

Die Bedeutung des braunen Fettgewebes im murinen Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Arne Beran
aus Duisburg

Düsseldorf, September 2022

aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Maria Grandoch

2. Prof. Dr. Joachim Altschmied

Tag der mündlichen Prüfung:
15.02.2023

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen..... | 1 |
| 1.1.1 Definition und Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren..... | 2 |
| 1.1.3 Der Myokardinfarkt (MI)..... | 3 |
| 1.1.4 Die angeborene Immunabwehr | 6 |
| 1.2 Braunes Fettgewebe | 12 |
| 1.2.1 Charakteristika | 12 |
| 1.2.2 Die endokrine Funktion des braunen Fettgewebes..... | 15 |
| 1.2.3 BAT im immunologischen Kontext..... | 16 |
| 1.3 Braunes Fettgewebe und das kardiovaskuläre System | 17 |
| 1.4 Präliminäre Ergebnisse | 20 |
| 1.5 Ziel der Arbeit..... | 22 |
| 2 Material und Methoden | 23 |
| 2.1 Tierversuche | 23 |
| 2.1.1 Mäuse | 23 |
| 2.1.2 Ischämie und Reperfusion..... | 23 |
| 2.1.3 Chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes | 24 |
| 2.1.4 Implantation osmotischer Minipumpen | 25 |
| 2.2 Qualitative und semiquantitative Durchflusszytometrie | 26 |
| 2.2.1 Herz | 26 |
| 2.2.2 Blut..... | 27 |
| 2.3 Zytokin Quantifizierung..... | 28 |
| 2.3.1 Plasma Gewinnung | 28 |
| 2.3.2 BAT-Überstand..... | 29 |
| 2.3.3 Zytokin Assays | 29 |
| 2.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>realtime</i> PCR..... | 29 |
| 2.4.1 braunes Fettgewebe..... | 29 |
| 2.4.2 Monozyten und neutrophile Granulozyten | 30 |
| 2.5 Transkriptom-Analyse..... | 31 |
| 2.5.1 Einzelzellsequenzierung von kardialen myeloiden Immunzellen..... | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.2 | Bulk-RNA Sequenzierung vom braunen Fettgewebe..... | 33 |
| 2.6 | Histologie | 33 |
| 2.6.1 | Gomori's 1-step Trichrome Färbung | 33 |
| 2.6.2 | Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung | 34 |
| 2.7 | Magnetresonanzbildgebung mittels ¹ H-NMR | 34 |
| 2.7.1 | Bestimmung der BAT-Aktivierung nach Mirabegron-Applikation..... | 34 |
| 2.7.2 | Erhebung der kardialen Funktion..... | 35 |
| 2.7.3 | Bestimmung der Infarktgröße | 35 |
| 2.8 | Metabolische Erhebung..... | 35 |
| 2.8.1 | NEFA-Messung..... | 35 |
| 2.9 | Statistik | 36 |
| 3 | Ergebnisse..... | 37 |
| 3.1 | Einfluss des Myokardinfarkts auf das BAT..... | 37 |
| 3.1.1 | Aktivierung des BAT durch den Myokardinfarkt | 37 |
| 3.1.2 | Transkriptom-Analyse des BAT nach Myokardinfarkt | 38 |
| 3.1.3 | Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt | 39 |
| 3.1.4 | Einfluss des BAT auf zirkulierende Zytokine..... | 41 |
| 3.2 | Einfluss der BAT-Ablation auf das Herz nach Myokardinfarkt | 42 |
| 3.3 | Einfluss der BAT-Ablation auf Immunzellen..... | 43 |
| 3.3.1 | Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen..... | 43 |
| 3.3.2 | Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen | 45 |
| 3.4 | Einfluss der BAT-Ablation auf Immunzellen nach Myokardinfarkt | 47 |
| 3.4.1 | Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 47 |
| 3.4.2 | Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 49 |
| 3.4.3 | Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 51 |
| 3.4.4 | Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 53 |
| 3.5 | Einfluss der BAT-Ablation auf das Transkriptom kardialer myeloider Zellen nach Myokardinfarkt | 55 |
| 3.5.1 | Generelle Charakterisierung des Transkriptoms analysierter Immunzellen..... | 55 |
| 3.5.2 | Einfluss auf neutrophile Granulozyten | 58 |
| 3.5.3 | Einfluss auf Makrophagen | 61 |
| 3.6 | <i>In-vitro</i> Charakterisierung von Neutrophilen und Monozyten..... | 63 |
| 3.6.1 | Neutrophile Granulozyten..... | 63 |

| | | |
|-----------|--|---|
| 3.6.2 | Monozyten..... | 65 |
| 3.7 | Einfluss des BAT auf metabolische Veränderungen | 65 |
| 3.7.1 | Veränderungen im Lipidstoffwechsel | 66 |
| 3.8 | Einfluss einer BAT-Aktivierung auf den Myokardinfarkt | 67 |
| 3.8.1 | Aktivierung des BAT durch Mirabegron ohne anschließenden Myokardinfarkt..... | 67 |
| 3.8.2 | Einfluss von Mirabegron auf die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt.... | 69 |
| 4 | Diskussion | 71 |
| 4.1 | Die Effekte der BAT-Aktivierung nach Myokardinfarkt | 72 |
| 4.2 | BAT und die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt..... | 74 |
| 4.3 | BAT im inflammatorischen Kontext nach Myokardinfarkt..... | 76 |
| 4.3.1 | Der proinflammatorische Charakter der Immunzellen | 79 |
| 4.3.2 | Metabolische Veränderungen in den Immunzellen nach MI..... | 80 |
| 4.4 | Die Effekte von BAT auf den Metabolismus im Kontext des Myokardinfarkts | 81 |
| 4.5 | Limitation und Ausblick..... | 82 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 84 |
| 6 | Summary | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| 7 | Appendix..... | 85 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 90 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 92 |
| 10 | Literatur..... | 93 |
| 11 | Originalarbeiten..... | 103 |
| 12 | Kongressbeiträge | 104 |
| 13 | Lebenslauf | 105 |
| 14 | Danksagung..... | 106 |
| 15 | Eidesstaatliche Versicherung..... | 107 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|---|
| ADT | <i>Antibody-Derived Tags</i> |
| Abb | Abbildung |
| AMI | Akuter Myokardinfarkt |
| AMPK | Adenosinmonophosphat-abhängige-Kinase |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Atp5k | ATP Synthase Subunit E |
| AUC | <i>Area Under the Curve</i> |
| A2AR | Adenosin-A2A-Rezeptor |
| BAT | <i>brown adipose tissue</i> |
| BDNF | <i>Brain Derived Neurotrophic factor</i> |
| BMAT | <i>bone marrow adipose tissue</i> |
| BMDM | <i>bone marrow derived monocytes</i> |
| BMI | <i>body mass index</i> |
| BMP | <i>bone morphogenic protein</i> |
| BMS | <i>Bare Metal Stents</i> |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bspw | beispielsweise |
| bzw | beziehungsweise |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CCL2 | <i>C-C chemokine ligand 2</i> |
| CCR2 | <i>C-C chemokine receptor type 2</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CEBP | <i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i> |
| CITE-seq | <i>Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing</i> |
| cm | Centimeter |
| CREB | <i>cAMP responsive element binding protein</i> |
| CRP | <i>C-reactive protein</i> |
| CSF | <i>colony stimulating factor</i> (siehe M-CSF) |
| cTn | <i>cardiac troponin</i> |
| CXCL | <i>chemokine (C-X-C-motif) ligand</i> |
| CXCR | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor |
| DAMP | <i>Damage-associated molecular patterns</i> |
| DES | <i>Drug Eluting Stents</i> |
| dl | Deziliter |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DPBS | Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| EBF2 | <i>early B-cell factor 2</i> |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |

| | |
|----------------------------|---|
| EDV | Enddiastolisches Volumen |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ERK1/2 | <i>Mitogen-activated protein kinase 1/2</i> |
| ESV | Endsystolisches Volumen |
| EV | extrazelluläre Vesikel |
| FAD | Flavinadenindinukleotid |
| FC | <i>Fold change</i> |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| ¹⁸ F-FDG-PET-CT | ¹⁸ F-Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie |
| FDR | <i>false discovery rate</i> |
| FSC | <i>Forward scatter</i> |
| FGF21 | <i>fibroblast growth factor 21</i> |
| FGFR1 | <i>fibroblast growth factor receptor 1</i> |
| Fos | <i>Transcription Factor AP-1 Subunit C-Fos</i> |
| FOXO1 | <i>Forkhead box protein O1</i> |
| FSTL1 | <i>Follistatin-related protein 1</i> |
| <i>g</i> | <i>Gravity</i> |
| g | Gramm |
| G-CSF | <i>granulocyte-colony stimulating factor</i> |
| GDF8 | <i>Growth/differentiation Factor 8</i> |
| Glut1 | Glukose-Transporter 1 |
| GM-CSF | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |
| GO | <i>Gene Ontology</i> |
| Gpi1 | Glukose-6-phosphat Isomerase 1 |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| G0s2 | <i>G0/G1 Switch Regulatory Protein 2</i> |
| G6P | Glukose-6-Phosphat |
| G6PD | Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase |
| h | <i>hours</i> |
| HBSS | <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> |
| Hk2 | Hexokinase 2 |
| HSL | Hormonsensitive Lipase |
| hsTNT | Hochsensitives Troponin T |
| I.E. | Internationale Einheiten |
| IFN-g | Interferon Gamma |
| IGF-1 | <i>insulin like growth factor 1</i> |
| IGFBP-2 | <i>insulin-like growth factor-binding protein 2</i> |
| IL | Interleukin |
| i.p. | <i>Intraperitoneal</i> |
| IPA | <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |
| IRF3 | <i>Interferon regulatory factor 3</i> |
| Junb | <i>Transcription Factor AP-1 Subunit JunB</i> |
| KC | <i>keratinocytes-derived chemokine</i> |
| kg | Kilogramm |
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LAD | <i>left anterior descending artery</i> |
| LANUV | Landesamt für Umwelt und Verbraucherschutz |
| LIF | <i>leukemia inhibitory factor</i> |

| | |
|--------|--|
| LTB4 | Leukotrien B4 |
| LGE | <i>late gadolinium enhancement</i> |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Lyve1 | <i>lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1</i> |
| Ly6C | <i>lymphocyte antigen 6 complex</i> |
| Ly6G | <i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i> |
| MCP-1 | monocyte chemotactic protein 1 |
| mg | Milligramm |
| MI | Myokardinfarkt |
| MIP | <i>Macrophage Inflammatory Proteins</i> |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| M-CSF1 | <i>macrophage colony-stimulating factor 1</i> |
| MertK | <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER</i> |
| MHCII | <i>major histocompatibility complex II</i> |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| mRNA | <i>Messenger-RNA</i> |
| ms | Millisekunden |
| M/V | Masse/Volumen |
| Myf5 | <i>myogenic factor 5 gene</i> |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NEFA | <i>Non-Esterified Fatty Acids</i> |
| NETs | <i>neutrophil extracellular traps</i> |
| NGAL | Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin |
| NH4Cl | Ammoniumchlorid |
| NSTEMI | Nicht-ST-Hebungsinfarkt |
| OSTN | <i>Osteocrin</i> |
| oxLDL | oxidiertes <i>low density lipoprotein</i> |
| pAVK | periphere Arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PCI | Percutaneous coronary intervention |
| PE | Polyethylen |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Pfkl | Phosphofruktokinase Typ Leber |
| Pfklp | Phosphofruktokinase Typ Blutplättchen |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| PPAR | Peroxisome-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor |
| qPCR | <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> |
| RAGE | <i>receptors for advanced glycation end products</i> |
| RARE | <i>Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement</i> |
| RBP-4 | <i>retinol binding protein 4</i> |

| | |
|--------------------|--|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RPL41 | <i>Ribosomal Protein L41</i> |
| RPS27/29 | <i>Ribosomal Protein S27/29</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s.c. | subkutan |
| SD | <i>Standard deviation</i> |
| Slc2a4 | <i>Solute Carrier Family 2 Member 4</i> |
| SPARC | <i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i> |
| SSC | <i>Sideways scatter</i> |
| STEMI | ST-Hebungsinfarkt |
| S100 | <i>S100 calcium-binding protein</i> |
| TGF | <i>Transforming Growth factor</i> |
| TGZ | Triglyzeride |
| TIMD4 | <i>T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4</i> |
| TLR | <i>toll like receptor</i> |
| TNF α | Tumornekrosefaktor alpha |
| TPH-1 | Tryptophanhydroxylase |
| TREM1 | <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i> |
| TRP | <i>transient receptor potential</i> |
| U | <i>Units</i> |
| UCP1 | <i>uncoupling protein 1</i> |
| VEGF-A | <i>vascular endothelial growth factor A</i> |
| Vol.% | Volumenprozent |
| vs. | <i>versus</i> |
| V/V | Volumen/Volumen |
| WAT | <i>white adipose tissue</i> |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| $^1\text{H-NMR}$ | <i>Proton nuclear magnetic resonance</i> |
| 18F-FDG-PET-CT | 18F-Fluor-Desoxyglukose-Positronenemissionstomographie- Computertomographie |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad-Celsius |
| % | Prozent |

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Kardiovaskulären Erkrankungen inkludieren unter anderem das Krankheitsbild der Koronaren Herzkrankheit (KHK), den ischämischen Myokardinfarkt (MI) und die peripher-arterielle Verschlusskrankheit und umfasst im Allgemeinen eine pathologische Störung des Gefäßsystems und des Herzens. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben im Jahr 2019 weltweit 17,9 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, was einem prozentualen Anteil von etwa 32 Prozent (%) aller Todesursachen ausmachte¹. Auch in Deutschland spiegelt sich die hohe Mortalität in den Statistiken wider. Hierzulande wurden die entsprechenden Todesursachen mit 34,3 % im Jahr 2020 beziffert². Gravierend hinzu kommt die Tatsache, dass die Inzidenz und Letalität positiv mit dem Alter korreliert. Die überwältigende Mehrheit (93 %) der Deutschen, die an den unmittelbaren oder mittelbaren Folgen verstarben, waren 65 Jahre oder älter. Vor dem Hintergrund des persistierenden, demographischen Wandels kommt diesem Umstand eine immer größere Bedeutung zu. Betrachtet man zudem retrospektiv die Jahre 2000 bis 2019 im Hinblick auf das Krankheitsbildes des ischämischen MIs weltweit, so lässt sich trotz wesentlich verbesserter akuter und chronischer Therapie ein unabdinglicher Handlungsbedarf feststellen. Laut Angaben der WHO wurde im Vergleich zum Jahr 2000 ein Anstieg von mehr als zwei Millionen Todesfälle im Jahr 2019 verzeichnet³.

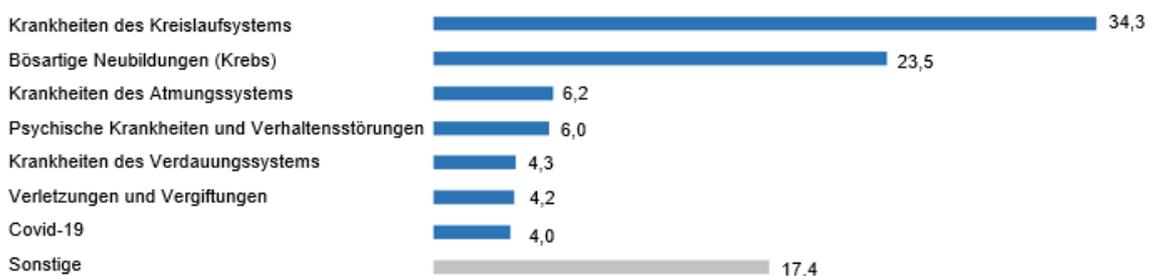


Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten (2020) in Deutschland in Prozent. Die hier dargestellten Todesfälle inkludieren sowohl männliche als auch weibliche Personen jeder Altersklasse².

1.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Charakteristisch für kardiovaskuläre Erkrankungen und entsprechende Manifestationen ist eine zeitlich vorausgehende atherosklerotische Veränderung der Arterien⁴. Hier ergibt es sich, dass dem initialen Ereignis einer endothelialen Dysfunktion eine Reihe weiterer, verschiedenster Prozesse folgt. Dabei steht vor allem die Akkumulation des *low density lipoproteins* (LDL) bzw. der oxidierten Form (oxLDL) in der Gefäß-Intima im Vordergrund. Als Konsequenz erfolgt eine Invasion von Immunzellen, allen voran Makrophagen aber auch T-Lymphozyten⁵. Zeitlich parallel kommt es zu einer Freisetzung zahlreicher Faktoren, die eben diese Rekrutierung stimuliert aber auch für deren Adhäsion am Endothel entscheidend ist. Um den Bereich nun eingrenzen zu können, mit dem Ziel, das umliegende intakte Strukturen in ihrer Integrität nicht durch beispielsweise Immunzellen kompromittiert werden, kommt es durch Einwanderung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu der Ausbildung einer sogenannten fibrösen Kappe. In Abhängigkeit der räumlichen Ausdehnung des gesamten Prozesses ergibt sich das klinische Bild einer partiellen Gefäßverengung (Stenose) mit eingeschränktem Blutfluss oder einem vollständigen Gefäßverschluss (Okklusion) mit der Folge einer Minderperfusion des betroffenen Areals. Letztlich gehört die Atherosklerose zu den chronisch-entzündlichen Erkrankungen, die nicht nur lokal begrenzt auftreten kann, sondern sich im gesamten arteriellen System in unterschiedlichem Ausmaß manifestiert. Bekannte Risikofaktoren umfassen unter anderem Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung sowie körperliche Inaktivität und sind starke Prädiktoren für das Auftreten atherosklerotischer Endothelveränderungen. Diese können in der Folge die Krankheitsbilder der Hypertonie, des Diabetes Mellitus Typ 2, der Hyperlipidämie und der Adipositas bedingen⁶, womit letztendlich der Weg für die oben beschriebenen Prozesse geebnet wird. Beispielsweise wird durch die langwierige Auswirkung hoher Blutdrücke im Gefäßsystem das Endothel derart in Mitleidenschaft gezogen, dass es zur Dysfunktionalität kommt. Bei der Hyperlipidämie liegen wiederum erhöhte Konzentrationen von oxLDL im Plasma vor, die am geschädigten Endothel über Wechselwirkungen akkumulieren können. Die Relevanz der Hyperlipidämie und Inflammation als eigenständige und unabhängige Risikofaktoren, lässt sich zudem bei Betrachtung des *CANTOS trial*, einer randomisierten, placebokontrollierten, prospektiven Studie, erkennen⁷. Mit der Darreichung eines antiinflammatorischen Wirkstoffs (Canakinumab), konnte hier die Rate an wiederkehrenden kardiovaskulären Ereignissen, unabhängig von der Lipidsenkung, signifikant verringert werden.

Trotz der sich stetig verbessernden Arzneimitteltherapie ist jedoch die Umstellung auf eine allgemein gesunde Lebensführung essenziell.

1.1.3 Der Myokardinfarkt (MI)

Ein auftretender MI definiert sich über den partiellen Untergang von Herzmuskelgewebe, dem sogenannten Myokard, auf Grund von Sauerstoffmangel (Ischämie). Häufig stellt die KHK die Basis der Ischämie dar, welche das oben beschriebene klinische Bild der Atherosklerose an den Koronargefäßen impliziert⁸. Neben der lokalen Ursache kann auch eine Ruptur eines atherosklerotischen Plaques in der Peripherie die Okklusion einer Koronararterie und den damit einhergehenden, örtlichen Sauerstoffmangel hervorrufen⁴. Letztlich resultiert jener Gefäßverschluss in einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung. Um die Diagnose des MIs stellen zu können, bedarf es der Messung einer gleichzeitigen Erhöhung des kardialen Troponin (*cardiac troponin*, cTn) I oder T oberhalb der 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches und weiterer Kriterien, bspw. einem bei der Angiographie detektiertem, intrakoronarem Thrombus^{9,10}. Zusätzlich wird die Symptomatik des Patienten hinsichtlich des Auftretens starker, häufig ausstrahlender retrosternaler Schmerzen aber auch anderer vegetativer Symptome wie Nausea betrachtet, wobei anzumerken ist, dass rund 20 % der Fälle asymptomatisch bzw. mit unspezifischen Symptomen verlaufen^{1,11}. So ist die Verwendung eines Elektrokardiogramms (EKG) sowohl in der Akut- als auch in der Postakutphase des MIs essenziell, welches abhängig vom Ausmaß der Wandschädigung den Befund des ST-Hebungsinfarkts (*ST elevation myocardial infarction*, STEMI) oder des Nicht-ST-Hebungsinfarkts (*non-ST elevation myocardial infarction*, NSTEMI) ergibt. Während sich ein STEMI durch seine transmurale Ausdehnung charakterisiert, beschränkt sich ein NSTEMI meist auf subendokardiale Bereiche. Diese Unterscheidung ist in vielerlei Hinsicht wichtig, da sich in Abhängigkeit des klinischen Bildes die Behandlung, nachfolgende Diagnostik und Mortalität ableiten lässt^{12,13}. Nicht nur mittels EKG-Diagnostik, sondern auch anhand differierender pathophysiologischer Vorgänge, Prognosen und resultierenden Therapieansätzen, lassen sich verschiedene Subtypen des MIs gegenwärtig klassifizieren. Der durch atherosklerotische Veränderungen mit konsekutiver Plaqueruptur hervorgerufene akuter MI (AMI) stellt Typ 1 dar. Typ 2 inkludiert ein breiteres Feld möglicher Ursachen, fokussiert sich im Allgemeinen aber auf eine generelle Dysbalance zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf, ausgelöst durch bspw. schwere, akute gastrointestinale

Blutungen oder einen hypotensiven Schock. Kommt es zu einem plötzlichen Herztod mit kardialer Kausalität, jedoch ohne Vorliegen von kardialen, AMI-typischen Biomarkern, wird dieser Fall Typ 3 des MIs zugeteilt. Ereignet sich ein MI in Folge einer perkutanen Koronarintervention (*percutaneous coronary intervention*, PCI) (4a), mittels Stentthrombose (4b) oder durch eine Restenose (4c), liegt die übergeordnete Kategorie 4 vor. Der Subtyp des MIs infolge einer *Bypass*-Operation wird unter der Kategorie 5 gefasst¹⁴.

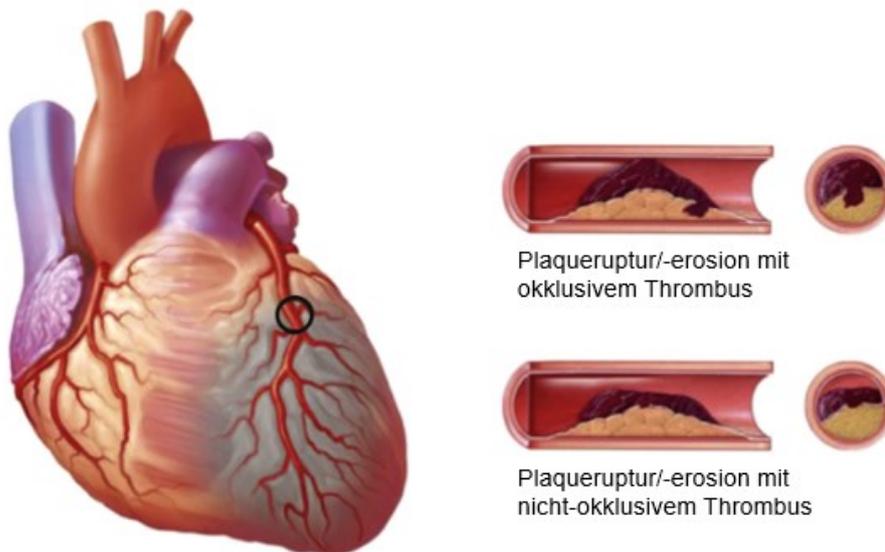


Abbildung 2: Myokardinfarkt Typ 1. Modifizierte Darstellung nach¹⁴, die die Pathogenese des durch atherosklerotische Veränderungen mit konsekutiver Plaqueruptur hervorgerufenen, akuten Myokardinfarkts darstellt.

1.1.3.1 Kardialer Metabolismus

Durch die unerlässliche Arbeit des Herzens dem Körper unter anderem ausreichend Sauerstoff zur Verfügung zu stellen, bedarf es einem effizienten Zusammenspiel aus Nährstoffbereitstellung und deren Umsetzung in verwertbare Energie. Entsprechend gestaltet sich das System derart funktional und robust, dass nicht nur eine Quelle als Energielieferant genutzt werden muss, sondern eine ganze Reihe verschiedener Substrate verwendet werden können¹⁵. Im physiologischen, aeroben Zustand bedienen sich die Kardiomyozyten vornehmlich der Beta-Oxidation von Fettsäuren und nur in sehr geringen Ausmaß der Glykolyse oder der Produktion von Guanosintriphosphat (GTP) durch den Citratzyklus¹⁶. Als wesentliche Einflussgröße der Aufnahme freier Fettsäuren in die Kardiomyozyten und konsekutiver Oxidation gilt die entsprechende Konzentration in den Arterien^{16,17}. Die Flexibilität bezüglich der Nutzung von bestimmten Substraten

zeigt sich auch in alternierenden äußeren Einflüssen. Im Zustand körperlicher Anstrengung und Bewegung vermag das Herz die steigenden Laktatkonzentrationen bevorzugt zu verwerten¹⁸. Liegt jedoch eine erhöhte Konzentration an Ketonkörpern vor, bspw. durch den Verzicht von Kohlenhydraten, wird die kardiale Fettsäureoxidation gehemmt, sodass diese Ketonkörper nun prädominant vom Herzen verwendet werden¹⁹. Doch nicht nur die Nutzung von Substraten wird dynamisch angepasst. Die Anpassungsfähigkeit auf verschiedene Stimuli lässt sich auch auf transkriptioneller Ebene wiederfinden. Hier offenbaren sich unter anderem die Mitglieder der Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor Familie (PPAR) alpha, beta/delta und gamma als wesentliche Regulatoren im Substratmetabolismus^{20,16,21}. Auch der Transkriptionsfaktor *Forkhead box protein O1* (FOXO1) nimmt Einfluss auf die Glykolyse oder Fettsäureoxidation²².

Im Zustand partieller Sauerstoffunterversorgung durch minderperfundierte Muskelgewebe im Rahmen eines MIs, weichen die Bedingungen einer aeroben Energiegewinnung auf Kosten anaerober Konditionen. So tritt eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung mit nachgeschalteter Beeinträchtigung der Beta-Oxidation auf²³. Folglich resultiert eine Dysbalance von Reduktionsäquivalenten wie Nicotinamadenindinukleotid (NADH, reduzierte Form des Koenzyms) zu NAD⁺ (oxidiertes Koenzym) und Flavinadenindinukleotid (FAD, oxidierte Form) zu FADH₂ (reduzierte Form). Dementsprechend kommt es zusätzlich zu einer Akkumulation von Acyl-Carnitinen und anderen Zwischenprodukten. Dieser Vorgang ist als kritisch zu betrachten, da die ohnehin schon vorliegende Einschränkung der mitochondrialen Funktion durch jene weiter verschärft wird. Um trotz anaerober Gegebenheiten lebenswichtiges Adenosintriphosphat (ATP) produzieren zu können, bedient sich die Zelle nun der anaeroben Glykolyse. Doch auch hier fallen mit Laktat und Protonen weitere Stoffwechselprodukte an, die wiederum vorgeschaltete Schritte der Glykolyse inhibieren²³. Somit potenziert sich die Ischämie-bedingte Unterversorgung, denn eine hohe Laktatkonzentration ist wiederum mit frühzeitigem Tod und anderen Komplikationen assoziiert^{24,25}. Darüber hinaus verkörpert die anaerobe Glykolyse einen in diesem Kontext unzureichenden Stoffwechselprozess hinsichtlich der Energiebereitstellung für die Herzfunktion²³.

In der Akutphase des Infarkts aber auch noch mehrere Stunden danach, kommt es neben oben beschriebener Umstellung zu einer drastischen Freisetzung von Katecholaminen, allen voran Noradrenalin, durch das sympathische Nervensystem^{26,27}, was dazu führt, dass die periphere Lipolyse forciert wird. Die Noradrenalin-bedingte Stimulation der Nebenniere wiederum fördert die Adrenalin-abhängige Glykogenolyse²⁸.

Folgt dem Ereignis der Ischämie die Reperfusionphase, können die freigewordenen Fettsäuren wieder vom Herzen aufgenommen und vornehmlich durch den Einfluss steigender Adenosinmonophosphat-abhängige-Kinase (AMPK) -Konzentrationen der Beta-Oxidation zugeführt werden. Auf diese Weise rehabilitiert sich die post-ischämische Stoffwechsellage wodurch die oxidative Metabolisierung der Glukose wiederum reduziert wird²⁹ und prä-ischämische Zustände hinsichtlich der Fettsäureverwertung wiederhergestellt werden. In gegebenen Kontext ist dieser Vorgang ebenfalls äußerst problematisch. Die nun erhöhte intrazelluläre Konzentration von freien Fettsäuren hemmt unter anderem die Pyruvatdehydrogenase, welche einen wichtigen enzymatischen Schritt katalysiert, der im physiologischen Zustand Einfluss auf die aerobe Glukoseoxidation nimmt^{30,31}. Die Konsequenz sind durch den anaeroben Glukosemetabolismus steigende Laktat- und Protonenkonzentrationen mit negativer Auswirkung auf die Herzfunktion durch fortschreitende azidotische Stoffwechsellagen^{32,33,34}. Neben einer pH-Wert assoziierten Beeinträchtigung kardialer Funktionen während post-ischämischen Konditionen, ist auch das nun vorherrschende Ungleichgewicht zwischen Fettsäureoxidation und Glukosemetabolismus zu berücksichtigen. Auf Grund der Tatsache, dass die Oxidation eines Mols Glukose lediglich 6 Mol Sauerstoff bedarf während die Oxidation von einem Mol Palmitat 31 Mol Sauerstoff benötigt, wird die Situation des Sauerstoffmangels durch den höheren Sauerstoffbedarf der Beta-Oxidation verschlechtert³⁵. Die pathologische Veränderung der Metabolisierung während und nach einem MI geht dementsprechend mit den negativen Auswirkungen der eigentlichen Ischämie einher. Dies zeigt sich auch in der vorteilhaften Einflussnahme auf die Stoffwechselprozesse nach MI, u.a. durch Inhibition der peripheren Lipolyse^{36,37,38}.

1.1.4 Die angeborene Immunabwehr

Um den Organismus vor äußeren Krankheitserregern aber auch durch pathologische Prozesse im Körper veränderte Zellen selbst zu schützen, bedient sich der Mensch einiger Mechanismen, die sowohl von Geburt an existieren (unspezifische Immunantwort) als auch über die Lebensjahre erlernt werden (spezifische Immunantwort). Im folgenden Abschnitt soll das angeborene zelluläre Immunsystem näher betrachtet werden, da die zugehörigen Kompartimente im Kontext des hier im Fokus stehenden MIs und des braunen Fettgewebes eine herausragende Rolle einnehmen.

