zukünftig neue Fragestellungen zu dieser Thematik auch in anderen Geweben oder in Bezug auf andere Biomarker entwickelt werden. Des Weiteren können die indirekte Kalorimetrie und die micro-Computertomografie für weitere Studien genutzt werden.

Teilprojekt 3:

Neben den Ergebnissen, die publiziert wurden oder demnächst publiziert werden können und die demzufolge ob ihres Erkenntnisgewinns von besonderem Wert sind, sind insbesondere diejenigen Ergebnisse zu nennen, die final in eine direkte Nutzung münden könnten. Dabei handelt es sich primär um Verknüpfung von Genexpressiondaten mit phänotypischen Analysen.

II.5 Bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens

Teilprojekt 1:

Die Regulation der anteiligen Veränderungen von Fett- und Magermasse während der Gewichtszunahme (oder Gewichtswiederzunahme nach Gewichtsverlust) durch nutritive Einflussfaktoren ist nach wie vor wenig erforscht. Neben den klassischen Faktoren wie den Auswirkungen einer positiven und negativen Energiebilanz (z.B. ein hohes Kaloriendefizit fördert den Verlust der Magermasse bei Gewichtsreduktion) und der Menge und biologischen Wertigkeit der Eiweißzufuhr hat die Menge und Qualität der Kohlenhydratzufuhr nach den Ergebnissen des vorliegenden Projektes einen Einfluss auf die Partitionierung von Fett und Magermasse während der Gewichtsab- und -zunahme.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des vorliegenden Projektes findet auch die Arbeitsgruppe um Barbara Gower einen schlechteren Gewichtserhalt nach Gewichtsreduktion bei insulin sensitiven Probanden unter einer Diät mit hoher glykämischer Last:

Gower BA, Hunter GR, Chandler-Laney PC, Alvarez JA, Bush NC. Glucose metabolism and diet predict changes in adiposity and fat distribution in weight-reduced women. *Obesity* (Silver Spring) 2010; **18(8)**: 1532-7.

Gower BA, Alvarez JA, Bush NC, Hunter GR. Insulin sensitivity affects propensity to obesity in an ethnic-specific manner: results from two controlled weight loss intervention studies. *Nutr Metab (Lond)* 2013; **10(1)**: 3.

Darüber hinaus könnte auch eine intermittierende Kalorienreduktion im Gegensatz zu einer kontinuierlich negativen Energiebilanz bei Gewichtsreduktion einen positiven Effekt auf die Stoffwechseladaptation während der Gewichtsreduktion haben und dadurch einer erneuten Gewichtszunahme vorbeugen:

Harvie M, Wright C, Pegington M, McMullan D, Mitchell E, Martin B, Cutler RG, Evans G, Whiteside S, Maudsley S, Camandola S, Wang R, Carlson OD, Egan JM, Mattson MP, Howell A. The effect of intermittent energy and carbohydrate restriction v. daily energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers in overweight women. *Br J Nutr.* 2013 Oct;110(8):1534-47.

Teilprojekt 2:

Während des Projektes wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Zur Verfügung standen folgende Datenbanken, wie PubMed und Medline. Diese Recherchen ergaben keine Hinweise auf Arbeiten und Ergebnisse von dritter Seite, die unseren Ergebnissen ähneln. Während

des Vorhabens erfolgte eine Publikation, die sich mit den persistierenden Effekten einer längerfristigen Futterrestriktion befasst (Giller et al. 2013).

Teilprojekt 3:

Im Zeitraum des Zuwendungsempfangs haben sich natürlich wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet ergeben. Dies betrifft insbesondere die genomweite Annotation von epigenetischen Markierungen, die im internationalen modENCODE-Projekt erarbeitet wurden. Allerdings blieben diese Entwicklungen im Rahmen des normalen wissenschaftlichen Fortschritts, die unsere zu Grunde liegenden Hypothesen nicht beeinträchtigt haben und demzufolge auch keine wissenschaftliche Umorientierung der Arbeiten hätten notwendig oder sinnvoll erscheinen lassen.

