

Aus dem
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

**Der Einfluss einer Ablation des braunen
Fettgewebes auf Morphologie,
Metabolismus und Inflammation des weißen
Fettgewebes im murinen Modell des akuten
Myokardinfarktes**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Kirkopoulos

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

Zusammenfassung

Braunes Fettgewebe ist entgegen einer langjährigen Auffassung nicht nur bei Kindern vorhanden, sondern auch im adulten menschlichen Organismus nachzuweisen. Seit seiner Entdeckung im Erwachsenen zu Beginn des 21. Jahrhunderts rückte das braune Fettgewebe in den Fokus aktueller Forschung. Dabei konnten Erkenntnisse über seine positiven Eigenschaften sowohl in metabolischer Hinsicht als auch in kardialer Hinsicht gewonnen werden. Braunes Fettgewebe verbessert einerseits eine bestehende Insulinresistenz und verhindert die Entwicklung von Übergewicht. Andererseits übt es positive Effekte auf das Myokard in struktureller und funktioneller Hinsicht im Rahmen einer Herzinsuffizienz aus. Es gibt bereits erste Hinweise darauf, dass auch im Rahmen einer akuten kardialen Ischämie im Sinne eines Myokardinfarktes vergleichbare lokale und systemische positive Einflüsse des braunen Fettgewebes festzustellen sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die systemischen Einflüsse einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes im Rahmen eines Myokardinfarktes zu charakterisieren. Speziell wurde dabei das viszerale weiße Fettgewebe untersucht, welches durch die Sekretion von Adipokinen bekanntermaßen metabolische und inflammatorische Prozesse systemisch beeinflusst. Darüber hinaus sind bereits Interaktionen zwischen braunen und weißen Fettgewebsdepots beschrieben, was einen Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes unter anderem auf das weiße Fettgewebe vermuten lässt. Dazu wurden mit Hilfe histologischer Färbungen die Fettzellgrößen in weißem Fettgewebe erfasst und die Anzahl an Makrophagen quantifiziert. Ergänzend wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um Einflüsse auf den Vorgang der Lipolyse erfassen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass braunes Fettgewebe die metabolische Umstellung nach einem Myokardinfarkt durch die Verstoffwechslung potenziell toxischer Lipolyseprodukte positiv beeinflusst. Außerdem konnte ein antiinflammatorischer Effekt auf das viszerale weiße Fettgewebe festgestellt werden. Diese positiven Einflüsse sind dabei nicht nur kurzfristig, sondern auch längerfristig nach einem Myokardinfarkt nachzuweisen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit positive Effekte des braunen Fettgewebes auf Metabolismus und Inflammation im weißen Fettgewebe nach akutem Myokardinfarkt, die in Tiermodellen und klinischen Studien weitergehend untersucht werden sollten. Eine günstige Beeinflussung der metabolischen Umstellung und eine Limitation von Entzündungsprozessen durch eine pharmakologische Aktivierung von braunem Fettgewebe könnte zukünftig eine unterstützende Behandlungsstrategie des akuten Myokardinfarktes und seiner Folgen darstellen.

Summary

Brown adipose tissue is not only present in children but can be also found in adult humans. Since its discovery in adults in the beginning of the 21st century current research has focused on this tissue. Researchers have already identified positive characteristics of brown adipose tissue regarding metabolism and cardiac remodeling. For example, it is able to attenuate an existing insulin resistance and to prevent weight gain in the setting of metabolic syndrome. Also, it influences cardiac remodeling due to chronic heart failure positively. Current research suggests that brown adipose tissue also exerts positive effects locally on the heart and systemically in the setting of acute myocardial infarction. The purpose of this dissertation is the characterization of the systemic effects of a surgical ablation of brown adipose tissue. Specifically, visceral white adipose tissue is examined which is known to influence metabolic and inflammatory processes systemically through the secretion of certain adipokines. Also, interactions between brown and white adipose tissue depots have already been described which lets us presume effects of brown adipose tissue ablation on white adipose tissue. For this purpose, histologic staining has been performed on white adipose tissue to measure adipocyte size and quantify macrophage content. Furthermore, genetic expression analyses have been performed to characterize possible effects of brown adipose tissue ablation on lipolysis.

The results of this work show that brown adipose tissue influences the metabolic changes after acute myocardial infarction positively by metabolizing possibly cardiotoxic products of lipolysis. Additionally, the present study observed anti-inflammatory effects of brown adipose tissue on inflammation in visceral white adipose tissue. These effects could be observed not only shortly after myocardial infarction but also some time later. In summary, the results of the present work show positive influences of brown adipose tissue on metabolism and inflammation in white adipose tissue after myocardial infarction, which should be further investigated in both, animal and clinical studies. The positive orchestration of metabolism and limitation of inflammatory processes by pharmacologic activation of brown adipose tissue could serve as a potential supporting treatment strategy of acute myocardial infarction in the future.

Abkürzungsverzeichnis

Acaca	Acetyl-Coenzym A Carboxylase alpha-Gen
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AgRP	<i>agouti-related peptide</i>
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATGL	Adipozytentriglyceridlipase
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe (<i>brown adipose tissue</i>)
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BMP8b	<i>Bone morphogenic protein 8b</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLS	<i>crown-like structures</i>
CT	Computertomographie
CXCL14	<i>C-X-C motif chemokine ligand-14</i>
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DES	<i>drug eluting stent</i>
EtOH	Ethanol
EKG	Elektrokardiogramm
Fasn	Fettsäuresynthase (<i>fatty acid synthase</i>)
¹⁸F-FDG	¹⁸ F-Fluordesoxyglukose
FGF21	<i>fibroblast growth factor 21</i>
GDF15	<i>growth and differentiation factor 15</i>
h	Stunde
HCL	Salzsäure
H&E	Hämalaun und Eosin
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HSL	Hormon sensitive Lipase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KG	Körpergewicht

KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	<i>left anterior descending artery</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
Lipe	Lipase E-Gen (synonym: Hormon sensitive Lipase)
MAC2	Galektin-3
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
min	Minuten
µm²	Quadratmikrometer
mRNA	<i>messenger-Ribunokleinsäure</i>
ng	Nanogramm
NPY	Neuropeptid Y
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PnPla	Adipozytentriglyceridlipase
RNA	Ribonukelinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
TB	Tris-Borat Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF-beta	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i> , Thermogenin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WAT	Weißes Fettgewebe (<i>white adipose tissue</i>)
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einführung	1
1.1 Myokardinfarkt	1
1.1.1 Die epidemiologische Bedeutung und klinische Relevanz des akuten Myokardinfarktes	1
1.1.2 Die metabolische Umstellung nach einem Myokardinfarkt.....	3
1.1.3 Die inflammatorische Reaktion nach einem Myokardinfarkt	4
1.2 Braunes Fettgewebe	6
1.2.1 Aufbau und Funktion des braunen Fettgewebes.....	6
1.2.2 Die Interaktion von braunem Fettgewebe mit anderen Organen ..	8
1.2.3 Die Rolle von braunem Fettgewebe bei kardialen Erkrankungen	10
1.3 Das weiße Fettgewebe	12
1.3.1 Aufbau und Funktion des weißen Fettgewebes	12
1.3.2 Das weiße Fettgewebe als endokrines Organ	13
1.3.3 Morphologische Veränderungen und Inflammation in weißem Fettgewebe im Kontext von Krankheiten	15
1.4 Ziele der Arbeit	17
2 Materialien und Methoden	18
2.1 Arbeitsmittel	18
2.1.1 Substanzen	18
2.1.2 Lösungen und Puffer	18
2.1.3 Erstantikörper	20
2.1.4 Zweitantikörper	20
2.2 Molekularbiologische Methode	20
2.2.1 Umschreibung von RNA	20
2.2.2 Verwendete Primer	21
2.3 Geräte und Material	22
2.4 Experimente im Mausmodell: Mauslinie und Behandlung	24
2.5 Histologische Aufarbeitung des Gewebes	27
2.5.1 Immunhistochemische Färbungen	28
2.5.2 H&E Färbung.....	28
2.5.3 MAC2 Färbung	28
2.6 Genexpressionsanalyse	30

2.7	Auswertung.....	32
2.7.1	Länge, Körper- und Probengewicht.....	32
2.7.2	Auswertung mit der Fiji Software.....	32
2.7.3	Viszerales Fettgewebe	33
2.7.4	Adipozytengröße	33
2.7.5	Crown-like structures.....	34
2.7.6	Genexpression: Auswertung mit dem Nanodrop.....	34
2.7.7	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf den Metabolismus im weißen Fettgewebe im Modell des Myokardinfarktes.....	36
3.1.1	Einfluss auf das Körpergewicht und auf das Gewicht des weißen Fettgewebes	36
3.1.2	Einfluss auf die Morphologie von Adipozyten im weißen Fettgewebe	37
3.1.3	Einfluss auf die Adipozytenanzahl im weißen Fettgewebe	40
3.2	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Genexpression im weißen Fettgewebe	42
3.3	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe im Modell des Myokardinfarktes.....	45
3.3.1	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe in der frühen Reperfusionphase nach Myokardinfarkt	45
3.3.2	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe in der späten Reperfusionphase nach Myokardinfarkt	47
4	Diskussion.....	49
4.1	Schlussfolgerungen	49
4.2	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf Körpergewicht und Gewicht des weißen Fettgewebes nach Myokardinfarkt	50
4.3	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf Morphologie und Anzahl von Adipozyten im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt	52
4.4	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Genexpression im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt.....	55
4.5	Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation in weißem Fettgewebe nach Myokardinfarkt.....	59
4.6	Limitationen	62
4.7	Ausblick	62
5	Literaturverzeichnis.....	64
6	Abbildungsverzeichnis	71

7	Tabellenverzeichnis.....	72
----------	---------------------------------	-----------

1 Einführung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Die epidemiologische Bedeutung und klinische Relevanz des akuten Myokardinfarktes

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Krankheiten und Todesursachen weltweit. Dabei werden unter diesem Begriff die Krankheitsbilder der ischämischen oder koronaren Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskulärer Erkrankungen wie der ischämische Schlaganfall, die peripher-arterielle Verschlusskrankheit, venöse Thrombembolien und rheumatische oder kongenitale Herzerkrankungen zusammengefasst. Von diesen Erkrankungen weist die koronare Herzkrankheit die weltweit höchste Mortalität auf. Laut aktueller Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben 2019 über 8 Millionen Menschen an einer ischämischen Herzkrankheit, zu deren unmittelbar auftretenden Komplikationen und häufigsten Todesursachen der akute Myokardinfarkt gehört. Damit haben die Sterbefälle im Zusammenhang mit dieser Erkrankung im Vergleich zum Jahr 2000 weltweit um mehr als 2 Millionen zugenommen¹, wodurch die stetige Zunahme der Prävalenz der KHK und des akuten Myokardinfarktes in der Bevölkerung widergespiegelt wird. Auch in Deutschland sind kardiovaskuläre Erkrankungen und insbesondere der akute Herzinfarkt als führende Todesursache zu verzeichnen. Gemäß den Angaben der Gesundheitsberichterstattung des Bundes starben im Jahre 2019 hierzulande 330,35 Menschen je 100.000 Einwohner in der Altersgruppe von 35 bis 75 Jahren an einem akuten Myokardinfarkt. In der Gruppe der 65- bis 75-Jährigen waren es sogar 785,66 Sterbefälle je 100.000 Einwohner².

Wie sich an diesen dargelegten Daten ablesen lässt, nimmt die koronare Herzkrankheit – inklusive des akuten Myokardinfarkts als Komplikation sowie der Behandlung der Krankheit – aufgrund ihrer Häufigkeit eine bedeutende Rolle im deutschen Gesundheitswesen ein. Da der Herzinfarkt vornehmlich eine Erkrankung des älteren Menschen ist, wird seine Bedeutung vor dem Hintergrund

des demographischen Wandels mit der stetig alternden Bevölkerung weiter zunehmen. Die Therapiemöglichkeiten haben sich in den vergangenen Jahren durch die Etablierung der Koronarangiographie mittels Herzkatheter mit Einsatz eines *Drug Eluting Stents* (DES) zur Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes als Standardverfahren^{3,4} bereits deutlich verbessert. Dennoch wird auf dem Themengebiet des akuten Myokardinfarktes weiterhin intensive Forschung betrieben, um die Behandlung des Herzinfarktes und insbesondere seiner Folgen zu optimieren und so das Behandlungsergebnis zu verbessern. Ziel ist es, die immer noch hohe Mortalität des Myokardinfarktes zu verringern und seine Folgeerscheinungen langfristig zu minimieren.

Jene Folgeerscheinungen stehen mit der Unterversorgung des Myokardgewebes mit Sauerstoff (Ischämie) im Zusammenhang, die in den häufigsten Fällen durch einen Verschluss (Okklusion) einer Koronararterie infolge atherosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand herbeigeführt wird⁵. Durch die akute Okklusion des Koronargefäßes gelangt kein Blut mehr an das distal dieser Läsion gelegene Herzgewebe, sodass es nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Die Folge ist ein Untergang des minderperfundierten, ischämischen Herzmuskelgewebes. Der nekrotische Untergang von Herzmuskelzellen hat dabei nicht nur lokale, sondern auch systemische Auswirkungen auf inflammatorische und metabolische Prozesse. So werden nach dem Infarkt nicht nur im Myokard selbst pro-inflammatorische Prozesse im Rahmen des *Remodeling* angeregt, sondern es werden auch Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen aus peripheren Geweben wie dem Knochenmark und der Milz mobilisiert^{6,7}. Außerdem ist nach einem akuten Myokardinfarkt eine systemische Zunahme lipolytischer Prozesse zu verzeichnen, sodass auch das Fettgewebe durch eine akute Myokardischämie affiziert wird⁸.

1.1.2 Die metabolische Umstellung nach einem Myokardinfarkt

Das Herz benötigt zur Aufrechterhaltung seiner Pumpfunktion sowie zur Erhaltung intrakardialer metabolischer Prozesse und transmembranärer Ionengradienten sehr viel Energie. Zur Deckung seines hohen Energiebedarfes muss kontinuierlich ATP gebildet werden. Unter aeroben Bedingungen bezieht das Herz sein benötigtes ATP zu etwa 50-70% aus der Beta-Oxidation von Fettsäuren⁹. Neben Fettsäuren stellen Kohlenhydrate das zweitwichtigste Substrat dar¹⁰, aus dessen Metabolisierung das Herz mittels Glykolyse und Laktatoxidation Energie gewinnt⁹.

Unter anaeroben Bedingungen, wie sie im Rahmen einer Ischämie auftreten, wird die Beta-Oxidation der Fettsäuren zunächst gehemmt⁸. Es kommt zu einer Akkumulation von Zwischenprodukten wie Acyl-Carnitinen und Acyl-CoA-Estern, die toxische Einflüsse auf das Myokard ausüben können. Eine solche Lipotoxizität äußert sich beispielsweise in Form einer Zerstörung der mitochondrialen Ultrastruktur mit folgenden Beeinträchtigungen in dem Vorgang der oxidativen Phosphorylierung⁹. Zu Beginn einer Ischämie ist das Herz stattdessen auf anaerobe Glykolyse als einzig verbleibende Quelle zur Energiegewinnung angewiesen⁸. Auch dieser metabolische Prozess führt zu einer Akkumulation schädlicher Nebenprodukte. Durch anaerobe Glykolyse kommt es zu einer Anhäufung von Laktat und Protonen in den Herzmuskelzellen¹¹, welche eine Azidose hervorruft. Die Azidose bedingt eine herabgesetzte Sensitivität der kontraktilen Myofilamente auf Calcium-Ionen als elektromechanische Koppler, was eine Aggravation der myokardialen Dysfunktion und letztendlich den Untergang der Myozyten zur Folge hat⁹. Die toxischen Nebenprodukte dieser Stoffwechselprozesse können erst im Rahmen einer Reperfusion mit dem wiedereinsetzenden Blutstrom aus dem Herzen heraustransportiert werden. Unter den ischämischen Bedingungen kommt es bei einem Myokardinfarkt infolge der akut einsetzenden Herzinsuffizienz und Schmerzen zudem zu einer Sympathikusaktivierung^{6,12}. Der Sympathikus initiiert den Vorgang der Lipolyse aus peripheren Fettgeweben, wodurch nach einem Myokardinfarkt das Angebot an freien Fettsäuren erhöht ist^{13,14}. Diese werden während der Reperfusion vermehrt zum Herzen transportiert. Somit dominiert während der Phase der Reperfusion die Beta-Oxidation von Fettsäuren

gegenüber der Oxidation von Kohlenhydraten als vornehmliche Quelle zur Energiegewinnung^{15,16}. Dieses Ungleichgewicht zwischen der oxidativen Verstoffwechslung von Fettsäuren und Kohlenhydraten zugunsten der Fettsäuren¹⁷ hat eine ineffiziente Energiegewinnung zur Folge. Für die Metabolisierung von einem Fettsäuremolekül zur Synthese von ATP werden fast viermal so viele Sauerstoffatome benötigt wie für die Verstoffwechslung eines Kohlenhydratmoleküls⁹. Verglichen mit der Nutzung von Kohlenhydraten als Substrat für die Energiegewinnung ist die Nutzung von Fettsäuren als Substrat für die ATP Synthese daher mit einem höheren Sauerstoffverbrauch verbunden. Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch ist unter postischämischen Bedingungen jedoch äußerst ineffizient und schädlich für die hypoxisch vorgeschädigten Myozyten. Im Anschluss kommt es zu einer Verschärfung des Unterganges von Herzmuskelzellen sowie einer Vergrößerung der Infarktnarbe im Myokard¹³. In Korrelation mit diesen Erkenntnissen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Lipolyse in peripherem Fettgewebe durch Beta-Adrenozeptor-Antagonisten und folglich eine Reduktion des Angebotes an freien Fettsäuren an das Herz eine Verkleinerung der Infarktnarbe im Herzmuskel zur Folge hat¹⁸. Insgesamt beeinträchtigt das erhöhte Angebot an freien Fettsäuren durch vermehrte Lipolyse also die kontraktile Funktion des Herzens und behindert seine funktionelle Regeneration nach einer Myokardischämie.

1.1.3 Die inflammatorische Reaktion nach einem Myokardinfarkt

In der Mehrzahl der Fälle entsteht ein Myokardinfarkt auf dem Boden einer vorbestehenden Atherosklerose der Koronararterien. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronische inflammatorische Erkrankung, die zu einer Lipidakkumulation in der Gefäßwand führt. Anschließend werden Makrophagen rekrutiert, die die Lipide oxidieren und somit eine Reaktionskaskade mit Beteiligung verschiedener Immunzellen auslösen. Es kommt zur Ausbildung einer Plaque, die unter der anhaltenden Entzündung stetig wächst. Falls eine solche Plaque in einer Koronararterie rupturiert, kann dies zur Embolisation mit Verschluss der Arterie führen. Die Folge ist ein ischämischer Myokardinfarkt. Aufgrund des plötzlichen Verschlusses einer Koronararterie als wesentlicher pathogenetischer Mechanismus ist der Myokardinfarkt im Gegensatz zu der

Atherosklerose der Gruppe der akuten Entzündungen zuzuordnen. Da der Blutfluss in das Versorgungsgebiet einer Koronararterie durch ihren akuten Verschluss plötzlich unterbunden wird, können keine Kollateralen zur Kompensation des Perfusionsdefizites durch alternative Blutversorgung des betroffenen Areals ausgebildet werden. Folglich kommt es zu einer Nekrose der Myozyten in diesem Gebiet, wodurch eine sterile Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Dabei lässt sich die Inflammation nach einem akuten Myokardinfarkt in zwei Phasen unterteilen. Initial kommt es in den ersten 24 Stunden nach dem Infarkt zu einer massiven Akkumulation von neutrophilen Granulozyten¹⁹. Ihre Aufgabe besteht in der Phagozytose untergegangenen Zellmaterials und in der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren, bevor sie durch Apoptose untergehen. Angezogen von inflammatorischen und chemotaktischen Mediatoren, infiltrieren Monozyten vom proinflammatorischen Subtyp das infarzierte Myokard²⁰. Dieser Zelltyp dominiert die erste Phase der inflammatorischen Reaktion und verbleibt etwa die ersten drei Tage nach dem Infarkt in hoher Anzahl im ischämischen Myokard. Die vornehmliche Aufgabe der proinflammatorischen Monozyten besteht in der Entfernung nekrotischer Kardiomyozyten mit Hilfe von Phagozytose und Sekretion proteolytischer Enzyme^{19,20}. Auf diesen Prozess folgt etwa zwischen Tag vier und sieben nach dem Myokardinfarkt die antiinflammatorische Phase. In dieser Phase der Entzündungsreaktion verlassen die Monozyten des proinflammatorischen Subtyps das Infarktareal und werden durch Monozyten des antiinflammatorischen Subtyps ersetzt¹⁹. Ihre Funktion besteht in der Initiierung reparativer Prozesse im Infarktareal, indem sie den Vorgang der Angiogenese aktivieren und die Akkumulation von Myofibroblasten im betroffenen Areal bewirken²⁰. Diese Prozesse initiieren die Monozyten durch die Sekretion entsprechender Mediatoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *transforming growth factor-beta* (TGF-beta)¹⁹. Durch die Angiogenese können neue Kapillaren entstehen, die das infarzierte Myokard wieder mit sauerstoffreichem Blut versorgen, während die Myofibroblasten Kollagen synthetisieren und damit dem geschädigten Areal mehr Stabilität verleihen. Es entsteht das für heilende Wunden typische Granulationsgewebe. Damit sind die Monozyten der zweiten Phase nicht nur für die Ausbildung von Narbengewebe, sondern auch für die Beendigung der lokalen inflammatorischen Reaktion verantwortlich¹⁹.