Neben den humoralen Faktoren wie das Komplementsystem, Zytokine oder auch Lysozyme, nutzt der menschliche Organismus eine zelluläre Abwehr. Diese beinhaltet u.a. Granulozyten, welche sich durch das Pappenheim-Färbeverhalten wiederum in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten spezifizieren. Neutrophile besitzen ein großes Wirkspektrum, welches über die Hauptfunktion der Phagozytose und anschließender intrazellulärer Degradation von Zielzellen hinausgeht³⁹. Nach der Reifung aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark werden die Zellen durch das Zusammenspiel von CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4 (CXCR4) und CXCR2 freigesetzt^{40,41}, wobei Dendritische Zellen über die Produktion von *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) und *chemokine-(C-X-C-motif)-ligand-1* (CXCL1) regulatorischen Einfluss nehmen⁴². Sollten die nun zirkulierenden Neutrophilen auf keinen Mikroorganismus oder andere Zielzellen treffen, werden sie nach Übergang in einen apoptotischen Zustand durch patrouillierende Makrophagen selbst phagozytiert⁴³. Dieser Prozess resultiert letztlich in der Reduktion proinflammatorischer Zytokine mit nachgeschalteter Regulierung der Granulopoese⁴³. Kommt es jedoch zu einem Gewebsschaden bedarf es auch hier der Interaktion mit Makrophagen, welche u.a. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin-1b (IL-1b) freisetzen, und Endothelzellen, an denen die Neutrophilen über Integrine zum Ort des Geschehens „rollen“^{39,44}. Sie selbst sezernieren weitere Faktoren wie Leukotrien B4 (LTB4), um in der Nähe befindliche Neutrophile ebenfalls zum Zielort zu lenken⁴⁵. Neutrophile sind letztlich unabdinglich in Bezug auf die Auflösung eines entzündlichen Geschehens⁴⁴, wobei eine in diesem Kontext zeitlich übermäßige Neutrophilen-Antwort das Ausmaß des vorliegenden Schadens potenzieren kann⁴⁶. Da die Granulozyten auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Wachstumsfaktoren und Proteasen ausscheiden, wird die intakte Umgebung ebenfalls kompromittiert und eventuell nachhaltig geschädigt⁴⁶. Wie hier angedeutet nimmt auch das Monozyten/Makrophagen Netzwerk sowohl auf die Funktion der Neutrophilen als auch als phagozytierende Abwehrzellen selbst im Kontext des Immunsystems Einfluss. Monozyten werden in Abhängigkeit vom *macrophage colony-stimulating factor-1* (M-CSF1) und IL-3 in primären lymphatischen Organen aus myeloischen Vorläuferzellen gebildet⁴⁷, wobei im Rahmen der sogenannten „*emergency hematopoiesis*“ auch die Milz als Syntheseort benutzt wird⁴⁸. Die in der Milz produzierten Monozyten weisen im Gegensatz zu konstitutiv patrouillierenden Monozyten einen unterschiedlichen Phänotyp auf. So sind die dort entstehenden *lymphocyte antigen 6 complex*^{high} (Ly6C^{high}), *C-C chemokine receptor type 2*⁺ (CCR2⁺) -Monozyten von proinflammatorischen Charakter^{48,49}. Während Ly6C^{low} -Monozyten über die *toll like receptor-7* (TLR-7) -Signalkaskade auf Schäden am Endothel aufmerksam gemacht

werden und diese durch Rekrutierung von Neutrophilen beheben⁵⁰, werden die entsprechenden Ly6C^{high}-Monozyten zu einem akuten Entzündungsherd rekrutiert, wo sie proinflammatorische Zytokine freisetzen und gegebenenfalls nach Gewebsinvasion zu phagozytierenden, aus Monozyten-abgeleiteten Makrophagen differenzieren⁵¹. In Abhängigkeit des vorliegenden Stimulus und der Interaktion mit verschiedenen Proteinen wie CCR2/ *C-C chemokine ligand 2* (CCL2) oder CXCR1/CCL3 ergibt sich die Differenzierung der Monozyten in die sogenannten proinflammatorischen M1- bzw. die antiinflammatorischen M2- Makrophagen⁵². Der M1-Subtyp klassifiziert sich über die Sekretion von TNF α und IL-6 und der daraus folgenden T-Lymphozyten Aktivierung. Die Hauptaufgabe dieses Zelltyps lässt sich in der Phagozytose und Gewebsdegradation finden⁵³. Komplementär agiert der M2-Zelltyp in antiinflammatorischer Weise über die Sekretion von bspw. IL-10 mit dem Ziel der Gewebsregeneration^{51,54}. Neben den in der Zirkulation vorkommenden Monozyten und den daraus resultierenden Monozyten-abgeleiteten Makrophagen existieren jedoch auch gewebsresidente Makrophagenpopulationen wie Kupferzellen oder alveolar Makrophagen, die nicht durch Monozyten erhalten werden⁵⁵. Die Entwicklung der verschiedenen Makrophagenpopulationen, zirkulierend sowie gewebsresident, vollzieht sich in einem dreiphasigen Prozess, der letztlich die Synthese von Mikroglia im Gehirn, Besiedelung der fetalen Leber sowie über den Weg der Blutzirkulation Milz und Knochenmark hervorbringt⁵⁶. Wie hier angedeutet bedarf es einem fein abgestimmten Prozess zwischen diversen Zelltypen, der durch zahlreiche Einflüsse entsprechend der zugrundeliegenden Situation reguliert bzw. moduliert wird, um eine existierende interne oder externe pathologische Einflussnahme zu bekämpfen und entstehende Schäden zu reparieren.

1.1.5 Der Myokardinfarkt und das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem nimmt nicht nur in der Abwehr pathogener Mikroorganismen eine wichtige Funktion ein, sondern trägt zudem entscheidend sowohl in der Akutphase als auch im nachfolgenden regenerativen Prozess des MIs bei. Im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen ist jedoch die Rolle von Immunzellen, bspw. von Makrophagen, sehr divergent. Sowohl ihre unspezifische Depletion⁵⁷ als auch ihre übermäßige Präsenz⁵⁸ nehmen einen pathologischen Einfluss auf die generelle Mortalität oder das spezifische Linksherz-*Remodelling*.

Die Chronologie der Prozesse, die sich während und nach der „sterilen Entzündung“, ein Ausdruck, der die Entzündungsreaktion im Körper in Abwesenheit von Pathogenen

beschreibt, ergeben, beinhaltet kritische Initialereignisse gefolgt von parallel ablaufenden Signalkaskaden⁵⁹. Durch den Zelluntergang im Herzen nach der Okklusion einer Koronararterie kommt es zu einer Freisetzung enormer Mengen von *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die sowohl über TLR als auch über *receptors for advanced glycation endproducts* (RAGE) proinflammatorische Abläufe initiieren^{60,61}. Darüber hinaus sind auch Bestandteile der extrazellulären Matrix, Hitzeschockproteine und ROS essentielle Träger der Entzündungsreaktion⁶⁰. Die Konsequenz der nachgeschalteten Signalkaskade mündet in der Sekretion von Zytokinen und weiteren Botenstoffen, allen voran M-CSF⁶², TNF α ⁶³ und IL-1 β ⁶⁴, mit dem Ziel residente Immunzellen zu aktivieren sowie neue zu rekrutieren⁵⁹.

Nach der Aktivierung peripherer neutrophiler Granulozyten sind diese die ersten Immunzellen, die das ischämische Areal erreichen⁶⁵. Hauptsächlich akkumulieren sie in der Grenzzone zum ischämischen Gebiet^{59,65}. Dafür bedarf es jedoch der Interaktion mit Endothelzellen, die durch Hochregulation von Selektinen zirkulierende Neutrophile abfangen. Darüber hinaus wechselwirken die von Neutrophilen exprimierten CXCR2-Rezeptoren mit endothelgebundenen CXC-Chemokinen, was eine Konformationsänderung von Leukozytenintegrinen nach sich zieht und die Adhäsionskraft verstärkt⁶⁶. Die abschließende Transmigration durch die Endothel- bzw. Perizytschicht wird letztlich durch die vergrößerten, interzellulären Lücken, die klassischerweise in einem Entzündungsgebiet vorkommen, erleichtert⁶⁷. Rekrutierte Neutrophile sezernieren nun Zytokine und weitere Faktoren wie Proteasen und ROS, die den Entzündungsprozess weiter aufrechterhalten und andere Immunzellen anlocken. Als klassisch phagozytierende Zellen bereinigen sie das betroffene Gebiet von toten Zellen und Debris⁶⁵. Die Konsequenzen hinsichtlich der Post-Infarkt-Phase lassen sich jedoch nur widersprüchlich ausmachen. Um eine exzessive Immunantwort, die ihrerseits als Prädiktor für ein verschlechtertes Ergebnis nach einem MI zu werten ist, zu inhibieren, wurden bereits einige *Knockout*-Mausmodelle verwendet. Mit dem *Knockout* oder der pharmakologischen Inhibition vom *triggering receptor expressed on myeloid cells 1* (TREM-1) ergibt sich eine drastisch verringerte Neutrophilen-Rekrutierung in das ischämische Areal mit konsekutiv verbesserter linksventrikulärer Funktion und Überleben⁶⁸. Die vorliegende Studie zeigt auch eine positive Korrelation erhöhter humaner TREM-1 Plasmawerte nach MI und Tod innerhalb einer zwei Jahre *Follow-up* Periode. Darüber hinaus führt die Inhibition der Myeloperoxidase zu einer signifikanten Reduktion von Myeloidzellen im Herzen nach einem MI, was mit verbesserten kardialen Funktionswerten und reduzierter linksventrikulärer Hypertrophie einhergeht⁶⁹. Das hier skizzierte Bild der Neutrophilen als negativen Prädiktor hinsichtlich eines

verschlechterten *Outcomes* post MI muss jedoch differenzierter betrachtet werden. In einer weiteren Studie, in der Neutrophile mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers neutralisiert wurden, zeigen die Mäuse mit depletierten Neutrophilen in Kombination mit einem MI sowohl eine verschlechterte kardiale Funktion als auch vermehrt Fibrose und Heraufregulation von Biomarkern, die mit Herzinsuffizienz assoziiert sind⁷⁰. Nach den Autoren liegt die Begründung in der eingeschränkten Neutrophilen-Makrophagen Kommunikation, die unter Normbedingungen regulatorischen Einfluss auf den Entzündungsprozess und seine Auflösung nimmt. Ersichtlich sei dies an einer verminderten Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) -abhängigen *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER* (MertK) -Expression in kardialen Makrophagen und einer damit verbundenen reduzierten Phagozytose-Kapazität⁷⁰. Die quantitative Entfernung toten Materials ist jedoch eine essenzielle Voraussetzung für die anschließende Ausbildung einer stabilen und robusten Narbe, was die Wichtigkeit der Immunzellinteraktion unterstreicht⁷¹.

Zirkulierende proinflammatorische Ly6C^{high}, CCR2⁺, CX3CR1^{low} -Monozyten erreichen das Entzündungsgebiet zeitlich etwas versetzt zu infiltrierenden Neutrophilen^{72,73}. Doch auch sie werden durch eine Reihe von Zytokinen in Anlehnung an die Neutrophilen-Rekrutierung zu ihrem Bestimmungsort gelenkt. Hier kommen v.a. Zytokinen und DAMPs, wie *S100 calcium-binding protein a8* bzw. *a9* (S100a8/9), die sowohl von residenten Makrophagen und Kardiomyozyten als auch von B-Zellen freigesetzt werden, eine große Bedeutung zu^{72,74,75}. Um den Infarkt bedingten Schaden einzugrenzen, werden nicht nur periphere Monozyten stimuliert sondern auch *de novo* in Milz und Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen synthetisiert^{76,73}. Die Ly6C^{high} -Monozyten nehmen Einfluss auf die Entfernung von Zelldebris und erleichtern im späteren Verlauf den notwendigen Reparaturprozess, der im Anschluss an die Auflösung der Entzündung folgt. Hier werden vor allem Ly6C^{low}, CX3CR1^{high} -Monozyten aktiv, die entweder selbst rekrutiert werden oder sich aus ihren Ly6C^{high} -Vorläufern entwickeln⁷⁷. Dieser reparative, antiinflammatorische Zelltyp dominiert in der späteren Phase nach einem MI und exprimiert vaskular-endotheliale Wachstumsfaktoren, um mittels Angiogenese und Myofibroblasten-Akkumulation zur Heilung beizutragen⁷⁷. Auch aus Makrophagen differenzierte Monozyten tragen maßgeblich zum Geschehen nach einem MI bei. Es zeigt sich, dass residente CCR2⁻ -Makrophagen, die vornehmlich embryonalen Ursprungs sind, Angiogenese und Kardiomyozyten-Proliferation in neonatalen Mäusen stimulieren und einen prädominant antiinflammatorischen Phänotyp verkörpern⁷⁸. Darüber hinaus weisen CCR2⁺ -Monozyten-differenzierte Makrophagen einen proinflammatorischen Subtyp auf⁴⁹. Durch die Inhibition der CCR2-abhängigen

Monozyten-Rekrutierung in das Herz nach MI mit Hilfe eines entsprechenden Antagonisten, zeigt sich ein Erhalt von residenten MHC-II^{low} CCR2- und MHC-II^{high} CCR2-Makrophagen. Infolgedessen kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Faktoren MCP-1, IL-1b, IL-6, und TNF α sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene. Auf Grund des Erhalts der residenten Makrophagen bleibt die koronare mikrovaskuläre Integrität weitgehend erhalten, wodurch die Regenerationskapazität bewahrt wird. Die angeführten Beobachtungen konnten durch eine weitere Studie untermauert und erweitert werden. Eine Depletion residenter CCR2⁻-Makrophagen im Vorfeld des MIs resultiert in einer signifikanten Verschlechterung kardialer Funktionsparameter sowie in einer vergrößerten Narbe im Vergleich zu Kontrolltieren⁴⁹. Ferner trägt die Methodik der Einzelzellsequenzierung zu Erkenntnissen der Heterogenität bestimmter Immunzellsubtypen bei. Allgemein betrachtet wird der Großteil gewebsresidenter Makrophagen nach einem MI ersetzt. Die Studie um Robbins und Epelman⁷⁹ zeigt jedoch, dass eine Subpopulation von residenten Makrophagen, die sich über die Expression von CCR2⁻MHC-II^{lo}TIMD4⁺LYVE1⁺ spezifiziert, über den MI hinaus persistiert. In Folge der Depletion dieser nur zu 2-5 % der Makrophagen ausmachenden Gruppe, verschlechtert sich die kardiale Funktion und beeinträchtigt die Heilung nach MI.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Heterogenität der sogenannten „*steady state*“-Makrophagen und die rekrutierten Vorläufer einen immensen Einfluss mit jeweils distinkten Eigenschaften auf das Geschehen nach einem MI haben. Während eine exazerbierende Leukozytose mit linksventrikulärer Dysfunktionalität korreliert⁸⁰ und Monozyten-Subtypen einen Prädiktor für auftretende kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen⁸¹, geht die unspezifische Depletion von Monozyten mit einer erhöhten Mortalität durch Kompromittierung der Heilung nach einem MI einher⁸².

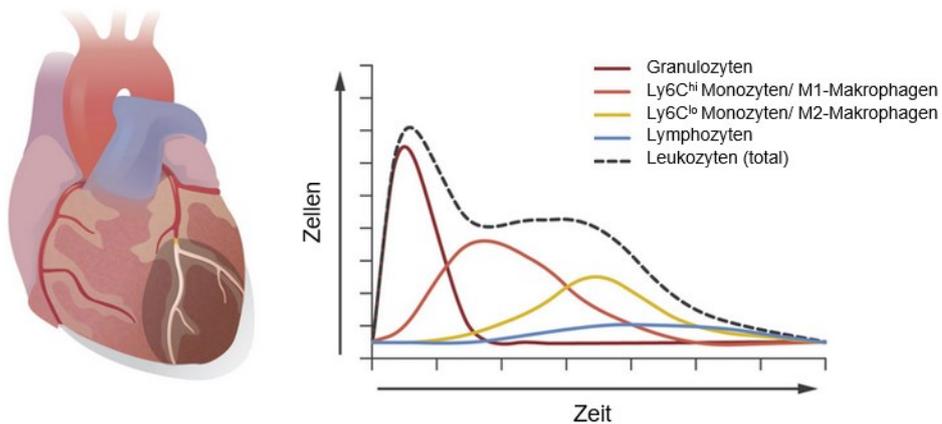


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Immunzellinfiltration in Abhängigkeit von der Zeit nach Myokardinfarkt. In dem hier abgebildeten und nach⁸³ modifizierten Diagramm zeigt sich die zeitabhängige Infiltration und Entwicklung von Immunzellen im Herzen nach dem Myokardinfarkt.

1.2 Braunes Fettgewebe

1.2.1 Charakteristika

Gegenwärtig sind vier verschiedene Arten des Fettgewebes mit unterschiedlichen Charakteristika bekannt. Weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), welches sich durch eine univakuoläre Morphologie auszeichnet, dient vor allem der Speicherung zugeführter Nahrungsfette in Form von Triglyzeriden und deren Freisetzung in Zeiten der Nahrungskarenz sowie der Funktion eines endokrinen Organs. Diese Hauptfunktion ergänzend lassen sich je nach Lokalisierung entsprechender Fettgewebsdepots weitere Aufgaben determinieren. So wirkt das subkutan (s.c.) gelegene weiße Fettgewebe zusätzlich einem möglichen Wärmeverlust durch externen Kälteeinfluss entgegen, indem es als eine Art Isolationsschicht fungiert^{84,85}. Hingegen nützt das viszeral lokalisierte weiße Fettgewebe der Polsterung innerer Organe. Darüber hinaus existiert mit dem Knochenmarksfettgewebe (*bone marrow adipose tissue*, BMAT) ein weiterer Subtyp⁸⁶. Die Verortung desselbigen impliziert die modulierende Wirkung auf die Knochenhämöostase⁸⁷, wobei auch hier endokrine Eigenschaften zum Tragen kommen. Auch ein Einfluss auf den systemischen Glukose-Metabolismus mit klarer Abgrenzung zum WAT und Muskelgewebe ist beschrieben⁸⁸. Neben den aufgeführten weißen Fettgewebsdepots stellen beige Adipozyten eine weitere Zellentität dar⁸⁹. Sie können durch entsprechende Stimulation im weißen Fettgewebe induziert werden, wobei sie ähnliche morphologische und funktionelle Eigenschaften wie das klassische braune Fettgewebe aufweisen, welches im Folgendem ausführlicher beschrieben ist.

Im Gegensatz zu dem weißen ist das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) durch eine hohe Mitochondrien-Anzahl sowie durch die Morphologie von multilokularen Lipidtröpfchen charakterisiert. Betrachtet man die Genese der braunen im Vergleich zu weißen Adipozyten lassen sich auch hier Unterschiede ausmachen: Braune Präadipozyten entwickeln sich aus *myogenic factor 5 gene* (Myf5) -positiven myogenen Vorläuferzellen im Zusammenspiel mit den Transkriptionsregulatoren *PR domain containing 16* (PRDM16)⁹⁰ sowie *early B-cell factor 2* (EBF2)⁹¹ und weiteren Transkriptionsfaktoren (bspw. *CCAAT/Enhancer Binding Protein*, CEBP/b)⁹². Es ergibt sich also ein distinkter Zelltyp, der sich durch eine einzigartige Genexpression spezifiziert. Hierfür essentiell ist das Vorhandensein des *uncoupling protein 1* (UCP1), ein BAT-spezifisches Protein mit der Hauptfunktion der zitterfreien Thermogenese⁹³. Neben der divergenten Adipogenese ist auch die Lokalisierung bezüglich der Charakterisierung des Fettgewebsdepots von ausschlaggebender Bedeutung. Bei Neugeborenen offenbart sich ein großes BAT-Depot vor allem interskapulär und macht so näherungsweise 5 % der Körpermasse aus. Dies ist von enormer Bedeutung hinsichtlich des postnatalen Erhalts von Normothermie, einem kritischen Aspekt auf Grund der Tatsache, dass Neugeborene ein größeres Körperoberflächen-zu-Körpervolumen-Verhältnis aufweisen. Die beiden Messgrößen dienen als Surrogatparameter für die Ratio Wärmeverlust zu Wärmeproduktion⁹⁴. In Erwachsenen ergibt sich ein sichtlich anderes Erscheinungsbild. Mittels Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie (PET-CT), kombiniert mit einer ¹⁸F-Fluoresoxyglukose-Injektion (¹⁸F-FDG-PET-CT), detektiert man hier eine vor allem parazervikale und supraklavikuläre Verortung, wobei es sich darüber hinaus auch paraspinal, abdominal, axillär und mediastinal lokalisiert^{95,96}. Letztlich ist die Prävalenz des BAT im Erwachsenen stark abhängig von dem *body mass index* (BMI), dem Alter, der Außentemperatur, dem Geschlecht und anderen Einflussgrößen. Sie bedingt die Kapazität der zitterfreien Thermogenese sowie das Ausmaß der endokrinen Funktion. BAT wird vornehmlich sympathisch durch vorausgehende Einflussnahme des ventromedialen hypothalamischen Nukleus aktiviert⁹³. Dieser wiederum erkennt bspw. den Bedarf an Wärmeproduktion und moduliert die Freisetzung von Katecholaminen, wobei die charakteristisch ausgeprägte Innervation des BAT diesbezüglich einen unterstützenden Einfluss nimmt^{93,97}. Für die Funktion der BAT-spezifischen Thermogenese ist die Bindung des Noradrenalins an den Beta-3-Rezeptor, welcher den prädominanten Subtyp in braunen Adipozyten ausmacht, essenziell. Der aktivierte Gs-gekoppelte Rezeptor aktiviert nun die Adenylatzyklase, wodurch die intrazelluläre cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) -Konzentration erhöht wird. Nachfolgend wird die

Proteinkinase A (PKA), eine Serin/Threonin-Kinase, stimuliert, die wiederum zahlreiche Substrate phosphoryliert. Beispielhaft hierfür ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors *cAMP responsive element binding protein* (CREB), der unter anderem die Expression von UCP1 herbeiführt. Neben dem Einfluss auf Transkriptionsebene sind zwei direkte Effekte für die Thermogenese entscheidend: Einerseits wird Perilipin durch Phosphorylierung degradiert, wodurch es nicht mehr in der Lage ist, enthaltene Triglyzeride (TGZ) vor der Lipolyse zu schützen. Andererseits kann die nun phosphorylierte und somit aktivierte hormonsensitive Lipase (HSL) die TGZ in freie Fettsäuren verstoffwechseln. Im Folgendem werden die Fettsäuren enzymatisch in Acetyl-CoA metabolisiert, welches in die Mitochondrien transportiert wird und so der Beta-Oxidation und dem Citratzyklus zugeführt werden kann. Als Resultat werden die generierten Coenzyme FADH und NADH im Zuge der Atmungskette oxidiert, Elektronen und Protonen generiert und entlang der Komplexe I-IV der Atmungskette transportiert. Nun kommt die entscheidende Funktion des UCP1, welches zu der Familie der Mitochondrientransportproteine gehört und sich in der inneren mitochondrialen Membran befindet, zum Tragen. Aktiviertes UCP1 entkoppelt die Protonenschleife, die den Komplex IV und V verbindet. Folglich kann Komplex V auf diese Weise kein ATP mehr erzeugen, sodass die durch die Atmungskette hervorgebrachte Energie in Wärme freigegeben wird. Entscheidend bei der beschriebenen thermogenen Wirkungsweise ist die vorausgehende Lipolyse bzw. das Vorhandensein freier Fettsäuren⁹⁸.

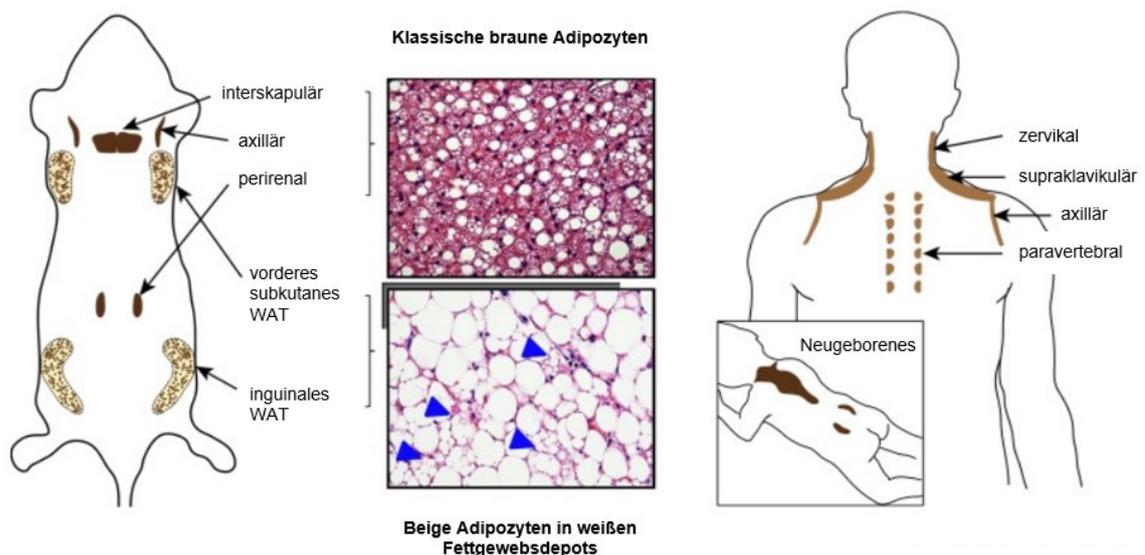


Abbildung 4: Anatomische Lokalisation der verschiedenen Adipozytenarten in Maus und Mensch. Die modifizierte, partielle Darstellung nach⁸⁹ zeigt das dominante interskapulär befindliche braune Fettgewebe (BAT) in der Maus und im Neugeborenen, während es im adulten Menschen vor allem parazervikal und supraklavikulär verortet ist. Ebenso ersichtlich ist das morphologische Erscheinungsbild des BAT, des weißen Fettgewebes (WAT) und der induzierbaren beige Adipozyten.

1.2.2 Die endokrine Funktion des braunen Fettgewebes

Braunes Fettgewebe weist neben der zitterfreien Thermogenese auch endokrine, parakrine und autokrine Eigenschaften auf. Beispielhaft sei hier der *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) genannt, welcher nach vorangegangener BAT-Aktivierung mittels Kälte verstärkt sezerniert wird⁹⁹. Nachfolgend wird autokrin die Vaskularisierung sowie die Gefäßpermeabilität des Fettgewebes selbst gesteigert, um eine Anpassung der zitterfreien Thermogenese an die niedrigere Temperatur zu gewährleisten¹⁰⁰. Darüber hinaus nimmt VEGF-A positiv Einfluss auf das Überleben und die Proliferation von braunen Adipozyten. Neben Wachstumsfaktoren üben auch Zytokine wie *bone morphogenic proteins* (BMPs) Funktionen in autokriner Weise auf BAT aus. BMP7 bedingt vornehmlich die Differenzierung brauner Prä-Adipozyten mittels Aktivierung der Adipogenese, einen Prozess, der ebenfalls die Induktion einiger essentieller Faktoren wie *Prdm16* und *Pparg coactivator 1a5* inkludiert¹⁰¹. Überexprimiert man selektiv BMP7 im Mausmodell führt dies zu einer signifikanten und spezifischen Zunahme der braunen Fettmasse und Erhöhung des Energieverbrauchs einhergehend mit einer verminderten Gewichtszunahme¹⁰¹. Während BMP7 überwiegend in Prä-Adipozyten exprimiert ist, weisen ausgereifte braune Adipozyten indessen BMP8b auf¹⁰². Das Protein, was ebenfalls zur *transforming growth factor b* (TGFb) -Familie gehört, nimmt regulatorischen Einfluss auf die BAT-assoziierte Thermogenese unter konsekutiver Modifizierung des Energiehaushaltes¹⁰². Durch die Erkenntnis der sekretorischen Charakteristika des braunen Fettgewebes in Kombination mit metabolischen Eigenschaften führten weitere Studien zu Determinierung mehrerer systemisch, relevanter Faktoren¹⁰³. Mittels Transplantation embryonalen BAT in Typ 1 diabetischen Mäusen, werden unter anderem *insulin like growth factor 1* (IGF1) vermittelt euglykämische Stoffwechsellagen wiederhergestellt¹⁰⁴. Ein klassisches so genanntes Batokin, eine sprachliche Anlehnung an Adipokine, welche dem weißen Fettgewebe entstammen, lässt sich wiederum mit *fibroblast growth factor 21* (FGF21) benennen. Während die Leber der Hauptsyntheseort des Proteins ist, sezerniert das braune Fettgewebe nach Stimulation desselben ebenfalls substantielle Mengen^{105,106}. Die pharmakologische Anwendung von FGF21 im Mausmodell zeigt eine Verbesserung diabetischer Stoffwechsellagen u.a. durch einen erhöhten Energieverbrauch und eine effizientere Fettverwertung¹⁰⁷ sowie eine erhöhte Glukose-Transporter 1 (*Glut1*) -Expression¹⁰⁸. Neben der endokrinen Funktion weist sezerniertes FGF21 auch eine autokrine Wirkungsweise auf, wodurch die Expression von *Ucp1* erhöht und die thermogene Kapazität gesteigert wird¹⁰⁹. Interessanterweise unterscheidet sich die Expression von FGF21 im menschlichen Organismus im

Vergleich zur Maus. Während es im gesundem, humanen weißen Fettgewebe nur marginal existent ist, wird es hingegen im braunen Fettgewebe konstitutiv und nach BAT-Stimulation vermehrt exprimiert und sezerniert¹¹⁰.

Die sekretorische Kapazität des braunen Fettgewebes wirkt synergistisch mit den metabolischen Eigenschaften und trägt somit zu einer physiologischen Lage im Organismus bei. Neben den hier aufgeführten und kurz beschriebenen Mediatoren stellt BAT ebenfalls eine Quelle für weitere Faktoren mit endokrinen Eigenschaften, wie bspw. *insulin-like growth factor-binding protein 2* (IGFBP-2), *retinol binding protein 4* (RBP4) und Neuregulin 4, dar¹⁰³.

1.2.3 BAT im immunologischen Kontext

Ein Charakteristikum der Adipositas ist die parallel vorliegende systemische Entzündung des weißen Fettgewebes, die durch die stetige Freisetzung proinflammatorischer Faktoren weiter aufrechterhalten wird. Die oben beschriebenen Unterschiede zwischen weißem und braunem Fettgewebe hinsichtlich der Verwertung von zugeführten Nahrungsbestandteilen führen sich auch hier im immunologischen Zusammenhang fort. Allerdings befinden sich im BAT selbst zahlreiche Immunzellen mit distinkten Funktionen, sowohl mit lokalen als auch systemischen Auswirkungen. Im allgemeinen Vergleich der beiden Fettgewebsdepots lässt sich jedoch feststellen, dass BAT im Vergleich zu WAT generell resistenter gegenüber aufkommenden Entzündungsreaktionen ist¹¹¹.