II.6 Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Teilprojekt 1:

Publikationen:

Merit Lagerpusch, Janna Enderle, Wiebke Later, Ben Eggeling, Detlef Pape, Manfred J Müller, Anja Bosy-Westphal. Impact of glycemic index and dietary fibre on insulin sensitivity during the refeeding phase of a weight cycle in young healthy men. Br J Nutr. 2013 May;109(9):1606-16. doi: 10.1017/S000711451200462X.

Merit Lagerpusch, Janna Enderle, Ben Eggeling, Wiebke Braun, Maïke Johannsen, Detlef Pape, Manfred J Müller, Anja Bosy-Westphal. Impact of carbohydrate intake and glycemic index on insulin sensitivity and liver fat during the refeeding phase of a weight cycle. J Nutr. 2013 Oct;143(10):1593-601. doi: 10.3945/jn.113.179390

Julia Jäger, Merit Lagerpusch, Janna Enderle, Ben Eggeling, Wiebke Braun, Detlef Pape, Manfred J Müller, Anja Bosy-Westphal. Carbohydrate intake and glycemic index affect substrate oxidation during a controlled weight cycle in healthy men. Eur J Clin Nutr, submitted.

Judith Karschin, Janna Enderle, Merit Lagerpusch, Manfred J. Müller, Anja Bosy-Westphal. Endocrine determinants of insulin sensitivity and insulin secretion during a weight cycle in healthy men. Manuscript in preparation.

Anja Bosy-Westphal, Julia Jäger, Merit Lagerpusch, Thomas Skurk and Manfred J Müller. Deep body composition phenotyping during weight cycling: Relevance to metabolic efficiency and metabolic risk. Invited Review, Obesity Reviews 2014, submitted.

Nicolle Breusing, Merit Lagerpusch, Janina Engstler, Ina Bergheim, Manfred J. Müller, Anja Bosy-Westphal. Influence of energy balance and glycemic index on metabolic endotoxemia in healthy men, manuscript in preparation.

M.J. Müller, Baracos, A. Bosy-Westphal, A. Dulloo, J. Eckel, K.C.H. Fearon, K.D. Hall, A. Pietrobelli, T.I.A. Sørensen, J. Speakman, P. Trayhurn, M. Visser, S.B. Heymsfield. Functional Body Composition and Related Aspects in Research on Obesity and Cachexia Report on the 12th Stock Conference held on September 6th and 7th, 2013 in Hamburg, Germany Obesity rev. 2014, Obesity Reviews, in press.

M.J. Müller, J. Enderle, B. Eggeling, M. Lagerpusch, M. Pourhassan, C. Glüer, J. Kehayias, A. Bosy-Westphal. Ancel Keys revisited - on adaptive thermogenesis in men. Manuscript in preparation.

Abstracts

- Lagerpusch M, Bosy-Westphal A, Kehden B, Müller MJ. Flexibility in glucose metabolism is associated with energetic efficiency of weight gain during controlled overfeeding. Postervortrag im Rahmen des 18. European Congress on Obesity, 25.-28.05.2011, Istanbul, Türkei. In: Obesity Reviews 2011, 12 (Supplement 1): S130.
- Lagerpusch M, Bosy-Westphal A, Kehden B, Müller MJ. Effects of controlled over- and underfeeding on indices of insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy men. Postervortrag im Rahmen des 2. EASO Björntorp Symposiums, 29.06.-01.07.2011, Göteborg, Schweden
- Bosy-Westphal A, Later W, Lagerpusch M, Enderle J, Eggeling B, Preuss U, Pape D, Müller MJ. Adaptive thermogenesis, glucose-induced thermogenesis and activity energy expenditure during controlled over- and underfeeding. Vortrag im Rahmen der Konferenz *Recent Advances and Controversies in Measuring Energy Expenditure* (RACMEM), 02.-04.11.2011, Maastricht, Niederlande
- Functional correlates of fat mass – fat-free mass relationships during under- and refeeding, Vortrag im Rahmen der Stock Conference, Hamburg 2013.
- Impact of metabolic flexibility on changes in body composition during caloric restriction and subsequent re-feeding. Julia Jäger, Merit Lagerpusch, Wiebke Later, Janna Enderle, Ben Eggeling, Manfred J Müller, Anja Bosy-Westphal. Poster auf dem European Congress on Obesity (ECO) in Liverpool, UK 2013.
- Impact of glycemic load on the regulation of energy balance during controlled re-feeding. Anja Bosy-Westphal, Merit Lagerpusch, Julia Jäger, Wiebke Later, Janna Enderle, Ben Eggeling, Manfred J Müller. Poster auf dem European Congress on Obesity (ECO) in Liverpool, UK, 2013.
- Endocrine determinants of insulin sensitivity and insulin secretion during a weight cycle in healthy men. Judith Karschin, Janna Enderle, Merit Lagerpusch, Manfred J. Müller, Anja Bosy-