Das Ausmaß der Entzündungsreaktion nach einem ischämischen Myokardinfarkt geht jedoch über die lokale Inflammation hinaus. Sie bewirkt zusätzlich systemische Veränderungen. Ein akuter Myokardinfarkt führt infolge von Stress, Schmerzen und akuter Linksherzinsuffizienz zu einer Aktivierung des Sympathikus⁶. Daraufhin bindet der sympathische Neurotransmitter Noradrenalin an Beta-3-Rezeptoren im Knochenmark, woraufhin hämatopoietische Progenitorzellen, die Vorläuferzellen der myeloiden Zellreihen, aus ihrer Knochenmarksnische mobilisiert werden. Diese Progenitorzellen gelangen über den Blutstrom zur Milz, welche extramedulläre Hämatopoiese betreiben kann. Dabei differenzieren die Vorläuferzellen zu Monozyten. Diese gelangen einerseits zum ischämischen Myokard, andererseits infiltrieren sie auf ihrem Weg durch das Gefäßsystem bereits bestehende atherosklerotische Plaques⁶. Wie die Arbeitsgruppe um Dutta et al. darstellen konnte, kommt es dadurch zur Progredienz einer vorbestehenden Atherosklerose. Dabei bestehen diese proinflammatorischen Veränderungen in den atherosklerotischen Plaques über mehrere Monate nach einem Myokardinfarkt fort, wodurch das Risiko für Komplikationen wie beispielsweise einem Re-Infarkt durch eine erneute Plaqueruptur in dieser Zeit erhöht ist.

1.2 Braunes Fettgewebe

1.2.1 Aufbau und Funktion des braunen Fettgewebes

Das Fettgewebe ist mesenchymaler Herkunft und lässt sich in drei Arten unterteilen: Man unterscheidet das univakuoläre weiße Fettgewebe von dem plurivakuolären braunen Fettgewebe und dem beigen Fettgewebe, welches Charakteristika der beiden erstgenannten Fettgewebsarten enthält und damit eine Mischform darstellt.

Das braune Fettgewebe ist gekennzeichnet durch seine kleinen plurivakuolären Adipozyten²¹, die sich durch ihren Reichtum an Mitochondrien in ihrem Zytoplasma auszeichnen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in den dicht gepackten Mitochondrien Auffaltungen ihrer inneren Membran zu zahlreichen Cristae zu erkennen, in denen sich das für das braune Fettgewebe

charakteristische *uncoupling protein 1* (UCP1) befindet²². Darüber hinaus ist das braune Fettgewebe stark vaskularisiert und innerviert. Immunohistochemische Färbungen implizieren, dass es sich bei den Nervenfasern um eintreffende sympathische und afferente sensible Fasern handelt, die das braune Fettgewebe ansteuern²². Dieses Innervierungsmuster stützt die allgemeine Auffassung, dass braunes Fettgewebe durch sympathische Einflüsse aktiviert wird²³. Eine ausgeprägte Vaskularisierung ist notwendig, damit Substrate wie freie Fettsäuren und Glukose sowie Sauerstoff in das braune Fettgewebe transportiert werden können²³. In den Adipozyten werden die Substrate verstoffwechselt, wobei Wärme als Produkt entsteht, die über die Kapillaren aus dem braunen Fettgewebe heraus transportiert und an die übrigen Organe verteilt werden kann²³.

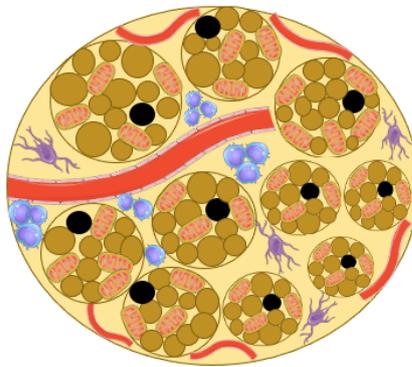


Abbildung 1 Schematischer Aufbau des braunen Fettgewebes

Charakteristisch für das braune Fettgewebe sind die plurivakuolären Adipozyten. Innerhalb der Adipozyten ist der Zellkern in schwarz dargestellt und die zahlreichen Mitochondrien in rot-braun. Blutgefäße sind in rot dargestellt, sympathische Neurone in lila und Immunzellen in blau.

Die Hauptaufgabe des braunen Fettgewebes ist der Erhalt der Körpertemperatur mittels zitterfreier Thermogenese²⁴. Hierbei wird die Atmungskette mit Hilfe des UCP1 entkoppelt, das Protonen von dem Intermembranraum der Mitochondrien in die mitochondriale Matrix pumpt. Dabei wird der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgehoben, der für die Synthese des universalen Energieträgers Adenosin triphosphat (ATP) benötigt wird. In der Folge wird stattdessen Energie in Form von Wärme freigesetzt. Dieser Mechanismus greift insbesondere in Situationen, in denen der Organismus Kälte ausgesetzt ist^{25,26}. In solchen Fällen wird das braune Fettgewebe durch

sympathische Efferenzen aktiviert, indem der Neurotransmitter Noradrenalin sezerniert wird und an Beta-3-Rezeptoren auf der Zelloberfläche brauner Adipozyten bindet. Dabei wird durch die Induktion einer Signalkaskade die Expression von UCP1 erhöht, wodurch die zitterfreie Thermogenese angeregt wird²³.

Darüber hinaus trägt das braune Fettgewebe durch die Metabolisierung von freien Fettsäuren und Glukose dazu bei, dass der Energieumsatz des Organismus in der Summe erhöht wird^{25,27}. Durch die Umsatzsteigerung und den Verbrauch an Fettsäuren und Glukose wird nicht nur eine Gewichtsabnahme unterstützt, sondern auch eine Verbesserung einer Insulinresistenz im Rahmen eines metabolischen Syndroms erzielt²⁴. Wegen seiner positiven Eigenschaften auf das Körpergewicht und den Metabolismus wird die Aktivierung von braunem Fettgewebe, wie in der Literatur mehrfach ausgeführt, als mögliches therapeutisches Mittel in der Behandlung von Adipositas sowie ihrer Folgeerkrankungen angesehen^{28,29}.

Aufgrund seiner vielfältigen positiven Einflüsse trägt das braune Fettgewebe zu einer Homöostase des Metabolismus im gesamten Organismus bei und kann seine Anpassungen an veränderte Umweltbedingungen - wie zum Beispiel eine Abkühlung der Umgebungstemperatur oder übermäßige Energiezufuhr mit der Nahrung - unterstützen. Diese Funktionen erfüllt es nicht nur bei kleinen Säugetieren und Säuglingen, sondern auch, wie erst vor kurzer Zeit entdeckt, bei erwachsenen Menschen^{30,31}. Cypess et al. konnten unter Anwendung einer Kombination von Positronenemissionstomographie und Computertomographie mit dem radioaktiv markierten Marker Fluordesoxyglukose (¹⁸F-FDG PET/CT) die Existenz von braunen Fettgewebsdepots in Erwachsenen nachweisen, die vornehmlich supraklavikular, zervikal und paravertebral lokalisiert waren. In Säuglingen und Mäusen ist ein bedeutendes Depot von braunem Fettgewebe hingegen interskapulär aufzufinden^{22,32}.

1.2.2 Die Interaktion von braunem Fettgewebe mit anderen Organen

Das braune Fettgewebe übt durch seinen Beitrag zur Wärmeerzeugung im Rahmen der zitterfreien Thermogenese und durch die Metabolisierung von Fettsäuren und Glukose einen Einfluss auf den systemischen Energieumsatz und

Stoffwechsel des Organismus aus. Darüber hinaus steht es in direkter, spezifischer Interaktion mit einer Vielzahl von einzelnen Organen.

Seine Effekte auf andere Organe übt das braune Fettgewebe vornehmlich über endokrine Mediatoren aus. Diese Mediatoren werden - in Anlehnung an Adipokine aus weißem Fettgewebe - „Batokine“ genannt. Über die Batokine *C-X-C motif chemokine ligand-14* (CXCL14) und Interleukin-6 (IL-6) bewirkt aktiviertes braunes Fettgewebe die lokale Invasion von Makrophagen des antiinflammatorischen M2-Subtypen^{33,34}, während es durch Sekretion von *growth-and-differentiation factor-15* (GDF-15) die Aktivität von proinflammatorischen M1 Makrophagen inhibiert³⁵. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass einige Komplementfaktoren wie beispielsweise die Faktoren D, B, C3 und C4b zum Sekretom des braunen Fettgewebes gehören³⁶. Damit kann dieser Fettgewebstyp durch Modulation von Teilen der angeborenen Immunantwort zu einer Limitation einer lokalen inflammatorischen Reaktion beitragen. Mit Hilfe des Faktors *bone morphogenic protein 8b* (BMP8b) wirken braune Adipozyten einerseits autokrin, wodurch andere Adipozyten für sympathische Einflüsse sensibilisiert werden und den Vorgang der Thermogenese aktivieren³⁷. Andererseits induziert BMP8b durch lokale und zentrale Wirkung angiogene Faktoren, sodass es eine Verbesserung der Perfusion von braunem Fettgewebe bewirkt^{30,34}. Das Ergebnis ist ein strukturelles *Remodeling* durch die Verbesserung von Innervation und Perfusion von braunem Fettgewebe mit dem Ziel, die Effektivität der zitterfreien Thermogenese zu steigern. Eine Schlüsselrolle unter den sezernierten Faktoren aus braunem Fettgewebe nimmt das pleiotrope Hormon *fibroblast growth factor 21* (FGF21) ein. Einerseits ist braunes Fettgewebe selbst ein Zielgewebe von FGF21 aus der Leber und Skelettmuskeln³⁸. Dabei induziert es den Vorgang der Thermogenese sowie die Glukoseaufnahme und -oxidation in braunem Fettgewebe. Andererseits stellt braunes Fettgewebe eine bedeutende Quelle für die Sekretion von FGF21 dar³⁹. Dieses wird infolge der Aktivierung von braunem Fettgewebe, beispielsweise im Rahmen einer akuten Kälteexposition, sezerniert und bewirkt die Aufnahme von Glukose in periphere Gewebe, sodass die allgemeine Glukosetoleranz des Organismus gesteigert wird³⁹. Darüber hinaus induziert FGF21 den Vorgang der Lipolyse in weißem Fettgewebe sowie die vermehrte Aufnahme von Lipiden in der Leber³⁹. Über die metabolischen Effekte

hinaus gibt es Hinweise darauf, dass FGF21 aus braunem Fettgewebe positive Auswirkungen auf das inflammatorische Geschehen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen hat⁴⁰. Dabei übt das FGF21 seinen antiinflammatorischen Effekt durch die Herabregulierung der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise der Interleukine 6 und 17 (IL-6, IL-17) aus. Außerdem scheint es eine Modulation der adaptiven Immunantwort mittels Inhibierung von T-Helferzellen vorzunehmen⁴⁰. Zuletzt konnte in neueren Studien festgestellt werden, dass braunes Fettgewebe mittels FGF21 im Rahmen einer hypertensiven Herzerkrankung kardioprotektive Effekte ausübt (siehe 1.2.3)⁴¹.

Zusätzlich zu den endokrinen Interaktionen scheint das braune Fettgewebe neuronale Verbindungen zu weißem Fettgewebe zu besitzen⁴². Demnach vermitteln die beiden Fettgewebsarten über sympathische Nervenfasern untereinander Informationen bezüglich des Energiebedarfes des Organismus und der Größe von Energiespeichern in weißem Fettgewebe. In Abhängigkeit dieser Kommunikation werden der Noradrenalinumsatz in braunem Fettgewebe und die Größe von weißen Fettgewebsdepots moduliert (Näheres siehe 4.3).

Vor dem Hintergrund dieser Ausführungen wird ersichtlich, dass das braune Fettgewebe in ein Netz von Interaktionen mit einer Vielzahl peripherer Organe verflochten ist. Dabei übt es modulierende Effekte auf metabolische und inflammatorische Prozesse anderer Organe aus.

1.2.3 Die Rolle von braunem Fettgewebe bei kardialen Erkrankungen

Über seine bisher beschriebenen, positiven metabolischen und antiinflammatorischen Effekte hinaus gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass braunes Fettgewebe eine wichtige Rolle im Rahmen von kardialen Erkrankungen spielt.

Kürzlich konnten kardioprotektive Eigenschaften von braunem Fettgewebe in einem Modell der catecholamininduzierten Herzinsuffizienz nachgewiesen werden⁴³. Dabei konnten Einflüsse von aktiviertem braunem Fettgewebe auf den Untergang von Myozyten, das Voranschreiten einer intrakardialen Fibrosierung und einer Hypertrophie des linken Ventrikels *in vivo* festgestellt werden. Diese Prozesse, die unter dem Begriff des kardialen *Remodelings* zusammengefasst

werden, treten infolge der chronischen Sympathikusaktivität und der konsekutiv vermehrt zirkulierenden Katecholamine im Rahmen einer Herzinsuffizienz auf. Auf lange Sicht verschlechtert sich durch diese strukturellen Veränderungen die kardiale Pumpfunktion, wodurch der Sympathikus wiederum stärker aktiviert wird. Diesen Teufelskreis kann aktiviertes braunes Fettgewebe durchbrechen, indem es die maladaptiven Prozesse des *Remodelings* limitiert.

Darüber hinaus kommt es auch im Rahmen einer hypertensiven Herzerkrankung zu einer Aktivierung von braunem Fettgewebe⁴¹. Auch bei diesem Krankheitsbild kann das braune Fettgewebe durch eine Reduktion von Linksherzhypertrophie und interstitieller Fibrosierung die kardiale Pumpfunktion verbessern und auf diese Weise die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz verhindern⁴¹. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die kardioprotektiven Effekte des braunen Fettgewebes bei einer vorliegenden hypertensiven Herzerkrankung auf die direkte Wirkung von FGF21 aus braunen Adipozyten auf das Herz zurückzuführen sind⁴¹. Damit moduliert das Batokin FGF21 nicht nur, wie unter 1.2.2 beschrieben, metabolische Vorgänge positiv, sondern trägt auch zu einer direkten Stärkung der kardiovaskulären Gesundheit bei^{33,41}.

Es ist bekannt, dass braunes Fettgewebe nicht nur im Rahmen einer hypertensiven Herzerkrankung und einer chronischen Herzinsuffizienz, sondern auch bei einem akuten Myokardinfarkt aktiviert wird⁴³. Bei diesem akuten Ereignis kommt es ebenfalls zu einer Sympathikusaktivierung. In der Folge wird eine Umstrukturierung des kardialen Gewebes induziert im Sinne einer Fibrosierung und einer Hypertrophie des Myokards. Neuere Studien konnten auch in diesem Zusammenhang kardioprotektive Eigenschaften des braunen Fettgewebes nachweisen, indem es eine Hypertrophie des linken Ventrikels verhindert und die Fibrosierung des Myokards nach einem milden Herzinfarkt reduziert⁴⁴. Als hierfür unter anderem verantwortliches Batokin wurde kürzlich das *12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid* (12,13-diHOME) identifiziert, welches die Zirkulation von Calcium-Ionen als elektromechanische Koppler verbessert⁴⁵. Zudem verwendet das braune Fettgewebe nach einem Myokardinfarkt vermehrt die infolge von verstärkter Lipolyse freigesetzten Fettsäuren als Substrat⁴⁴, wodurch die für das ischämisch vorgeschädigte Myokard ausgeprägte Lipotoxizität der freien Fettsäuren entschärft wird. Auch Glukose wird vermehrt durch das braune Fettgewebe metabolisiert, wodurch die Entwicklung einer

Glukoseintoleranz bis hin zu Diabetes mellitus Typ 2 nach einem Myokardinfarkt unterbunden wird⁴⁴. Diese Entwicklung wurde für den Langzeitverlauf nach einem Myokardinfarkt insbesondere bei übergewichtigen Menschen beobachtet⁴⁶. Weiterhin geben kürzlich erschienene Studien Hinweise darauf, dass braunes Fettgewebe günstige Auswirkungen auf inflammatorische Prozesse in peripheren Geweben wie dem viszeralen weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt ausübt^{44,47}. Somit nimmt das braune Fettgewebe nach einem Myokardinfarkt nicht nur direkten Einfluss auf die Umstrukturierungsvorgänge im Herzen, sondern auch indirekten Einfluss über seine günstigen metabolischen und antiinflammatorischen Eigenschaften in Interaktion mit anderen Geweben. Diese Interaktionen werden dabei vornehmlich durch die Beeinflussung der Genexpression in peripheren Geweben⁴⁴ sowie über Batokine⁴⁷, ähnlich wie unter 1.2.2 beschrieben, vermittelt. Neben den sympathisch vermittelten Einflüssen sind somit auch endokrine Mechanismen für die kardioprotektiven Eigenschaften des braunen Fettgewebes nach akutem Myokardinfarkt von Bedeutung.

1.3 Das weiße Fettgewebe

1.3.1 Aufbau und Funktion des weißen Fettgewebes

Das univakuoläre weiße Fettgewebe wird in zwei Kategorien unterteilt: In das subkutane und das viszerale weiße Fettgewebe. Das subkutane Fettgewebe bewirkt eine Wärmeisolierung des Organismus und verhindert Wärmeverluste nach außen. Das viszerale Fettgewebe hingegen umgibt innere Organe und ist für deren Polsterung, Stabilisierung und Schutz vor mechanischen Einflüssen zuständig⁴⁸. Die hauptsächliche Aufgabe von weißem Fettgewebe besteht in der Energiespeicherung bei -überschuss und der Energiebereitstellung während Hunger- und Fastenzeiten⁴⁹. So wird im Rahmen einer Nahrungskarenz durch die Wirkung des Sympathikus und Aktivierung von Enzymen wie der Hormonsensitiven Lipase (HSL) und der Adipozytentriglyceridlipase (ATGL) die Lipolyse in weißem Fettgewebe induziert⁴⁹. Als Endprodukt werden unveresterte Fettsäuren sezerniert, welche die Glukoseaufnahme in weiße Adipozyten im

Sinne eines negativen Feedbackmechanismus hemmen. Auf diese Weise wird eine Versorgung von Nervenzellen und Erythrozyten mit Glukose sichergestellt⁵⁰, während die Fettsäuren von anderen Organen zur Energiegewinnung metabolisiert werden können.

Das weiße Fettgewebe gilt außerdem als das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers. Im Rahmen seiner endokrinen Interaktionen übt es Einflüsse auf metabolische Prozesse aus und wirkt beispielsweise auf die Nahrungsaufnahme, die Blutdruckregulation sowie die Entstehung und das Wachstum von atherosklerotischen Plaques ein⁵¹. Zudem moduliert das weiße Fettgewebe mittels endokriner und parakriner Mechanismen immunologische Prozesse⁵¹ (siehe 1.3.2).