Es zeigt sich, dass im BAT residente CXCR1⁺-Makrophagen zur Innervation desselbigen beitragen, was wiederum Einfluss auf die Noradrenalin-abhängige Thermogenese nimmt und damit auf die Körperkomposition¹¹². In diesem Kontext nehmen auch sogenannte „*sympathetic neuron-associated macrophages*“ regulatorischen Einfluss auf die Noradrenalin-Konzentration, indem sie das Noradrenalin aufnehmen und Monoaminoxidase A (MAO-A) -abhängig degradieren, um einem möglichen Überfluss entgegenzuwirken¹¹³. Angelehnt an den vorangegangenen Abschnitt lassen sich residente Makrophagen im BAT als M2-polarisiert klassifizieren, während in adipösen Stoffwechsellagen M1 -Makrophagen immigrieren können¹¹⁴. Im murinen Modell der Fettleibigkeit besitzen sowohl einwandernde Makrophagen als auch T-Lymphozyten einen proinflammatorischen Charakter, was u.a. durch die Messung von erhöhten IL-6, M-CSF1 und TNF α -Werten sowie vermehrter ROS Produktion mit kompensatorischer Erhöhung von Antioxidantien wie Vitamin E ersichtlich wird¹¹⁵.

Unterdessen kann hier mit einem zusätzlichen *Knockout* der TNF-Rezeptoren eine Verbesserung der thermogenen Kapazität im Vergleich zu Tieren, die über eine funktionale TNF-Signalkaskade verfügen, gezeigt werden¹¹⁶. Durch den entsprechenden *Knockout* wird die Apoptose in braunen Adipozyten reduziert und die Beta-3-Rezeptor- sowie die *Ucp1*-Expression verstärkt¹¹⁷.

1.3 Braunes Fettgewebe und das kardiovaskuläre System

Zusätzlich zu der lang bekannten thermogenen Kapazität des BAT ergeben sich aus neueren Studien stetig mehr Informationen über zusätzliche Wirkungsweisen und Wirkungen desselbigen. Kommt es durch akute oder zeitlich längerfristige Kälteexposition zu einer Stimulation peripher lokalisierter *transient receptor potential* (TRP) -Kanäle in sensorischen Neuronen wird der Sympathikus und konsekutiv das BAT aktiviert. Die oben beschriebene UCP1-abhängige Thermogenese führt dann über Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einem erhöhten Energieverbrauch und vermindert auf diesem Weg den Körperfettanteil¹¹⁸. Oft gehen mit diesem Krankheitsbild auch erhöhte Plasma-Triglyzeridkonzentrationen einher, welche isoliert betrachtet selbst einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen¹¹⁹. Auch in diesem Kontext offenbart sich ein positiver Effekt der durch Kälteexposition hervorgerufenen BAT-Aktivierung. Der Kältestimulus-bedingte Lipoprotein-Umsatz resultiert in einer Modellierung der Endothelpermeabilität, woraufhin mehr triglyzeridreiche Lipoproteine ins BAT internalisiert werden können¹²⁰. Dieser Effekt wird neben einer lokal erhöhten Lipoproteinlipase-Aktivität durch eine verstärkte CD36-Expression, ein Membranprotein, welches in der Hauptfunktion freie Fettsäuren ins Zellinnere transportiert, hervorgerufen¹²¹. Neben der Einflussnahme auf den Fettstoffwechsel kann BAT auch eine Verbesserung der Insulinresistenz bewirken^{122,123}. Basierend auf einer in der Literatur beschriebenen Assoziation zwischen Übergewichtigkeit und erhöhten Serotoninspiegel¹²⁴ kann in einem genetisch modifiziertem Mausmodell eine Korrelation zur BAT-Aktivierung hergestellt werden. Die für das Gen der Tryptophanhydroxylase (*Tph1*), welches essenziell für die Biosynthese von Serotonin ist, defizienten Mäuse, entwickeln unter einer hochkalorischen Fütterung eine signifikant reduzierte Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolle. Darüber hinaus rehabilitiert sich ebenfalls die Glukosetoleranz und die Insulinresistenzlage. Als zu Grunde liegender Mechanismus wird eine gesteigerte Sensitivität von Beta-Adrenozeptoren gegenüber Katecholaminen postuliert, wodurch die cAMP-vermittelte Signalkaskade in braunen Adipozyten

effizienter abläuft. Zusätzlich resultiert auch in diesem Zusammenhang eine erhöhte *Ucp1*-Expression, wodurch sich eine positive Wirkung auf die Energiebilanz in adipösen Stoffwechsellagen ergibt¹²⁵. Wie in der Einführung bereits dargelegt, verkörpert die Entstehung bzw. die Progression atherosklerotischer Plaques die Grundlage eines möglichen MIs. Auch hier bewirkt eine Aktivierung des braunen Fettgewebes mit einem Beta-Adrenozeptoren-Agonisten einen positiven Effekt. Durch die Verbesserung des Plasma-Cholesterin-Profils und in Anwesenheit bzw. voller Funktionalität des Apolipoproteins E (ApoE) sowie des LDL-Rezeptors kann durch die pharmakologische Stimulation des BAT eine drastische Verringerung atherosklerotischer Läsionsflächen erzielt werden¹²⁶.

Neben seiner vorteilhaften metabolischen Einflussnahme durch Verbesserung des Glukose- und Lipidprofils agiert BAT wie beschrieben als endokrines Organ mit der Sekretion so genannter Batokine. In einem hypertensiven Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein BAT-spezifischer *Knockout* des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors (A_{2A}R) zu einer Dysfunktionalität von braunem Fettgewebe führt und sukzessiv in einem verschlimmertem kardialen *Remodelling* resultiert¹²⁷. Erklärt wurde dieser Effekt mit dem durch den *A2ar-Knockout* bedingte Abfall des FGF-21 Plasmaspiegels. Auch im murinen Modell der Ischämie/ Reperfusion wurde der protektive Einfluss des FGF-21 dargestellt¹²⁸. Das von der Leber aber auch vom Fettgewebe sezernierte Protein interagiert mit dem FGF-Rezeptor 1 (FGFR1) und bewirkt über den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) – Proteinkinase B (PKBa) -Signalweg eine Reduktion der Apoptose sowie das verbesserte Überleben von Kardiomyozyten¹²⁸. Ferner zeigte eine 2015 veröffentlichte Studie in einem *Ucp1-Knockout* Mausmodell eine Verschlechterung des linksventrikulären *Remodelling* hinsichtlich einer gesteigerten Hypertrophie durch eine 14-tägige Isoproterenol-Infusion im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle¹²⁹. Zugrunde lag eine gesteigerte Kardiomyozyten-Schädigung und Tod, begleitet durch eine erhöhte Fibrose. Interessanterweise ist ferner die Überlebensrate der *Ucp1-Knockout* Mäuse im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert. Durch die Transplantation von intaktem braunem Fettgewebe in *Ucp1*-defiziente Mäuse konnte jedoch eine Reduktion der Kardiomyozyten Schädigung bei Katecholamin-induzierter Kardiomyopathie erzielt werden¹²⁹. Darüber hinaus führte implantiertes funktionales BAT zu einer Begrenzung der Fibrose und des linksventrikulären *Remodellings*. Als zu Grunde liegender Mechanismus wurde ein abgeschwächter, PKB-abhängiger kardioprotektiver Signalweg in *Ucp1-Knockout* Mäuse angeführt¹²⁹.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen BAT-abhängigen Effekte hinsichtlich der Reduktion vermeintlicher kardiovaskulärer Risikofaktoren lassen sich in einer 2021

publizierten Arbeit zusammenfassen⁹⁵. Durch die Evaluierung von ¹⁸F-FDG-PET-CT Scans von über 50.000 Patienten wurde eine Korrelation zu in der Studienpopulation präsenten kardiovaskulären Krankheiten hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die generelle Existenz und die detektierte Menge an braunem Fettgewebe mit einem geringeren Vorkommen von koronarer Herzkrankheit, zerebrovaskulären Erkrankungen, kongestiver Herzinsuffizienz und Bluthochdruck einherging. Darüber hinaus zeigten Patienten mit positivem Scan-Ergebnis für BAT geringere Diabetes Mellitus Typ 2- und Dyslipidämie-Prävalenzen. Neben der Glukose- und Fettsäure-reduzierenden Wirkung des BAT wurden auch andere Mechanismen diskutiert. Die Abwesenheit von braunem Fettgewebe hing bspw. mit einer höheren Leukozytenzahl zusammen, ein Parameter, der für sich genommen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen korreliert¹³⁰.

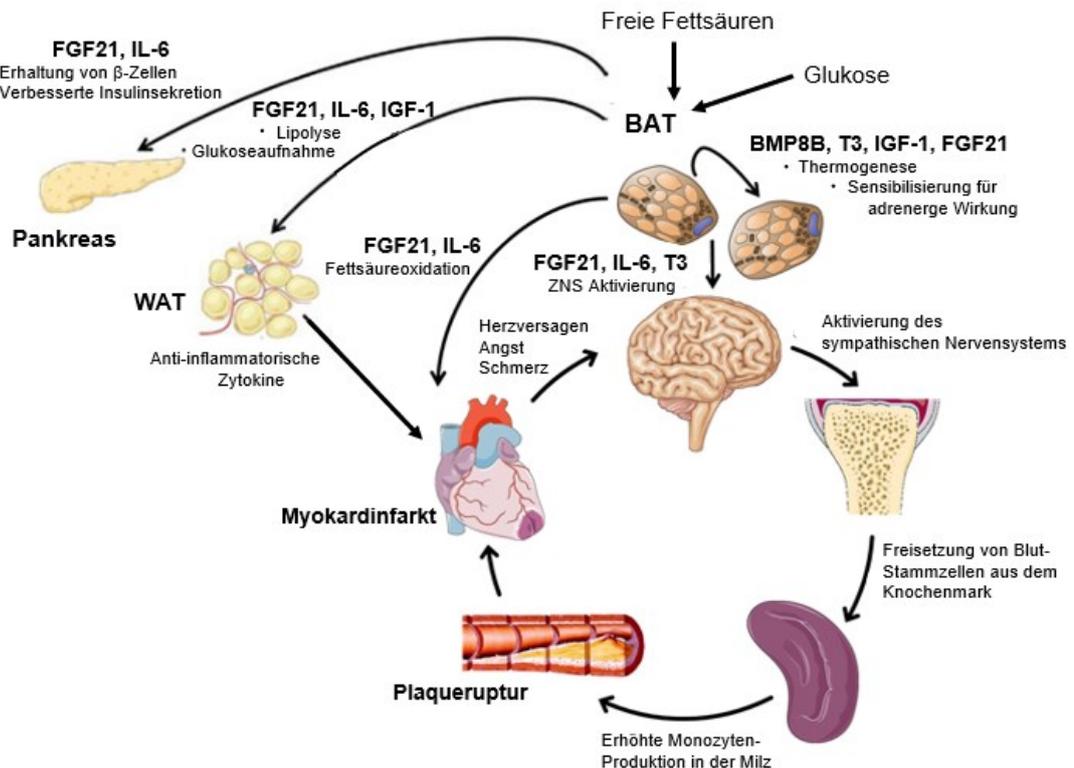


Abbildung 5: Braunes Fettgewebe im Kontext einer organübergreifenden humoralen Kommunikation in kardiovaskulären Erkrankungen. Die Darstellung (modifiziert nach¹³¹) zeigt eine Einflussnahme des braunen Fettgewebes (BAT) nach Aktivierung im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen durch die Sekretion von Batokinen und unter Verwendung von freien Fettsäuren und Glukose als Substrate für die zitterfreie Thermogenese. (Die Abbildung beinhaltet modifizierte Elemente von Servier Medical Art (lizenziiert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0))

1.4 Präliminäre Ergebnisse

Um den Einfluss des BAT auch im Kontext einer Ischämie/Reperfusion (I/R) -Verletzung zu eruieren, wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits die kardiale Funktion nach einer chirurgischen Entfernung des interskapulären braunen Fettgewebes und I/R-Operation untersucht. Als Kontrolle diente eine sogenannten BAT-*Sham* Operation, bei der das braune Fettgewebe zwar weitestgehend intakt belassen wurde, jedoch bis auf die Entnahme ein vergleichbarer Eingriff interskapulär stattfand. Die mittels Echokardiographie vor und nach der I/R-Operation vermessenen Parameter zeigten eine signifikante Einschränkung derselbigen, sofern das BAT im Vorfeld entfernt wurde (Abb. 6). Sowohl die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (Abb. 6A, EF nach 21 Tagen: BAT-Ablation: 29,1 % vs. BAT-*Sham*: 39,8 %) als auch das endsystolische- und enddiastolische Volumen (Abb. 6B, C) waren in der BAT-Ablationsgruppe signifikant über die Beobachtungszeit von 21 Tagen im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkt.

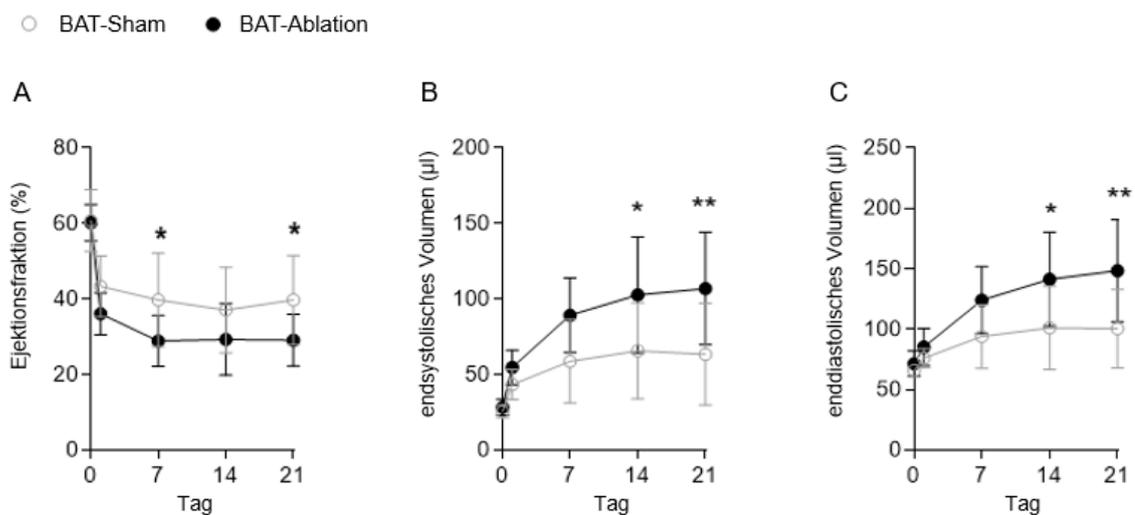


Abbildung 6: Die kardiale Funktion der BAT-ablatierten Tiere und der Kontrollen bis 21 Tage nach Myokardinfarkt. Echokardiographische Erhebungen **A**, der Ejektionsfraktion (%) **B**, dem endsystolisches Volumen (μl) und dem **C**, enddiastolischen Volumen (μl) in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. der BAT-Ablation. Die Daten wurden zum Zeitpunkt 0 (Basaldaten, vor dem Anbringen der Ligaturanlage), 24 Stunden, 7, 14 und 21 Tage nach der Induktion des Myokardinfarkts durch Frau Dr. Simone Gorressen erhoben. ($n = 8,11$ für jeden Zeitpunkt). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden durch eine *two-way*-ANOVA berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Darüber hinaus konnte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Ulrich Flögel (Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) die Herzfunktion einen Tag nach der I/R-Operation in Kombination mit der BAT-*Sham* bzw. BAT-Ablation evaluiert werden. Die in Abbildung 7A dargestellten Aufnahmen

resultierten 24 Stunden nach MI und ließen mittels *late gadolinium enhancement* (LGE) -Kontrast Aussagen über die Größe der ischämischen Region zu. Das optisch größere ischämische Areal (gelbe Pfeile) ließ sich auch im korrespondierenden Graphen (Abb. 7B) anhand der zugrundeliegenden Werte erkennen. Darüber hinaus wurde bei den Tieren, die eine BAT-Ablation im Vorfeld der I/R-Operation erhalten haben, eine signifikante Reduktion der linksventrikulären EF (Abb. 7C) vermessen. Somit zeigte sich eine persistierende Verschlechterung der kardialen Funktion über die Zeit, die bereits einen Tag nach der I/R-Operation präsent war.

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

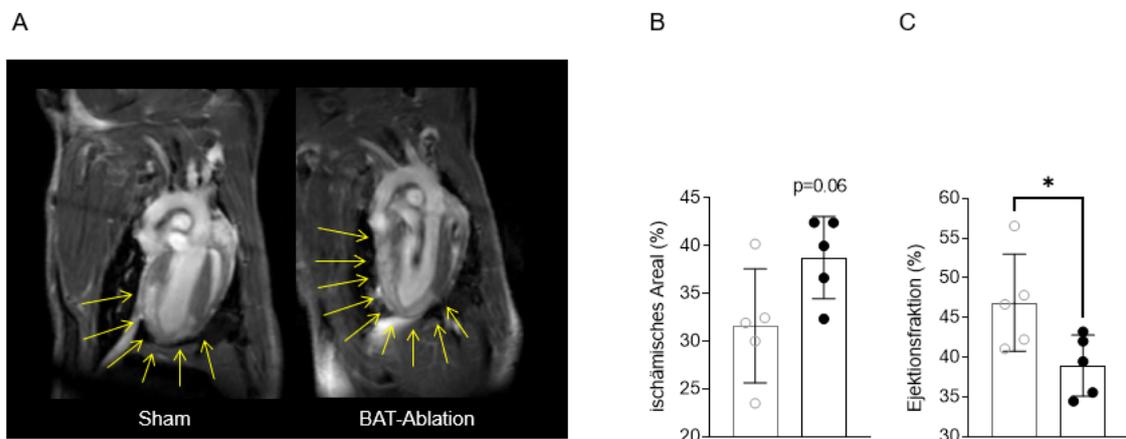


Abbildung 7: Die kardiologische Funktion der BAT-ablatierten Tiere und der Kontrollen 24 Stunden nach Myokardinfarkt. ¹H-NMR Erhebungen: **A**, repräsentative Bilder des Herzes 24 Stunden nach Myokardinfarkt mittels LGE-Methode in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham*-Operation oder der BAT-Ablation **B**, ischämisches Areal (%) (n=5,5) **C**, Ejektionsfraktion (%) (n=5,5). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanz wurde durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, p < 0,05. Die Daten wurden durch Prof. Ulrich Flügel erhoben.

1.5 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob BAT im Kontext des kardialen Ischämie- und Reperusionsmodell a) aktiviert wird und b) welche Effekte mit einer nachfolgenden Aktivierung assoziiert sind. Zu diesem Zweck wurde auch der Einfluss einer chirurgischen BAT-Entfernung auf die Immunzellantwort vor und nach I/R erfasst. Hintergrund der angeführten Überlegungen ist die Tatsache, dass BAT neben seiner thermogenen Funktion auch endokrine Eigenschaften besitzt. Nach einem AMI kommt es durch das sympathische Nervensystem zu einer massiven Freisetzung von Katecholaminen, welche wiederum die Funktion des BAT direkt beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass BAT durch die Regulation der *Lipid Clearance* und Glukosehämostase einen modulierenden Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen nimmt. Auf Grund dieser charakteristischen Funktion, Lipide und Glukose als Substrate im Zuge der Thermogenese zu nutzen, im Zusammenspiel mit der Sekretion systemisch aktiver Faktoren, wurde eine entscheidende Rolle des braunen Fettgewebes im Kontext des AMIs angenommen. Dementsprechend konnte unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten bereits schwerwiegende kardiale Funktionseinschränkungen nach I/R aufzeigen, die auf die Abwesenheit des BAT zurückzuführen waren. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es nun die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären und die BAT-Herz-Interaktion genauer zu analysieren. Dieses Ziel wurde mit Hilfe der chirurgischen BAT-Ablation und des murinen Modells der kardialen I/R erreicht, wobei der Fokus auf der BAT-abhängigen Modulation der Immunantwort und auf der endokrinen Veränderung des BAT selbst lag.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Die Genehmigung für Tierversuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, mit dem Aktenzeichen 81-02.04.2017.A458 erteilt.

2.1.1 Mäuse

Für die aufgeführten Versuche wurden ausschließlich männliche, 10 bis 12 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Ile, Frankreich) bezogen und alle Versuche wurden gemäß den Richtlinien für die Verwendung von Versuchstieren nach dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Versuchstiere wurden bei $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mit unbegrenztem Zugang zu Wasser und Futter und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Experimentatoren waren nicht verblindet, was die Zuordnung der Tiere vor jeder Behandlung betraf. Bei folgenden Experimenten erfolgte eine verblindete Datenerfassung und/oder -analyse: histologische Färbung, qPCR, MRT- und Echokardiographie-Messungen, ELISA, Durchflusszytometrie-Analyse.

2.1.2 Ischämie und Reperfusion

Die Induktion der kardialen Ischämie/ Reperfusion wurde in einem zweiteiligen Prozess durchgeführt^{132,133}. Das Anbringen der Ligaturanlage im Sinne einer „Vor-Operation“ wurde von Herrn Dominik Semmler, die eigentliche Induktion der Ischämie nach 72 Stunden von Frau Dr. Simone Gorressen durchgeführt.

In einem ersten, präoperativen Schritt wurden die Versuchstiere mit Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht, Reckitt Benckiser, Berkshire, UK) s.c. analgesiert. Dreißig Minuten später wurde mit einer intraperitoneal (*i.p.*) Injektion von Esketaminhydrochlorid (90 mg/kg Körpergewicht; Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht; Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) die Narkose eingeleitet und anschließend über Intubation mit einem Gemisch aus 1/3 Sauerstoff und Isofluran 2,0 Vol.% (Forene R, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) sowie 2/3 Luft aufrechterhalten, wobei ein Tidalvolumen von $10\ \mu\text{l/g}$ Körpergewicht bei einer Rate von 140 Hüben/min erzeugt wurde. Die Mäuse wurden zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf Wärmeplatten gelegt, welche über die Verwendung einer Rektalsonde überwacht wurde. Unter Nutzung eines Mikroskops wurde ein kleiner, linksseitiger thorakaler-Einschnitt vorgenommen, gefolgt von der Thorakotomie im

vierten, linksseitigen Interkostalraum. Nach dem Eröffnen des Thorax wurde der Herzbeutel sezirt, um die Anatomie der Koronararterien sichtbar zu machen. Anschließend wurde eine chirurgische 7-0-Naht (Ethicon, New Jersey, USA) unter die *left anterior descending artery* (LAD) gelegt. Die Nadel des Fadens wurde entfernt und die beiden freien Enden in einen 1 mm langen Polyethylen (PE)-10-Schlauch eingeführt, so dass eine lose Schlinge um die LAD entstand, mit etwa 1 mm Entfernung zur Spitze des linken Herzhohls. Die beiden Enden wurden dann durch den Thorax und die Muskelschichten geführt, die Rippen mit 5-0 Prolene geschlossen und der Faden schließlich s.c. im rechtsseitigen Thorax platziert bevor der Brustkorb unter Verwendung von 5-0 Prolene vernäht wurde. Im Anschluss erfolgte nach Entwöhnung von der Beatmung und Rückkehr zur Spontanatmung die Extubation gefolgt von der postoperativen Analgesie mit Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht).

Im zweiten Schritt, 72 Stunden nach dem ersten Eingriff, wurden die Mäuse erneut wie oben beschrieben mit Isofluran als Inhalationsnarkotikum betäubt und zum Erhalt der Körpertemperatur auf Wärmeplatten gelegt. Die Hautnaht wurde eröffnet und die s.c. platzierten Nähte freigelegt. Um die Ischämie zu induzieren, wurde unter Kontrolle der ST-Hebung im EKG an jedem Ende der Naht gezogen. Die Reperfusion wurde 45 Minuten nach der Ischämie eingeleitet, indem die Nähte in geringem Abstand zur Brustwand durchtrennt wurden, woraufhin die Brusthaut wieder geschlossen wurde. Zur Kontrolle im Sinne einer *Sham*-Operation wurden die Versuchstiere auf die gleiche Weise operiert, jedoch ohne eine Einleitung der Ischämie durch Zug an den Fäden.

2.1.3 Chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes

Das interskapuläre Fettgewebedepot wurde den Mäusen unter Esketaminhydrochlorid (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht) -Narkose durch einen etwa 1 cm langen Einschnitt zwischen beiden Schulterblättern chirurgisch entfernt. Dazu wurden *Cutis* und *Subcutis* durchtrennt und das darunterliegende Fettgewebe vorsichtig freipräpariert und abgetrennt. Um einen Blutverlust zu vermeiden, wurde das unter dem BAT liegende Gefäß verödet. Anschließend wurde die Wunde mit Nähten verschlossen. Während der Erholungsphase wurde die Maus auf eine Wärmeplatte gelegt, um das Tier vor Wärmeverlust zu schützen. Bei scheinoperierten (BAT-*Sham*) Tieren wurde der Einschnitt ebenfalls vorgenommen aber das braune Fettgewebe nicht entfernt. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht). Das Vorgehen wurde entweder alleine oder im direkten

Anschluss an die Anbringung der Ligaturanlage im Vorfeld der I/R-Operation durchgeführt.

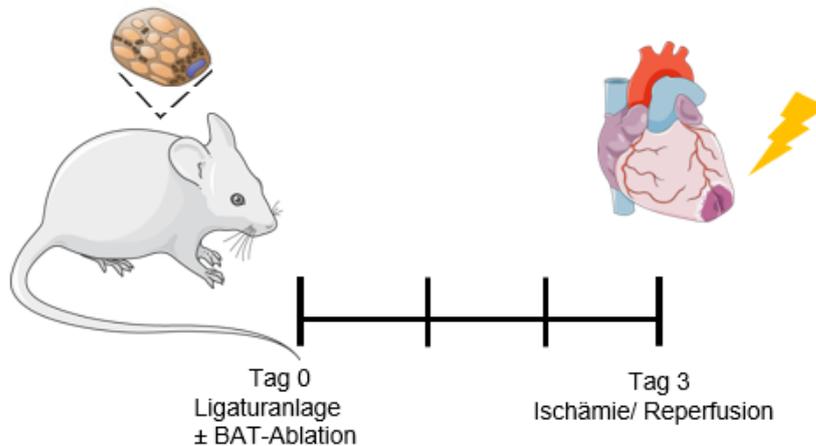


Abbildung 8: Chirurgische Entfernung des interskapulären braunen Fettgewebsdepot. Schematische Darstellung der chirurgischen Entfernung des interskapulären braunen Fettgewebsdepot drei Tage vor der kardialen Ischämie/ Reperfusion.

2.1.4 Implantation osmotischer Minipumpen

Hierzu wurde den Tieren im Alter von 10 bis 12 Wochen unter Ketamin/Xylazin -Narkose der Beta-3-Rezeptoragonist Mirabegron (Bio-Techne GmbH, Wiesbaden-Norderstedt, Deutschland) bzw. das Lösungsmedium PEG/DMSO (50 %/50 %; Kollisolv® PEG 400, Sigma Aldrich, Darmstadt bzw. CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland) als Kontrolle mittels subkutaner Implantation osmotischer Minipumpen appliziert (Alzet Modell 2004; Alza Corp, Mountain View, CA, USA). Mirabegron wurde in der Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht (50 % DMSO, 50 % PEG) mit einer Freisetzungsrate von 0,25 μ l/h und einem finalen Volumen von 200 μ l über einen Zeitraum von 28 Tagen eingesetzt. Direkt nach dem Eingriff und vor Beendigung der Narkose erhielten die Tiere das Analgetikum Carprofen s.c. (5 mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland). Während der Aufwachphase wurde die Maus auf eine Wärmeplatte gelegt, um das Tier vor Wärmeverlust zu schützen.

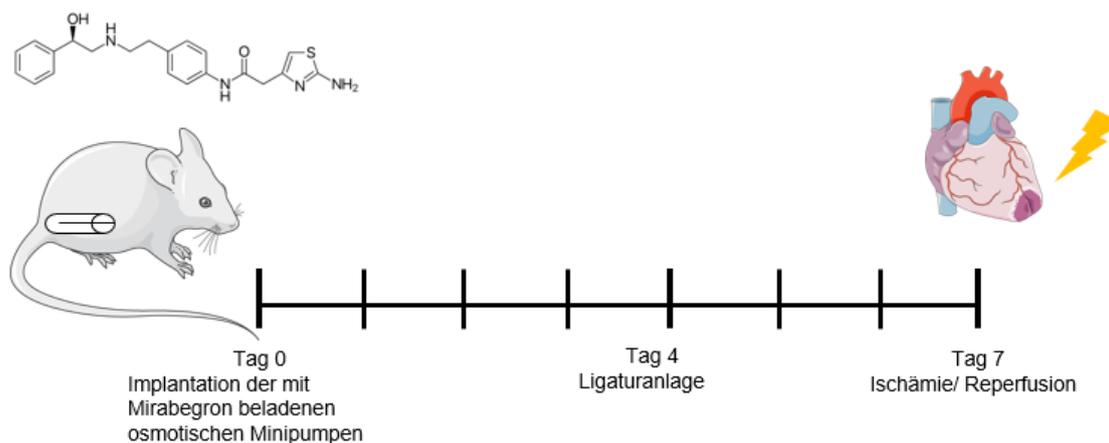


Abbildung 9: Implantation osmotischer Minipumpen.

Schematische Darstellung der subkutanen Implantation der mit Mirabegron oder Lösungsmedium beladenen osmotischen Minipumpen 7 Tage vor der kardialen Ischämie/ Reperfusion.

2.2 Qualitative und semiquantitative Durchflusszytometrie

2.2.1 Herz

Um eine durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im Herzen durchzuführen, wurden die Proben direkt nach der Tötung der Mäuse gewonnen. Für die Aufbereitung des Herzens wurden 10 Minuten vor der Tötung 50 μ l Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) intraperitoneal (*i.p.*) injiziert. Die Herzen wurden *in vivo* mit kaltem PBS (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) für 2 Minuten perfundiert. Nach der Entnahme des Herzens wurde es vorsichtig zerkleinert und in eine 2 ml Verdaulösung mit Kollagenase Typ I (600 U/ml, Worthington, Lakewood, NJ, USA) und DNase I (60 U/ml, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in *Hank's Balanced Salt solution* (HBSS, Gibco Life Technologies, Paisley, UK) gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37° C wurde die Suspension über 100 und 40 μ m Nylonfilter filtriert und bei 800 x g bei 4° C zentrifugiert. Der resultierende Rückstand wurde mit hypotonem Lysepuffer (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM EDTA; alle Substanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich Invitrogen, Carlsbad, CA, USA bezogen) versetzt und 7 Minuten bei 4° C inkubiert. Um den Erythrozyten-Lysepuffer zu inaktivieren, wurde kaltes PBS zugegeben und die Suspension erneut 10 Minuten bei 300 x g bei 4° C zentrifugiert und das resultierende Zellpellet anschließend in PEB (2mM EDTA, 0,5% (M/V) BSA in PBS; Sigma-Aldrich Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde mit einem CD16/32-Antikörper (FC Block), LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit und mit einer Antikörperkombination inkubiert (Tabelle1). Für die quantitative Auswertung wurden *Flow-Count Fluorophores* (Beckman Coulter Inc, Krefeld,

Deutschland) verwendet. Bis auf die in Abschnitt 3.4.4 gezeigten Messungen, welche sowohl mit dem BD LSR Fortessa (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) als auch mit dem Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Kalifornien, USA) durchgeführt wurden, wurden alle übrigen Messungen ausschließlich mit dem BD LSR Fortessa vorgenommen und anschließend mit FlowJo v10.7.1 (BD Life Science) analysiert. Resultierende Zellzahlen sind als Zellen pro mg Herzgewebe dargestellt. Das verwendete *Gating*-Schema ist im Appendix abgebildet.