Westphal. Vortrag auf dem International Congress on Obesity (ICO) in Kuala Lumpur, Malaysia, 2014.

- Julia Jäger, Merit Lagerpusch, Janna Enderle, Ben Eggeling, Wiebke Braun, Manfred J Müller, Anja Bosy-Westphal. Metabolic responses to overfeeding are not associated with responses to refeeding. Vortrag auf dem International Congress on Obesity (ICO) in Kuala Lumpur, Malaysia, 2014.
- Anja Bosy-Westphal, Julia Jäger, Merit Lagerpusch, Janna Enderle, Ben Eggeling, Wiebke Braun, Manfred J Müller. Impact of glycemic load on the composition of weight regain. Vortrag auf dem International Congress on Obesity (ICO) in Kuala Lumpur, Malaysia, 2014.
- Nicolle Breusing, Merit Lagerpusch, Janina Engstler, Ina Bergheim, Manfred J. Müller, Anja Bosy-Westphal. Influence of energy balance and glycemic index on metabolic endotoxemia in healthy men. Poster auf dem International Congress on Obesity (ICO) in Kuala Lumpur, Malaysia, 2014.
- Judith Karschin, Janna Enderle, Merit Lagerpusch, Manfred J. Müller, Anja Bosy-Westphal. Endokrine Determinanten der Veränderungen von Insulinsensitivität und Insulinsekretion während eines *weight cycles* bei gesunden Männern. Posterpräsentation Ernährung 2014, Ludwigsburg.

Dissertationen

Merit Lagerpusch, (2013): Changes in insulin sensitivity during a controlled weight cycle in healthy men: Impact of energy balance, glycemic index and carbohydrate intake. Erschienen im Der Andere Verlag Band 67/2013. ISBN 978-3-86247-346-5.

Benjamin Eggeling, (2013): Einfluss einer kontrollierten Kalorienrestriktion und Realimentation auf die Aktivität des Sympathischen Nervensystems bei gesunden Männern – Assoziation zum Blutdruck und Stoffwechsel. Schriftenreihe des Instituts für Humanernährung und Lebensmittelkunde der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Band 69. Der Andere Verlag, ISBN:978-3-86247-367-0.

Teilprojekt 2:

Bisher sind keine Ergebnisse aus diesem Teilprojekt veröffentlicht worden. Für das Jahr 2014 ist die Anfertigung einer Dissertation, sowie verschiedener Publikationen auf Basis dieses Projektes geplant.

Literatur

Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., Moncada S., Carruba M.O., 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310, 314-317.

Hancock C.R., Han D.H., Higashida K., Kim S.H., Holloszy J.O., 2011. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 785-791.

Giller K., Huebbe P., Henning S., Dose J., Pallauf K., Doering F., Rimbach G., 2013. Beneficial effects of a 6-month dietary restriction are time-dependently abolished within 2 weeks or 6 months of refeeding – genome-wide transcriptome analysis in mouse liver. *Free Radical Biology and Medicine* 61, 170-178.

