

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Glukosemetabolismus und Ketoseinduktion unter  
low-carbohydrate/high-fat-Diäten in der Ratte:  
Was bewirkt eine Modulation des Fett-zu-Protein-Verhältnisses?**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dominik Menhofer

aus Augsburg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Reincke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Ines Golly Prof. Dr. Peter Weisweiler
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Martin Bidlingmaier Dr. med. vet. Maximilian Bielohuby
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	15.05.2014

*Meiner Familie*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Übergewicht und diätetische Intervention.....	1
1.2 LowCarb-HighFat-Diäten.....	2
1.3 Die Ratte als Tiermodell für diätetische Studien .....	4
1.4 Übersicht über die Glukoseaufnahme .....	5
1.5 Die Rolle von Insulin für den Glukosemetabolismus .....	6
1.6 Ketonkörper, Ketogenese und Ketose .....	6
1.7 Glukoseproduktion durch die Glukoneogenese .....	9
1.8 Die zentral Rolle der Glukosetransporter für den Glukosemetabolismus.....	11
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
<b>2.. Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
2.1 Verwendete Kontroll- und Experimentaldiäten.....	14
2.2 Tiermodell, Haltung und Sektion .....	15
2.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen .....	15
2.2.2 Lebendgewichtsmessung .....	16
2.2.3 Paar-Fütterung.....	16
2.2.4 Sektion .....	17
2.2.5 Tierschutz & Genehmigung .....	18
2.3 Studiendesign dieser Arbeit.....	18
2.4 Durchgeführte tierexperimentelle Methoden.....	21
2.4.1 Theoretische Grundlagen der indirekten Kalorimetrie .....	21
2.4.2 Versuchsaufbau der indirekten Kalorimetrie .....	21
2.4.3 Durchführung des oralen Glukosetoleranztests.....	23
2.4.4 Probengewinnung für die Ketonkörpermessung.....	24
2.5 Verwendete laborexperimentelle Methoden.....	25
2.5.1 Messung der Glukosekonzentration im Vollblut .....	25
2.5.2 Konzentrationsbestimmung freier Fettsäuren im Serum.....	25
2.5.3 Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum.....	26
2.5.4 Anfertigung von Leberschnitten mit Sudan®- III-Rot-Färbung .....	26
2.6 Angewandte molekularbiologische Methoden .....	27
2.6.1 Theoretische Grundlagen der RNA-Extraktion .....	27
2.6.2 Durchführung der RNA-Extraktion.....	28
2.6.3 Messung der RNA-Konzentration .....	30

---

2.6.4	Anwendung der Gelelektrophorese .....	30
2.6.5	Umschreibung der RNA-Proben in cDNA.....	31
2.6.6	Primerdesign.....	33
2.6.7	Testung der entworfenen Primer an verschiedenen Gewebeproben.....	33
2.6.8	Theoretische Grundlagen der quantitativen Realtime-PCR .....	35
2.6.9	Praktische Anwendung der quantitativen Realtime-PCR .....	36
2.7	Verwendung des „Homeostatic Model Assessment“ (HOMA).....	37
2.8	Statistische Analysen .....	38
<b>3..</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Tägliche Energieaufnahme und Gewichtsverlauf der Diätgruppen.....	39
3.1.1	Tägliche Energieaufnahme .....	39
3.1.2	Gewichtsverlauf der Diätgruppen.....	40
3.2	Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung .....	41
3.2.1	Gewicht der epididymalen, perirenaln und inguinalen Fettdepots .....	41
3.2.2	Gewicht der fettfreien Körpermasse .....	43
3.2.3	Gewicht der Leber .....	44
3.2.4	Darstellung der histologischen Leberschnitte .....	46
3.3	Effekte in der indirekten Kalorimetrie .....	47
3.3.1	Veränderung des respiratorischen Quotienten.....	47
3.3.2	Auswirkungen auf den Grundumsatz .....	47
3.4	Ketonkörper, Ketogenese und Ketose .....	48
3.4.1	Konzentration freier Fettsäuren im Serum.....	48
3.4.2	Relative mRNA-Expression der HMG-CoA-Lyase .....	49
3.4.3	Laborchemische Messung von Ketonkörpern in Serum und Urin.....	50
3.4.4	Verschiedenen Messverfahren zur Ketonkörperquantifizierung im Urin .....	51
3.5	Expressionsänderungen von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese .....	51
3.5.1	Glukoneogenese in der Leber .....	52
3.5.2	Glukoneogenese in der Niere .....	52
3.5.3	Glukoneogenese im Duodenum .....	53
3.6	Effekte auf die Expression der Glukosetransporter .....	54
3.6.1	Glut-2 in Leber, Muskel und Duodenum .....	54
3.6.2	Glut-4 in Leber und Muskel .....	55
3.7	Auswirkungen auf die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität.....	56
3.7.1	Nüchternkonzentrationen von Glukose im Blut und Insulin im Serum.....	56
3.7.2	Insulinsensitivitätsberechnungen durch den HOMA2-Index.....	57

---

3.7.3 Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests .....	58
<b>4.. Diskussion .....</b>	<b>61</b>
4.1 Kritische Darstellung der angewandten Methoden.....	61
4.2 Welche Effekte traten in der indirekten Kalorimetrie auf? .....	62
4.3 Was zeigen Gewichtsverlauf und Körperzusammensetzung? .....	62
4.4 Ist die Ketoseinduktion bei LCHF-Diäten vom Fett- und Proteingehalt abhängig? ....	65
4.5 Welches glukoneogenetische Organ speist den Blutglukosespiegel? .....	68
4.6 Gibt es Veränderungen der Genexpression der Glukosetransporter? .....	70
4.7 Werden Glukosetoleranz und Insulinsensitivität positiv beeinflusst? .....	71
4.8 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und Resümee.....	74
<b>5.. Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>6.. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>7.. Anhang</b>	
7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	84
7.2 Verwendete Materialien.....	85
7.3 Herstellerverzeichnis.....	90
7.4 Veröffentlichungen .....	92
7.5 Danksagung.....	94

# 1 Einleitung

## 1.1 Übergewicht und diätetische Intervention

In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit (Adipositas) weltweit stark zugenommen. Damit hat sich Adipositas in den letzten 25 Jahren zum größten medizinischen Problem der Industrienationen entwickelt. Jedoch steigt auch in den Entwicklungsländern die Prävalenz für Übergewicht immer mehr an. So äußerte sich die WHO darüber besorgt, dass Entwicklungsländer heutzutage die Belastung einer Doppelbürde aus Über- und Untergewicht schultern müssen [1].

Als übergewichtig gilt, wessen Körpergewicht in Kilogramm geteilt durch die mit zwei potenzierte Körperlänge in Metern (BMI,  $\text{kg/m}^2$ ) größer als 25 ist. Ab einem BMI von 30 gilt man als stark übergewichtig, sprich adipös. Zwischen 18 und 24 befindet sich der Bereich des Normalgewichts, darunter gilt man als untergewichtig [2].

<b>(BMI <math>\text{kg/m}^2</math>)</b>	<b>Bedeutung</b>
< 18	untergewichtig
18-24	normalgewichtig
25-30	übergewichtig
>30	adipös

**Tabelle 1: Relation des BMI zu Übergewicht und Adipositas [2]**

Es ist bereits allgemein bekannt, dass Übergewicht und Adipositas die Morbidität und Mortalität deutlich erhöhen. Sie gelten als starker Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen - mit 17 Millionen Toten weltweit an der Spitze der Todesursachen - wie Herzerkrankungen, Hypertonie und Schlaganfall. Auch Diabetes mellitus Typ 2 ist durch das immer häufiger vorkommende Übergewicht zu einem globalen Problem geworden. Desweiteren werden Erkrankungen des Bewegungsapparats, Kolonkarzinome, Schlafstörungen und Atembeschwerden begünstigt [3].

Laut WHO waren 2008 ca. 1,5 Milliarden Erwachsene (ab dem 20. Lebensjahr) übergewichtig und 500 Millionen adipös [1]. Die WHO schätzte 2006, dass im Jahre 2015 die Zahlen auf 2,3 Milliarden Übergewichtige und 700 Millionen Adipöse ansteigen werden [4]. Auch in Deutschland steigt die Zahl der Übergewichtigen stetig. Etwa 51 % der erwachsenen Deutschen waren im Jahre 2009 übergewichtig, 15 % adipös. Nicht außer Acht lassen darf man den Unterschied zwischen den Geschlechtern, denn Männer (60 %) sind deutlich häufiger

---

übergewichtig als Frauen (43 %). Damit ist die Anzahl der übergewichtigen Deutschen in den letzten 10 Jahren gestiegen, denn 1999 waren nur 56 % der Männer und 40 % der Frauen übergewichtig [5]. Dies stellt, nebenbei bemerkt, eine hohe finanzielle Belastung im Gesundheitswesen dar, vor allem ausgelöst durch Folgeerkrankungen wie Diabetes, Hypertonie und Herzerkrankungen [6].

Im krassen Gegensatz zur steigenden Anzahl zu dicker Menschen steht das westliche, von Medien geprägte Schönheitsideal des 21. Jahrhunderts. Das Schönheitsideal der Frau unterzog sich einer stetigen Veränderung im Verlauf der Menschheitsgeschichte. In früheren Zeitaltern galt Übergewicht bei Frauen als Zeichen der Fertilität. Heutzutage ist Übergewicht mit Armut, fehlender Bildung, Faulheit und Maßlosigkeit verbunden, ein schlanker Körper hingegen mit Willensstärke und Selbstdisziplin [7]. Einen großen Teil tragen die Medien dazu bei. Diese stellen unrealistisch dünne Frauen als Schönheitsideal dar und verbinden diese fälschlicherweise mit körperlicher Gesundheit [7]. So nahm von 1922 bis 1999 der BMI der Gewinnerinnen des Miss America Schönheitswettbewerbes signifikant ab. Oft war dieser sogar kleiner als  $18,5 \text{ kg/m}^2$ , also im Bereich des Untergewichts [8].

Bedenkt man das von Medien aufgezeigte wirklichkeitsfremd schlanke Schönheitsideal, die Verknüpfung von Übergewicht mit negativen Begriffen und der im Gegensatz dazu stehenden steigenden Prävalenz von Übergewicht, ist es kaum verwunderlich, dass Diäten immer beliebter werden. 66 % der Deutschen haben schon mindestens eine Diät gemacht [9]. Die meisten Zeitschriften sind voll von Diättipps, Schlankheitskuren und Sportempfehlungen. Das Internet bietet eine fast grenzenlose Auswahl verschiedenster Diäten, jedoch mangelt es ihnen oft an wissenschaftlichen Belegen.

Eine besonders populäre Gruppe dieser Diäten sind die Niedrig-Kohlenhydrat-Hoch-Fett-Diäten (low-carbohydrate/high-fat-diets), die bekannteste ist die Atkins-Diät [3].

## **1.2 Low-carbohydrate/high-fat-Diäten**

Sogenannte „Niedrig-Kohlenhydrat/Hoch-Fett-Diäten“, „low-carbohydrate/high-fat-diets“ oder auch „low-carb-diets“ (LCHF-Diäten) sind beliebte Diäten, welche den Verzehr von Kohlenhydraten (CHO) restringieren und zur Gewichtskontrolle oder Behandlung von Übergewicht angewendet werden [3]. Nahrungsmittel, die reich an Kohlenhydraten (z.B. Nudeln oder Brot) sind, werden durch Nahrungsmittel mit hohem Fett- und Proteinanteil (z.B. Eier, Käse, Fleisch, Fisch und Nüsse) oder niedrigem Kohlenhydratanteil (z.B. Salat und Gemüse) ersetzt [10].

---

Die Menge an erlaubten Kohlenhydraten variiert abhängig von den verschiedenen Arten von LCHF-Diäten. Die „Unified Diet“ ist ein Konsens zur Ernährungsempfehlung der „American Heart Association“, der „American Cancer Society“, der „American Diabetic Association“, der „American Academy of Pediatrics“ und dem „National Institutes of Health“. Diese empfiehlt ein Nahrungsverhältnis von 55 % Kohlenhydrate, 30 % Fett und 15 % Protein [11]. Die meisten LCHF-Diäten schreiben aber eine Kohlenhydrataufnahme von unter 100 g pro Tag vor, also einen Kohlenhydratanteil von weniger als 20 % an der täglichen Nahrungsaufnahme [3]. Die sogenannte „Atkins Diät“ empfiehlt je nach Diätphase sogar einen Kohlenhydratanteil von bis zu 5 %, also nur 13 g Kohlenhydrate pro Tag [11]. Diese ist der populärste Vertreter der LCHF-Diäten und wurde von dem amerikanischen Kardiologen und späteren Ernährungswissenschaftler Robert Coleman Atkins (geboren 17.10.1930 in Columbus, gestorben 17.04.2003 in New York City) entwickelt. Zum ersten Mal wurde die Diät 1972 veröffentlicht („Dr. Atkins' Diet Revolution“ [12]) und 1992 noch einmal aktualisiert („Dr. Atkins' New Diet Revolution“ [10]). In den letzten 40 Jahren konnte Atkins 45 Millionen Exemplare seiner Bücher verkaufen [13].

Die verschiedenen LCHF-Diäten unterscheiden sich in einzelnen Punkten leicht voneinander, jedoch teilen alle dieselbe Grundidee, dass Übergewicht durch den Verzehr von Kohlenhydraten und nicht durch einen Kalorienüberschuss entsteht. Von Befürwortern dieser Diäten wird der Gewichtsverlust bei LCHF-Diäten unter anderem auch durch eine Erhöhung des Grundumsatzes und durch einen Energieverlust wegen der Ausscheidung von Ketonkörpern via Urin erklärt [3, 13]. Aus diesem Grund werden LCHF-Diäten auch ketogene Diäten genannt, da diese die Produktion von Ketonkörpern anregen und damit Ketose auslösen können [13]. Dies tritt laut Literatur beim Menschen ab einer Kohlenhydratzufuhr von unter 50 g pro Tag auf [14]. Atkins postulierte, dass die Ernährungsumstellung auf eine LCHF-Diät einen metabolischen Vorteil erbringe und deshalb zu Gewichts- und Körperfettverlust führe, eine Erniedrigung von Glukose- und Insulinspiegeln auslöse und prophylaktisch gegen Diabetes und Herzerkrankungen wirke [11].

Diesen Aussagen mangelt es aber an wissenschaftlicher Grundlage. Die Atkins-Diät und andere LCHF-Diäten werden seit Jahrzehnten diskutiert. Zahlreiche Gesundheitsorganisationen, unter anderem die „American Heart Association“ oder die „American Dietetic Association“, haben sich gegen LCHF-Diäten ausgesprochen [15]. Andererseits gibt es viele Studien, die den LCHF-Diäten unzählige positive Effekte zuschreiben [3]. In dem systematischen Review von Bravata et al. [15], welches 107 Fachartikel über LCHF-Diäten untersuchte, wurde aber bemängelt, dass diese Studien zu kurz waren, meist eine zu geringe Fallzahl hatten, die Ausfallrate sehr hoch war und die ausgefallenen Studienteilnehmer nicht in die Studie

---

einbezogen wurden. Jedoch wurden in letzter Zeit mehrere Studien in renommierten Fachjournalen veröffentlicht, in denen LCHF-Diäten zu einem Gewichtsverlust führten [16-20] und mit der anerkannten, kohlenhydratreichen Niedrigfett-Diät auf eine Stufe gesetzt wurden [16-19]. Außerdem schienen LCHF-Diäten kardiovaskuläre Risikofaktoren zu verbessern [17, 21] und die Insulinsensitivität zu erhöhen [15, 22]. Interessanterweise werden seit Jahren modifizierte ketogene LCHF-Diäten erfolgreich zur Behandlung von Kindern mit therapieresistenter Epilepsie genutzt [23]. Jedoch sind sich diese Studien einig, dass die Ursache des Gewichtsverlustes nicht die Diätzusammensetzung oder der metabolische Vorteil sind, sondern - ebenso wie bei Niedrigfett-Diäten - eine verringerte Kalorienaufnahme [3, 13, 15]. Dennoch gibt es noch nicht genug Beweise, die für oder gegen LCHF-Diäten sprechen [15], weshalb immer wieder neue Studien veröffentlicht werden, was den Anstoß zur Verfassung dieser Arbeit gab.

### **1.3 Die Ratte als Tiermodell für diätetische Studien**

Laborratten werden schon seit langer Zeit für Tierexperimente verwendet. Diese sind allesamt Nachfahren der Wanderratte (*rattus norvegicus*). Die Gründe, warum Ratten neben Mäusen zu den wichtigsten Versuchstieren gehören, sind zahlreich. Ratten sind leicht verfügbar, ihre Zucht gestaltet sich unkompliziert und sie sind sehr gut unter Laborbedingungen zu halten. Außerdem besitzen Ratten als Säugetiere eine physiologische Ähnlichkeit mit dem Menschen. So sind diese wie der Mensch Omnivoren, also Allesfresser. Ratten sind nachtaktive Tiere und besitzen ein fabelhaftes Dämmersehen, jedoch ist es ihnen unmöglich rotes Licht wahrzunehmen, weshalb Experimente in ihrer aktiven Nachtphase unter Rotlicht durchgeführt werden. Ratten besitzen die Fähigkeit ihren Futterkonsum zu kontrollieren. Aus diesem Grund kann ihnen Futter ad libitum bereitgestellt werden. Vorsicht geboten ist bei Temperaturabfall, da dieser den Futterkonsum stark erhöht. Deswegen sind – wie für alle Arbeiten mit Labornagern - auch für Diätstudien konstante Bedingungen, inklusive einer Konstanthaltung der Temperatur, notwendig [24].

Trotz anatomischer Unterschiede des Verdauungstraktes zwischen Ratten und Menschen sind diese, bezogen auf die Verdaulichkeit von Energie, Protein, Fett und nicht aus Stärke stammender Polysaccharide, ein geeignetes Modell für Diätstudien. Da Ratten bezogen auf deren Körpermasse einen höheren Energiebedarf als Menschen haben, resultiert daraus ein erhöhter Nahrungsbedarf und eine schnellere Darmpassage [25]. Dadurch können weniger Nährstoffe resorbiert werden, was aber durch den Verzehr des eigenen Kotes (Koprophagie) ausgeglichen wird. Jedoch wird dies bei bedarfsgerechtem Futter kaum beobachtet [26]. Ein

weiterer anatomischer Unterschied zum Menschen ist das Fehlen einer Gallenblase. Galle fließt also kontinuierlich in das Duodenum und kann im Gegensatz zum Menschen nicht konzentriert werden [25]. Dies könnte sich negativ auf die Fettverdauung auswirken, besonders bei großen Fettmahlzeiten. In der Studie Wiskers et al. (1996) zeigten Mensch und Ratte aber trotz hohem Fettgehalt der Diäten eine exzellente Übereinstimmung der Verdaulichkeit [25].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ratte trotz anatomischer Unterschiede ein geeignetes Tiermodell für Diätstudien ist.

## **1.4 Übersicht über die Glukoseaufnahme**

Mit der Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate werden zum größten Teil in Form des Polysaccharids Stärke, aber auch als Disaccharide wie Sacharose (Glukose + Fruktose) und Laktose (Glukose + Galaktose) aufgenommen. Stärke wird sofort von Alpha-Amylase, welche sich im Speichel und später im exokrinen Sekret des Pankreas befindet, in Oligosaccharide aus drei bis zehn Glukoseeinheiten (Dextrine) aufgebrochen. Im Darm werden diese Oligosaccharide dann durch weitere Enzyme bis zu Monosacchariden gespalten. Mit der Nahrung aufgenommene Disaccharide werden erst im Darm in Monosaccharide hydrolysiert. Eines der dadurch entstandenen Monosaccharide ist Glukose. Dieses wird dann in einem natriumgekoppelten aktiven Transport zusammen mit Galaktose gegen einen Konzentrationsgradienten apikal in die Enterozyten aufgenommen [27, 28].

Dies wird durch den Natrium Glucose Transporter (SGLT1) ermöglicht [29]. Aus den Enterozyten gelangt Glukose an der basolateralen Seite des Enterozyts mit Hilfe des Glukosetransporters 2 (Glut-2) in den Blutkreislauf [30]. Ein Teil der resorbierten Glukose gelangt über die Pfortader in die Leber, wo sie über Glut-2 insulinunabhängig in die Hepatozyten aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung als Energielieferant für den Körper in Form von Glykogen gespeichert wird [27, 28]. Der größte Teil wird insulinabhängig, ausgelöst durch den postprandialen Anstieg des Blutzuckerspiegels, via Glukosetransporter 4 (Glut-4) in Skelettmuskel- und Fettzellen transportiert und dort gespeichert [29-31]. Dies führt zu einer schnellen Reduzierung des Blutzuckerspiegels nach der Nahrungsaufnahme [27, 28].

---

## 1.5 Die Rolle von Insulin für den Glukosemetabolismus

Insulin und dessen Antagonist Glukagon sind die wichtigsten Regulatoren des Glukosestoffwechsels. Insulin ist ein Peptidhormon und besteht aus zwei Peptidketten mit insgesamt 51 Aminosäuren. Der Ort der Insulinsynthese sind die  $\beta$ -Zellen des Pankreas [32].

Primärer Stimulus für die Insulinsekretion ist ein hoher Blutglukosespiegel [33]. Aber auch Entero hormone, wie das gastroinhibitorische Peptid (GIP) induzieren eine Insulinsekretion. Deswegen ist die Insulinausschüttung bei gleicher Glukosemenge größer als bei parenteraler Gabe, wenn diese oral verabreicht wird [34].

Insulin beeinflusst besonders die Leber, die Muskeln und das Fettgewebe. Diese Beeinflussung setzt sich aus schneller Aktivierung bereits vorhandener Proteine und längerfristiger Enzyminduktion und Enzymrepression zusammen [28]. Die Hauptaufgabe von Insulin ist die schnelle Senkung des Blutzuckerspiegels durch Stimulierung der Translokation von Glut-4 in die Plasmamembran von Fett- und Skelettmuskelzellen [29-31]. Dieser Glukosetransporter hat eine wesentlich höhere Affinität als Glut-2 und transportiert Glukose unabhängig von der Plasmakonzentration [30]. Durch Aktivitätsveränderungen von Schlüsselenzymen verschiedener Stoffwechselwege stimuliert Insulin die Glykolyse und die Glykogensynthese in Leber und Skelettmuskel und hemmt gleichzeitig die Glukoneogenese in der Leber. Damit wird Glukose zu ATP umgesetzt oder als Glykogen gespeichert und wird nicht unnötig durch Neusynthesisierung nachgeliefert. Durch diese Mechanismen kommt es zur effektiven Senkung des Blutzuckerspiegels, was besonders nach der Nahrungsaufnahme benötigt wird [27, 28].

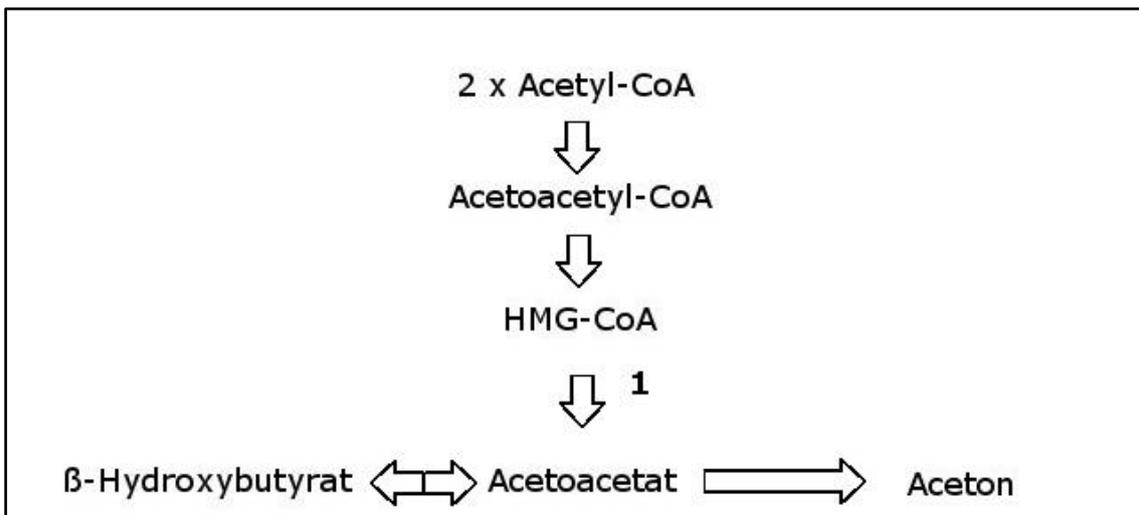
## 1.6 Ketonkörper, Ketogenese und Ketose

Die Produktion von Ketonkörpern und die daraus resultierende Ketose ist ein zentraler Mechanismus der LCHF-Diäten. Sie wird von Befürwortern als maßgebend für den Erfolg der Diät gesehen und in Atkins Theorien als ein Grund der Gewichtsreduktion beschrieben [10].

In der Medizin versteht man unter dem Begriff Ketonkörper die drei Moleküle Acetoacetat (AcAc), 3- $\beta$ -Hydroxybutyrat (3HB) und Aceton (siehe Abbildung 1). AcAc akkumuliert während des Fettsäurestoffwechsels bei Kohlenhydratmangel. Dieses kann in den Mitochondrien zu 3HB reduziert werden oder spontan zu Aceton decarboxylieren. Die Reduktion zu 3HB ist umkehrbar, die Decarboxylierung zu Aceton nicht, weshalb Aceton mit dem Urin ausgeschieden oder durch die Lunge abgeatmet werden muss [27].

Aceton ist verantwortlich für den süßlichen Atemgeruch bei ketoazidotischen Zuständen. 3HB und AcAc sind energiereiche Substrate und werden bei Glukosemangel als Glukoseersatz genutzt. 3HB und AcAc werden in der Leber produziert und von anderen Organen wie Herz, Niere, Skelettmuskel und besonders dem Gehirn als alternative Energiequelle genutzt. Im Gegensatz zu anderen Organen kann das Gehirn keine Fettsäuren zur Energieversorgung nutzen und ist deshalb auf eine konstante Versorgung mit Glukose angewiesen [35].

Deswegen muss auch im Hungerzustand eine ausreichende Versorgung mit Glukose gewährleistet werden. Bei für lange Zeit erniedrigtem Glukosespiegel kann das Gehirn fast 2/3 seines Energiebedarfs mit Ketonkörpern decken. Zunächst aber wird die Versorgung durch den Abbau von in Hepatozyten gespeichertem Glykogen gewährleistet. Auch im Skelettmuskel ist Glykogen gespeichert, dies wird aber ausschließlich für den Eigenbedarf verwendet. Gehen die Glykogenvorräte der Leber zur Neige, wird Glukose einerseits durch die Glukoneogenese aus Metaboliten, die keine Kohlenhydrate sind, produziert und der Stoffwechsel stellt sich andererseits auf die partielle Nutzung von Ketonkörpern um [27].



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Ketonkörpersynthese [35]**

Die Ziffer 1 bezeichnet das Enzym HMG-CoA-Lyase.

Ketose ist der Zustand, in dem die Serumwerte für Ketonkörper erhöht sind. Dieser Zustand ist fast immer temporär und entsteht physiologisch bei ausgedehnter körperlicher Aktivität, ketogenen Diäten oder längerem Fasten – besonders in der frühen Kindheit oder bei Schwangerschaft – und pathologisch bei endokrinologischen Erkrankungen, wie Diabetes oder Cortisolmangel, und toxikologischen Ereignissen, wie Alkoholabusus oder Salicylatüberdosierung. Da Ketonkörper sauer sind, kommt es bei stark erhöhten

---

Serumkonzentrationen zu einer Azidose. Dann spricht man von einer diabetischen oder toxischen Ketoazidose [35].

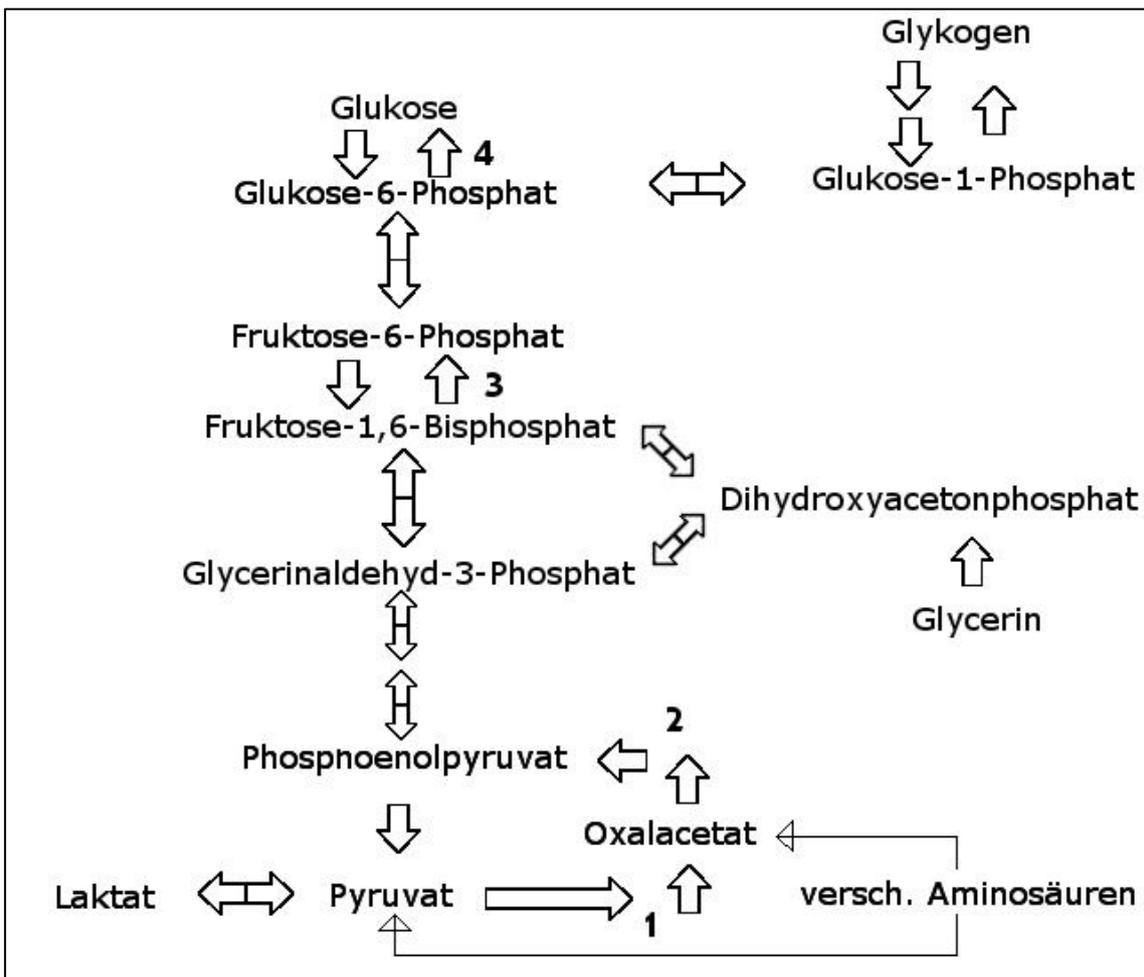
Die Ketogenese findet in den Mitochondrien perivenöser Hepatozyten statt. Dabei werden Fettsäuren, die aus der Lipolyse im Fettgewebe entstehen, in AcAc und 3HB umgewandelt. Acetyl-CoA ist die gemeinsame Verbindung der Glykolyse von Glukose und der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren zum Citratzyklus. Bei normaler Stoffwechsellage entsteht aus der Glykolyse von Glukose Pyruvat, das in Oxalacetat umgebaut wird. Dieses kondensiert mit dem aus der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren entstandenem Acetyl-CoA und wird in den Citratzyklus geschleust. Bei Glukosemangel wird Oxalacetat stattdessen für die Glukoneogenese genutzt. Außerdem kommt es wegen des erhöhten Glukagonspiegels zu einer Stimulierung der Lipolyse und damit zu einer Mobilisierung von Fettsäuren, die dann zu Acetyl-CoA umgewandelt werden. Da dieses nicht mehr zusammen mit Oxalacetat in den Citratzyklus geschleust werden kann, wird es zu Ketonkörpern umgebaut [28]. Zuerst wird Acetoacetyl-CoA durch das Enzym 3-Kethothiolase aus zwei Acetyl-CoA gebildet. Dieses wird zunächst durch die mitochondriale HMG-CoA-Synthase zu 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG CoA) und dann durch die HMG-CoA- Lyase zu AcAc umgebaut. Dieses kann anschließend zu 3HB reduziert werden oder zu Aceton decarboxylieren [35].

In der Ketogenese gibt es drei Schlüsselenzyme, die unter hormoneller Regulierung stehen. Die Hormonsensitive Lipase wird in peripheren Adipozyten translatiert und katalysiert die Konversion von Triacylglyceriden (TAG) zu Diacylglyceriden, welche später zu - für die Ketogenese benötigten - Fettsäuren umgewandelt werden. Das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase katalysiert die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. [35]. Das dritte Schlüsselenzym ist die HMG-CoA-Synthase, welche Acetoacetyl-CoA zu HMG-CoA umbaut. Die Aktivität dieses Enzyms ist bei Hunger und Hoch-Fett-Diäten erhöht und wird durch Insulin gehemmt. Eine erhöhte Aktivität der HMG-CoA-Synthase führt zu einer verstärkten Produktion von Ketonkörpern. [36] Auch wenn die HMG-CoA-Lyase kein Schlüsselenzym in diesem Sinne ist, gibt es Studien, die zeigen, dass dieses Enzym durch Fasten und Hochfettdiäten aktiviert wird [37].