Tabelle 1: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen des Herzens

| Antikörper | Klon | Hersteller | Cat. # |
|---------------------------|-----------------|------------------------------------|--------|
| CD45 – AlexaFluor488 | 30-F11 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 103122 |
| CD11b – BV711 | M1/70 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 101242 |
| Ly6G – APC/Fire750 | 1A8 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 127652 |
| CD64 – APC | X54-5/7.1 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 139306 |
| MHCII – PE/Dazzle594 | M5/114.15 .2 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 107648 |
| CCR2 – BrilliantViolet421 | SA203G1 1 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 150605 |
| Ly6C – AlexaFluor700 | HK1.4 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 128024 |
| MertK – PE | 2B10C42 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 128024 |
| Live/Dead-Aqua | | Life Technologies, Eugene, OR, USA | L34957 |
| CD16/32 (FC Block) | 93 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 101302 |

2.2.2 Blut

Für die durchflusszytometrische Untersuchung des Blutes wurde es entweder kardial oder aus der Schwanzspitze entnommen und mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoaguliert. Die Proben wurden daraufhin mit hypotonem Lysepuffer versetzt und für 7 Minuten bei 4° C inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 300 x g und 4° C zentrifugiert und der entstehende Rückstand in PEB-Puffer resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend mit einem FC-Block zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen inkubiert. Im Folgendem wurden die Zellen mit einer Antikörper-Kombinationen gefärbt und daraufhin für 20 Minuten in 0.1 % (V/V)

Roti®-Histofix 4 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in PBS bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Zur Entfernung des enthaltenden Paraformaldehyds sowie zur Aufreinigung der Zellen wurden die Zellen erneut mit PEB versetzt und zentrifugiert. Bis auf die in Abschnitt 3.4.3 gezeigten Messungen, welche sowohl mit dem BD LSR Fortessa (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) als auch mit dem Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Kalifornien, USA) durchgeführt wurden, wurden alle übrigen Messungen ausschließlich mit dem BD LSR Fortessa vorgenommen und anschließend mit FlowJo v10.7.1 (BD Life Science) analysiert. Alle Antikörper und die entsprechenden Klone sind in Tabelle 2 aufgeführt. Resultierende Zellzahlen sind als Zellen pro μl Blut dargestellt. Das verwendete *Gating*-Schema ist im Appendix abgebildet.

Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen des Blutes

| | | | |
|----------------------------|--------|-------------------------------|--------|
| Ly6G – BrilliantViolet 650 | 1A8 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 127641 |
| CD45 – PE | 30-F11 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 103106 |
| CD3 – AlexaFluor700 | 17A2 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 100216 |
| CD115 – BrilliantViolet711 | AFS98 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 135515 |
| CD11b – PE/Dazzle 594 | M1/70 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 101256 |
| Ly6C – APC/Cy7 | HK1.4 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 128026 |
| CD19 – PacificBlue | 6D5 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 115523 |
| CD16/32 (FC Block) | 93 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 101302 |

2.3 Zytokin Quantifizierung

2.3.1 Plasma Gewinnung

Das Blut wurde 6 Stunden nach der I/R-Induktion bzw. *Sham*-Operation oder 72 Stunden nach der I/R-Induktion in Kombination mit der im Vorfeld stattgefundenen chirurgischen Entfernung des braunen Fettgewebes bzw. der korrespondierende *Sham*-Operation mittels Punktion des rechten Ventrikels gewonnen und mit 50 μl EDTA (100 mM, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) antikoaguliert. Im Anschluss wurde das Blut bei 800 x *g* bei 4° C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand daraufhin abgenommen und dieser erneut bei 15871 x *g* bei 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Das generierte Plasma wurde aliquotiert und bei -80° C bis zum Zeitpunkt der Analyse gelagert.

2.3.2 BAT-Überstand

Zur Gewinnung des BAT-Überstandes wurde 6 Stunden nach Induktion der I/R- bzw. *Sham*-Operation das interskapuläre BAT *post mortem* entfernt, gewogen und mit Dulbeccos phosphatgepufferter Kochsalzlösung (DPBS, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gespült. Im Anschluss wurde es auf eine gekühlte 12-well Platte transferiert, zerkleinert und in 500 μ l RPMI Medium (Gibco RPMI 1640 Medium, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gegeben. Daraufhin wurde das BAT für 6 Stunden in einem Wärmeschrank bei 38° C inkubiert. Nachfolgend wurde der Überstand vollständig entnommen, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gefüllt und in einem ersten Schritt bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurde die resultierende Lösung in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert, zu 50 μ l aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.3.3 Zytokin Assays

Die nachfolgend aufgeführten Analysen wurden sowohl im Plasma (2.3.1) als auch im BAT-Überstand (2.3.2) in Kooperation mit Herrn Dr. Stefan Lehr und Frau Dr. Sonja Hartwig (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt: IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, KC, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, RANTES, TNFa, BDNF, FGF-21, Fractalkine, FSTL1, GDF8, Irisin, LIF, Oncostatin M, OSTN, SPARC, TGF-b1-3. Dafür wurde der Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine, der Bio-Plex Pro Mouse Diabetes 8-Plex und der Bio-Plex Pro TGF-b 3-plex Assay (alle 3 wurden von Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA bezogen) sowie der Multiplex® Mouse Myokine Magnetic Bead Panel Assay (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

2.4 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *realtime* PCR

2.4.1 braunes Fettgewebe

Nach der I/R- bzw. *Sham*-Operation wurde das BAT entnommen, Zellen mittels PeqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) lysiert und anschließend die RNA extrahiert.

Zu dem Lysat wurde Chloroform hinzugegeben und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation mit 16000 x g bei RT für 15 Minuten. Die resultierende oben aufliegende wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, gevortext und bei RT für 10 Minuten stehen gelassen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4° C

und 16000 x g für 30 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 75 % Ethanol gewaschen. Das im Anschluss durch Zentrifugation bei 4° C und 16000 x g für 10 Minuten gewonnene Pellet wurde bei 65° C für 5 Minuten getrocknet und in RNAse freies Wasser überführt und gelöst.

Die resultierende RNA-Konzentration und ihre Qualität wurden durch photometrische Messung der Absorption bei 260/280 nm (Nanodrop ND1000, PeqLab, Erlangen, Deutschland) bewertet. Anschließend wurde cDNA aus 1mg RNA mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) synthetisiert. Für die Analyse der mRNA-Expression wurde das StepOnePlus Real-Time PCR System mit der StepOne Software v2.3 und dem SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Mit Hilfe der *Primer Plus Software* (Free Software Foundation, Boston, MA, USA) und NCBI Primer Blast (National center for biotechnology information, Bethesda, MD, USA) wurden Primer entworfen, die dann in der semiquantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet wurden. Die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 3 zu finden. Die relative mRNA-Expression wurde nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet und alle ermittelten Werte wurden auf die Expression von 18S normalisiert, welches als interne Kontrolle diente.

2.4.2 Monozyten und neutrophile Granulozyten

Die Gewinnung von mRNA und die anschließende Synthese von cDNA wurde in Analogie zu 2.4.1 durchgeführt. Nach der I/R- bzw. *Sham*-Operation wurde das Knochenmark unter Verwendung einer Spritze und PBS aus Femur und Tibia gespült und Monozyten mit dem CD115 MicroBead Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) bzw. neutrophile Granulozyten mit dem Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotech) nach Filtration durch einen 40 μ m Nylonfilter isoliert. Hierfür wurden enthaltene Erythrozyten durch einen hypotonen Lysepuffer entfernt und verbliebende Zellen durch Aufnahme in PEB sowie mittels Zentrifugation aufgereinigt. In Abhängigkeit von den resultierenden Zellzahlen wurden die Volumina, der in den Kits enthaltenden Lösungen wie in dem von der Firma Miltenyi Biotech bereitgestellten Protokoll, angepasst. Die immunomagnetische Separation wurde durch MS- bzw. LS-Säulen (Miltenyi Biotech) realisiert.

Tabelle 3: verwendete qPCR-Primer

| Gen | Vorwärts PRIMER 5'-3' | Rückwärts PRIMER 5'-3' |
|-----|-----------------------|------------------------|
| 18S | GCAATTATTCCCCATGAACG | GGCCTCACTAAACCATCCAA |

| | | |
|---------------|----------------------|----------------------|
| <i>Ucp 1</i> | TCAGGATTGGCCTCTACGAC | TGCCACACCTCCAGTCATTA |
| <i>Il1b</i> | GGATGAGGACATGAGCACCT | CGTCACACACCAGCAGGTTA |
| <i>Tnf</i> | TCGAGTGACAAGCCTGTAGC | AAGGTACAACCCATCGGCTG |
| <i>Slc2a4</i> | ATCATCCGGAACCTGGAGG | CGGTCAGGCGCTTTAGACTC |
| <i>Gpi1</i> | ATGGGCATATTCTGGTGGAC | CCCGATTCTCGGTGTAGTTG |
| <i>Pfkl</i> | GCCTATCTCATCCAGCTACG | CTTGCTACTCAGGATTCGGT |
| <i>Pfkp</i> | AAGCTATCGGTGTCCTGACC | TCCCACCCACTTGCAGAAT |
| <i>Hk2</i> | AGAGAACAAGGGCGAGGAG | GGAAGCGGACATCACAATC |

2.5 Transkriptom-Analyse

2.5.1 Einzelzellsequenzierung von kardialen myeloiden Immunzellen

Zweiundsiebzig Stunden nach der I/R-Operation in Kombination mit der im Vorfeld stattgefundenen chirurgischen Entfernung des braunen Fettgewebes bzw. der korrespondierende *Sham*-Operation wurden die Mäuse 10 Minuten nach Heparinisieren durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden die Herzen freipräpariert und über die Aorta an einen Langendorff-Apparat kanüliert. Um verbleibendes Blut zu entfernen, wurden die Herzen mit je 8 ml PBS bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min bei 37° C gespült und daraufhin mit 10 ml der Verdauungslösung (siehe Abschnitt 2.2.1) bei gleicher Geschwindigkeit und Temperatur retrograd perfundiert. Das durch den enzymatischen Verdau gewonnene Eluat wurde aufgefangen. Nach dem Herzverdau wurden die Herzen abgenommen, mit einem Skalpell vorsichtig auseinandergezogen und mit dem jeweiligen Eluat über einen 100 µm Nylonsieb gegeben. Im Folgendem wurde die Zellsuspension für eine Minute bei 55 x *g* bei 4° C zentrifugiert und der resultierende Überstand über einen 40 µm Nylonsieb pipettiert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation bei 300 x *g* für 7 Minuten bei 4° C wurden die Zellen in PEB resuspendiert. Die Färbung der Zellen wurde entsprechend der Angaben in 2.2.1 durchgeführt: Zu 250 µl Zellsuspension wurde 10 µl des CD16/32-Antikörper hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4° C um die *CITE-seq*-Antikörper ergänzt. Im Anschluss an die 30-minütige Inkubation bei 4° C wurden die Antikörper für die eigentliche Markierung der kardialen, myeloiden Zellen hinzugegeben. Verwendete Antikörper finden sich in der nachfolgenden Tabelle 4 wieder. Die nun

angefärbten Zellen wurden nach 15 Minuten Inkubationszeit zweimal mit PEB gewaschen, zentrifugiert und erneut in DMEM plus 10 % FCS resuspendiert. Bevor die einzelnen Zellen sequenziert werden konnten, wurden sie vorher in Zusammenarbeit mit Frau Katharina Raba (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf) mittels Durchflusszytometrie quantitativ sortiert. Um tote Zellen auszusortieren, wurde vor jedem Durchlauf 1,25 µl Propidiumiodid (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, USA) ergänzt. Die eigentliche Sequenzierung über das 10X Genomics Chromium System (10X Genomics Inc., Pleasanton, USA) wurde im Biologisch- Medizinischem Forschungszentrum Düsseldorf von Herrn Dr. Tobias Lautwein nach Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Insgesamt wurden für diesen Zweck 67.000 Einzelzellen genutzt, wobei die Prozessierung der Proben nach Angaben des Herstellers mit dem HiSeq 3000 Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, USA), mit einer durchschnittlichen Sequenzierungstiefe von ca. 50.000 *Reads*/Zelle für Genexpressionsbibliotheken und ca. 4.000 *Reads*/Zelle für ADT-Bibliotheken durchgeführt wurde. Nachfolgende Auswertungen wurden mit dem Programm RStudio (2021 und 2022) in Kombination mit Seurat v4.0 in Anlehnung an den des Satija Lab (New York Genome Center, NY, USA) vorgegebenen Algorithmus vorgenommen.

Tabelle 4: verwendete Antikörper für die Transkriptom-Analyse

| Antikörper | Klon | Hersteller | Cat. # |
|-----------------------------------|-------------|--|--------|
| CD16/32 | 93 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 101302 |
| CD45 – AlexaFluor700 | 30-F11 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 103128 |
| CD11b – PE | M1/70 | BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA | 557397 |
| CD31 – PE/Cy7 | 390 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 102418 |
| TotalSeq-B0117 anti-mouse I-A/I-E | M5/114.15.2 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 107657 |
| TotalSeq-B0106 anti-mouse CD11c | N418 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 117359 |
| TotalSeq-B0105 anti-mouse CD115 | AFS98 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 135543 |
| TotalSeq-B0013 anti-mouse Ly-6C | HK1.4 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 128053 |
| TotalSeq-B0202 anti-mouse CD64 | X54-5/7.1 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 139329 |
| TotalSeq-B0015 anti-mouse Ly-6G | 1A8 | BioLegend, San Diego, CA, USA | 127659 |

2.5.2 Bulk-RNA Sequenzierung vom braunen Fettgewebe

Für diesen Versuch wurde anders als in 2.4.1 die Gewinnung von RNA aus braunem Fettgewebe mittels RNeasy Plus Universal Mini Kit (50) (Qiagen, Hilden, Deutschland) umgesetzt. Hierzu wurde das braune Fettgewebe 6 Stunden nach der I/R- bzw. *Sham*-Operation entnommen und die korrespondierende RNA nach Herstellerangaben generiert. Der eigentliche Prozess der Sequenzierung wurden von Herrn Dr. Patrick Petzsch unter Verwendung des Illumina® 'TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit' (Illumina Inc. San Diego, USA) und HiSeq 3000/4000-System (Illumina Inc. San Diego, USA) im Biologisch- Medizinischem Forschungszentrum Düsseldorf durchgeführt, wobei jeweils 6 biologische Replikate verwendet wurden. Die anschließende bildliche Darstellung bezüglich kalkulierter *Pathways* erfolgte mit Hilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.6 Histologie

2.6.1 Gomori's 1-step Trichrome Färbung

Einundzwanzig Tage nach der I/R-Operation wurden die Herzen nach kardialer Blutentnahme entnommen und *ex-vivo* mit PBS gespült, um das restliche Blut zu entfernen. Danach wurden sie für 24 Stunden in Formaldehydlösung (Histofix 4 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Herzen in PBS überführt, abgetropft und in Paraffin eingebettet. Für die Gomori-Färbung wurden die Herzen in 5 μm dicke Schnitte in 10 Ebenen (100 μm pro Ebene) vom Apex aufwärts geschnitten (HistoCore MULTICUT Leica Biosystem, Nussloch, Deutschland), wobei 250 μm zwischen jeder Ebene verworfen wurde. Für die Messung der Infarktgröße wurden Schnitte der Ebenen 1 bis 10 verwendet und die Gomori-Färbung nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Verfahrensnummer HT10) durchgeführt. Die fertig gefärbten Schnitte wurden anschließend mit RotiMount-Einbettungsmedium (CarlRoth, Karlsruhe, Deutschland) auf Deckgläsern befestigt, mit einem Zeiss AxioObserver.Z1 Mikroskop aufgenommen und mit Hilfe der Software ZEN 3.3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) verarbeitet. Die anschließenden Planimetrieberechnungen wurden ebenfalls mit der Software ZEN 3.3 vorgenommen, indem die verschiedenen Herzregionen (Infarktzone, Randzone, gesamter linker sowie rechter Ventrikel und Lumen) nachgezeichnet wurden.

2.6.2 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung

Sieben bzw. 14 Tage nach Behandlung mit Mirabegron wurde das BAT entnommen und für 24 Stunden in Formaldehydlösung (Histofix 4 %, Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Vierundzwanzig Stunden später wurde das BAT in PBS überführt, abgetropft und in Paraffin eingebettet. Für die Detektion des Einflusses von Mirabegron auf das BAT wurde das Gewebe in 5 μm dicke Paraffinschnitte geschnitten, entparaffiniert und anschließend für eine Minute mit Hämalaun-Lösung (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Daraufhin wurden die Schnitte 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt, um ein Bläuen der Zellkerne zu erreichen. Abschließend erfolgte für eine Minute unter Verwendung einer 1 % Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) die Zytoplasma-Färbung.

2.7 Magnetresonanzbildgebung mittels ^1H -NMR

Die folgenden Methoden wurden in Zusammenarbeit mit Frau Anne Vera Flocke und Prof. Dr. Ulrich Flögel aus dem Institut für Molekulare Kardiologie, Magnetresonanz-Spektroskopie und -Bildgebung durchgeführt. Resultierende Daten wurden hierbei von Frau Anne Vera Flocke ausgewertet.

2.7.1 Bestimmung der BAT-Aktivierung nach Mirabegron-Applikation

Um den Einfluss des Mirabegron auf das BAT zu eruieren wurden die Tiere mittels Magnetresonanztomographie untersucht. Hierfür wurden die Tiere vor und 4, 7 und 14 Tage nach der Implantation, der mit Mirabegron beladenen osmotischen Minipumpen, vermessen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere mit 1,5 Vol.% Isofluran (Forene R, Abbott GmbH, Deutschland) in wassergesättigter Luft bei einem Gasfluss von 50 ml/min narkotisiert. Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Positionierung der narkotisierten Tiere mittels eines speziell angefertigten *Animal Handling Systems* im Probenkopf (25 mm ^1H -Quadratur-Resonator) des NMR-Spektrometers (9.4 T AVANCEIII WB NMR-Spektrometer, Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Die Erfassung des 3-Punkt-EKGs (Klear-Trace; CAS Medical Systems, Brüssel, Belgien) erfolgte hierbei über die Vorder- und Hinterpfoten, während die Respiration mit Hilfe eines an einen Drucksensor gekoppelten Ballon mit dem *Small Animal Monitoring and Gating System* (SA-Instruments, Inc., NY, USA) aufgezeichnet wurde. Im Anschluss wurde der Probenkopf in den Magneten des Spektrometers eingeführt und die Messungen durchgeführt. Die Kerntemperatur der Tiere wurde hierbei konstant bei 37° C gehalten. Nach der Aufnahme von ersten anatomischen Orientierungsscans wurden hochauflösende

Spinecho- bzw. Gradientenecho-¹H-Bilder über das entsprechende Areal aufgenommen, um Aussagen bezüglich der Zusammensetzung des Fettgewebes treffen zu können (ParaVision360 V3.2, Bruker, Rheinstetten, Deutschland). Als Messgröße wurde hierbei die T2-Relaxationszeit in Millisekunden (ms) über T2-gewichtete *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE) -Messungen herangezogen, indem die Intensitätsabnahme einzelner Pixel bestimmt wurde.

2.7.2 Erhebung der kardialen Funktion

Um den Einfluss des Mirabegron auf die kardiale Funktion vor und nach der I/R-Operation evaluieren zu können, wurden die Tiere mittels Magnetresonanztomographie untersucht. Hierfür wurden die Tiere vor der Anbringung der Ligaturanlage im Rahmen der Vor-Operation sowie einen Tag, 7, 14 und 21 Tage nach der I/R-Operation in Analogie zu 2.7.1 vermessen. Mit Spinecho- bzw. Gradientenecho-¹H-Bilder (IntragateFLASH (Bruker)) über mehrere, linksventrikuläre Herzebenen mit einer Aufnahme von je 16 Bildern pro Herzzyklus konnten so kardiale Funktionsparameter manuell mit ParaVision360 V3.2 (Bruker, Rheinstetten, Deutschland) bestimmt werden. Die Durchführung entspricht wie in 2.7.1 dargelegt.

2.7.3 Bestimmung der Infarktgröße

Die Evaluation der Infarktgröße erfolgte einen Tag nach MI. Hierfür wurde den Tieren das Kontrastmittel Magnevist® (Gadopentetat-Dimeglumin; 0,2 mmol/kg Körpergewicht; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) 20 Minuten vor der Messung *i.p.* injiziert. Durch die Aufnahmen hochauflösender Bilder (IntragateFLASH (Bruker)) und dem resultierenden optischen Kontrast im Herzen konnte infarziertes Gewebe von gesundem Gewebe unterschieden und so Rückschlüsse auf die Infarktgröße gezogen werden, wobei die Messungen technisch analog zu 2.7.1 durchgeführt wurden.

2.8 Metabolische Erhebung

2.8.1 NEFA-Messung

Die Plasmakonzentrationen (siehe 2.3.1 für die Plasmagewinnung) von unveresterten Fettsäuren (*Non-Esterified Fatty Acids*, NEFA) wurden 24 Stunden nach MI mit einem enzymatischen Kit nach Herstellerangaben gemessen (Gene5 2.05; NEFA-HR (2), Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland).

2.9 Statistik

Die generierten Daten wurden mit Hilfe der Software Graphpad Prism 9 (La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Alle aufgeführten Daten sind als Mittelwert \pm bzw. + *standard deviation* (SD) dargestellt. Mittels Grubb's-Test ($\alpha = 0,05$) wurden Ausreißer determiniert und von der Kohorte ausgeschlossen. Sofern nur zwei experimentelle Gruppe verglichen wurden, wurde der *unpaired t-test* verwendet. Für die Evaluierung der Herzfunktionsdaten über die Zeit von 21 Tagen wurde eine *Two way-analysis of variance* (ANOVA) benutzt, für die Werte der *in vitro* Charakterisierung der Immunzellen eine *One way-ANOVA*. Für die Signifikanzbestimmung der *Bulk-Analyse* und der Einzelzellsequenzierungsdaten wurde die *false discovery rate* (FDR) -Methode herangezogen. Signifikanz ergab sich bei einem $p < 0,05$. Einzelne Punkte in den Graphen verkörpern je ein individuelles Versuchstier.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des Myokardinfarkts auf das BAT

3.1.1 Aktivierung des BAT durch den Myokardinfarkt

Wie in der Einführung beschrieben, ist das sympathische Nervensystem bzw. dessen Aktivierung ein starker Stimulus für die zitterfreie Thermogenese und die endokrine Funktion des braunen Fettgewebes. Aus diesem Grund wurde 24 Stunden nach der I/R- bzw. *Sham*-Operation das Gewicht des interskapulären BAT und das Körpergewicht bestimmt und sowohl einzeln als auch im Sinne einer Ratio ausgewertet, um nachzuweisen, ob auch in dem vorliegenden pathologischen Kontext eine BAT-Aktivierung stattgefunden hat. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des BAT-Gewichts (Abb. 10A) ohne Veränderung des Körpergewichts (Abb. 10B) in der MI-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. Das korrespondierende Verhältnis von BAT-Gewicht zu Körpergewicht (Abb. 10C) verdeutlichte dies.

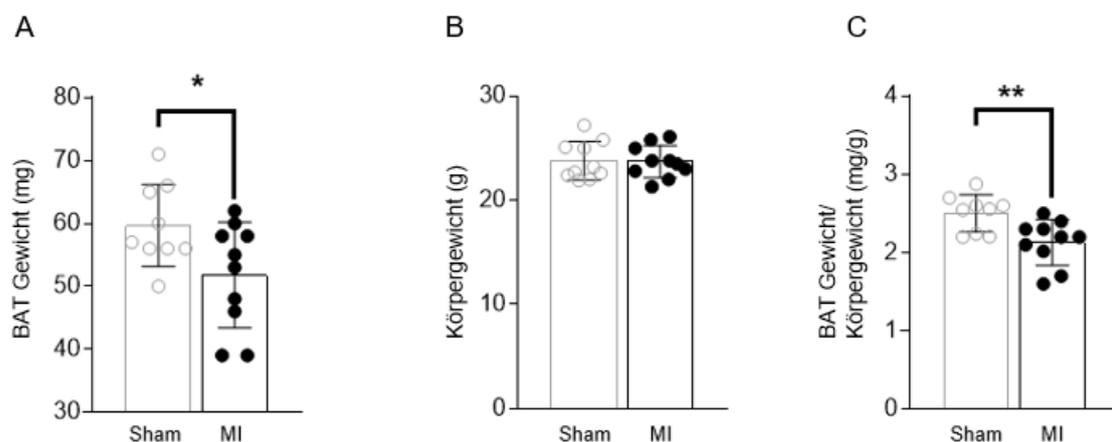


Abbildung 10: Aktivierung des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt.

Die Messungen des **A**, BAT (braunes Fettgewebe) -Gewichts (mg) und **B**, des Körpergewichts (g) erfolgten 24 Stunden nach Myokardinfarkt (MI) bzw. *Sham*-Operation und wurden **C**, ins Verhältnis zueinander gesetzt (mg/g). (n=10,10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Darüber hinaus wurde das interskapuläre BAT 3, 6 und 24 Stunden nach der I/R- bzw. *Sham*-Operation entnommen, um das BAT-spezifische *Ucp1* in der qPCR zu vermessen (Abb. 11). Zu dem frühen Zeitpunkt nach MI zeigte sich eine signifikante Hochregulation der *Ucp1*-mRNA (Abb. 11A), wobei der Effekt im Folgendem wieder auf Basalniveau zurückging (Abb. 11B, C).

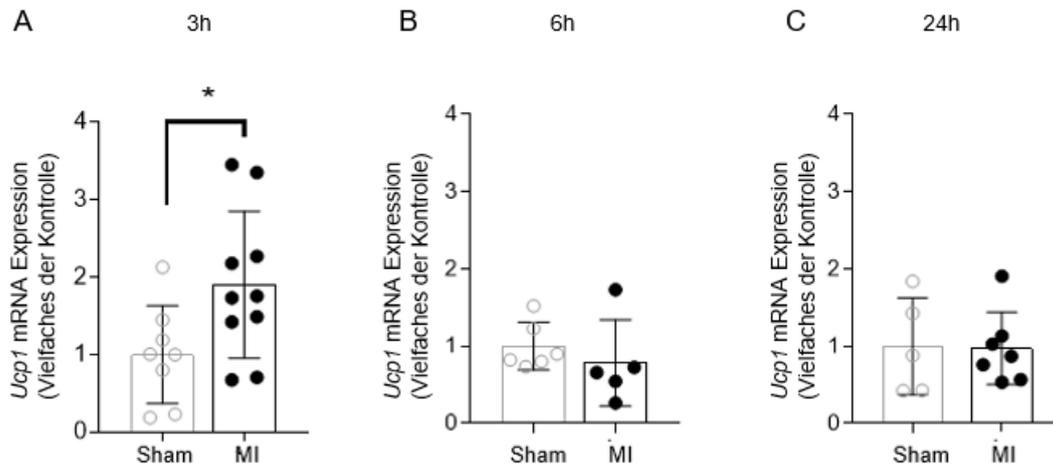


Abbildung 11: Aktivierung des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt

Die Messungen der Expression des *uncoupling proteins 1* (*Ucp1*) erfolgten **A**, 3 (n=8,10) **B**, 6 (n=6,5) und **C**, 24 Stunden (h) (n=5,7) nach dem Myokardinfarkt (MI) bzw. Sham-Operation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanz wurde durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, $p < 0,05$.

Darüber hinaus wurde in Kooperation mit Prof. Ulrich Flögel 72 Stunden nach der I/R-Operation eine $^1\text{H-NMR}$ Messung der Versuchstiere durchgeführt. Hier zeigte sich ein Trend hinsichtlich einer Reduktion in der im BAT gemessenen T2-Relaxationszeit als Surrogatparameter für eine BAT-Aktivierung (Daten nicht dargestellt) im Vergleich zur Basalmessung vor dem MI.

3.1.2 Transkriptom-Analyse des BAT nach Myokardinfarkt

Um zu evaluieren, ob eine Aktivierung des interskapulären Fettdepots auch mit einer veränderten Genexpression und konsekutiver Änderung des Sekretionsprofils einherging, wurde zunächst eine *Bulk*-Analyse des BAT 6 Stunden nach der I/R- bzw. Sham-Operation durchgeführt. Mit Hilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) zeigte sich in der MI- im Vergleich zur Sham-Gruppe eine Herunterregulation (blau dargestellt) von proinflammatorischen Genen wie *Irf3*, *Tnf*, *Il1b* und *Csf1/2* (Abb. 12, grün umrandet).

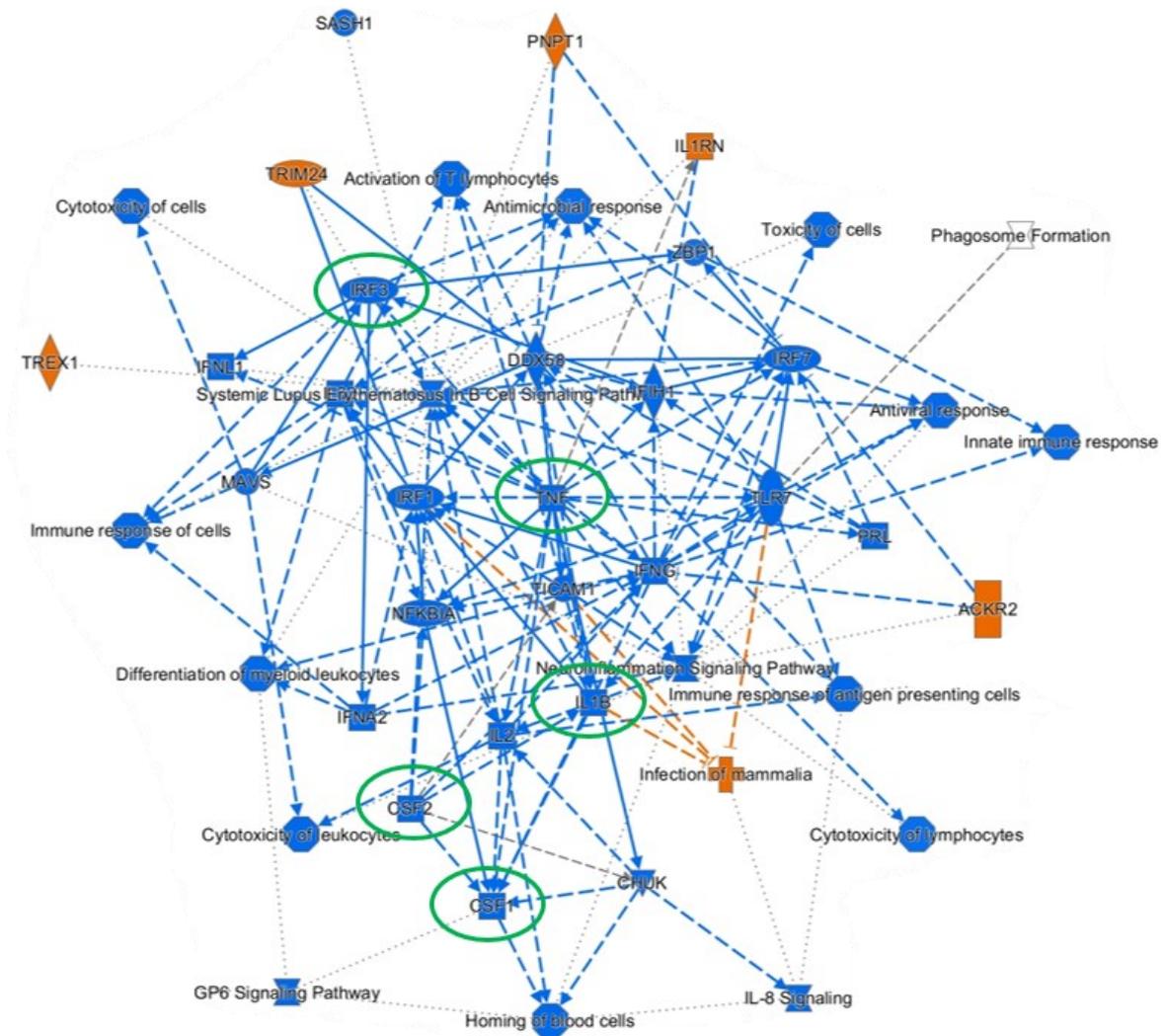


Abbildung 12: Bulk-Analyse des BAT nach Myokardinfarkt.

