

University of Groningen

## Effects of laboratory housing conditions on neurobiology of energy balance in mice

Karapetsas, Giorgio

DOI:  
[10.33612/diss.182828078](https://doi.org/10.33612/diss.182828078)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Karapetsas, G. (2021). *Effects of laboratory housing conditions on neurobiology of energy balance in mice*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.182828078>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# Appendix I

## English Summary

AI

In the last decades, the prevalence of obesity and overweight increased dramatically worldwide. Research has shown that early life factors, such as unhealthy nutrition, can increase the risk of developing these conditions. In this respect, the use of mouse models has been essential to understand the neurobiology of energy balance, body weight regulation, growth, and appetite control. However, there are laboratory factors that can profoundly affect energy balance regulation in itself and can affect experimental outcomes. The main goal of this thesis was to study the effects of various social (number of pups in a litter; individual versus social housing at weaning) and environmental factors (housing temperature) on growth, energy balance regulation, and metabolic health in C57BL/6J mice, exposed to either healthy or obesogenic diets. In addition, focus has also been given to study feeding behaviour in mice, and in particular a new methodology for meal definition has been developed to calculate meal-related parameters.

In chapter 2, previously published literature was used to investigate the neuroendocrine mechanisms resulting from the use of litter size reduction models in rodents. The results of this review showed that rodents raised in small litters develop consistently weight gain and obesity, and these changes are often associated with worsened metabolic health. These effects are likely the result of the increased milk energy transfer from mother to the individual pup, but other factors may also play a role in this respect. For example, huddling among pups in a litter can affect heat loss and energy expenditure, but also factors such as strain differences, number of pups assigned to control litter size, and litter-sex distribution might contribute to these effects. Therefore, it is important to be aware of the effects that litter size can have on energy balance regulation and metabolic health, and information on litter sizes should be always reported in energy balance studies.

In chapter 3, the effects of postweaning individual versus social (i.e. in pairs with a littermate) housing on growth, energy balance regulation and metabolic health in male mice were studied. It was found that male mice individually housed at weaning showed lower weight gain, lean mass and femur length in adulthood. These changes were accompanied by an increased percentage of fat mass, and fat mass to lean mass ratio, suggesting that postweaning individual housing predisposes for obesity. However, the metabolic health of individually housed mice was not worsened as a fatter phenotype may suggest, as shown by an improved glucose homeostasis and insulin sensitivity in individually housed mice. It has been argued that differences in energy intake and energy expenditure between

individually and socially housed animals could be the result of the lack of social thermoregulation in individually housed mice. This is why, to rule out these effects, half of the mice were kept near their thermoneutral zone (28°C), compared to standard room temperature (21°C). Keeping mice near thermoneutrality, resulted in a decreased energy expenditure that was compensated for by a decreased energy intake, with no apparent effects on body composition and metabolic health. However, it was found that the effects of postweaning individual housing were independent of environmental temperature, despite energy expenditure and intake were elevated in individually housed mice only at 21°C. In addition, hypothalamic gene expression of genes related to energy metabolisms, stress and growth were also studied, but no effect of housing was found. Finally, the exposure of mice to a high fat diet greatly increased adiposity in male mice. In an exploratory analysis, the establishment of social dominance relationships in the mice housed socially was evaluated, but it did not pertain to effects in energy balance regulation. We concluded that (social) housing conditions were the prime factor that affected lean mass and bone development, whereas environmental temperature affected energy fluxes and diet was the main factor affecting adiposity.

In chapter 4, the effects of postweaning individual versus social housing on growth, energy balance regulation and metabolic health were studied in female mice. Remarkably, the effects found in male mice (chapter 3) were not present in female mice. Potential sex-differences in body weight development, growth and metabolic health may explain these differences. These findings are relevant and should be taken into account in designing and interpreting studies investigating energy balance using male and female mice. In an exploratory analysis, the establishment of social dominance relationships in female mice was investigated. Dominant female mice were heavier than subordinates when fed a high fat diet, and showed increased fat mass, lean mass and leptin levels, compared to subordinate cagemates. These findings are relevant, but should be interpreted with caution, as this was an exploratory analysis and it was not certainly powered for drawing conclusions. Future research should focus on studying the establishment of social dominance relationships in female littermates housed in pairs and in bigger groups, with a bigger sample size than our experiment. It also remains to be seen whether these hierarchies were present in early life and they were stable throughout an experimental setting as in the present study.