Hormonell wird die Ketogenese durch Glukagon gefördert und durch Insulin gehemmt. Insulin hemmt die Lipolyse, stimuliert die Lipogenese und hemmt HMG-CoA-Synthase. Ein hoher Glukagon- und ein niedriger Insulinspiegel, wie es bei Hunger oder Diabetes der Fall ist, führen zu einer Stimulierung der Ketogenese und damit zu einer erhöhten Produktion von Ketonkörpern und somit zu Ketose [35].

## 1.7 Glukoseproduktion durch die Glukoneogenese

Die Glukoneogenese produziert Glukose aus Metaboliten, die keine Kohlenhydrate sind und garantiert einen konstanten Blutzuckerspiegel nach Verbrauch der Glykogenvorräte. Im Gehirn und den Erythrozyten wird die produzierte Glukose in der Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt. Die Produktion von Glukose kostet allerdings mehr Energie als in der Glykolyse gewonnen werden kann. Glukoneogenese wird nur deshalb betrieben, da das Gehirn und die Erythrozyten - im Gegensatz zu anderen Zellen - keine Fettsäuren als Energiequellen nutzen können und deshalb auf die Energieversorgung mit Glukose angewiesen sind. Im Gehirn allerdings wird der Glukosebedarf durch partielle Umstellung auf Ketonkörper verringert. Im Prinzip ist die Glukoneogenese, bis auf drei irreversible Reaktionsschritte, eine umgekehrte Glykolyse. Diese Schritte werden bei der Glukoneogenese durch bestimmte Schlüsselenzyme umgangen [27, 28].



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Glukoneogenese [38]**

Die vier Schlüsselenzyme sind die Pyruvatcarboxylase (1), die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK, 2), die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (3) und die Glukose-6-Phosphatase (G6PH, 4).

Die Glukoneogenese findet überwiegend in der Leber statt [38]. Auch die Niere ist zur Glukoneogenese fähig, jedoch ist ihr Beitrag zur Glukoseversorgung des Körpers noch nicht restlos geklärt [38, 39].

Schlüsselenzyme der Glukoneogenese sind die Pyruvat-Carboxylase, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK), die Fruktose-1,6-Bisphosphatase und die Glukose-6-Phosphatase (G6PH). Damit Glukoneogenese stattfinden kann, müssen alle Schlüsselenzyme vorhanden sein, um die irreversiblen Reaktionen der Glykolyse zu umgehen [40]. Dies trifft auch auf Zellen des Dünndarms zu, weshalb es Hypothesen gibt, dass dies ein weiterer Ort der Glukoseproduktion sein könnte [41].

Der quantitativ wichtigste Ausgangsstoff der hepatischen und renalen Glukoneogenese ist Laktat. Dieses wird stetig in Erythrozyten und im Falle eines Sauerstoffmangels auch im Skelettmuskel produziert. Laktat und auch Alanin aus dem Proteinabbau werden zu Pyruvat, dem Produkt der Glykolyse, umgebaut. Zusätzlich wird in der Leber auch Glycerin aus dem Abbau von Triacylglyceriden (TAG) aus dem Fettgewebe verwendet. Aus der Produktion von Glukose aus Glycerin wird weniger Energie aufgewendet als aus Laktat, da Glycerin direkt zu einem Metaboliten der Glukoneogenese umgebaut wird [27].

Früher wurde davon ausgegangen, dass die Verfügbarkeit von Substraten die Glukoneogenese reguliert [42], heutzutage gilt die Produktion von Glukose aus der Glukoneogenese bei Menschen aber innerhalb verschiedener metabolischer Zustände als relativ konstant [40].

---

## 1.8 Die zentrale Rolle der Glukosetransporter für den Glukosemetabolismus

Sowohl mit der Nahrung aufgenommene als auch im Körper synthetisierte Glukose muss vom Blutkreislauf in die Zielzellen transportiert werden [30]. Membranassoziierte Trägerproteine (Carrier) transportieren Glukose durch die Lipid-Doppelmembran der Zellen, denn diese ist für hydrophile Moleküle - wie Glukose - impermeabel. Jene Trägerproteine nennt man Glukosetransporter [29]. Diese werden in zwei Hauptgruppen klassifiziert, welche sich strukturell und funktionell unterscheiden [43]. Die natriumabhängigen Glukose-Cotransporter (kurz SGLT, Gencode SLC5A) schleusen die Glukose durch einen sekundär aktiven Transport - mit Natrium als Symporter und ATP als Energiequelle - ein. Die natriumunabhängigen Glukosetransporter (kurz GLUT, Gencode SLC2A) nutzen den Diffusionsgradienten von Glukose entlang der Plasmamembran [30]. Beide Transportergruppen gehören zur Familie der löslichen Carrierfamilie SLC [29].

Das menschliche Genom enthält 14 Mitglieder der GLUT-Familie, die man aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und charakteristischen Elementen in drei Subfamilien einteilt. Die verschiedenen Transporter der GLUT-Familie sind charakterisiert durch ihre unterschiedlichen Substratspezifitäten, kinetischen Eigenschaften und Gewebeexpressionen [43]. Wegen ihrer tragenden Rolle im Kohlenhydratmetabolismus und der umfassenden Klassifizierung ihrer Struktur, Funktion und Gewebeverteilung sollen hier nur Transporter der Klasse I näher behandelt werden. Zu dieser Klasse gehören die Transporter GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3, GLUT-4 und GLUT-14, welches exklusiv im Hoden exprimiert wird [29].

Der insulinunabhängige GLUT-1 ist ubiquitär [29, 30, 43] und dient der Grundversorgung der Zellen mit Glukose [29]. Zum ersten Mal wurde GLUT-1 im Jahr 1985 von Mueckler et al. isoliert [44]. Die höchste Expressionsrate zeigt sich in den Erythrozyten und im Gehirn [29, 30]. Zur Diffusion von Glukose über die Blut-Hirnschranke ist nur GLUT-1 in der Lage. Interessanterweise löst das GLUT-1-Mangel-Syndrom, bei dem es zu einem beeinträchtigten Glukosetransport über die Blut-Hirnschranke kommt, epileptische Symptome aus, welche erfolgreich mit einer ketogenen Diät behandelt werden können [45].

GLUT-2 wird primär in der Niere, der Leber, den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, den proximalen Tubuluszellen der Niere und den Enterozyten des Dünndarms exprimiert [29, 30, 46]. In der Leber dient er dem bidirektionalen Transport von Glukose in und aus den Hepatozyten und im Pankreas dient er als Glukose-Sensor der  $\beta$ -Zellen [30]. In den Enterozyten des Dünndarms transportiert GLUT-2 einerseits die von der Nahrung resorbierte Glukose über die basolaterale Membran in den Blutkreislauf [46], andererseits kann GLUT-2 auch bei Bedarf die Resorption

von Glukose aus dem Darmlumen unterstützen [47]. Dieser Transporter ist insulinunabhängig und niederaffin. Das heißt, dass die Transportrate von Glukose direkt von der Glukosekonzentration abhängt [29].

Glut-3 hat eine hohe Affinität und ist insulinunabhängig [29]. Er wird hauptsächlich in Gewebe mit hohem Glukosebedarf exprimiert, also vor allem im Gehirn [29, 30].

Der hochaffine Glut-4 ist insulinabhängig, weshalb er in „insulinsensitivem Gewebe“, wie im Herzmuskel, Skelettmuskel und Fettgewebe, exprimiert wird [29, 30]. Nach der Nahrungsaufnahme kommt es zu einem schnellen Anstieg des Blutzuckerspiegels [27]. Dieser postprandiale Anstieg wird durch Glut-4 reduziert. Der Anstieg des Glukosespiegels löst die Insulinausschüttung im Pankreas aus, welche die Translokation von speziellen, mit Glut-4 beladenen Vesikeln in die Plasmamembran stimuliert [29-31]. Dadurch kommt es zu einem 10- bis 20-fachen Anstieg der Glukosetransportrate in diese Zellen [48].

Die Vertreter der Klasse-I-Gluts spielen eine zentrale Rolle für den Glukosemetabolismus, da sie resorbierte Glukose in den Blutkreislauf transportieren, zur Speicherung in die Hepatozyten bringen, die Zellen stetig mit Energie versorgen und sich an der Kontrolle des Blutzuckerspiegels beteiligen.

## **1.9 Zielsetzung dieser Arbeit**

LCHF-Diäten bleiben auch weiterhin wissenschaftlich interessant. Obwohl einige positive Wirkungen auf den Metabolismus veröffentlicht wurden, bleibt die Effektivität der LCHF-Diäten umstritten. Wie oben bereits dargestellt, zählen Adipositas und ihre Folgeerkrankungen zu den wichtigsten Gesundheitsbelastungen in der industrialisierten Welt. Neue, wirksame Therapieansätze zur Gewichtsreduktion werden händeringend gesucht. Neuerdings wurde immer wieder die positive Wirkung von LCHF-Diäten auf die Insulinsensitivität beschrieben. Da sich mit der steigenden Prävalenz für Adipositas auch Diabetes Mellitus Typ 2 häuft, ist der Bedarf nach einer einfachen, effektiven und kostengünstigen Therapie groß. Ob sich LCHF-Diäten wirklich positiv oder negativ auf den Glukosemetabolismus auswirken, ist aber noch nicht geklärt. Deshalb ist das Hauptziel dieser Arbeit die Untersuchung der Auswirkungen von LCHF-Diäten auf den Glukosemetabolismus am Tiermodell Ratte.

Die Glukosetransporter spielen eine tragende Rolle für den Glukosemetabolismus. Sie beteiligen sich an der Glukoseaufnahme, der Glukoseversorgung der Zellen und der Regulation des Blutglukosespiegels. Deswegen wurden in dieser Arbeit die genauen Auswirkungen von LCHF-Diäten auf die Glukosetransporter mittels Genexpressionsstudien untersucht.

Wegen der fehlenden Glukose in der Nahrung könnte man schlussfolgern, dass LCHF-Diäten zu einer Erniedrigung des Glukosespiegels führen, jedoch gibt es keine Berichte über Hypoglykämien in der Literatur [15]. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird deshalb auch die Frage behandelt, ob die Glukoneogenese in den glukoneogenetischen Organen von LCHF-Diäten hochreguliert wird. Genauer gesagt lautet die Frage: Aus welcher Quelle wird der Glukosespiegel gespeist, wenn allein Kohlenhydrate in der Nahrung fehlen, Protein und Fett aber reichlich vorhanden sind?

Aktuelle Berichte über die Verbesserung der Insulinsensitivität durch LCHF-Diäten und deren mögliche Bedeutung zur kostengünstigen, wirksamen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 gaben den Anstoß, in dieser Arbeit die Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz zu untersuchen.

Bei LCHF-Diäten bleibt immer die Frage im Raum, ob induzierte Effekte auf den niedrigen Kohlenhydratanteil oder den hohen Fettanteil zurückzuführen sind. Deshalb wurden alle Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus zusätzlich an einer Hoch-Fett-Diät mit normalem Kohlenhydratanteil (Cafeteria) untersucht.

Außerdem wird in der gegenwärtigen Literatur davon ausgegangen, dass Ketose einfach nur unterhalb einer bestimmten Kohlenhydratzufuhr ausgelöst wird. Dies lässt allerdings die Frage offen, ob weitere Faktoren auf die Entwicklung von Ketose Einfluss nehmen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll deshalb die Frage beantwortet werden, ob die Einschränkung von Kohlenhydraten per se Ketose auslösen oder ob sich das Verhältnis von Fett und Protein in der Nahrung auf die Ketonkörperproduktion auswirkt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Kontroll- und Experimentaldiäten

Die verwendeten Diäten wurden von der Firma „Kliba Nafag“ (Provini Kliba AG) produziert. Die detaillierte Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 2 aufgeführt und wurde nach der Produktion der Diäten unabhängig durch die Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (Lufa-ITL) mittels Weender Futtermittel-Analyse bestätigt. Die Nomenklatur der verschiedenen LCHF-Diäten setzt sich aus dem prozentualen Anteil von Fett und Protein an der Trockenmasse zusammen. So hatte z.B. die LC-75/10-Diät einen relativen Fettgehalt von 75 % und einen Proteingehalt von 10 % an der Trockenmasse.

Diät	ME (Kcal/100g)	Fett (% der ME)	Protein (% der ME)	CHO (% der ME)
Chow n = 31	384	16,7	19,0	64,3
LC-75/10 n = 31	721	92,8	5,5	1,7
LC-65/20 n = 16	668	86,3	11,8	1,9
LC-55/30 n = 21	617	78,7	19,1	2,2
Cafeteria n = 20	508	61,9	18,7	19,4

**Tabelle 2: Energiegehalt und Zusammensetzung der verwendeten Diäten**

Die Zusammensetzung ist als prozentualer Anteil an der metabolisierbaren Energie (ME) nach den Atwater-Faktoren [49] angegeben.

Die Zusammensetzung der Kontrolldiät Chow entsprach der vom American Institute of Nutrition empfohlen Standard Diät AIN-93G [50]. Außerdem enthielten sowohl die LC-55/30-Diät als auch Chow einen Proteinanteil von etwa 19 % der metabolisierbaren Energie (diese waren zueinander „protein-gematched“). Die Cafeteria Diät entsprach der in der industrialisierten Welt häufigen Ernährungsweise durch eine hochenergetische HighFat-Diät. Alle Diäten wurden „semipurified“ produziert, das heißt, dass jeder Nährstoff aus einem bestimmten gereinigten Inhaltsstoff stammte [51]. Die Proteinquelle der Kontrolldiät, der Cafeteria-Diät und den LCHF-Diäten war ausschließlich Natrium-Casein. Der Fettanteil setzte sich bei der Chowdiät zu gleichen Anteilen aus Rindertalg und Sojaöl zusammen, bei den LCHF-Diäten und der Cafeteria-Diät ausschließlich aus Rindertalg. Die Kohlenhydrate in der

---

Kontrolldiät stammten aus Stärke. Alle LCHF-Diäten enthielten praktisch keine Kohlenhydrate, jedoch ist ein geringer Anteil an Kohlenhydrate in der Nahrung technisch nötig (hier ca. 2 % der metabolisierbaren Energie), um Mineralien, Vitamine und Spurenelemente im Futter zu binden. Diese wurden entsprechend der speziell für die Wachstumsphase von Nagern geschaffenen AIN-93G-Referenzdiät hinzugefügt [50]. In der Chowdiät betrug der Rohfaser- und Rohascheanteil 6,7 %, in den LCHF-Diäten 12 % und in der Cafeteria-Diät 4,2 % der Trockenmasse.

Die im Futter enthaltene Energie (Brutto-Energie) und die vom Körper tatsächlich metabolisierbare Energie (ME) unterschieden sich je nach Zusammensetzung der Diäten voneinander. Da sich die Atwater-Faktoren zur Berechnung der metabolisierbaren Energiegehalts einer Diät für Ratten bewährten [52], wurde die ME der Kontroll- und Experimentaldiäten nach dieser Formel berechnet [49]:

$$\begin{aligned} \text{ME (MJ/kg)} &= 0,01674 \times \text{Proteingehalt (g)} \\ &+ 0,03767 \times \text{Fettgehalt (g)} \\ &+ 0,01674 \times \text{Stickstoff freier Masse (g)} \end{aligned}$$

Die Kenntnis über den genauen Gehalt der wirklich verwertbaren Energie aller Diäten erlaubte eine exakte Durchführung der Paar-Fütterung.

## 2.2 Tiermodell, Haltung und Sektion

### 2.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen

Männliche Wistar Ratten (Wistar Unilever, Harlan Laboratories) aus spezifiziert pathogenfreier Haltung wurden im Alter von 10 Wochen geliefert. Die Ratten wurden einzeln auf Einstreu in Typ 3 Makrolon Käfigen (Techniplast) mit Metallgitterdeckeln in einem abgetrennten Raum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV gehalten. Während des gesamten Experiments wurden die Tiere konstant unter Standardbedingungen gehalten: Die durchschnittliche Temperatur lag bei  $21,5 \pm 3,3$  °C, die durchschnittliche Luftfeuchtigkeit bei  $55 \pm 15$  %. Bei künstlicher Beleuchtung wurde ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12-Stunden eingehalten (Licht an: um 23:00 Uhr; Licht aus: um 11:00 Uhr). Jegliche Tätigkeiten in der Dunkelperiode wurden ausschließlich unter Rotlicht durchgeführt, um die Ratten nicht in ihrem Tag-/Nachtrhythmus zu stören. Rotlicht wurde deshalb verwendet, weil Ratten Licht über 580 nm Wellenlänge nicht

---

wahrnehmen können [53]. Nach Lieferung der Ratten konnten sich diese in einer zehn- bis vierzehntägigen Akklimatisationsphase an ihre neue Umgebung und den mit ihnen interagierenden Personen gewöhnen. In dieser Zeit wurden alle Ratten mit einer pelletierten Standardnagerhaltungsdiät (Ssniff Spezialdiäten) ad libitum gefüttert. Wasser wurde während der Akklimatisierungsphase und des gesamten Experiments für alle Tiere ad libitum via Nippeltränke bereitgestellt. Nach der Akklimatisierungsphase wurden die Ratten gewogen, und abhängig von ihrem Körpergewicht in vier gleichschwere Experimentaldiätgruppen und einer Kontrollgruppe (Chow) eingeteilt (dies wird auch „weightmatching“ genannt). Die Tiere in der Kontrollgruppe und den Experimentalgruppen wurden bis zu 30 Tage mit der entsprechenden Diät gefüttert und anschließend zur Gewinnung von Probenmaterial sezient.

### *2.2.2 Lebendgewichtsmessung*

Alle zwei Tage wurde in der ersten Stunde der Dunkelphase bei allen Ratten das Körpergewicht mit einer Genauigkeit von 0,1 g gemessen (Sartorius Competence CP2201). Um Verfälschungen durch Bewegungen der Tiere während des Wiegevorgangs zu reduzieren, wurde die dynamische Wägefunktion der oben genannten Waage benutzt. Diese berechnet den Mittelwert aus 20 aufeinanderfolgenden Messungen innerhalb von zwei Sekunden und garantiert eine möglichst exakte Gewichtsmessung.

### *2.2.3 Paar-Fütterung*

Die Kontrollgruppe hatte ad libitum Zugriff auf die Chowdiät, die vier Experimentaldiäten wurden isoenergetisch zur Kontrollgruppe paar-gefüttert. Dazu wurde täglich eine Stunde nach Beginn der Dunkelperiode die 24-Stunden-Nahrungsaufnahme der ad libitum gefütterten Chowgruppe, mit einer Genauigkeit von 0,1 g, gemessen (Sartorius Competence CP2201). Zusammen mit dem Energiegehalt der Diäten ermöglichte dies die Berechnung der innerhalb von 24 h aufgenommenen Menge an metabolisierbarer Energie in der Kontrollgruppe und die Errechnung der isoenergetischen Nahrungsmenge in den vier Experimentaldiäten. Am Tag darauf wurde bei jedem einzelnen Tier in den Experimentalgruppen kontrolliert, ob die ihm angebotene Nahrung vollständig verzehrt wurde. Durch diese Methode konsumierten alle Diätgruppen die gleiche Menge an Energie. Die standardisierte Nagerdiät der Akklimatisationsphase, Chow und Cafeteria wurden aufgrund ihrer pelletierten Form in einem Futterkorb im Deckel des Käfigs angeboten. LCHF-Diäten wurden aufgrund des hohen Fettgehalts und ihrer pastösen Konsistenz in Porzellanschalen im Käfig bereitgestellt.

---

#### 2.2.4 Sektion

Aufgrund der großen Tierzahl war es nicht möglich, alle Versuchstiere einer Studie am selben Tag zu sezieren. Deswegen wurde dies an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass an jedem Tag zufällig ausgewählte Tiere aus allen Diätgruppen seziiert wurden. Dafür wurden die Ratten nach vier Wochen auf der entsprechenden Diät für sechs Stunden gefastet und mit Isofluran (Forene®, Abott) anästhesiert. Dazu wurde ca. 10 ml Isofluran in einem Glasbehälter (Schott) gegeben. Nach vollständiger Verdampfung des Isoflurans wurden die Ratten für etwa 15 Sekunden in den Behälter gesetzt. Die betäubten Ratten wurden mittels Guillotine dekapitiert.

Das aus den Halsgefäßen ausströmende Blut wurde unverzüglich über ein Trichtersystem in einem Röhrchen (S-Monovette® 7,5 ml Z-Gel, Sarstedt), das mit einem Gerinnungsaktivator gefüllt war, gesammelt, verschlossen, zur Vermischung des Vollblutes mit dem Gerinnungsfaktor mehrmals geschwenkt und für eine Viertelstunde bei Raumtemperatur aufrecht gelagert. Nach vollständiger Gerinnung wurden die Proben für 12 Minuten bei 12 °C mit 13000 x G zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf). Das Serum wurde abpipettiert und bis zur Analyse in speziellen Röhrchen (Cryo Tube, Nunc) bei - 80 °C eingefroren. Außerdem wurde eine Blutprobe von 20 µl für die Blutglukosemessung über eine spezielle Natrium-Heparin-Einmalkapillare (Hirschmann) in spezielle Reaktionsgefäße (Glucocapil Eco Solo, Care Diagnostica) entnommen, zur Vermischung der Reagenzien kräftig geschüttelt und später mittels Glukose-Oxidase-Methode (siehe Kapitel 2.5.1) analysiert (Glucoseanalyzer Eco Solo, Care Diagnostica).

Die ausgebluteten Versuchstiere wurden auf dem Rücken platziert und mit Standardsektionsbesteck (Äsculap) und Einmalskalpellen Nr. 22 (Feather) entlang der Linea Alba eröffnet. Von Inguinal wurde der Hodensack eröffnet und das darin enthaltene epididymale Fettgewebe von Samenstrang, Testis und Epididymis befreit. Das dadurch gewonnene epididymale Fettdepot wurde gewogen und in ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Stücken auf Trockeneis eingefroren. Nach Anheben des Magen-Darm-Pakets und Eröffnung des Retroperitonealraums kaudal der Leber wurde das Fettgewebe, das die Niere umgibt, von der Niere getrennt. Das dadurch gewonnene perirenale Fettdepot wurde gewogen und in etwa 1 cm<sup>2</sup> großen Stücken auf Trockeneis eingefroren. Zur Gewinnung des inguinalen Fettdepots wurde das inguinale subkutan liegende Fettgewebe mit einem Skalpell von der inneren Bauchwand bis auf die Dermis präpariert. Wegen der individuell unterschiedlichen kranialen Ausdehnung dieses Fettdepots wurde die Höhe des Xiphoids als kraniale Grenze gewählt. Anschließend wurde es gewogen und in ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Stücken auf Trockeneis eingefroren.

---

Es wurde die Leber entnommen, gewogen und ungefähr 1 cm<sup>2</sup> große Proben zur RNA-Extraktion auf Trockeneis eingefroren. Zur Erstellung von Schnitten wurden bei einigen Ratten jeder Diätgruppe ein ganzer Leberlappen entnommen und im Ganzen auf Trockeneis eingefroren. Beidseitig wurde die Niere entnommen, gewogen und einige etwa 1 cm<sup>2</sup> große Nierenstücke, welche sowohl Nierenmark als auch Nierenrinde enthielten, auf Trockeneis eingefroren. Nach Ausstreichen des Duodenuminhalts wurde ca. 1 cm distal des Pylorus ein etwa 1,5 cm langes Stück des Duodenums entnommen und auf Trockeneis eingefroren. Außerdem wurde eine ca. 2 cm<sup>2</sup> große Muskelprobe aus dem Musculus quadrizeps femoris entnommen und auf Trockeneis eingefroren.

Alle auf Trockeneis eingefrorenen Proben wurden bis zur mRNA-Extraktion, bzw. Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten, bei - 80 °C gelagert.

Zuletzt wurden alle in der Ratte verbliebenen Organe, die Haut und das gesamte Fettgewebe entfernt und die daraus resultierende fettfreie Masse (Karkasse/Lean body mass) gewogen.

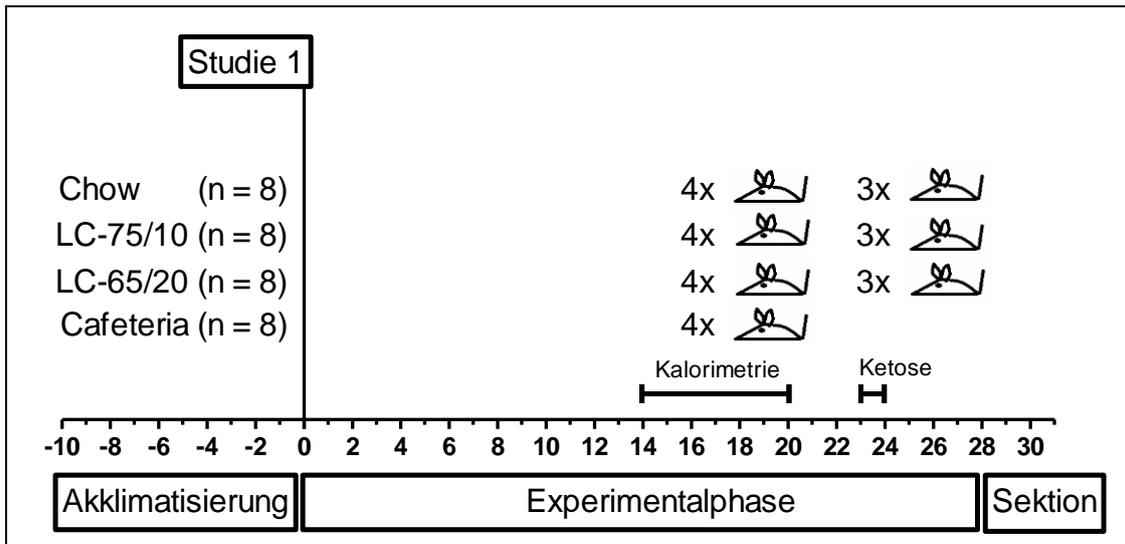
Die Gewichte der Organe und Fettdepots wurden mit einer Genauigkeit von 0,001 g (SBC 32, Scaltec Instruments) gemessen. Die Gewichte der fettfreien Masse wurden mit einer Genauigkeit von 0,1 g (Competence CP 2201, Sartorius) gemessen.

#### *2.2.5 Tierschutz & Genehmigung*

Alle Prozeduren wurden im Rahmen des aktuellen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-105-09 genehmigt.

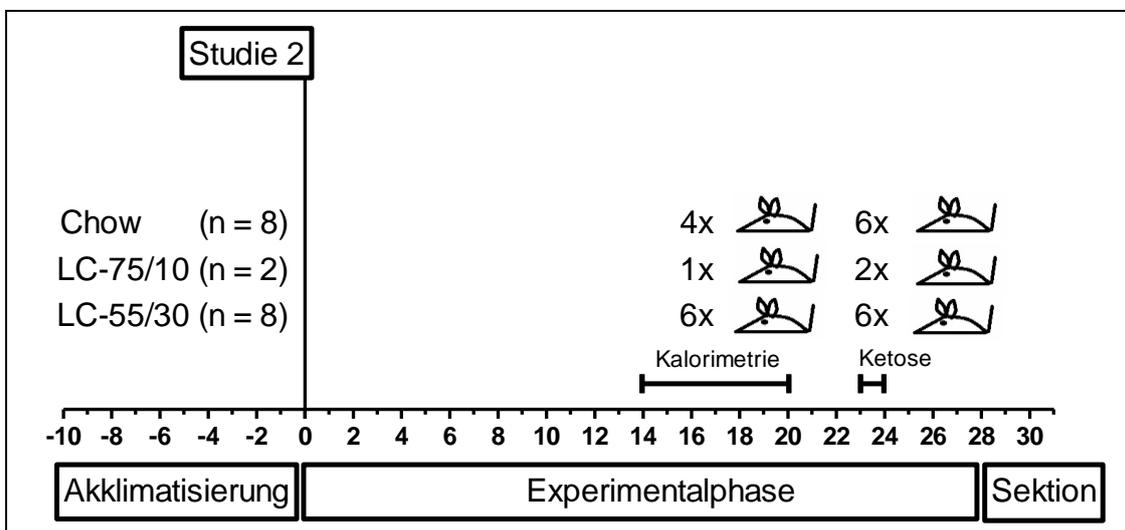
### **2.3 Studiendesign dieser Arbeit**

Aufgrund des begrenzten Platzangebots im Tierstall wurden in dieser Arbeit vier Studien mit variierenden Diätgruppen, Fallzahlen und Experimenten durchgeführt. Nach einer zehn- bis vierzehntägigen Akklimatisationsphase wurden die Ratten in die verschiedenen Experimentalgruppen, bzw. die Kontrollgruppe, eingeteilt. Die Versuchstiere wurden jeden zweiten Tag gewogen. Die Kalorimetriemessung erfolgte innerhalb der dritten Woche (Tag 14 bis 20) der jeweiligen Studie. Das sammeln von Urin- und Serumproben zur Ketonkörperbestimmung (in den Abbildungen 3 bis 6 als Ketose benannt, Tag 23 bis 24) und die Durchführung von oralen Glukosetoleranztests (oGTT) wurden innerhalb der vierten Woche (Tag 21 bis 22) durchgeführt. Die Sektion erfolgte zwischen dem 28. und dem 30. Tag.



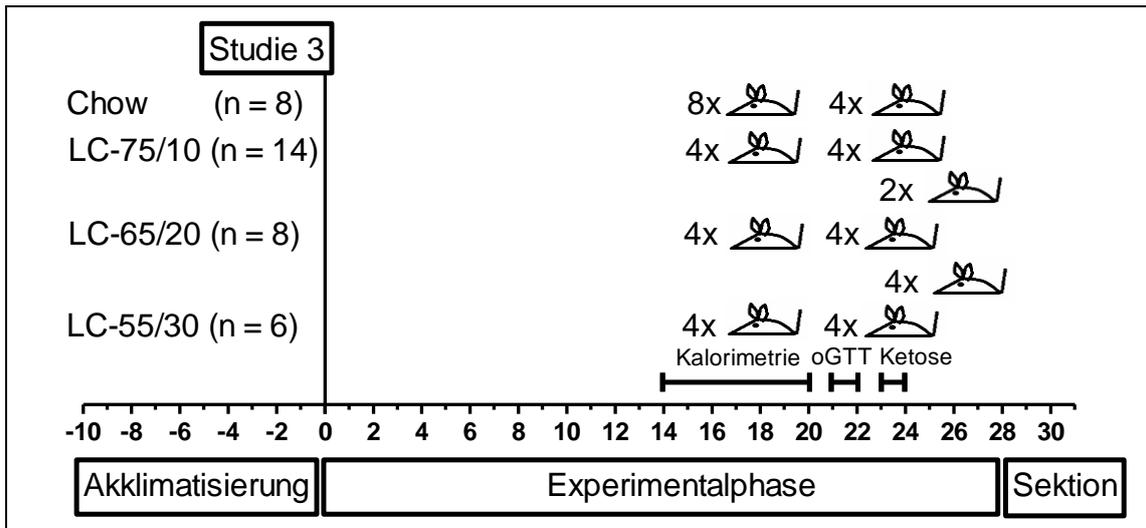
**Abbildung 3: Gruppenteilung und Zeitlinie der ersten Studie in Tagen**

Das Sammeln von Urin- und Serumproben zur Ketonkörperbestimmung ist als Ketose bezeichnet. Messungen durch das Verfahren der indirekten Kalorimetrie sind mit Kalorimetrie vermerkt. Der Buchstabe n steht für die gesamte Anzahl an Ratten in der jeweiligen Gruppe. Desweiteren ist die Anzahl der Individuen einer Gruppe angegeben, bei denen das darunter stehende Testverfahren zu einem bestimmten Zeitraum im Verlauf des Experimentes durchgeführt wurde.



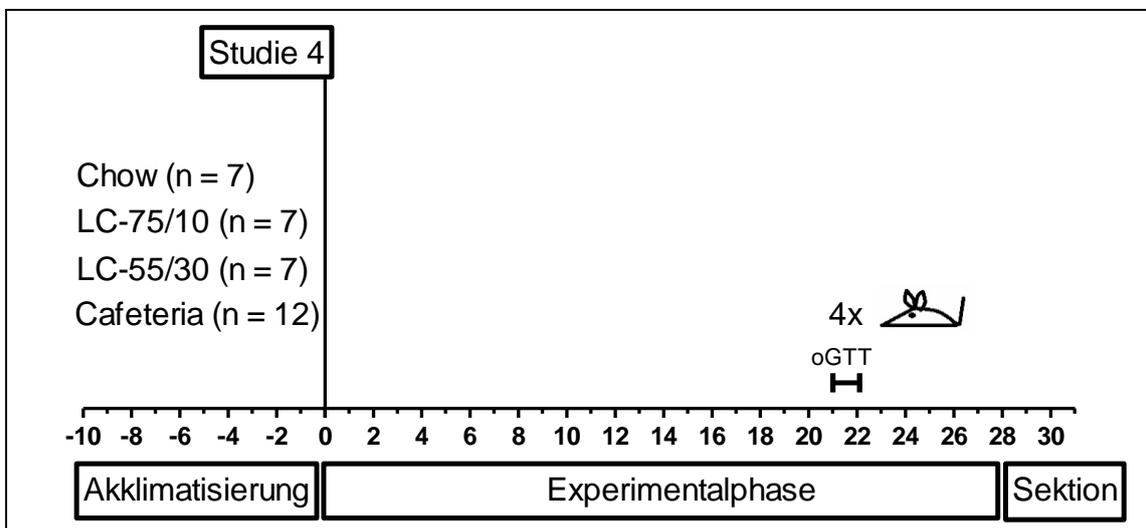
**Abbildung 4: Gruppenteilung und Zeitlinie der zweiten Studie in Tagen**

Das Sammeln von Urin- und Serumproben zur Ketonkörperbestimmung ist als Ketose bezeichnet. Messungen durch das Verfahren der indirekten Kalorimetrie sind mit Kalorimetrie vermerkt. Der Buchstabe n steht für die gesamte Anzahl an Ratten in der jeweiligen Gruppe. Desweiteren ist die Anzahl der Individuen einer Gruppe angegeben, bei denen das darunter stehende Testverfahren zu einem bestimmten Zeitraum im Verlauf des Experimentes durchgeführt wurde.