BAT (braunes Fettgewebe) -Bulk-Analyse 6 Stunden nach dem Myokardinfarkt (MI) bzw. Sham-Operation. Die grafische Zusammenfassung für "Krankheiten", "Funktionen" und "vorgeschaltete Regulatoren" basiert auf der IPA-Analyse (Qiagen Inc.). Die Darstellung zeigt in blau herunterregulierte Gene, in orange heraufregulierte Gene in der MI-Gruppe an. Mit grüner Umrandung sind die Gene *Irf3*, *Tnf*, *Il1b* sowie *Csf1/2* graphisch hervorgehoben. Signifikanzen wurden nach der FDR-Methode berechnet: p (FDR) < 0.01 und FC > 1.5 ergab insgesamt 26 hochregulierte- und 212 herunterregulierte Gene.

3.1.3 Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt

Im Folgendem wurde eruiert, ob sich die Veränderung auf Transkriptebene ebenfalls auf das endokrine Profil des BAT hinsichtlich einer reduzierten Sekretion entsprechender proinflammatorischer Zytokine ausgewirkt hat. Hierzu wurde das interskapuläre BAT-Depot 6 Stunden nach der I/R- bzw. Sham-Operation entnommen, für weitere 6 Stunden inkubiert und der Überstand anschließend mit Multiplex-Assays auf die Regulation von Zytokinen überprüft. Das BAT-Gewebe der MI-Gruppe zeigte eine signifikant reduzierte

Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL1b, TNFa oder IL6 im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb. 13).

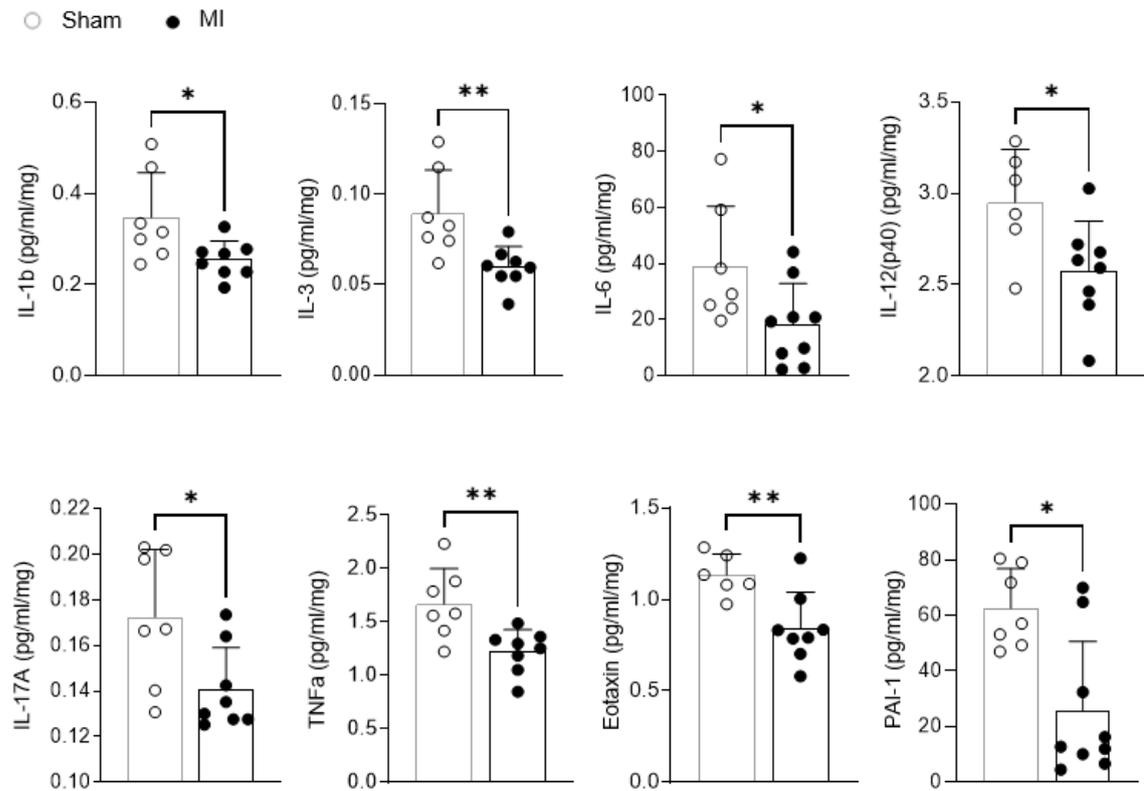


Abbildung 13: Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt.

Hier dargestellt sind alle signifikant regulierten Zytokine, die durch das braune Fettgewebe (BAT) 6 Stunden nach Myokardinfarkt (MI) bzw. Sham-Operation in das Kulturmedium sezerniert und mittels Multiplex-Immunoassays nachgewiesen wurden. Dargestellt sind Mittelwerte + SD in der Einheit pg/ml/mg, wobei sich die mg-Angabe auf das eingesetzte BAT-Gewicht bezieht. n=6,8;7,9. Signifikanzen wurden durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, p < 0,05; **, p < 0,01. Die Erhebung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Lehr und Frau Dr. Sonja Hartwig (beide aus dem Deutschen Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland). IL-1b: Interleukin1b, IL-3: Interleukin-3, IL-6: Interleukin-6, IL-12(p40): Interleukin-12(p40), IL-17A: Interleukin-17A, TNFa: Tumornekrosefaktor-a, Eotaxin, PAI-1: Plasminogenaktivatorinhibitor-1.

Darüber hinaus war einzig der *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) in der MI-Gruppe signifikant mehr sezerniert worden (Abb. 14).

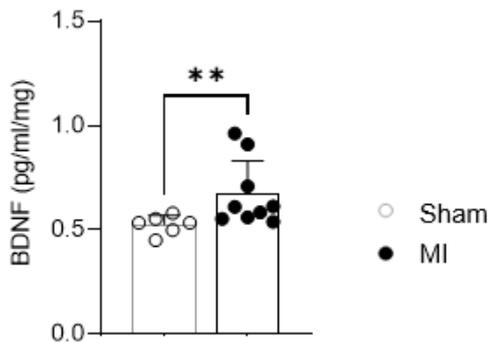


Abbildung 14: Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt.

Darstellung des sezernierten *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) 6 Stunden nach Myokardinfarkt (MI) bzw. *Sham*-Operation durch das braune Fettgewebe (BAT) in Analogie zu Abbildung 13. Dargestellt sind Mittelwerte + SD in der Einheit pg/ml/mg, wobei sich die mg-Angabe auf das eingesetzte BAT-Gewicht bezieht. $n=6,9$. Signifikanz wurde durch den *unpaired t-test* ermittelt: **, $p < 0,01$.

3.1.4 Einfluss des BAT auf zirkulierende Zytokine

Da sich ein stark verändertes Sekretionsprofil des BAT nach MI zeigte, sollte als nächstes eruiert werden, ob auch bei zirkulierenden Zytokinen eine quantitative Veränderung vorlag. Hierfür wurde Plasma 72 Stunden nach MI von BAT-ablatierten bzw. *BAT-Sham* operierten Tieren gewonnen und ebenfalls mit den in 2.3.3 beschriebenen Assays untersucht. Bis auf den *Granulocyte-Colony-Stimulating Factor* (G-CSF, Abb. 15) lagen keine signifikanten Änderungen der vermessenen Zytokine im Plasma vor. Die chirurgische Entfernung des BAT im Vorfeld des MIs führte demnach zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des G-CSF in der Zirkulation 72 Stunden nach der I/R-Operation.

Andere Zytokine zeigten keine Veränderung durch die Behandlung und wurden deshalb hier nicht dargestellt. Darüber hinaus lagen viele Werte anderer Analyten außerhalb des Messbereiches, weshalb eine genaue Aussage hierzu nicht getroffen werden konnte.

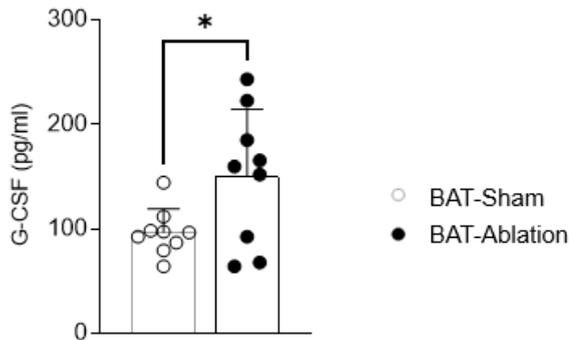


Abbildung 15: Quantitative Veränderung von G-CSF 72 Stunden nach Myokardinfarkt.

72 Stunden nach Myokardinfarkt lag G-CSF (pg/ml) in der BAT (braunes Fettgewebe) - Ablationsgruppe signifikant mehr vor, was mittels Multiplex-Immunoassay nachgewiesen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. n=9,9. Signifikanz wurde durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, $p < 0,05$. Die Erhebung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Lehr und Frau Dr. Sonja Hartwig (beide aus dem Deutschen Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland). G-CSF: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor.

3.2 Einfluss der BAT-Ablation auf das Herz nach Myokardinfarkt

Nachfolgend sollte der Einfluss des braunen Fettgewebes im Kontext des MIs untersucht werden. Um den Einfluss einer BAT-Ablation auf das Herz nach MI charakterisieren zu können, wurden die Herzen 21 Tage nach der I/R-Operation entnommen und anschließend eine histochemische *Gomori's 1-step Trichrome* Färbung durchgeführt. Außerdem wurde ergänzend das Gewicht der Tiere sowie das Herzgewicht gemessen, um Aussagen bezüglich eines möglichen hypertrophen oder dilatativen kardialen Phänotyps tätigen zu können.

In dem hier abgebildeten Graphen (Abb. 16A) zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich einer Erhöhung des Körpergewichts der Versuchstiere, bei denen das BAT entfernt wurde. Dieser Umstand wiederum hatte jedoch keinen Einfluss auf das Herzgewicht (Abb. 16B) oder das korrespondierende Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (Abb. 16C). Allerdings führte die BAT-Ablation zu einer signifikant größeren, linksventrikulären Narbe im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16D). Bei genauerer Betrachtung der angefärbten Herzen fiel zudem auf, dass der linke Ventrikel der Herzen der BAT-Ablationsgruppe deutlich ausgedünnt war (Abb. 16E). Während die Herzen der Kontrolltiere trotz MI ein optisch scheinbar physiologisches Erscheinungsbild hinsichtlich der generellen Struktur darlegten, konnte man die BAT-Ablationsgruppe als eher dilatativ charakterisieren.

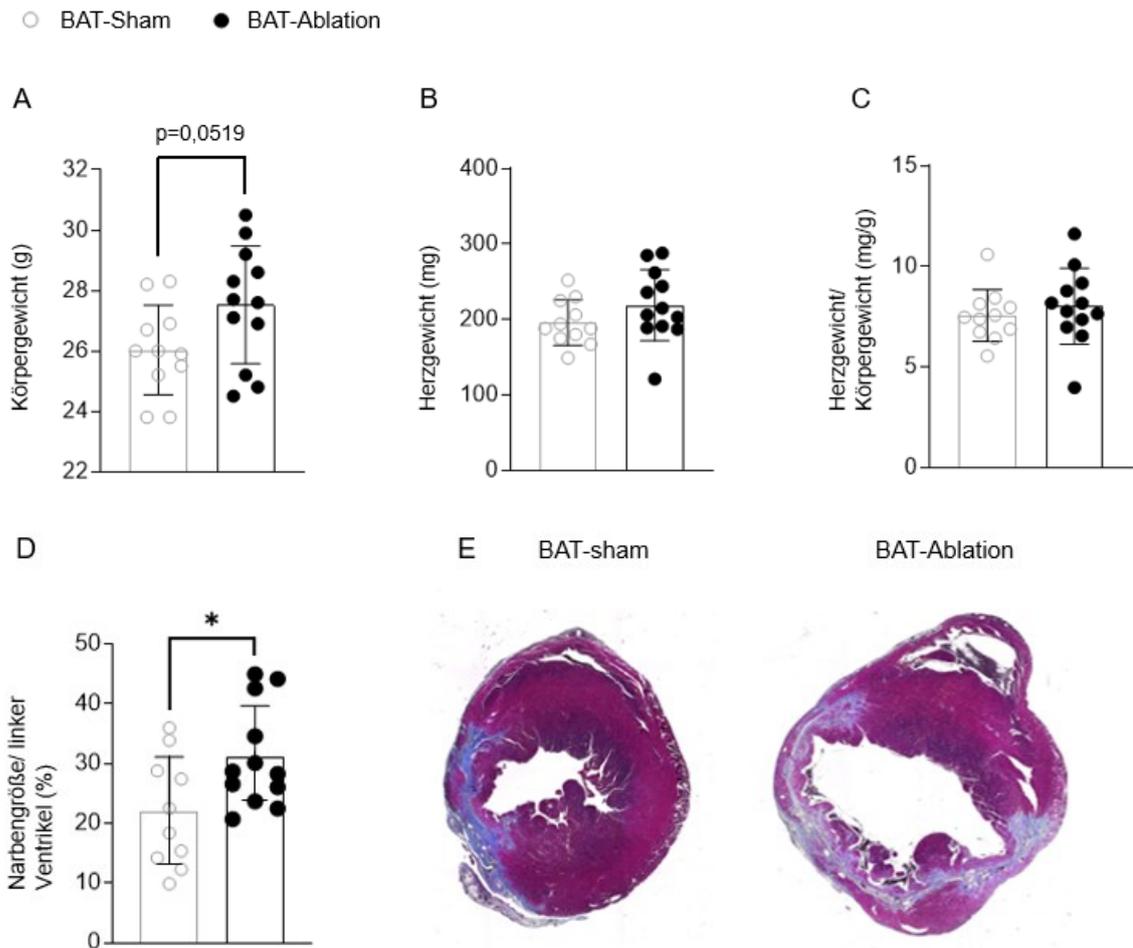


Abbildung 16: Gewichtsdaten und histochemische Färbung der Herzen 21 Tage nach Myokardinfarkt. Erhebung verschiedener Parameter 21 Tage nach Myokardinfarkt (MI) in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. der BAT-Ablation. Dargestellt ist **A**, das Körpergewicht (g) 21 Tage nach MI (n=11,12) **B**, das Herzgewicht (mg) (n=11,12) **C**, das korrespondierende Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (mg/g) (n=11,12), **D**, die Vermessung der Narbengröße in Bezug auf den linken Ventrikel (%) (n=10,12), **E**, repräsentative Bilder der *Gomori's 1-step Trichrome* Färbung der Herzen im Vergleich BAT-*Sham* zu BAT-Ablation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet: *, $p < 0,05$.

3.3 Einfluss der BAT-Ablation auf Immunzellen

3.3.1 Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen

Wie in Abschnitt 1.1.4 und 1.1.5 dargelegt, nehmen Immunzellen maßgeblich Einfluss auf das Geschehen während und nach einem MI. Inwieweit BAT in gegebenem Kontext einen Effekt hierauf hat, sollte an dieser Stelle eruiert werden. Um zunächst zu überprüfen, inwiefern sich die Anbringung der Ligaturanlage im Rahmen der Vor-Operation in Kombination mit einer BAT-Ablation bzw. eine BAT-*Sham* Operation ohne

anschließenden MI auf zirkulierende Immunzellen auswirkt, wurden Durchflusszytometrie-Analysen von entnommenem Schwanzspitzen-Blut in definierten Zeitabständen nach dem kardialen Eingriff vorgenommen (Abb. 17). In keiner der abgebildeten Zellpopulation ließ sich ein signifikanter, behandlungsbedingter Unterschied beobachten. Darüber hinaus wurde ein genereller Anstieg der verschiedenen Immunzellsubtypen über die Zeit festgestellt. Während die Neutrophilen ihr postoperatives Maximum nach 48 Stunden erreichten (Abb. 17 B), zeigte sich eine stetige Zunahme der Monozyten (Abb. 17C) und korrespondierende Subtypen (Abb. 17D-F) über die gesamte Beobachtungsdauer.

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

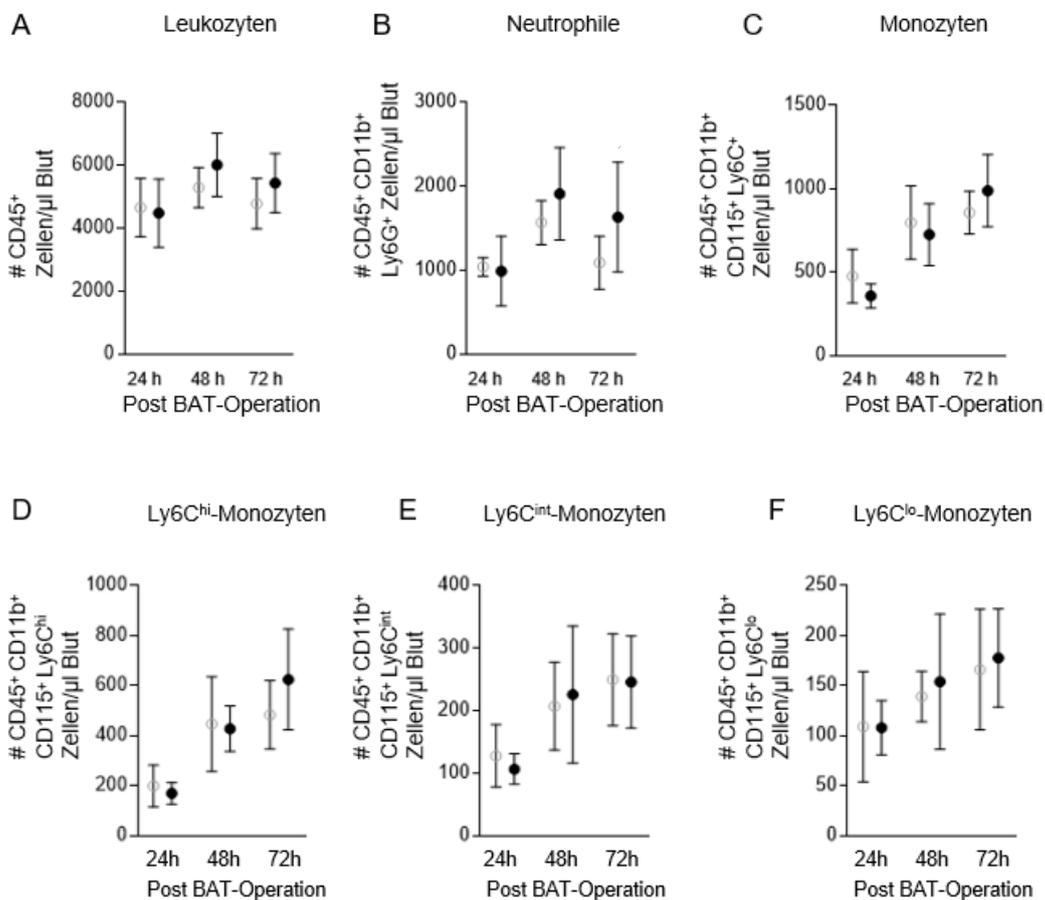


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen nach BAT-Ablation. Dargestellt sind verschiedene Immunzelltypen und -subtypen in Zellen pro μ l Blut, 24, 48 und 72 Stunden (h) nach der BAT (braunes Fettgewebe) -Sham Operation bzw. BAT-Ablation. **A**, Quantifizierung der CD45⁺ Leukozyten (n=3,5;8,6;10,12) **B**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Neutrophilen Granulozyten (n=3,5;8,8;12,13) **C**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺ Ly6C⁺ -Monozyten (n=3,6;8,7;10,11). Mit dem Monozyten-Marker Ly6C wurden in Abhängigkeit der Expression weitere Subtypen quantifiziert **D**, Ly6C^{hi}-Monozyten (n=3,6;8,7;10,11) **E**, Ly6C^{int}-Monozyten (n= n=3,6;8,7;10,11) und **F**, Ly6C^{lo}-Monozyten (n=3,6;8,7;10,11). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Neben den myeloiden Leukozyten können auch zirkulierende Lymphozyten durch die Behandlung verändert worden sein, weshalb ebenfalls eine Analyse von T- und B-Zellen durchgeführt wurde. Bei Betrachtung der Abbildung 18 erkennt man jedoch, dass die Anbringung der Ligaturanlage in Kombination mit der BAT-Ablation keine quantitative Veränderung der Lymphozyten in der Zirkulation hervorgebracht hat.

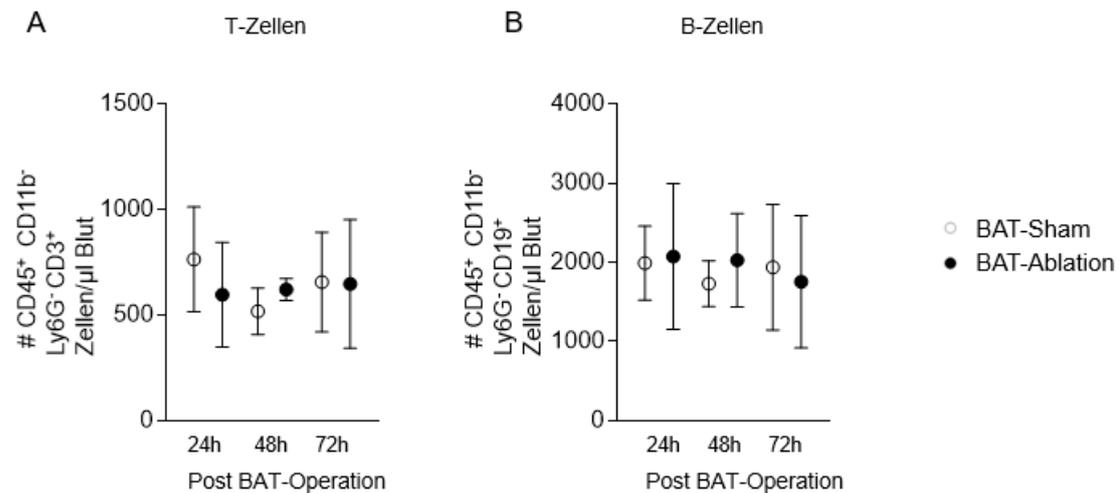


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen nach BAT-Ablation. Dargestellt sind T- und B-Zellen in Zellen pro μl Blut, 24, 48 und 72 Stunden (h) nach der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. **A**, Quantifizierung der $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^- \text{Ly6G}^- \text{CD3}^+$ T-Zellen (n=3,5;8,6;10,12) **B**, Quantifizierung der $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^- \text{Ly6G}^- \text{CD19}^+$ B-Zellen (n=3,5;8,8;12,13). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.2 Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen

Um Veränderungen der Immunzellen im Herzen selbst zu evaluieren, wurden nachfolgend auch kardiale Immunzellpopulationen charakterisiert. Um den Einfluss der Anbringung der Ligaturanlage im Zuge der Vor-Operation zusammen mit der BAT-Operation entsprechend ohne anschließende I/R-Operation zu determinieren, wurde deshalb 3 Tage nach dem chirurgischen Eingriff eine durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im Herzen durchgeführt (Abb. 19). In keiner der dargestellten Immunzellpopulationen ließen sich Unterschiede feststellen, weshalb geschlossen werden konnte, dass die Vor-OP zusammen mit der BAT-Ablation keine Auswirkung im Sinne eines kardialen, immunogenen Effektes zu haben schien.

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

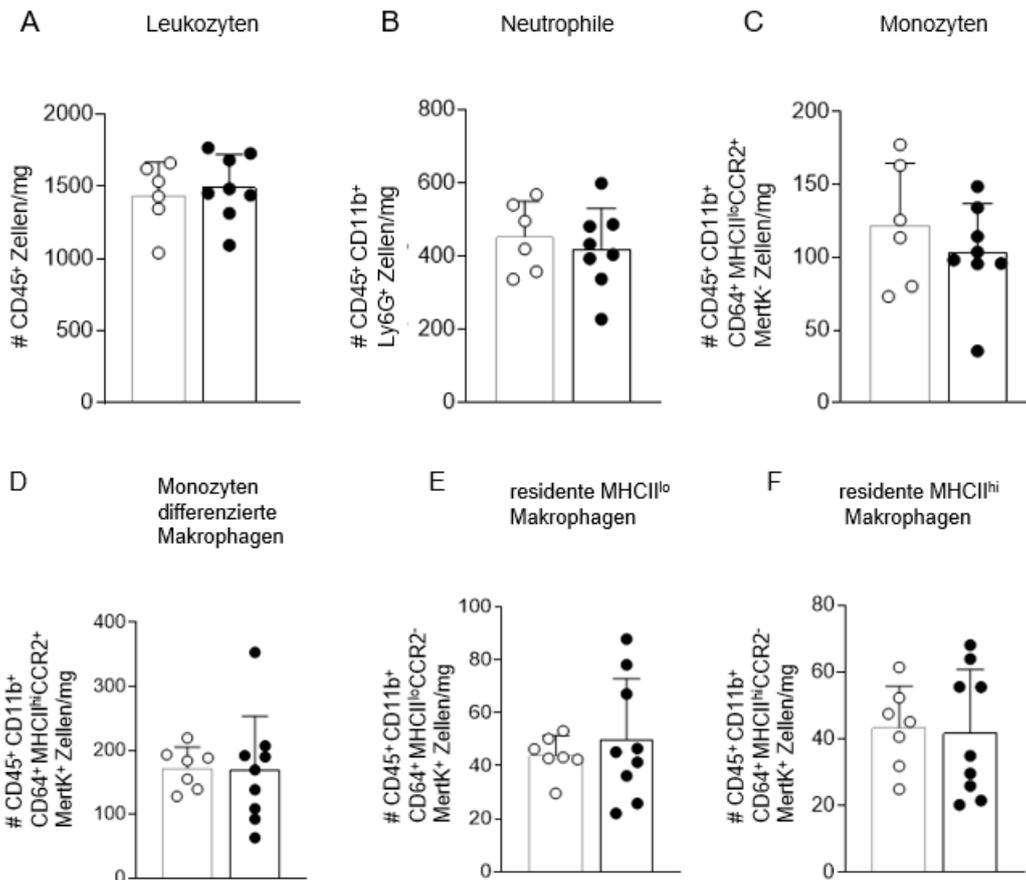


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen 72 Stunden nach BAT-Ablation. Dargestellt sind verschiedene Immunzelltypen und -subtypen in Zellen pro mg Herzgewebe 72 Stunden nach der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. In Analogie zu Abb. 17 wurden Oberflächenmarker für die Quantifizierung von **A**, Leukozyten (n=6,8) und **B**, Neutrophile (n=6,8) verwendet und um die Marker CD64, MHCII, CCR2 und MertK für die Quantifizierung von **C**, CD45⁺ CD11b⁺ CD64⁺ MHCII^{lo} CCR2⁺ MertK⁺ - Monozyten (n=6,8) **D**, CD45⁺ CD11b⁺ CD64⁺ CCR2⁺ MHCII^{hi} MertK⁺ aus Monozyten differenzierte Makrophagen (n=7,9) **E**, CD45⁺ CD11b⁺ CD64⁺ CCR2⁻ MertK⁺ residente MHCII^{lo} -Makrophagen (n=7,9) **F**, CD45⁺ CD11b⁺ CD64⁺ CCR2⁻ MertK⁺ residente MHCII^{hi} -Makrophagen (n=7,9) erweitert. Dargestellt sind Mittelwerte + SD.

Auch die Analyse kardialer Immunzellen hinsichtlich der Lymphozyten zeigte keinen Unterschied in der BAT-*Sham* bzw. BAT-Ablationsgruppe (Abb. 20).

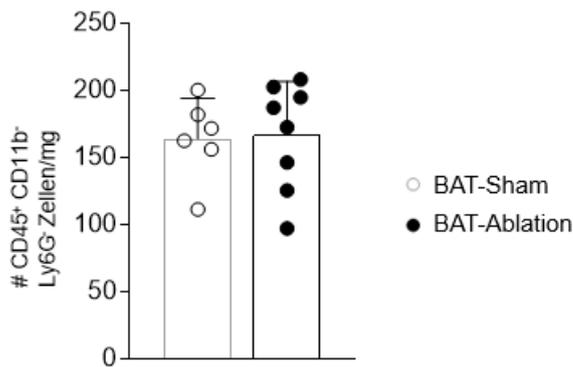


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 72 Stunden nach BAT-Ablation. Quantifizierung von CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ Lymphozyten in Zellen pro mg Herzgewebe 72 Stunden nach der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. Dargestellt sind Mittelwerte + SD, n=6,8.

3.4 Einfluss der BAT-Ablation auf Immunzellen nach Myokardinfarkt

3.4.1 Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Da keine Effekte durch die Vor-Operation in Kombination mit einer BAT-Operation auf Immunzellen zu beobachten waren, ergab sich im Folgendem die Frage, ob sich die Ablation des braunen Fettgewebes mit anschließendem MI auf die Immunzellantwort auswirkt. Auch hierfür wurde eine durchflusszytometrischen Messung des Blutes 72 Stunden nach der I/R-Operation durchgeführt (Abb. 21). In der BAT-Ablationsgruppe konnte man eine tendenzielle Erhöhung von Leukozyten (Abb.21A) und Neutrophilen (Abb.21B) erkennen. Der Effekt auf die Monozyten (Abb.21C) fiel deutlicher aus und zeigte sich letztlich in einer statistisch signifikanten Erhöhung der korrespondierenden proinflammatorischen Ly6C^{hi}-Monozyten (Abb. 21D). Darüber hinaus zeigten auch die Ly6C^{int}-Monozyten der BAT-Ablationsgruppe ein deutlich stärkeres Aufkommen als in der Kontrollgruppe (Abb. 21E). Ferner waren die Ly6C^{hi}-Monozyten den Ly6C^{lo}-Monozyten (Abb. 21F) zahlenmäßig zu gegebenem Zeitpunkt überlegen. Sofern also im Vorfeld des MIs das braune Fettgewebe chirurgisch entfernt wurde, schien dies eine erhöhte periphere Immunantwort nach MI zu stimulieren.