In chapter 5, a new methodology for meal definition was developed and validated. By taking into account every intermeal-interval (i.e. the time elapsing between

two feeding events) reported by an automated weighing system, the relationship between averaged meal sizes and minimal intermeal intervals showed broken-stick relationships. This was present only when pooling data from each animal and not by pooling the data of all the animals together. With the use of the R package “segmented”, the breakpoint between the broken-stick relationships were automatically detected and used as meal definition parameter (meal cluster analysis - MCA). Interestingly, the breakpoints found varied significantly based on which dietary and environmental manipulations the mice were subjected to. This may suggest that with the use of standard arbitrary intermeal intervals, that is the use of a predefined and arbitrarily chosen criteria for all the animals, may affect meal related parameters in a different way than the MCA. In fact, the use of arbitrary IMI led to differences in the main effects of diet (high fat versus low fat) and temperature (21°C versus 28°C), indicating how important it is to take into account and analyse meal related parameters not only using arbitrary IMI. This implies that studies performed with the use of standard arbitrary IMI may have missed potential relevant effects of experimental challenges and reanalysis of meal related parameters with the use of the MCA function may shed some light in this respect.

In conclusion, the number of pups in a litter and postweaning social factors can affect growth, energy balance and metabolic health. Interestingly, social factors after weaning had robust effects on growth and energy balance regulation in a sex-dependent fashion. On the other hand, social hierarchy relationships were present both in male and female socially housed littermates, but pertained to clear differences in energy balance regulation and metabolic health only in female mice. Finally, investigation of feeding behaviour and meal-related parameters in mice is possible through automated breakpoint analysis and the use of arbitrary intermeal intervals to define meals should be carefully evaluated.

## **Appendix II**

# **Nederlandse Samenvatting**

In de afgelopen decennia is er wereldwijd een drastische toename geweest in de prevalentie van obesitas en overgewicht. Uit onderzoek is gebleken dat omgevingsfactoren tijdens het vroege leven, zoals ongezonde voeding, het risico op het ontwikkelen van deze aandoeningen kunnen vergroten. Het gebruik van muismodellen is essentieel geweest om de hierbij behorende processen zoals neurobiologie van energiebalans, regulering van het lichaamsgewicht, groei en voedselinname controle beter te kunnen begrijpen. In het laboratorium kunnen er echter factoren aanwezig zijn die ook de regulering van de energiebalans sterk kunnen beïnvloeden en die daarmee van invloed kunnen zijn op de experimentele uitkomsten. Het hoofddoel van dit proefschrift was het bestuderen van de invloed van verschillende sociale factoren (aantal pups in een nest; individuele versus sociale huisvesting na het spenen) en omgevingsfactoren (omgevingstemperatuur) op groei, regulering van de energiebalans en de metabole gezondheidsstatus van C57BL/6J muizen die waren blootgesteld aan een gezond dieet of een dieet dat aanzet tot obesitas. Daarnaast is er ook aandacht besteed aan het bestuderen van voedselinnamegedrag bij muizen, waarbij er een nieuwe methodologie is ontwikkeld voor het definiëren van een maaltijd om maaltijd gerelateerde parameters te kunnen berekenen.

In hoofdstuk 2 is gebruik gemaakt van reeds gepubliceerde artikelen om veranderingen in neuro-endocrine mechanismen te onderzoeken die optreden bij knaagdiermodellen waarbij het aantal pups in het nest wordt verlaagd. De resultaten van dit literatuuronderzoek toonden aan dat knaagdieren die in kleine nesten zijn grootgebracht gewichtstoename en obesitas ontwikkelen, deze veranderingen worden vaak geassocieerd met een verslechterde metabole gezondheid. Deze effecten worden waarschijnlijk veroorzaakt door een hogere aanvoer van energie van de moeder naar de individuele pup via de melk, maar andere factoren kunnen ook meespelen. Het tegen elkaar aankruipen van de pups in een nest kan bijvoorbeeld van invloed zijn op warmteverlies en energieverbruik, maar ook factoren zoals knaagdierstam, het aantal mannelijke en vrouwelijke pups in het nest, het aantal pups per nest dat gebruikt wordt in de controlegroep kunnen bijdragen aan deze effecten. Bewustwording over de effecten van nestgrootte op de regulatie van de energiebalans en de metabole gezondheid is daarom belangrijk en de gebruikte nestgrootte zou standaard gerapporteerd moeten worden bij studies over energiebalans.