**Abbildung 5: Gruppenzuteilung und Zeitlinie der dritten Studie in Tagen**

Das Sammeln von Urin- und Serumproben zur Ketonkörperbestimmung ist als Ketose bezeichnet. Die Durchführung von oralen Glukosetoleranztests als oGTT. Messungen durch das Verfahren der indirekten Kalorimetrie sind mit Kalorimetrie vermerkt. Der Buchstabe n steht für die gesamte Anzahl an Ratten in der jeweiligen Gruppe. Desweiteren ist die Anzahl der Individuen einer Gruppe angegeben, bei denen das darunter stehende Testverfahren zu einem bestimmten Zeitraum im Verlauf des Experimentes durchgeführt wurde.



**Abbildung 6: Gruppenzuteilung und Zeitlinie der vierten Studie in Tagen**

Die Durchführung von oralen Glukosetoleranztests ist als oGTT bezeichnet. Der Buchstabe n steht für die gesamte Anzahl an Ratten in der jeweiligen Gruppe. Desweiteren ist die Anzahl der Individuen einer Gruppe angegeben, bei denen das darunter stehende Testverfahren zu einem bestimmten Zeitraum im Verlauf des Experimentes durchgeführt wurde.

---

## 2.4 Durchgeführte tierexperimentelle Methoden

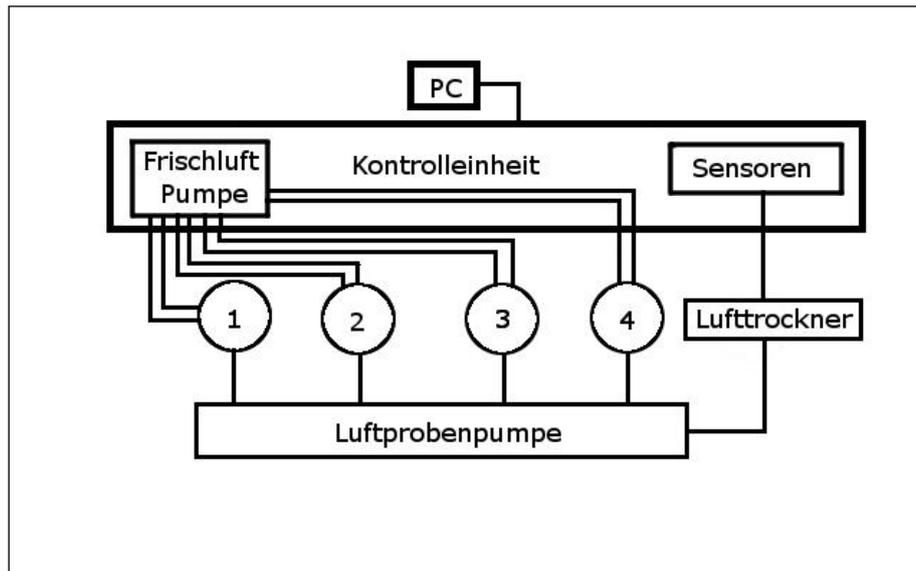
### 2.4.1 Theoretische Grundlagen der indirekten Kalorimetrie

Im Gegensatz zur direkten Kalorimetrie, bei der der totale Hitzeverlust des Körpers gemessen wird, wird bei der indirekten Kalorimetrie die Stoffwechselrate durch die Messung des  $O_2$ -Verbrauchs und der  $CO_2$ -Produktion abgeschätzt. Der gemeinsame Endweg aller Makronährstoffe (CHO, Protein und Fett) zur Energiegewinnung ist die Oxidation mit  $O_2$ , bei der  $CO_2$  und Wasser entstehen. Der respiratorische Quotient [20] steht für das Verhältnis der  $CO_2$ -Produktion zum  $O_2$ -Verbrauch. Dieser zeigt für jeden Makronährstoff einen charakteristischen Wert: 1,00 bei Glukose, 0,7 bei Fett und 0,8 bei Proteinen. Durch die Messung der Oxidationsrate der Makronährstoffe und der Kenntnis über deren kalorischer Äquivalenz lässt sich der Gesamtenergieverbrauch berechnen. Als Maß des Proteinkatabolismus muss noch die Stickstoffausscheidung im Urin berücksichtigt werden. Dies kann aber durch diverse Formeln abgeschätzt werden [54].

### 2.4.2 Versuchsaufbau der indirekten Kalorimetrie

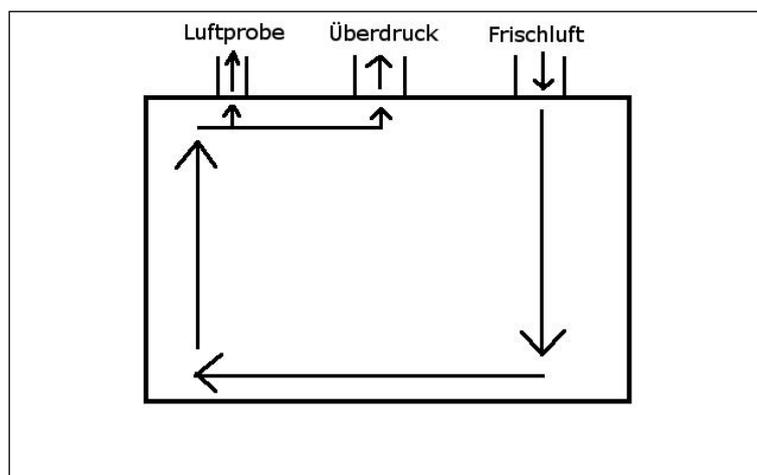
Für die indirekte Kalorimetrie wurde ein kommerziell erhältliches offenes System speziell für Labornager verwendet (CaloSys Calorimetry System, TSE Systems). Dabei verließen die Ratten ihren vertrauten Käfig nicht. Lediglich der Käfigdeckel wurde mit einem luftdicht schließenden Kunststoffdeckel des Kalorimetriesystems ausgetauscht. Wasser wurde über eine innen am Deckel befestigte Nippeltränke ad libitum bereitgestellt. Tiere auf Chow erhielten ihr pelletiertes Futter über einen speziellen, an der Innenseite des Deckels befestigten Futterkorb, Tiere auf den LCHF-Diäten über eine im Käfig platzierte Futtertasse. Um gleiche Messbedingungen zu erhalten, wurde den Tieren auf den LCHF-Diäten ein leerer Futterkorb in den Käfig gehängt. Tieren auf Chow wurde eine leere Futtertasse in den Käfig gestellt. Die Messboxen wurden durchgehend über einen Schlauch mit etwa 2 l/min frischer Raumluft versorgt. Außerdem gab es ein Überdruckventil, das sich im Falle eines Überdrucks geöffnet hätte. Die Frischluftpumpe befand sich in der Kontrolleinheit, in der auch Temperatursensoren eingebaut waren. Diese war das Herzstück des Systems und wurde von einem PC mit dessen Software LabMaster CaloSys (TSE Systems) gesteuert. Außerdem befanden sich in der Kontrolleinheit auch alle Messsensoren, die ihre Messdaten an das Computerprogramm weitergaben. Der Energieumsatz konnte dann von diesen Messwerten ( $CO_2$ -Produktion und  $O_2$ -Verbrauch) berechnet werden. Alle 15 Minuten wurde der Reihe nach für drei Minuten die Konzentration von  $O_2$  und  $CO_2$  in den vier Käfigen gemessen. Die Luft wurde dazu über einen

weiteren Schlauch in den Käfigdeckel über die Proben-Pumpe in die Kontrolleinheit gesogen. Zur abwechselnden Luftprobenentnahme befand sich in der Pumpe eine Weiche. Zwischen Probenpumpe und Kontrolleinheit befand sich eine Lufttrocknereinheit, um die Messwerte nicht durch Wasserdampf zu verfälschen. Die CO<sub>2</sub>-Konzentrations-Messung erfolgte durch einen Infrarot-Gassensor, die O<sub>2</sub>-Konzentrations-Messung durch einen Sensor aus zwei zirkoniumstabilisierten Elektroden.



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau des Kalorimetrie-Systems**

Die Ziffern 1 bis 4 stehen für die Messboxen eins bis vier.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Messbox des Kalorimetriesystems**

Die Messboxen wurden durchgehend über einen Schlauch mit etwa 2 l/min frischer Raumluft versorgt. Außerdem gab es ein Überdruckventil, das sich im Falle eines Überdrucks geöffnet hätte. Zur Messung der Konzentration von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wurde über einen weiteren Schlauch im Käfigdeckel Luft aus dem Käfig über die Proben-Pumpe in die Kontrolleinheit gesogen.

---

Die Versuchstiere befanden sich 27 Stunden im Kalorimetriesystem, wobei die ersten drei Stunden der Messungen verworfen wurden, da sich die Ratten an ihre neue Umgebung gewöhnen mussten. Die Aufzeichnungsdauer betrug also 24 Stunden.

#### *2.4.3 Durchführung des oralen Glukosetoleranztests*

Bei einem oralen Glukosetoleranztest wird dem Versuchstier eine auf sein Körpergewicht angepasste Menge Glukose (hier 4 µl einer 50 %-tigen Glukoselösung/g Körpergewicht) über eine Magensonde gegeben und die Änderung des Glukose- und Insulinspiegel in einem bestimmten Zeitraum beobachtet. Vergleichbare Studien an Ratten verabreichten eine Glukosemenge zwischen 1,5 und 2,0 g Glukose pro kg Körpergewicht [55-57].

Nach drei Wochen wurden bei insgesamt 20 Ratten orale Glukosetoleranztests durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Tiere 18 Stunden gefastet. Es wurde eine 50 %-tige Glukoselösung aus D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck) und Aqua ad iniectabilia (B.Braun) vorbereitet. Nach Zusammenbringen der Zutaten in einem Schottgefäß (Schott) wurde die Lösung 30 Minuten durch einen Magnetrührer (RH Basic 2, IKA) zu einer homogenen Flüssigkeit vermischt. Da ein Glukosetoleranztest ein dynamischer Test ist, gab es mehrere Blutabnahmezeitpunkte, die bei jeder Ratte durchgeführt wurden. Einmal kurz vor und dann jeweils 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten nach der oralen Glukosegabe, wobei immer eine Probe zur Insulinspiegelbestimmung und eine Probe zur Glukosespiegelbestimmung entnommen wurde. Das Blut wurde zu jedem Abnahmezeitpunkt aus der Schwanzvene entnommen. Um diese Prozedur stress- und schmerzfrei zu gestalten, wurden die Ratten vor jedem Abnahmezeitpunkt kurz mit Isofluran (Forene®, Abott) anaesthetisiert. Dazu wurde ca. 10 ml Isofluran in einem Glasbehälter (Schott) gegeben. Nach vollständiger Verdampfung des Isoflurans wurden die Ratten für etwa zehn Sekunden in den Behälter gesetzt. Zur Bestimmung des Insulinspiegels wurden ca. 100-150 µl des austretenden Blutes über Mikrokapillaren (Microheamatocrit Tubes Na-Heparin, Brand) in Reaktionsgefäße (Eppendorf) gegeben, bis zur vollständigen Gerinnung inkubiert und für 12 Minuten bei 4 °C mit 13000 x G zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf). Das daraus gewonnene Serum wurde abpipettiert und bis zur Analyse bei - 80°C in speziellen Röhrchen (Cryo Tube, Nunc) eingefroren. Zur Bestimmung des Glukosespiegels wurde 20 µl des auslaufenden Blutes über spezielle Na-Heparin-Einmalkapillare (Hirschmann) in spezielle Reaktionsgefäße (Glucocapil, Eco Solo, Care Diagnostica) gegeben, zur Vermischung der Reagenzien kräftig geschüttelt und später mittels Glukose-Oxidase-Methode (siehe Kapitel 2.5.1) analysiert (Glucoseanalyzer Eco Solo, Care Diagnostica). Für die Glukosegabe selbst wurden die Ratten, wie oben beschrieben, mit

---

Isofluran (Forene®, Abbott) anästhesiert. Danach wurde ihnen sofort über eine Magensonde (Eingabekanüle mit Knopf, Eickemeyer) mit einer 2 ml Einwegspritze (Injekt®, B. Braun) 4 µl pro Gramm Körpergewicht der 50 %-tigen Glukoselösung gegeben. Während der Dauer des Tests von drei Stunden wurde den Ratten der Zugang zu Futter und Wasser verwehrt und unmittelbar nach Beendigung des Tests wieder gewährt. Aufgrund der körperlichen Belastung und dem daraus folgenden Gewichtsverlust, die dieser Test für die Ratten darstellt, wurden diese am Folgetag von der Lebendgewichtbestimmung ausgeschlossen.

#### *2.4.4 Probengewinnung für die Ketonkörpermessung*

Zur Gewinnung von Urinproben wurde nach 23 Tagen auf Diät bei 29 Ratten die Streu entfernt und ein metallenes Lochgitter (Techniplast) im Käfigboden platziert. Kot und Urin konnten durch dieses Gitter auf den Käfigboden fallen, die Ratten konnten diese aufgrund des Abstands zum Käfigboden aber nicht erreichen. Nach sechs Stunden wurde der angesammelte Urin mit einer 2 ml Einwegspritze Injekt® (B. Braun Melsungen) entnommen. Zunächst wurde die Ketonkörperkonzentration mittels den im Handel erhältlichen Urineststreifen „Ketostix“ (Bayer) und „Ketodiabur Sticks“ (Roche) nach Herstelleranweisung gemessen. Dazu wurden einige Tropfen des Urins auf das Testfeld der Urineststreifen beider Hersteller gegeben und die hervorgerufene Farbänderung mit einer beiliegenden Farbskala verglichen. Der Rest des gesammelten Urins wurde in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und bis zur Analyse unberührt bei - 20 °C gelagert. Direkt danach wurde eine Blutprobe aus der Schwanzvene, über Mikrokapillaren (Microheamatocrit Tubes Na-Heparin, Brand), in ein Reaktionsgefäß (Eppendorf) entnommen. Die Blutproben wurden zwölf Minuten bei 4 °C mit 13000 x G zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf), das daraus gewonnene Serum abpipettiert und bis zur Analyse bei - 80°C in speziellen Röhrchen (Cryo Tube, Nunc) eingefroren.

Die gewonnenen Blut- und Urinproben wurden später in ein externes Labor versendet (Laboratoriumsmedizin Dortmund) und dort untersucht. Die Urinproben wurden auf ihre Acetonkonzentration mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrikopplung (GC/MS-Analyse) untersucht. Dazu wurden die zu untersuchenden Stoffe durch den Gaschromatographen aufgetrennt und durch einen Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert [58]. Wenn die Acetonkonzentration im Urin unterhalb des Detektionslimits war, wurde der Wert auf 1 mg/dl gesetzt. Die Blutproben wurden auf ihre 3-HB-Konzentration mit Hilfe eines automatischen Systems, dem Autokit 3-HB-R1 und -R2 (Wako Chemicals), untersucht.

---

## 2.5 Verwendete laborexperimentelle Methoden

### 2.5.1 *Messung der Glukosekonzentration im Vollblut*

Im Rahmen der Sektion und den oGTTs wurde der Glukoseanalyzer Eco Solo (Care Diagnostica) zur Messung der Glukosekonzentration im Vollblut benutzt. Die Messung erfolgte dabei maximal drei Stunden nach der Probenentnahme. Bei jeder Einzelmessung wurde eine der oben beschriebenen Blutproben kräftig geschüttelt, der Deckel des Reaktionsgefäßes abgeschnitten, das Gefäß mit der Probe in die Messvorrichtung gesteckt und einzeln gemessen. Das Gerät wurde vor der ersten Messung mit einer Kalibrationslösung (Care Diagnostica) kalibriert. Der Glukoseanalyzer Eco Solo nutzt die Glukose-Oxidase-Methode. Bei diesem sehr häufig bei Schnelltest-Kits für Diabetiker angewendeten Testprinzip wird Glukose durch das Enzym Glukose-Oxidase sauerstoff-abhängig oxidiert. Bei dieser Reaktion entstehen Gluconolacton und Wasserstoffperoxid, wobei letzteres bei einer nachgeschalteten Farbreaktion durch das Enzym Peroxidase (POD) zu Wasser reduziert wird [59].

### 2.5.2 *Konzentrationsbestimmung freier Fettsäuren im Serum*

Für die Messung der freien Fettsäuren wurden Serumproben von sechsstündig-gefasteten Ratten untersucht. Diese entsprachen dem bei der Sektion gewonnenen Probenmaterial. Die Serumproben wurden mit dem „Free fatty acids, Half-micro test“-Kit (Roche Diagnostics) nach dem Testprinzip der enzymatischen Kolorimetrie gemessen. Darunter versteht man die Konzentrationsbestimmung einer lichtabsorbierenden Substanz durch eine Vergleichsmessung mit einer Probe bekannter Konzentration [58]. Die tiefgefrorenen Proben wurden vor ihrer Verwendung bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und anschließend auf dem Vortexer Vibro Fix VF2 (IKA®-Werke) gemischt und nach dem im Kit enthaltenen Protokoll mit den Kitreagenzien verarbeitet. Außerdem wurde eine Leer-, bzw. Referenzprobe mit Aqua ad iniectabilia (B.Braun) angefertigt. Die vorbereiteten Proben und die Referenzprobe wurden durch ein DU® - 62 Spectrophotometer (Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 546 nm auf deren Absorption gemessen. Die Konzentration freier Fettsäuren wurde, unter Berücksichtigung der Vergleichsprobe, mit Hilfe der im Protokoll enthaltenen Formel berechnet (Microsoft Excel 2003).

---

### 2.5.3 Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum

Zur Quantifizierung von Analytmolekülen werden häufig immunologische Verfahren genutzt. Bei den nichtkompetitiven Immunoassays, den sogenannten Sandwich-Assays, wird der zu untersuchende Analyt mit einem Fangantikörper gebunden und mit einem Detektionsantikörper markiert. Ist die signalgebende Substanz auf dem Detektionsantikörper ein Enzym, spricht man von einem ELISA (Enzym linked immunosorbant assay). Bei einem Sandwich ELISA wird nach Bindung der Antikörper und Entfernung ungebundener Bestandteile eines Chromogens der Farbumschlag gemessen, der im Gegensatz zu kompetitiven Verfahren proportional zur Konzentration der untersuchten Analyts ist [60].

Im Rahmen der Sektion und des oralen Glukosetoleranztests wurden Serumproben zur Bestimmung der Insulinkonzentration gewonnen. Bei den Proben der Sektion wurden die Ratten sechs Stunden gefastet, bei den Proben des oralen Glukosetoleranztests 18 Stunden. Diese Proben wurden mit dem Sandwich-Typ-Immunoassay „Insulin (Rat) Ultrasensitive ELISA“ (Alpco Diagnostics) streng nach dem beigefügten Protokoll gemessen. Die tiefgefrorenen Proben wurden vor ihrer Verwendung bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und anschließend auf dem Vortexer Vibro Fix VF2 (IKA®-Werke) gemischt. Im Rahmen der Messung wurde die 96-Well-Mikroplatte des Kits benutzt, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Insulin beschichtet war. Insulin-Standards, Insulin-Kontrollen und die wie oben dargestellt vorbereiteten Proben wurden zusammen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Insulin, der mit Meerrettich-Peroxidase markiert war, in die einzelnen Wells der Mikroplatte gegeben. Nach einer Inkubation auf einem Wallac 1296-003 Delfia® Plateshake (Perkin Elmer) wurde die Mikroplatte mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Nach Hinzugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) in jedes Well wurde die Mikroplatte erneut auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser zweiten Inkubation wurde die enzymatische Farbreaktion mit einer sauren Stopplösung angehalten und die optische Dichte durch ein Spectrophotometer Tecan Spectra II Microplate Reader (Tecan Deutschland) bei 450 nm - mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm - gemessen. Die Intensität der generierten Farbe in der Probe ist direkt proportional mit der Insulinkonzentration.

### 2.5.4 Anfertigung von Leberschnitten mit Sudan®- III-Rot-Färbung

Von den bei der Sektion eingefrorenen Lebern wurden mit einem Kryostat (SLEE Technik) 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Sudan®-III-Lösung (Sigma-Aldrich) inkubiert und für 30 Sekunden mit Hemalaun (Merck) blau

---

gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte in Glycerin-Gelatine (Merck) fixiert und bis zur Mikroskopierung auf Objektträger aufgetragen. Dafür wurde ein Mikroskop mit 20-fach-vergrößernder Linse verwendet (Leica DM 2500). Die digitale Kamera (Leica DFC340 FX) war direkt mit dem Mikroskop verbunden. Es wurde jeweils ein Bild mit 100-facher und 200-facher Vergrößerung angefertigt.

## **2.6 Angewandte molekularbiologische Methoden**

### *2.6.1 Theoretische Grundlagen der RNA-Extraktion*

Beim Umgang mit Ribonucleinsäuren (RNA) müssen deren besondere Eigenschaften und die Unterschiede zur DNA bedacht werden. RNA ist im Gegensatz zur DNA nicht doppelsträngig, sondern einzelsträngig. Außerdem ist sie extrem anfällig für spontane Hydrolyse und dem exo- und endonucleolytischen Abbau durch RNasen. Diese RNasen sind selbst sehr stabil und kommen ubiquitär vor.

Durch diese Eigenschaften ist RNA deutlich instabiler als DNA und benötigt spezielle Vorsichtsmaßnahmen, vor allem gegen RNasen. Da diese auch auf den Händen vorkommen, müssen immer Handschuhe getragen werden. Alle Arbeitsgeräte und Gebrauchsgegenstände, z.B. Pipetten, müssen RNase frei sein. Bei 0 bis 4 °C ist die RNaseaktivität deutlich geringer als bei Raumtemperatur, weshalb Proben mit RNA immer auf Eis liegen und bei mindestens -70 °C gelagert werden sollten. Auch die Zugabe von RNase-Inhibitoren, wie z.B. Diethylpyrocarbonat (DEPC), kann die RNA vor der Denaturierung schützen. Zur Isolierung der RNA gibt es einige Hauptarbeitsschritte, wobei sich diese je nach gewählter Arbeitsmethode im Detail unterscheiden können. Die Zelle muss zunächst aufgeschlossen werden, bei festen Gewebestücken müssen diese zuvor homogenisiert werden. Die RNA kann dann von allen übrigen Zellbestandteilen getrennt werden. Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wird diese im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zu dem Agarosegel wird Ethidiumbromid hinzugegeben, das in Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert. Die RNA zeigt dabei idealerweise drei fluoreszierende Banden: Die 5S, 18S und die 28S Bande der ribosomalen RNA. Ist die RNA intakt, sind diese Banden klar zu erkennen. Sind diese Banden unscharf, ist die RNA denaturiert und kann nicht verwendet werden.

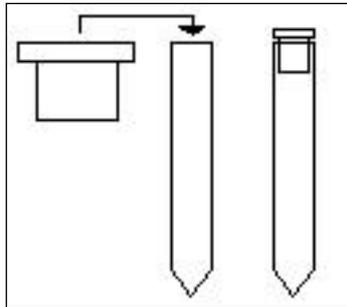
Nach diesem Schritt kann die RNA in einem eigenen Arbeitsschritt mittels Reverser Transkriptase in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese cDNA kann dann für Genexpressionsstudien mittels quantitativer Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (quantitativer Realtime-PCR) eingesetzt werden [61].

---

### 2.6.2 Durchführung der RNA-Extraktion

Zur Isolierung der RNA aus den verschiedenen Gewebeproben, die im Rahmen der Sektion gesammelt wurden, wurde das Kit „SV Total RNA Isolation System“ (Invitrogen) genutzt. In diesem Absatz erwähnte Reagenzien, welche mit Invitrogen vermerkt sind, stammen aus diesem RNA-Isolations-Kit. Falls nötig wurden die im Kit enthaltenen Reagenzien wie im beigelegten Protokoll vorbereitet. Aufgrund der Fragilität der zu isolierenden RNA wurden bei allen Vorgängen im Kit enthaltene oder autoklavierte Reaktionsgefäße und gefilterte Pipettenspitzen (Sarstedt) benutzt. Zunächst wurde für jede Probe 175 µl des vorbereiteten RNA Lysis Buffer (Invitrogen) in ein autoklaviertes 2ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert und in einen gekühlten Ständer gestellt. Die Boxen mit den Organproben wurden aus dem -80°C Gefrierschrank in eine mit Trockeneis gefüllte Styroporbox gelegt, aus der sie nie länger als 30 Sekunden genommen wurden. Von den Organproben wurde mit einem Rasiermesser ein etwa 100 mg Stück abgetrennt und sofort in ein mit RNA-Lysis-Buffer gefülltes Reaktionsgefäß gegeben. Das Abtrennen des passenden Organstücks erfolgte auf einem mit Aluminiumfolie umwickelten Kühlelement. Diese Vorsichtsmaßnahmen garantierten die lückenlose Einhaltung der Kühlkette und verhinderten eine Denaturierung der RNA in den Proben. Das Reaktionsgefäß mit der Organprobe und dem RNA-Lysis-Buffer wurde sofort mit dem Ultra Turrax T8 (IKA®-Werke) vollständig homogenisiert. Das Reaktionsgefäß wurde zurück in den gekühlten Ständer gestellt und das Gerät mit einer schwachen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung) gereinigt. Die Aluminiumfolie und die Rasierklinge wurden mit RNase free (LTF Labortechnik) abgewischt. Danach wurden weitere Organproben bis zu diesem Schritt verarbeitet. Nachdem maximal acht Proben homogenisiert wurden, wurde je 350 µl RNA Dilution Puffer (Invitrogen) hinzugefügt, der Deckel der Reaktionsgefäße verschlossen und diese kräftig geschüttelt. Die Proben wurden bei 70 °C für drei Minuten in einem Thermoblock (Haep Labor Consult) inkubiert. Nach Ablauf der drei Minuten wurden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 16000 x G zentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco, Kendro Laboratory Products). Alle Zentrifugationsvorgänge in diesem Abschnitt wurden mit derselben Temperatur und Zentrifugalbeschleunigung durchgeführt. Durch das Zentrifugieren wurden die Proben in verschiedene Phasen aufgetrennt. Die Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert. Zu jeder Probe wurde dann 200 µl 95 % Ethanol (Sigma-Aldrich®) hinzugefügt und durch Auf- und Niederdrücken der Pipette vermischt. Von dieser Lösung wurden 600 µl in den Spin Basket Assembly (Invitrogen, siehe Abbildung 9) pipettiert. Der Spin Basket Assembly mit der Lösung wurde eine Minute lang zentrifugiert. Durch den Korb in den Auffangbehälter geflossene Flüssigkeit wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde mit dem im Reaktionsgefäß übrig

gebliebenen Lysat wiederholt, da das Fassungsvermögen des Korbes 600 µl betrug, meist aber mehr Lysat entstand. In den Spin Basket Assembly, in dessen Netz die RNA jetzt gefangen war, wurden 600 µl der vorbereiteten Waschlösung hinzugefügt. Der Spin Basket Assembly wurde eine Minute zentrifugiert und der Überschuss verworfen. Danach wurde der DNase Inkubationsmix aus 40 µl YellowCore-Puffer (Invitrogen), 5 µl Magnesiumchlorid (0,09M, Invitrogen) und 5 µl rekonstituierter DNase I (Invitrogen) pro Probe auf Eis vorbereitet. Auf jede Korbmembran wurden vorsichtig 50 µl dieser Lösung pipettiert. Die Proben wurden verschlossen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Spin Basket Assembly (Invitrogen)**

Das Spin Basket Assembly besteht aus einem Korb mit Deckel, dessen Boden aus einer Membran besteht. Dieser Korb wird zunächst in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß und später in das im Kit enthaltene Elutionsgefäß hineingesteckt. Durch Zentrifugieren wird in den Korb gefüllte Flüssigkeit durch die Membran in das Elutionsgefäß gedrückt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl der vorbereiteten DNase Stopplösung in den Korb pipettiert. Die Proben wurden wieder eine Minute zentrifugiert und der Überschuss verworfen. Danach wurden 600 µl der Waschlösung in den Korb gegeben. Die Proben wurden wieder eine Minute zentrifugiert und der Überschuss ebenfalls verworfen. Danach wurden 250 µl der Waschlösung in den Korb gegeben. Die Proben wurden diesmal für drei Minuten zentrifugiert und der Überschuss wiederum verworfen. Nach diesem Schritt wurde der Deckel des Korbes abgetrennt, der Korb aus seinem Behältnis genommen und in ein „Elution Tube“ (Invitrogen) gesteckt. Es wurden vorsichtig 50 µl nukleasefreies Wasser (Invitrogen) auf die Korbmembran pipettiert und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für eine weitere Minute zentrifugiert. Die im Elution Tube gesammelte Flüssigkeit enthielt die isolierte RNA. Deshalb wurde diese sofort in einen gekühlten Ständer gestellt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen (siehe Kapitel 2.6.3) und zum Ausschluss der RNA-Degradierung mittels Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.6.4) untersucht. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von - 80°C.

### 2.6.3 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsmessung wurde mit dem Spectrophotometer Nanodrop 1000 und der zugehörigen Software Nanodrop 1000 V3.6.0 (Thermo Scientific) durchgeführt. Dazu wurde das Gerät zunächst durch Pipettieren von 1,5 µl nukleasefreiem Wasser aus dem Kit „SV Total RNA Isolation System“ (Invitrogen) auf die Messfläche gereinigt, mit einem Einwegtuch abgewischt und anschließend mit derselben Menge nucleasefreiem Wasser geeicht. Danach konnten die Proben nacheinander gemessen werden, wobei die Messfläche nach jeder Messung durch ein Einwegtuch gereinigt wurde.

### 2.6.4 Anwendung der Gelelektrophorese

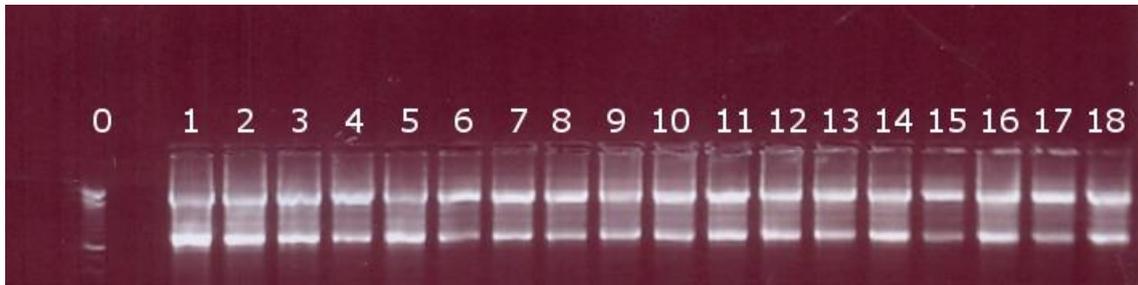
Zunächst wurde ein 1,5 %-tiges Gel erstellt. Dazu wurden 100 ml TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) und 0,75 g „peqGold UniversalAgarose“ Pulver (PeqLab Biotechnologie) in ein 500 ml Glasgefäß (Schott) gegeben und unverschlossen in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung vollständig homogen war. Zum Abkühlen wurde das Gefäß für einige Minuten in ein Wasserbad gestellt und die Agaroselösung durch einen Magnetrührer RH Basic 2 (IKA®-Werke) auf niedriger Stufe gerührt. Nach einigen Minuten wurden unter weiterem Rühren 5 µl des Fluoreszenz-Farbstoffs Ethidiumbromid (Carl Roth) hinzugefügt und die flüssige Lösung in eine Gießvorrichtung mit einem speziellen Gelkamm gegossen, in der sie zu einem Gel aushärten konnte.

Während der Aushärtung wurden die zu überprüfenden Proben vorbereitet. Aufgrund der Fragilität der isolierten RNA, wurden bei allen Schritten autoklavierte Reaktionsgefäße und gefilterte Pipetten (Sarstedt) benutzt. Zunächst wurden die bei - 80 °C gelagerten RNA-Proben auf Eis aufgetaut. Dann wurde aus jeder Probe 2 µl RNA entnommen, in ein 200 µl well von 8er-Strip-Reaktionsgefäßen (NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs) pipettiert und mit 5 µl autoklaviertem Wasser und 3 µl Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega) vermischt. Die ursprünglichen RNA-Proben wurden nach ihrer Verwendung umgehend in einen - 80 °C Kühlschrank zurück gestellt.

Nach ungefähr 30 Minuten war das Gel in einem festen Zustand und konnte verwendet werden. Der Kamm wurde aus dem ausgehärteten Gel gezogen, um kleine Taschen zu erzeugen. Gel inklusive Gießvorrichtung wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt. Die Kammer wurde so mit TBE-Puffer gefüllt, dass das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche des Gels wurden 3 µl des BenchTop 100bp DNA Ladder (100bp Abstand) (Promega) als Molekulargewichtsmarker pipettiert. Danach wurden nacheinander 5 µl jeder Probe in jede

weitere Tasche pipettiert. Das Gel wurde zur elektrophoretischen Auftrennung für 20 Minuten an eine Spannung von 80 Volt (Power Pac 300, Bio Rad Laboratories) angeschlossen.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gel aus der Kammer entnommen und mit dem Geldokumentationssystem Gel iX Imager (Intas) unter UV-Licht photographiert.