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

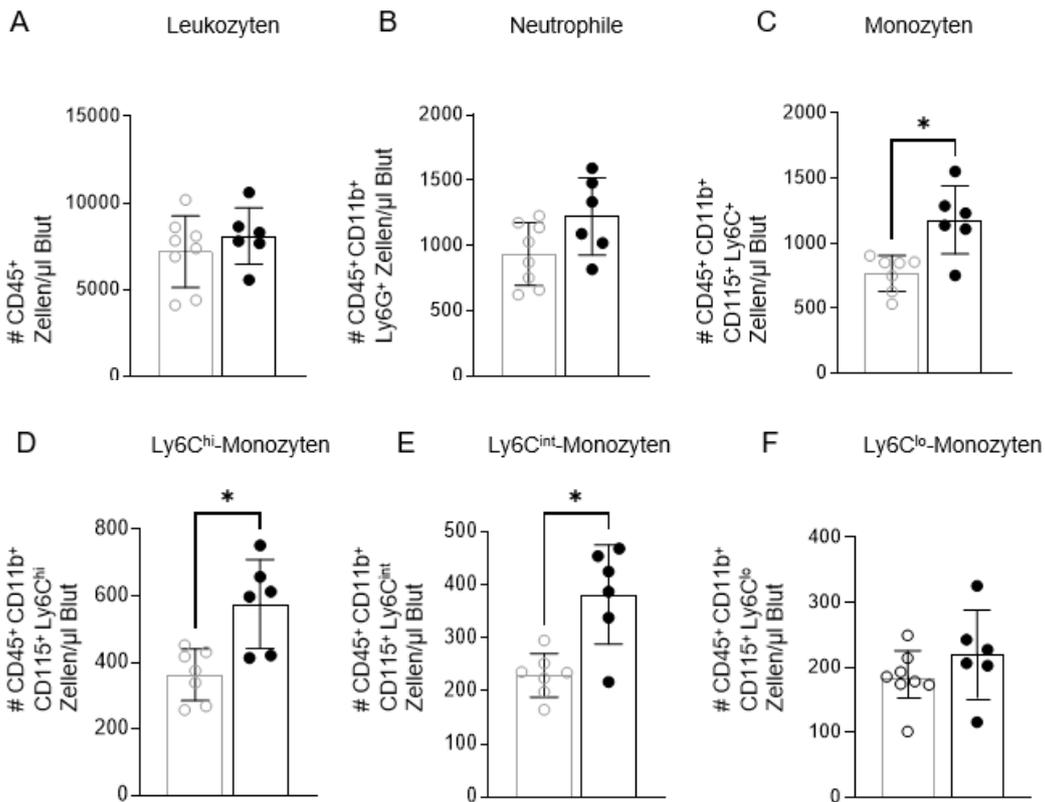


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt. Dargestellt sind verschiedene Immunzelltypen und -subtypen in Zellen pro μ l Blut 72 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -Sham Operation bzw. BAT-Ablation. In Analogie zu Abb. 17 wurden die gleichen Oberflächenmarker für die Identifizierung von **A**, Leukozyten (n=8,6) **B**, Neutrophile (n=8,6) **C**, Monozyten (n=7,6) **D**, Ly6C^{hi}-Monozyten (n=7,6) **E**, Ly6C^{int}-Monozyten (n=7,6) und **F**, Ly6C^{lo}-Monozyten (n=7,6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden durch den *unpaired t-test* berechnet: *, p < 0,05.

Die korrespondierende Analyse der zirkulierenden T- und B-Zellen ergab erneut keine behandlungsbedingten Unterschiede (Abb. 22).

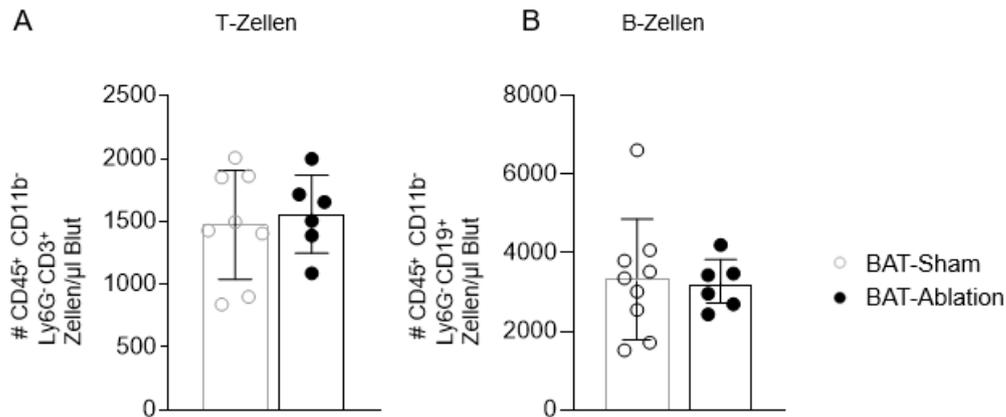


Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt. Dargestellt sind T- und B-Zellen in Zellen pro μl Blut 72 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. **A**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ CD3⁺ T-Zellen (n=8,6) **B**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ CD19⁺ B-Zellen (n=9,6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

3.4.2 Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt

Im Folgenden wurden Immunzellen im Herzen analog zum Abschnitt 3.3.2 genauer auf entsprechende Immunzellpopulationen hin untersucht. In der durchflusszytometrischen Analyse der Herzen 72 Stunden nach MI zeigte sich ein klares Bild: Tieren, denen vor der I/R-Operation das braune Fettgewebe entnommen wurde, offenbarten ein signifikant höheres Aufkommen an kardialen Immunzellen. Sowohl die Leukozyten im Allgemeinen (Abb. 23A) als auch neutrophile Granulozyten (Abb. 23B), residente MHCII^{lo} - Makrophagen (Abb. 23E) und aus Monozyten differenzierte Makrophagen (Abb. 23G) waren im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen das BAT funktionell intakt war, stark erhöht. Darüber hinaus deutete auch die Hauptpopulation der Monozyten (Abb. 23C) eine größere Präsenz im Herzen an, sofern die Tiere einer BAT-Ablation unterzogen worden sind.

Zu dem gegebenen Zeitpunkt zeigte die durchflusszytometrische Analyse, dass die BAT-Ablation in einem deutlich höheren Aufkommen von proinflammatorischen Zellentitäten wie Neutrophilen und aus Monozyten differenzierte Makrophagen resultierte. Allerdings konnte in der gleichen Gruppe auch eine erhöhte Zellzahl von antiinflammatorischen, residenten Makrophagen beobachtet werden.

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

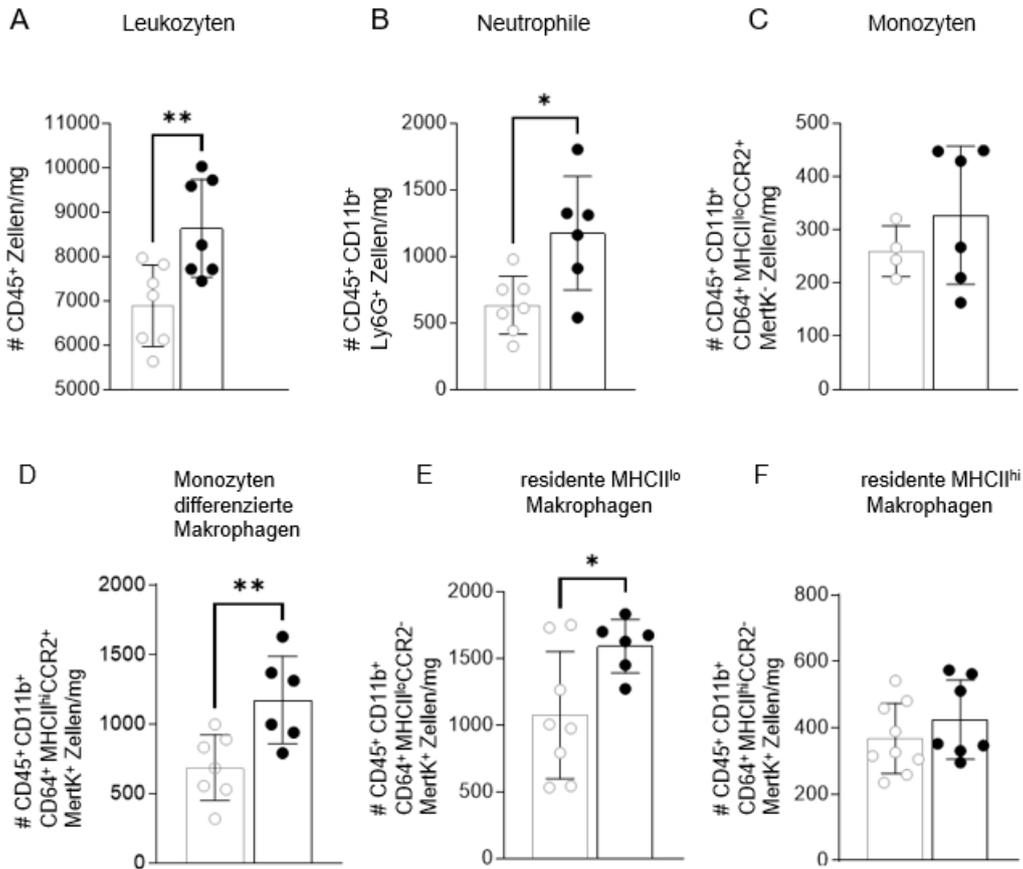


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt. Dargestellt sind verschiedene Immunzelltypen und -subtypen in Zellen pro mg Herzgewebe 72 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. In Analogie zu Abb. 19 wurden die gleichen Oberflächenmarker für die Quantifizierung von **A**, Leukozyten (n=6,8) **B**, Neutrophilen Granulozyten (n=6,8) **C**, Monozyten (n=6,8) **D**, aus Monozyten differenzierte Makrophagen (n=7,6) **E**, residente MHCII^{lo} -Makrophagen (n=7,9) **F**, residente MHCII^{hi} -Makrophagen (n=7,9) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet: *, p < 0,05; **, p < 0,01.

Auch zu diesem Zeitpunkt ergab sich kein Unterschied in kardialen Lymphozyten durch die jeweilige BAT-Operation (Abb 24).

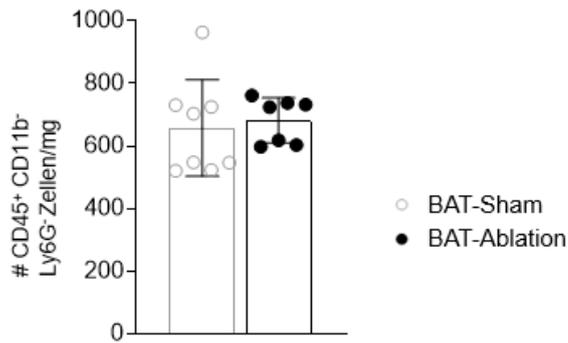


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 72 Stunden nach Myokardinfarkt. Quantifizierung von CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ Lymphozyten in Zellen pro mg Herzgewebe 72 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n=8,7.

3.4.3 Einfluss der BAT-Ablation auf zirkulierende Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt

Auf Grund des Umstands, dass der zuvor gewählte 3-Tageszeitpunkt eventuell zu spät war, um Unterschiede in Granulozyten-Zahlen durch die BAT-Operation in der Zirkulation zu detektieren, wurde nachfolgend ein 24 Stunden Zeitpunkt nach MI gewählt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich jedoch, dass die Neutrophilen der BAT-Ablationsgruppe zu diesem Zeitpunkt nicht durch die Behandlung beeinflusst waren (Abb. 25A). Auch die Monozyten zeigten keine Veränderung (Abb. 25C). Lediglich die Ly6C^{hi}-Monozyten der BAT-Ablationsgruppe zeigten eine tendenziell quantitative Erhöhung im Vergleich zur BAT-*Sham* Gruppe, was den 72 Stunden Befund partiell bestätigte.

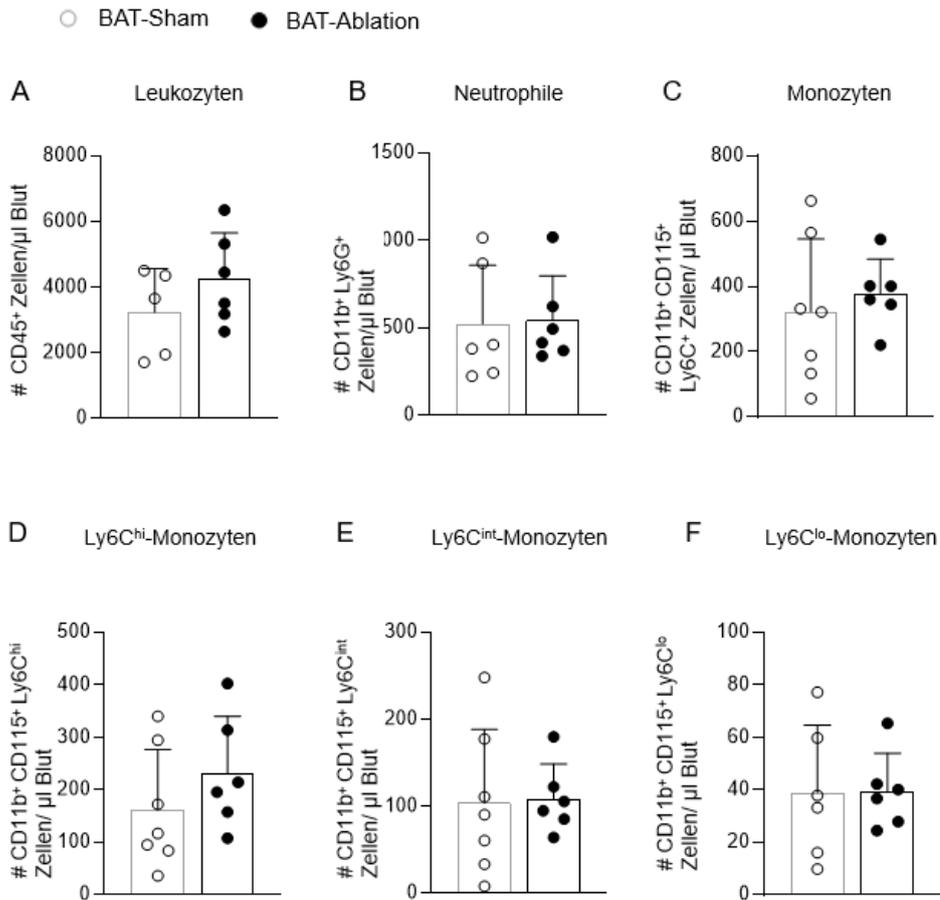


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt. Quantifizierung verschiedener Immunzelltypen und -subtypen pro μ l Blut 24 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. In Analogie zu Abb. 17 wurden die gleichen Oberflächenmarker für die Quantifizierung von **A**, Neutrophile (n= 5,3) **B**, Monozyten (n=5,3) **C**, Ly6C^{hi} -Monozyten (n=5,3) **D**, Ly6C^{int} -Monozyten (n=5,3) und **E**, Ly6C^{lo} -Monozyten (n=5,3) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte + SD.

Darüber hinaus waren auch zu diesem Zeitpunkt T- Zellen nicht signifikant verändert (Abb. 26A). Allerdings ist eine tendenzielle Erhöhung der B-Zellanzahl in der BAT-Ablationsgruppe zu erkennen (Abb. 26B)

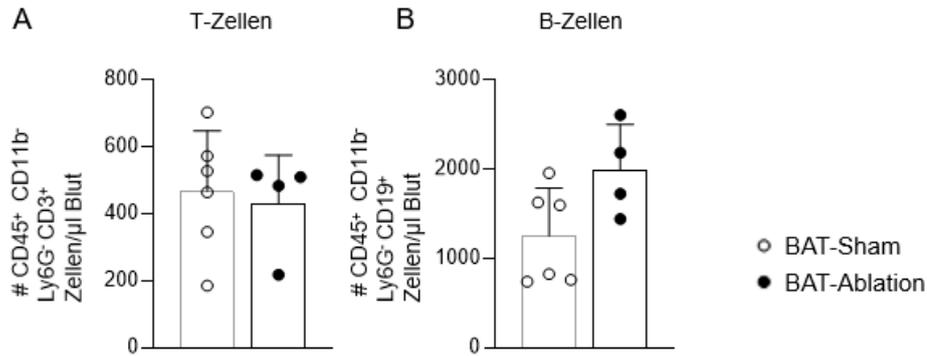


Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt. Dargestellt sind T- und B-Zellen in Zellen pro μl Blut 24 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. **A**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ CD3⁺ T-Zellen (n=8,6) **B**, Quantifizierung der CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ CD19⁺ B-Zellen (n=9,6). Dargestellt sind Mittelwerte + SD.

3.4.4 Einfluss der BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt

Die Analyse von Immunzellen im Herzgewebe 24 Stunden nach MI ergab ebenfalls keine signifikante, quantitative Veränderung durch die Entfernung des braunen Fettgewebes (Abb. 27).

○ BAT-Sham ● BAT-Ablation

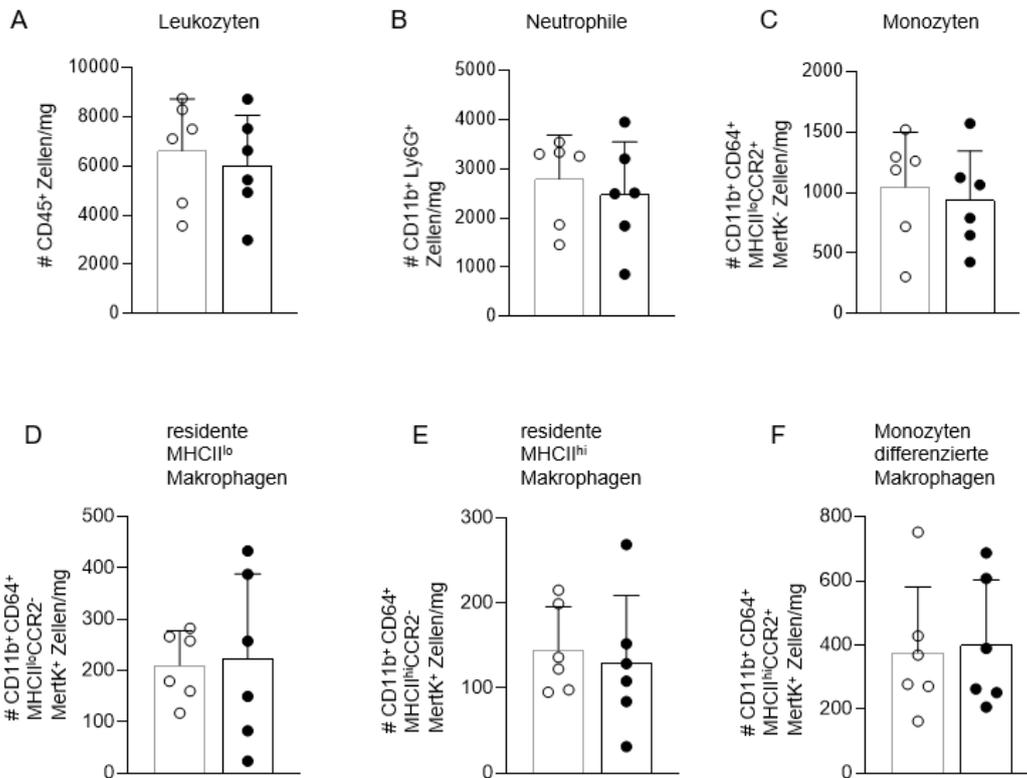


Abbildung 277: Der Einfluss einer BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt. Dargestellt sind verschiedene Immunzelltypen und -subtypen in Zellen pro mg Herzgewebe 24 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -Sham Operation bzw. BAT-Ablation. In Analogie zu Abb. 19 wurden die gleichen Oberflächenmarker für die Quantifizierung von **A**, Neutrophilen (n=4,4) **B**, Monozyten (n=3,4) **C**, residenten MHCII^{lo} -Makrophagen (n=4,4) **D**, residenten MHCII^{hi} -Makrophagen (n=4,4) und **E**, aus Monozyten differenzierten Makrophagen (n=4,4) verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte + SD.

Zudem war die Lymphozytenanzahl auf Grund des operativen Eingriffs der BAT-Ablation erneut nicht verändert (Abb. 28).

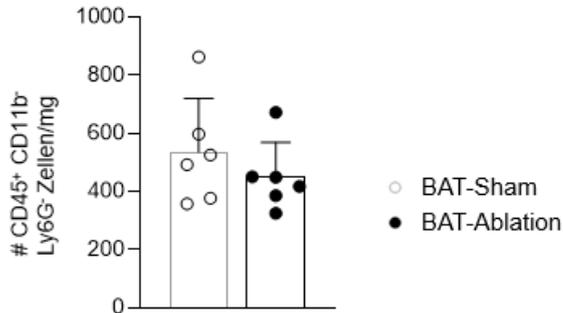


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 24 Stunden nach Myokardinfarkt. Quantifizierung von CD45⁺ CD11b⁻ Ly6G⁻ Lymphozyten in Zellen pro mg Herzgewebe 24 Stunden nach Myokardinfarkt in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -*Sham* Operation bzw. BAT-Ablation. Dargestellt sind Mittelwerte + SD, n=8,7.

3.5 Einfluss der BAT-Ablation auf das Transkriptom kardialer myeloider Zellen nach Myokardinfarkt

3.5.1 Generelle Charakterisierung des Transkriptoms analysierter Immunzellen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes im Vorfeld des MIs zu einer stärkeren Immunantwort sowohl in der Zirkulation als auch im Herzen selbst nach MI führte. Auf Grund der Tatsache, dass mittels durchflusszytometrischer Analyse nur unvollständige Aussagen über den jeweils spezifischen Phänotyp einzelner Immunzellpopulationen gemacht werden können, wurde die Methodik der Einzelzell-RNA-Sequenzierung genutzt, um hier eine detailliertere Charakterisierung kardialer Immunzellen zu ermöglichen. Dafür wurden lebende, myeloide Zellen nach vorheriger quantitativer, durchflusszytometrischer Sortierung von CD45⁺, CD11b⁺ und CD31⁻ Zellen analysiert (siehe 2.5.1). Basierend auf der individuelle Genexpression ergaben sich 28 distinkte Zellcluster, die nach literatur- und datenbankbasierenden Analysen zu den hier (Abb. 29A) dargestellten 18 *Cluster* zusammengefasst wurden. Durch die generelle Abbildung der verschiedenen *Cluster*, ohne die differierende Variable der BAT-Operation mit einzubeziehen, wurde deutlich, dass trotz des im Vorfeld stattgefundenen Zellsortierens neben myeloiden Zellen auch andere Zellentitäten wie Erythrozyten oder Kardiomyozyten erfasst wurden. Diese wurden jedoch im Folgenden durch entsprechende bioinformatische Programmierung nicht weiter berücksichtigt.

Um nachvollziehen zu können, welchen Einfluss die chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes nahm, wurden die Zellpopulationen für die jeweilige Behandlung

bioinformatisch separat berechnet und dann aufeinandergelegt (Abb. 29B). Auf diesem Weg wurde ersichtlich, dass die BAT-Ablation (rot) im Vorfeld des MIs im Vergleich zur BAT-*Sham*-Operation (blau) kein neues Zellcluster hervorgebracht hat. Die BAT-Ablation per se führte also nicht zu einer gänzlich abweichenden Zellentität, die sich durch ein distinktes Genexpressionsmuster klassifizieren würde.

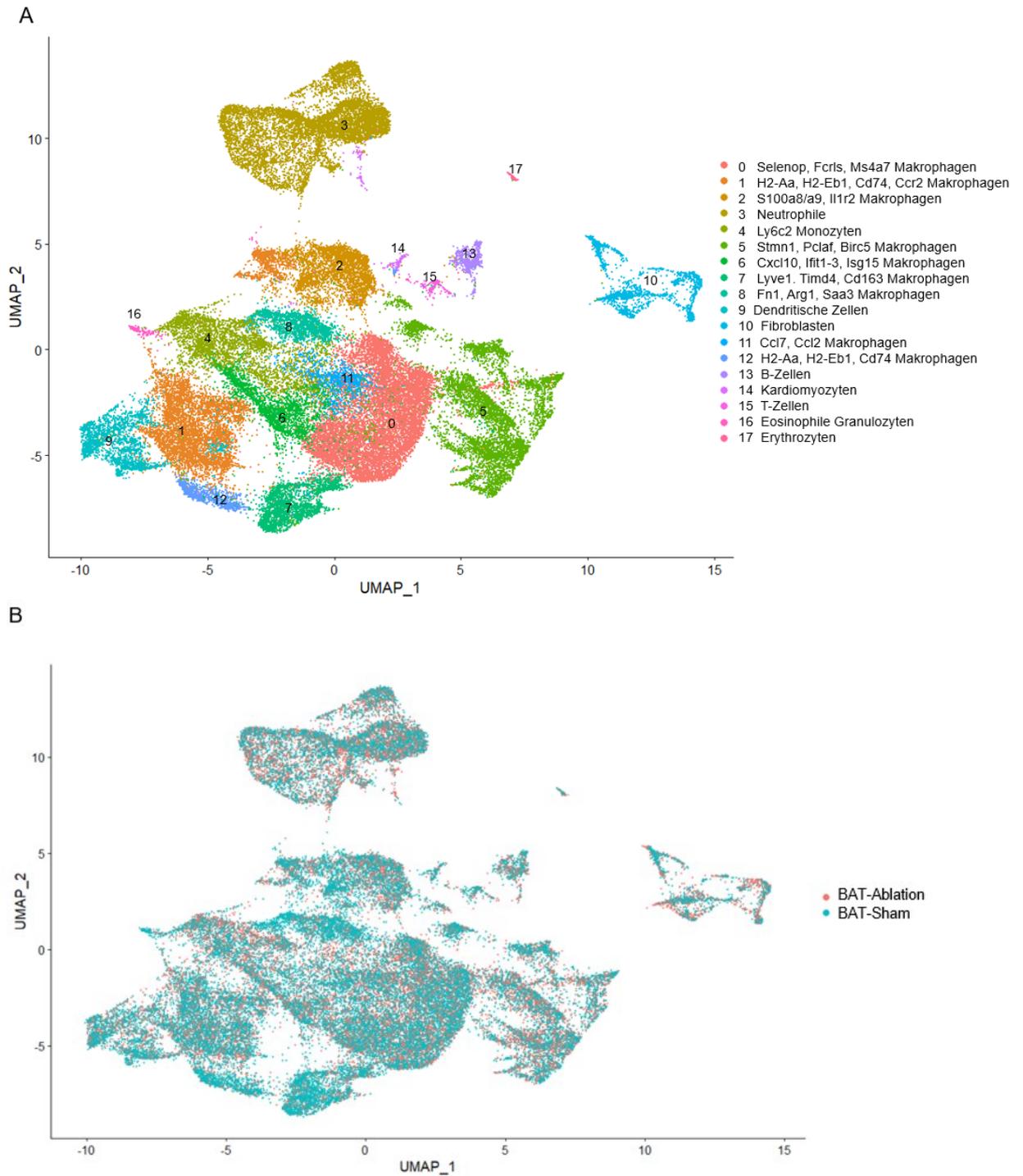


Abbildung 29: UMAP-Plot von CD45⁺, CD11b⁺, CD31⁻ vorsortierten kardialen myeloiden Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt. Die hier aus 59436 sequenzierten Zellen definierten *Cluster* ergeben sich nach literatur- und datenbankbasierenden Analysen entsprechend der Expression kanonischer Gene **A**. Die Farbkodierung mit den entsprechenden Zahlen dient als Zuordnungshilfe für die korrespondierenden Zellpopulationen. Die Analyse umfasst ein n=3 pro Behandlung. **B**, UMAP-Plot der Zellcluster, wobei die sequenzierten Zellen der BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation und BAT-*Sham*-Operation aufeinander *geplottet* wurden.

3.5.2 Einfluss auf neutrophile Granulozyten

Da im Rahmen der durchflusszytometrischen Erhebung neutrophile Granulozyten im Sinne eines möglichen pro- oder antiinflammatorischen Charakters nicht weiter differenziert wurden, konnte dies nun anhand der individuellen Genexpression vervollständigt werden. Es zeigte sich, dass die neutrophilen Granulozyten in der BAT-Ablationsgruppe nach MI ein signifikant stärkeres proinflammatorisches Profil aufwiesen als die der BAT-*Sham* Gruppe. Dies wurde deutlich in Anbetracht des dargestellten *Volcano-Plots* (Abb. 30), der die Heraufregulation von Entzündungsmarkern wie *Fos*, *Il1b* und *Junb* in der BAT-Ablationsgruppe abbildet. Ferner konnte mit der Hochregulation von *G0s2* ein Gen ausgemacht werden, was sich unter anderem über eine metabolische Einflussnahme klassifiziert. Eine signifikante Herunterregulation zeigte sich vor allem in Genen ribosomaler Proteine wie *Rps27*, *Rps29* oder *Rpl41*.

Wurde das BAT im Vorfeld des MIs entfernt, führte dies also zu einem veränderten Genexpressionsmuster in den analysierten neutrophilen Granulozyten, sowohl auf inflammatorischer als auch auf metabolischer Ebene.

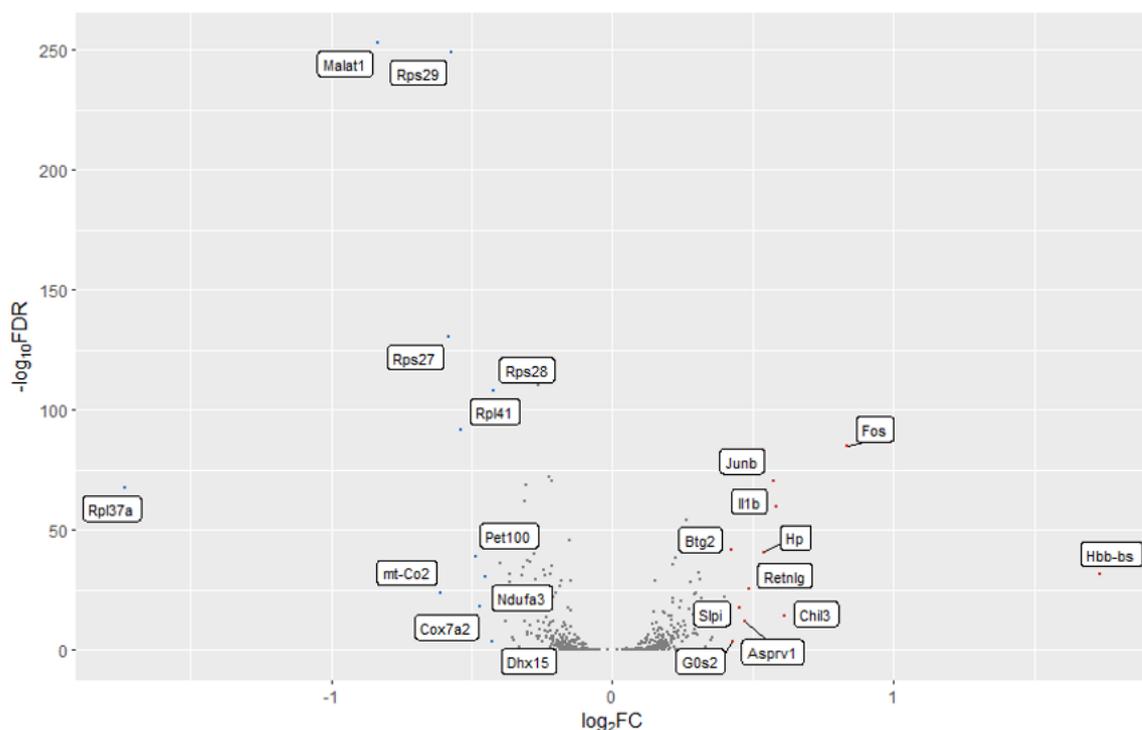


Abbildung 30: Volcano-Plot von neutrophilen Granulozyten nach Myokardinfarkt.