Das weiße Fettgewebe besteht zu einem großen Teil aus Adipozyten, die 40% der Zellen darstellen und über 90% des Volumens einnehmen⁵². Darüber hinaus enthält es mesenchymale Stammzellen und Präadipozyten sowie Fibroblasten, Endothelzellen und vaskuläre Zellen⁵³.

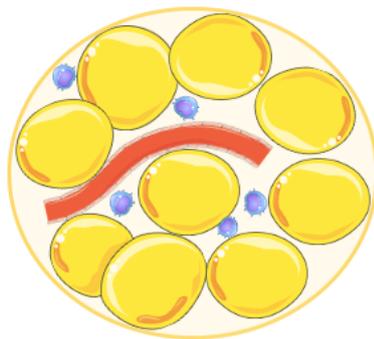


Abbildung 2 Schematischer Aufbau des weißen Fettgewebes

Charakteristisch für das weiße Fettgewebe sind die großen univakuolären Adipozyten mit dem randständigen Zellkern. In blau sind Immunzellen, in rot ein Blutgefäß schematisch dargestellt.

1.3.2 Das weiße Fettgewebe als endokrines Organ

Das weiße Fettgewebe wird als das größte endokrine Organ des menschlichen Körpers angesehen. Seine autokrinen, parakrinen und endokrinen Wirkungen gehen auf die Sekretion sogenannter Adipokine zurück. Mit Hilfe der Adipokine nimmt das weiße Fettgewebe hauptsächlich Einfluss auf metabolische und immunologische Prozesse.

Unterschieden wird zwischen proinflammatorischen Adipokinen wie Leptin und Resistin sowie antiinflammatorischen Adipokinen wie Adiponektin. Leptin wirkt proinflammatorisch, indem es die Zytokinproduktion, Makrophagen und CD4⁺ T-Helferzellen in peripheren Organen induziert⁵⁴. Durch seine zentrale Wirkung auf Neurone im Hypothalamus nimmt Leptin Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz des Organismus⁵⁵. So inhibiert Leptin eine Sekretion der appetitstimulierenden Neuropeptide *agouti-related peptide* (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY). In der Summe weist dieses Adipokin eine appetitzügelnde Wirkung auf. Es verringert die Nahrungsaufnahme. Während einer Nahrungskarenz und Abnahme von Energiereserven sinkt der Plasmaspiegel des Leptins hingegen. Daraufhin können AgRP und NPY aus dem Hypothalamus sezerniert werden, sodass ein Hungergefühl entsteht und die Nahrungsaufnahme gesteigert wird⁵⁶. Neben der Beeinflussung des Hungergefühls kann Leptin durch eine Sympathikusaktivierung den Blutdruck erhöhen und durch eine Entkopplung der Atmungskette die Thermogenese in braunem Fettgewebe steigern^{57,58}.

Das antiinflammatorische Adiponektin limitiert nicht nur lokale inflammatorische Prozesse, sondern wird auch mit einer positiven Regulation metabolischer Prozesse assoziiert⁵⁹. Beispielsweise induziert es in der Leber die Fettsäureoxidation, während es die hepatische Glukoneogenese inhibiert. Dadurch übt es einen protektiven Effekt für das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2 aus. Zudem stärkt es die Betazellfunktion im Pankreas und verbessert die periphere Insulinsensitivität. Interessanterweise konnten kürzlich kardioprotektive Eigenschaften dieses Adipokins festgestellt werden⁶⁰. Seine positiven Eigenschaften auf das Herz übt das Adiponektin demnach sowohl direkt durch Sicherung des Überlebens von Kardiomyozyten nach akuter Myokardischämie als auch indirekt durch Verbesserung einer Dyslipidämie und Limitation der Entzündungsprozesse nach einem Myokardinfarkt aus.

Die geweberesidenten Makrophagen im weißen Fettgewebe können darüber hinaus ebenfalls Mediatoren wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) und Interleukin 6 (IL-6) sezernieren⁵⁹. Mit Hilfe dieser Mediatoren beeinflussen Makrophagen zusätzlich parakrin den Adipozytenstoffwechsel. Ist die Zytokinsekretion der Makrophagen beispielsweise im Rahmen eines metabolischen Syndroms gestört, können konsekutiv Erkrankungen wie

Diabetes mellitus Typ 2, Autoimmunerkrankungen und Gefäßerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (KHK) resultieren⁵⁹.

1.3.3 Morphologische Veränderungen und Inflammation in weißem Fettgewebe im Kontext von Krankheiten

Das weiße Fettgewebe unterliegt einer Plastizität und durchläuft pathologische Veränderungen beim Vorliegen von Erkrankungen. Solche Veränderungen sind vor allem im Zusammenhang mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom beschrieben. Insbesondere das viszerale Fettgewebe ist von morphologischen und inflammatorischen Anpassungsreaktionen beim metabolischen Syndrom betroffen⁶¹. Als Speicherorgan für Lipide muss das viszerale weiße Fettgewebe die im Rahmen einer Adipositas überschüssig aufgenommene Energie mit der Nahrung zwischenspeichern. Indem die Fettsäuren in das Fettgewebe eingelagert werden, hypertrophieren die weißen Adipozyten bis zu einer kritischen Größe⁶¹. Daraufhin wird die Proliferation von Adipozyten angeregt, um die Speicherkapazität für Lipide zu erhöhen⁶¹. Somit kommt es im Anschluss an die Hypertrophie zu einer Hyperplasie der Adipozyten im weißen Fettgewebe. Diese morphologischen Veränderungen werden sowohl als Zunahme der Adipozytengröße als auch als Zunahme der Adipozytenanzahl messbar^{62,63}. Eine Abnahme der Adipozytengröße tritt analog auf, wenn beispielsweise durch eine Sympathikusaktivierung in Zuständen mit erhöhtem Energieverbrauch - wie in Fastenzeiten - die Lipolyse initiiert wird. Hierbei werden Fettsäuren aus den Adipozyten abgespalten und in die Zirkulation freigesetzt.

Darüber hinaus ist ein adipöser Phänotyp mit einer Zunahme inflammatorischer Prozesse in weißem Fettgewebe assoziiert⁶³. Dabei kommt es durch die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren zu einer chronischen Entzündung im Fettgewebe⁶⁴. Durch den erhöhten Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie MCP1 und zunehmende Apoptose werden Makrophagen angelockt. Diese infiltrieren das weiße Fettgewebe und polarisieren dort zum proinflammatorischen M1 Subtypen⁶⁵. Die polarisierten Makrophagen sezernieren wiederum Mediatoren wie TNF-alpha, IL-6 und iNOS⁶⁶. Diese Mediatoren stellen den Großteil der in weißem Fettgewebe produzierten Entzündungsfaktoren dar und locken weitere Immunzellen in das Fettgewebe,

sodass unter adipösen Bedingungen eine chronische unterschwellige Entzündung im viszeralen Fettgewebe aufrechterhalten werden kann.

Makrophagen im weißen Fettgewebe akkumulieren und lagern sich um apoptotische Adipozyten herum zusammen. Dabei entstehen Strukturen, die als *crown-like structures* (CLS) bezeichnet werden⁶⁷. Diese Strukturen können histologisch angefärbt und somit visualisiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Menge an akkumulierten Makrophagen mit dem Ausmaß der Entzündung in weißem Fettgewebe unter einem adipösen Phänotyp positiv korreliert^{67,68}.

Diese morphologischen und inflammatorischen Veränderungen des weißen Fettgewebes bei Adipositas tragen zur Krankheitsentstehung bei⁶³. Sie begünstigen die Ausbildung einer Insulinresistenz und somit die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II bis hin zum metabolischen Syndrom. Das metabolische Syndrom stellt einen wichtigen Risikofaktor für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Ob die beschriebenen pathologischen Veränderungen im viszeralen weißen Fettgewebe auch in direktem Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen stehen, ist bisher hingegen nicht bekannt.

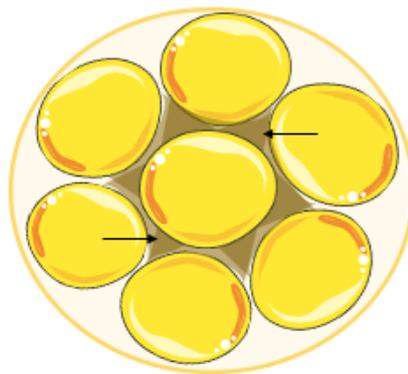


Abbildung 3 Schematische Darstellung von Crown-like structures

Im weißen Fettgewebe akkumulieren Makrophagen um apoptotische Adipozyten. Es entstehen *Crown-like structures* (in der Abbildung braun dargestellt, mit Pfeilen markiert), die aus Makrophagen bestehen und als histologisches Korrelat lichtmikroskopisch sichtbar werden.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Interorgankommunikation zwischen braunem und weißem Fettgewebe. Hierzu sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit eine Ablation des braunen Fettgewebes zu Modulationen der Morphologie, des Metabolismus und der Inflammation in viszeralem weißem Fettgewebe führt. Zu diesem Zweck wurden Mäuse untersucht, bei denen zuvor eine Myokardischämie und -reperfusion als Korrelat eines akuten Myokardinfarktes induziert wurde. Somit wird der Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das weiße Fettgewebe im Rahmen einer akuten kardiovaskulären Erkrankung betrachtet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Tabelle 1: Verwendete Substanzen

Substanz	Katalognummer	Firma
Roticlear	A538.5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	85033.360	VWR Chemicals, Radnor, USA
Hämalaun	1.09249.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotimount	HP68.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	071918-31	VWR Chemicals, Radnor, USA

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

Lösung	Katalognummer	Firma
NaOH	6771.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	P087.5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (96%)	UN1170	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (70%)	85825.360	VWR Chemicals, Radnor, USA

HCl (10%)	0710.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ (30%)	9681.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAB + Chromogen	DAB530	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Färbelösungen

Färbelösung	Ansatz
1% Eosin	1 g Eosin Y Dinatrium-Salz, 100 ml destilliertes Wasser, Katalognummer: 3137.1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Blockierlösung	10% 10xTBS, 10% FCS, 1% BSA auf <i>Aqua dest.</i>

Tabelle 4: Verwendete Puffer

Puffer	Ansatz
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM Na ₂ HPO auf <i>Aqua dest.</i>
10x TB	60,57 g Tris (MW 121,14 g/mol) auf 1 l <i>Aqua dest.</i> (pH 7,6)

2.1.3 Erstantikörper

Tabelle 5: Verwendete Erstantikörper

Zielstruktur	Beschreibung	Katalognummer	Firma
MAC2	Rat Anti-Mac2 Monoclonal AK	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada

2.1.4 Zweitantikörper

Tabelle 6: Verwendete Zweitantikörper

Färbung	Beschreibung	Katalognummer	Firma
MAC2	Goat Anti-Rat IgG2a HRP	NB7126	Novus Biologicals, Minneapolis, USA

2.2 Molekularbiologische Methode

2.2.1 Umschreibung von RNA

Tabelle 7: Verwendetes Kit zur Umschreibung von RNA in cDNA

Name und Beschreibung	Katalognummer	Firma
Quanti Tect® Reverse Transcription Kit - gDNA Wipeout Buffer - Quantiscript Reverse Transcriptase - Quantiscript RT Buffer - RT Primer Mix	205311	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2.2 Verwendete Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer

Untersuchtes Protein	Genbezeichnung	Sequenz
Hormon-sensitive Lipase	Lipe	3' → 5': GGGCTTCCAGTTCACACC TG 5' → 3': GAATCGGCCACCGGTAAA GA
Adipozytentriglycerid-lipase	PnPla	3' → 5': CTCCAAGGGGTGCGCTAT G 5' → 3': GAGGCGGTAGAGATTGCG AA
Fettsäuresynthase	Fasn	3' → 5': GACTCGGCTACTGACACG AC 5' → 3': CGAGTTGAGCTGGGTTAG GG
Acetyl-Coenzym-A-Carboxylase	Acaca	3' → 5': CCTCACCCAACCCAGAAA GG 5' → 3': AACCTGGCTCTGCCAACTA C

2.3 Geräte und Material

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Modell	Firma
Tissue-Tek (Verwendung für die Entwässerung)	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek GmbH, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Leica EG (Verwendung für das Einblocken der Proben in Paraffin)	Leica-EG1150	Leica, Wetzlar, Deutschland
Einbettkassetten	Biopsie LOT101806	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom	LEICA RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad	MEDAX 25900	MEDAX, Neumünster, Deutschland
Objektträger	SuperFrost®Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Färbekammer	Vertical Staining Jar	ThermoElectron, Waltham, Massachusetts, USA

Deckgläschen	24x60 mm	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Mikroskop	Axiostar plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Axiolmager.M2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Präparatkasten	5280723 275x185x40 mm	CEESEM, Marburg, Deutschland
Dissoziator	gentleMACS Dissociator®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfröhrchen	Eppendorf Tubes® 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfröhrchen	Eppendorf Safelock-Tubes® 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nanodrop-UV/VIS Spektrometer	NanoDrop 1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Cycler	Mastercycler® nexus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.4 Experimente im Mausmodell: Mauslinie und Behandlung

Die hier beschriebenen Versuche erfolgten nach den tierschutzrechtlichen Vorgaben nach §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2017.A458 genehmigt. Die Haltung sowie die Zucht der Versuchstiere erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dabei wurde jedes Tier unter standardisierten Bedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten.

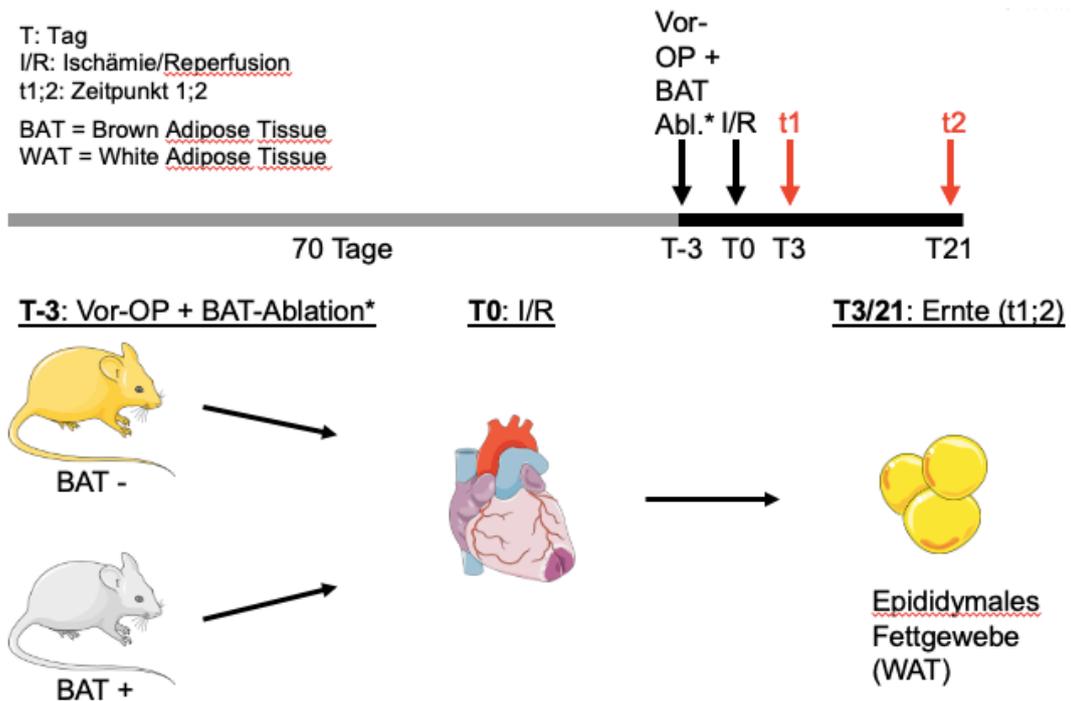
Für die vorliegende Dissertation wurden männliche Mäuse der Linie C57BL6/J (Janvier Labs, Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. In einem Alter von zehn Wochen wurde mit der Behandlung der Tiere begonnen, welche aus zwei Phasen operativer Intervention bestand. Dabei wurde in einem ersten Eingriff die Induktion einer Ischämie nach einem *Closed Chest* Modell vorbereitet. Alle Mäuse wurden mit Hilfe von intraperitoneal appliziertem Pentobarbital (8-10 µl/g Körpergewicht) narkotisiert, beatmet und auf einer Wärmeplatte fixiert. Während des Eingriffes wurde die Körpertemperatur mittels Rektalsonde kontinuierlich kontrolliert. Nach linkslateraler Thorakotomie wurde eine Ligatur um den absteigenden Ast der linken Koronararterie (*left anterior descending artery*, LAD) gelegt. Die Fadenenden wurden vor Verschluss des Hautschnittes in Muskeltaschen eingelagert. In einem anschließenden zweiten Eingriff wurde bei einem Teil der Tiere eine Ablation des interskapulären braunen Fettgewebes vorgenommen. Dazu wurden die noch narkotisierten Tiere auf dem Bauch gelagert und es erfolgte ein Hautschnitt zwischen den Schulterblättern. Nachdem der oberflächliche Anteil des braunen Fettgewebes entnommen worden war, wurde der Hautschnitt verschlossen. Bei der Kontrollgruppe wurde lediglich ein Hautschnitt durchgeführt, um eventuelle, von diesem Schnitt ausgehende Effekte bei den behandelten Tieren auszuschließen.

Nach einer Latenzzeit von drei Tagen erfolgte in der zweiten operativen Phase die Induktion einer Ischämie bei allen Mäusen. Dazu wurden zunächst EKG-Elektroden auf dem Thorax angebracht. Daraufhin wurden die Ligaturfäden aus

ihrem Lager mobilisiert, nach außen geführt, zusammengezogen und mit Hilfe von Klebestreifen am Untergrund fixiert, sodass die LAD verschlossen wurde. Unter laufender EKG-Kontrolle wurde die Ischämie für fünfundvierzig Minuten aufrechterhalten. Anschließend wurde die Fixierung der Fäden gelöst und die Phase der Reperfusion eingeleitet.

Zweiundsiebzig Stunden beziehungsweise drei Wochen nach der Ischämie wurden die benötigten Gewebeprobe aus den Mäusen entnommen. Dabei wurde das viszerale epididymale Fettgewebe beider Seiten, welches der Gruppe des weißen Fettgewebes zuzuordnen ist, entnommen.

Die Voroperation sowie die Induktion der Ischämie wurden von Frau Dr. Simone Gorreßen vorgenommen. Die Ablation des braunen Fettgewebes erfolgte durch Herrn Arne Beran. Ich habe im Rahmen meiner FELASA B Zertifizierung die Probenentnahme des weißen Fettgewebes sowie die Aufarbeitung des Gewebes für die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt.



* Vor-Operation durch Frau Dr. Simone Gorreßen und BAT-Ablation durch Herrn Arne Beran mit freundlicher Genehmigung und Nutzung der Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abbildung 4 Aufbau der Versuchsreihe und Behandlung der Tiere

Männliche Wildtyp-Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen einer operativen Behandlung unterzogen (T-3). Dabei wurde in einer Vor-Operation nach dem *Closed Chest* Modell eine Ligatur um den vorderen absteigenden Ast der linken Koronararterie gelegt. In einem zweiten Schritt wurde einem Teil der Tiere das interskapuläre braune Fettgewebe operativ entfernt. Drei Tage (T0) nach der Vor-Operation wurde unter laufender EKG-Kontrolle für 45 Minuten eine Myokardischämie induziert. Drei Tage (T3) beziehungsweise drei Wochen (T21) nach der Ischämie wurde den Tieren nach der Tötung das viszerale weiße Fettgewebe chirurgisch entfernt und für die weiteren Versuche aufgearbeitet. Für Details siehe Text.

2.5 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Nachdem das viszerale Fettgewebe aus der Maus entnommen worden war, wurde es für 24 Stunden in vierprozentiger Formaldehyd-Lösung gelagert, anschließend in einfach konzentriertes PBS überführt und entwässert. Es folgte die Einbettung in Paraffin.

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe des Mikrotoms in einer Schnittdicke von 5 μm geschnitten. Dabei wurden drei Ebenen, die jeweils einen Abstand von 300 μm zueinander hatten, auf insgesamt zwanzig Objektträgern angefertigt. So enthielt ein Objektträger drei Ebenen einer Probe, wobei die Objektträger konsekutiv aufeinander folgten. Die aufgezogenen Schnitte trockneten über Nacht bei Raumtemperatur und wurden am Folgetag für eine Stunde bei 60°C hitzefixiert. Die Schnitte wurden bis zum Zeitpunkt einer Färbung in Präparatekästen gelagert.