**Abbildung 10: Repräsentative Photographie der auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten RNA-Proben zur Überprüfung deren Integrität**

Die Proben stammen aus der ersten Studie. Die Ziffer 0 bezeichnet den DNA Ladder, 1 bis 18 die aufgetrennten RNA-Proben. Die Zahlen wurden nachträglich eingefügt.

#### 2.6.5 Umschreibung der RNA-Proben in cDNA

Um die fragile RNA bis zur Umschreibung zu schützen, wurden im folgenden Abschnitt ausschließlich autoklavierte Reaktionsgefäße (Eppendorf) und Pipettenspitzen (Eppendorf) benutzt. Außerdem wurden alle Schritte bis zur Inkubation auf Eis durchgeführt. Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde mit dem SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) durchgeführt.

Zunächst wurden die tiefgefrorenen RNA-Proben auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde aus den Kitreagenzien ein Mastermix aus 10 µl 2XRT Reaction Mix + 2 µl RT Enzyme Mix je Probe in einem autoklavierten 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) hergestellt und auf Eis gestellt. In autoklavierten 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) wurde ein definiertes Volumen der RNA-Probe mit einem definierten Volumen DEPC-Wasser (Invitrogen) vermischt. Die RNA-Gesamtmenge in jedem Reaktionsgefäß betrug 500 ng, das Gesamtvolumen 8 µl. Je nach in der ursprünglichen Probe enthaltenen RNA-Konzentration, wurde die Probe vorher 1:10, 1:5, 1:1 oder gar nicht verdünnt, um pipettierbare Volumina zu erhalten. Zur Berechnung (Microsoft Excel 2003) des korrekten Verhältnisses wurden die Konzentrationswerte der NanoDrop-Messung (siehe 2.6.3) verwendet.

Jedem Reaktionsgefäß wurden 12 µl des Mastermixes hinzugefügt, das Behältnis sanft geschwenkt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In den folgenden Inkubationsschritten wurden zur Vermeidung von Verzögerungen in den Arbeitsschritten zwei

---

verschiedene Thermoblöcke benutzt. Während der zehnmütigen Inkubationszeit wurde der erste Thermoblock (Thermomixer Comfort, Eppendorf) vorgeheizt. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 50 °C in diesem inkubiert. Währenddessen wurde der zweite Thermoblock (Haep Labor Consult) auf 85 °C vorgeheizt und die Proben nach Ablauf der ersten Inkubationsphase in diesem für fünf Minuten inkubiert. Nach diesen fünf Minuten wurden die Proben einige Minuten auf Eis gelegt, je 1 µl der E.coli RNase H (Invitrogen) dazugegeben und bei 37 °C für 20 Minuten im ersten Heizblock inkubiert. Nach diesem letzten Inkubationsschritt wurden die cDNA Proben bis zur Verwendung in der quantitativen Realtime-PCR bei - 20 °C gelagert.

### 2.6.6 Primerdesign

Alle Primer wurden entweder aus der Literatur übernommen oder mit dem frei verfügbaren Online Programm Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research) entworfen. Die Primer wurden von der Firma Metabion mit einer Konzentration von 100 pmol/μl geliefert und mit autoklaviertem Wasser auf 10 pmol/μl verdünnt. Diese wurden dann bei - 20 °C bis zur ihrer Verwendung gelagert.

Primer	Foward-Sequenz/Reverse-Sequenz	AT	Quelle
18S-RNA	5´ - GGGG TAG TGA CGA AAA ATA ACA AT- 3´	60 °C	Primer 3
	5´ - TTG CCC TCC AAT GGA TCC T - 3´		
Glut-2	5´ - CTC GGG CCT TAC GTG TTC TTC CTT - 3´	60 °C	Muthusamy et al. [62]
	5´ - TGG TTC CCT TCT GGT CTG TTC CTG - 3´		
Glut-4	5´ - GGG CTG TGA GTGT GCT TTC - 3´	60 °C	Muthusamy et al. [62]
	5´ - CAG CGA GGC AAG GCTA - 3´		
PEP-CK	5´ -TGC CCT CTC CCC TTA AAA AAG - 3´	55 °C	Lars et al. [63]
	5´ - CGC TTC CGAGA TGA TCT - 3´		
G6PH	5´ - CCCA CTA GAG ATC CTG ACA GAA T - 3´	60 °C	Xu et al. [64]
	5´ - GCA CAA CGC TCT TTT CTT TTA CC - 3´		
β-HMG-CoA-Lyase	5´-CGG AAG AAT GTG AAC TGC TCT A - 3´	60 °C	Primer 3
	5´-ATG TAG ACCG TCC TCG GTA G - 3´		

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer**

Die Bezeichnung AT steht für die Annealing-Temperatur des entsprechenden Primers in °C.

### 2.6.7 Testung der entworfenen Primer an verschiedenen Gewebeproben

Die Primer wurden in verschiedenen, bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Geweben getestet. Um die Primer für 18S-RNA, PEP-CK und G6PH zu testen, wurde cDNA aus zwei verschiedenen Leberproben und einer Probe aus inguinalem Fettgewebe genutzt. Für den Primer Glut-4 wurden noch zusätzlich zwei Muskelproben verwendet. Der Primer β-HMG-CoA-Lyase wurde nur an zwei Leberproben getestet. Die cDNA Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um die Integrität der cDNA zu schützen. Es wurde ein Mastermix von je 24 μl pro Probe in einem autoklavierten 1,5 ml

Reaktionsgefäß (Eppendorf) hergestellt. Die 24 µl setzen sich aus 12,5 µl GoTaq® Green Master Mix (BioRad), je 1 µl des zu testenden Forward- und Reverse-Primer und 9,5 µl autoklaviertem Wasser zusammen. In 200 µl 8er-Strips-Reaktionsgefäßen (NeoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb) wurde (siehe Tabelle 4) jeweils 1 µl cDNA-Probe mit 24 µl Mastermix vermischt. Zur Untersuchung von Primer-Dimeren wurde außerdem 1 µl autoklaviertes Wasser mit 24 µl Mastermix in ein Well pipettiert. Die leeren Streifen der Reaktionsgefäße wurden abgetrennt.

<i>Leber 1</i>	<i>Leber 2</i>	<i>Fett inguinal</i>	<i>H<sub>2</sub>O</i>
----------------	----------------	----------------------	-----------------------

**Tabelle 4: Pipettierschema der Primertestung für Glut-2, PePC und G6PH**

Die ersten drei Streifen enthielten cDNA aus den genannten Gewebeprobe. Der letzte Streifen enthielt die Negativprobe mit autoklaviertem Wasser.



**Abbildung 11: Repräsentative Photographie des elektrophoretisch aufgetrennten Test-RNA-Primer-Gemisches auf einem Agarosegel**

Die Ziffer 0 entspricht dem DNA Ladder, 1 bis 4 PEP-CK, 5 bis 8 G6PH und 9 bis 12 18S. Die Testung erfolgte aus cDNA Proben von jeweils Leber 1, Leber 2, inguinales Fettgewebe und Wasser (siehe Pipettierschema Tabelle 4, Reihenfolge auf Gel identisch). Die Zahlen wurden nachträglich eingefügt.

Nach diesem Schritt wurde das Reaktionsgefäß mit seinem Deckel verschlossen und in die PCR-Maschine Primus 25 Advanced® gestellt. Die PCR Maschine lief mit der entsprechenden Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 3) für 35 Zyklen.

---

Da im GoTaq® Green Master Mix (BioRad) bereits ein Loading Dye enthalten ist, konnte das gesamte PCR-Produkt von 25 µl direkt auf ein 1,5 %-tiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch (siehe Kapitel 2.6.4) aufgetrennt werden.

Alle getesteten Primer ergaben ein spezifisches PCR-Produkt. Die Größe des PCR-Produktes stimmte mit der erwarteten Größe des Zielgens überein. Die Negativprobe zeigte keine Primer-Dimere.

### 2.6.8 Theoretische Grundlagen der quantitativen Realtime-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zählt zu den wichtigsten Methoden der heutigen Molekularbiologie. Bei einer Standard-PCR bringt man Ausgangs-DNA mit thermostabiler DNA-Polymerase, zwei passenden Oligonukleotidprimern, Puffer und den Nukleotiden der DNA (Thymin, Adenin, Guanin, Cytosin) zusammen. Durch drei typische Arbeitsschritte wird die ursprüngliche DNA verdoppelt. Zunächst werden im Denaturierungsschritt die Doppelstränge der DNA bei 94 °C getrennt. Beim Annealingschritt können die Oligonukleotidprimer bei ihrer spezifischen Annealingtemperatur (meist 55 - 60 °C) an die Einzelstränge binden. Zuletzt synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase - von den gebundenen Primern ausgehend - den passenden Komplementärstrang im Elongationsschritt. Durch jene Arbeitsschritte wird die ursprüngliche DNA verdoppelt, wobei diese immer wieder wiederholt werden können. Nachdem man ausreichend DNA vervielfältigt hat, kann diese für verschiedene molekularbiologische Aufgaben verwendet werden [65].

Um die Expression eines bestimmten Gens zu untersuchen, verwendet man eine weiterentwickelte Variante der PCR, die quantitative Realtime-PCR. Diese ermöglicht nicht nur die Verdopplung der DNA-Stränge, sondern auch deren Quantifizierung nach jedem Verdopplungszyklus. Dabei wird in cDNA umgeschriebene RNA verwendet. Diese wird durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, z.B. SYBR® Green, markiert. Ein Detektor misst nach jedem Zyklus die Fluoreszenz, die mit der Konzentration der cDNA korreliert. Im optimalen Fall bedeutet ein PCR-Zyklus eine exakte Verdopplung, d.h. die DNA wird exponentiell vervielfältigt. In der Praxis aber tritt nach einigen Zyklen lediglich eine lineare Vermehrung auf. Dies wird durch verschiedene Dinge verursacht, wie z.B. der Verknappung von Primern und Nukleotiden oder der Deaktivierung der DNA-Polymerase. Deswegen wird die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade so vom Hintergrund abhebt, festgehalten (Ct-Wert). In diesem Bereich ist die Vervielfältigung noch exponentiell. Je höher die Ursprungskonzentration der cDNA, umso niedriger der Ct-Wert, also umso früher wird ein Signal detektiert [65].

---

Die Effizienz eines PCR-Zyklus liegt nicht bei 2,0 (das entspräche einer Verdopplung der DNA), sondern liegt im Bereich von 1,7 bis 1,9 [66]. Zur Berechnung der Effizienz dient die Erstellung einer Standardkurve aus Verdünnungsstufen [67]. Diese können aus einer Mischprobe, die sich aus allen verwendeten cDNA Proben zusammensetzt, hergestellt werden [66]. Wird die Genexpression des Zielgens in Relation zur Genexpression eines Haushaltsgens (z.B. 18S-RNA) gebracht (normalisiert), so wird dies relative Quantifizierung genannt [67]. Haushaltsgene sind nicht reguliert und werden unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert [27]. Dies verhindert den Einfluss von RNA-Extraktionsschwankungen der Proben auf die Quantifizierung.

### 2.6.9 *Praktische Anwendung der quantitativen Realtime-PCR*

Zur Untersuchung der Genexpression in einem bestimmten Gewebe mittels quantitativer Realtime-PCR wurde zunächst eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurde aus allen cDNA Proben des zu untersuchenden Gewebes je 2 µl in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert (1:1 Verdünnung) und mit der Pipette vermischt. Aus diesem Gemisch wurden 3 µl in ein mit 27 µl autoklaviertem Wasser gefülltes Reaktionsgefäß pipettiert (1:10 Verdünnung) und mit der Pipette vermischt. Aus der 1:10-Verdünnung wurden wieder 3 µl in 27 µl autoklaviertem Wasser pipettiert, um eine 1:100-Verdünnung zu bekommen. Dieser Schritt wurde noch 3-mal wiederholt, um die Verdünnungsstufen 1:1000, 1:10000 und 1:100000 zu erhalten. Die Verdünnungsreihe wurde für jedes untersuchte Gewebe erstellt und lief bei jeder quantitativen Realtime-PCR als Standardkurve mit.

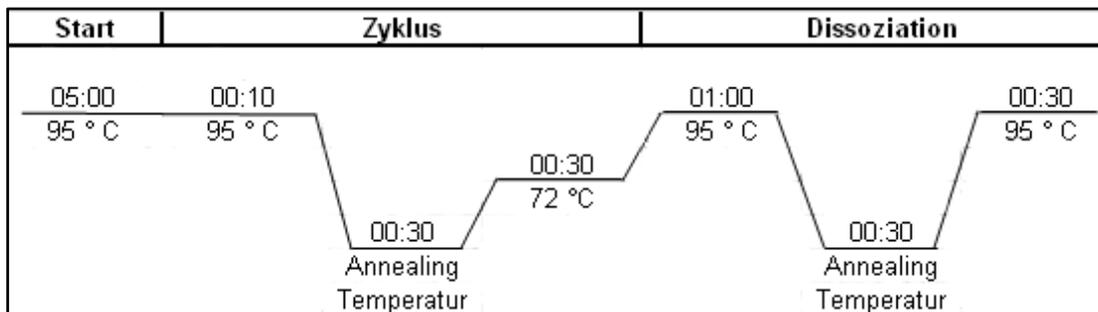
Für die PCR wurde eine 96b Multiply® PCR Platte natur (Sarstedt) benutzt. Jeder Arbeitsschritt wurde auf Eis durchgeführt, um die Integrität der cDNA zu bewahren. Es wurden ausschließlich autoklavierte Pipettenspitzen (Eppendorf) und Reaktionsgefäße (Eppendorf) benutzt.

Zunächst wurden die cDNA Proben auf Eis aufgetaut und ein Mastermix aus je 1 µl Forward- und Reverse-Primer, 10 µl Eva GreenSupermix (BioRad) und 8,5 µl autoklaviertem Wasser hergestellt. Die Proben wurden nach dem Pipettierschema (siehe Tabelle 5) als Doppelwerte pipettiert. Jeder Wert bestand aus 19,5 µl Mastermix und 0,5 µl der Standardprobe, einer Negativkontrolle aus Wasser oder einer cDNA-Probe. Auf die PCR-Platte wurde eine optisch klare Klebefolie (Sarstedt) geklebt und für etwa fünf Sekunden zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Die PCR-Platte wurde in die PCR-Maschine (Stratagene Mx3000 Pro, Stratagene) platziert. Mit der PCR-Software (MxPro – Mx3000P v4.01, Stratagene) wurden die benötigten Einstellungen getroffen und die PCR-Maschine gestartet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
B	S2	S2	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
C	S3	S3	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
D	S4	S4	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
E	S5	S5	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
F	S6	S6	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
G	-	-	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
H	NTC	NTC	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40

**Tabelle 5: Pipettierschema einer PCR-Platte**

Die Abkürzung S steht für Standardprobe, NTC für eine Negativkontrolle mit autoklaviertem Wasser und P für Probe. S1 entspricht hierbei einer 1:1-, S2 der 1:10-, S3 einer 1:100-, S4 einer 1:1000-, S5 einer 1:10000- und S6 einer 1:100000-Verdünnung. Es konnten bis zu 40 Proben gleichzeitig untersucht werden.



**Abbildung 12: Graphische Darstellung der quantitativen Realtime-PCR**

Der Zyklus wurde 35-mal wiederholt. Die Annealing-Temperatur ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

## 2.7 Verwendung des „Homeostatic Model Assessment“ (HOMA)

Der HOMA-Index schätzt die Insulinsensitivität (HOMA-%S), die Insulinresistenz (HOMA-IR) und die  $\beta$ -Zellfunktion (HOMA-%B) anhand des Nüchterninsulin- und Nüchternglukosespiegels eines Menschen ab. HOMA-IR ist schlichtweg das reziproke HOMA-%S und wird in der logarithmierten Form auch als Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) bezeichnet. Das Computermodell HOMA2 ist die Verbesserung des ursprünglichen HOMA1 und macht den Vorgänger somit obsolet [68].

Zur Berechnung des HOMA2-Index wurde die frei zur Verfügung stehende, kostenfreie Software HOMA Calculator v. 2.2.2 der Universität Oxford (<http://www.dtu.ox.ac.uk>) benutzt.

---

## 2.8 Statistische Analysen

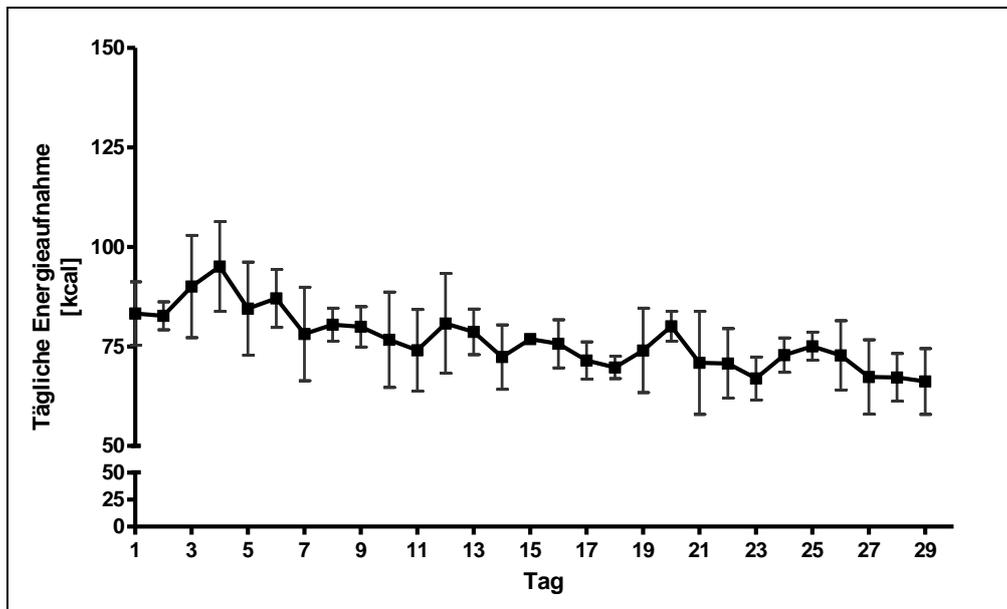
Für die statistischen Auswertungen der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurde das Programm „Graph Pad Prism 5 Version 5.01“ (Graph Pad Software, Inc.) verwendet. Zunächst wurden alle Daten auf Normalverteilung getestet. Zur Berechnung statistischer Unterschiede zwischen drei oder mehr Gruppen wurde ein „one-way ANOVA“ mit anschließendem Bonferroni post-hoc Tests durchgeführt. Wenn ANOVA eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $P < 0,05$ ) ergab, wurden die Gruppenunterschiede als signifikant gewertet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % ( $p < 0,01$ ) wurden die Gruppenunterschiede als hochsignifikant gewertet. Wichen Messwerte um mehr als das doppelte der Standardabweichung der Gruppenmittelwerte ab, wurden diese von der Auswertung ausgeschlossen. Sofern nicht anders angegeben sind in dieser Arbeit alle Daten als Mittelwert  $\pm$  SD (standard deviation/Standardabweichung) angegeben. Bei der graphischen Darstellung von Ergebnissen unterscheiden sich Gruppen mit gleichen Buchstaben zueinander nicht, jedoch signifikant zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner anderen Gruppe signifikant. Die Abkürzung n.s. zeigt, dass es überhaupt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gibt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tägliche Energieaufnahme und Gewichtsverlauf der Diätgruppen

#### 3.1.1 Tägliche Energieaufnahme

Täglich wurde die verzehrte Energiemenge der ad libitum gefütterten Kontrollgruppe gemessen. Da alle experimentellen Diätgruppen isoenergetisch zur Kontrollgruppe paargefüttert wurden, entspricht dies der täglichen Energieaufnahme aller Diätgruppen. Durchschnittlich nahmen die Ratten  $76,5 \pm 9,8$  kcal pro Tag auf, wobei die täglich verzehrte Futtermenge zu Beginn des Experiments höher war und sich dann im Verlauf des Experiments leicht verringerte.

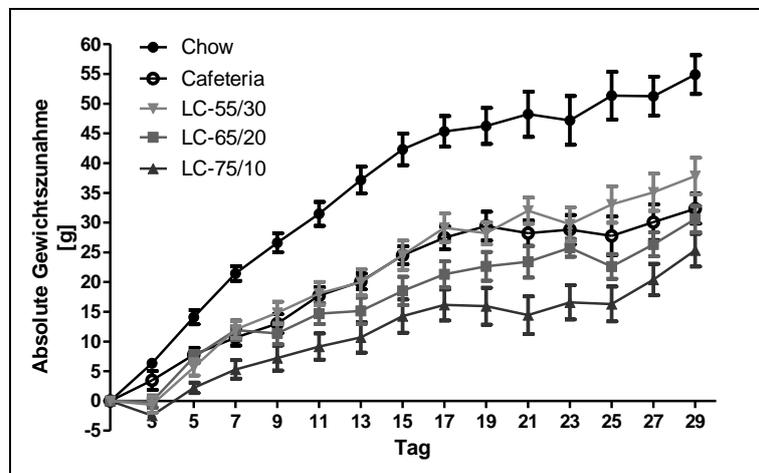


**Abbildung 13: Tägliche Energieaufnahme der ad libitum gefütterten Kontrollgruppe**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben.

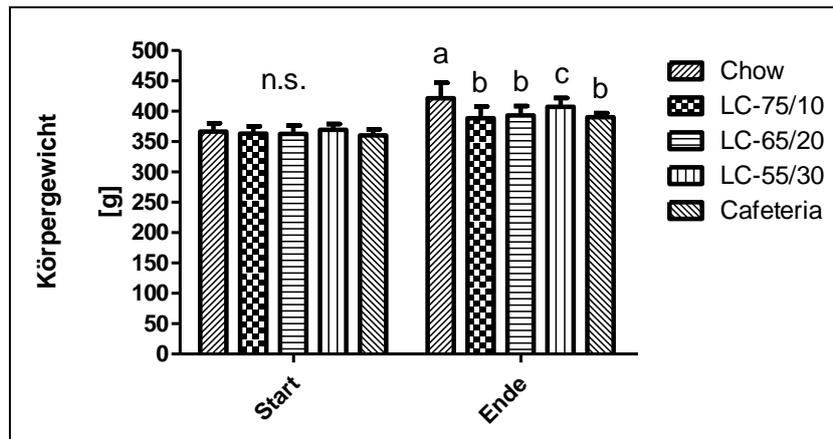
### 3.1.2 Gewichtsverlauf der Diätgruppen

Alle zwei Tage wurde das Körpergewicht gemessen. Um Schwankungen des Anfangsgewichtes zu eliminieren, ist in der Graphik nicht das absolute Körpergewicht, sondern der tägliche Gewichtszuwachs, dargestellt. Zur besseren Übersicht wird der Gewichtsverlauf als Mittelwert mit SEM (standard error of the mean, Standardfehler) ausgedrückt. Die verschiedenen Gruppen wiesen zu Beginn des Experiments (Tag 1) keine signifikanten Gewichtsunterschiede auf (Chow:  $366,3 \pm 13,8$  g; LC-75/10:  $363,2 \pm 12,1$  g; LC-65/20:  $362,6 \pm 13,7$  g; LC-55/10:  $369,6 \pm 9,4$  g; Cafeteria:  $360,0 \pm 10,1$  g). Der Gewichtsverlauf zeigte eine stetige Zunahme in allen Gruppen, außer in den ersten vier Tagen der Diät. In dieser Zeit nahmen Ratten auf den LCHF-Diäten nicht zu, in der LCHF-Gruppe mit dem höchsten Fettgehalt (LC-75/10) leicht ab. Am letzten Tag des Experiments war das Gewicht der Kontrollgruppe ( $421,3 \pm 25,7$  g) signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in allen anderen Diätgruppen. Die Gruppen LC-75/10 ( $388,5 \pm 19,2$  g) und LC-65/20 ( $393,2 \pm 15,2$  g) waren signifikant ( $p < 0,05$ ) leichter im Vergleich zur LC-55/30-Gruppe ( $407,4 \pm 14,4$  g). Versuchstiere auf der Cafeteria-Diät ( $390,0 \pm 6,9$  g) waren signifikant ( $p < 0,05$ ) leichter als auf Chow und LC-55/30, unterschieden sich jedoch nicht zu LC-75/10 und LC-65/20.



**Abbildung 14: Absolute Gewichtszunahme (n = 8 - 24) während des Experiments bezogen auf das Startgewicht**

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

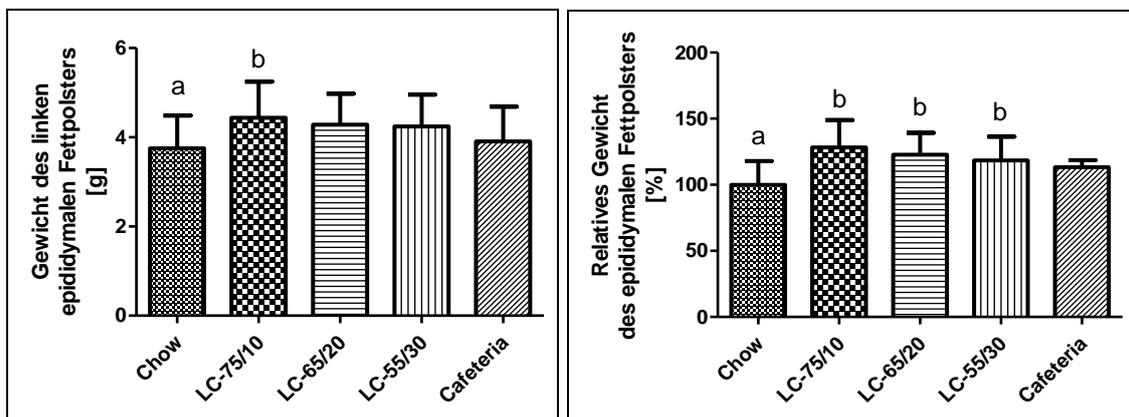


**Abbildung 15: Durchschnittliches Körpergewicht (n = 8 - 24) zu Beginn (erster Tag) und am Ende (nach vier Wochen) auf Diät**

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD angegeben. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Diätgruppen gab. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

## 3.2 Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung

### 3.2.1 Gewicht der epididymalen, perirenal und inguinalen Fettdepots

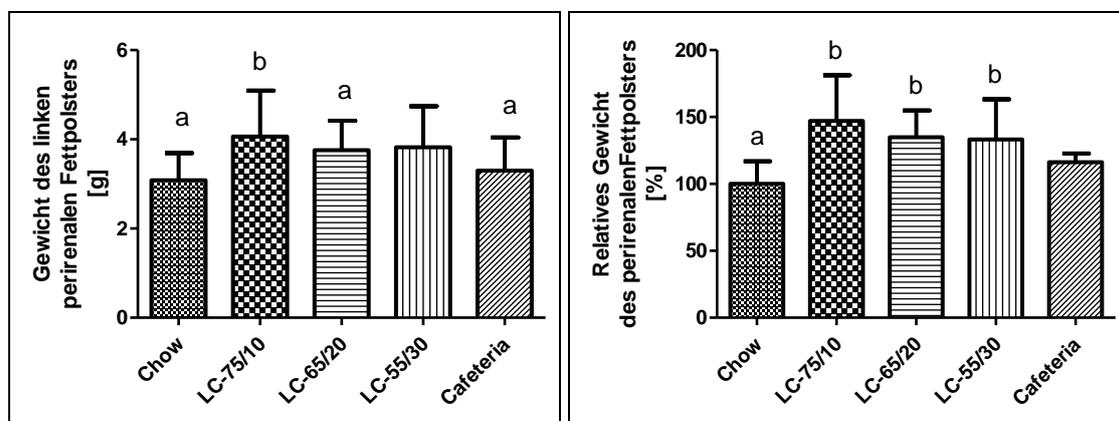


**Abbildung 16: Absolutes (links,) und relatives (normalisiert auf das Körpergewicht und als prozentualer Unterschied zu Chow ausgedrückt - rechts) Gewicht des linken epididymalen Fettdepots (n = 15 - 30) nach vier Wochen auf Diät**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

Nach vier Wochen wurden die Ratten sezirt, deren Fettdepots entnommen und gewogen. Das absolute Gewicht des epididymalen Fettdepots war in der LC-75/10 Gruppe ( $4,44 \pm 0,81$  g)

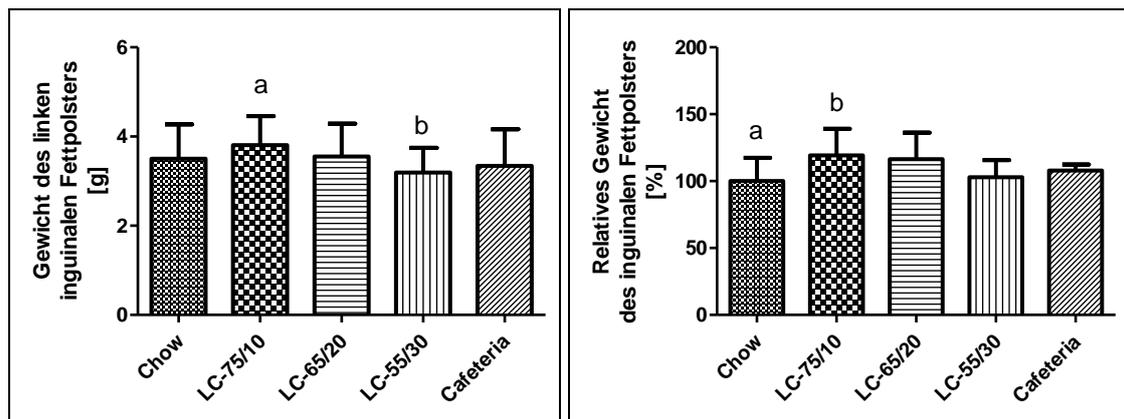
signifikant größer ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe ( $3,75 \pm 0,74$  g). Es gab keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den LCHF-Diätgruppen (LC-65/20:  $4,28 \pm 0,70$  g; LC-55/30:  $4,25 \pm 0,71$  g) oder Cafeteria ( $3,91 \pm 0,78$  g). Normalisiert man die Gewichte der Fettdepots auf das Körpergewicht des Individuums und drückt es als prozentualen Unterschied zur Kontrollgruppe aus, erhält man das relative Gewicht. In diesem unterschieden sich Chow ( $100 \pm 17,9$  %) und Cafeteria ( $113,3 \pm 21,6$  %) nicht voneinander. Alle LCHF-Diätgruppen (LC-75/10:  $128,2 \pm 20,8$  %; LC-65/20:  $122,8 \pm 16,4$  %; LC-55/30:  $118,3 \pm 18$  %) unterschieden sich nicht signifikant zur Cafeteria-Diät oder untereinander, jedoch waren alle relativen Gewichte der LCHF-Diätgruppen signifikant größer ( $p < 0,05$ ) als die der Kontrollgruppe.



**Abbildung 17: Absolutes (links) und relatives (normalisiert auf das Körpergewicht und als prozentualer Unterschied zu Chow ausgedrückt - rechts) Gewicht des linken perirenal Fettdepots (n = 15 - 30) nach vier Wochen auf Diät**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

Das absolute Gewicht der perirenal Fettdepots der LC-75/10-Gruppe ( $4,06 \pm 1,03$  g) war signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als das der Chow- ( $3,08 \pm 0,61$  g), LC-65/20- ( $3,76 \pm 0,66$  g) und Cafeteria-Gruppe ( $3,30 \pm 0,74$  g), unterschied sich jedoch nicht signifikant von der LC-55/30-Gruppe ( $3,82 \pm 0,92$  g). Alle anderen Diätgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander auf. Das Gewicht der perirenal Fettdepots in der LC-55/30 war signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als das der Chow- und LC-65/20-Gruppe. Die relativen Gewichte der perirenal Fettdepots aller LCHF-Diäten (LC-75/10:  $147,1 \pm 34,2$  %; LC-65/20:  $135,0 \pm 20,0$  %; LC-55/30:  $133,2 \pm 30,0$  %) waren signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als die der Kontrollgruppe ( $100,0 \pm 17,0$  %). Die Cafeteria-Gruppe ( $116,3 \pm 27,6$  %) wies keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Diätgruppen auf.



**Abbildung 18: Absolutes (links) und relatives (normalisiert auf das Körpergewicht und als prozentualer Unterschied zu Chow ausgedrückt - rechts) Gewicht des linken inguinalen Fettdepots (n = 15 - 30) nach vier Wochen auf Diät**

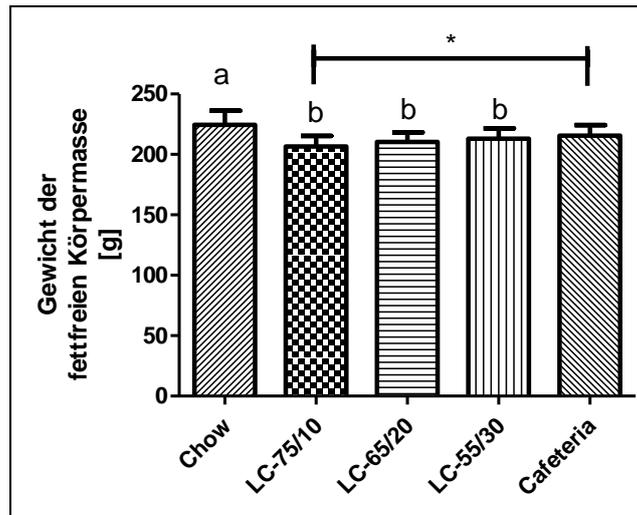
Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

Das absolute Gewicht der inguinalen Fettdepots auf der LC-75/10-Diät ( $3,81 \pm 0,65$  g) war signifikant größer ( $p < 0,05$ ) als auf der LC-55/30-Diät ( $3,20 \pm 0,55$  g). Alle anderen Diäten (Chow:  $3,50 \pm 0,77$  g; LC-65/20:  $3,55 \pm 0,74$  g; Cafeteria:  $3,34 \pm 0,82$  g) zeigten keine signifikante Differenz zueinander.