Volcano-Plot zur Hervorhebung unterschiedlich exprimierter Gene in Neutrophilen in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation bzw. BAT-*Sham*-Operation. Rote Punkte (rechte Seite) stehen für Gene, die aufgrund der BAT-Ablation heraufreguliert sind, graue Punkte für nicht signifikant veränderte Gene und blaue Punkte (linke Seite) für herunterregulierte Gene. Signifikanzen wurden durch die FDR (*false discovery rate*) errechnet; $p < 0,05$.

Darüber hinaus wurde eine datenbankbasierte-Analyse (*GO-Term* Signalweg-Analyse) der Neutrophilen hinsichtlich regulierter Signalwege herangezogen. Die BAT-Ablation führte zu einer signifikanten Heraufregulation von Genen, wodurch sich eine korrespondierende, eindeutige Konstellation ergab und sich deshalb eine enge Interaktion mit myeloiden Leukozyten ausmachen ließ. Regulierte *Pathways* zeigten eine Beteiligung der Neutrophilen der BAT-Ablationsgruppe in der „Leukozyten-Chemotaxis“, „myeloiden Leukozyten-Migration“ und „generellen Chemotaxis“ (Abb. 31). Die Neutrophilen der BAT-*Sham* Gruppe besaßen hingegen hochregulierte Signalwege in der „Mitochondrien Organisation“, „ribosomalen Biogenese“ und „intrinsisch apoptotischen Signalwegen“.

Das Bild des proinflammatorischen Charakters der neutrophilen Granulozyten der BAT-Ablationsgruppe wurde auf diesem Weg weiter bekräftigt.

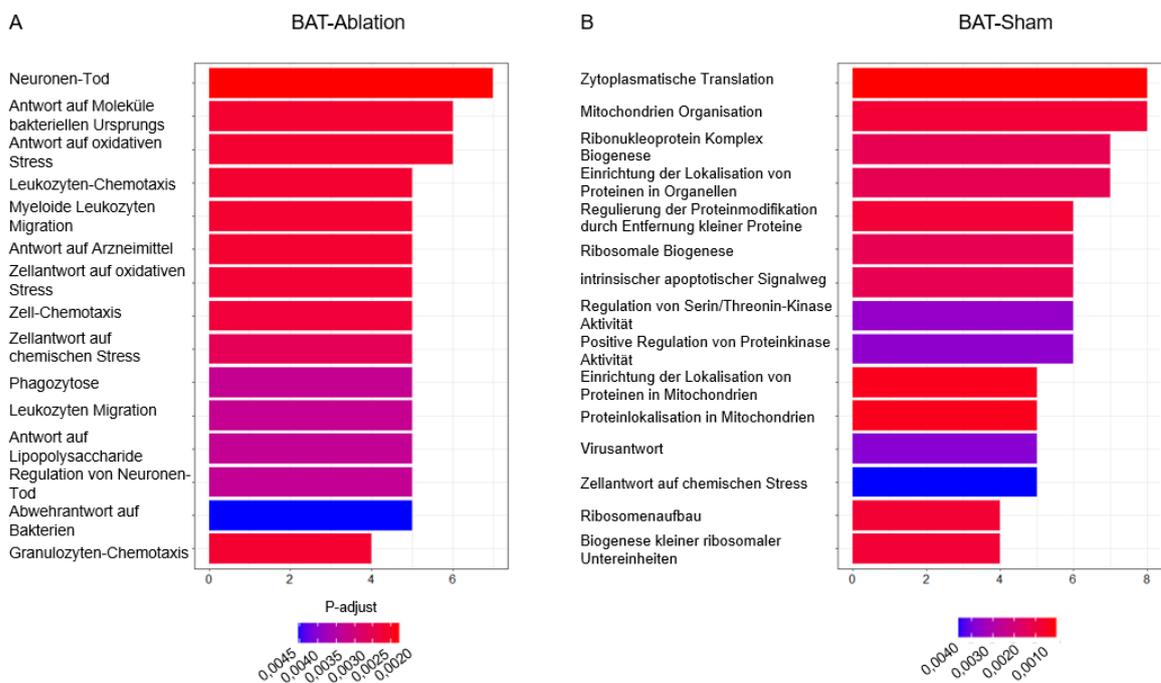


Abbildung 31: GO-Term Signalweg-Analyse in neutrophilen Granulozyten.

Dargestellt sind 15 mittels *ClusterProfiler* generierten *Gene Ontology* (GO) -Signalwege, um funktionale Profile zwischen den Behandlungen **A**, BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation und **B**, BAT-*Sham* in neutrophilen Granulozyten zu vergleichen und zu visualisieren. p-Werte wurden durch die FDR (*false discovery rate*) -Methode errechnet, wobei sich eine Signifikanz bei $p < 0,05$ ergab.

Da die oben angeführten Beobachtungen auch mit Veränderungen im zellulären Metabolismus zusammenhängen können, wurden die Einzelzellsequenzierungsdaten auf Unterschiede in den Behandlungen hinsichtlich Lipolyse- und Glykolyse-assoziiierter Gene geprüft. Das signifikant hochregulierte *G0s2* Gen wurde um weitere Marker

ergänzt (siehe Appendix für im *Dotplot* verwendeter Gene), um eine genauere Aussage tätigen zu können. Die BAT-Ablation führte in Neutrophilen zu einer verstärkten durchschnittlichen Expression von Genen, die in dem Prozess der Glykolyse (Abb. 32A) involviert sind. Dies wurde durch die Hochregulation der Gene wie *Aldoa*, *Gapdh* oder *Pkm* deutlich. Hingegen konnte im Kontext der Lipolyse (Abb. 32B) keine eindeutige Schlussfolgerung gezogen werden, da sich hier sowohl in der prozentualen als auch in der durchschnittlichen Expression keine klare Tendenz durch die Behandlung zeigte.

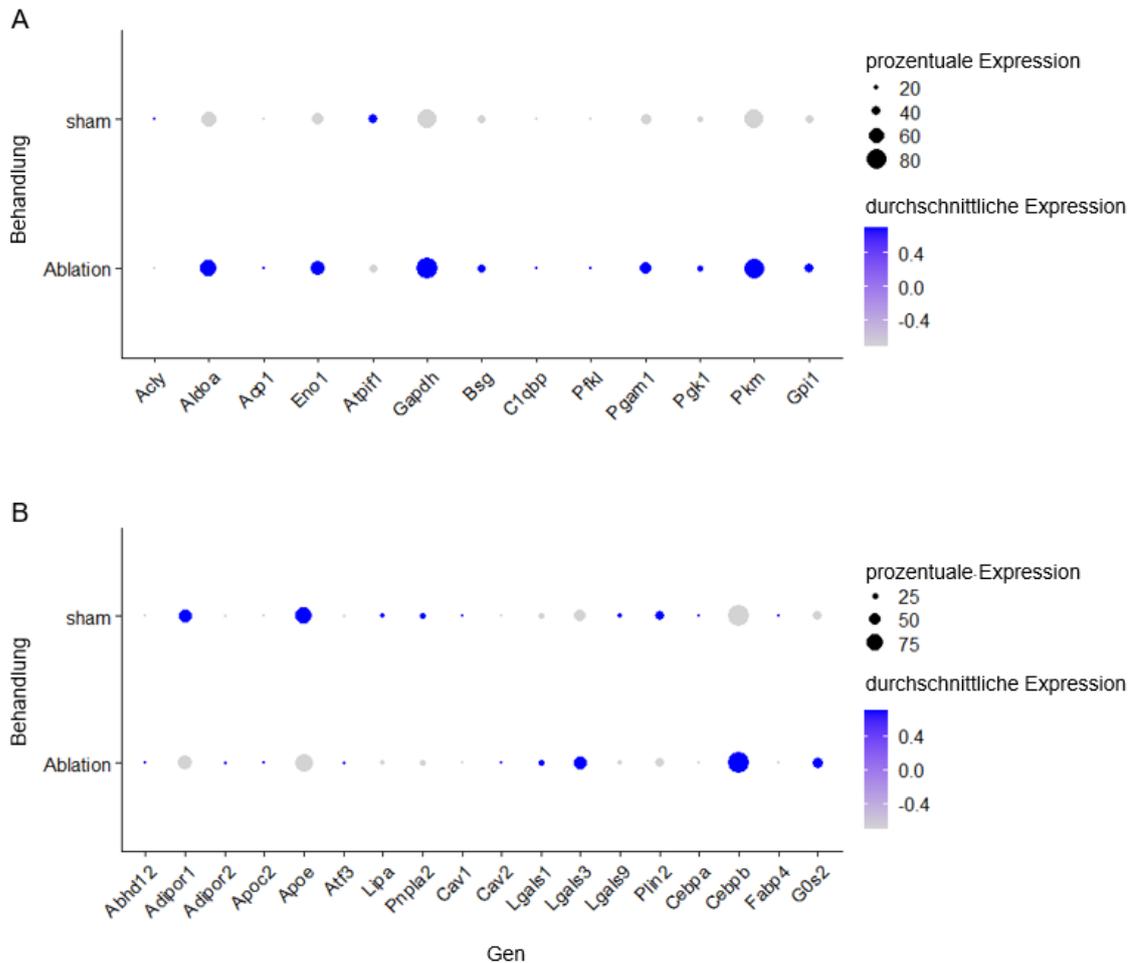


Abbildung 32: Expression Glykolyse- und Lipolyse assoziierter Gene in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung in neutrophilen Granulozyten. Dargestellt sind *Dotplots* von **A**, Glykolyse- oder **B**, Lipolyse-assoziiierter Gene in Abhängigkeit der BAT (braunes Fettgewebe) - Ablation bzw. BAT-*Sham*-Operation. Die Größe jedes Punktes zeigt den Prozentsatz an Neutrophilen an, die ein entsprechenden Gen exprimieren. Die Farbintensität jedes Punktes stellt die durchschnittliche Expression des entsprechenden Gens über alle Neutrophile hinweg dar.

3.5.3 Einfluss auf Makrophagen

Da mittels Durchflusszytometrie proinflammatorische Zellpopulationen lediglich anhand der Oberflächenmarker Ly6C und CCR2 ausgemacht werden konnten, wurde die Charakterisierung mit Hilfe der Einzelzellsequenzierung komplettiert. Ähnlich wie bei den Daten zu neutrophilen Granulozyten ließ sich auch in den Makrophagen (Abb. 33) eine Heraufregulation von proinflammatorischen Genen wie *S100a8*, *S100a9* und *Fos* erkennen. Auf der anderen Seite konnte eine Herunterregulation ribosomaler- (*Rps29*) und Mitochondrien-assoziiierter Gene (*Atp5k*) beobachtet werden.

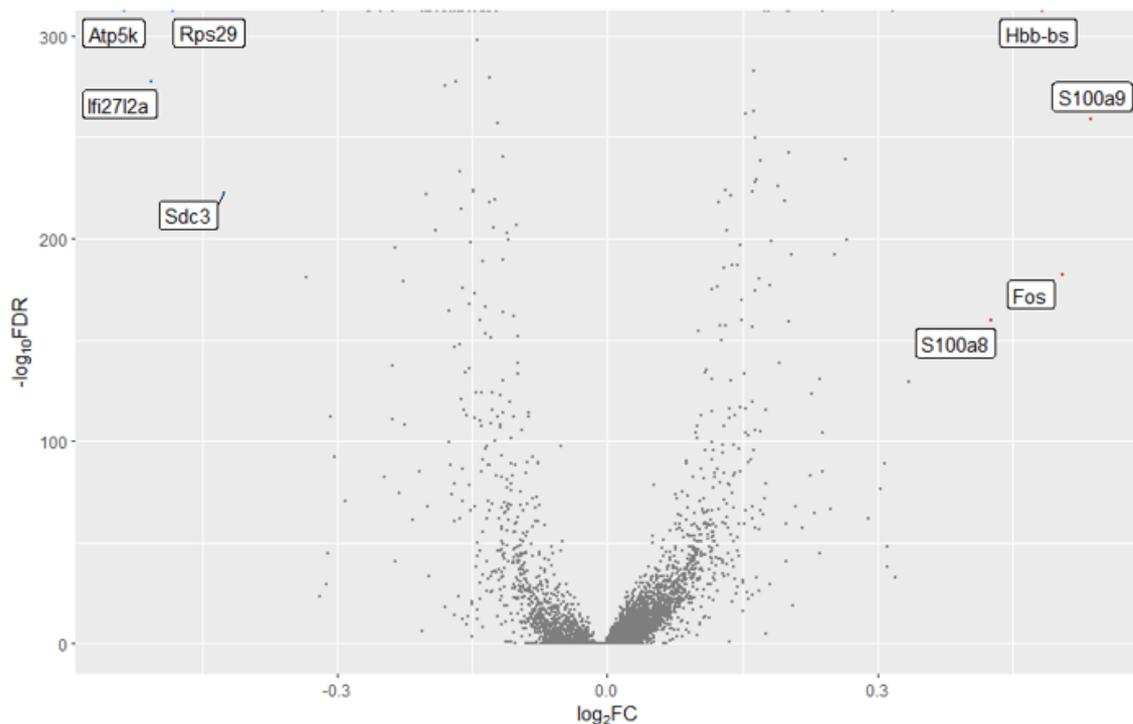


Abbildung 33: Volcano-Plot von Makrophagen nach Myokardinfarkt.

Volcano-Plot zur Hervorhebung unterschiedlich exprimierter Gene in Makrophagen in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation bzw. BAT-*Sham*-Operation. Rote Punkte (linke Seite) stehen für Gene, die aufgrund der BAT-Ablation hochreguliert sind, graue Punkte für nicht signifikant veränderte Gene und blaue Punkte (rechte Seite) für herunterregulierte Gene. Signifikanzen wurden durch die FDR (*false discovery rate*) errechnet; $p < 0,05$.

Analog zu den neutrophilen Granulozyten wurde auch für alle *Cluster* der Makrophagen eine GO-Term Signalweg-Analyse durchgeführt (Abb.34). Die hochregulierten Signalwege offenbarten eine starke Zell-Zell Interaktion zwischen Neutrophilen und Makrophagen *vice versa*. Dies ließ sich in der BAT-Ablationsgruppe an der hochregulierten, Makrophagen-abhängigen Einflussnahme auf die „Neutrophilen-Chemotaxis“, „Neutrophilen-Migration“ und auch „Leukozyten-Migration“ im Allgemeinen

festmachen. Interessanterweise schien auch eine Involvierung in metabolischer Hinsicht zu bestehen, was sich in dem heraufregulierten Signalweg „negative Regulation katabolischer Prozesse“ darstellte. Hingegen zeigten die Makrophagen in der BAT-*Sham*-Gruppe eine Regulation in „zytoplasmatischer Translation“, „negative Regulation der Zytokin Produktion“ und „ERK1 und ERK2 Kaskade“.

Folglich bedingte die BAT-Ablation ähnlich wie bei den Neutrophilen im Vorfeld des MIs eine Umstellung der Makrophagen zu einem vermeintlich proinflammatorischen Charakter.

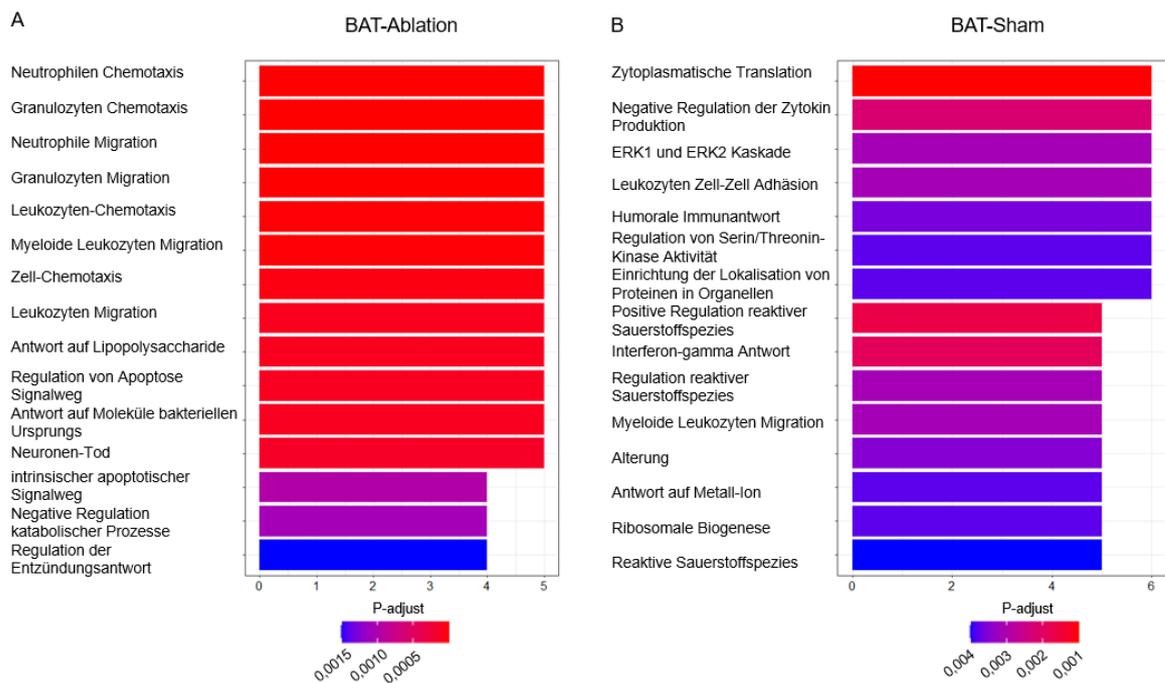


Abbildung 34: GO-Term Signalweg-Analyse in Makrophagen.

Dargestellt sind 15 mittels *ClusterProfiler* generierten *Gene Ontology* (GO) -Signalwege, um funktionale Profile zwischen den Behandlungen **A**, BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation und **B**, BAT-*Sham* und den damit verbundenen Makrophagen-*Cluster* zu vergleichen und zu visualisieren. p-Werte wurden durch die FDR (*false discovery rate*) -Methode errechnet, wobei sich eine Signifikanz bei $p < 0,05$ ergab.

Wie dargestellt, zeigten die Makrophagen im Allgemeinen eine Heraufregulation proinflammatorischer Gene und damit verbundener Signalwege, was sich auch in einer Veränderung des zellulären Metabolismus widerspiegelte (Abb. 35). Die BAT-Ablation führte zu einer klaren Veränderung in Glykolyse-assoziierten Genen (Abb. 35A) in den Makrophagen-*Cluster*. Ähnlich wie bei den neutrophilen Granulozyten ergab die *Dotplot*-Darstellung der Lipolyse-assoziierten Gene keinen eindeutigen Unterschied durch die Behandlung (Abb. 35B).

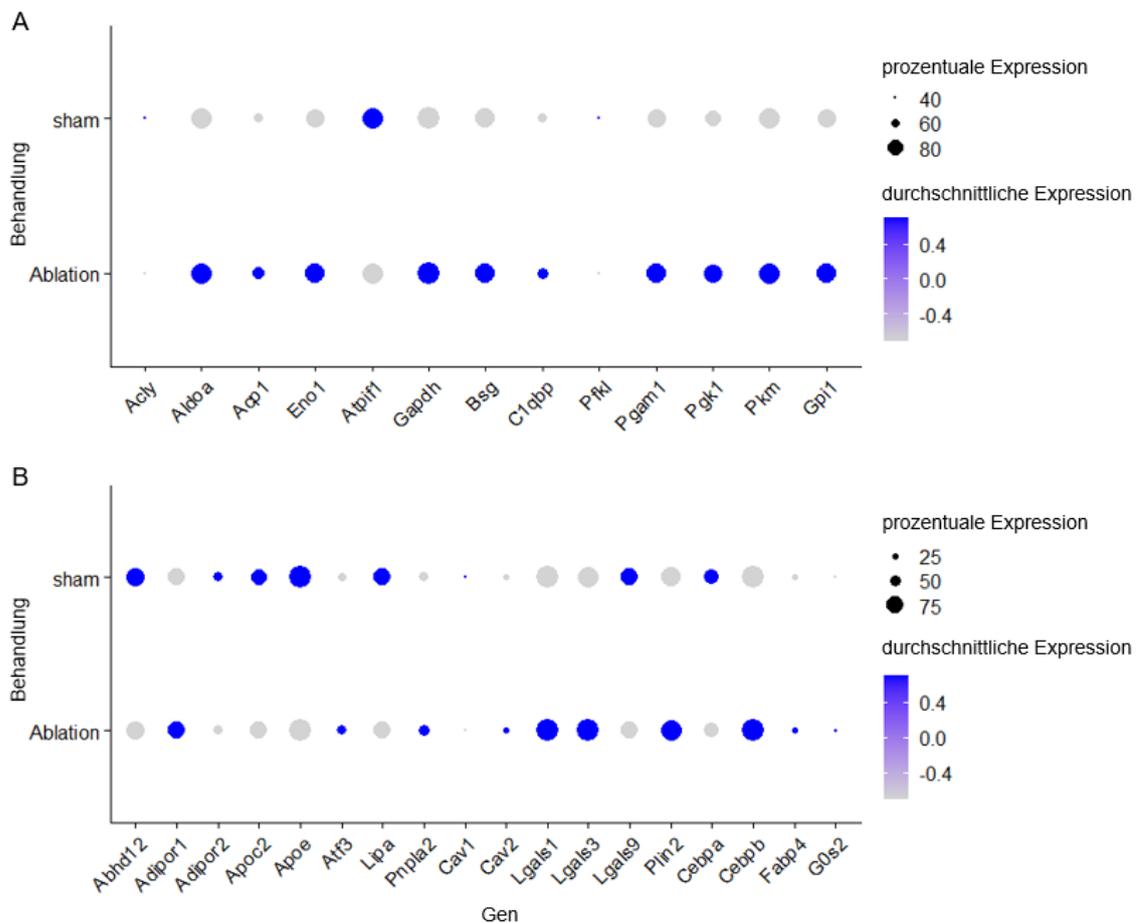


Abbildung 355: Expression Glykolyse- und Lipolyse assoziierter Gene in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung in Makrophagen. Dargestellt sind *Dotplots* von **A**, Glykolyse- oder **B**, Lipolyse-assoziierter Gene in Abhängigkeit der BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation bzw. BAT-*Sham*-Operation. Die Größe jedes Punktes zeigt den Prozentsatz an Makrophagen an, die ein entsprechenden Gen exprimieren. Die Farbintensität jedes Punktes stellt die durchschnittliche Expression des entsprechenden Gens über alle Makrophagen hinweg dar.

3.6 *In-vitro* Charakterisierung von Neutrophilen und Monozyten

3.6.1 Neutrophile Granulozyten

Der in 3.5.2 und 3.5.3 bioinformatisch nachgewiesene Effekt der BAT-Ablation auf den zellulären Metabolismus und inflammatorischen Charakter der myeloiden Leukozyten, wurde ferner in einem *in-vitro* Experiment weiter untersucht. Die Frage, ob ein veränderter Zellmetabolismus auch mit einer veränderten Expression von proinflammatorischen Genen einherging, wurde mit Hilfe der qPCR-Methode validiert. Hierzu wurden Monozyten und neutrophile Granulozyten mittels immunomagnetischer Separation 24 Stunden nach MI isoliert und auf Unterschiede durch die BAT-Ablation vermessen. Verglichen wurde die Expression inflammatorischer- und metabolischer

Gene 3 Tage nach der BAT-Operation mit Daten, die einen Tag nach MI erhoben wurden. Die letztgenannte Versuchsgruppe erhielt wiederum eine BAT-*Sham* Operation oder eine BAT-Ablation.

Die isolierte BAT-Ablation führte in den Neutrophilen zu einer tendenziellen Reduktion der jeweiligen mRNA im Vergleich zur BAT-*Sham* Gruppe (Abb. 36). Ein nachfolgender MI kehrte den Effekt drastisch um, sodass nun die neutrophilen Granulozyten der BAT-Ablationsgruppe eine höhere Expression entsprechender Gene im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Dementsprechend war die Expression von *Tnf* und *Il1b* (Abb. 36A, B) einen Tag nach MI verglichen mit dem 3-Tage-Zeitpunkt nach der BAT-Operation signifikant erhöht, was mit einer starken Heraufregulation der abgebildeten metabolischen Marker einherging (Abb. 36C-F).

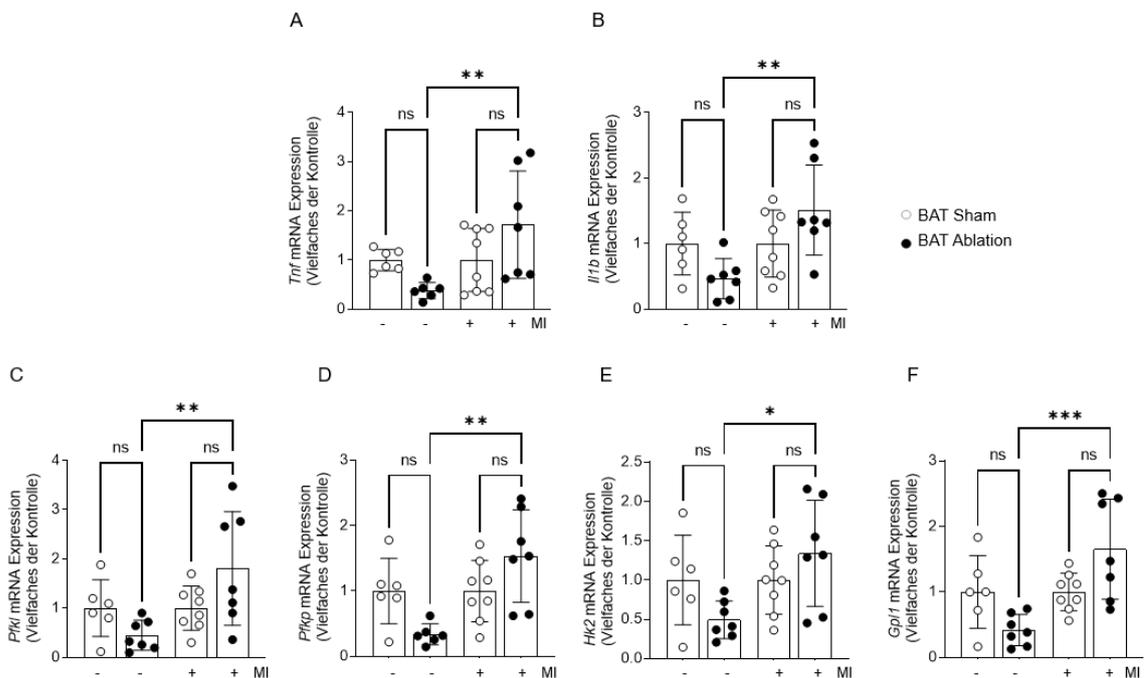


Abbildung 36: Einfluss einer BAT-Ablation mit und ohne folgenden Myokardinfarkt auf die Expression proinflammatorischer sowie metabolischer Genen in Neutrophilen. Die Neutrophilen wurden 3 Tage nach der BAT (braunes Fettgewebe) -Operation (-) oder einen Tag nach Myokardinfarkt (MI) (+) isoliert. Verglichen wurde hierbei der Einfluss der BAT-Ablation auf mRNA-Ebene. **A**, *Tnf* (n=6,6;6,5) **B**, *Il1b* (n=6,6;6,4) **C**, *Pfk1* (n=7,6;6,6) **D**, *Pfkp* (n=7,6;6,6) **E**, *Hk2* (n=7,6;6,6) und **F**, *Gpl1* (n=7,6;6,6) jeweils mit und ohne MI in Abhängigkeit von der BAT-Ablation bzw. BAT-*Sham* Operation. Dargestellt sind Mittelwerte von mRNA-Werten als Vielfaches der Kontrolle \pm SD. Signifikanz wurden durch eine *oneway*-ANOVA bestimmt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.6.2 Monozyten

Analog zu den Neutrophilen zeigten alle vermessenen Gene der isolierten Monozyten eine tendenzielle Herunterregulation durch die isolierte BAT-Ablation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 37). Die galt sowohl für *Il1b* und bedingt für *Tnf* (Abb. 37A, B) als auch für *Pfkl*, *Pfkp*, *Hk2* und *Gpl1* (Abb. 37C-F). Dieser Effekt kehrte sich jedoch durch die Kombination mit einem nachfolgenden MI um. Hier verhielt es sich derart, dass nun alle analysierten Gene in der BAT-Ablationsgruppe tendenziell hochreguliert waren.

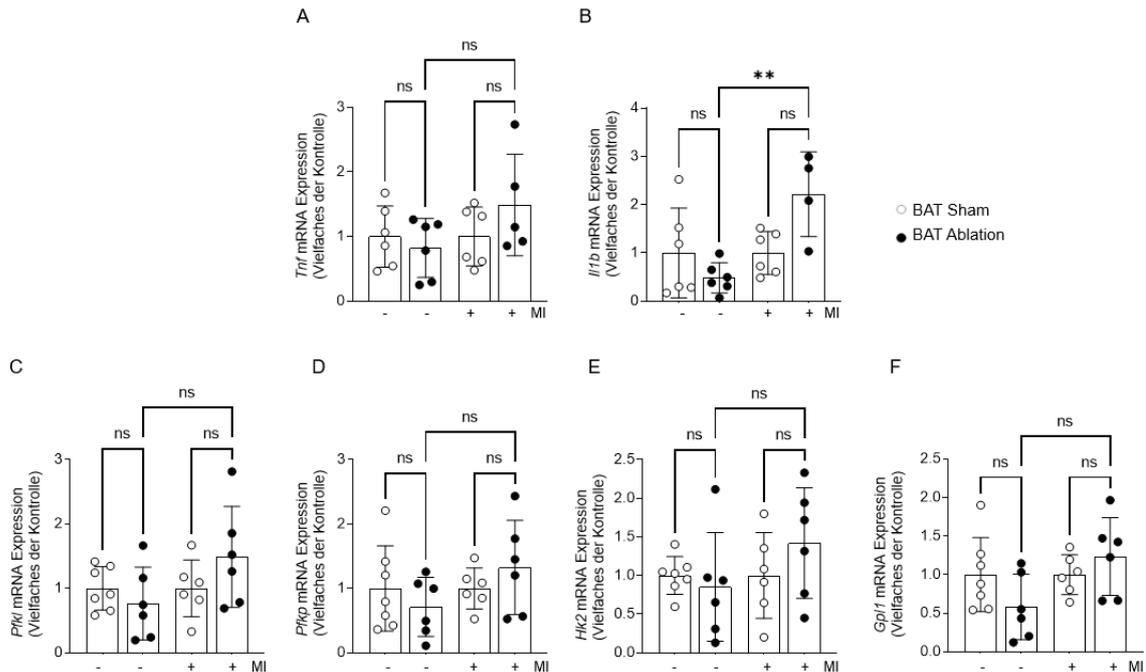


Abbildung 37: Einfluss einer BAT-Ablation mit und ohne folgenden Myokardinfarkt auf die Expression proinflammatorischer sowie metabolischer Genen in Monozyten. Die Monozyten wurden 3 Tage nach der BAT (braunes Fettgewebe) -Operation (-) oder einen Tag nach Myokardinfarkt (MI) (+) isoliert. Verglichen wurde hierbei der Einfluss der BAT-Ablation auf mRNA-Ebene. **A**, *Tnf* (n=6,6;6,5) **B**, *Il1b* (n=6,6;6,4) **C**, *Pfkl* (n=7,6;6,6) **D**, *Pfkp* (n=7,6;6,6) **E**, *Hk2* (n=7,6;6,6) und **F**, *Gpl1* (n=7,6;6,6) jeweils mit und ohne MI in Abhängigkeit von der BAT-Ablation bzw. BAT-Sham Operation. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanz wurde durch eine *oneway*-ANOVA bestimmt: **, $p < 0,01$

3.7 Einfluss des BAT auf metabolische Veränderungen

Die in der Einführung angebrachte Einflussnahme des BAT auf den generellen Metabolismus sollte auch im Rahmen des MIs eruiert werden, um auch hier mögliche Veränderungen feststellen zu können.