In hoofdstuk 3 werden de effecten van individuele versus sociale huisvesting (in paren met een nestgenoot) na het spenen op groei, regulatie van de energiebalans en metabole gezondheid van mannelijke muizen bestudeerd. Er werd gevonden

dat mannelijke muizen een minder sterke toename in lichaamsgewicht hadden als gevolg van individuele huisvesting na spenen, en een lagere vetvrije massa en kortere dijbeenlengte op volwassen leeftijd. Deze veranderingen gingen gepaard met een hoger lichaamsvetpercentage en een hogere ratio vetmassa /vetvrije massa, wat suggereert dat individuele huisvesting na het spenen aanleiding is voor de ontwikkeling van obesitas. In tegenstelling tot wat een dikker fenotype suggereert was de metabole gezondheid van individueel gehuisveste muizen echter niet verslechterd zoals bleek uit een verbeterde glucosehomeostase en insulinegevoeligheid. Er is geopperd dat de verschillen in energie-inname en energieverbruik tussen individueel en sociaal gehuisveste dieren het gevolg zouden kunnen zijn gebrek aan sociale thermoregulatie bij individueel gehuisveste muizen. Om dit effect uit te kunnen sluiten werd een groep muizen bij een hogere omgevingstemperatuur gehouden (28 °C), die in de buurt van hun thermoneutrale zone ligt, en vergeleken met een groep muizen die bij standaard kamertemperatuur (21 °C) werden gehouden. De omgevingstemperatuur in de buurt van thermoneutraliteit resulteerde in een lager energieverbruik van de muizen, dit werd gecompenseerd door een lagere energie-inname zonder verder duidelijke effecten op de lichaamssamenstelling en metabole gezondheid te veroorzaken. Ondanks dat het energieverbruik en de voedsel inname bij individueel gehuisveste muizen alleen bij 21°C verhoogd waren werd er gevonden dat de effecten van individuele huisvesting na het spenen niet afhankelijk waren van de omgevingstemperatuur. Daarnaast werd ook de expressie bestudeerd van specifieke genen in de hypothalamus die gerelateerd zijn aan energiemetabolisme, stress en groei, maar er werd geen effect van huisvesting op expressie vastgesteld. Tot slot bleek dat blootstelling aan een vetrijk dieet de lichaamsvetophoping aanzienlijk verhoogde bij mannelijke muizen. In de sociaal gehuisveste muizen werden de onderlinge dominantie-relaties tussen kooigenoten bepaald en er werd middels een verkennende analyse vastgesteld dat deze relaties verder niet van invloed waren op de regulatie van de energiebalans. We concludeerden dat bij mannelijke muizen de (sociale) huisvestingsomstandigheden de belangrijkste factor is die de vetvrije massa en botontwikkeling beïnvloedde, terwijl de omgevingstemperatuur de energiefluxen beïnvloedde en voeding de belangrijkste factor was die de ophoping van lichaamsvet bepaalde.

In hoofdstuk 4 werden de effecten van individuele versus sociale huisvesting na het spenen op groei, energiebalansregulatie en metabole gezondheid bestudeerd bij vrouwelijke muizen. Opmerkelijk is dat de effecten die gevonden werden bij mannelijke muizen (hoofdstuk 3) niet aanwezig waren bij vrouwelijke muizen. Dit verschil zou mogelijk verklaard kunnen worden door sekseverschillen in

lichaamsgewichtontwikkeling, groei en metabole gezondheid. Deze bevindingen zijn relevant en er moet rekening worden gehouden met sekseverschillen bij het opzetten en het interpreteren van onderzoek naar de energiebalans met muizen. In de sociaal gehuisveste vrouwelijke muizen werden de onderlinge dominantierelaties tussen kooigenoten bepaald en werd de invloed hiervan op experimentele uitkomsten middels een verkennende analyse onderzocht. Bij blootstelling aan een vetrijk dieet waren dominante vrouwelijke muizen zwaarder dan ondergeschikte kooigenoten, dit ging gepaard met verhoogde vetmassa, vetvrije massa en hogere leptinespiegels. Deze bevindingen zijn relevant, maar moeten met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd, aangezien dit een verkennende analyse was en de gebruikte groepsgrootte te klein was om sterke conclusies aan de uitkomsten te kunnen verbinden. In toekomstige studies zou het ontstaan van sociale dominantierelaties bij vrouwelijke muizen die in paren en in grotere groepen zijn gehuisvest verder onderzocht moeten worden, waarbij gebruik moet worden gemaakt van een grotere groepsomvang dan toegepast in de huidige studie. Het is tevens nog onzeker of de sociale hiërarchieën op jonge leeftijd reeds aanwezig zijn en of deze stabiel blijven in een experimentele setting zoals in de huidige studie.