Die relativen Gewichte der inguinalen Fettdepots in der LC-75/10-Gruppe ( $119,3 \pm 19,9$  %) waren signifikant größer ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe ( $100 \pm 17,4$  %). Es gab keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen allen Diätgruppen (LC-65/20:  $116,5 \pm 19,8$  %; LC-55/30:  $102,9 \pm 12,9$  %; Cafeteria:  $107,8 \pm 18,6$  %).

### 3.2.2 Gewicht der fettfreien Körpermasse

Das Gewicht der fettfreien Körpermasse, auch Karkasse oder lean body mass genannt, war im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $224,5 \pm 11,7$  g) in den LCHF-Gruppen Diäten (LC-75/10:  $206,6 \pm 8,6$  g; LC-65/20:  $210,4 \pm 7,9$  g; LC-55/30:  $213,0 \pm 8,6$  g) signifikant leichter ( $p < 0,05$ ). Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen LCHF-Gruppen auf. Versuchstiere auf der Cafeteria-Diät hatten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) schwerere Karkasse ( $215,5 \pm 8,8$  g) als Ratten auf LC-75/10, zeigten aber sonst keine signifikante Differenz zu den anderen Diäten.

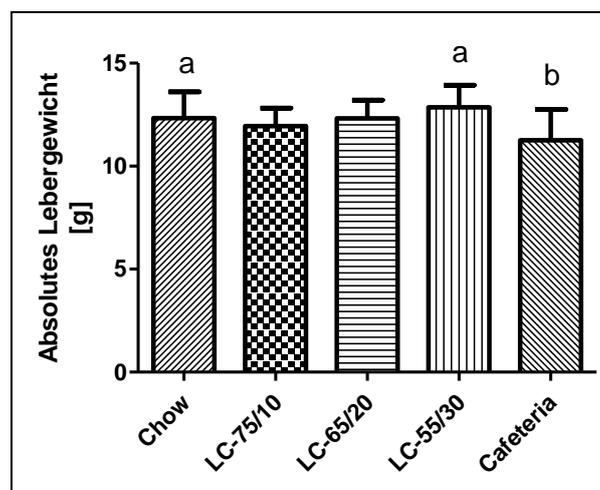


**Abbildung 19: Gewicht der fettfreien Körpermasse (n = 15 - 30) nach vier Wochen auf Diät**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. \* gibt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen LC-75/10 und Cafeteria an.

### 3.2.3 Gewicht der Leber

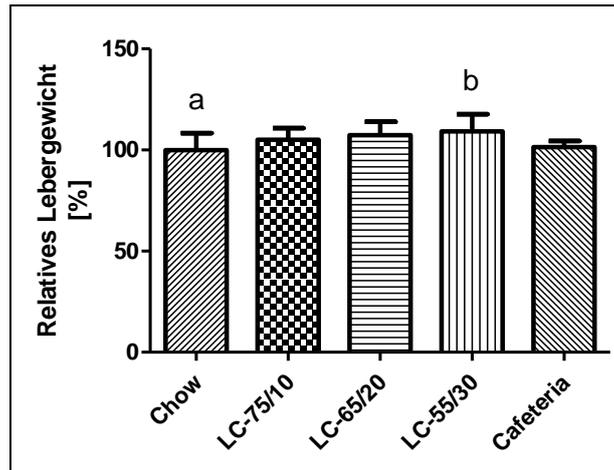
Bei der Sektion wurde die Leber als Ganzes entnommen und gewogen. Die Lebergewichte in den Gruppen Chow ( $12,33 \pm 1,28$  g), LC-75/10 ( $11,94 \pm 0,88$ g), LC-65/20 ( $12,32 \pm 0,89$ g) und LC-55/30 ( $12,86 \pm 1,07$ g) unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Lebern der Cafeteria-Gruppe ( $11,26 \pm 1,50$ g) wiesen keinen signifikanten Gewichtsunterschied zu LC-75/10 und LC-65/20 auf, waren aber signifikant ( $p < 0,05$ ) leichter als in den Gruppen Chow und LC-55/30.



**Abbildung 20: Absolutes Lebergewicht (n = 15 - 30) nach vier Wochen auf Diät**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

Die absoluten Lebergewichte wurden auf das jeweilige Körpergewicht der Ratten normalisiert und als prozentualer Unterschied zur Kontrollgruppe berechnet. Chow ist dabei auf 100 % gesetzt worden. Dabei zeigt sich, dass die relativen Lebergewichte in der LC-55/30 ( $109,2 \pm 8,4$  %) Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) größer waren als in der Kontrollgruppe ( $100,0 \pm 8,4$  %). Sonst zeigten die Diätgruppen keine signifikanten Unterschiede zueinander auf (LC-75/10:  $105,1 \pm 5,7$  %; LC-65/20:  $107,3 \pm 6,7$  %; Cafeteria:  $101,4 \pm 12,7$  %).

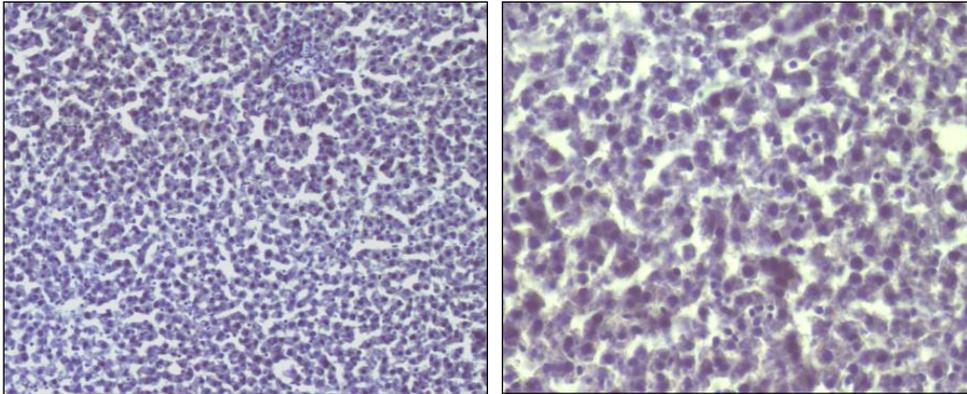


**Abbildung 21: Relatives Lebergewicht (n = 15 - 30) normalisiert auf das Körpergewicht nach vier Wochen auf Diät**

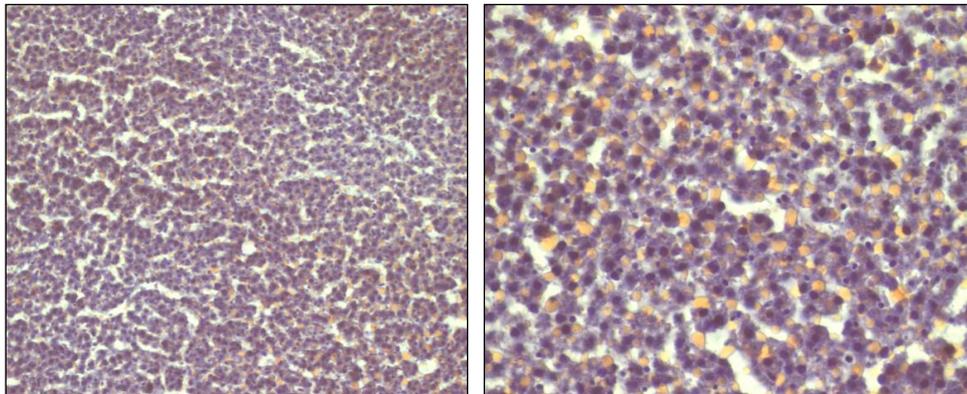
Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Das Gewicht in der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.2.4 Darstellung der histologischen Leberschnitte

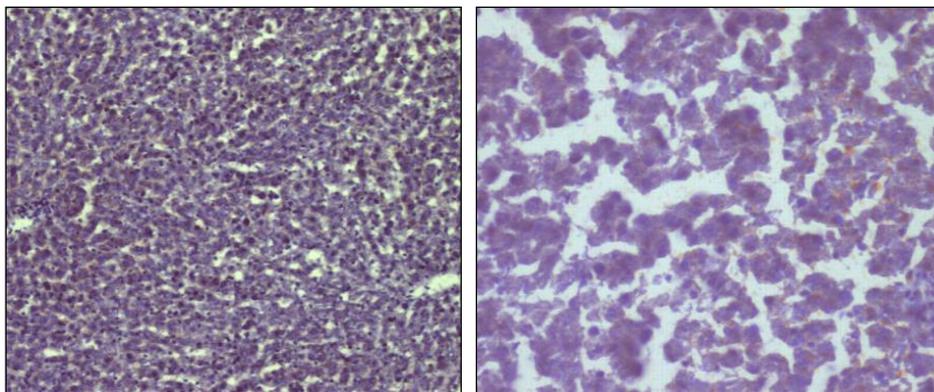
Die Schnitte wurden mit Sudan<sup>®</sup>-III-Rot anfärbt, um eine Leberverfettung zu untersuchen. Im Vergleich zu Chow schienen die Lebern der LCHF-Gruppen LC-75/10 und LC-55/30 deutlich mehr Fetttröpfchen aufzuweisen. Auch erschienen diese im Durchmesser größer. Dies spricht für eine stärkere Verfettung der Leber auf LCHF-Diäten. Im Vergleich untereinander schien die Leberverfettung in der LC-75/10-Gruppe stärker als in der LC-55/30-Gruppe zu sein.



**Abbildung 22: Sudan<sup>®</sup>-III-Rot-Färbung eines Leberschnitts aus der Kontrollgruppe in 100-facher (links) und 200-facher (rechts) Vergrößerung**



**Abbildung 23: Sudan<sup>®</sup>- III-Rot-Färbung eines Leberschnitts aus der LC-75/10-Gruppe in 100-facher (links) und 200-facher (rechts) Vergrößerung**

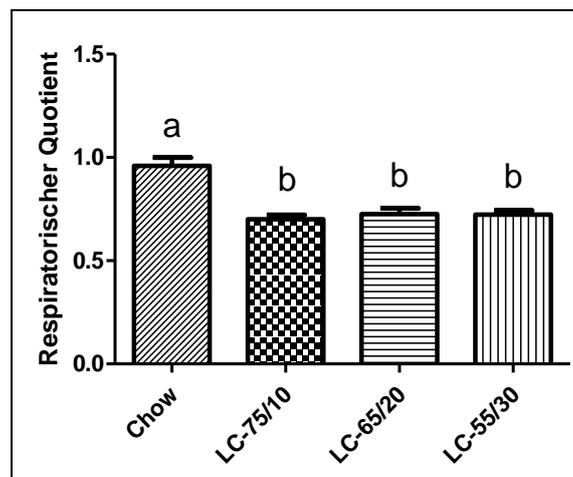


**Abbildung 24: Sudan<sup>®</sup>-III-Rot-Färbung eines Leberschnitts aus der LC-55/30-Gruppe in 100-facher (links) und 200-facher (rechts) Vergrößerung**

### 3.3 Effekte in der indirekten Kalorimetrie

#### 3.3.1 Veränderung des respiratorischen Quotienten

Der dimensionslose respiratorische Quotient gibt über die Art der im Körper oxidierten Nahrungsstoffe Auskunft. Dieser war signifikant ( $p < 0,01$ ) höher in der Kontrollgruppe ( $0,96 \pm 0,04$ ) im Vergleich zum Respiratorischen Quotient der LC-75/10- ( $0,70 \pm 0,02$ ), der LC-65/20- ( $0,73 \pm 0,03$ ) und der LC-55/30-Gruppe ( $0,72 \pm 0,02$ ).

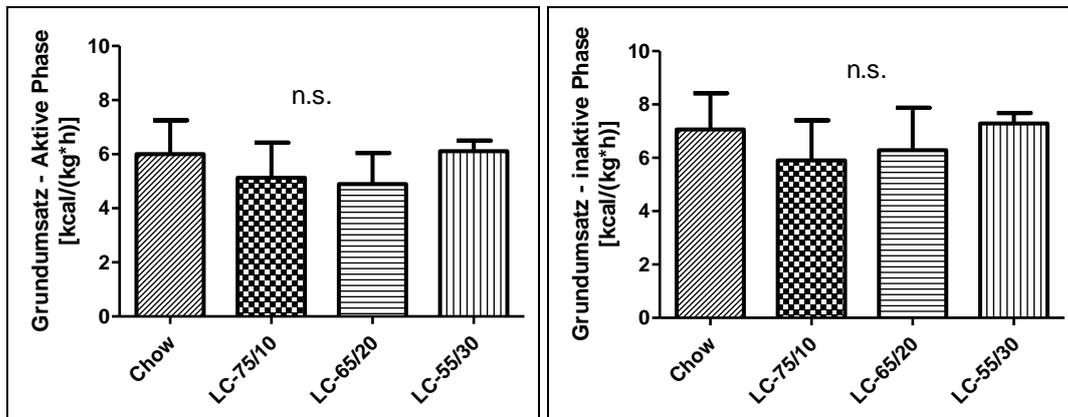


**Abbildung 25: Respiratorischer Quotient (n = 8 - 16)**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

#### 3.3.2 Auswirkungen auf den Grundumsatz

Mittels Kalorimetrie wurde der Grundumsatz innerhalb von 24h gemessen. Dieser wurde nach dem Tag-/Nachtrhythmus der Ratten in zwei unterschiedliche Phasen - der aktiven und der inaktiven Phase - eingeteilt. Weder in der aktiven (Chow:  $6,0 \pm 1,2$ ; LC-75/10:  $5,1 \pm 1,3$ ; LC-65/20:  $4,9 \pm 1,2$ ; LC-55/30:  $6,1 \pm 0,4$  [kcal/(kg\*h)]) noch in der inaktiven Phase (Chow:  $7,1 \pm 1,4$ ; LC-75/10:  $5,9 \pm 1,5$ ; LC-65/20:  $6,3 \pm 1,6$ ; LC-55/30:  $7,3 \pm 0,4$  [kcal/(kg\*h)]) zeigten die Gruppen signifikante Unterschiede zueinander.



**Abbildung 26: Grundumsatz (n = 8 - 16) der aktiven Phase (l.) und der inaktiven Phase (r.)**

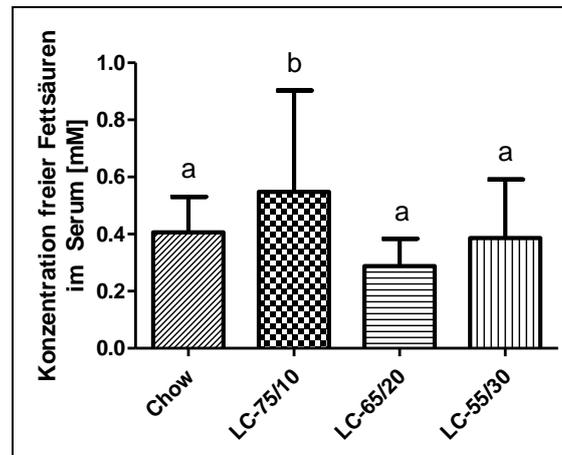
Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Diätgruppen gab.

### 3.4 Ketonkörper, Ketogenese und Ketose

Die Ketose ist ein Schlüsselmechanismus von LCHF-Diäten. Um die Frage zu beantworten, ob die Relation von Fett und Protein die Bildung von Ketonkörpern beeinflussen kann, wurde die Serum- und Urinkonzentration von Ketonkörpern und die Expression des zur Ketonkörperbildung benötigten Enzyms HMG-CoA-Lyase untersucht. Außerdem wurde die Konzentration freier Fettsäuren im Serum gemessen, da diese zur Produktion von Ketonkörpern benötigt werden. Die kohlenhydratreiche Cafeteria-Diät wurde hier nicht untersucht, da bei dieser Diät keine Ketonkörper erwartet werden.

#### 3.4.1 Konzentration freier Fettsäuren im Serum

Zur Bildung von Ketonkörpern wird Acetyl-CoA benötigt, das in der  $\beta$ -Oxidation von freien Fettsäuren gebildet wird. Ausschließlich die LCHF-Diät mit dem höchsten Fett-, bzw. niedrigstem Proteingehalt, zeigte im Vergleich zu allen anderen Diäten signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte Serumkonzentrationen freier Fettsäuren (Chow:  $0,406 \pm 0,124$  mM; LC-75/10:  $0,548 \pm 0,355$  mM; LC-65/20:  $0,288 \pm 0,096$  mM; LC-55/30:  $0,387 \pm 0,205$  mM). In den LCHF-Gruppen LC-65/20 und LC-55/30, welche einen höheren Proteingehalt als LCHF-75/10 haben, war die Serumkonzentration freier Fettsäuren nicht erhöht.

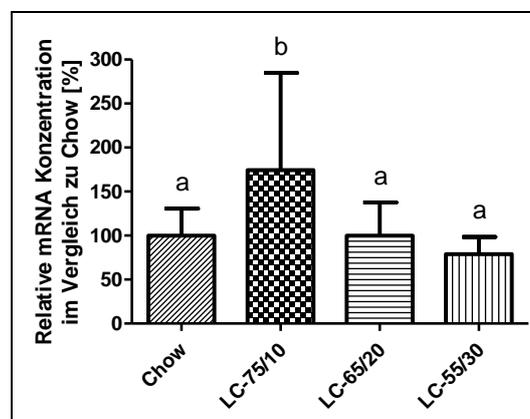


**Abbildung 27: Konzentration freier Fettsäuren im Serum (n = 15 – 30)**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.4.2 Relative mRNA-Expression der HMG-CoA-Lyase

Die HMG-CoA-Lyase ist an der Synthese der Ketonkörper beteiligt und spaltet HMG-CoA in AcAc. Dieses wird entweder zu 3-HB reduziert und ins Blut abgegeben oder spontan zu Aceton decarboxyliert und über die Lunge oder durch den Urin ausgeschieden. Ausschließlich Ratten, die mit der proteinarmen LC-75/10-Diät ( $174,5 \pm 110,3$  %) gefüttert wurden, zeigten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte Expression der HMG-CoA-Lyase in der Leber. Die proteinreicheren LCHF-Diätgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Chow:  $100,0 \pm 30,6$  %; LC-65/20:  $99,9 \pm 37,8$  %; LC-55/30:  $78,9 \pm 19,4$  %).



**Abbildung 28: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Konzentration von HMG-CoA-Lyase in der Leber (n = 8),**

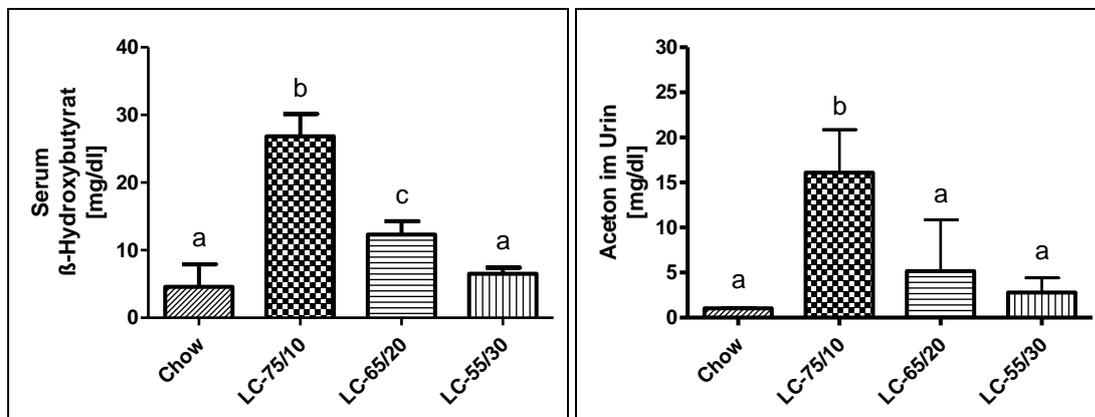
Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich

zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.4.3 Laborchemische Messung von Ketonkörpern in Serum und Urin

Ratten, die mit der Diät mit dem höchsten Fettanteil (LC-75/10:  $26,86 \pm 3,31$  mg/dl) gefüttert wurden, zeigten die höchste ( $p < 0,01$ ) Serumkonzentration an 3-HB. Diese war verglichen mit der Chow- ( $4,59 \pm 3,33$  mg/dl) und LC-55/30-Gruppe ca. sechs Mal höher. Erhöht man den Proteinanteil um 10 % wie bei der LC-65/20, so halbierte sich der 3HB-Spiegel ungefähr (LC-65/20:  $12,33 \pm 1,94$  mg/dl). Dieser war in der LC-65/20-Gruppe signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als im Vergleich zur Kontroll- und LC-55/30-Gruppe und signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger als im Vergleich zur LC-75/10-Gruppe. Die zur Chowdiät protein-gematchte LC-55/30-Gruppe ( $6,52 \pm 0,90$  mg/dl) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Im Urin war die Acetonkonzentration in der LC-75/10-Gruppe ( $16,08 \pm 4,78$  mg/dl) etwa 16-mal höher ( $p < 0,01$ ) als in der Kontrollgruppe ( $1,03 \pm 0,07$  mg/dl) und drei bis vier Mal höher ( $p < 0,01$ ) als in den Diätgruppen LC-65/20 und LC-55/30. In den LCHF-Gruppen mit dem höheren Proteingehalt zeigten sich die Acetonkonzentrationen leicht, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht (LC-65/20:  $5,16 \pm 5,71$  mg/dl; LC-55/30:  $2,80 \pm 1,61$  mg/dl).

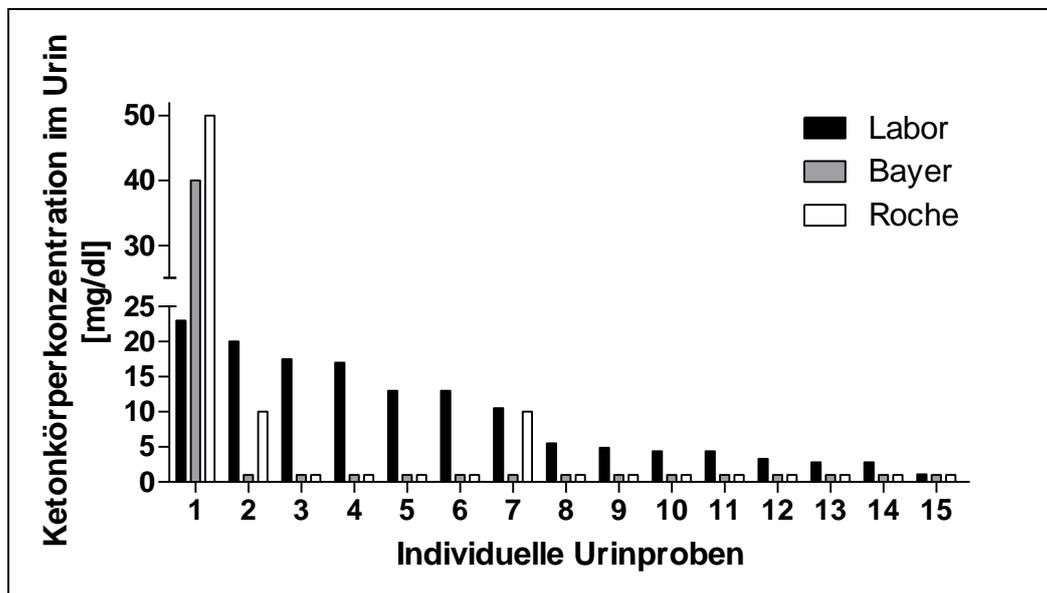


**Abbildung 29: Konzentration von  $\beta$ -HB im Serum (links,  $n = 6 - 9$ ) und Aceton im Urin (rechts,  $n = 6 - 9$ ), durch laborchemische Verfahren gemessen**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

Zusammengefasst war nur die LCHF-Diätgruppe mit dem höchsten Fett- und dem niedrigstem Proteinanteil klar in Ketose (LC-75/10). Im Gegensatz dazu zeigten die Ratten der proteinreichen LC-55/30-Gruppe keine Anzeichen für Ketose.

### 3.4.4 Verschiedenen Messverfahren zur Ketonkörperquantifizierung im Urin



**Abbildung 30: Ergebnis der Ketonkörpermessung im Urin beispielhaft bei 15 Ratten auf den ketogenen LCHF-Diäten**

Dabei werden die Messung der Ketonkörperkonzentration mittels laborchemischen Verfahren und die Schnelltestung mit Hilfe der Urinteststreifen „Ketostix“ (Bayer) und „Ketodiabur Sticks“ (Roche) gegenübergestellt. Urinteststreifen mit negativem Messergebnis (0 mg/dl) wurden auf 1 mg/dl gesetzt.

Bei der Gegenüberstellung der Messungen der Ketonkörperkonzentration im Urin mittels GC/MS-Analyse und der Benutzung von Urinteststreifen der Hersteller Bayer und Roche bei Individuen auf den ketogenen LCHF-Diäten zeigte sich eine starke Diskrepanz zwischen beiden Testverfahren. In manchen Fällen waren die Ketonkörper im Urin bei der Labormessung positiv, bei den Urinteststreifen aber negativ. Auch zwischen den beiden Herstellern konnte das Ergebnis bei derselben Urinprobe variieren. Die Urinteststreifen unterschätzten tendentiell die Ketonkörperkonzentration. In wenigen Fällen überschätzten die Urinteststreifen die Ketonkörperkonzentration jedoch.

## 3.5 Expressionsänderungen von Schlüsselenzymen der Glukoneogenese

Da nur ca. 2 % der täglich mit der Nahrung aufgenommenen metabolisierbaren Energie CHOs waren, muss es, von der Nahrung abgesehen, andere Quellen geben, aus denen die Ratten auf LCHF-Diäten ihren Blutzucker speisen konnten. Da die Glykogenvorräte nach wenigen Tagen verbraucht sind, bleibt nur die Glukoneogenese, welche hauptsächlich von der Leber, aber auch von der Niere und dem Duodenum betrieben wird. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus

diesen Organen extrahiert, in cDNA umgeschrieben und durch die quantitative Realtime-PCR auf die Expression der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, der Glukose-6-Phosphatase und der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, untersucht.

### 3.5.1 Glukoneogenese in der Leber

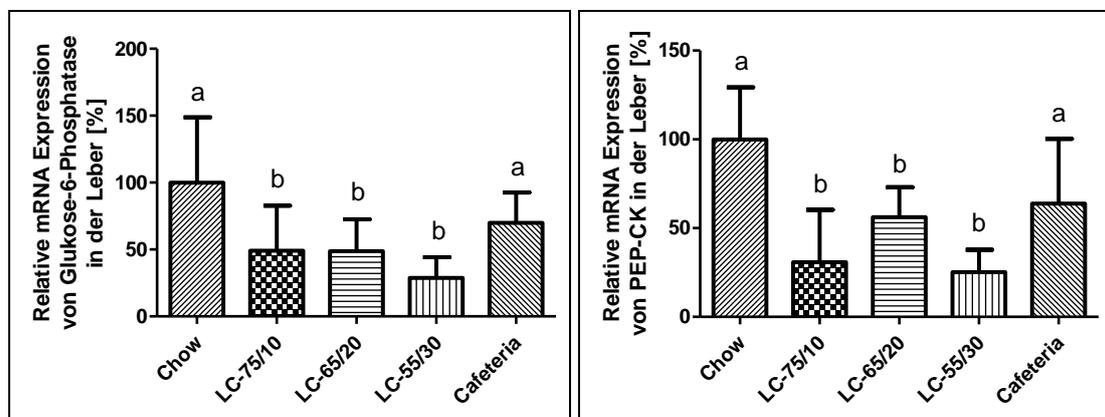
Die hepatische Expression der untersuchten Glukoneogenese-Enzyme war verglichen mit der Chow- und Cafeteria-Gruppe in allen LCHF-Gruppen um etwa 50 % niedriger ( $p < 0,05$ ). Untereinander unterschieden sich die LCHF-Gruppen nicht. Die Kontroll- und Cafeteria-Gruppe wiesen keinen signifikanten Unterschied zueinander auf.

#### G6PH

Chow:  $100,0 \pm 48,7$  %; LC-75/10:  $49,1 \pm 33,7$  %; LC-65/20:  $48,8 \pm 23,9$  %; LC-55/30:  $28,7 \pm 15,6$  %; Cafeteria:  $69,9 \pm 22,8$  %.

#### PeP-CK

Chow:  $100,0 \pm 29,4$  %; LC-75/10:  $30,8 \pm 29,5$  %; LC-65/20:  $56,2 \pm 17,0$  %; LC-55/30:  $25,3 \pm 12,5$  %; Cafeteria:  $63,8 \pm 36,5$  %.



**Abbildung 31: Relative Expression von G6PH (links, n = 6 - 10) und PEP-CK (rechts, n = 6 - 10) in der Leber, normalisiert auf 18S-mRNA**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.5.2 Glukoneogenese in der Niere

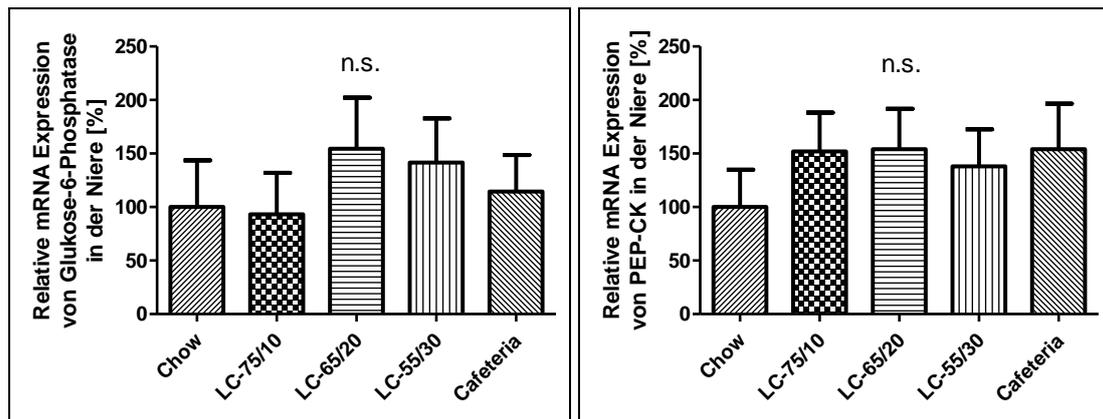
Die Expression der Glukoneogenese-Enzyme in der Niere zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

G6PH

Chow: 100,0 ± 43,7 %; LC-75/10: 93,2 ± 38,7 %; LC-65/20: 154,5 ± 47,6 %; LC-55/30: 141,6 ± 41,1 %; Cafeteria: 114,6 ± 34,2 %.

PeP-CK

Chow: 100 ± 34,8 %; LC-75/10: 152,1 ± 36,1 %; LC-65/20: 154,1 ± 37,6 %; LC-55/30: 138,0 ± 34,5 %; Cafeteria: 154,1 ± 42,4 %.



**Abbildung 32: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Expression der G6PH (links, n = 6 - 10) und der PEP-CK (rechts, n = 6 - 10) der Niere**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte ± SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

### 3.5.3 Glukoneogenese im Duodenum

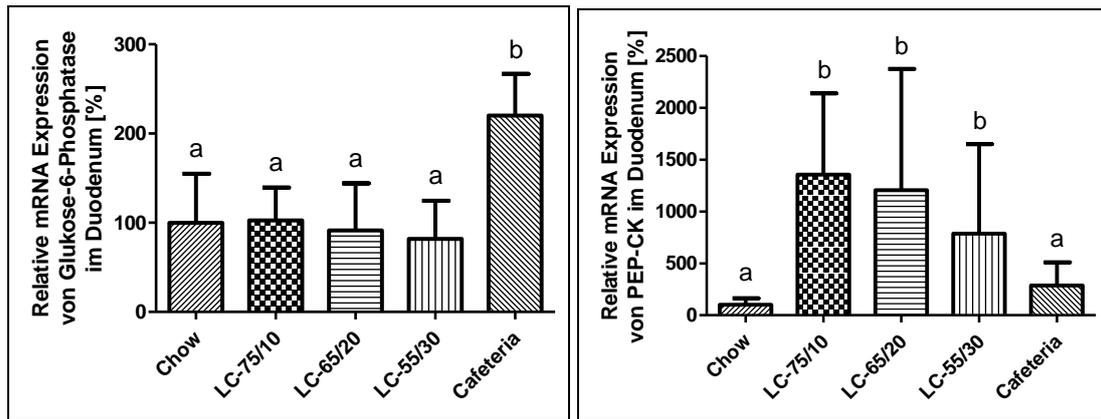
Im Duodenum zeigte die Expression der G6PH in den LCHF-Gruppen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Expression der G6PH war in der Cafeteria-Gruppe etwa doppelt so hoch ( $p < 0,05$ ) wie in den anderen Gruppen. Die Expression der PEP-CK dagegen war verglichen mit der Kontroll- und Cafeteria-Gruppe in allen LCHF-Diäten etwa acht bis dreizehn Mal höher ( $p < 0,05$ ). Zwischen den beiden CHO-reichen Diäten selbst gab es keinen signifikanten Unterschied.

G6PH

Chow: 100,0 ± 54,9 %; LC-75/10: 102,5 ± 37,0 %; LC-65/20: 91,4 ± 52,7 %; LC-55/30: 81,9 ± 42,8 %; Cafeteria: 220 ± 47,0 %.