Nachfolgend wurde das viszerale Fettgewebe in einer Hämalaun-Eosin Färbung und auf MAC2 gefärbt. Die entsprechenden Protokolle werden nachstehend erläutert.

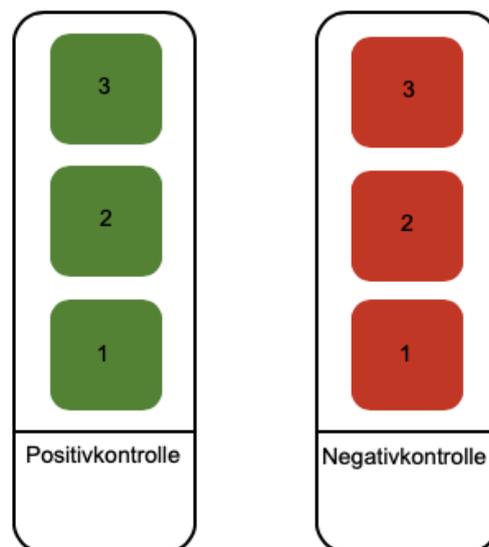


Abbildung 5 Schnittschema des viszeralen Fettgewebes

Schematisch dargestellt ist die Anordnung der Schnitte von viszeralem weißem Fettgewebe auf einem Objektträger. Ein Objektträger enthält drei Ebenen (Zahlen 1-3) von einer Fettgewebsprobe.

2.5.1 Immunhistochemische Färbungen

Um färbebedingte Schwankungen in den Intensitäten zu vermeiden und die Vergleichbarkeit zu erhöhen, wurden die Färbungen an den Gewebeproben aller Tiergruppen an einem Tag unter Einsatz der gleichen Lösungen, Antikörperkonzentrationen und Substanzen durchgeführt.

Da alle Gewebe in Paraffin eingebettet waren, war die Behandlung der Schnitte zu Beginn aller Färbungen gleich. Die Vorbehandlung umfasst die Schritte des Entparaffinierens und der Aufwässerung. Dazu wurden die Schnitte unter dem Abzug dreimal für je 15 Minuten in Roticlear gewaschen und anschließend für je zwei Minuten mit einer absteigenden Ethanolreihe behandelt. Dafür wurde Ethanol in absteigenden Konzentrationen verwendet (Ethanol absolut, 96% Ethanol und 70% Ethanol).

2.5.2 H&E Färbung

Nach dem Schritt des Aufwässerns mit Hilfe des Ethanols wurden die Schnitte für die H&E Färbung zweimal für je fünf Minuten in einfach konzentriertem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine einminütige Inkubation in Hämalan, woraufhin die Schnitte zunächst kurz in Leitungswasser und dann in 1% HCl getaucht wurden. Daran schloss sich ein Bläuungsschritt für zehn Minuten unter fließendem kaltem Leitungswasser an. Es folgte ein Eintauchen in 1% Eosin für eine Minute. Abschließend wurden die Schnitte für je zwei Minuten mittels Ethanolösungen aufsteigender Konzentration (70%, 96%, Ethanol absolut) entwässert und für fünf Minuten in Roticlear gewaschen. Nachdem die Roticlearreste um das Gewebe herum mit einem Kosmetiktuch entfernt worden waren, wurden die Schnitte mit Rotimount unter dem Abzug eingedeckt.

2.5.3 MAC2 Färbung

Nach der Entparaffinierung und dem Aufwässern wurden die Schnitte für die MAC2 Färbung dreimal für je fünf Minuten in einfach konzentriertem PBS gewaschen. Daraufhin folgte eine Behandlung mit einer Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Reste der Blockierlösung

um das Gewebe herum mit einem Kosmetiktuch von dem Objektträger abgewischt und der Erstantikörper wurde direkt auf das Gewebe pipettiert. Dazu wurde der Antikörper in einer Konzentration von 1:400 in 1%BSA/1xPBS verdünnt. Auf die Negativkontrolle, bestehend aus einem zusätzlichen Objektträger einer Maus, wurde 1%BSA/1xPBS ohne Antikörper gegeben. Die Schnitte inkubierten über Nacht in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 4°C.

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimal für je fünf Minuten in einfach konzentriertem PBS gewaschen. Es folgte ein Blockierschritt, bei dem die Objektträger für fünf Minuten in dreiprozentiges H₂O₂ gestellt wurden. Daran schloss sich erneut ein dreimaliger Waschschrift mit PBS an.

Anschließend wurde der Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in PBS auf alle Gewebeproben pipettiert. Die Schnitte inkubierten hierbei für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Ungebundene Antikörperreste wurden durch erneutes Waschen in PBS (dreimal für je fünf Minuten) ausgewaschen.

Im Rahmen der nachfolgenden Detektion wurden die Schnitte für zehn Minuten in TB gewaschen. Die eigentliche Detektion fand mit Hilfe von DAB (4 ml DAB Chromogen auf 80 ml DAB-Substrat) statt. Die Reaktion mit dem DAB wurde durch erneutes Überführen und fünfminütiges Lagern in TB gestoppt. Die Detektion wurde mit einem Waschschrift für eine Minute in destilliertem Wasser beendet.

Abschließend wurde eine Kernfärbung mit Hilfe von Hämalaun durchgeführt. Nach einminütiger Einwirkzeit wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser und 1% HCl gewaschen. Es schloss sich ein Bläuungsschritt für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser an. Nach einem letzten Waschschrift für eine Minute in destilliertem Wasser konnte eine Entwässerung vorgenommen werden. Dazu wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% Ethanol, 96% Ethanol und Ethanol absolut für je zwei Minuten) behandelt. Nachdem die Schnitte für fünf Minuten in Roticlear gewaschen und die Reste mit einem Kosmetiktuch entfernt worden waren, erfolgte das Eindecken mit Rotimount unter dem Abzug.

2.6 Genexpressionsanalyse

Um die Expression einzelner Lipolysemarker auf molekularer Ebene zu analysieren, wurde eine Isolation von Gesamt-RNA in Form einer Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem weißen Fettgewebe durchgeführt. Dafür wurden Fettgewebeproben verwendet, die 72 Stunden und drei Wochen nach Ischämie aus den Versuchstieren entnommen wurden. Es wurde jeweils die Hälfte einer viszeralen Fettgewebeprobe verwendet. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme aus der Maus in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen Fettgewebeproben wurden jeweils mit 1 ml Trizol versetzt und mit Hilfe des *gentleMACS Dissociater*[®] Systems (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) mechanisch zerkleinert. Nach Zentrifugieren für eine Minute bei 3000 rpm wurde das Lysat vollständig in ein Eppendorfröhrchen überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die Röhrchen wurden invertiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 20°C und einer Geschwindigkeit von 15000 rpm. Nach dem Zentrifugieren war eine deutliche Phasentrennung in eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine aufliegende wässrige RNA-haltige Phase sichtbar. Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein weiteres Eppendorfröhrchen pipettiert und zum Ausfällen der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt. Das Volumen des Isopropanol war dabei äquivalent zu dem Volumen der wässrigen Phase. Die Proben wurden vollständig durchmischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 15000 rpm erneut zentrifugiert. In einem darauf folgenden Waschschrift wurde der wässrige Überstand abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Nachdem eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 15000 rpm erfolgt war, wurde der Überstand erneut abgesaugt. Das Pellet wurde bei 65°C getrocknet, bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem, gefiltertem Wasser gelöst und für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und unmittelbar hinsichtlich der Menge an vorhandener RNA gemessen. Die Messung der Konzentration und

Reinheit der RNA (Quotient aus 260nm/280nm) erfolgte mit Hilfe des Nanodrop-UV/VIS Spektrometers (Nanodrop, Peqlab, Erlangen).

Die Proben mit der isolierten RNA wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde eine Umschreibung in cDNA vorgenommen. Die Umschreibung der Gesamt-RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung des *Quanti Tect® Reverse Transcription Kit* der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland). Dabei wurden pro analysierter Probe 1000 ng RNA in cDNA umgeschrieben.

Mit Hilfe der erhaltenen cDNA wurde eine quantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion (qPCR) hinsichtlich der Expression der Lipolysemarker Hormon-sensitive Lipase und Adipozytentriglyceridlipase sowie hinsichtlich der Fettsäuresynthesemarker Fettsäuresynthase und Acetyl-Coenzym A-Carboxylase durchgeführt.

2.7 Auswertung

2.7.1 Länge, Körper- und Probengewicht

Unmittelbar nach der Tötung wurden die Tiere gewogen und es wurde die Endlänge bestimmt. Nach Entnahme der Gewebeprobe wurde das Gewicht einer epididymalen Fettgewebsprobe für jedes Tier erhoben.

In der nachfolgenden Auswertung wurde das Verhältnis von Fettgewebsgewicht zu dem Körpergewicht für alle Tiere bestimmt.

2.7.2 Auswertung mit der Fiji Software

Für die Auswertung der histologisch aufgearbeiteten Proben wurde ein Makro verwendet, das mit Hilfe der *Fiji* Software (Schindelin et al. *Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods.* 2012 (9): 676-682.) und der *BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox* (BioVoxel, Mutterstadt) programmiert wurde. Durch die Verwendung des Makros war eine halbautomatische Auswertung möglich, wodurch Fehler bei der Auswahl der Adipozyten vermieden und insgesamt eine größere Anzahl an Adipozyten in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. So ließ sich eine Minimierung des systematischen Fehlers bei der Auswertung erreichen.

Zunächst wurde das Mikroskopbild einer Probe manuell in Fiji eingefügt und mit Hilfe des *Bio formats plugin* in drei Farbkanäle (c=0-2) aufgetrennt. Für die weitere Auswertung wurde der Farbkanal c=1 ausgewählt und das Makro gestartet. Durch die einzelnen Funktionen des Makros wurde das Bild automatisch in mehreren Schritten optimiert. Auf die Korrektur von Bildartefakten, die beispielsweise aufgrund von mehreren Lichtquellen im Raum während des Mikroskopierens entstehen, folgte eine Anhebung des Kontrastes, um die filigranen Adipozytengrenzen deutlicher hervorzuheben. Durch weitere Funktionen wurden das Hintergrundrauschen des Bildes reduziert, kleine Lücken im Hintergrund aufgefüllt und angrenzende Objekte deutlich voneinander separiert. Daraufhin folgte eine erste manuelle Überprüfung des Bildes, bei der defekte Adipozyten und Paraffinrisse im Schnitt erkannt und eliminiert werden konnten. Es schloss sich die erste Auswertung des Bildes an, indem die zu

untersuchenden Adipozyten durch das Makro erfasst und gezählt wurden. Anschließend wurde eine Invertierung des Hintergrundes vorgenommen, um die einzelnen Zellen und eventuelle Risse in den Membranen der Adipozyten besser darzustellen. In einem zweiten manuellen Auswertungsschritt wurden defekte Adipozytenmembranen korrigiert und die Auswertung abgeschlossen. Abschließend wurden die erhobenen Daten angezeigt, die sich aus der Anzahl und Größe der einzelnen Adipozyten sowie der Gesamtfläche und durchschnittlichen Größe der Adipozyten in dem Mikroskopbild zusammensetzten. Die Daten konnten manuell abgespeichert und für die weitere Auswertung mittels *Excel* verwendet werden.

2.7.3 Viszerales Fettgewebe

Um Einflüsse einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Morphologie und Inflammation des weißen Fettgewebes festzustellen, wurden anhand von HE- und MAC2-gefärbten Schnitten die Adipozytengröße und die Anzahl an Makrophagen im weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes und Kontrolltieren bestimmt.

Die Schnitte wurden unter Anwendung der *Axiovision Software* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mikroskopiert. Dabei wurden Aufnahmen bei gleicher Belichtungszeit, Raumhelligkeit und Vergrößerung angefertigt. Für die H&E Färbung wurden jeweils drei exemplarische Bilder pro Schnitt in zwanzigfacher Vergrößerung aufgenommen, während für die MAC2 Färbung drei Aufnahmen pro Schnitt in zehnfacher Vergrößerung angefertigt wurden.

Um eine unbewusste Beeinflussung zu vermeiden und die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, erfolgten das Mikroskopieren und die Auswertung zu jeder Zeit verblindet und jeweils an einem Tag.

2.7.4 Adipozytengröße

Für die Bestimmung der Adipozytengröße wurde das unter 2.7.2 beschriebene Makro verwendet. Randständige und zerrissene Adipozyten sowie Risse im Paraffinblock wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Anschließend wurden die ermittelten Adipozytengrößen der einzelnen Fettzellen in *Excel*

weiterverarbeitet und anhand ihrer Größe (in μm^2) klassifiziert. Um eine bessere Veranschaulichung zu erzielen, wurde zusätzlich die prozentuale Verteilung der einzelnen Größen berechnet. Anschließend wurden die totale Anzahl und die prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen in *GraphPad Prism 8.4* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) eingetragen und als Graphen dargestellt.

2.7.5 Crown-like structures

Um das Vorkommen von Makrophagen im viszeralen Fettgewebe zu ermitteln, wurde die Anzahl der *Crown-like structures* (CLS) als bildmorphologisches Korrelat von Makrophagen manuell pro Bild der MAC2-gefärbten Schnitte ausgezählt. Randständige und zerrissene CLS wurden dabei von der Auswertung ausgenommen. Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Behandlungsgruppen wurde das Vorkommen von CLS auf eine Anzahl von 100 Adipozyten bezogen. Der entsprechende Graph für diese Daten wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism* erstellt.

2.7.6 Genexpression: Auswertung mit dem Nanodrop

Die Menge an isolierter RNA aus dem weißen Fettgewebe wurde mit Hilfe des Nanodrop gemessen. Dazu wurde das Gerät mit 1,5 μl RNase-freiem Wasser als Leerwert kalibriert. Von den Proben mit der gelösten RNA wurden jeweils 1,5 μl auf die Sensoren des Gerätes gegeben. Die quantitative Messung an isolierter RNA erfolgte mittels Spektralphotometrie durch das Programm des Nanodrop. Die erhaltenen Daten wurden in *GraphPad* eingetragen und als Graph dargestellt.

2.7.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe der Statistik-Software *GraphPad Prism 8.4* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Statistische Ausreißer wurden mit dem *Grubb's Test* ermittelt. Die bereinigten Datensätze wurden abhängig davon, ob eine Normalverteilung vorlag oder nicht, mittels ungepaartem, doppelseitigem t-Test oder nicht-parametrischem *Mann-Whitney*

Test auf Signifikanz hin getestet. Die beiden Datensätze zum Vergleich der Adipozytengröße nach 72 Stunden beziehungsweise drei Wochen nach Ischämie zwischen behandelten Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes und Kontrolltieren wurden mittels *Two-way ANOVA* auf Signifikanz getestet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Wert von $P < 0,05$ angenommen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf den Metabolismus im weißen Fettgewebe im Modell des Myokardinfarktes

3.1.1 Einfluss auf das Körpergewicht und auf das Gewicht des weißen Fettgewebes

Um einen grundsätzlichen Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf den metabolischen Umsatz im Gesamtorganismus und im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden das Körpergewicht und das Gewicht des weißen Fettgewebes erhoben. Dazu wurden die Tiere unmittelbar nach der Tötung gewogen. Das Gewicht des viszeralen Fettgewebes wurde unmittelbar nach Entnahme aus der Maus unilateral gemessen. Am Ende der Versuchsreihe konnte zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Myokardischämie kein Unterschied bezüglich des Körpergewichtes zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden ($p = 0,88$) (Abbildung 5A). Jedoch zeigten Tiere mit einer Ablation zu dem gleichen Zeitpunkt tendenziell ein höheres Gewicht des weißen Fettgewebes auf als die Kontrolltiere, wobei dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant ausfiel ($p = 0,16$) (Abbildung 5B).

Um den Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des weißen Fettgewebes nach Myokardischämie genauer evaluieren zu können und die Vergleichbarkeit zwischen den beiden Behandlungsgruppen zu erhöhen, wurden das Gewicht des weißen Fettgewebes und das Körpergewicht in Relation zueinander gesetzt. So konnte festgestellt werden, welchen Anteil das weiße Fettgewebe an dem Körpergewicht bildete. Dabei stellte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Verhältnisses von dem Gewicht des weißen Fettgewebes zu dem Körpergewicht zwischen den beiden Behandlungsgruppen heraus (Abbildung 5C). Jedoch war eine Tendenz dahingehend sichtbar, dass Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes im

Verhältnis zu ihrem Körpergewicht ein schwereres viszerales Fettgewebe besaßen als Tiere mit erhaltenem braunem Fettgewebe ($p = 0,21$).

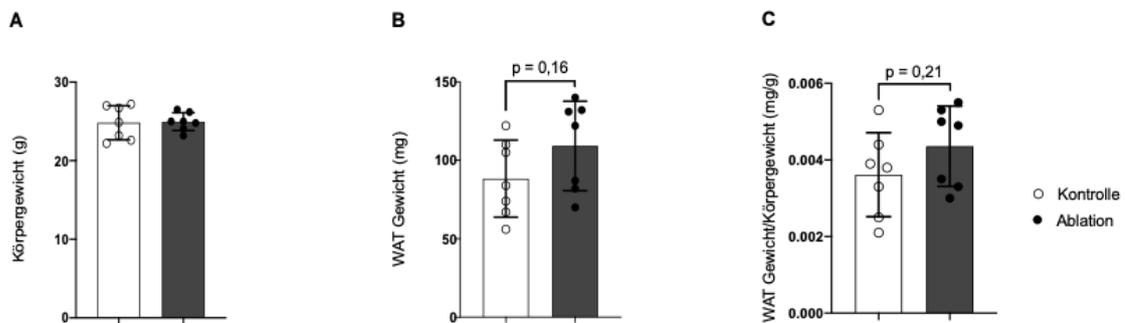


Abbildung 6 Kein Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des weißen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. 72 Stunden nach Induktion einer Myokardischämie wurden (A) das Körpergewicht (g), (B) das Gewicht des weißen Fettgewebes (mg) und (C) das Verhältnis von dem Gewicht des weißen Fettgewebes zu dem Körpergewicht (mg/g) bestimmt. Mittelwerte \pm SD, (A) $n = 7,7$; (B) $n = 7,7$; $p < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

3.1.2 Einfluss auf die Morphologie von Adipozyten im weißen Fettgewebe

Um sowohl den kurzfristigen als auch den langfristigen Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Adipozytengröße im weißen Fettgewebe auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurden, wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, epididymale Fettgewebeproben aus Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes und aus Kontrolltieren entnommen. Zur Analyse eines möglichen kurzfristigen Effektes wurde viszerales Fettgewebe untersucht, das 72 Stunden nach Induktion der Myokardischämie entnommen worden war. Für die Charakterisierung eines langfristigen Einflusses auf die Adipozytengröße wurden viszerale Fettgewebeproben analysiert, die drei Wochen nach Myokardischämie aus den Versuchstieren entnommen worden waren.

Dazu wurde von dem epididymalen Fettgewebe eine HE Färbung angefertigt. Mit Hilfe des unter 2.7.2 beschriebenen Makros konnte eine Auswertung hinsichtlich der durchschnittlichen Adipozytengröße erfolgen (Abbildung 6). Dabei war festzustellen, dass Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardinfarkt eine signifikant größere durchschnittliche Adipozytenfläche (in μm^2) als die Kontrolltiere aufwiesen ($P = 0,02$) (Abbildung 6A). Dieser Effekt war auch drei Wochen nach Ischämie zu beobachten. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine Tendenz dahingehend, dass Tiere mit Ablation durchschnittlich größere Adipozyten hatten als die Kontrolltiere (Abbildung 6B). Dieser Zusammenhang war zu dem Zeitpunkt drei Wochen nach Infarkt jedoch nicht signifikant ($p = 0,22$).