Teilprojekt 3:

Miersch C, Döring F (2012). Paternal dietary restriction affects progeny fat content in *Caenorhabditis elegans*. *IUMB Life* 64(7): 644-648

Miersch, C. and Döring, F. (2013). Sex differences in body size and composition, fat storage and gene expression profile in *Caenorhabditis elegans* in response to dietary restriction during development. *Physiol Genomics*. 2013 May 28

Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen

Das abgeschlossene Forschungsvorhaben berücksichtigt die folgenden Aspekte der Ausschreibung zum Thema „Ernährungsforschung – für ein gesundes Leben; Modul Innovationen und neue Ideen für den Ernährungssektor“:

„Veränderte Lebensumstände und Entwicklungstrends in der modernen Gesellschaft und die abnehmende Notwendigkeit der körperlichen Betätigung zeigen deutliche Auswirkungen auf den aktuellen Gesundheitszustand der Bevölkerung in Deutschland. Insbesondere die Zunahme von Übergewicht und Adipositas und der daraus resultierende Anstieg verschiedener ernährungsassoziierter Krankheiten, wie Diabetes, Atherosklerose, Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen ist Besorgnis erregend.“

Adipositas ist eine chronische Erkrankung mit zunehmender Inzidenz, eingeschränkter Lebensqualität und hohem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko. Die Therapie von Adipositas ist durch eine hohe Rezidivneigung nach einer erfolgreichen Gewichtsabnahme gekennzeichnet. Darüber hinaus ist das in unserer heutigen affluenten Gesellschaft häufig praktizierte *Weight Cycling* oder *YoYo-Dieting* zu einem pro-inflammatorischen Status und einem erhöhten kardiometabolischen Risiko assoziiert. Das neu entwickelte wissenschaftlich fundierte Konzept einer hohen Glykämischen Last der Diät während der Gewichtsabnahme und einer niedrigen Glykämischen Last der Nahrung mit dem Ziel der Gewichtsabnahme und des Gewichtserhalts dient dazu, über die eigentliche Phase der Gewichtsabnahme hinaus eine Gewichtsstabilisierung und langfristige Gewichtskontrolle sicherzustellen. Aus den Ergebnissen werden auch Empfehlungen zur Prävention und Therapie bei Typ 2 Diabetes abgeleitet.

2. das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Teilprojekt 1: Das *catch-up fat* Phänomen ist eine evolutionär konservierte physiologische Reaktion, die nach einer Energierestriktion und nachfolgender Gewichtszunahme auftritt. Neuroendokrine und metabolische Anpassungen nach einer Gewichtsreduktion führen zu einer vulnerablen Phase, in der eine präferentielle Repletion der Fettspeicher stattfindet. Diese Stoffwechselanpassungen äußern sich in einer vermehrten Insulinsensitivität, einer Drosselung des Energieverbrauchs und einer vermehrten Kohlenhydratverbrennung auf Kosten einer geringeren Fettoxidation und begünstigen nicht nur eine erneute Gewichtszunahme, sondern erklären auch ein erhöhtes kardiometabolisches Risiko (z.B. Anstieg des Leberfettgehalts und der Triglyceridspiegel). Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Glykämische Last der Diät während der Gewichtsabnahme der Stoffwechselanpassung entgegen wirken kann, während in der Phase nach einer Reduktionsdiät der Verzehr von Nahrungsmitteln, die reich an Ballaststoffen sind und einen niedrigen Glykämischen Index haben, nicht nur zur Prävention von metabolischen Risikofaktoren, sondern auch zur langfristigen Gewichtsregulation (geringere Gewichtszunahme) beitragen kann. Ein besseres Verständnis zum Einfluss der Ernährung auf die Stoffwechselregulation in der Gewichtshaltephase nach einer Diät trägt zur Prävention chronischer Krankheiten wie z.B. Adipositas, Typ-2-Diabetes und koronare Herzerkrankungen bei.