PeP-CK

Chow: 100,0 ± 62,7 %; LC-75-10: 1354,0 ± 784,1 %; LC65-20: 1206,0 ± 1168,0 %; LC-55/30: 786,4 ± 863,0 %; Cafeteria: 285,7 ± 222,8 %.



**Abbildung 33: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Expression der G6PH (links, n = 6 - 10) und der PEP-CK (rechts, n = 6 - 10) des Duodenums**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.6 Effekte auf die Expression der Glukosetransporter

#### 3.6.1 *Glut-2 in Leber, Muskel und Duodenum*

Die aus den Gewebeproben extrahierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Realtime-PCR auf die mRNA-Expression von Glut-2 untersucht. In der Leber und im Muskel zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Gruppen. Im Duodenum war die mRNA-Expression von Glut-2 in allen LCHF-Diätgruppen etwa nur ein Drittel ( $p < 0,05$ ) der Expression in Chow. Versuchstiere auf der Cafeteria-Diät zeigten keinen signifikanten Unterschied zu Tieren auf der Kontrolldiät ( $p < 0,05$ ), hatten aber eine etwa vier Mal höhere Expression als Ratten der LCHF-Gruppen.

#### Leber

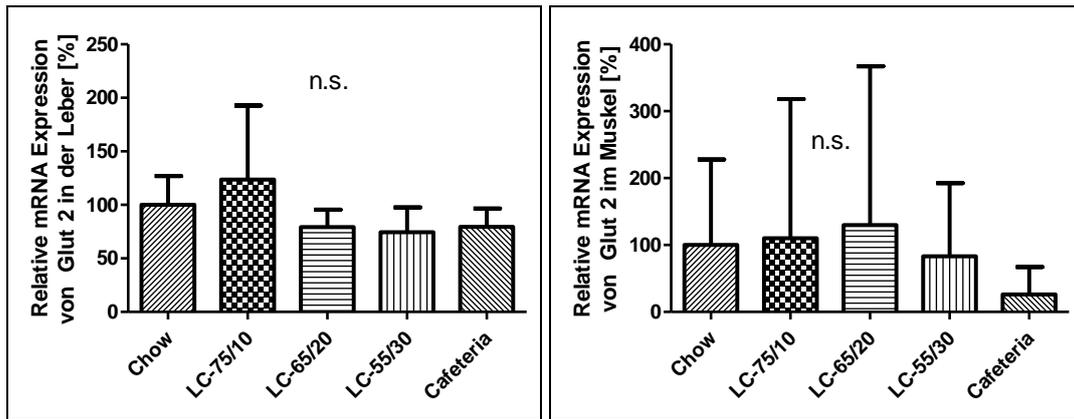
Chow:  $100,0 \pm 27,0$  %; LC-75/10:  $123,7 \pm 69,1$  %; LC-65/20:  $79,4 \pm 16,1$  %; LC-55/30:  $74,5 \pm 23,0$  %; Cafeteria:  $79,6 \pm 17,0$  %

#### Muskel

Chow:  $100,0 \pm 127,8$  %; LC-75/10:  $110,1 \pm 208,1$  %; LC-65/20:  $129,8 \pm 237,5$  %; LC-55/30:  $83,1 \pm 109,5$  %; Cafeteria:  $26,2 \pm 40,9$  %

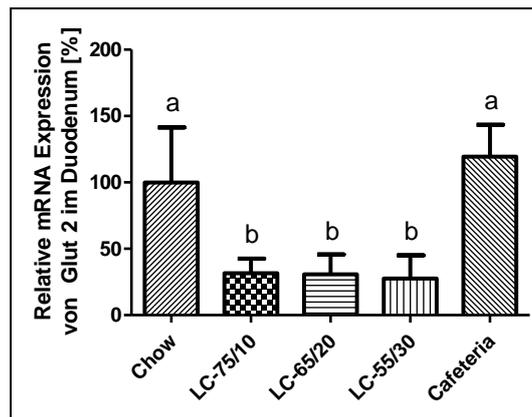
#### Duodenum

Chow:  $100,0 \pm 41,4$  %; LC-75/10:  $31,6 \pm 10,9$  %; LC-65/20:  $30,8 \pm 15,0$  %; LC-55/30:  $27,6 \pm 17,5$  %; Cafeteria:  $119,4 \pm 24,0$  %



**Abbildung 34: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Expression von Glut-2 in der Leber (links, n = 6 - 10) und im Muskel (rechts, n = 6 )**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.



**Abbildung 35: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Expression von Glut-2 im Duodenum (n = 6 - 10)**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ).

### 3.6.2 Glut-4 in Leber und Muskel

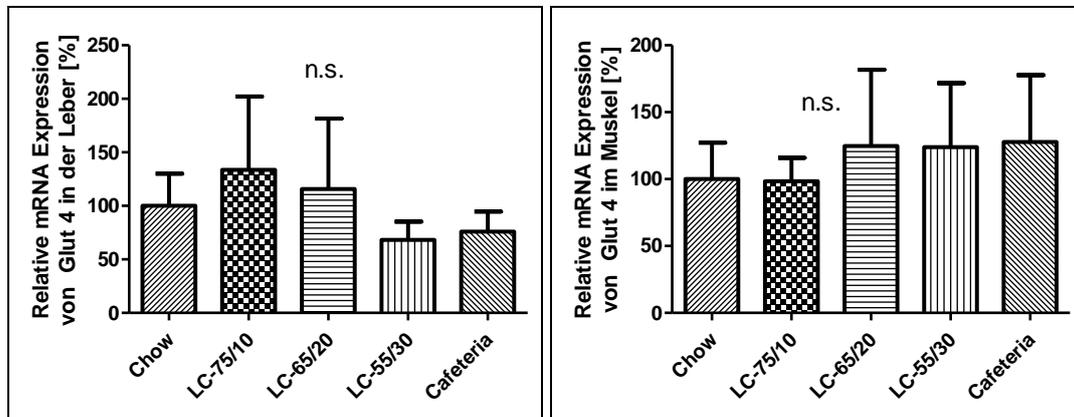
Die Expression von Glut-4 zeigte sowohl in der Leber als auch im Muskel keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Diätgruppen.

#### Leber

Chow:  $100,0 \pm 30,2$  %; LC-75/10:  $133,7 \pm 68,4$  %; LC-65/20:  $115,7 \pm 65,8$  %; LC-55/30:  $68,2 \pm 17,1$  %; Cafeteria:  $75,9 \pm 18,7$  %.

## Muskel

Chow:  $100,0 \pm 27,2$  %; LC-75/10:  $98,4 \pm 17,5$  %; LC-65/20:  $124,7 \pm 57,1$  %; LC-55/30:  $123,9 \pm 47,8$  %; Cafeteria:  $127,8 \pm 50,0$  %.



**Abbildung 36: Relative, auf 18S-mRNA normalisierte mRNA-Expression von Glut-4 in der Leber (links, n = 6 - 10) und im Muskel (rechts, n = 6)**

Die Ergebnisse sind in Relation zur Kontrollgruppe und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben. Die Expression in der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

## 3.7 Auswirkungen auf die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität

### 3.7.1 Nüchternkonzentrationen von Glukose im Blut und Insulin im Serum

Bei der Sektion wurden Blutproben gewonnen, in denen die Konzentration von Glukose und Insulin gemessen wurde. Vor der Sektion wurden die Tiere sechs Stunden gefastet, d.h. diese waren nüchtern, um direkte Einflüsse der Nahrungsaufnahme auf die Werte zu vermeiden.

Der Glukosespiegel war in allen LCHF-Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als in der Chow-Gruppe. Zusätzlich hatten Individuen auf LC-75/10 einen signifikant niedrigeren Glukosespiegel als Individuen auf LC-65/20, nicht aber auf LC-55/30. Die Cafeteria-Gruppe unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe, hatte aber signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Blutglukosespiegel als die LCHF-Gruppen.

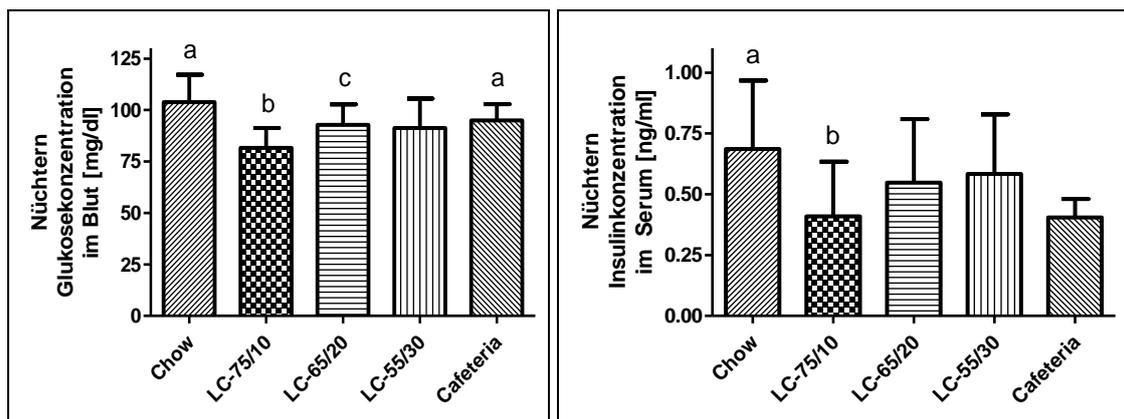
Der Insulinspiegel war ausschließlich in der LCHF-Diät mit dem höchsten Fettgehalt (LC-785/10) signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als in der Kontrollgruppe. Sonst gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Diätgruppen.

### Glukosespiegel

Chow:  $103,8 \pm 13,3$  mg/dl; LC-75/10:  $81,6 \pm 9,6$  mg/dl; LC-65/20:  $92,8 \pm 10,0$  mg/dl; LC-55/30:  $91,2 \pm 14,4$  mg/dl; Cafeteria:  $95,0 \pm 7,9$  mg/dl.

### Insulinspiegel

Chow:  $0,686 \pm 0,281$  ng/ml; LC-75/10:  $0,409 \pm 0,225$  ng/ml; LC-65/20:  $0,548 \pm 0,261$  ng/ml; LC-55/30:  $0,584 \pm 0,245$  ng/ml; Cafeteria:  $0,404 \pm 0,077$  ng/ml.



**Abbildung 37: Nüchternkonzentration von Glukose im Blut (links, n = 8 - 24) und Insulin im Serum (rechts, n = 8 - 24)**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ausgedrückt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

### 3.7.2 *Insulinsensitivitätsberechnungen durch den HOMA2-Index*

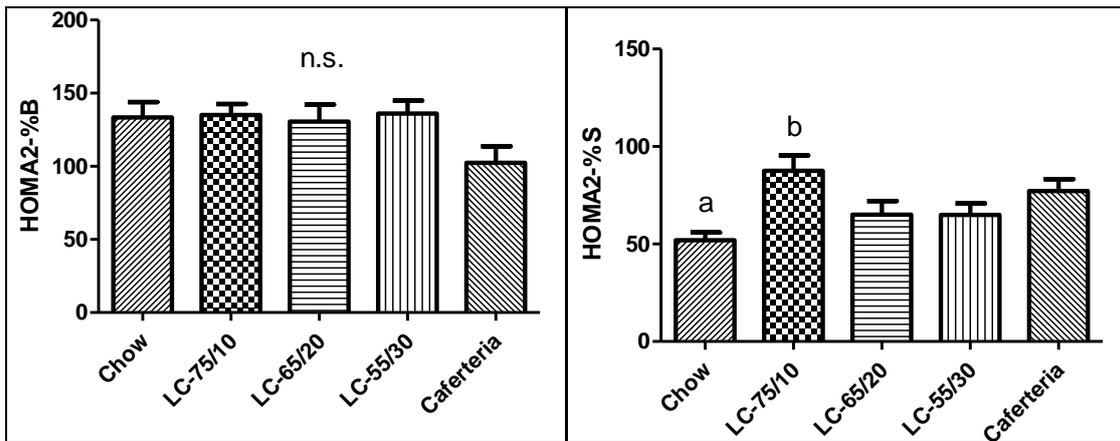
Mittels Computermodell HOMA2 wurde berechnet, dass sich die  $\beta$ -Zellfunktion in den Gruppen nicht unterschied. Die Insulinsensitivität der LC-75/10 war signifikant höher im Vergleich zur Chow ( $p < 0,05$ ). Die anderen Gruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe die Tendenz einer Sensitivitätserhöhung, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz.

### HOMA2-%B

Chow:  $133,3 \pm 50,9$  mg/dl; LC-75/10:  $135,2 \pm 36,3$  mg/dl; LC-65/20:  $137,5 \pm 51,1$  mg/dl; LC-55/30:  $144,8 \pm 44,9$  mg/dl; Cafeteria:  $92,0 \pm 37,5$  mg/dl.

### HOMA2-IR

Chow:  $51,9 \pm 19,5$  ng/ml; LC-75/10:  $87,6 \pm 36,7$  ng/ml; LC-65/20:  $65,0 \pm 28,0$  ng/ml; LC-55/30:  $62,0 \pm 22,9$  ng/ml; Cafeteria:  $77,2 \pm 16,1$  ng/ml.



**Abbildung 38:  $\beta$ -Zellfunktion (links, n = 8 - 24) und Insulinsensitivität (rechts, n = 8 - 24)**

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ausgedrückt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

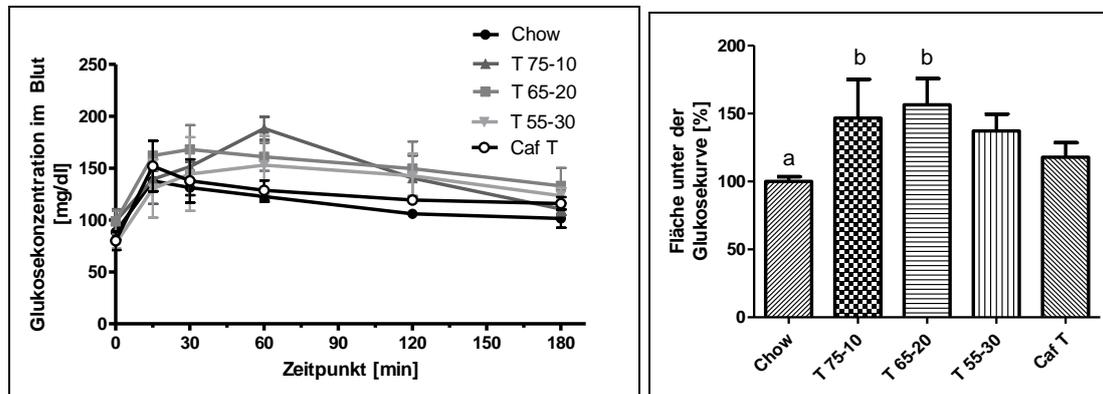
### 3.7.3 Ergebnisse des oralen Glukosetoleranztests

Nach einer 18-stündigen Fastenperiode wurde direkt vor der oralen Gabe von Glukose eine Blutprobe entnommen (Zeitpunkt null). In allen Diätgruppen kam es nach der Glukosegabe zu einem Anstieg des Glukosespiegels im Blut. Die höchste Blutglukosekonzentration in der Chow- und Cafeteria-Gruppe trat nach 15 Minuten auf. In den LCHF-Gruppen trat das Maximum später auf: Nach 30 Minuten in der LC-65/20-Gruppe und nach 60 Minuten in der LC-75/10- und LC-55/30-Gruppe. Nach Erreichen des Konzentrationsmaximums nahm die Glukosekonzentration stetig ab, erreichte aber innerhalb des Abnahmezeitraums von 180 Minuten in keiner Gruppe den Anfangswert.

Es wurde die Fläche unter der Kurve berechnet und diese in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Alle LCHF-Gruppen zeigten eine größere Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Unterschied erreichte in den Gruppen LC-75/10 und LC-65/20 statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Untereinander wiesen diese keinen signifikanten Unterschied auf. Die Fläche der Cafeteria-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontroll- und LC-55/30-Gruppe auf, war jedoch signifikant niedriger als in den Gruppen LC-75/10 und LC-65/20.

### Fläche unter der Glukosekurve

Chow:  $100,0 \pm 3,4$  %; LC-75/10:  $146,6 \pm 28,5$  %; LC-65/20:  $156,4 \pm 19,4$  %; LC-55/30:  $137,2 \pm 12,4$  %; Cafeteria:  $117,8 \pm 10,8$  %.



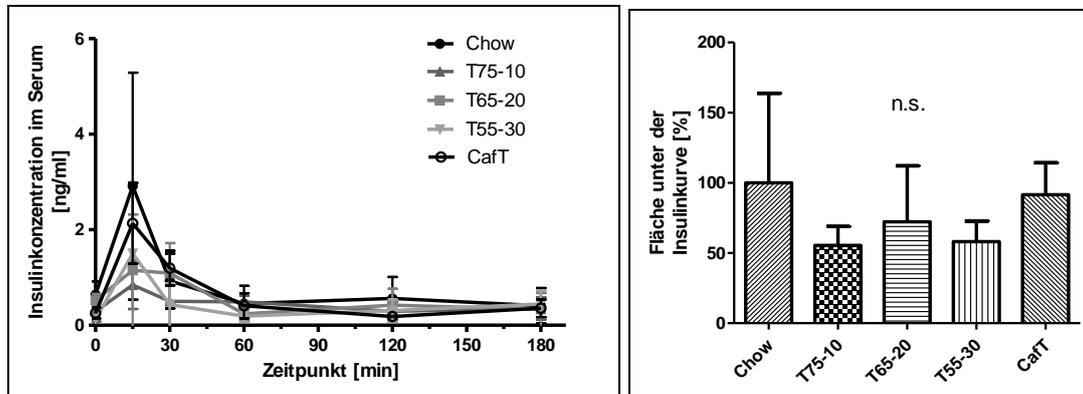
**Abbildung 39: Glukosekonzentration im Serum während des oGTTs als zeitlicher Verlauf (links, n = 4) und als AUC im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgedrückt (rechts, n = 4)**

Bei der Beschreibung der AUC wurde Chow auf 100% gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ausgedrückt. Gruppen mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich zueinander nicht, jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu Gruppen mit anderen Buchstaben. Gruppen ohne Buchstaben unterscheiden sich von keiner Gruppe signifikant.

In allen Diätgruppen trat nach der Glukosegabe ein Anstieg des Insulinspiegels im Serum auf. Die höchste Insulinkonzentration zeigte sich in allen Diätgruppen nach 15 Minuten. Nach 60 Minuten ging der Insulinspiegel ungefähr auf das Niveau vor der Glukosegabe zurück. Es wurde die Fläche unter der Kurve berechnet und diese in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Dabei zeigten die Flächen aller Diätgruppen keine signifikanten Unterschiede zueinander auf.

### Fläche unter der Insulinkurve

Chow:  $100 \pm 63,8 \%$ ; LC-75/10:  $55,4 \pm 13,4 \%$ ; LC-65/20:  $72,3 \pm 39,8 \%$ ; LC-55/30:  $58,1 \pm 14,7 \%$ ; Cafeteria:  $91,6 \pm 22,7 \%$ .



**Abbildung 40: Insulinkonzentration im Serum während des oGTTs als zeitlicher Verlauf (links, n = 4) und als AUC im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgedrückt (rechts, n = 4)**

Bei der Beschreibung der AUC wurde Chow auf 100% gesetzt. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD ausgedrückt. Die Abkürzung „n.s.“ drückt aus, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

Zusammengefasst kam es nach oraler Gabe von Glukose bei allen Diätgruppen zu einem Anstieg der Blutglukosekonzentration. Auch die Konzentration von Insulin im Serum stieg an. In allen LCHF-Gruppen war der Anstieg der Blutglukose höher als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig gab es keinen signifikanten Unterschied beim Ansteigen des Insulinspiegels. Dies zeigt, dass die Insulinsensitivität in den LCHF-Diäten im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer war, also Ratten auf LCHF-Diäten mit derselben Menge Insulin weniger Glukose aus dem Blut in den Muskel, bzw. in das Fettgewebe schaffen konnten.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Kritische Darstellung der angewandten Methoden

Am Graphen des Gewichtszuwachses (siehe Kapitel 3.1.2) ist zu erkennen, dass sich der invasive oGTT in der dritten Woche des Experiments negativ auf die Gewichtszunahme auswirkte. Dies könnte zu einem Bias im Gewichtsverlauf und im Endgewicht führen. Jedoch wurde diese Methode in allen Diätgruppen mit derselben Anzahl an Tieren durchgeführt, weshalb die Veränderung in allen Gruppen ähnlich sein müsste. Außerdem wurden am Folgetag des oGTT betroffene Tiere aller Gruppen von der Lebendgewichtsbestimmung ausgeschlossen, sowie Tiere der Kontrollgruppe für die Paar-Fütterung nicht berücksichtigt. Jedoch muss festgehalten werden, dass die Auswirkung in einer Diätgruppe mit höherer Gesamtanzahl (z.B. Chow und LC-75/10) geringer ausfallen müsste als in einer Diätgruppe mit niedriger Gesamtanzahl (z.B. Cafeteria).

Leider können bei ad libitum Fütterung von Ratten teilweise starke Schwankungen in der täglichen Energieaufnahme nicht vermieden werden. Wie schon oben beschrieben, ist zur exakten Durchführung von Diätstudien an Ratten eine konstante Temperatur nötig, da Temperaturschwankungen den Futterkonsum stark beeinflussen [24]. Die täglich gemessene Durchschnittstemperatur ( $21.5 \pm 1,3$  °C) in dieser Studie war relativ konstant und schwankte lediglich um etwa 1 °C. Der Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Futterkonsum war also vermutlich gering. Jedoch spielt auch das individuelle Fressverhalten jeder einzelnen Ratte, welches durch die Einzeltierhaltung und eventuellen Stress beeinflusst wird, eine Rolle. Desweiteren sind Wistar Ratten Auszuchttiere, welche im Gegensatz zu homogenen Inzuchttieren eine größere Variabilität aufweisen [24]. Diese Faktoren führten zu nicht unbedeutenden Schwankungen im täglichen Futterkonsum der Kontrollgruppe innerhalb einer Studie und innerhalb aller vier Studien, was man gut an der hohen Streuung im Graphen der täglichen Energieaufnahme sehen kann. Dies übertrug sich durch die Paar-Fütterung natürlich auf alle Diätgruppen.

Die quantitative Realtime PCR ist derzeit die Standardmethode für Genexpressionsstudien [69], jedoch hat auch diese Methode Grenzen. Zwar gibt es eine enge Verbindung zwischen Genexpression und Genprodukt, jedoch können sich diese trotzdem, z.B. durch posttranslationale Regulation voneinander unterscheiden [70]. Leider konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht alle Aspekte des Themas betrachtet werden. Dies bietet aber Raum für weitere Studien, z.B. die Untersuchung von Zielproteinen der untersuchten Gene durch das Western Blot Verfahren.

## 4.2 Welche Effekte traten in der indirekten Kalorimetrie auf?

Der dimensionslose Respiratorische Quotient gibt über die Art der im Körper oxidierten Nahrungsstoffe Auskunft (1,00 bei Glukose, 0,7 bei Fett und 0,8 bei Proteinen) und wurde zur Kontrolle der Diäten gemessen. Der Respiratorische Quotient der Chowgruppe lag bei  $0,96 \pm 0,04$ . Dies bestätigt, dass die Hauptenergiequelle der kohlenhydratreichen Kontrollgruppe Glukose war. Im Gegensatz dazu war der durchschnittliche Respiratorische Quotient in allen LCHF-Gruppen bei etwa 0,7. Das zeigt, dass alle LCHF-Gruppen - wie gewünscht - hauptsächlich Energie aus der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren gewannen.

Obwohl zwei Studien am Tiermodell Maus eine Erhöhung des Grundumsatzes durch eine LCHF-Diät beobachteten [71, 72] und Atkins selbst die Erhöhung des Grundumsatzes als Ursache für den Gewichtsverlust auf LCHF-Diäten beschreibt [10], konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied zwischen den LCHF-Gruppen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dennoch kam es in allen LCHF-Gruppen zu einer verringerten Gewichtszunahme. Dies zeigt, dass der Grundumsatz im Mechanismus der LCHF-Diäten keine große Rolle spielen kann. LC-75/10 und LC-55/20 zeigten sogar die Tendenz einer Verringerung des Grundumsatzes. Leider war es aufgrund der eingeschränkten Kapazität an Kalorimetrie-Messeinheiten nur möglich vier Tiere gleichzeitig zu messen. Jedoch hatten Kollaborationspartner dieser Arbeitsgruppe in den USA deutlich mehr Kapazitäten und konnten gleichzeitig bis zu 32 Tiere messen. Diese kürzlich publizierten Daten bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit, da alle dort untersuchten LCHF-Gruppen einen signifikant niedrigen Grundumsatz zeigten [73]. Außerdem ist der Hauptbestandteil aller LCHF-Diäten Fett. Da Fett thermoneutral ist, ist es unwahrscheinlich, dass dadurch der Grundumsatz positiv beeinflusst wird [74].

## 4.3 Was zeigen Gewichtsverlauf und Körperzusammensetzung?

Der Gewichtsverlauf zeigt, dass die Kontrollgruppe mehr Gewicht zunahm als alle LCHF-Gruppen und die kohlenhydratreiche Cafeteria-Gruppe. Letztere verhielt sich im Gewichtsverlauf ähnlich wie LC-55/30. Außerdem scheint die Verringerung der Gewichtszunahme vom Protein- und Fettgehalt der LCHF-Diät abzuhängen. Der „Diäteeffekt“ scheint proportional zum Fettanteil und umgekehrt proportional zum Proteinanteil der LCHF-Diät zu sein. Obwohl in allen Diätgruppen das Anfangsgewicht im Mittel gleich war, zeigte sich schon nach wenigen Tagen ein Gewichtsunterschied zwischen Chow- und LCHF-Diäten. Während Chow von Anfang an Gewicht zunahm, taten dies die LCHF-Gruppen erst nach etwa vier Tagen. Die LCHF-Gruppe mit dem höchsten Fettgehalt zeigte in der Zeit sogar eine

---

Gewichtsabnahme. Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben. Die Ursache ist der Verbrauch der Glykogenspeicher in Muskel und Leber durch das plötzliche Ausbleiben von Kohlenhydraten in der Nahrung. Da pro Gramm Glykogen drei Gramm Wasser gespeichert werden ist der Gewichtsverlust auch auf die Ausscheidung des dabei freiwerdenden Wassers über die Niere zurückzuführen [75].

Nach zwei Wochen verringerte sich die Steigung der Gewichtszunahme ein wenig. Dies könnte direkt mit der täglichen Energieaufnahme zusammen hängen, da sich diese im Verlauf des Experimentes leicht verringerte. Nach drei Wochen konnte in jeder Diätgruppe ein Gewichtsverlust beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich kein Diäteeffekt, sondern im Kapitel 4.1 bereits beschriebene Auswirkung des invasiven oGTTs.

Am Ende des Experimentes zeigten alle LCHF-Gruppen ein geringeres Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle LCHF-Diäten führten also zu einer geringeren Gewichtszunahme. Da alle Diätgruppen durch die Paar-Fütterung dieselbe Energiemenge aufnahmen wie die Kontrollgruppe, scheint dies ein Effekt der Makronährstoffzusammensetzung der LCHF-Diäten zu sein. Obwohl einige Studien diesen Einfluss anzweifeln [3, 13, 15] scheint sich die Zusammensetzung der Nahrung – zumindest im Tiermodell - doch auf den Gewichtsverlust auszuwirken.

Auch die Cafeteriagruppe wies im Vergleich zur Kontrollgruppe ein niedrigeres Endgewicht auf. Scheinbar führt die Paarfütterung einer kohlenhydratreichen Hochfettdiät auch zu einer geringeren Gewichtszunahme. Die Mechanismen konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeiten nicht untersucht werden, bieten aber Raum für weitere Studien.

Dass LCHF-Diäten zu einem Gewichtsverlust führen, wurde in den letzten Jahren mehrfach durch Studien an Mensch und Nager beobachtet:

In der Studie Samaha et al. (2003) folgten 132 schwer adipöse Patienten für 6 Monate entweder einer LC-Diät oder einer kohlenhydratreichen Niedrigfettdiät. Dabei zeigte sich, dass der Gewichtsverlust mit der LC-Diät höher als mit der Niedrigfettdiät war [21].

Die Studie Foster et al. (2003) an 63 übergewichtigen Personen zeigte hingegen, dass der Gewichtsverlust durch eine LCHF-Diät in den ersten 6 Monaten zwar höher war als durch eine Niedrigfettdiät, dieser Unterschied in beiden Diätgruppen aber nach 12 Monaten nicht mehr beobachtet wurde [17].

Weitere aktuelle Studien an Menschen bestätigen, dass eine LCHF-Diät zum Abnehmen gleichwertig mit einer kohlenhydratreichen Niedrigfettdiät zu setzen ist [19, 76]. Die Studie Shai et al. (2008) zeigte sogar, dass die LCHF-Diät im Gegensatz zur Niedrigfettdiät nicht kalorienbeschränkt sein muss, um denselben Diäteeffekt zu erzielen [19].

---

Auch im Tiermodell konnte beobachtet werden, dass LCHF-Diäten trotz gleicher Energieaufnahme zu weniger Gewichtszunahme führen. In der Studie Kennedy et al. (2007) hatten Mäuse für neun Wochen ad libitum Zugriff auf eine LCHF-Diät (78,9% Fett; 9,5% Protein; 0,76% CHO), eine Chowdiät oder eine kohlenhydrathaltige Hochfettdiät. Obwohl die Energieaufnahme in den Diätgruppen gleich war, nahmen Mäuse auf der LCHF-Diät im Gegensatz zur Chow- und Hochfettgruppe nicht zu [72].

Diese Studien bestätigen alle, dass LCHF-Diäten zu einer verringerten Gewichtszunahme, bzw. einem Gewichtverlust führen. Doch passiert dies etwa durch die erhoffte Reduzierung der Fettmasse? Ganz im Gegenteil. Denn in dieser Arbeit zeigten alle LCHF-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar eine Vergrößerung der Fettmasse, aber gleichzeitig eine Verringerung der fettfreien Masse. Das heißt, dass der verringerten Gewichtszunahme nicht ein Abbau des Fettgewebes zu Grunde lag, sondern dass diese auf Kosten der fettfreien Masse erfolgte. Dieser Effekt konnte schon vorher sowohl bei Mäusen [72] als auch bei Ratten beobachtet werden:

Caton et al. konnten 2009 zeigen, dass die Fütterung von männlichen Wistar-Ratten mit einer LCHF-Diät ähnlich der LC-75/10 (94% Fett; 4,2% Protein; 1,3% CHO; 7,5 kcal/g) bei erwachsenen Tieren zu einer Gewichtsabnahme und bei wachsenden Tieren zu einer verringerten Gewichtszunahme führte, jedoch gleichzeitig auch eine Erhöhung der Fettmasse erfolgte [77].

In der Studie Lobley et al. (2007) wurden 19 Tage alte männliche Ratten für 22 Wochen mit einer Hochfettdiät gemästet. Im Gegensatz zu einer kohlenhydratreichen Diät vergrößerte die anschließende Fütterung mit einer LCHF-Diät deren Fettmasse noch weiter [78]. Auch eine weitere Studie an adipösen Ratten zeigte denselben Effekt einer LCHF-Diät auf die Fettmasse [79]. Dies wirft die Frage auf, ob dieser unerwünschte Effekt nur bei Nagern oder auch bei Menschen auftreten kann. In der Tat bestätigen mehrere Studien an Menschen, dass LCHF-Diäten zu einem erhöhten Verlust an fettfreier Masse führen können [75, 80].

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Daten und Studien an Tiermodellen und Menschen legen nahe, dass LCHF-Diäten zwar zum Gewichtsverlust führen, jedoch negative Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung haben. Die Paar-Fütterung schließt Effekte durch Verringerung der Kalorienzufuhr aus und führt zu dem Schluss, dass die verringerte Gewichtszunahme vermutlich auf die unterschiedliche Makronährstoffzusammensetzung zurückzuführen ist.

---

#### 4.4 Ist die Ketoseinduktion bei LCHF-Diäten vom Fett- und Proteingehalt abhängig?

Derzeit gibt es keinen Konsens darüber, unterhalb welcher Kohlenhydratmenge beim Menschen Ketose ausgelöst wird [75], jedoch trat Ketose meist ab einer Kohlenhydratzufuhr von unter 50 g pro Tag auf [14]. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen klar, dass zumindest bei der Ratte nicht allein die Einschränkung von Kohlenhydraten Ketose auslöst. Denn die verschiedenen LCHF-Diäten unterschieden sich nur in ihrem Verhältnis von Fett und Protein. Ausschließlich die LCHF-Gruppe mit dem höchsten Fett- bzw. niedrigsten Proteingehalt (LC-75/10) war klar in Ketose. Eine Erhöhung des Proteingehalts der Trockenmasse um 10% (LC-65/20) halbierte die  $\beta$ -Hydroxybutyratkonzentration im Serum. Die LCHF-Gruppe mit dem höchsten Proteingehalt (LC-55/30) zeigte überhaupt keine Anzeichen für Ketose. Interessanterweise war diese Diät protein-gemacht zur Chowdiät, beide Gruppen bezogen also den gleichen Anteil an Energie aus Proteinen.