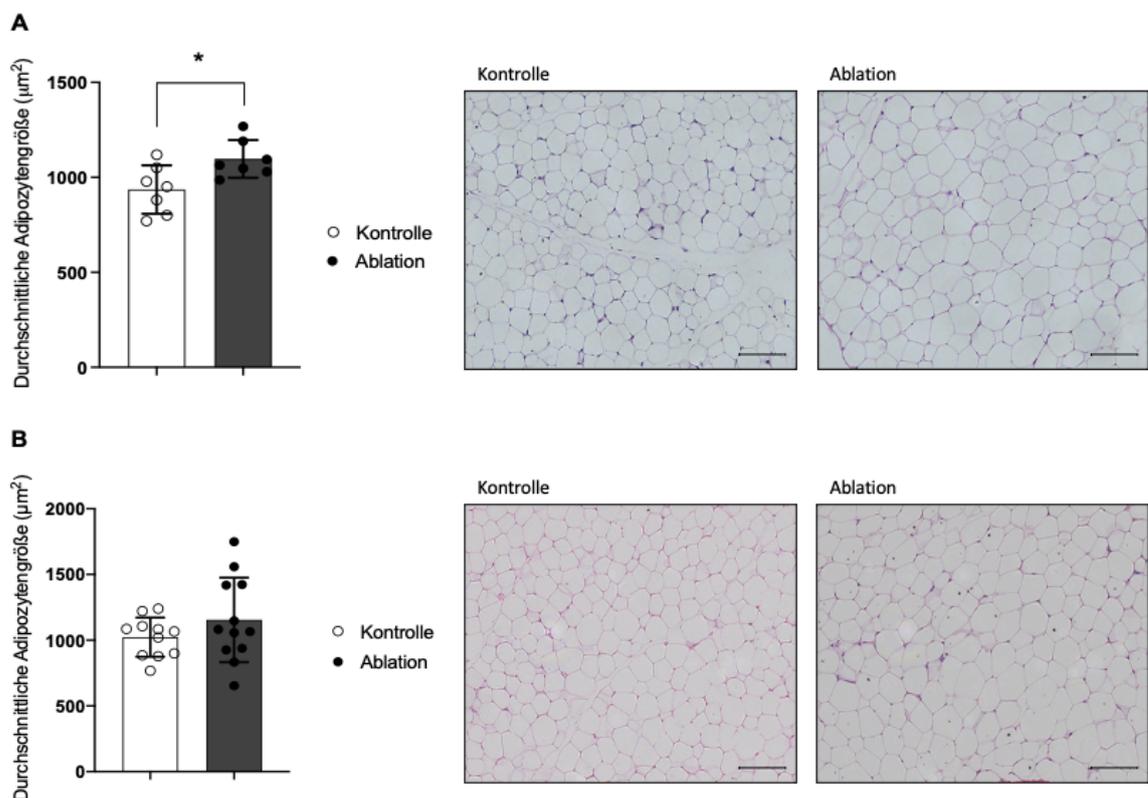


Abbildung 7 Durchschnittlich größere Adipozyten bei Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Es sind die durchschnittlichen Adipozytenflächen (μm^2) mit repräsentativen Mikroskopbildern des epididymalen Fettgewebes in HE Färbung von Mäusen (**A**) 72 Stunden und (**B**) drei Wochen nach Myokardischämie dargestellt. Maßstabsbalken: 100 μm , 20x Vergrößerung, Mittelwerte \pm SD, (**A**) $n = 7,7$; (**B**) $n = 11,12$; $*P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

Um die Größenverteilung der Adipozyten in den beiden Behandlungsgruppen weitergehend zu analysieren, wurden die einzelnen Adipozytenflächen nach Größenkategorien geordnet. Neben der Darstellung der absoluten Anzahl an Adipozyten in den einzelnen Größenkategorien je Fettgewebsprobe wurde zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden Behandlungsgruppen eine prozentuale Darstellung erstellt (Abbildung 7). Dabei ist der Anteil einer jeweiligen Größenkategorie an der Gesamtzahl an Adipozyten in einer Fettgewebsprobe dargestellt. Sowohl in der absoluten als auch in der relativen Verteilung der Adipozytenflächen war bei Mäusen mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie eine Größenverschiebung dahingehend festzustellen, dass bei solchen Tieren im Gegensatz zu der Kontrollgruppe große Adipozyten häufiger und kleine Adipozyten seltener vorkamen (Abbildung 7A). Nach drei Wochen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich der Adipozytengrößen nachgewiesen werden. Lediglich in der prozentualen Verteilung war ein entsprechender Trend zu beobachten, dass Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes anteilig mehr große und weniger kleine Adipozyten aufwiesen als Tiere mit erhaltenem braunem Fettgewebe (Abbildung 7B). Dieser Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen war statistisch jedoch nicht signifikant.

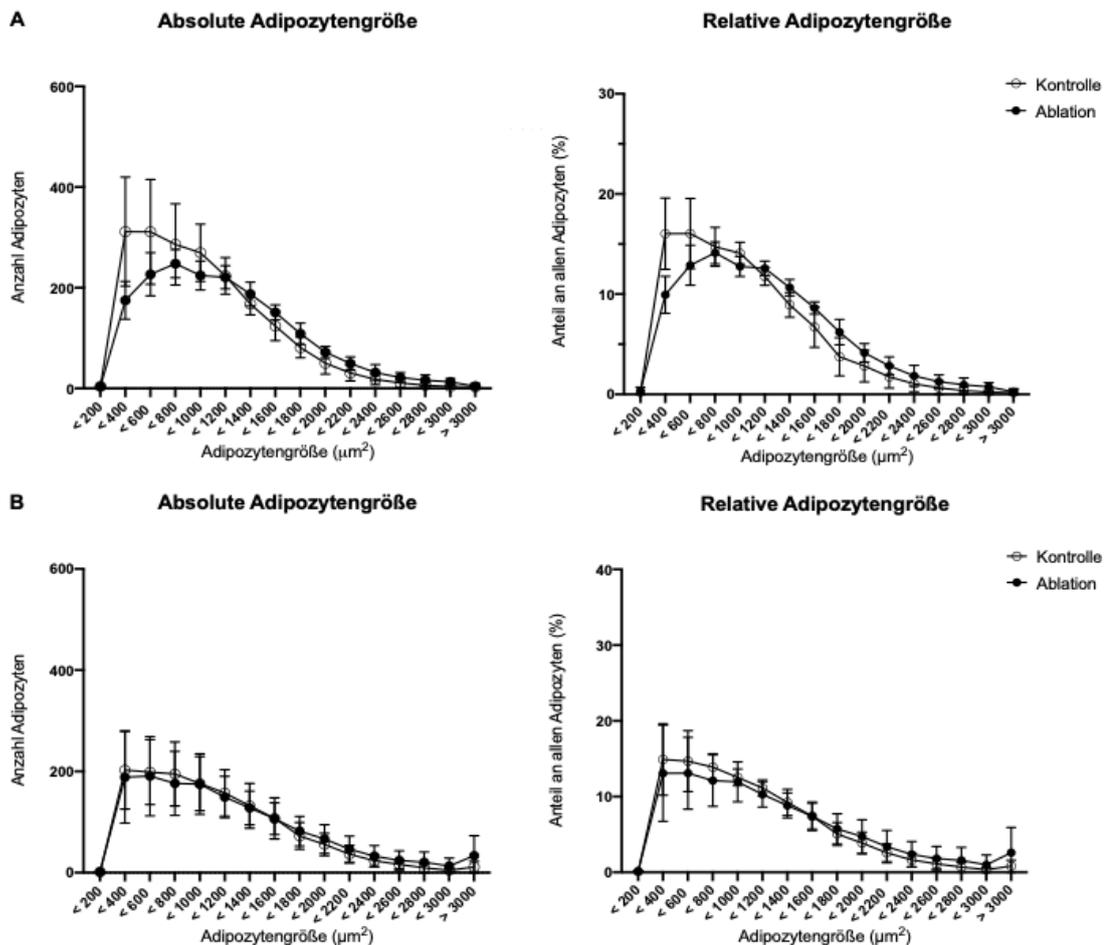


Abbildung 8 Absolut und anteilig weniger kleine und mehr große Adipozyten im weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Es sind die absolute und die prozentuale Verteilung der Adipozytengröße in epididymalem Fettgewebe von Mäusen (A) 72 Stunden und (B) drei Wochen nach Myokardischämie dargestellt. Mittelwerte \pm SD, (A) $n = 7,7$; (B) $n = 11,12$; $*P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgt mit Hilfe einer *Two-Way ANOVA*.

3.1.3 Einfluss auf die Adipozytenanzahl im weißen Fettgewebe

Um zu untersuchen, ob die Zunahme der Adipozytengröße bei Ablation des braunen Fettgewebes von einer Veränderung der Adipozytenanzahl im viszeralen weißen Fettgewebe begleitet ist, wurde die Anzahl der Adipozyten in einer Fettgewebsprobe kumulativ bestimmt. Diese konnte zusammen mit der Adipozytengröße mit Hilfe des Makros ermittelt werden. Weder in der frühen

Phase der Reperfusion nach 72 Stunden noch in der späten Reperusionsphase drei Wochen nach Myokardischämie war ein Unterschied zwischen den Fettgewebsproben von Tieren mit und ohne braunem Fettgewebe hinsichtlich der Adipozytenanzahl festzustellen ($p = 0,44$ bzw. $p = 0,79$) (Abbildung 8A,B). Demnach kamen durchschnittlich vergleichbar viele Adipozyten in den Gewebeproben beider Behandlungsgruppen vor. Die Unterschiede bezüglich der Adipozytengröße zwischen abladierten und nicht-abladierten Tieren ging dementsprechend nicht mit einer Veränderung der Adipozytenanzahl im weißen Fettgewebe einher.

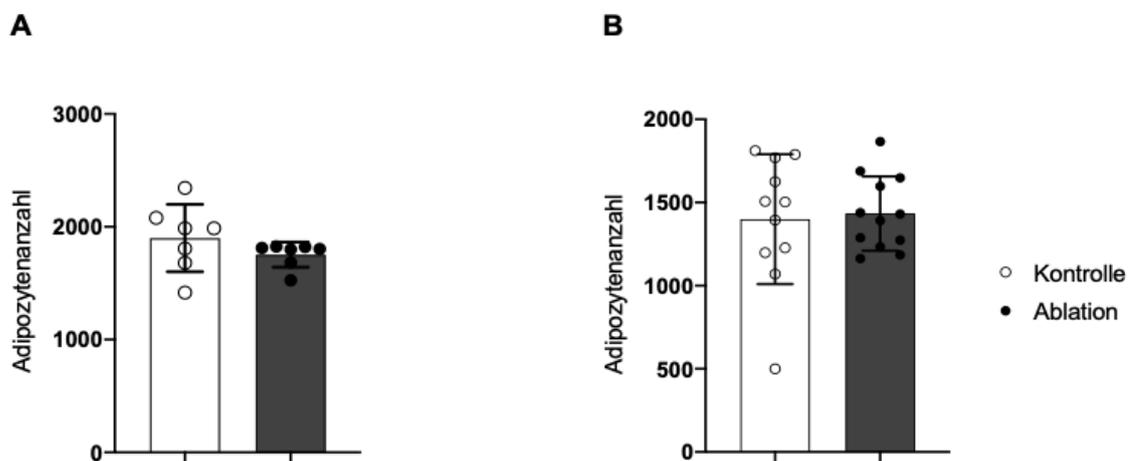


Abbildung 9 Kein Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Adipozytenanzahl im weißen Fettgewebe nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Dargestellt ist die absolute Anzahl an Adipozyten in einer Fettgewebsprobe auf einer Fläche von $378267 \mu\text{m}^2$ ($710,52 \mu\text{m} \times 532,38 \mu\text{m}$) von Mäusen (**A**) 72 Stunden und (**B**) drei Wochen nach Myokardischämie. Mittelwerte \pm SD, (**A**) $n = 7,7$; (**B**) $n = 11,12$; $p < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in (**A**) mit Hilfe des *Mann-Whitney test* und in (**B**) mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

3.2 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Genexpression im weißen Fettgewebe

Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu eruieren, die die Unterschiede hinsichtlich der Adipozytengröße im weißen Fettgewebe bei fehlendem und erhaltenem braunem Fettgewebe nach Myokardischämie bedingen, wurden die unter 3.1.2 gewonnenen Ergebnisse um Genexpressionsanalysen aus dem weißen Fettgewebe beider Versuchsgruppen ergänzt. Aus dem Fettgewebe sowohl von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes als auch von Mäusen ohne Ablation, das 72 Stunden beziehungsweise drei Wochen nach Ischämie entnommen worden war, wurde RNA isoliert. Mit Hilfe dieser konnte im weiteren Vorgehen, wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben, die Expression von den Lipolysemarkern Hormon-sensitive Lipase (*Lipe*) und Adipozytentriglyceridlipase (englisch *Patatin-like phospholipase domain-containing 2*, *PnPla*) im weißen Fettgewebe auf Genebene mittels qPCR analysiert werden. Zusätzlich wurde die Expression der beiden Fettsäuresynthesemarker Fettsäuresynthase (englisch *Fatty acid synthase*, *Fasn*) und Acetyl-Coenzym A-Carboxylase (*Acaca*) untersucht, um den Fettsäurestoffwechsel präziser abbilden und den Effekt sowohl von Lipolyse als auch von Fettsäuresynthese auf die Adipozytengröße sowie gegebenenfalls die wechselseitige Beeinflussung dieser beiden Prozesse jeweils genauer quantifizieren zu können.

Bei der Betrachtung der Genexpressionsanalyse der Tiere, deren weißes Fettgewebe 72 Stunde nach induziertem Myokardinfarkt gewonnen wurde, fiel bei den Mäusen mit einer Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu den Kontrolltieren mit braunem Fettgewebe eine Tendenz zu einer geringeren Expression sowohl von lipolytischen Enzymen als auch von an der Fettsäuresynthese beteiligten Enzymen auf (Abbildung 9). Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen war jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,33$ und $p = 0,39$ bzw. $p = 0,13$ und $p = 0,28$).

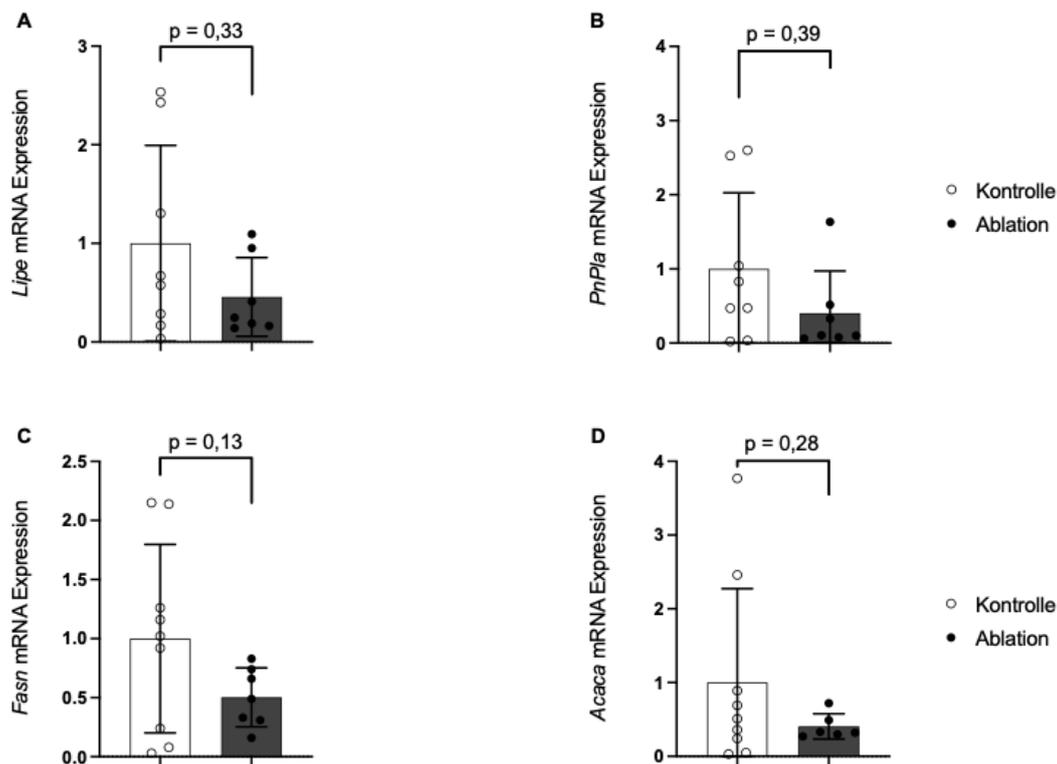


Abbildung 10 Tendenzuell geringere Expression von Lipolyse- und Fettsäuresynthesemarkern in Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Vergleichend dargestellt ist das Ausmaß der Expression von (A, B) Lipolysemarkern und (C, D) Fettsäuresyntheseparametern im epididymalen weißen Fettgewebe von Mäusen zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Myokardischämie. Mittelwerte \pm SD, (A) $n = 8,8$; (B) $n = 8,7$; (C) $n = 9,7$; (D) $n = 9,6$; $p < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in (A) und (B) mit Hilfe des *Mann-Whitney test* und in (C) und (D) mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

Drei Wochen nach Myokardinfarkt wurde eine gegensätzliche Expression von Lipolyse- und Fettsäuresyntheseparametern beobachtet (Abbildung 10). Zu diesem Zeitpunkt exprimierten Tiere, deren braunes Fettgewebe entfernt worden war, im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit erhaltenem braunem Fettgewebe sowohl mehr Lipolyse- als auch mehr Fettsäuresynthesemarker. Dabei wurden in dem weißen Fettgewebe von Tieren mit ablatiertem braunem Fettgewebe im Vergleich zu dem weißen Fettgewebe aus der Kontrollgruppe signifikant mehr Enzyme synthetisiert, die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind ($P = 0,002$ bzw. $P = 0,03$).

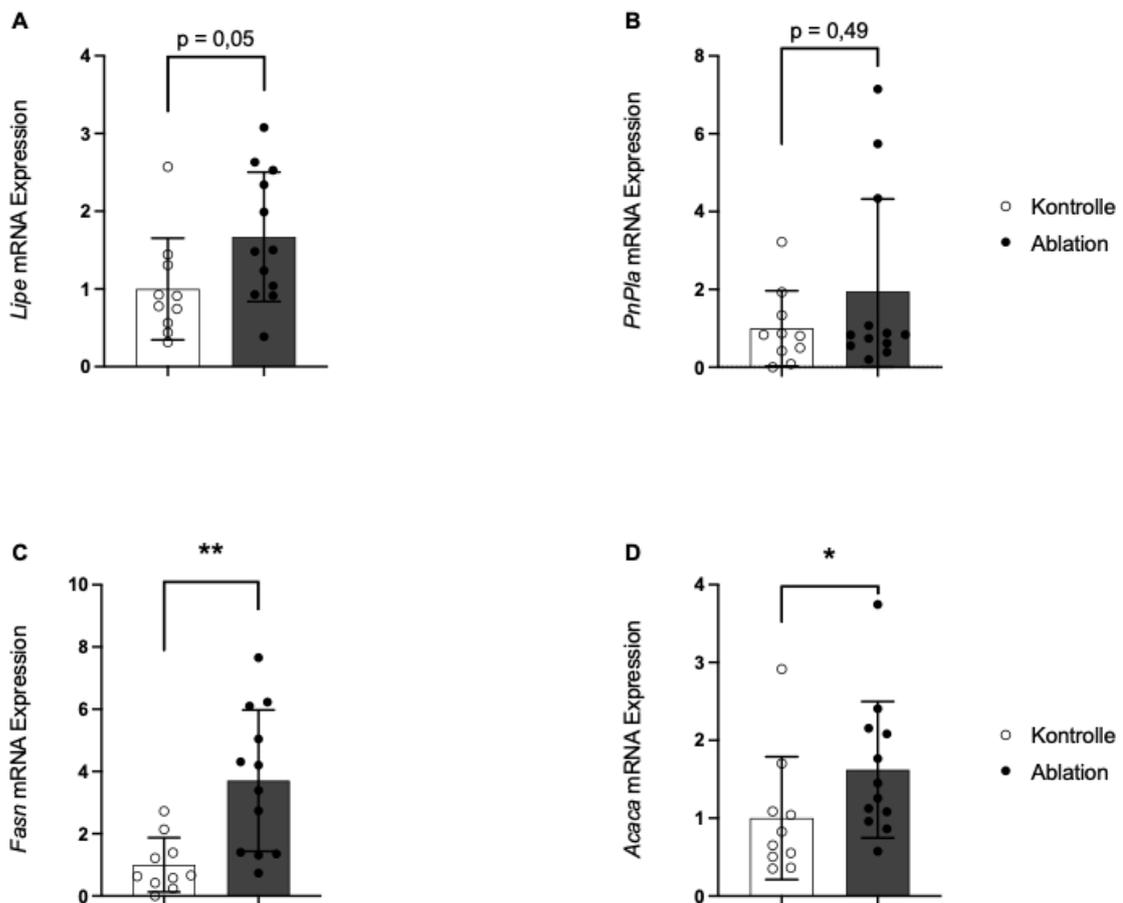


Abbildung 11 Höhere Expression von Lipolysemarkern und signifikant erhöhte Expression von Fettsäuresynthesemarkern in Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes drei Wochen nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Vergleichend dargestellt ist das Ausmaß der Expression von (A, B) Lipolysemarkern und (C, D) Fettsäuresyntheseparametern im epididymalen weißen Fettgewebe von Mäusen zu einem Zeitpunkt von drei Wochen nach Myokardischämie. Mittelwerte \pm SD, (A) $n = 10,12$; (B) $n = 10,12$; (C) $n = 10,12$; (D) $n = 10,12$; * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte in (A) und (C) mit Hilfe des *unpaired student t-test* und in (B) und (D) mit Hilfe des *Mann-Whitney test*.