Teilprojekt 2: Übergewicht und Adipositas sind ein großes und sich immer weiter ausbreitendes Problem in zahlreichen Ländern (WHO). Eine Gewichtsreduktion hat positive Auswirkungen, jedoch besteht die therapeutische Herausforderung darin, hohe Rückfallquoten, insbesondere das sogenannte catch-up fat Phänomen, zu vermeiden. Da das *catch-up fat* Phänomen mit erhöhtem oxidativen und inflammatorischen Stress assoziiert wird, wird angenommen, dass es Unterschiede in der Ausprägung dieses Phänomens zwischen ApoE3- und ApoE4-Trägern geben könnte. Der ApoE4-Genotyp (Allelhäufigkeit 25%) ist mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen und vermehrtem oxidativen Stress verbunden. Eine kurzfristig durchgeführte Futterrestriktion (3 Wochen) und anschließendes Refeeding führte zu phänotypischen Veränderungen jedoch nicht zur Ausprägung des catch-up fat Phänomens im Sinne einer „überschießenden“ Fettmassenzunahme. Eine langfristig durchgeführte Futterrestriktion (6 Monate) an ApoE-transgenen Mäusen zeigt ebenfalls keine entscheidenden Unterschiede zwischen dem ApoE3- und ApoE4-Genotyp. Es ist anzunehmen, dass die „Qualität“ der Diät eine wichtige Rolle spielen könnte. Das heißt, dass eine längerfristige Restriktion dennoch nicht ausreicht, um auf molekularer Ebene signifikante Veränderungen hervorzurufen.

Teilprojekt 3: Ziel des TP war Erforschung des „Catch-up fat Phänomens“ (CFP). Die genetische Regulation dieses Phänomens scheint entwicklungsgenetisch konserviert und lässt sich in *C. elegans* beobachten. Wir postulierten, dass eine kalorische Restriktion (KR) mit anschließender erneuter Gewichtszunahme zu langfristigen Änderungen der Genexpression führt, möglicherweise induziert durch epigenetische Modifikationen. Daher wurde mit einem translationalen Ansatz eine systematische Suche nach Genen mit persistierenden Veränderungen in der Genexpression während der Wiederauffütterung mit Hilfe von DNA-Microarrays durchgeführt. Hierbei wurden mehr als 20 evolutionär konservierte Gene identifiziert, die im Kontext des CFP von Relevanz sind. Basierend auf einem standardisierten KR-Protokoll konnte das CFP in *C.elegans* rekapituliert werden. Moderate als auch drastische KR führten zu einer erhöhten Lebensdauer bei Würmern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Alterspigment Lipofuscin unter KR-Bedingungen weniger akkumuliert war als unter *ad libitum* Bedingungen. Zudem ist CFP transgenerational nachweisbar. Es zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in Körperzusammensetzung und Genexpression zwischen männlichen und hermaphroditen Würmern, die einer KR ausgesetzt waren.

3. Fortschreibung des Verwertungsplans

- Die im Rahmen des Forschungsvorhabens bereits gewonnen Ergebnisse sollen auch weiterhin in internationalen Fachzeitschriften publiziert werden (entsprechende Manuskripte sind in allen 3 Teilprojekten in Vorbereitung bzw. zur Veröffentlichung eingereicht). Des Weiteren können zusätzliche Masterarbeiten oder Dissertationen aus dem bereits vorhandenen Probenmaterial angefertigt werden.

Darüber hinaus wurde durch dieses Forschungsvorhaben die Methode der indirekten Kalorimetrie in der Arbeitsgruppe von Prof. Rimbach etabliert und steht somit für zukünftige Projekte innerhalb der Arbeitsgruppe als auch in anderen Arbeitskreisen zur Verfügung. Ebenso entstand die Kooperation mit dem Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC) zur Durchführung der micro-Computertomografie, die ebenfalls für nachfolgende Projekte genutzt werden kann.