In hoofdstuk 5 werd een nieuwe methodologie voor het definiëren van een maaltijd van een muis ontwikkeld en gevalideerd. Door iedere intermeal-interval (d.w.z. de tijd die verstrijkt tussen twee voedselinname gebeurtenissen) die geregistreerd wordt met behulp van geautomatiseerd weegsysteem mee te nemen in de berekeningen, kon de relatie tussen gemiddelde maaltijdgroottes en minimale intermeal-interval uitgedrukt worden als een gebroken lijn. Dit was alleen het geval wanneer gegevens van elk individu samengevoegd werden en niet bij het samenvoegen van de gegevens van alle dieren. Met het gebruik van het R-pakket “gesegmenteerd”, werd het breekpunt op de gebroken lijn relatie automatisch gedetecteerd en gebruikt als maaltijddefinitieparameter (maaltijdclusteranalyse - MCA). Interessant is dat deze breekpunten varieerden op basis van de voeding en omgevingsfactoren waaraan de muizen werden blootgesteld. Dit kan erop wijzen dat bij het traditioneel gebruik van standaard willekeurige intermeal intervals (IMI, vooraf gedefinieerde en willekeurig gekozen criteria voor alle dieren) de uitkomsten op het gebied van maaltijdgerelateerde parameters anders zijn dan bij het gebruik van MCA. Het gebruik van standaard willekeurige IMI in deze studie leidde inderdaad tot andere uitkomsten op het gebied van effecten van voeding (vetrijk versus laag vetgehalte) en temperatuur (21°C versus 28°C) dan met MCA, wat aangeeft hoe belangrijk het is om maaltijdgerelateerde parameters uitgebreider te analyseren dan enkel met de standaard willekeurige IMI. Dit zou tevens kunnen betekenen dat men bij eerdere studies, waarbij alleen gebruik gemaakt is van

standaard willekeurige IMI, mogelijk relevante effecten van experimentele factoren niet zijn opgepikt, en heranalyse van maaltijdgerelateerde parameters met behulp van de MCA-functie zou hier nieuw perspectief kunnen bieden.

De eindconclusie van dit werk is dat groei, de energiebalans en de metabole gezondheid van muizen kan worden beïnvloed door het aantal pups in het nest tijdens het vroege leven en door sociale omgevingsfactoren na het spenen. Interessant is dat sociale factoren na het spenen robuuste effecten hadden op de groei en de regulering van de energiebalans op een geslachtsafhankelijke manier. In sociaal gehuisveste dieren waren hiërarchierelaties aanwezig tussen kooigenoten, zowel bij mannelijke als vrouwelijke dieren, maar alleen bij vrouwelijk muizen had dit betrekking op de regulering van de energiebalans en metabole gezondheid. Tot slot kan geautomatiseerde breekpuntanalyse uitkomst bieden bij onderzoek naar voedselinnamegedrag en maaltijdgerelateerde parameters bij muizen en zal het gebruik van de traditioneel willekeurige gekozen intermeal intervals om maaltijden mee te kunnen definiëren zorgvuldig moeten worden geëvalueerd.

# Acknowledgements



It seems yesterday that this journey started and I'm already here writing the last (and very important) part of my thesis. There are many people that have been part of this fantastic journey that I would like to thank.

First, I would like to thank my supervisors. **Gertjan**, you have been an excellent mentor full of enthusiasm. Thanks for the many scientific discussions, the guidance, and the support given to me. I will miss walking into your office every day and bother you with my questions. **Jan**, your great sense of humor and your organized way of working have been crucial for the completion of my PhD. I will never forget the first time I met you: you were laying down on the floor of your office while stretching, with Gertjan that was helping you. One of the funniest moments of my PhD. **Lidewij**, you have a great mentor despite the distance! I will never forget your help and support during the experiment, and thanks for teaching me many tricks and tips on how to do research!