3.3 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe im Modell des Myokardinfarktes

3.3.1 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe in der frühen Reperfusionphase nach Myokardinfarkt

Um den Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das weiße Fettgewebe nach Myokardinfarkt in immunologischer Hinsicht zu charakterisieren, wurde eine immunhistochemische MAC2 Färbung von viszeralem weißem Fettgewebe angefertigt. Diese Färbung ist Makrophagen-spezifisch, sodass von allen Immunzellen des weißen Fettgewebes ausschließlich Makrophagen angefärbt werden. Im weißen Fettgewebe sind die Makrophagen randständig an apoptotischen Adipozyten lokalisiert und gruppieren sich in so einer Weise, dass sie eine absterbende Fettzelle umgeben. Die dabei entstehende Struktur, die mit der MAC2 Färbung angefärbt wird, hat ein Kronen-ähnliches Aussehen. Daher spricht man in der Literatur von *Crown-like structures* (CLS), die einen apoptotischen Adipozyten umgeben⁶⁸. Somit handelt es sich bei CLS um das histologische Korrelat von Makrophagen.

Mit Hilfe der MAC2 Färbung konnte festgestellt werden, dass Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie signifikant mehr Makrophagen in ihrem viszeralem weißem Fettgewebe aufwiesen als die Kontrolltiere mit erhaltenem braunem Fettgewebe (Abbildung 11). Dabei war der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich der absoluten Anzahl an Makrophagen signifikant ($P = 0,001$) (Abbildung 11A). Eine Signifikanz zeigte sich ebenfalls, als die absolute Makrophagenanzahl einer Fettgewebprobe zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 Adipozyten bezogen wurde. Auch hier zeigten die Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes signifikant mehr Makrophagen pro 100 Adipozyten als die Kontrolltiere ($P = 0,002$) (Abbildung 11B).

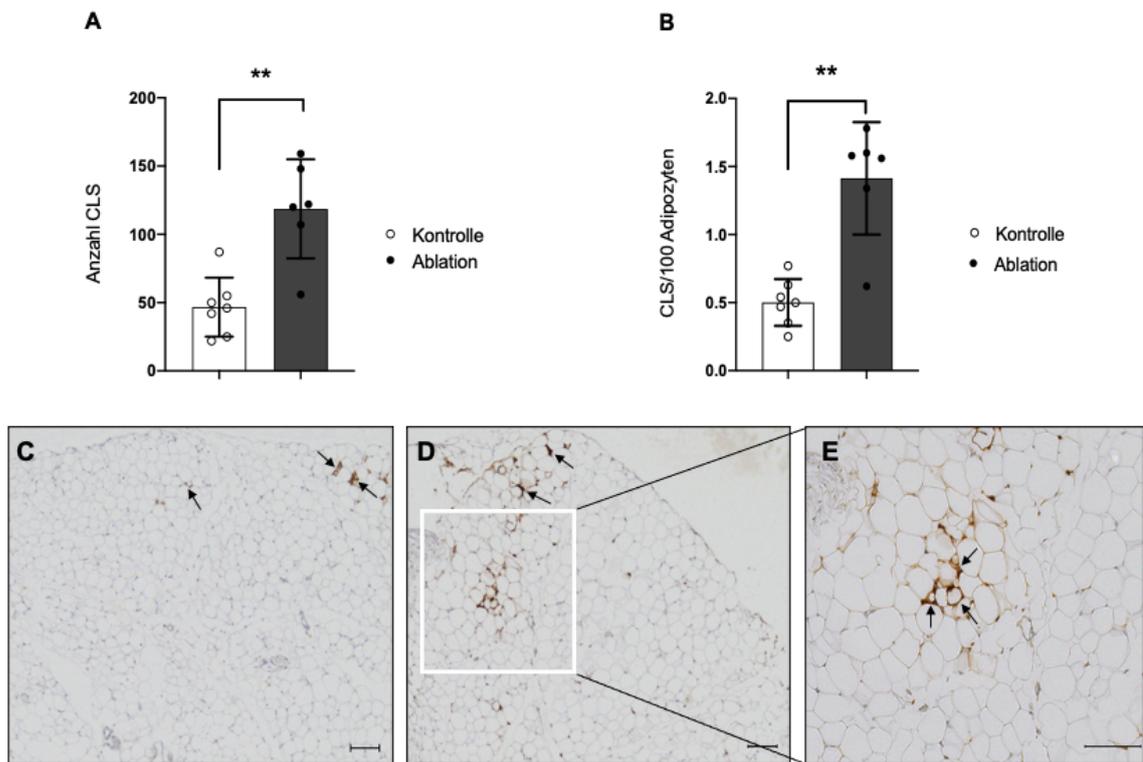


Abbildung 12 Signifikant mehr *Crown-like structures* (CLS) im viszeralen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Dargestellt sind (A) die absolute Anzahl der CLS und (B) die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten im weißen Fettgewebe von Kontrolltieren und Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie. In (C) und (D) sind repräsentative Mikroskopaufnahmen von viszeralen Fettgewebe in MAC2 Färbung von (C) Kontrolltieren und (D) Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes gezeigt. In (E) ist der in (D) mit dem weißen Kasten markierte Bereich vergrößert dargestellt. Die Pfeile markieren exemplarisch CLS. Maßstabsbalken: 100 μm , (C), (D) 10x Vergrößerung, (E) 20x Vergrößerung, Mittelwerte \pm SD, (A) $n = 7,6$; (B) $n = 7,7$; $**P < 0,005$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

3.3.2 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation im weißen Fettgewebe in der späten Reperfusionphase nach Myokardinfarkt

Um zu untersuchen, ob eine Ablation des braunen Fettgewebes einen langfristigen Einfluss auf die Inflammation im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt ausübt, wurde das Vorkommen von Makrophagen im viszeralen Fettgewebe drei Wochen nach Myokardinfarkt untersucht. Dazu wurde wie bereits unter 3.3.1 beschrieben eine MAC2 Färbung von viszeralem weißem Fettgewebe angefertigt. Hierbei fiel auf, dass Mäuse mit Ablation des braunen Fettgewebes mehr Makrophagen in ihrem weißen Fettgewebe aufwiesen als die Kontrolltiere (Abbildung 12). Der Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen bezüglich der absoluten Makrophagenanzahl war dabei nicht signifikant ($p = 0,09$) (Abbildung 12A). Wurde die Anzahl an *Crown-like structures* einer jeweiligen Fettgewebsprobe zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden Behandlungsgruppen auf 100 Adipozyten bezogen, stellte sich ein signifikanter Unterschied ein ($P = 0,02$). Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes wiesen signifikant mehr Makrophagen je 100 Adipozyten auf als die Kontrolltiere mit erhaltenem braunem Fettgewebe (Abbildung 12B).

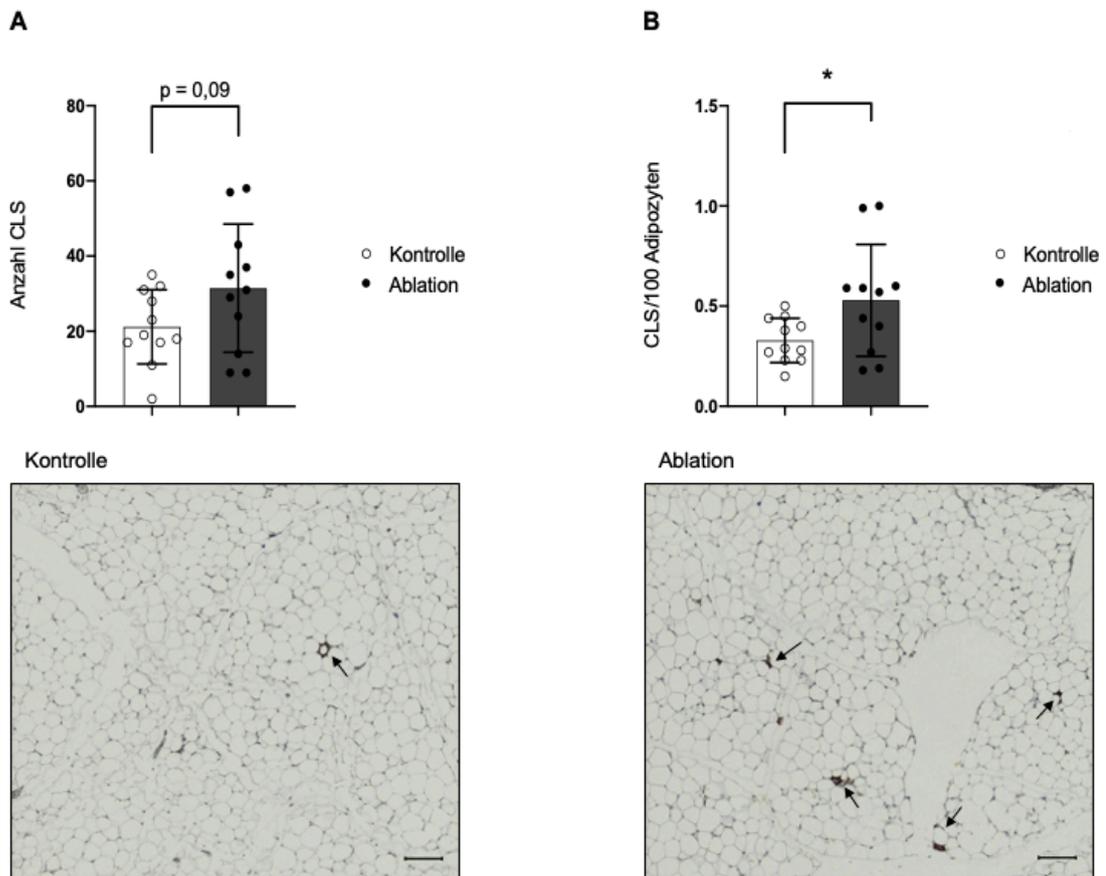


Abbildung 13 Mehr *Crown-like structures* (CLS) im viszeralen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 3 Wochen nach Myokardischämie

Bei 10 Wochen alten, männlichen Wildtyp-Mäusen wurde das braune Fettgewebe entfernt und eine Myokardischämie induziert. Dargestellt sind **(A)** die absolute Anzahl der CLS und **(B)** die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten im weißen Fettgewebe von Kontrolltieren und Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes mit repräsentativen Mikroskopaufnahmen von viszeralem Fettgewebe in MAC2 Färbung zum Zeitpunkt 3 Wochen nach Myokardischämie. Die Pfeile markieren exemplarisch CLS. Maßstabsbalken: 100 μm , 10x Vergrößerung, Mittelwerte \pm SD, **(A)** $n = 11,11$; **(B)** $n = 11,11$; $*P < 0,05$. Die Testung auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des *unpaired student t-test*.

4 Diskussion

4.1 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Morphologie, den Metabolismus und die Inflammation in viszeralem weißem Fettgewebe nach Myokardinfarkt untersucht. Dabei konnten im Mausmodell deutliche Effekte auf das viszerale Fettgewebe in metabolischer und immunologischer Hinsicht festgestellt werden.

Eine Ablation des braunen Fettgewebes lässt sich mit einer akut veränderten Adipozytengröße im weißen Fettgewebe in Zusammenhang bringen. So hatten Tiere ohne braunes Fettgewebe signifikant größere Adipozyten als Tiere mit intaktem braunem Fettgewebe. Interessanterweise ließ sich eine entsprechende Tendenz hin zu mehr großen und weniger kleinen Fettzellen im viszeralem Fettgewebe von Tieren mit Ablation auch nach drei Wochen feststellen, was auf einen langfristig anhaltenden Effekt einer Entfernung des braunen Fettgewebes auf die Morphologie von weißen Adipozyten hindeutet.

Auf metabolischer Ebene konnten Alterationen in der akuten und langfristigen Expression von lipolytischen und liposynthetischen Markern festgestellt werden. Während in der frühen Reperfusionphase Tiere mit einer Ablation des braunen Fettgewebes tendenziell weniger lipolytische und liposynthetische Enzyme exprimierten als die Kontrolltiere, zeigte sich in der späten Reperfusionphase eine signifikant erhöhte Expression von Enzymen der Fettsäuresynthese und eine ebenfalls vermehrte Expression lipolytischer Enzyme im weißen Fettgewebe von Tieren mit einer Ablation im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Durch die Ablation des braunen Fettgewebes und den damit einhergehenden Verlust seiner pleiotropen Effekte war das viszerale Fettgewebe von Tieren mit Ablation im Vergleich zu dem Fettgewebe von Kontrolltieren mit erhaltenem funktionalem Gewebe inflammatorisch geprägt. Dafür spricht das vermehrte Vorkommen von Makrophagen im weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dieser Effekt wurde an beiden Zeitpunkten beobachtet, sodass sowohl von einer kurzfristigen als auch von einer langfristigen Beeinflussung des inflammatorischen

Geschehens im viszeralen Fettgewebe durch eine Ablation des braunen Fettgewebes ausgegangen werden kann.

So lässt sich schlussfolgern, dass eine Ablation des braunen Fettgewebes sowohl akute als auch langfristige Einflüsse auf Metabolismus und Inflammation im viszeralen weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt ausübt.

Es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen hinsichtlich der Körperlänge und Adipozytenanzahl beziehungsweise zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Induktion der Myokardischämie hinsichtlich des Körpergewichts und Gewichts des weißen Fettgewebes beobachtet werden.

4.2 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf Körpergewicht und Gewicht des weißen Fettgewebes nach Myokardinfarkt

Wie in dem Kapitel „Ergebnisse“ beschrieben, konnte in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des weißen Fettgewebes nach Myokardinfarkt im Vergleich zu der Kontrollgruppe beobachtet werden. Es war lediglich eine Tendenz dahingehend festzustellen, dass Tiere mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie ein schwereres epididymales Fettgewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren besaßen. In Vorarbeiten innerhalb der Forschungsgruppe von Frau Professor Grandoch, durchgeführt von Herrn Beran, konnte hingegen nach Myokardinfarkt ein deutlicher Unterschied zwischen Tieren mit und ohne Ablation des braunen Fettgewebes hinsichtlich des Körpergewichtes nachgewiesen werden. Demnach zeigte sich ein starker Trend dahingehend, dass eine Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu keiner Ablation mit einem schwereren Körpergewicht nach Myokardischämie verbunden war ($p = 0,0583$). Dabei wurden diese Gewichtsdaten zu einem Zeitpunkt von drei Wochen nach der Ischämie erhoben, während das Körpergewicht in der vorliegenden Arbeit 72 Stunden nach der Myokardischämie bestimmt wurde. Das spricht dafür, dass eine Ablation des braunen Fettgewebes zwar keinen akuten, jedoch einen langfristigen Effekt auf das Körpergewicht

ausübt. Diese Annahme stimmt mit Daten aus Vorarbeiten überein, in denen eine Assoziation von verstärkter Aktivierung von braunem Fettgewebe mit Körpergewichtsverlust sowohl in Mäusen⁶⁹ als auch in Menschen³⁰ nachgewiesen werden konnte. Almind *et al.* führten dabei Fütterungsstudien an zwei Mauslinien durch, von denen eine Linie (129S6/SvEvTac) eine genetisch festgelegt hohe Expression von braunem Fettgewebe und UCP1 aufwies. Der Gewichtsverlauf der Mäuse wurde über einen Zeitraum von 18 Wochen beobachtet. Die Arbeitsgruppe von Cypess *et al.* erhob das Gewicht und den *Body Mass Index* (BMI) von Patienten, bei denen mittels ¹⁸F-FDG PET-CT das Vorkommen von braunem Fettgewebe detektiert wurde. Das Körpergewicht und der BMI sind dabei zwei Größen, die sich erst über einen langfristigen Zeitraum entwickeln und stabilisieren. Zudem stellte die Arbeitsgruppe eine Assoziation von Temperaturschwankungen mit veränderter Aktivität von braunem Fettgewebe her. Demnach waren niedrige Außentemperaturen mit einer hohen Aktivität und hohe Außentemperaturen mit einer geringen Aktivität des braunen Fettgewebes verbunden. Dieser Zusammenhang zwischen niedriger Außentemperatur und Aktivierung des braunen Fettgewebes konnte auch in neueren Studien bestätigt werden⁷⁰. Die erhobenen Daten suggerieren somit, dass sich der Energiehaushalt des gesamten Organismus in Abhängigkeit vom Vorhandensein eines intakten braunen Fettgewebes zunächst an neue Umgebungsbedingungen adaptieren muss, sodass ein Effekt auf das Körpergewicht erst mit Latenz sichtbar wird.

Der angedeutete akute Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das Gewicht von viszeralem weißem Fettgewebe, der in dieser Arbeit beobachtet werden konnte, deutet darüber hinaus auf eine Kommunikation zwischen dem braunen und dem weißen Fettdepot hin. Wie Harris bereits postulierte, stehen die beiden Fettkompartimente in nervalen Kontakt miteinander⁴². Über sensorische Afferenzen von weißem zu braunem Fettgewebe wird die Thermogenese in letzterem induziert⁴², für welche das braune Fettgewebe unter anderem durch Lipolyse aus weißem Fettgewebe sezernierte freie Fettsäuren als Substrat verwendet⁷¹. Andererseits nimmt das braune Fettgewebe über ein Netz von nervalen Verschaltungen Einfluss auf die Lipolyse in dem weißen Fettgewebe⁷² (siehe 4.3). So ist davon auszugehen, dass bei Fehlen beziehungsweise - wie in der vorliegenden Arbeit - bei teilweiser Entfernung einer

der beiden Komponenten diese Kommunikation zwischen den beiden Fettdepots im Rahmen einer Umstellung des Metabolismus nach akutem Myokardinfarkt gestört ist und dies mit einer negativen Auswirkung auf die metabolische Aktivität in dem verbleibenden Depot verbunden ist. Als Korrelat der verminderten Freisetzung von freien Fettsäuren, die nicht mehr als Substrat für die Thermogenese in braunem Fettgewebe verarbeitet werden können, kann aufgrund einer konsekutiv vermehrten Speicherung von Lipiden das tendenziell erhöhte Gewicht des weißen Fettgewebes in Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes angesehen werden.

4.3 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf Morphologie und Anzahl von Adipozyten im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt

In der vorliegenden Arbeit konnte herausgearbeitet werden, dass eine Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu seinem Erhalt mit einer größeren Fettzellgröße im weißen Fettgewebe assoziiert ist. Die Anzahl der Adipozyten war dabei in der Gruppe mit Ablation im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu keiner Zeit verändert.