Die Ergebnisse dieses Projektes sind in den anschließenden und nunmehr in der 2. Begutachtungsphase befindlichen Antrag „NutriSysNorth- A nutritional systems biology approach to

study preventive effects and mechanisms of different forms of caloric restriction on human health“ der aktuellen BMBF Fördermaßnahme „Kompetenzcluster Ernährungsforschung“ eingegangen. Dieses vorgesehene Forschungsvorhaben thematisiert den gesundheitsförderlichen Aspekt von Kalorienrestriktion und die Anwendung des Prinzips der „caloric restriction“. Es verfolgt diese Ziele:

„A major aim of the Competence Cluster is to establish a persistent platform for human nutritional intervention studies with a systems biology analysis. It is assumed to perform 5 different CR intervention studies using a forward approach in translational science: (1) in order to examine if novel CR strategies or CR mimetic compounds developed by the Cluster are as effective as a classical CR in terms of exerting beneficial effects on human physiology incl. metabolism, brain, body composition, energy homeostasis, skin barrier function, intestinal barrier function, liver, cardiovascular system, immune system, microbiome and (2) it is assumed to perform a combined analysis of –omics and phenotype data of the 5 different CR intervention studies, in order to identify common molecular signatures which might reflect important but yet unidentified signalling pathways besides the known candidates like SIRT1 or mTOR2. Such novel pathways will serve as future targets for the development of novel preventive nutritional strategies and/or new food products to prolong human health and life.“

Dieser Antrag wurde in der Vorbegutachtung positiv bewertet und wird nun endgültig eingereicht werden.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Die Durchführung der Pilotstudie in Teilprojekt 2 hat zu dem Ergebnis geführt, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen kein catch-up fat Phänomen erreicht werden konnten. Daher kam es zu einer entsprechenden Anpassung des Versuchplanes. Das Refeeding wurde im Hauptversuch mit den ApoE3- und ApoE4-transgenen Mäusen nicht mehr berücksichtigt, die Phase der Futterrestriktion aber auf sechs Monate verlängert, um den Effekt einer längerfristigen Futterrestriktion in Abhängigkeit des ApoE-Genotyps abzubilden.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer - z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt)

Während der Laufzeit des Forschungsvorhabens wurden zahlreiche Teilergebnisse bereits durch Vorträge oder Poster auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellt und diskutiert. Erste Ergebnisse sind bereits in internationalen Peer-Reviewed Fachzeitschriften erschienen, zur Veröffentlichung angenommen oder eingereicht. Weitere Veröffentlichungen der Teilergebnisse sowie eine Publikation der Gesamtergebnisse sind geplant und in Vorbereitung.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Das Projekt wurde fristgerecht beendet und der beantragte Zeitrahmen wurde eingehalten. Der rechnerische Abschlussbericht (Verwendungsnachweis) liegt bereits vor. Es wird an dieser Stelle auf die Abschnitte Nrn. I. und II. des Schlussberichts verwiesen.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Abschlussbericht
3. Titel Ätiologie, Pathophysiologie und Prävention einer überschießenden Körperfettzunahme nach Gewichtsreduktion – Vermeidung des JoJo-Effektes in der Behandlung von Übergewicht Teilprojekt 1: Einfluss einer Diät mit niedrigem Glykämischen Index nach Gewichtsreduktion auf das <i>catch-up fat</i> Phänomen beim Menschen Teilprojekt 2: Zusammenhang zwischen Redoxstatus, Inflammation, Insulinresistenz, adaptiver Thermogenese und dem <i>catch-up fat</i> Phänomen in transgenen Mäusen Teilprojekt 3: Bedeutung evolutionärer konservierter Stoffwechselwege des <i>catch-up fat</i> Phänomens	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Bosy-Westphal, Anja; Braun, Wiebke, Eggeling, Ben; Lagerpusch, Merit; Enderle, Janna; Johannsen, Maïke; Pape, Detlef; Glüer, Claus-Christian; Jäger, Julia; Karschin, Judith; Breusing, Nicolle; Müller, Manfred J, Schlösser, Anke; Rimbach, Gerald; Döring, Frank; Onur, Simone; Ludewig, Hanno Andreas	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.07.2013
	6. Veröffentlichungsdatum 14.4.2014
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Christian-Albrechts-Platz 4 24118 Kiel	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 01EA1336
	11. Seitenzahl 54
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben
	14. Tabellen
	15. Abbildungen
16. Zusätzliche Angaben 	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) 	