Obwohl der respiratorische Quotient in allen LCHF-Gruppen um die 0,7 lag - ein Zeichen, dass hauptsächlich Fett in der  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung genutzt wurde - war die Serumkonzentration freier Fettsäuren nur in der LCHF-Gruppe mit dem höchsten Fettgehalt (LC-75/10) signifikant höher. Dies war auch die Gruppe mit der höchsten Ketonkörperkonzentration im Serum und im Urin. Auch war nur in dieser Gruppe die mRNA-Expression eines Enzyms der Ketogenese (HMG-CoA-Lyase) hochreguliert. Dies zeigt außerdem, dass die diätetische Induktion von Ketose die Expression der HMG-CoA-Lyase hochreguliert. In den proteinreicheren LCHF-Gruppen war weder die Serumkonzentration freier Fettsäuren erhöht, noch die HMG-CoA-Lyase hochreguliert. Obwohl die Ketonkörperkonzentration (3-HB) im Serum in der LC-65/20-Gruppe signifikant höher war als in der Chowgruppe, war diese im Urin (Aceton) zwar erhöht, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die hohe Varianz, ausgelöst durch das gänzliche Fehlen oder eine nur sehr geringe Erhöhung von Aceton im Urin bei mehreren Individuen der Gruppe. Wodurch dies ausgelöst wurde, ist unbekannt. Unterschiedliche renale Filtrationsraten oder individuelles Trinkverhalten könnten die Ursache sein. Dies bestätigt, dass die Schlussfolgerung einer Studie an Menschen, die Messung des 3-HB im Serum sei zur Beurteilung von Ketose besser geeignet als die Quantifizierung von Aceton im Urin [81], auch für Ratten gilt. Dies wurde kürzlich in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe belegt [73]. In einer großangelegten Studie mit 21 000 gesunden, arbeitenden Männern und Frauen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Urinteststreifen ein geeignetes Screeningverfahren zur Ketosedetektion im Urin ist [82]. Obwohl die Verwendung von

---

Urinteststreifen nie für die Verwendung an Nagern validiert wurde, werden diese als nichtinvasive Alternative zur Ketonkörperquantifizierung bei Ratten genutzt [83, 84]. Likhodii et al. stellten bereits 2000 fest, dass Urinteststreifen die Ketonkörperkonzentration im Rattenplasma unzureichend widerspiegeln [85] und entwickelten deswegen als Alternative einen Atemtest zur Acetondetektion [86]. Dies könnte daran liegen, dass die Urinteststreifen nicht einmal die Ketonkörperkonzentration im Urin richtig widerspiegeln. Denn vergleicht man, wie in der hier verfassten Arbeit geschehen, die Quantifizierung der Ketonkörper im Urin mittels GC/MS-Analyse und Urinteststreifen, so zeigen sich große Unterschiede innerhalb derselben Urinprobe. Tendentiell unterschätzten die Urinteststreifen die Ketonkörperkonzentration im Urin deutlich. Auch versagten Urinteststreifen beider Hersteller gleichermaßen bei der Quantifizierung von Ketonkörpern. Deswegen kann von der Verwendung von Urinteststreifen zur Ketosedetektion bei Ratten nur abgeraten werden.

In der ursprünglichen Theorie von Robert Atkins wird der Gewichtsverlust bei LCHF-Diäten teilweise durch den Energieverlust durch Ketonkörperausscheidung über den Urin erklärt [10]. Dies wurde aber bereits mehrfach abgelehnt [13, 52, 87]. Auch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen gegen diese Theorie, da das Endgewicht zwar in allen LCHF-Gruppen signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe, sich aber nur die LC-75/10-Gruppe deutlich in Ketose befand.

Die proteinärmste LCHF-Diät war deutlich, die etwas proteinreichere LCHF-Diät nur noch leicht und die proteinreichste LCHF-Diät gar nicht in Ketose. Dies führt zu der Vermutung, dass zur Auslösung von Ketose nicht nur eine Kohlenhydratrestriktion, sondern auch ein geringer Proteingehalt in der Diät nötig ist. In einer zwei Jahre dauernden Studie an Menschen (2010, Foster et al.) waren zwar signifikant mehr Individuen der LCHF-Gruppe in Ketose als Individuen der Kontrollgruppe. Sie zeigte aber auch, dass nicht alle Individuen in der LCHF-Gruppe (63 % nach drei Monaten, 28 % nach sechs Monaten) in Ketose waren [17]. Dies könnte dadurch ausgelöst worden sein, dass die Versuchspersonen lediglich in ihrer Kohlenhydratzufuhr eingeschränkt wurden, das Verhältnis von Fett und Protein aber selbst bestimmen konnten. Auch in weiteren Studien an Menschen mit reiner Kohlenhydratlimitierung waren zwar Individuen der LCHF-Gruppe häufiger in Ketose als Individuen der Kontrollgruppe, jedoch betrug ihr Anteil in der LCHF-Gruppe nur weniger als 60 % [17, 19]. Im Gegensatz dazu zeigten die LCHF-Gruppen in der Studie Kim et al. (2008) an Ratten eine zweimal höhere Ketonkörperkonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obwohl der Proteingehalt der LC-Diäten sehr hoch war (Fett: 23%, Protein: 50% und CHO: 10% der Energieaufnahme), kam es innerhalb der LC-Gruppen zur Ketose mit geringer Varianz. Jedoch wurden hier alle Ratten vor der Ketonkörpermessung zwölf Stunden lang gefastet, so dass selbst Tiere der

---

Kontrollgruppe in Ketose waren. In der Studie selbst wurde eingeräumt, dass die Ketonkörperkonzentrationen bei nicht gefasteten Ratten viel geringer ausgefallen wären [88]. Theoretisch hätten also einige Tiere der LC-Gruppe im nicht gefasteten Zustand die fehlende Nahrungsglukose noch durch Glukoneogenese ohne Zuhilfenahme von Ketose ausgleichen können und erst das zwölf-stündige Fasten hätte die Kompensationsfähigkeit - durch schon vorher geleerte Glykogenspeicher - der LC-Gruppen überstiegen.

Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass eine LCHF-Diät nicht unbedingt eine ketogene Diät sein muss. Erst wenn zur Kohlenhydratrestriktion eine Proteinrestriktion kommt, werden Ketonkörper produziert. Eventuell können die zugeführten Nahrungsproteine zur Glukoneogenese genutzt werden. Dies wurde 2003 in einem Review von VanItallie und Nufert [14] vorgeschlagen, da die meisten Proteine glukogen sind, also direkt oder nach verschiedenen Umwandlungsschritten zur Glukoneogenese genutzt werden können. Bei ausreichender Glukoseproduktion durch die Versorgung mit glukogenen Aminosäuren wäre die Ketogenese nicht notwendig. Außerdem könnten Proteine aus dem Skelettmuskel zur Glukoneogenese herangezogen werden. In dieser Arbeit zeigten alle LCHF-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere fettfreie Masse. Könnte nicht nur die Erhöhung der Fettmasse, sondern auch ein Proteinabbau im Skelettmuskel zur Nutzung in der Glukoneogenese die Ursache sein? Über die Ursache kann man im Moment nur spekulieren, dies bietet aber Raum für neue Forschungsmöglichkeiten.

---

## 4.5 Welches glukoneogenetische Organ speist den Blutglukosespiegel?

Glykogenolyse und Glukoneogenese sind die wichtigsten Stoffwechselwege in der postresorptiven Phase, um auf Hypo- und Hyperglykämien zu reagieren [89]. Die aufgenommene Kohlenhydratmenge beeinflusst die postresorptive Glukoseproduktion hauptsächlich durch die Glykogenolyse [90]. Die Produktion von Glukose aus der Glukoneogenese bei Menschen innerhalb verschiedener metabolischer Zustände gilt als relativ konstant [40]. Dennoch führte die Fütterung von Ratten mit einer kohlenhydratfreien Diät zu einer erhöhten hepatischen Umwandlung von Alanin und Pyruvat zu Glukose [91]. In einer elf Tage dauernden Studie an sechs gesunden Männern zeigte die Gruppe, die sich von einer extrem kohlenhydratarmen Diät (2% der Energieaufnahme) ernährte, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine 14 % höhere Glukoneogeneserate [90]. Veldhorst et al. konnten 2009 zeigen, dass eine proteinreiche (30 % der Energieaufnahme), kohlenhydratarme Diät die Glukoneogenese bei leeren Glykogenvorräten stark erhöht [92]. Eigentlich könnte man erwarten, dass die Glukoneogenese in den LCHF-Gruppen im Vergleich zur Kontroll- und Cafeteria-Gruppe erhöht war. Auch, weil der Nüchternglukosespiegel in allen LCHF-Gruppen signifikant niedriger war im Vergleich zur Kontroll- und Cafeteria-Gruppe.

Im Gegensatz dazu war die relative mRNA-Expression der Schlüsselenzyme PEP-CK und G6PH in der Leber nicht erhöht, sondern sogar signifikant herunterreguliert. Dieser Effekt zeigte sich im Gegensatz zur Studie von Veldhorst et al. [92] unabhängig vom Proteingehalt der Nahrung. Auch trat dieser Effekt ausschließlich in den LCHF-Gruppen auf, da die kohlenhydratreiche Cafeteria-Gruppe keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Möglicherweise ist der Unterschied auf die unterschiedliche Dauer der Ernährung mit LCHF-Diäten zurückzuführen. In den oben genannten Studien [90, 92] wurden ausschließlich kurzzeitige Effekte auf die Glukoneogenese untersucht (drei bzw. elf Tage). Eine vierwöchige Diätdauer könnte völlig andere Effekte im Metabolismus und in der Glukoneogenese auslösen. Ratten der LCHF-Diäten (LC-75/10 und LC-55/30) zeigten in der Sudan<sup>®</sup>-III-Färbung von Leberschnitten, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, deutliche Lipidtröpfchen, was ein Hinweis auf eine Leberverfettung ist. Derselbe Effekt und zusätzlich eine Beeinträchtigung des „insulin signaling“ wurde in der Studie von Jornayvaz et al. (2010) an Mäusen beobachtet [71]. Durch eine Verfettung der Leber könnte vielleicht die Fähigkeit zur Glukoneogenese eingeschränkt gewesen sein. Das wirft die Frage auf, ob andere Organe die Rolle der Glukoseversorgung für den Körper übernommen haben.

Der Gesamtbeitrag der Niere zur Glukoseversorgung des Körpers im postresorptiven Zustand ist in der Literatur zwischen gering [38] und bedeutend [39] eingestuft worden. Die Bedeutung

---

der Niere für den Glukosemetabolismus ist also noch nicht restlos geklärt. Auch fehlen vergleichbare Studien mit LCHF-Diäten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten geben allerdings keinen Hinweis darauf, dass die renale Glukoneogenese durch LCHF-Diäten auf Expressionsebene beeinflusst wurde.

Der Beitrag des Dünndarms zur Glukoseproduktion ist immer noch unklar. Zellen des Dünndarms exprimieren die Schlüsselenzyme G6PH [93] und PEP-CK [94]. Außerdem wurden einige Studien veröffentlicht, die den Dünndarm als drittes Glukoneogenese-Organ sehen [95-98]. Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass die Schlüsselenzyme der Glukoneogenese sehr häufig in der Dünndarmmukosa von neugeborenen Ratten exprimiert werden, deren Expression aber nach der Entwöhnung dramatisch abfällt [99-101]. In dieser Studie unterschied sich die relative mRNA-Expression der G6PH im Dünndarm in den LCHF-Gruppen nicht von der Kontrollgruppe. Die relative Expression in der Cafeteria-Gruppe war etwa 100 % höher als in allen anderen Gruppen, jedoch war die Varianz in allen Gruppen extrem hoch (etwa 37 - 55 %), Außerdem ist der Expressionsunterschied mit Blick auf die relative mRNA-Expression der PEP-CK eher gering. Diese war in allen LCHF-Gruppen je nach Gruppe zwischen 8- und 14-mal höher als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem war dies ein reiner LCHF-Effekt. In dieser Studie war die relative mRNA-Expression von PEP-CK drastisch erhöht, die der G6PH aber nicht. Das wirft die Frage auf, ob dies eine Erhöhung der Glukoneogeneserate bedeutet oder eine andere Ursache hat.

PEP-CK wird nicht nur in Leber, Dünndarm und Niere, sondern auch in der Lunge, im Herz und im Fettgewebe exprimiert [102]. Im Fettgewebe dient das Enzym der sogenannten Glyceroneogenese, einer Kurzform der Glukoneogenese. Zum ersten Mal beschrieben wurde die Glyceroneogenese 1967 von Reshef et al. [103] und Ballard et al. [104]. 1969 wurde die Glyceroneogenese von Gorin et al. [105] als solche benannt. Diese liefert 3-Phosphoglycerat für die Triacylglyceratsynthese aus Fettsäuren, wenn dieses - z.B. bei längerem Fasten - nicht aus Glukose hergestellt werden kann. Dabei werden wie in der Glukoneogenese Laktat, Alanin oder Pyruvat als Ausgangsstoffe verwendet [106]. Dieser Stoffwechselweg ist bei Ratten [107] und Menschen [108] aktiv. In der Studie von Brito et al. von 2006 [109] wurden Ratten mit einer proteinreichen, kohlenhydratarmen Diät gefüttert. Dies führte zu einer Erhöhung der Glyceroneogenese im Fettgewebe. Es wäre äußerst interessant die Expression der PEP-CK auch im Fettgewebe zu untersuchen. Möglicherweise ist die drastische Erhöhung der mRNA-Expression in den LCHF-Gruppen auf eine stark erhöhte Glyceroneogenese zurückzuführen. Da Glukose in der Nahrung praktisch nicht vorhanden war, die LCHF-Gruppen aber gleichzeitig mit einer massiven Fettdiät konfrontiert waren, könnte das aus der Glyceroneogenese entstehende 3-Phosphoglycerat zur Triacylglyceratsynthese aus den freien

Fettsäuren der Nahrung genutzt werden. Außerdem war in allen LCHF-Gruppen die Expression von Glut-2 herunterreguliert, welcher Glukose aus den Enterozyten ins Blut transportiert. Dies alles spricht gegen die Vermutung, der Dünndarm könnte die Glukoseproduktion des Körpers übernommen haben.

Entgegen der Annahme, die Glukoneogenese könnte durch LCHF-Diäten aktiviert werden, zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien keine Anzeichen dafür. Wie oben bereits erwähnt, gilt die Glukoneogenese als relativ konstant. Außerdem könnte die Glukoneogenese auch durch eine allosterische Aktivierung der normalen Enzymausstattung erhöht sein, ohne dass die Expression beeinflusst wird. Dies lässt sich aber nicht mit Expressionsstudien beantworten. Dieser Frage könnte man in einer neuen Studie mit der derzeit exaktesten Methode zur Messung der Glukoneogeneserate, die Deuterium-Oxid-Methode ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) von Landau et al. [40], nachgehen.

#### **4.6 Gibt es Veränderungen der Genexpression der Glukosetransporter?**

Nach bestem Wissen gibt es zur Zeit der Abgabe dieser Arbeit keine ähnlichen Veröffentlichungen zu LCHF-Diäten und Glukosetransporter im entsprechenden Zelltyp. Die insulinunabhängige Auf- und Abnahme von Glukose durch die Leber via Glut-2 und die insulinabhängige Glukoseaufnahme via Glut-4 in den Muskel scheinen nicht durch LCHF-Diäten beeinflusst zu werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Veränderungen auf Proteinebene induziert oder die Translokation der mit Glut-4 beladenen Vesikel moduliert wurde. Die signifikant niedrigere relative mRNA-Expression von Glut-2 im Duodenum könnte eine direkte Reaktion der Enterozyten auf die kohlenhydratfreie Kost und das damit verbundene Ausbleiben der Kohlenhydratresorption sein. Scheinbar wird Glut-2 im Duodenum herunterreguliert, wenn es nicht mehr zur Kohlenhydratresorption benötigt wird.

## 4.7 Werden Glukosetoleranz und Insulinsensitivität positiv beeinflusst?

Es gibt viele aktuelle Studien an Menschen, in denen LCHF-Diäten nicht nur zur Gewichtsabnahme, sondern auch zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 vorgeschlagen werden [20, 110, 111]. Da mit der zunehmenden Anzahl an Übergewichtigen auch die Zahl der Diabetiker stark zunimmt, ist der Bedarf einer effektiven und kostengünstigen Therapie gegen Diabetes mellitus Typ 2 vorhanden. Deswegen wurde im Rahmen dieser Studie auch die Auswirkung auf die Glukosetoleranz gemessen.

Die Tiere aller LCHF-Gruppen in dieser Studie zeigten im Vergleich zur Chowgruppe signifikant niedrigere Nüchternglukosespiegel. Allein die LCHF-Gruppe mit dem höchsten Fettanteil (LC-75/10) zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe auch einen signifikant niedrigeren Nüchterninsulinspiegel. Diese Daten wurden für Berechnungen durch den HOMA-Index verwendet. Der HOMA-Index und dessen logarithmierte Form (QUICKI) wurde schon bei vielen Tierstudien zur Beurteilung der Insulinsensitivität und  $\beta$ -Zellfunktion genutzt [71, 72, 78, 112, 113], weshalb er auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Jedoch wurde bereits in der Literatur mehrfach darauf hingewiesen, dass der HOMA-Index für den Menschen entwickelt und noch nicht für Tierstudien validiert wurde [68, 71]. Die Benutzung des HOMA-Modells an Tieren könnte also zu Ergebnisverfälschungen führen. Laut dem HOMA-Index zeigten alle LCHF-Diäten die Tendenz einer verbesserten Insulinsensitivität. Dieser Trend erreichte in der LCHF-Diätgruppe mit dem höchsten Fettgehalt (LC-75/10) statistische Signifikanz. Dem HOMA-Index nach führten LCHF-Diäten also scheinbar zu einer unbeeinträchtigten Insulinsensitivität.

Im Gegensatz dazu konnte der orale Glukosetoleranztest zeigen, dass die Insulinsensitivität in allen LCHF-Gruppen beeinträchtigt war. Zwar zeigte sich in der AUC der Insulinkonzentration im Serum während des oralen Glukosetoleranztests kein signifikanter Unterschied, die AUC der Glukosekonzentration war aber im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen LCHF-Diäten höher. Dieselbe Menge Insulin war in den LCHF-Gruppen demnach insuffizient, nach der Konfrontation mit einer großen Menge Glukose, eine normale Blutglukosekonzentration zu erzielen. Obwohl der HOMA-Index das Gegenteil ergab, konnte der orale Glukosetoleranztest zeigen, dass die Insulinsensitivität durch die LCHF-Diäten beeinträchtigt wurde. Dies bestätigt außerdem oben genannte Studien, dass die Anwendung des HOMA-Index bei Ratten zu falschen Ergebnissen führt und deshalb bei diesen nicht angewendet werden sollte.

In der Studie von Foster et al. [17] wurden 64 übergewichtige Menschen in eine LCHF-Diätgruppe und eine kalorienarme, kohlenhydratreiche Niedrigfett-Diätgruppe eingeteilt. Die LCHF-Gruppe, aber auch die Niedrigfett-Gruppe, zeigten Gewichtsverluste und eine verbesserte Insulinantwort nach einem oralen Glukosetoleranztest. Jedoch kann hier nicht klar

---

festgestellt werden, ob der Effekt auf die Diätzusammensetzung oder den Gewichtsverlust in beiden Gruppen zurückzuführen ist. Denn selbst ein geringer Gewichtsverlust führt beim Menschen zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität [114]. Bei Ratten hingegen wurde beobachtet, dass eine LCHF-Diät zwar Adipositas verhindern kann, jedoch trotzdem zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz führt [115].

Dagegen gibt es zwei Studien an Mäusen, in denen sich die Glukosetoleranz nach Fütterung einer LCHF-Diät verbesserte [72, 112]. Könnte es speziesspezifische Unterschiede im Glukosemetabolismus geben? In der Studie Axen und Axen (2006) zeigten übergewichtige männliche Ratten eine beeinträchtigte Insulinantwort auf eine intraperitoneale Glukosegabe nach zwei-wöchiger LCHF-Fütterung [79]. Auch in der LCHF-Diät-Studie von Kinzig et al. (2010) an männlichen Ratten zeigten diese eine gestörte Insulinsensitivität. Nach acht Wochen auf einer LCHF-Diät mit einer Fett-/Protein-Ratio zwischen LC-65/20 und LC-55/30 (80 % Fett, 15 % Protein und 5 % CHO der Energiezufuhr) wurde ein intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Glukoseclearance, gleichzeitig war aber die Insulinausschüttung in der LCHF-Gruppe deutlich erhöht. Das bedeutet, dass mehr Insulin nötig war, um dieselbe Menge Glukose aus dem Blut zu schaffen [116]. Im Gegensatz dazu war im oralen Glukosetoleranztest dieser Arbeit die Insulinausschüttung zu gering, um die nötige Menge Glukose aus dem Blut zu entfernen. Dies ist überraschend, denn eigentlich ist die Insulinantwort auf eine bestimmte Glukosemenge, als sogenannter Inkretineffekt beschrieben, oral verabreicht höher als durch Umgehung des Verdauungstraktes [34, 117]. Die Ursache des Inkretineffekts ist die Beeinflussung des Magen-Darm-Trakts auf die Inselzellen des Pankreas und die dadurch ausgelöste Stimulierung der Insulinausschüttung [118]. Könnte eine Beeinträchtigung des Inkretineffekts zu einer insuffizienten Stimulierung der Insulinausschüttung geführt haben? In der Studie von Leite et al. (2009) zeigten Meerschweinchen, die mit einer LCHF-Diät gefüttert wurden, eine niedrigere Serumkonzentration von Glukagon-like-Peptid 1, einem Hormon des Inkretineffekts, das die Insulinfreisetzung stimuliert [119]. Vielleicht wurde aber auch eine Insulinresistenz durch die LCHF-Diäten ausgelöst. Zwar war das Körpergewicht in den LCHF-Gruppen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, jedoch war gleichzeitig die Fettmasse höher und Fettleibigkeit erhöht das Risiko zur Insulinresistenz [120, 121]. Auch könnte die Verfettung der Leber in den LCHF-Gruppen zur hepatischen Insulinresistenz geführt haben [122]. In der oben genannten Studie von Kinzig et al. (2010) wird die These aufgestellt, dass die inadäquate Insulinreaktion durch die fehlende Glukoseexposition ausgelöst wird [116]. Es könnte sein, dass sich der Metabolismus auf das Ausbleiben der Kohlenhydrate in der Nahrung anpasst und auf eine plötzliche Konfrontation mit einer hohen Glukosemenge unvorbereitet ist. In dieser Arbeit war

---

die Glut-2-mRNA-Expression im Duodenum in allen LCHF-Gruppen herunterreguliert. Dies war ein reiner LC-Effekt, denn die Expression in der Cafeteria-Gruppe zeigte keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Die fehlende Glukoseresorption könnte dies induziert haben. Bei einer oralen Glukoseladung würden diese Transporter dann fehlen, um die resorbierte Glukose ins Blut zu schaffen. Auch Inkretinhormone könnten herunterreguliert worden sein. In der Tat zeigten alle LCHF-Gruppen ein späteres Maximum in der Glukosekurve nach oraler Glukosegabe als die Kontroll- oder Cafeteria-Gruppe (Chow und Cafeteria: nach 15 min; LC-65/20: nach 30 min; LC-75/10 und LC-55/30: nach 60 min). Dies wirft die Frage auf, ob dieser Effekt reversibel ist. In der oben beschriebenen Studie von Kinzig et al. führte die ein-wöchige Fütterung mit einer kohlenhydratreichen Diät bei den LCHF-Ratten anschließend zu einem unverdächtigen intraperitonealen Glukosetoleranztest [116].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LCHF-Diäten die Glukosetoleranz beeinträchtigen können. Ob dies durch eine Beeinträchtigung des Inkretineffekts, der zu hohen Fettmasse, der Leberverfettung oder durch eine reversible Anpassung des Körpers ausgelöst wurde, könnte in einer weiteren Arbeit geklärt werden.

---

## 4.8 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und Resümee

Die Ratte gilt, wie oben beschrieben, als ein geeignetes Tiermodell für Diätstudien. Jedoch kann man diese Ergebnisse nur mit Vorsicht auf den Menschen übertragen, da Diätstudien an Menschen meist ad libitum waren und keinerlei Einschränkung im Verhältnis von Fett- und Protein vorgaben [3, 15].

Der ad libitum Zugriff auf Nahrung bietet Raum für einige Einflüsse, die bei einer Energievorgabe ausgeschlossen werden. Einige Studien an Menschen berichten über einen höheren Sättigungseffekt bei LCHF-Diäten [3]. Dieser könnte durch den hohen Proteingehalt in LCHF-Diäten ausgelöst werden [13]. Andere Studien berichten über eine spontane Reduzierung der Kalorienaufnahme auf einer ad libitum LCHF-Diät [19, 22, 123, 124]. Erklärungen für die verringerte Kalorienaufnahme sind die Eintönigkeit der Ernährung, die Lebensmitteleinschränkung und die dadurch ausgelöste unbewusste Reduzierung der Kalorienaufnahme [13]. Des Weiteren ist allgemein die Durchführung einer Diät oft mit Life-Style-Modifikationen vergesellschaftet. Der Verzicht oder der erhöhte Konsum von Nikotin, Koffein und Alkohol, die Einnahme von verschreibungspflichtigen oder rezeptfreien Medikamenten, aber auch reduzierte oder vermehrte sportliche Betätigung kann beim Menschen nicht kontrolliert und ausgeschaltet werden. Zu guter Letzt können Auswirkungen auf gastrointestinale Signale [125], Leptin oder Neuropeptid Y [126] nicht ausgeschlossen werden.

Außerdem sind menschliche Individuen, die ihre Ernährung auf eine LCHF-Diät umstellen, meist übergewichtig. Ferner ist deren primäres Ziel die Gewichtsabnahme und nur sekundär die positiven Effekte auf den Metabolismus. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit normalgewichtige Ratten genutzt, da das primäre Ziel dieser Studie nicht die Beurteilung der Effektivität von LCHF-Diäten war und die Ergebnisse nicht von den Effekten eines bereits vorhandenen Übergewichts beeinflusst werden sollten.

Dennoch legen die Ergebnisse im Rattenmodell nahe, dass LCHF-Diäten zwar zu Gewichtsverlust führen, jedoch keine positiven Effekte auf die Körperzusammensetzung und die Glukosetoleranz haben, und deshalb nicht als Diät empfohlen werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Kohlenhydraten allein noch keine Ketose auslöst

---

## 5 Zusammenfassung

Die steigende Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit in den Industrienationen und das im Gegensatz dazu stehende Schönheitsideal des 21. Jahrhunderts führten zur Entwicklung immer neuer Diätkonzepten, bei denen oft nicht nur die Verringerung der Energieaufnahme, sondern auch die Modifikation der Makronährstoffzusammensetzung eine zentrale Rolle spielen. Am bekanntesten ist die Gruppe der LowCarb-HighFat-Diäten (LCHF-Diäten), wobei die Atkins-Diät besonders hervorsteicht. Dabei werden Nahrungsmittel reich an Kohlenhydraten durch Nahrungsmittel mit hohem Fett- und Proteingehalt oder generell niedrigem Kohlenhydratanteil ersetzt. Diese Diäten werden auch ketogene Diäten genannt, da sie die Ketonkörperproduktion anregen und somit zu Ketose führen können. Immer wieder berichten Studien über die positiven Effekte von LCHF-Diäten auf die Körperzusammensetzung, dem Verlust von Fettmasse und den positiven Effekten auf die Insulinsensitivität. Deshalb wurden LCHF-Diäten bereits mehrfach zur Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 vorgeschlagen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, zu klären, welche Effekte LCHF-Diäten auf den Glukosemetabolismus haben. Wegen ihrer zentralen Rolle im Glukosemetabolismus wurden Genexpressionsstudien der wichtigsten Glukosetransporter durchgeführt. Da trotz fehlender Kohlenhydrate in der Nahrung Berichte über Hypoglykämien fehlen, wurde durch Genexpressionsstudien der Schlüsselenzyme der Glukoneogenese die Frage behandelt, ob diese durch LCHF-Diäten stimuliert wird und welches glukoneogenetische Organ den Blutzuckerspiegel in diesem Fall mit Glukose speist. Auch wurde mit Blick auf die Häufung von Diabetes mellitus Typ 2 in der industrialisierten Welt die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität durch Messungen der Nüchternglukose- und Nüchterninsulinspiegel, Sensitivitätsberechnungen mit dem HOMA-Modell und einem oralen Glukosetoleranztest untersucht. Da bisher die Frage immer offen blieb, ob beobachtete Effekte auf den hohen Fettanteil oder den niedrigen Kohlenhydratanteil zurückzuführen sind, wurden die Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus auch mit einer kohlenhydratreichen Hochfetttdiät (Cafeteria-Diät) durchgeführt und verglichen. Weil in der derzeitigen Literatur von einer generellen Ketoseinduktion auf LCHF-Diäten unterhalb einer bestimmten Glukosezufuhr ausgegangen wird, wurde außerdem die Frage untersucht, ob der Fett- und Proteingehalt verschiedener LCHF-Diäten die Ketoseinduktion beeinflusst.

Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellungen wurden zwölf Wochen alte, männliche Wistar Ratten auf eine standardisierte Nagerdiät (Chow: 16,7 % Fett/19,0 % Protein/64,3 % CHO der ME), eine von vier LCHF-Diäten mit unterschiedlichem Fett- und Proteinanteil (LC-75/10: 92,8 % Fett/5,5 % Protein/ 1,7 % CHO der ME; LC-65/20: 86,3 % Fett/11,8 %

---

Protein/ 1,9 % CHO der ME; LC-55/30: 78,7 % Fett/19,1 % Protein/ 2,2 % CHO der ME) oder einer kohlenhydratreichen Hochfett-Diät (Cafeteria: 61,9 % Fett/18,7 % Protein/19,4 % CHO der ME) gesetzt. Es wurde der Gewichtsverlauf dokumentiert, Urin- und Blutproben zur Ketonkörperquantifizierung gesammelt, Messungen per indirekter Kalorimetrie gemacht und ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Nach vier Wochen auf Diät wurden die Ratten zur Gewinnung von Blut- und Probenmaterial seziiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass LCHF-Diäten zu einer dem Fettgehalt in der LCHF-Diät proportional geringeren Gewichtszunahme der Ratten führten. Jedoch geschah dies auf Kosten der fettfreien Masse, denn die Fettmasse war in den LCHF-Diäten sogar höher als in der Kontrollgruppe. Als ursächlicher Mechanismus für die geringere Gewichtszunahme scheiden der von Atkins propagierte erhöhte Grundumsatz und der Verlust von Energie durch Ketonkörper via Urin aus. Denn Ketose wird nur dann von LCHF-Diäten ausgelöst, wenn der Fettgehalt hoch und der Proteingehalt niedrig ist. Entgegen den Erwartungen wurden Schlüsselenzyme der Glukoneogenese in der Leber nicht hinauf- sondern herunterreguliert. Warum dies so war, ist unbekannt, jedoch könnte die mittels Sudan<sup>®</sup>-III-Rot-Färbung von Leberschnitten nachgewiesene hepatische Verfettung zu einer Beeinträchtigung der Leberfunktion geführt haben. Auch die Niere schien keine zentrale Rolle für die Glukoseerzeugung zu spielen. Die Ursache der extrem erhöhten mRNA-Expression von PEP-CK im Duodenum (Faktor 8 bis 13) könnte durch eine erhöhte Verwendung des Enzyms in der Glyceroneogenese erklärt werden. Die Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass LCHF-Diäten die Glukoneogenese auf Expressionsebene beeinflussen. Die mRNA-Expression der Glukosetransporter Glut-2 und Glut-4 wurden in der Leber und im Muskel nicht von LCHF-Diäten beeinflusst. Jedoch scheinen LCHF-Diäten zu einer Herunterregulierung von Glut-2 im Duodenum zu führen. Im oralen Glukosetoleranztest konnte bei den LCHF-Diätgruppen, trotz positiver Insulinsensitivität laut dem oft in anderen Tierstudien verwendeten HOMA-Index, eine Insulinresistenz nachgewiesen werden. Dies bestätigt Studien, die die Validität des - eigentlich für Menschen entwickelten - HOMA-Index für Tiermodelle in Frage stellen. Ob die Insulinresistenz durch eine Beeinträchtigung des Inkretineffekts, der zu hohen Fettmasse, der Leberverfettung oder durch eine reversible Anpassung des Körpers auf die fehlende Nahrungsglukose ausgelöst wurde, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse im Rattenmodell legen nahe, dass LCHF-Diäten zwar zu Gewichtsverlust führen, jedoch keine positiven Effekte auf die Körperzusammensetzung und die Glukosetoleranz haben und deshalb nicht als Diät empfohlen werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Organization, W.-W.H., *Obesity and overweight (Fact sheet N°311)*, 2011.
2. Organization, W.-W.H. *BMI classification*. 2011; Available from: [http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html).
3. Freedman, M.R., J. King, and E. Kennedy, *Popular diets: a scientific review*. *Obes Res*, 2001. **9 Suppl 1**: p. 1S-40S.
4. Organization, W.-W.H., *Obesity and overweight (Fact sheet N°311)*, 2006.
5. Bundesamt, S., *Pressemitteilung Nr. 194 des statistischen Bundesamtes 02-06.2010 (Mikrozensus 2009)*, 2010.
6. T. von Lengerke, J.J., *Gesundheitsökonomische Aspekte der Adipositas - Bisherige Ergebnisse der Kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA), in Bewegungstherapie und Gesundheitssport 2005*; 21:116-1172005.
7. Bonafini, B.A. and P. Pozzilli, *Body weight and beauty: the changing face of the ideal female body weight*. *Obes Rev*, 2011. **12**(1): p. 62-5.
8. Rubinstein, S. and B. Caballero, *Is Miss America an undernourished role model?* *JAMA*, 2000. **283**(12): p. 1569.
9. Analyse, K., *Presseinformation ([www.konzept-analyse.de](http://www.konzept-analyse.de))*, 2008.
10. Atkins, R., *Dr. Atkins New Diet Revolution*. 1992: M. Evans and Company.
11. Kushner, R.F., *Low-carbohydrate diets, con: the mythical phoenix or credible science?* *Nutr Clin Pract*, 2005. **20**(1): p. 13-6.
12. Atkins, R., *Dr. Atkins Diet Revolution*. 1972: Bantam.
13. Astrup, A., T. Meinert Larsen, and A. Harper, *Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss?* *Lancet*, 2004. **364**(9437): p. 897-9.
14. VanItallie, T.B. and T.H. Nufert, *Ketones: metabolism's ugly duckling*. *Nutr Rev*, 2003. **61**(10): p. 327-41.
15. Bravata, D.M., et al., *Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review*. *JAMA*, 2003. **289**(14): p. 1837-50.
16. Foster, G.D., et al., *Weight and metabolic outcomes after 2 years on a low-carbohydrate versus low-fat diet: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2010. **153**(3): p. 147-57.
17. Foster, G.D., et al., *A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(21): p. 2082-90.
18. Sacks, F.M., et al., *Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(9): p. 859-73.
19. Shai, I., et al., *Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(3): p. 229-41.
20. Westman, E.C., et al., *The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-glycemic index diet on glycemic control in type 2 diabetes mellitus*. *Nutr Metab (Lond)*, 2008. **5**: p. 36.
21. Samaha, F.F., et al., *A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(21): p. 2074-81.
22. Brehm, B.J., et al., *A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(4): p. 1617-23.