Alterationen der Fettzellgröße wurden bisher überwiegend im Zusammenhang mit Übergewicht und Adipositas untersucht. So konnte eine Korrelation von großen Adipozyten mit Übergewicht hergestellt werden⁷³. Bei einem Energieüberschuss erfolgt demnach eine Expansion des weißen Fettgewebes, bei Vorliegen eines metabolischen Syndroms mit Übergewicht vornehmlich des viszeralen weißen Fettgewebes. Die Expansion ist dabei reguliert aus einem Gleichgewicht von Größenzunahme der Adipozyten (sogenannte Hypertrophie) und Zunahme der Zellzahl innerhalb des Fettdepots (sogenannte Hyperplasie)^{49,73}. Umgekehrt geht ein Gewichtsverlust mit einer Reduktion der Fettzellgröße einher^{49,73}. In der vorliegenden Arbeit konnte demgegenüber jedoch keine Assoziation zwischen der veränderten Adipozytengröße und dem Körpergewicht festgestellt werden. 72 Stunden nach dem Myokardinfarkt war keine Alteration des Körpergewichtes sichtbar, während die Adipozyten in Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit

erhaltenem braunem Fettgewebe bereits signifikant vergrößert waren. Da sich die beiden Versuchsgruppen einzig im Fehlen oder Vorhandensein des braunen Fettgewebes unterschieden, ist vielmehr eine beeinträchtigte Interaktion zwischen braunem und weißem Fettgewebe als Ursache für die vergrößerten Adipozyten in der Versuchsgruppe mit fehlendem braunem Fettgewebe anzunehmen. In neueren Studien konnten Ryu et al. bidirektionale neuronale Verbindungen zwischen braunem und weißem Fettgewebe nachweisen⁷². Demnach sind die beiden Fettgewebsarten im Sinne eines afferenten Reflexes (*adipose afferent reflex*) über ein Netzwerk von sensorischen und sympathischen Neuronen miteinander verbunden. Über dieses Netzwerk regulieren zentrale Afferenzen mit Ursprung im braunen Fettgewebe die Lipolyse in weißem Fettgewebe, wobei diese Interaktion über zentrale sympathische Efferenzen in das viszerale weiße Fettgewebe vermittelt wird. Diese Erkenntnisse von Ryu et al. könnten einen Erklärungsansatz für die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit darstellen. Demnach entfiel durch die Elimination der afferenten neuronalen Informationen des braunen Fettgewebes durch seine chirurgische Ablation ein regulatorischer Einfluss auf die Lipolyse in dem weißen Fettgewebe. Infolge des Wegfalls des regulatorischen Einflusses unterbliebe die Aktivierung lipolytischer Prozesse in dem weißen Fettgewebe. Wie ebenfalls in der Literatur beschrieben, ändert sich die Fettzellgröße in Abhängigkeit von dem intrazellulären Triglyceridgehalt⁶². Demnach ist ein erhöhter intrazellulärer Triglyceridgehalt mit einer großen Fettzellgröße assoziiert, während ein niedriger Gehalt intrazellulärer Triglyceride mit einer kleinen Adipozytengröße korreliert. Somit ist davon auszugehen, dass eine verminderte Lipolyse durch die fehlende Freisetzung von Triglyceriden in einer vergrößerten Adipozytengröße in dem weißen Fettgewebe resultiert.

Darüber hinaus wurde von Meyer et al. das Vorkommen einer Hyperplasie im Rahmen einer Expansion des weißen Fettgewebes beschrieben. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine Zunahme der Adipozytenanzahl in behandelten Tieren in Abhängigkeit von einer Gewichts- und Größenzunahme des viszeralen Fettgewebes beobachtet werden. Wie mehrfach in der Literatur beschrieben⁶², wird die Fettzellproliferation durch den Einfluss sympathischer Nervenfasern reguliert. Demnach hat der Einfluss des Sympathikus auf das weiße Fettgewebe eine Inhibierung der Fettzellproliferation zur Folge. Eine

Hyperplasie wurde stattdessen bei Elimination des sympathischen Einflusses im Rahmen von Versuchen beobachtet, bei denen eine Denervierung von weißem Fettgewebe vorgenommen wurde^{42,62,74}. Vor dem Hintergrund dieser Ausführungen kann als Erklärung für die ähnliche Adipozytenanzahl in beiden Versuchsgruppen zu einem Zeitpunkt von 72 Stunden nach Myokardinfarkt die allgemein anerkannte Sympathikusaktivierung im Rahmen einer akuten Myokardischämie^{13,75} herangezogen werden. Durch die Ablation des braunen Fettgewebes wurden zwar seine sympathischen Efferenzen in das weiße Fettgewebe eliminiert, jedoch stand das viszerale Fettgewebe im Rahmen der Aktivierung des Sympathikusanteils des autonomen Nervensystems nach der akuten Myokardischämie weiterhin unter einem sympathischen Einfluss. Dieser konnte weiterhin einen inhibierenden Effekt auf die Fettzellproliferation ausüben. Für den Zustand in der späten Reperfusionphase, in der ebenfalls eine ähnliche Adipozytengröße im weißen Fettgewebe beider Versuchsgruppen beobachtet wurde, kann der zeitlich begrenzte Einfluss des Sympathikus als Erklärung dienen. Die Sympathikusaktivierung nach Myokardinfarkt wurde in den verfügbaren Studien für einen kurzfristigen zeitlichen Rahmen beschrieben^{13,14,75}. Somit ist davon auszugehen, dass weder die seit längerer Zeit fehlenden sympathischen Efferenzen aus braunem Fettgewebe noch der nervale Einfluss einer systemischen Sympathikusaktivierung zu einem Zeitpunkt von drei Wochen nach akuter Myokardischämie einen regulatorischen Einfluss auf die Fettzellproliferation im weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes ausüben. Gleichzeitig fehlt bei gleichbleibender Fütterung und somit unveränderter Energieaufnahme mit der Nahrung ein Reiz, der die Proliferation der weißen Adipozyten initiiert. Somit unterbleibt eine Expansion des weißen Fettgewebes mittels Hyperplasie, was im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit erhaltenem braunem Fettgewebe sichtbar wird.

Hinsichtlich des Einflusses einer systemischen Sympathikusaktivierung nach Myokardischämie auf Hyperplasie und Hypertrophie in weißem Fettgewebe ist von einer Hypothese auszugehen, da ein solcher Effekt noch nicht in der vorhandenen Literatur untersucht wurde. Die vorhandenen Studien aus den Arbeitsgruppen um Bowers, Harris und Bartness haben die Innervierung von viszeralem Fettgewebe unter nicht-ischämischen Bedingungen untersucht. Jedoch ist in der Literatur mehrfach beschrieben, dass eine systemische

Sympathikusaktivierung nach Myokardinfarkt die Lipolyse in weißem Fettgewebe initiiert¹³. Somit ist ein sympathischer Einfluss auf weißes Fettgewebe unter postischämischen Bedingungen bereits bekannt, sodass weitere über die Lipolyse hinausgehende Effekte des Sympathikus auf das weiße Fettgewebe wahrscheinlich sind.

4.4 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Genexpression im weißen Fettgewebe nach Myokardinfarkt

Um zu überprüfen, ob eine Modulation der Lipolyse im weißen Fettgewebe durch eine Ablation des braunen Fettgewebes tatsächlich als Ursache für das tendenziell erhöhte Gewicht des epididymalen Fettgewebes und für die größere Adipozytengröße nach Myokardinfarkt infrage kommt, wurden die im Abschnitt „Material und Methoden“ beschriebenen Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dabei konnte 72 Stunden nach Myokardinfarkt eine verminderte Expression von lipolytischen und lipogenen Enzymen in dem weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes festgestellt werden. Drei Wochen nach Myokardinfarkt zeigte sich ein gegensätzlicher Phänotyp, wobei Tiere ohne braunes Fettgewebe im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit erhaltenem braunem Fettgewebe sowohl signifikant mehr Fettsäuresynthesemarker als auch vermehrt Lipolysemarker exprimierten.

Bereits seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass es infolge eines akuten Myokardinfarktes zur Aktivierung der Lipolyse in weißem Fettgewebe kommt. So beschrieb bereits die Arbeitsgruppe um Mjøs und Kjekshus, dass die bei der Sympathikusaktivierung im Rahmen einer akuten Myokardischämie vermehrt sezernierten Katecholamine über eine Aktivierung der Hormon-sensitiven Lipase die Lipolyse in weißem Fettgewebe induzierten^{13,76}. Diese Annahme konnte in neueren Studien bestätigt werden⁷⁷. In den beschriebenen Studien wurde die Assoziation zwischen der Sympathikusaktivierung bei einem Myokardinfarkt und der aktivierten Lipolyse im weißen Fettgewebe dabei jeweils in einem kurzfristigen zeitlichen Rahmen beobachtet, der die ersten Stunden nach der Myokardischämie umfasste. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen in der Hinsicht mit diesen in der Literatur dargelegten Erkenntnissen überein.

Demnach war zu erwarten, dass nach der Induktion einer Myokardischämie vermehrt lipolytische Enzyme in weißem Fettgewebe von unbehandelten Tieren exprimiert würden. Im Einklang mit dieser Erwartung konnte 72 Stunden nach Myokardischämie im Vergleich zu der behandelten Gruppe mit einer Ablation des braunen Fettgewebes eine solche erhöhte Expression von Lipolysemarkern in dem weißen Fettgewebe der Kontrollgruppe mit erhaltenem braunem Fettgewebe mit Hilfe der Genexpressionsanalysen gezeigt werden. Als Limitation der vorliegenden Studie ist an dieser Stelle anzumerken, dass es keine Ausgangswerte bezüglich der exprimierten lipolytischen Enzyme gab. So konnte das Ausmaß der Expression von Lipolysemarkern in der Kontrollgruppe nicht mit dem Ausmaß der Expression vor der Induktion der akuten Myokardischämie verglichen und somit die Höhe der Zunahme der Expression lipolytischer Marker nach Myokardischämie nicht genau quantifiziert werden. Von Interesse war in der vorliegenden Arbeit in diesem Zusammenhang jedoch der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Ablation des braunen Fettgewebes. Aufgrund der verminderten Expression lipolytischer Enzyme in den Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu den Kontrolltieren ist die Hypothese aufzustellen, dass durch eine Eliminierung des braunen Fettgewebes die Lipolyse in weißem Fettgewebe nach Myokardinfarkt vermindert induziert wird. Damit käme dem braunen Fettgewebe eine regulatorische Funktion hinsichtlich des Lipidmetabolismus im weißen Fettgewebe im Rahmen der metabolischen Umstellung nach akuter Myokardischämie zu. Diese Hypothese steht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen und unter 4.3 bereits ausgeführten Beeinflussung der Lipolyse im weißen Fettgewebe durch das braune Fettgewebe⁷². In den Arbeiten von Ryu *et al.* wurden dabei als modulierende Strukturen, die den Einfluss des braunen Fettgewebes auf das weiße Fettgewebe vermitteln, Nervenfasern des sympathischen Nervensystems identifiziert. Wie mehrfach beschrieben^{42,78,79}, spielen sympathische Nervenfasern eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Lipolyse in weißem Fettgewebe insbesondere durch die Aktivierung der beiden Katecholaminsensiblen Enzyme Hormon-sensitive Lipase und Adipozytentriglyceridlipase. Die Expression dieser beiden Enzyme wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Marker für die Lipolyse im viszeralen Fettgewebe herangezogen. Ihre erhöhte Expression stützt die allgemein anerkannte Annahme, dass sympathische

Fasern nach Myokardischämie den regulatorischen Einfluss des braunen Fettgewebes auf die Lipolyse im weißen Fettgewebe vermitteln.

Als alternativer oder zusätzlicher Mechanismus, über den das braune Fettgewebe Einfluss auf metabolische Prozesse im weißen Fettgewebe nehmen könnte, ist eine endokrine Verknüpfung mittels Adipokinen denkbar. Hinweise auf eine solche Interaktion zwischen braunem und weißem Fettgewebe wurden in neueren Studien beschrieben⁸⁰. Die Arbeitsgruppe um Khan *et al.* postulierte eine Einflussnahme von Adipokinen aus braunem und weißem Fettgewebe auf Stoffwechselprozesse in beiden Fettdepots. Dabei zeigte sie eine Verschiebung des sekretorischen Profils beider Fettgewebsarten unter Sympathikusaktivierung, wobei eine Verlagerung von die Lipidspeicherung fördernden Adipokinen hin zu die Lipolyse unterstützenden Adipokinen unter sympathischem Einfluss zu beobachten war. Somit ließe sich auch in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der metabolischen Umstellung nach akuter Myokardischämie eine Umstellung der Adipokinsekretion aus braunem und weißem Fettgewebe mit Beeinflussung lipolytischer Prozesse vermuten. Im Gegensatz zu der mehrfach beschriebenen Interaktion zwischen braunem und weißem Fettgewebe auf nervaler⁷² und endokrinologischer Ebene^{36,80} jeweils unter basalen Bedingungen und induzierter Sympathikusaktivierung wurden in der bisher verfügbaren Literatur solche Interaktionen der beiden Fettgewebsdepots noch nicht im Rahmen eines Myokardinfarktes untersucht. Daher sollten zukünftig weitere Studien durchgeführt werden, die eine entsprechende regulatorische Funktion des braunen Fettgewebes nach einer akuten Myokardischämie näher beleuchten und die oben genannten Hypothesen überprüfen beziehungsweise diese weiter untermauern.

Darüber hinaus ist die - zusätzlich zu den vermehrt exprimierten lipolytischen Enzymen - erhöhte Expression von Enzymen der Fettsäuresynthese in den Kontrolltieren 72 Stunden nach akuter Myokardischämie interessant. In Vorarbeiten innerhalb der Forschungsgruppe von Frau Professor Grandoch, welche durch Herrn Beran durchgeführt wurden, konnten 24 Stunden nach Myokardischämie erhöhte Fettsäurespiegel (*non esterified fatty acids*, NEFA) in dem Blut von Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes gemessen werden. Als ursächlich hierfür wurde das Fehlen des metabolisch aktiven braunen Fettgewebes angesehen. Wenn braunes Fettgewebe als wichtiger

Verbraucher fehlt, steigt die Konzentration der freien Fettsäuren im Blut akut an. Vor diesem Hintergrund ist eine Art metabolische Kopplung im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus in Kontrolltieren denkbar, bei dem durch den vermehrten Verbrauch freier Fettsäuren durch das intakte braune Fettgewebe der Vorgang der Lipogenese akut initiiert wird. Bisher ist jedoch weder ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität von braunem Fettgewebe und dem Vorgang der Fettsäuresynthese noch zwischen einem akuten Myokardinfarkt und Alterationen in der Lipogenese beschrieben. Daher sollten künftige Studien eine eventuelle Assoziation einer Aktivierung des braunen Fettgewebes mit einer Zunahme der Fettsäuresynthese, auch im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes, mitberücksichtigen.

Während die obigen Ausführungen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse in der frühen Reperfusionphase nach akuter Myokardischämie erklären, stellen sie keinen Erklärungsansatz für die Ergebnisse der späten Reperfusionphase dar. Drei Wochen nach akutem Myokardinfarkt war der Lipidmetabolismus von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes durch Fettsäuresynthese geprägt, wobei gleichzeitig eine Erhöhung der Expression lipolytischer Enzyme im Vergleich zu den Kontrolltieren mit erhaltenem braunem Fettgewebe zu beobachten war. Die ebenfalls zu diesem Zeitpunkt festgestellte Zunahme der Adipozytengröße in Tieren mit einer Ablation scheint ein Resultat einer vermehrten Fettsäuresynthese und nicht etwa einer verminderten Lipolyse zu sein, da die liposynthetischen Enzyme im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant und im Vergleich zu den lipolytischen Enzymen der gleichen Gruppe durchschnittlich höher exprimiert waren. Shi und Bartness⁷⁴ zeigten durch ihre Versuche eine Assoziation von Zerstörung sensorischer Nervenfasern aus weißem Fettgewebe mit einer Hypertrophie von Adipozyten im weißen Fettgewebe auf. Daher sollte in Erwägung gezogen werden, dass in den behandelten Tieren bei der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes zusätzlich sensorische, aus dem weißen Fettgewebe stammende Fasern als Anteil des bereits beschriebenen bidirektional funktionierenden Neuronennetzwerkes zwischen den beiden Fettgewebsdepots⁷² beschädigt worden sein könnten. Der Wegfall der sensorischen Informationen aus dem weißen Fettgewebe resultierte folglich in einer hypertrophierten Adipozytengröße.

Wie weiterhin in der neueren Literatur ausgelegt, hypertrophieren Adipozyten bis zu einer kritischen Größe⁶¹. Ist diese kritische Größe erreicht, werden andere Mechanismen aktiviert, um ein eventuell steigendes Angebot an freien Fettsäuren bei ausgelasteter Kapazität bestehender Adipozyten zur Speicherung zusätzlicher Lipide adäquat zu kompensieren. So ist es denkbar, dass im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus eine gesteigerte Aktivierung der Fettsäuresynthese mit einer vermehrten Induktion der Lipolyse im weißen Fettgewebe assoziiert ist. Mit dieser Hypothese stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit überein. Auch in diesem Zusammenhang sind jedoch künftig weitere Versuche zur Verifizierung notwendig.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen korrelieren für beide beschriebenen Zeitpunkte mit den unter 4.3 dargelegten Ergebnissen bezüglich der Adipozytengröße. Sowohl eine verminderte Expression lipolytischer Enzyme 72 Stunden nach akuter Myokardischämie als auch eine signifikant erhöhte Expression liposynthetischer Enzyme drei Wochen nach akutem Myokardinfarkt in Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes führen zu einer verminderten Freisetzung freier Fettsäuren aus den weißen Fettzellen. Nach den Erkenntnissen von Bowers *et al.*⁶² ist eine vermehrte intrazelluläre Speicherung von Lipiden mit einer vergrößerten Fettzellgröße assoziiert. Diesen Darstellungen entsprechend wiesen Tiere mit einer Ablation des braunen Fettgewebes sowohl 72 Stunden als auch drei Wochen nach akuter Myokardischämie größere Adipozyten in ihrem weißen Fettgewebe auf als Kontrolltiere mit erhaltenem braunem Fettgewebe.

4.5 Einfluss einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Inflammation in weißem Fettgewebe nach Myokardinfarkt

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten antiinflammatorische Eigenschaften des braunen Fettgewebes an, da seine Ablation sowohl in der frühen als auch in der späten Reperfusionphase mit einem im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikanten Anstieg von Makrophagen im weißen Fettgewebe assoziiert ist.

Die Inflammation in weißem Fettgewebe wurde bisher überwiegend im Zusammenhang mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom untersucht. Es ist bekannt, dass Adipositas mit einer chronischen Inflammation im weißen Fettgewebe assoziiert ist^{63,66}. Die im Rahmen von Übergewicht mit der Nahrung aufgenommene überschüssige Energie wird in Form von Triglyceriden im weißen, vornehmlich viszeralen, Fettgewebe gespeichert. Dabei hypertrophieren die Adipozyten durch die vermehrte Einlagerung von Triglyceriden⁶³. Vor dem Hintergrund dieser pathophysiologischen Vorgänge konnte eine Assoziation einer vermehrten Makrophageninfiltration mit zunehmender Hypertrophie der Adipozyten im weißen Fettgewebe festgestellt werden⁶⁶. Bei den Makrophagen im weißen Fettgewebe von adipösen Individuen handelt es sich dabei, im Gegensatz zu den antiinflammatorischen M2 Makrophagen im Fettgewebe von Normalgewichtigen, um den proinflammatorischen M1 Subtypen⁸¹. Dieser sezerniert proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNF-alpha und IL-6, wodurch die lokale Inflammation weiter verstärkt wird. Cinti *et al.* identifizierten in ihren Arbeiten den Oberflächenmarker MAC2 auf Makrophagen, die zu *Crown-like structures* um apoptotische Adipozyten akkumulieren, als Aktivitätsmarker unter anderem für ihre proinflammatorische Aktivität⁶⁷. Dieser Marker wurde auch in der vorliegenden Arbeit zur Identifikation von Makrophagen in weißem Fettgewebe verwendet. Daher ist davon auszugehen, dass hier das Ausmaß der Detektion von Makrophagen mit der Inflammation im viszeralen Fettgewebe korreliert. Cinti *et al.* führten weiterhin aus, dass eine Adipozytenhypertrophie allein ohne gleichzeitig bestehendes Übergewicht ebenfalls zu einer Akkumulation von Makrophagen im weißen Fettgewebe führt. Als Mechanismus für dieses Phänomen vermutete die Arbeitsgruppe die bereits unter 4.4 beschriebene Hypertrophie von Adipozyten bis zu einer kritischen Grenze, bevor sie in Apoptose gehen^{61,82}. Die apoptotischen Adipozyten bedingen daraufhin eine Rekrutierung von Makrophagen in das weiße Fettgewebe, wo sie sich in *Crown-like structures* um die betroffenen Adipozyten formieren⁶⁷. Diese Ausführungen werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt. Hier wurde eine vermehrte Akkumulation von Makrophagen im weißen Fettgewebe von Tieren mit einer Ablation des braunen Fettgewebes im Vergleich zu dem weißen Fettgewebe von Kontrolltieren beobachtet, wobei die Mäuse beider Versuchsgruppen nicht übergewichtig waren. Allerdings hatten die Tiere

mit einer Ablation sowohl in der frühen als auch in der späten Reperfusionphase größere Adipozyten in ihrem weißen Fettgewebe als die Kontrolltiere, was jeweils mit einer signifikant erhöhten Anzahl an Makrophagen verbunden war.