18. Kurzfassung

Das *catch-up fat* Phänomen ist eine evolutionär konservierte physiologische Reaktion, die nach einer Energierestriktion und nachfolgender Gewichtszunahme auftritt. Neuroendokrine und metabolische Anpassungen nach einer Gewichtsreduktion führen zu einer vulnerablen Phase, in der eine präferentielle Repletion der Fettspeicher stattfindet. Diese Stoffwechselanpassungen äußern sich in einer vermehrten Insulinsensitivität, einer Drosselung des Energieverbrauchs und einer vermehrten Kohlenhydratverbrennung auf Kosten einer geringeren Fettoxidation und begünstigen nicht nur eine erneute Gewichtszunahme, sondern erklären auch ein erhöhtes kardiometabolisches Risiko (z.B. Anstieg des Leberfettgehalts und der Triglyceridspiegel).

Es konnte in TP1 gezeigt werden, dass eine hohe Glykämische Last der Diät während der Gewichtsabnahme der Stoffwechselanpassung entgegen wirken kann während in der Phase nach einer Reduktionsdiät der Verzehr von Nahrungsmitteln, die reich an Ballaststoffen sind und einen niedrigen Glykämischen Index haben, nicht nur zur Prävention von metabolischen Risikofaktoren, sondern auch zur langfristigen Gewichtsregulation (geringere Gewichtszunahme) beitragen kann. Ein besseres Verständnis zum Einfluss der Ernährung auf die Stoffwechselregulation in der Gewichtshaltephase nach einer Diät trägt letztlich zur Prävention chronischer Krankheiten wie z.B. Adipositas, Typ-2-Diabetes und koronare Herzerkrankungen bei.

Da das *catch-up fat* Phänomen mit erhöhtem oxidativen und inflammatorischen Stress assoziiert wird, wurde in TP2 untersucht, ob es Unterschiede in der Ausprägung dieses Phänomens zwischen ApoE3- und ApoE4-Trägern geben könnte. Der ApoE4-Genotyp (Allelhäufigkeit 25%) ist mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen und vermehrtem oxidativen Stress verbunden. Eine kurzfristig durchgeführte Futterrestriktion (3 Wochen) mit einer hochkalorischen Diät und anschließendem (Refeeding) führte zu phänotypischen Veränderungen jedoch nicht zur Ausprägung des *catch-up fat* Phänomens im Sinne einer „überschießenden“ Fettmassezunahme. Eine langfristig durchgeführte Futterrestriktion (6 Monate) an ApoE-transgenen Mäusen zeigte ebenfalls keine entscheidenden Unterschiede zwischen dem ApoE3- und ApoE4-Genotyp. Es ist anzunehmen, dass die „Qualität“ der Diät eine wichtige Rolle spielen könnte. Das heißt, dass eine längerfristige Energierestriktion dennoch nicht ausreichend, um auch auf molekularer Ebene signifikante Veränderungen hervorzurufen.

Nach den Ergebnissen von TP3 erscheint die genetische Regulation des *catch-up fat*-Phänomens entwicklungs-genetisch konserviert und lässt sich in *C. elegans* beobachten. Mit einem translationalen Ansatz wurde eine systematische Suche nach Genen mit persistierenden Veränderungen in der Genexpression während der Wiederauffütterung mit Hilfe von DNA-Microarrays durchgeführt. Hierbei wurden mehr als 20 evolutionär konservierte Gene identifiziert, die im Kontext des *catch-up fat* Phänomens von Relevanz sind. Basierend auf einem standardisierten KR-Protokoll konnte das *catch-up fat* Phänomen in *C.elegans* rekapituliert werden. Moderate als auch drastische KR führten zu einer erhöhten Lebensdauer bei Würmern. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Alterspigment Lipofuscin unter KR-Bedingungen weniger akkumuliert war als unter *ad libitum* Bedingungen. Zudem ist *catch-up fat* transgenerational nachweisbar. Es zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in Körperzusammensetzung und Genexpression zwischen männlichen und hermaphroditen Würmern, die einer KR ausgesetzt waren.