I would like to thank the members of the reading committee for the time they invested in reviewing this thesis. I would have never made it without the outstanding help of my students: **Paula, Chiara, Amber, Karin, Lance, Maarten**, and **Judith**. A big thanks also to **Jan B.**, you have helped so much with setting up the TSE system, with data extraction, and with analyzing the blood and fecal samples!! Thanks also to **Wanda, Roel, Kunja, Roy, Christa**, and **Jan K.**, for helping, explaining and teaching me laboratory tricks. A big thanks also to **Pleunie** and **Corine** for all their help. Thanks also to all the wonderful Professors from the second floor: **Sietse, Anton, Bauke** and **Jocelien**.

To **Roos**, you have been an incredible source of energy, thanks for supporting (and bearing) me. To **Raphael**, you have always been interested in science and in what I was doing and kept asking me how the status of this thesis was. Thanks to you both for the amazing moments we have had together and per essere una squadra fortissima!

A **Marta**, la sorella che ho sempre sognato di avere. Non lo so nemmeno io come hai fatto a sopportarmi e come fai a volermi così bene! Mi manchi tantissimo e vorrei tanto che fossi qui a festeggiare questo momento. Però la tua lotta è molto più importante del mio dottorato. Continua ad essere la leonessa che sei sempre stata!

To my office mates, the **0258s**. The say goes that for a foreigner is hard to make Dutch friends in the Netherlands. Well, thanks to you I feel like I am the exception!

Thanks to everybody for all the moments shared, I am sure I will miss our room very much in the future. **Kevin, Danielle, Betty, Anouschka, Laura, Diana, Deepika, Kong, Mila, Bente, Nur** and **Maria**. A special mention goes to **Steffen**, the craziest and loudest colleague I have ever had. With you, there were no days where we got bored in the lab and the office. Thanks for the amazing moments spent together in the climate rooms, especially the tropical room. With some of the office mates, we have been able to make a wonderful team (**Steffie, Mr. clean, Yala, Nonno**) on agar.io, and I believe we were one of the most competitive teams worldwide. Sorry to the others that weren't part of the team and had to bear the noise of the games!

A big thanks also to the colleagues from the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> floor (**Remco, Yuri, Anouk, Frank, Marelle, Valentina**) and all the amazing people from the **Komdeur group**.

A big thanks also to **Riccardo**, my Italian buddy in the Netherlands, for the many enjoyable moments spent together talking about everything and nothing. Thanks to **Neil**, our evenings with barbecues, smoked meat, and special beers are the best in den Haag. The following mornings were a little less enjoyable but were part of the game. Thanks also to my new neighbors **Vilmantis** and **Roberta** for the amazing year we spent together during the difficult COVID-19 lockdown.

Un ringraziamento particolare al mio mentore **Vittorio**. Senza di te, non so se avrei mai pensato di continuare a studiare e di addirittura fare un dottorato di ricerca all'estero. Un grazie anche a tutti i gli amici dall'Italia. Nominarvi tutti sarebbe impossibile, siete stati sempre nella mia mente e nel mio cuore in questi anni. Grazie mille anche a **Carlo Polidori** e **Carlo Cifani** dell'Università di Camerino per avermi fatto avvicinare al mondo della Scienza e per avermi mandato a Groningen. Un ringraziamento alla mia famiglia: **Stefano, Dominika, Catia, Mimmo, Alessandro, Erica, Nico, Noemi, Olga** e **Massi**. Ovviamente voi siete una parte di me, e è difficile starvi lontano!

A huge thanks go to my paranymphs: **Niels**, how could I not ask a man that loves Italian food, wine, cars, and shoes to be my paranymph? Jokes aside, thanks for the endless discussions and dinners had during the last years. You have been very supportive in making decisions and a great friend. **Warner**, you helped me when I was alone in the lab, with hundreds of tasks to perform each day. I still owe you a lot for all the help you have given. Thank you very much also for being an amazing colleague and for being an amazing deskmate.

## Acknowledgements

Ai miei **genitori**, le persone più importanti nella mia vita. Senza di voi, questo lavoro sarebbe stato impossibile.

For the rest of people that I forgot to mention, I'm sorry, it's just forgetfulness!