Eine mögliche regulatorische Einflussnahme von braunem Fettgewebe auf die Inflammation in weißem Fettgewebe wurde bereits durch die Arbeitsgruppe um Shankar *et al.* untersucht⁸³. Sie analysierte dabei die Regulation der chronischen Inflammation im epididymalen weißen Fettgewebe von adipösen Mäusen durch das interskapuläre braune Fettgewebe mit Hilfe von Versuchen, in denen das braune Fettgewebe transplantiert oder exstipiert wurde. Shankar *et al.* konnten unter dem Einfluss von braunem Fettgewebe eine verminderte inflammatorische Aktivität im weißen Fettgewebe und umgekehrt eine Exazerbation der Inflammation bei Ablation des braunen Fettgewebes beobachten. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse postulierten sie antiinflammatorische Eigenschaften von braunem Fettgewebe. Neuere Studien konnten diese Hypothese untermauern. Diese erst kürzlich durchgeführten Versuche zeigten, dass intaktes braunes Fettgewebe in einem Mausmodell der rheumatoiden Arthritis - vermutlich durch die Sekretion spezifischer Marker wie beispielsweise *fibroblast growth factor 21* (FGF21) - die Genexpression für proinflammatorische Zytokine in epididymalem Fettgewebe herabregulierte⁴⁰. Es resultierte eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin 17 (IL-17) bei gleichzeitig gesteigerter Expression antiinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) im Fettgewebe. Auch in der vorliegenden Arbeit bestand eine Assoziation zwischen einer Ablation des braunen Fettgewebes und einem pro-inflammatorischen Phänotypen im weißen Fettgewebe bei vermehrter Akkumulation von Makrophagen. Gleichzeitig war in der Kontrollgruppe mit erhaltenem braunem Fettgewebe eine im Vergleich zu der Gruppe mit Ablation verminderte Inflammation im weißen Fettgewebe festzustellen. In der Summe unterstützen die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse daher die Resultate der vorliegenden Arbeit. Die Ausführungen aus der Literatur lassen sich dabei gut auf diese Arbeit übertragen, da in den beschriebenen Studien durch Analyse des Einflusses von interskapulärem braunem Fettgewebe auf epididymales weißes Fettgewebe die gleichen Fettgewebsdepots betrachtet wurden wie in der vorliegenden Arbeit.

Wie bereits erwähnt, wurden Entzündungsvorgänge in weißem Fettgewebe vornehmlich im Zusammenhang mit Adipositas und dem metabolischen Syndrom untersucht^{49,63}. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Untersuchung der Situation nach einem akuten Myokardinfarkt hingegen eine Form der akuten Entzündung betrachtet. Hierbei konnte erstmalig eine akute Exazerbation der Inflammation in weißem Fettgewebe gezeigt werden.

4.6 Limitationen

Das experimentelle Projekt, auf dem die Ausführungen dieser Arbeit basieren, weist einige Limitationen auf. So sind zum einen die Versuchsgruppen recht klein, eine Reproduktion der Ergebnisse in größeren Populationen ist zur Verkleinerung des Standardfehlers notwendig. Zum anderen ist anzumerken, dass es in der vorliegenden Studie für die Genexpressionsanalysen keine Vergleichsgruppen von unbehandelten Versuchstieren gab, bei denen die basale Expression lipolytischer und liposynthetischer Enzyme vor Induktion einer akuten myokardialen Ischämie erhoben wurde. Eine Quantifizierung der Expressionssteigerung in den Versuchsgruppen nach dem akuten Myokardinfarkt war somit nicht möglich. Entsprechende Vergleichsgruppen sind zu generieren und die Ergebnisse entsprechend zu ergänzen.

4.7 Ausblick

Wie aus den Ausführungen in der vorgelegten Arbeit hervorgeht, weist braunes Fettgewebe mit seinen stoffwechselmodulierenden und antiinflammatorischen Wirkungen neu entdeckte, positive Charakteristika auf. Mit diesen Eigenschaften besitzt dieses Gewebe ein großes Potential, die Umstellung des Metabolismus nach akutem Herzinfarkt günstig zu beeinflussen. Dadurch ist eine positive Einflussnahme auf pathogenetische Vorgänge nach kardialer Ischämie anzunehmen, wodurch die Morbidität und Mortalität nach einem akuten Myokardinfarkt auch im Menschen verringert werden könnten. In diesem Zusammenhang ist eine pharmakologische Rekrutierung von braunem Fettgewebe - wie sie beispielsweise mittels bereits vorhandener Beta-3-Adrenozeptoragonisten wie Mirabegron möglich wäre⁸⁴ - als zukünftige,

supportive prophylaktische Maßnahme in der Behandlung des akuten Myokardinfarktes denkbar. Um dieses langfristige Ziel zu erreichen, sind in Zukunft mittelfristig eine Translation der dargelegten Ergebnisse in die klinische Forschung und eine aus klinischen Ergebnissen folgende Etablierung therapeutischer Konzepte notwendig.

5 Literaturverzeichnis

1. WHO. The top 10 causes of death (2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Letzter Zugriff am 24.07.2022).
2. Robert Koch-Institut. Fallrate akuter Myokardinfarkte (tödlich und nicht-tödlich) sowie koronare Sterbefälle je 100.000 Einwohner. *Indikator 24 der ECHI shortlist: Fallrate akuter Myokardinfarkte (tödlich und nicht-tödlich) sowie koronare Sterbefälle je 100.000 Einwohner* (Primärquelle: Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik und Krankenhausstatistik). Berlin. In www.gbe-bund.de (2021).
3. Neumann, Franz-Josef (ESC Chairperson), Sousa-Uva, Miguel (EACTS Chairperson), Ahlsson, Anders, Alfonso, Fernando, Banning, Adrian P., Benedetto, Umberto, Byrne, Robert A., Collet, Jean-Philippe, Falk, Volkmar, Head, Stuart J., Juni, Peter, Kastrati, Adna, M. O. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. <https://www.escardio.org/Guidelines/Clinical-Practice-Guidelines/ESC-EACTS-Guidelines-in-Myocardial-Revascularisation-Guidelines-for> (2018) doi:10.1093/eurheartj/ehy394.
4. Saleh, M. & Ambrose, J. A. Understanding myocardial infarction [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Res* **7**, (2018).
5. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol* **72**, 2231–2264 (2018).
6. Dutta, P. *et al.* Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **487**, 325–329 (2012).
7. Dutta, P. *et al.* Myocardial infarction activates CCR2+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* **16**, 477–487 (2015).
8. Hendricksom, S. C. *et al.* Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* **166**, 85-94 (1997).
9. Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiological Reviews* **90**, 207–258 (2010).
10. Wisneski, J. A. *et al.* Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *Journal of Clinical Investigation* **76**, 1819–1827 (1985).
11. Dennis, S. C., Gevers, W. & Opie, L. H. Protons in ischemia: Where do they come from; Where do they go to? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **23**, 1077–1086 (1991).

12. Johansson, P. I. *et al.* Sympathoadrenal activation and endothelial damage are inter correlated and predict increased mortality in patients resuscitated after out-of-hospital cardiac arrest. A post hoc sub-study of patients from the TTM-trial. *PLoS ONE* **10**, 1–14 (2015).
13. Kjekshus, J. K. & Mjos, O. D. Effect of inhibition of lipolysis on infarct size after experimental coronary artery occlusion. *Journal of Clinical Investigation* **52**, 1770–1778 (1973).
14. Kurien, V. A. & Oliver, M. F. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Progress in Cardiovascular Diseases* **13**, 361–373 (1971).
15. Taniguchi, M. *et al.* Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **280**, 1762–1769 (2001).
16. Turer, A. T. *et al.* Metabolomic profiling reveals distinct patterns of myocardial substrate use in humans with coronary artery disease or left ventricular dysfunction during surgical ischemia/reperfusion. *Circulation* **119**, 1736–1746 (2009).
17. McNulty, P. H. *et al.* Glucose metabolism distal to a critical coronary stenosis in a canine model of low-flow myocardial ischemia. *Journal of Clinical Investigation* **98**, 62–69 (1996).
18. Maroko, P R, Kjekshus, J K, Sorbei, B E, Watanabe, T, Covell, J W, Ross, J, B. E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* **XLIII**, (1971).
19. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 3037–3047 (2007).
20. Dutta, P. & Nahrendorf, M. Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **35**, 1066–1070 (2015).
21. de Jong, J. M. A. *et al.* Human brown adipose tissue is phenocopied by classical brown adipose tissue in physiologically humanized mice. *Nature Metabolism* **1**, 830–843 (2019).
22. Cinti, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**, 319–328 (2001).
23. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews* **84**, 277–359 (2004).
24. Grandoch, M. *et al.* 4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Nature Metabolism* **1**, 546–559 (2019).

25. Orava, J. *et al.* Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metabolism* **14**, 272–279 (2011).
26. Yang, F. T. & Stanford, K. I. Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review). *Current Obesity Reports* **11**, 1–9 (2022).
27. Bartelt, A. *et al.* Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine* **17**, 200–206 (2011).
28. van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine* **360**, 1500–1508 (2009).
29. Cypess, A. M. *et al.* Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metabolism* **21**, 33–38 (2015).
30. Cypess, A. M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *Obstetrical and Gynecological Survey* **64**, 519–520 (2009).
31. Virtanen, Kirsi A., Lidell, Martin E., Orava, Janne, Heglind, Mikael, Westergren, Rickard, Niemi, Tarja, Taittonen, Markku, Laine, Jukka, Savisto, Nina-Johanna, Enerbäck, Sven, Nuutila, P. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *New England Journal of Medicine* **360**, 1518–25 (2009).
32. Zhang, F. *et al.* An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metabolism* **27**, 252–262.e3 (2018).
33. Villarroya, J. *et al.* New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *Journal of Endocrinology* **243**, R19–R27 (2019).
34. Mauer, J. *et al.* Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nature Immunology* **15**, 423–430 (2014).
35. Campderrós, L. *et al.* Brown Adipocytes Secrete GDF15 in Response to Thermogenic Activation. *Obesity* **27**, 1606–1616 (2019).
36. Villarroya, J., Cereijo, R., Giralt, M. & Villarroya, F. Secretory proteome of brown adipocytes in response to cAMP-mediated thermogenic activation. *Frontiers in Physiology* **10**, 1–8 (2019).
37. Whittle, A. J. *et al.* BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* **149**, 871–885 (2012).
38. Hondares, E. *et al.* Hepatic FGF21 Expression Is Induced at Birth via PPAR α in Response to Milk Intake and Contributes to Thermogenic Activation of Neonatal Brown Fat. *Cell Metabolism* **11**, 206–212 (2010).

39. Hondares, E. *et al.* Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 12983–12990 (2011).
40. Moon, J. *et al.* Brown adipose tissue ameliorates autoimmune arthritis via inhibition of Th17 cells. *Scientific Reports* **10**, 1–11 (2020).
41. Ruan, C. C. *et al.* A2A Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell Metabolism* **28**, 476–489.e5 (2018).
42. Harris, R. B. S. Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Obesity* **20**, 1355–1364 (2012).
43. Thoonen, R. *et al.* Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **84**, 202–211 (2015).
44. Peres Valgas da Silva, C. *et al.* Brown adipose tissue prevents glucose intolerance and cardiac remodeling in high-fat-fed mice after a mild myocardial infarction. *International Journal of Obesity* **46**, 350–358 (2022).
45. Pinckard, K. M. *et al.* A Novel Endocrine Role for the BAT-Released Lipokine 12,13-diHOME to Mediate Cardiac Function. *Circulation* **143**, 145–159 (2021).
46. Barbarash, O. *et al.* The role of adipose tissue and adipokines in the manifestation of type 2 diabetes in the long-term period following myocardial infarction. *Diabetology and Metabolic Syndrome* **8**, 1–9 (2016).
47. Moon, H. *et al.* Brite Adipocyte FGF21 Attenuates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts by Modulating NRF2. *Cells* **11**, (2022).
48. Park, A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells* **6**, 33 (2014).
49. Sakers, A., de Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419–446 (2022).
50. Rosen, Evan D.; Spiegelmann, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **44**, (2006).
51. Coelho, M., Oliveira, T. & Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Archives of Medical Science* **9**, 191–200 (2013).
52. Kanneganti, T. D. & Dixit, V. D. Immunological complications of obesity. *Nature Immunology* **13**, 707–712 (2012).

53. Rosen, E. D. & Spiegelman, B. M. What we talk about when we talk about fat. *Cell* **156**, 20–44 (2014).
54. Carbone, F.; La Rocca, C.; Matarese, G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* **94**, 2082–2088 (2012).
55. Koh, Kwang Kon; Park, Sang Min; Quon, M. J. Leptin and cardiovascular disease. *Circulation* **117**, 3238–3249 (2008).
56. Ahima, R. S., Kelly, J., Elmquist, J. K. & Flier, J. S. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* **140**, 4923–4931 (1999).
57. Hausberg, M. *et al.* Leptin potentiates thermogenic sympathetic responses to hypothermia: A receptor-mediated effect. *Diabetes* **51**, 2434–2440 (2002).
58. Simonds, S. E. *et al.* Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell* **159**, 1404–1416 (2014).
59. Harwood, H. J. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **63**, 57–75 (2012).
60. Goldstein, B. J., Scalia, R. G. & Ma, X. L. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* **6**, 27–35 (2009).
61. Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L. & Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *Journal of Clinical Investigation* **72**, 1150–1162 (1983).
62. Bowers, R. R. *et al.* Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **286**, 1167–1175 (2004).
63. Chait, A. & den Hartigh, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **7**, 1–41 (2020).
64. Wellen, K. E. & Hotamisligil, G. S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1785–1788 (2003).
65. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 175–184 (2007).
66. Weisberg, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1796–1808 (2003).

67. Cinti, S. *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of Lipid Research* **46**, 2347–2355 (2005).
68. Murano, I. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research* **49**, 1562–1568 (2008).
69. Almind, K., Manieri, M., Sivitz, W. I., Cinti, S. & Kahn, C. R. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2366–2371 (2007).
70. Alexander Iwen, K. *et al.* Cold-induced brown adipose tissue activity alters plasma fatty acids and improves glucose metabolism in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **102**, 4226–4234 (2017).
71. Nguyen, Ngoc L. T.; Xue, B.; B. T. J. Sensory denervation of inguinal white fat modifies sympathetic outflow to white and brown fat in Siberian Hamsters. *Physiol Behav* **190**, 28–33 (2018).
72. Ryu, V., Watts, A. G., Xue, B. & Bartness, T. J. Bidirectional crosstalk between the sensory and sympathetic motor systems innervating brown and white adipose tissue in male Siberian hamsters. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **312**, R324–R337 (2017).
73. Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C. & Phillips, S. A. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte* **2**, 217–226 (2013).
74. Shi, H. & Bartness, T. J. White adipose tissue sensory nerve denervation mimics lipectomy-induced compensatory increases in adiposity. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **289**, 514–520 (2005).
75. Sunaga, H. *et al.* Activation of cardiac AMPK-FGF21 feed-forward loop in acute myocardial infarction: Role of adrenergic overdrive and lipolysis byproducts. *Scientific Reports* **9**, 1–13 (2019).
76. Mjos, O. D., Kjekshus, J. K. & Lekven, J. Importance of free fatty acids as a determinant of myocardial oxygen consumption and myocardial ischemic injury during norepinephrine infusion in dogs. *Journal of Clinical Investigation* **53**, 1290–1299 (1974).
77. Obokata, M. *et al.* Early increase in serum fatty acid binding protein 4 levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* **7**, 561–569 (2018).

78. Bartness, Timothy J.; Liu, Y.; Shrestha, Y. B.; Ryu, V. Neural Innervation of White Adipose Tissue and the Control of Lipolysis. *Front Neuroendocrinol* **35**, 473–493 (2014).
79. Salatzki, J. *et al.* Adipose tissue ATGL modifies the cardiac lipidome in pressure-overload-induced left ventricular failure. *PLoS Genetics* **14**, 1–24 (2018).
80. Ali Khan, A. *et al.* Comparative secretome analyses of primary murine white and brown adipocytes reveal novel adipokines. *Molecular and Cellular Proteomics* **17**, 2358–2370 (2018).
81. Boulenouar, S. *et al.* Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* **46**, 273–286 (2017).
82. Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S. & Hirsch, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: A new model of obesity. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology* **4**, (1978).
83. Shankar, K. *et al.* Role of brown adipose tissue in modulating adipose tissue inflammation and insulin resistance in high-fat diet fed mice. *European Journal of Pharmacology* **854**, 354–364 (2019).
84. Pinckard, K. M. & Stanford, K. I. The Heartwarming Effect of Brown Adipose Tissue. *Molecular Pharmacology* MOLPHARM-MR-2021-000328 (2021) doi:10.1124/molpharm.121.000328.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau des braunen Fettgewebes	7
Abbildung 2 Schematischer Aufbau des weißen Fettgewebes	13
Abbildung 3 Schematische Darstellung von Crown-like structures.....	16
Abbildung 4 Aufbau der Versuchsreihe und Behandlung der Tiere	26
Abbildung 5 Schnittschema des viszeralen Fettgewebes	27
Abbildung 6 Kein Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des weißen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie	37
Abbildung 7 Durchschnittlich größere Adipozyten bei Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes nach Myokardischämie	38
Abbildung 8 Absolut und anteilig weniger kleine und mehr große Adipozyten im weißen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt	40
Abbildung 9 Kein Effekt einer Ablation des braunen Fettgewebes auf die Adipozytenanzahl im weißen Fettgewebe nach Myokardischämie.....	41
Abbildung 10 Tendenziell geringere Expression von Lipolyse- und Fettsäuresynthesemarkern in Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardinfarkt	43
Abbildung 11 Höhere Expression von Lipolysemarkern und signifikant erhöhte Expression von Fettsäuresynthesemarkern in Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes drei Wochen nach Myokardischämie	44
Abbildung 12 Signifikant mehr <i>Crown-like structures</i> (CLS) im viszeralen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 72 Stunden nach Myokardischämie	46
Abbildung 13 Mehr <i>Crown-like structures</i> (CLS) im viszeralen Fettgewebe von Tieren mit Ablation des braunen Fettgewebes 3 Wochen nach Myokardischämie	48

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substanzen	18
Tabelle 2: Verwendete Lösungen	18
Tabelle 3: Verwendete Färbelösungen	19
Tabelle 4: Verwendete Puffer	19
Tabelle 5: Verwendete Erstantikörper.....	20
Tabelle 6: Verwendete Zweitantikörper	20
Tabelle 7: Verwendetes Kit zur Umschreibung von RNA in cDNA	20
Tabelle 8: Verwendete Primer	21
Tabelle 9: Verwendete Geräte	22

Danksagung

Frau Professor Dr. Grandoch danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in ihrer Forschungsgruppe. Ich danke ihr für die gute Betreuung, ihren Rat und die vielen anregenden Ideen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Arne Beran für die Begleitung dieser Arbeit, die tatkräftige Unterstützung und für sein immer offenes Ohr. Aus zahlreichen Gesprächen sind viele konstruktive Anregungen entstanden.

Mein Dank gilt auch Frau Annika Zimmermann, die mit ihrer humorvollen Art das Arbeiten in der Histologie stets angenehm gestaltete und mir mit vielen praktischen Ratschlägen immer zur Seite stand.

Allen Kollegen danke ich für die sehr angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, wodurch ich große Freude an der Arbeit im pharmakologischen Institut hatte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für den familiären Rückhalt und ihre liebevolle Unterstützung. Mit großem Interesse an dieser Dissertation stand sie mir stets zur Seite und hat mich in jeder Entscheidung bestärkt.

Herrn Daniel Brodhuhn danke ich für die Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.