19. Schlagwörter

Kalorienrestriktion, Realimentation, Glykämischer Index, Glykämische Last, Fettmasse, Magermasse, Insulinsensitivität, oxidativer Stress, ApoE-Genotyp, *C. elegans*, Epigenetik

20. Verlag

21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication)	
3. title A low glycemic index diet as prevention of the <i>catch-up fat phenomenon</i>		
4. author(s) (family name, first name(s)) Bosy-Westphal, Anja; Braun, Wiebke, Eggeling, Ben; Lagerpusch, Merit; Enderle, Janna; Johannsen, Maike; Pape, Detlef; Glüer, Claus-Christian; Jäger, Julia; Karschin, Judith; Breusing, Nicolle; Müller, Manfred J, Schlösser, Anke; Rimbach, Gerald; Döring, Frank; Onur, Simone; Ludewig, Hanno Andreas	5. end of project 07.30.2013	6. publication date 4.14.2014
	7. form of publication Final Report	
	8. performing organization(s) (name, address) Christian-Albrechts-University Kiel Christian-Albrechts-Platz 4 24118 Kiel	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	9. originator's report no. 01EA1336	
	10. reference no.	
	11. no. of pages 54	
13. no. of references	14. no. of tables	
	15. no. of figures	
	16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)		

18. abstract

The *catch-up fat* phenomenon is an evolutionary conserved physiological response to a starvation-refeeding cycle. It is characterized by long-term suppression of thermogenesis, reduced body protein regain and an increase in fat mass above basal level during refeeding. Clinically, it characterises weight cycling in overweight patients which is associated with increasing fat mass (visceral fat) and increased morbidity (e.g. insulin resistance, inflammation). In this project, the physiological, cellular and molecular mechanisms of this phenomenon are investigated in humans, mice and *C. elegans*. It was hypothesized that refeeding a low GI (=glycemic index)- diet after weight loss prevents the *catch-up fat* phenomenon and its sequelae. This translational research provides comprehensive insights into the *catch-up fat* phenomenon and offers a suitable strategy for its prevention.

Results of Subproject 1 (SP1) have shown that a high glycemic load diet during weight loss and a low glycemic load diet with a high fiber content during controlled weight regain contribute to counteract metabolic adaptation to weight loss and regain and thus prevent weight regain and metabolic risk during refeeding. These data contribute to a new concept of the impact of diet composition on metabolic regulation of body composition and energy balance after diet-induced weight loss (i.e. during the weight maintenance phase). The results of SP1 will thus contribute to prevention of obesity and weight cycling associated chronic diseases (e.g. obesity, Type 2 diabetes and CHD).

Because the *catch-up fat* phenomenon is associated with chronic inflammation and oxidative stress SP2 investigated differences in body weight and metabolic regulation during weight loss and regain between ApoE3- and ApoE4-mice. Short-term caloric restriction (3 weeks) with subsequent refeeding led to energy balance-specific adaptations but not to a disproportionate fat regain. Long-term caloric restriction (6 months) in ApoE-transgenic mice also did not reveal any significant differences between ApoE3- und ApoE4-genotypes. Hence it was suggested that the quality of food could have a greater impact on metabolic adaptation during perturbations in energy balance.

The results of SP3 have supported the concept that the genetic regulation of the catch-up fat phenomenon is ontogenetically conserved and can be verified in *C. elegans*. In a translational approach, a systematic search for genes with persistent modification of gene expression during refeeding was performed using DNA-microarrays. Thus, more than 20 evolutionary conserved genes could be identified that are important for the catch-up fat phenomenon. Moderate to severe caloric restriction contributed to longevity and a prevention of lipofuscin accumulation in *C. elegans*. In this model, the catch-up fat phenomenon tracked over generations and showed gender-specific differences with respect to changes in body composition and gene expression.

19. keywords

Caloric restriction, refeeding, glycemic index, glycemic load, fat mass, lean mass, insulin sensitivity, oxidative stress, ApoE-genotype, *C. elegans*, epigenetics, translational research

20. publisher

21. price