- 
23. Neal, E.G. and J.H. Cross, *Efficacy of dietary treatments for epilepsy*. J Hum Nutr Diet, 2010. **23**(2): p. 113-9.
  24. Weiss, J., *Tierpflege in Forschung und Klinik*. Vol. 3. Auflage. 2009: Enke Verlag.
  25. Wisker, E., et al., *Digestibilities of energy, protein, fat and nonstarch polysaccharides in a low fiber diet and diets containing coarse or fine whole meal rye are comparable in rats and humans*. J Nutr, 1996. **126**(2): p. 481-8.
  26. Mathers, J.C. and L.D. Dawson, *Large bowel fermentation in rats eating processed potatoes*. Br J Nutr, 1991. **66**(2): p. 313-29.
  27. Joachim Rassow, K.H., Roland Netzker, Rainer Deutzmann, *Biochemie (Duale Reihe)*. Vol. 1. Auflage. 2006: Thieme Verlag.
  28. Florian Horn, I.M., Nadine Schneider, Christian Grillhösl, Silke Berghold, Gerd Lindenmeier, *Biochemie des Menschen*. Vol. 3. Auflage. 2005: Thieme Verlag.
  29. Scheepers, A., H.G. Joost, and A. Schurmann, *The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(5): p. 364-71.
  30. Wood, I.S. and P. Trayhurn, *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. Br J Nutr, 2003. **89**(1): p. 3-9.
  31. Klip, A., *The many ways to regulate glucose transporter 4*. Appl Physiol Nutr Metab, 2009. **34**(3): p. 481-7.
  32. De Meyts, P., *Insulin and its receptor: structure, function and evolution*. Bioessays, 2004. **26**(12): p. 1351-62.
  33. Jitrapakdee, S., et al., *Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling*. Diabetologia, 2010. **53**(6): p. 1019-32.
  34. Creutzfeldt, W., *The incretin concept today*. Diabetologia, 1979. **16**(2): p. 75-85.
  35. Laffel, L., *Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 1999. **15**(6): p. 412-26.
  36. Quant, P.A., *The role of mitochondrial HMG-CoA synthase in regulation of ketogenesis*. Essays Biochem, 1994. **28**: p. 13-25.
  37. Coleman, M.D. and S.M. Nickols-Richardson, *Urinary ketones reflect serum ketone concentration but do not relate to weight loss in overweight premenopausal women following a low-carbohydrate/high-protein diet*. J Am Diet Assoc, 2005. **105**(4): p. 608-11.
  38. Previs, S.F., D.Z. Brunengraber, and H. Brunengraber, *Is there glucose production outside of the liver and kidney?* Annu Rev Nutr, 2009. **29**: p. 43-57.
  39. Gerich, J.E., et al., *Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis*. Diabetes Care, 2001. **24**(2): p. 382-91.
  40. Nuttall, F.Q., A. Ngo, and M.C. Gannon, *Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?* Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24**(6): p. 438-58.
  41. Watford, M., *Is the small intestine a gluconeogenic organ*. Nutr Rev, 2005. **63**(10): p. 356-60.
  42. Jahoor, F., E.J. Peters, and R.R. Wolfe, *The relationship between gluconeogenic substrate supply and glucose production in humans*. Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 1): p. E288-96.
  43. Joost, H.G. and B. Thorens, *The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review)*. Mol Membr Biol, 2001. **18**(4): p. 247-56.

- 
44. Mueckler, M., et al., *Sequence and structure of a human glucose transporter*. Science, 1985. **229**(4717): p. 941-5.
  45. Klepper, J., *Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1DS) and the ketogenic diet*. Epilepsia, 2008. **49 Suppl 8**: p. 46-9.
  46. Thorens, B., et al., *Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells*. Am J Physiol, 1990. **259**(6 Pt 1): p. C279-85.
  47. Kellett, G.L. and P.A. Helliwell, *The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane*. Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 155-62.
  48. Bryant, N.J., R. Govers, and D.E. James, *Regulated transport of the glucose transporter GLUT4*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(4): p. 267-77.
  49. J. Kamphues, M.C., Ellen Kienzle *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung*. Vol. 9. Auflage. 1999: M. & H. Schaper-Verlag.
  50. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr, 1993. **123**(11): p. 1939-51.
  51. Unbekannt, *About Dies Formulas (Purified Diets)*. 2011.
  52. Bielohuby, M., et al., *Predicting metabolisable energy in commercial rat diets: physiological fuel values may be misleading*. Br J Nutr, 2010. **103**(10): p. 1525-33.
  53. Jacobs, G.H., *Evolution of colour vision in mammals*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1531): p. 2957-67.
  54. Ferrannini, E., *The theoretical bases of indirect calorimetry: a review*. Metabolism, 1988. **37**(3): p. 287-301.
  55. Kindel, T.L., et al., *Duodenal-jejunal exclusion improves glucose tolerance in the diabetic, Goto-Kakizaki rat by a GLP-1 receptor-mediated mechanism*. J Gastrointest Surg, 2009. **13**(10): p. 1762-72.
  56. Farrar, N.S., et al., *Effect of a series of novel sulphonylthioureas on glucose tolerance in the obese fa/fa Zucker rat*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001. **28**(5-6): p. 386-91.
  57. Weksler-Zangen, S., et al., *Glucose tolerance factor extracted from yeast: oral insulin-mimetic and insulin-potentiating agent: in vivo and in vitro studies*. Br J Nutr, 2011: p. 1-8.
  58. Dornblüth, O., *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Vol. 262. neu bearbeitete Auflage. 2010: Gruyter.
  59. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie*. Vol. 3. Auflage. 1999: Enke Verlag.
  60. Lehnert, D.G.f.E.H., *Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*. Vol. 3. Auflage. 2010: Thieme Verlag
  61. Gassen, H.G., *Gentechnische Methoden* Vol. 2. Auflage. 1999: Spektrum Akademischer Verlag.
  62. Muthusamy, T., P. Murugesan, and K. Balasubramanian, *Sex steroids deficiency impairs glucose transporter 4 expression and its translocation through defective Akt phosphorylation in target tissues of adult male rat*. Metabolism, 2009. **58**(11): p. 1581-92.
  63. Klieverik, L.P., et al., *Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(3): p. E513-20.

- 
64. Xu, H., et al., *Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36013-8.
  65. Mühlhardt, C., *Molekularbiologie*. Vol. 2. Auflage. 2000: Spektrum Akademischer Verlag.
  66. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR--a perspective*. J Mol Endocrinol, 2005. **34**(3): p. 597-601.
  67. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
  68. Wallace, T.M., J.C. Levy, and D.R. Matthews, *Use and abuse of HOMA modeling*. Diabetes Care, 2004. **27**(6): p. 1487-95.
  69. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-pCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. Blospektrum, 2004. **1/04**: p. 92-95.
  70. Valasek, M.A. and J.J. Repa, *The power of real-time PCR*. Adv Physiol Educ, 2005. **29**(3): p. 151-9.
  71. Jornayvaz, F.R., et al., *A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(5): p. E808-15.
  72. Kennedy, A.R., et al., *A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(6): p. E1724-39.
  73. Bielohuby, M., et al., *Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E65-76.
  74. Westerterp, K.R., *Diet induced thermogenesis*. Nutr Metab (Lond), 2004. **1**(1): p. 5.
  75. Adam-Perrot, A., P. Clifton, and F. Brouns, *Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects*. Obes Rev, 2006. **7**(1): p. 49-58.
  76. Meckling, K.A., C. O'Sullivan, and D. Saari, *Comparison of a low-fat diet to a low-carbohydrate diet on weight loss, body composition, and risk factors for diabetes and cardiovascular disease in free-living, overweight men and women*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2717-23.
  77. Caton, S.J., et al., *Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(2): p. 283-9.
  78. Lobley, G.E., et al., *Impact of high-protein diets with either moderate or low carbohydrate on weight loss, body composition, blood pressure and glucose tolerance in rats*. Br J Nutr, 2007. **97**(6): p. 1099-108.
  79. Axen, K.V. and K. Axen, *Very low-carbohydrate versus isocaloric high-carbohydrate diet in dietary obese rats*. Obesity (Silver Spring), 2006. **14**(8): p. 1344-52.
  80. Westman, E.C., et al., *Effect of 6-month adherence to a very low carbohydrate diet program*. Am J Med, 2002. **113**(1): p. 30-6.
  81. van Delft, R., et al., *Blood beta-hydroxybutyrate correlates better with seizure reduction due to ketogenic diet than do ketones in the urine*. Seizure, 2010. **19**(1): p. 36-9.
  82. Carel, R.S., et al., *Routine urinalysis (dipstick) findings in mass screening of healthy adults*. Clin Chem, 1987. **33**(11): p. 2106-8.
  83. Klisic, J., et al., *Acute and chronic regulation of the renal Na/H+ exchanger NHE3 in rats with STZ-induced diabetes mellitus*. Nephron Physiol, 2006. **102**(2): p. p27-35.

84. Mordes, J.P., et al., *LEW.1WR1 rats develop autoimmune diabetes spontaneously and in response to environmental perturbation*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2727-33.
85. Likhodii, S.S., et al., *Dietary fat, ketosis, and seizure resistance in rats on the ketogenic diet*. *Epilepsia*, 2000. **41**(11): p. 1400-10.
86. Likhodii, S.S., K. Musa, and S.C. Cunnane, *Breath acetone as a measure of systemic ketosis assessed in a rat model of the ketogenic diet*. *Clin Chem*, 2002. **48**(1): p. 115-20.
87. Association, A.M., *A critique of low-carbohydrate ketogenic weight reduction regimens. A review of Dr. Atkins' diet revolution*. *JAMA*, 1973. **224**(10): p. 1415-9.
88. Kim, J.Y., et al., *Effects of very-low-carbohydrate (horsemeat- or beef-based) diets and restricted feeding on weight gain, feed and energy efficiency, as well as serum levels of cholesterol, triacylglycerol, glucose, insulin and ketone bodies in adult rats*. *Ann Nutr Metab*, 2008. **53**(3-4): p. 260-7.
89. Moore, M.C., C.C. Connolly, and A.D. Cherrington, *Autoregulation of hepatic glucose production*. *Eur J Endocrinol*, 1998. **138**(3): p. 240-8.
90. Bisschop, P.H., et al., *The effects of carbohydrate variation in isocaloric diets on glycogenolysis and gluconeogenesis in healthy men*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(5): p. 1963-7.
91. Eisenstein, A.B., I. Strack, and A. Steiner, *Increased hepatic gluconeogenesis without a rise of glucagon secretion in rats fed a high fat diet*. *Diabetes*, 1974. **23**(11): p. 869-75.
92. Veldhorst, M.A., M.S. Westerterp-Plantenga, and K.R. Westerterp, *Gluconeogenesis and energy expenditure after a high-protein, carbohydrate-free diet*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **90**(3): p. 519-26.
93. Rajas, F., et al., *The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(1): p. 132-9.
94. Rajas, F., et al., *Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine*. *Diabetes*, 2000. **49**(7): p. 1165-8.
95. Croset, M., et al., *Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 740-6.
96. Mithieux, G., *New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2001. **4**(4): p. 267-71.
97. Mithieux, G., et al., *Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(3): p. E370-5.
98. Mithieux, G., F. Rajas, and A. Gautier-Stein, *A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 44231-4.
99. Hahn, P. and F.A. Smale, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase in the small intestine of developing rodents*. *J Nutr*, 1982. **112**(5): p. 986-9.
100. Hahn, P. and F.A. Smale, *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase during postnatal development in the rat*. *Can J Biochem Cell Biol*, 1983. **61**(7): p. 683-7.
101. Watford, M. and A.V. Tatro, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase of rat small intestine: distribution and regulation of activity and mRNA levels*. *J Nutr*, 1989. **119**(2): p. 268-72.
102. Hanson, R.W. and A.J. Garber, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1972. **25**(10): p. 1010-1021.

103. Reshef, L., J. Niv, and B. Shapiro, *Effect of propionate on lipogenesis in adipose tissue*. J Lipid Res, 1967. **8**(6): p. 682-7.
104. Ballard, F.J., R.W. Hanson, and G.A. Leveille, *Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue*. J Biol Chem, 1967. **242**(11): p. 2746-50.
105. Gorin, E., Z. Tal-Or, and E. Shafir, *Glyceroneogenesis in adipose tissue of fasted, diabetic and triamcinolone treated rats*. Eur J Biochem, 1969. **8**(3): p. 370-5.
106. Hanson, R.W. and L. Reshef, *Glyceroneogenesis revisited*. Biochimie, 2003. **85**(12): p. 1199-205.
107. Botion, L.M., I.C. Kettelhut, and R.H. Migliorini, *Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet*. Horm Metab Res, 1995. **27**(7): p. 310-3.
108. Kalhan, S.C., et al., *Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol synthesis in humans*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12928-31.
109. Brito, S.C., et al., *Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids*. Metabolism, 2006. **55**(1): p. 84-9.
110. Dyson, P.A., *A review of low and reduced carbohydrate diets and weight loss in type 2 diabetes*. J Hum Nutr Diet, 2008. **21**(6): p. 530-8.
111. Gannon, M.C. and F.Q. Nuttall, *Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2375-82.
112. Badman, M.K., et al., *A Very Low Carbohydrate Ketogenic Diet Improves Glucose Tolerance in ob/ob Mice Independent of Weight Loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009.
113. Hussein, A.A., et al., *Myocardial and metabolic dysfunction in type 2 diabetic rats: impact of ghrelin*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(1): p. 99-111.
114. Knowler, W.C., et al., *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin*. N Engl J Med, 2002. **346**(6): p. 393-403.
115. Sinitskaya, N., et al., *Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(10): p. 417-25.
116. Kinzig, K.P., M.A. Honors, and S.L. Hargrave, *Insulin sensitivity and glucose tolerance are altered by maintenance on a ketogenic diet*. Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3105-14.
117. Elrick, H., et al., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. J Clin Endocrinol Metab, 1964. **24**: p. 1076-82.
118. Nauck, M.A., et al., *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. J Clin Endocrinol Metab, 1986. **63**(2): p. 492-8.
119. Leite, J.O., et al., *Low-carbohydrate diet disrupts the association between insulin resistance and weight gain*. Metabolism, 2009. **58**(8): p. 1116-22.
120. Bastard, J.P., et al., *Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance*. Eur Cytokine Netw, 2006. **17**(1): p. 4-12.
121. Zeyda, M. and T.M. Stulnig, *Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review*. Gerontology, 2009. **55**(4): p. 379-86.
122. Pasarin, M., et al., *Insulin resistance and liver microcirculation in a rat model of early NAFLD*. J Hepatol, 2011. **55**(5): p. 1095-102.

- 
123. Gardner, C.D., et al., *Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial*. JAMA, 2007. **297**(9): p. 969-77.
  124. Yancy, W.S., Jr., et al., *A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial*. Ann Intern Med, 2004. **140**(10): p. 769-77.
  125. Hite, A.H., V.G. Berkowitz, and K. Berkowitz, *Low-carbohydrate diet review: shifting the paradigm*. Nutr Clin Pract, 2011. **26**(3): p. 300-8.
  126. Westman, E.C., et al., *Low-carbohydrate nutrition and metabolism*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(2): p. 276-84.

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

3-HB	<i>3-<math>\beta</math>-Hydroxybutyrat</i>
AcAC	<i>Acetoacetat</i>
AT	<i>Annealing-Temperatur, Anlagerungstemperatur</i>
ATP	<i>Adenosintri-phosphat</i>
BMI	<i>Body mass index, Körpermassindex</i>
cDNA	<i>complementary-Desoxyribonukleinsäure</i>
CHO	<i>Kohlenhydrate</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA	<i>Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
G	<i>G-Kraft</i>
G6PH	<i>Glukose-6-Phosphatase</i>
GC/MS-Analyse	<i>Gaschromatographie mit Massenspektrometriekopplung</i>
GIP	<i>Gastroinhibitorisches Peptid</i>
Glut	<i>Glukosetransporter</i>
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A</i>
HMG-CoA-Synthase	<i>Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase</i>
HOMA	<i>Homeostatic model assessment</i>
LC	<i>Low-Carbohydrate</i>
LCHF	<i>Low-Carbohydrate-High-Fat, Niedrig-Kohlenhydrat-Hoch-Fett</i>
ME	<i>Metabolisierbare Energie</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
n	<i>Anzahl</i>
n.s	<i>nicht signifikant</i>
oGTT	<i>oraler Glukosetoleranztest</i>
p	<i>Irrtumswahrscheinlichkeit</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PEP-CK	<i>Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase</i>
POD	<i>Peroxidase</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
SCL	<i>Solute Carrier</i>
SD	<i>Standard deviation, Standardabweichung</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SEM	<i>Standard error of the mean, Standardfehler</i>
SGLT1	<i>Sodium Glucose Transporter 1</i>
TAG	<i>Triacylglycerid</i>
TBE	<i>Tris-Borat-EDTA</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

---

## 7.2 Verwendete Materialien

### Tierhaltung:

Lochgitter (Techniplast)

Individualkäfig (Makrolon Typ III, Techniplast)

Versuchstierfutter (Provini Kliba)

Versuchsratte Wistar, männlich (Harlan Laboratories)

### Verbrauch:

Eingabekanüle mit Knopf (Eickemeyer)

Einwegskalpell (Disposabel Scalpell Nr. 22, Feather)

Einwegspritze 2ml (Injekt<sup>®</sup>, B. Braun)

Elution Tube (Invitrogen)

Glasgefäß, 500 ml (Schott)

Glucocapil (Eco Solo, Care Diagnostica)

Isofluran (Abbott)

Kanüle (Microlance 3, BD)

Klebefolie (Sarstedt)

Kunststoffröhrchen (PS Röhrchen 7,5 ml, Greiner Bio-One)

Makropipette [52]

Multipette<sup>®</sup> Plus (Eppendorf)

Multiwell TM 24 Well (Falcon)

Natrium-Heparin-Einmalkapillaren (Hirschmann)

Natrium-Heparin-Einmalkapillaren (Microhaematocrit Tubes, BRAND)

Nunc Röhrchen (Cryo Tube Vials 1,8 ml, Nunc)

PCR-Platte (96b Multiply<sup>®</sup> PCR Platte natur, Sarstedt)

Pipettenspitze (Combitips<sup>®</sup> Plus 1 ml, Eppendorf)

Pipettenspitze (Combitips<sup>®</sup> Plus 10 ml, Eppendorf)

---

Pipettenspitze (Combitips<sup>®</sup> Plus 2,5 ml, Eppendorf)  
Pipettenspitze, 100 µl (Biosphere<sup>®</sup> Filter Tip, Sarstedt)  
Pipettenspitze, 100 µl (Sarstedt)  
Pipettenspitze, 1000 µl (Sarstedt)  
Pipettenspitze, 1000 µl (Biosphere<sup>®</sup> Filter Tip, Sarstedt)  
Pipettenspitze, 200 µl (Biosphere<sup>®</sup> Filter Tip, Sarstedt)  
Pipettenspitze, 200 µl (Sarstedt)  
Reaktionsgefäß, 1,5 ml (Eppendorf)  
Reaktionsgefäß, 2 ml (Eppendorf)  
Reaktionsgefäß, 200 µl, 8er Strips (NeoLab)  
Sektionsbesteck (Äsculap)  
Serologische Pipette, 10 ml (Promega)  
Serologische Pipette, 25 ml (Promega)  
Serum Monovette<sup>®</sup> 7,5 ml Z-Gel (Sarstedt)  
Spin Basket Assembly (Invitrogen)  
Urinteststeifen (Ketostix<sup>®</sup>, Bayer)  
Urinteststreifen (Ketodiabur Sticks<sup>®</sup>, Roche)

Reagenzien:

2XRT Reaction Mix (Invitrogen)  
Agarosepulver (PeqGold Universal Agarose, PeqLab)  
Aqua ad iniectabilia (B.Braun)  
Benchtop 100bp DNA Ladder (Promega)  
Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega)  
D(+)- Glukose-Monohydrat (Merck)  
DEPC- behandeltes Wasser (Invitrogen)  
DNase I (Promega)  
DNase Stop Solution (Promega)  
E.coli RNase H (Invitrogen)

---

Ethanol, 95 % (Sigma-Aldrich)  
Ethidiumbromidlösung (Carl Roth)  
EvaGreen® Supermix (BioRad)  
Glycerin Gelatine (Merck)  
GoTaq® Green Master Mix (Promega)  
Hemalaun-Farbstoff (Merck)  
MnCl<sub>2</sub> (Promega)  
Nukleasefreies Wasser (Promega)  
RNA Dilution Buffer (Promega)  
RNA Lysis Buffer (Promega)  
RNA Wash Solution (Promega)  
RNase Free (LTF Labortechnik)  
RT EnzymeMix (Invitrogen)  
Sudan® III (Sigma-Aldrich)  
Yellow Core Buffer (Promega)  
β-Mercaptoethanol (Promega)

Geräte:

Blutzuckermesssystem (Glucose Analyzer Eco Solo, Care Diagnostica)  
Cryostat (SLEE Technik)  
Digitale Kamera (Leica DFC340 FX, Leica Microsystems)  
Elektrophoresesystem (Power Pac 300, BioRad)  
Geldokumentationssystem (Gel iX Imager, Intas)  
Heizblock (Thermoblock , Haep Labor Consult)  
Heizblock (Thermomixer Comfort, Eppendorf)  
Homogenisator (Ultra Turrax T8, IKA®-Werke)  
Kalorimetriesystem (CaloSys Calorimetry System, TSE Systems)  
Magnetrührer (RH Basic 2, IKA®-Werke)  
Mikroplattenleser (Tecan Spectra II Microplate Reader, Tecan)

Mikroplattenwäscher (Tecan Columbus, Tecan)  
Mikroskop (Leica DM 2500, Leica Microsystems)  
PCR-Maschine (Primus 25 Advanced<sup>®</sup>, PeqLab)  
PCR-Maschine (Stratagene Mx3000Pro, Stratagene)  
Rüttler (Wallac 1296-003 Delfia<sup>®</sup> Plateshake, Perkin Elmer)  
Spektrophotometer (DU<sup>®</sup> - 62 Spectrophotometer, Beckmann)  
Spektrophotometer (Nanodrop 1000, Thermo Scientific)  
Vortexer (Vibro Fix VF2, IKA<sup>®</sup>-Werke)  
Waage (BP121A, Sartorius)  
Waage (Competence CP 2201, Sartorius)  
Waage (SBC 32, Saltec)  
Zentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf)  
Zentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf)  
Zentrifuge (Heraeus Biofuge fresco, Kendro)

Kommerzielle Kits:

Free Fatty Acids, Half-micro Test (Roche)  
Insulin (Rat) Ultrasensitive ELISA (Alpco)  
Super Script TH III First Strand (Invitrogen)  
SV Total RNA Isolation System (Promega)

Software:

Graph Pad Prism (Graph Pad Software, Inc.)  
MxPro – Mx3000p v4.01 (Stratagene)  
Nanodrop 1000 V.3.6.0 (Thermo Scientific)  
Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research)  
Windows Microsoft Excel V6.0 (Microsoft)

---

Puffer:

TBE 10x:

*108 g Trisbase*

*55 g Borsäure*

*7,4g EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O*

*1l ddH<sub>2</sub>O*

*HCL in Tropfen bis auf pH = 8,2*

1,5 %-tiges Agarosegel

*100 ml TBE 10x*

*0,75g PeqGold Universal Agarose (PeqLab)*

*5 µl Ethidiumbromid (Carl Roth)*

50 %-tige Glukoselösung

*25 g D(+)- Glukose-Monohydrat (Merck)*

*25 ml Aqua ad iniectabilia (B.Braun)*

Sudan®-III-Rot-Lösung

*3 g Sudan® III (Sigma-Aldrich)*

*10 ml Ethanol 96 %*

*90 ml Essigsäure 99 %*

Schwache SDS-Lösung

*1 Spatelspitze Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma-Aldrich)*

*250 ml Aquadest*

---

### 7.3 Herstellerverzeichnis

Abott Deutschland (Wiesbaden)

Alpco Diagnostics (Salem, USA)

Äsculap AG (Tuttlingen)

Bayer AG (Leverkusen)

B.Braun Melsungen AG (Melsungen)

BD (Heidelberg)

Beckmann Coulter GMBH (Krefeld)

BioRad Laboratories GMBH (München)

BRAND GMBH & Co. KG (Wertheim)

Care Diagnostica Laborreagenzien GMBH (Voerde)

Carl Roth GMBH (Karlsruhe)

Eickemeyer – Medizintechnik für Tierärzte AG (Tuttlingen)

Eppendorf AG (Hamburg)

Falcon GMBH (Gräfeling)

Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)

Graph Pad Software, Inc. (La Jolla, USA)

Greiner Bio-One GMBH (Frickenhausen)

Haep Labor Consult (Bovenden)

Harlan Laboratories GMBH (Eystруп)

Hirschmann Laborgeräte GMBH & Co. KG (Eberstadt)

IKA®-Werke GMBH & Co. KG (Staufen)

Intas - Science Imaging Instruments GMBH (Göttingen)

Invitrogen GMBH (Karlsruhe)

Kendro Laboratory Products (Osterode)

Leica Microsystems (Wetzlar)

LTF Labortechnik GMBH & Co. KG (Wasserburg am Bodensee)

Merck KGaA (Darmstadt)

Metabion GMBH (Martinsried)

Microsoft Cooperation (München)  
NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GMBH (Heidelberg)  
Nunc GMBH & Co. KG (Langenselboldt)  
PeqLab Biotechnologie GMBH (Erlangen)  
Perkin Elmer Inc. (Rodgau)  
Promega GMBH (Mannheim)  
Provini Kliba AG (Kaiseraugst, Schweiz)  
Roche Diagnostics (Mannheim)  
Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)  
Sartorius AG (Göttingen)  
Scaltec Instruments GMBH (Göttingen)  
Schott AG (Mainz)  
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)  
SLEE Technik (Mainz)  
Stratagene (La Jolla, USA)  
Tecan Deutschland GMBH (Greilsheim)  
Techniplast Deutschland GMBH (Hohenpeißenberg)  
Thermo Fisher Scientific (München)  
TSE Systems GMBH (Bad Homburg)

## 7.4 Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJM, Ramisch J, **Menhofer D**, Hoeflich A und Bidlingmaier M.  
*Extreme ketogenic, but not moderate, low-carbohydrate/high fat diets lead to loss of lean body mass in rats due to impairments of the GH/IGF system*  
European Congress of Endocrinology, 2011  
Rotterdam, Holland
2. Bielohuby M, Sisley S, Sandoval D, Sorrell J, **Menhofer D**, Stoehr BJM, Herbach N, Stemmer K, Ottaway N, Tschöp M, Seeley RJ und Bidlingmaier M.  
*Rats fed low-carb/high fat diets develop insulin resistance despite reductions in body weight and reduced fasting glucose and insulin levels*  
54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 2011  
Hamburg, Deutschland
3. Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJM, Ramisch J, **Menhofer D**, Hoeflich A and Bidlingmaier M.  
*Low-carbohydrate/high fat diets impair the GH/IGF system in rats*  
Gentianum der Medizinische Klinik – Innenstadt, 2011  
Insel Frauenchiemsee, Deutschland
4. Stoehr BJM, Bielohuby M, Ramisch J, **Menhofer D** und Bidlingmaier M.  
*Effects of low-carbohydrate / high-fat LCHF diets on the growth hormone GH / insulin like growth factor IGF system in rats*  
5th International Congress of the GRS and the IGF Society, 2010  
New York, USA
5. Bielohuby M, **Menhofer D**, Stoehr BJM, Kienzle E und Bidlingmaier M.  
*Induction of ketosis in rats depends on the relative abundance of fat and protein in low-carbohydrate/high fat diets*  
14th congress of the European Society of Veterinary & Comparative Nutrition, 2010  
Zürich, Switzerland
6. Bielohuby M, **Menhofer D**, Stoehr BJM, Kienzle E und Bidlingmaier M.  
*Induction of ketosis and weight loss in rats on low-carbohydrate, high fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein*  
11th International Congress on Obesity, 2010  
Stockholm, Sweden
7. Bielohuby M, **Menhofer D**, Stoehr BJM und Bidlingmaier M.  
*Low-carbohydrate/high fat diets: Effects on glucose and insulin metabolism in rats*  
92nd Congress of the Endocrine Society, 2010  
San Diego, USA

- 
8. **Menhofer D**, Bielohuby M, Stoehr BJM und Bidlingmaier M.  
*Metabolic consequences of high-fat cafeteria diets in rats: Comparison of ad libitum and pair feeding settings*  
92nd Congress of the Endocrine Society, 2010  
San Diego, USA
  
  9. Bielohuby M, Kumann M, Stoehr BJM, **Menhofer D**, Sawitzky M, Chau L, Hoeflich A und Bidlingmaier M.  
*Short-term treatment with growth hormone affects body and organ weights and JAK2/Stat5 phosphorylation, but does not change serum IGF-I levels in generic mice*  
53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 2010  
Leipzig/ Germany
  
  10. Stoehr BJM, Bielohuby M, **Menhofer D** und Bidlingmaier M.  
*Low-Carbohydrate / High-Fat Diets induce hepatic growth hormone GH resistance and impair GH secretion in rats*  
53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 2010  
Leipzig/ Germany
  
  11. **Menhofer D**, Bielohuby M, Stoehr BJM und Bidlingmaier M.  
*Low-carbohydrate/high fat diets: Effects on ketosis, glucose and insulin metabolism in rats*  
53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 2010  
Leipzig/ Germany

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Bielohuby M, **Menhofer D**, Kirchner H, Stoehr BJM, Müller TD, Stock P, Hempel M, Stemmer K, Pfluger PT, Kienzle E, Christ B, Tschöp MH und Bidlingmaier M.  
*Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein.*  
Am J Physiol Endocrinol Metab. 300(1):E65-76/2011
  
2. Bielohuby M, **Menhofer D**, Stoehr BJM und Bidlingmaier M.  
*Failure of urine dipsticks to detect ketosis in rats*  
Obes Facts. 4(1):81-82/2011
  
3. Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJM, Stock P, **Menhofer D**, Ebensing S, Bjerre M, Frystyk J, Binder G, Strasburger C, Wu Z, Christ B, Hoeflich A und Bidlingmaier M.  
*Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone resistance in rat.*  
Endocrinology. 152(5):1948-60/2011
  
4. Bielohuby M, Sisley S, Sandoval D, Herbach N, Zengin A, Fischereeder M, **Menhofer D**, Stoehr BJ, Stemmer K, Wanke R, Tschöp MH, Seeley RJ, Bidlingmaier M.  
*Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets.*  
Am J Physiol Endocrinol Metab. 305(9):E1059-70/2013

## 7.5 Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Martin Reincke bedanke ich mich für die Überlassung des Themas.

Mein Dank gilt auch dem Leiter der Arbeitsgruppe, Dr. Martin Bidlingmaier, für seine hervorragende Betreuung, die Finanzierung dieser Arbeit und der Möglichkeit zum Besuch nationaler und internationaler Kongresse.

Zu ganz besonderem Dank verpflichtet bin ich Dr. Maximilian Bielohuby für seine ausgezeichnete, engagierte Betreuung, seine Kompetenz, seine Begeisterungsfähigkeit und seine positive und fröhliche Art.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Bidlingmaier und Beuschlein, insbesondere aber bei Frau Brigitte Mauracher und Frau Juliane Ramisch, die mich in die Arbeitstechniken einführten und mir bei Fragen immer mit einem offenen Ohr zur Seite standen, möchte ich mich hier bedanken.

Frau Dr. Peggy Stock und der Arbeitsgruppe "Hepatozytentransplantation Prof. Dr. Bruno Christ" in Halle danke ich für die Möglichkeit zur persönlichen Anfertigung von Leberschnitten mittels Sudan<sup>®</sup>-III-Rot-Färbung.

Desweiteren möchte ich meinen Co-Doktoranden Frau Barbara Stöhr und Frau Lena Schumacher und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen für das freundschaftliche und kollegiale Arbeitsklima danken.

## Eidesstattliche Versicherung

**Dominik Sebastian Menhofer**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Glukosemetabolismus und Ketoseinduktion unter low-carbohydrate/high-fat-Diäten in der Ratte: Was bewirkt eine Modulation des Fett-zu-Protein-Verhältnisses?**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kupferberg, den 11.12.13  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin/Doktorand