3.7.1 Veränderungen im Lipidstoffwechsel

Auf Grund der Tatsache, dass BAT neben Glukose auch Fettsäuren aufnehmen und verstoffwechseln kann wurden zusätzlich *non-esterified fatty acids* (NEFA) 24 Stunden nach MI im Plasma vermessen (Abb. 39). Die BAT-Ablation führte zu einem signifikanten Anstieg der NEFA-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

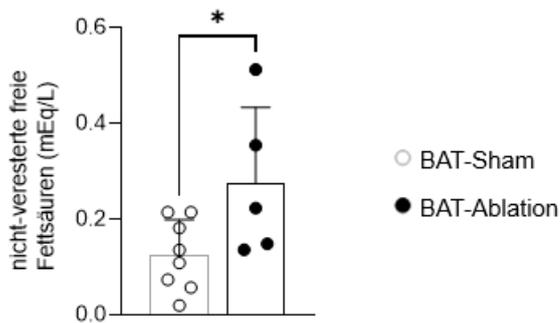


Abbildung 389: Einfluss einer BAT-Ablation auf Plasmaspiegel nicht veresteterter, freier Fettsäuren nach Myokardinfarkt. Nicht-veresterte freie Fettsäuren (NEFA) wurden im Plasma 24 Stunden nach Myokardinfarkt analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte + SD in mEq/L in Abhängigkeit von der BAT (braunes Fettgewebe) -Ablation bzw. BAT-Sham Operation. n=8,5. Signifikanz wurde durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, $p < 0,05$.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass der Hauptanteil metabolischer Messungen im Kontext von BAT und MI von Prof. Ulrich Flögel und Frau Anne Vera Flocke vorgenommen wurde (Daten nicht gezeigt). Durch eine ^2H -NMR-Messung des braunen Fettgewebes 24 Stunden nach der I/R-Operation konnte eine drastisch erhöhte Glykolyse anhand steigender Laktatwerte beobachtet werden. Bei Betrachtung des Herzens zum selben Zeitpunkt ergab sich ein ähnliches Resultat, da auch hier signifikant mehr Glukose in Laktat umgesetzt wurde. Durch die Kombination der BAT-Ablation zusammen mit einem nachfolgenden MI ergab sich ein gegenteiliger Effekt. Vierundzwanzig Stunden nach der I/R-Operation befanden sich die Laktatwerte im Herzen in der BAT-Ablationsgruppe annähernd auf Basalniveau.

Darüber hinaus ist die dezidierte Charakterisierung der Glukosespiegel zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der BAT-Ablation, während der kardialen Ischämie sowie in der Reperusionszeit Gegenstand laufender Untersuchungen.

3.8 Einfluss einer BAT-Aktivierung auf den Myokardinfarkt

Im Folgendem sollte untersucht werden, ob sich der im Vorfeld beobachtete, vermeintlich protektive Einfluss des braunen Fettgewebes therapeutisch nutzen ließ. Hierfür wurde das BAT vor dem MI mit Hilfe des Beta-3-Rezeptor-Agonisten Mirabegron aktiviert und der resultierende Effekt fortlaufend erfasst.

3.8.1 Aktivierung des BAT durch Mirabegron ohne anschließenden Myokardinfarkt

Zunächst wurde geprüft, ob das BAT generell durch das aus s.c. implantierten osmotischen Minipumpen freigegebene Mirabegron aktiviert wurde. Die Basal-Messung vor der Pumpen-Implantation (Abb. 40B) wies vergleichbare T2-Werte in beiden Behandlungsgruppen auf. An Messtag 4 und 14 (Abb. 40C, D) zeigte sich eine signifikante Reduktion der T2-Relaxationszeit in der mit Mirabegron behandelten Gruppe. Ein individueller Vergleich an Tag 7 konnte auf Grund fehlender Messungen der Kontrolle nicht durchgeführt werden. Anzumerken ist jedoch, dass die T2-Relaxationszeit des nicht stimulierten BAT an Tag 14 über das Basal-Niveau hinausging.

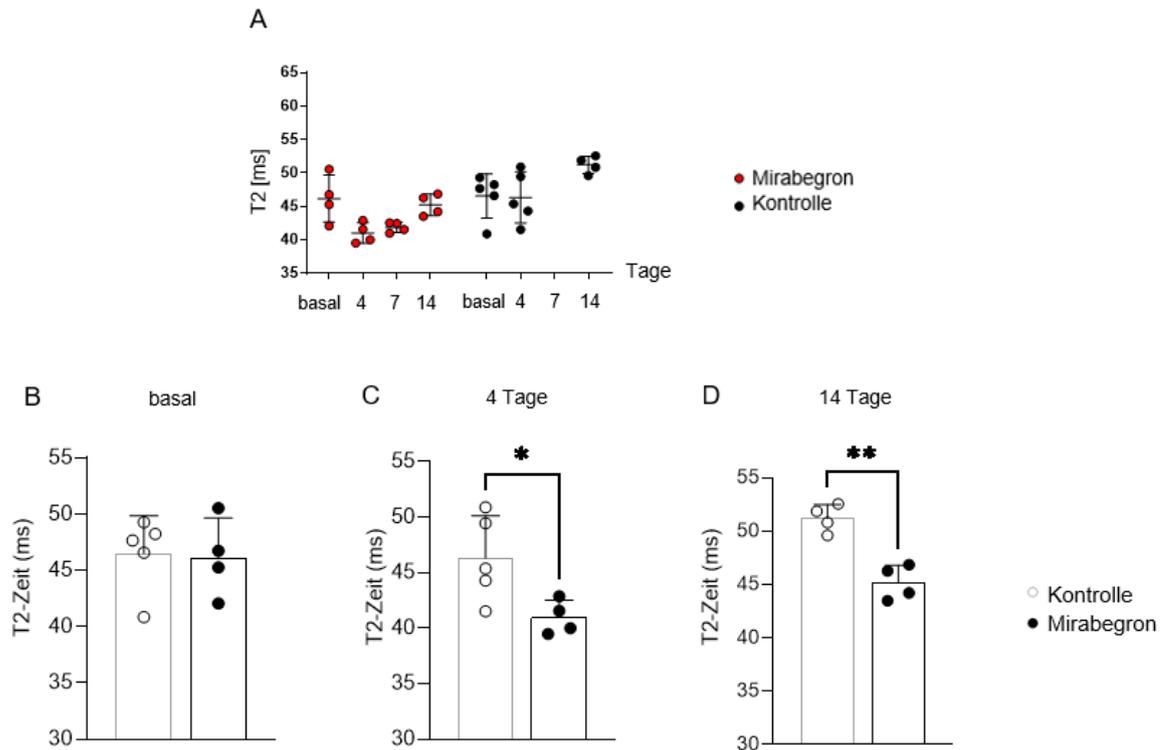
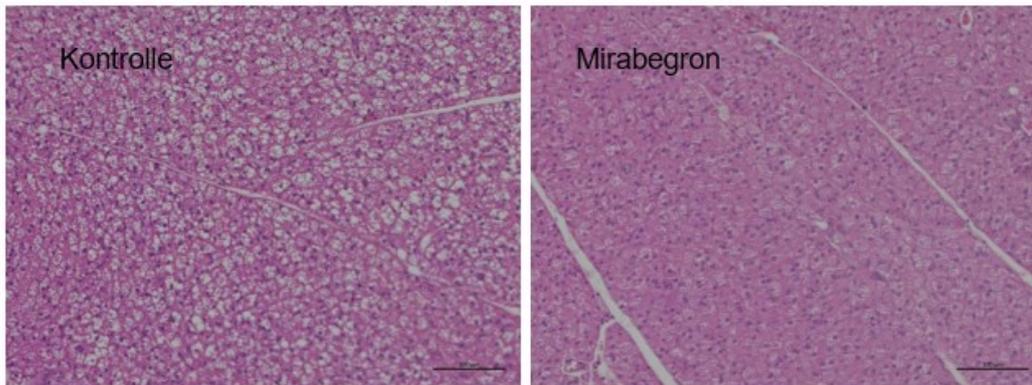


Abbildung 39: T2-Relaxationszeit-Messung im BAT ohne und nach Stimulation mit Mirabegron. Hier dargestellt ist sowohl **A**, der Verlauf der T2-Relaxationszeit von basal bis 14 Tage nach Pumpen-Implantation als auch die einzelnen Messzeitpunkte **B**, vor der Implantation (basal, n=5,4) **C**, 4 Tage (n=5,4) und **D**, 14 Tage (n=4,4) nach der Implantation. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. Signifikanzen wurden durch den *unpaired t-test* ermittelt: *, $p < 0,05$. **, $p < 0,01$.

Als weitere Charakterisierungsmaßnahme der BAT-Aktivierung durch Mirabegron wurde eine histologische Färbung des interskapulären, braunen Fettgewebsdepots 7 und 14 Tage nach Implantation der osmotischen Minipumpen durchgeführt (Abb. 41). Die Behandlung mit Mirabegron führte nach 7 Tagen (Abb. 40A) zu einer deutlichen morphologischen Veränderung des BAT, wobei der Effekt bis Tag 14 (Abb. 40B) persistierte. Die Kontrolltiere wiesen im Vergleich optisch mehr Lipidtröpfchen im betrachteten Gewebe auf.

A



B

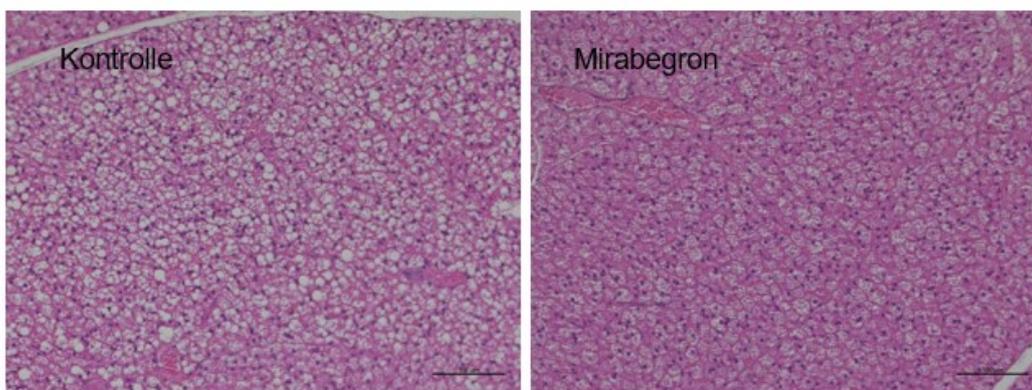


Abbildung 40: morphologische Unterschiede im BAT nach Mirabegron-Stimulation.

Darstellung repräsentativer Bilder des **A**, braunen Fettgewebes (BAT) in einer H&E-Färbung im Vergleich zwischen unbehandelten und mit Mirabegron-behandelten Versuchstieren 7 Tage und **B**, 14 Tagen nach Implantation der osmotischen Minipumpen.

3.8.2 Einfluss von Mirabegron auf die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt

Nach Darstellung der BAT-Aktivierung mittels Mirabegron wurde der Agonist nun im Vorfeld des MIs angewendet, um die Auswirkung einer BAT-Stimulation im gegebenen Kontext zu eruieren. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls Mirabegron oder Vehikel-beladene, osmotische Minipumpen 7 Tage vor der I/R-Operation s.c. implantiert. In den abgebildeten kardialen Parameter der EF (Abb. 42A), des ESV (Abb. 42B) und des EDV (Abb. 42C) stellte sich über die Beobachtungszeit eine signifikante Verbesserung ein, sofern die Tiere mit Mirabegron behandelt wurden.

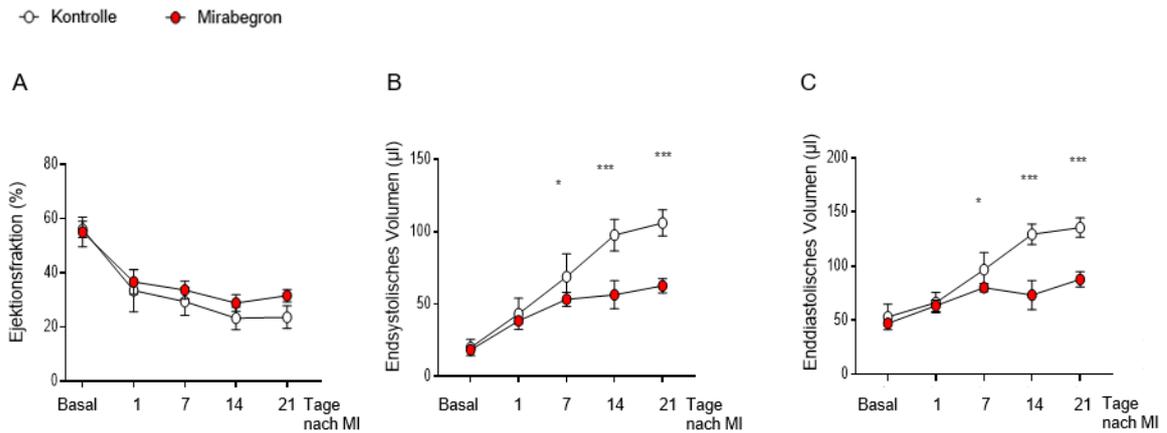


Abbildung 41: $^1\text{H-NMR}$ Daten der kardialen Funktion nach Mirabegron-Applikation.

Hier dargestellt sind die kardialen Funktionsparameter **A**, Ejektionsfraktion (%) **B**, endsystolisches- bzw. **C**, enddiastolisches Volumen (%) vor der Implantation (Basal) sowie über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Myokardinfarkt (MI). Die Daten wurden zusammen mit Frau Anne Vera Flocke generiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. $n=7,7$ bzw. $4,4$ bei der Basalmessung. Signifikanzen wurden mittels *twoway*-ANOVA errechnet: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

Da sich die Mirabegron-Behandlung auch auf die Infarktgröße auswirken konnte, wurde eine LGE-Messung durchgeführt, um auch diesen kardialen Parameter zu erfassen (Abb. 43). Einen Tag nach MI konnte diesbezüglich kein Unterschied durch die vorherige BAT-Stimulation festgestellt werden.

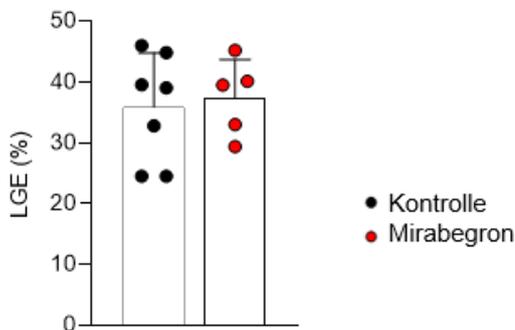


Abbildung 423: $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Infarktgröße nach Myokardinfarkt.

Einen Tag nach Myokardinfarkt wurde mittels *late gadolinium enhancement* (LGE) das ischämische Areal (%) mittels $^1\text{H-NMR}$ bestimmt ($n=7,5$). Verglichen wurde hierbei die Mirabegron-Behandlung mit der Kontrollgruppe. Die Daten wurden zusammen mit Frau Anne Vera Flocke generiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

4 Diskussion

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.1) bereits erwähnt wurde, stellt der MI trotz verbesserter Reperfusionstherapie oder antithrombotischen Pharmakotherapie eine der führenden Todesursachen der Gegenwart dar, weshalb innovative Therapieoptionen weiterhin dringend notwendig sind, um die Mortalität zu senken und die Prognose der Patienten zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Rolle des BAT im Zusammenhang mit der kardialen Ischämie und Reperfusion untersucht werden, um mögliche neue therapeutische Ansätze im Themenfeld des Myokardinfarkts aufdecken zu können.

Im Rahmen des AMI ereignet sich eine starke Immunzellinfiltration mit vorgeschalteter und synchroner Freisetzung diverser Entzündungsmediatoren. Durch die verschiedenen Zeitabschnitte in dem entweder Neutrophile Granulozyten prädominant vorliegen oder im späteren Verlauf notwendige, reparative Ly6C^{low} -Monozyten, offenbart sich eine allgemeine, unspezifische Immunsuppression als problematisch. Zielt man jedoch auf einzelne Hauptmediatoren im inflammatorischen Geschehen ab ergibt sich ein vermeintlich protektiver Effekt. Die Inhibition von IL-6 mit dem Antagonisten Anakinra führte in einer Humanstudie zu einer Reduktion von CRP (*C-reactive protein*) und hochsensitivem Troponin T (hsTNT)¹³⁴. Analog konnte im Mausmodell mit einem IL-6 Inhibitor eine Reduktion kardialer Entzündung erreicht werden, was mit einer Verbesserung des linksventrikulären *Remodelling* und der kardialen Funktion einherging¹³⁵. Ein ähnliches Resultat wurde durch die Anwendung eines TNF α -Inhibitors erzielt¹³⁶.

Darüber hinaus kann wie bereits in der Einleitung beschrieben durch die Einflussnahme auf den systemischen Metabolismus eine Verbesserung im Kontext des MIs erreicht werden. Durch die Hemmung der peripheren Lipolyse konnte eine Verbesserung kardialer Parameter nach der Ischämie erzielt werden¹³⁷. Da braunes Fettgewebe sowohl im immunologischen als auch im metabolischen Zusammenhang detailliert beschrieben und bereits eine Korrelation zu kardiovaskulären Erkrankungen hergestellt wurde⁹⁵, ergab sich die Hypothese, dass auch im murinen Modell der kardialen I/R-Verletzung eine Beteiligung des BAT vorliegt.

4.1 Die Effekte der BAT-Aktivierung nach Myokardinfarkt

Zunächst wurde geprüft, ob durch den MI eine BAT-Aktivierung stattgefunden hat. Tatsächlich zeigte sich 3 Stunden nach MI eine signifikante Erhöhung der *Ucp1*-mRNA im Vergleich zu Kontrolltieren. Auf Grund der Tatsache, dass ein MI in einer drastisch erhöhten Freisetzung von Katecholaminen resultiert²⁶ und diese an Beta-3-Rezeptoren im BAT binden^{93,138}, ließ sich dieses Ereignis mit einer BAT-Aktivierung korrelieren. Das mRNA-Niveau von *Ucp1* fiel im Verlauf ab, was durch die geringe Halbwertszeit von ca. 3 Stunden erklärt werden kann¹³⁸. Darüber hinaus konnte 72 Stunden nach MI in Zusammenarbeit mit Prof. Ulrich Flögel eine Reduktion der T2-Relaxationszeit im BAT detektiert werden (Daten nicht dargestellt), was zeigt, dass der MI einen längerfristigen Einfluss auf das BAT genommen hat. Anzumerken ist, dass keine Proteindetektion von UCP1 vorgenommen wurde, wobei die Betrachtung der ¹H-NMR Daten eine entsprechende Translation von *Ucp1* suggerierte. Als weiteren Parameter der BAT-Aktivierung kann das Gewicht desselbigen herangezogen werden. Vierundzwanzig Stunden nach dem Ereignis zeigte sich in der MI-Gruppe eine Verringerung des BAT-Gewichts und in dem körperrgewichtsadaptierten Verhältnis. Zu diesen Ergebnisse kann die Arbeit von Grandoch *et al*¹²³ unterstützend hinzugezogen werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine Gewichtsreduktion auf Grund der Abnahme des Lipidgehalts nach Stimulation des BAT durch die Applikation von 4-Methylumbelliferon.

Basierend auf der Annahme, dass es zu einer BAT-Aktivierung nach MI kommt, wurden weitere Analysen durchgeführt, um eine entsprechende Auswirkung auf das BAT-Transkriptom-Profil und den sekretorischen Charakter aufzuklären. Mit Hilfe der BAT-*Bulk* Sequenzierungsmethode konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des BAT mit einer Reduktion proinflammatorischer Gene einhergeht. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der Expression von *Ccl4*, *Ccl5*, *Tnf* oder *Ccr5* in der MI-Gruppe im Vergleich zu nicht aktiviertem BAT (Daten nicht abgebildet). Die angeführten Mediatoren sind bekanntermaßen im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen beschrieben und eine entsprechende Verminderung mit günstigen Konsequenzen assoziiert¹³⁹⁻¹⁴². Mit Hilfe der *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) konnte ein Netzwerk diverser Faktoren prädiziert werden. Hier ergab sich unter anderem eine verminderte Expression von *Irf3*, *Tnf*, *Csf1/2* und *Il1b* im braunen Fettgewebe. Dieser Umstand ist ebenfalls als positiv zu bewerten, da eine im Jahr 2017 publizierte Arbeit den protektiven Effekt einer IRF3-Depletion im Mausmodell hinsichtlich eines verbesserten *Outcomes* nach MI zeigte⁶¹. Die auf Transkriptom-Niveau erhobenen Daten konnten auch im Zuge eines Sekretom-Versuchs bestätigt werden. Wie bereits im Abschnitt 1.2.2 beschrieben, gibt es bereits zahlreiche

Studien, die den sekretorischen Charakter des BAT genauer analysierten und entsprechend darstellten¹⁰³. Die günstige Einflussnahme des BAT auf das kardiovaskuläre System durch die zitterfreie Thermogenese wird so um die endokrine Funktion, die Freisetzung von Batokinen, ergänzt und erweitert. Dementsprechend wurde in Analogie zu der *Bulk*-Analyse das BAT aus Mäusen gewonnen, die 6 Stunden zuvor einen MI oder eine *Sham*-Operation erhielten. Das entnommene Fettgewebe wurde daraufhin für weitere 6 Stunden inkubiert und der Überstand für die nachfolgende Analyse genutzt. Aktiviertes BAT zeigte eine signifikant reduzierte Sekretion zahlreicher proinflammatorischer Faktoren wie IL-6 und Eotaxin, welche in Analogie zu den oben aufgeführten Faktoren ebenfalls eine nachweislich negative Korrelation hinsichtlich pathologischer Auswirkungen im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen aufweisen^{135,143}. Das einzige signifikant hochregulierte Protein durch den MI war BDNF. Die Expression des Wachstumsfaktors wurde bereits für BAT beschrieben¹⁴⁴ und auch im Kontext des MIs liegen experimentelle Ergebnisse vor, welche unsere Daten bestätigen: Durch eine entsprechende systemische Deletion ergab sich eine Verschlechterung der kardialen Dysfunktion nach einem MI, wobei die Verabreichung von BDNF wiederum einen günstigen Effekt auf Parameter wie der linksventrikulären EF oder dem fibrotischen Areal besaß¹⁴⁵. Auf Grund der hier angeführten Analysen des BAT hinsichtlich seines veränderten Transkriptoms einhergehend mit einer günstigen Modulierung des korrespondierenden sekretorischen Profils, wurde die protektive Bedeutung des Fettdepots deutlich. Die Frage, ob durch BAT sezernierte Faktoren quantitativ ausreichend für eine Einflussnahme auf das kardiovaskuläre System sind, kann durch die Studie von Pinckard und Kollegen¹⁴⁶ beantwortet werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine BAT-Transplantation in Empfängerermäuse mit einer verbesserten kardialen Funktion assoziiert war. Als Mechanismus wurde die vermehrte, BAT-bedingte Freisetzung von *12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic-acid*, ein Derivat der Linolsäure, postuliert. Interessanterweise war die Konzentration dieser Substanz in Patienten mit einer Herzkrankheit reduziert, was wiederum mit kardialen Funktionsparametern korrelierte.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass in Folge der chirurgischen BAT-Ablation diese vorteilhaften Eigenschaften entfallen, so dass auf diese Weise zumindest partial die oben beschriebenen Folgen einer Entfernung bzw. Aktivierung des BAT erklärt werden können.

4.2 BAT und die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt

Wie in der Einleitung (1.4) dargelegt führte die chirurgische Entfernung des interskapulären BAT-Depots in C57BL/6J Mäusen im Vorfeld des MIs zu verschlechterten kardialen Parameter, was mittels Echokardiographie eruiert wurde. Die kardiale Dysfunktion, die im Vergleich zu Kontrolltieren ab Tag 7 nach der I/R-Operation verschlimmert vorlag, persistierte über die Beobachtungsdauer von 21 Tagen. Die Effekte der BAT-Ablation im Rahmen der I/R-Operation werden durch Literatur aus dem murinen Modell der Isoproterenol-induzierten Kardiomyopathie unterstützt. Die BAT-Dysfunktionalität, die durch einen *Ucp1-Knockout* erreicht wurde, führte nach Induktion der Kardiomyopathie ebenfalls zu einer Verschlechterung der Herzfunktion, was 14 Tage nach Isoproterenol-Infusion mittels EKG vermessen wurde¹²⁹. Zudem zeigt die diesbezüglich jüngste Publikation¹⁴⁷, dass zu dem 24 Stunden Zeitpunkt nach MI noch kein signifikanter Unterschied in den Behandlungsgruppen der BAT-Ablation und der BAT-*Sham* Operation im EKG vorlag. Mit Hilfe von Prof. Ulrich Flögel konnten die EKG-Daten um eine ¹H-NMR Methode, der LGE-Messung, ergänzt werden, um einen früheren Zeitpunkt nach dem Eingriff zu untersuchen. Im MRT zeigte sich bereits einen Tag nach MI ein erhöhtes ischämisches Areal, was mit einer signifikanten Reduktion der EF einherging. Eine mögliche Erklärung des differierenden Zeitpunkts bezüglich der Einstellung des signifikant verschlechterten Parameters der EF könnte in der Messmethode selbst begründet sein. Die ¹H-NMR erlaubt mit der Verwendung eines Kontrastmittels eine wesentlich genauere Auflösung des gewünschten Areals als die Echokardiographie. Interessanterweise konnte in Patienten gezeigt werden, dass selbst ohne vorausgehenden MI ein im MRT positives LGE-Signal ein starker, negativer Prädiktor für schwerwiegende, unerwünschte kardiale Ereignisse und kardiale Mortalität darstellt¹⁴⁸. Das initial vermessene größere ischämische Areal in der BAT-Ablationsgruppe resultierte in einer signifikant größeren Narbe im linken Ventrikel und offenbarte bei vergleichbaren Herzgewichten ein deutlich dilatiertes Erscheinungsbild im Vergleich zur Kontrolle. Es kann vermutet werden, dass eine initial erhöhte Kardiomyozyten-Schädigung vorlag, wodurch der Prozess der Narbenbildung verstärkt wurde. Auch in dem Modell der Isoproterenol-induzierten Kardiomyopathie zeigte sich sowohl eine erhöhte Kardiomyozyten-Schädigung in der *Ucp1-Knockout*-Gruppe als auch eine verstärkte Fibrose. Allerdings ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit keine Messungen bezüglich entsprechender Parameter hinsichtlich einer Kardiomyozyten-Schädigung durchgeführt wurden. Auf Grund der ¹H-NMR-Daten ergab sich demnach die Vermutung, dass sich der Effekt der BAT-Ablation bereits sehr früh

nach MI manifestierte und sich nicht erst über die Zeit einstellte. Dies lässt sich auch partiell aus den Daten der Arbeit von Zhao *et al* ableiten¹⁴⁷. Die Kombination aus sportlicher Aktivität und intramyokardialer Injektion von isolierten extrazellulären Vesikel (EV) aus dem braunen Fettgewebe im Vorfeld des MIs, resultierte in einer reduzierten Kardiomyozyten-Schädigung durch eine positive Einflussnahme auf Komponenten des MAPK-Signalwegs.

Während die BAT-Ablation im Vorfeld des MIs die kardiale Funktion verschlechterte, führte die Aktivierung desselbigen zu einer verbesserten Herzfunktion. Zunächst wurde die Wirkung des Beta-3-Rezeptoragonisten Mirabegron auf das BAT evaluiert, um zu prüfen, ob im Gewebe eine Aktivierung stattgefunden hat. Hierzu wurde die als Surrogatparameter fungierende T2-Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxationszeit) herangezogen¹²³. Das BAT ist wie in der Einführung erklärt durch eine distinkte molekulare und zelluläre Zusammensetzung charakterisiert. Es ist reich an Eisen und an Gefäßen, weshalb es sich in der T2-Relaxationszeit von anderen Geweben unterscheidet. Erfolgt nun eine Aktivierung verändert sich die entsprechende Komposition durch eine erhöhte Perfusion, die initiierte Lipolyse und des geringeren Wasseranteils mit nachfolgender Reduktion der T2-Relaxationszeit. Die Implantation, der mit Mirabegron beladenen Minipumpen, reduzierte 4 Tage nach dem Eingriff im Vergleich zur Kontrolle die T2-Relaxationszeit im BAT signifikant, weshalb hier von einer Aktivierung desselbigen ausgegangen werden konnte. Allerdings war der Vergleich zur Kontrolle an Tag 14 nur bedingt möglich, da in der Kontrollgruppe die T2-Relaxationszeit größer war als vor dem Eingriff. Eventuell kann dieser Umstand dem generellen Prozess des sogenannten *whitening* zugeordnet werden, welcher unter anderem im Kontext einer hochkalorischen Diät, körperlichen Inaktivität oder erhöhten Außentemperaturen beschrieben wurde. Hierbei kommt es zu einer Abnahme brauner Adipozyten und deren spezifischen Funktion zu mehr weißen, unilokulären Fettzellen^{149,150}. Diese Hypothese wurde durch histologische H&E-Färbungen bestätigt, da sich sowohl 7 als auch 14 Tage nach der Implantation der mit Mirabegron beladenen Minipumpen eine augenscheinliche Verminderung von Lipidtröpfchen bzw. -größe ergab. Bei Betrachtung der Kontrollen an Tag 7 und 14 konnte eine Tendenz hinsichtlich einer erhöhten Anzahl an gefüllten Fettzellen als zu dem früheren Zeitpunkt ausgemacht werden. Ein Umstand, der durch den Prozess des *whitening* entstanden sein könnte. Durch die Reduktion der T2-Relaxationszeit im MRT und die Reduktion von Lipidtröpfchen in der H&E-Färbung konnte geschlussfolgert werden, dass das BAT durch Mirabegron aktiviert wurde. Die Ergebnisse unterstützend kann eine Studie aus dem Jahr 2020 herangezogen werden.

Hier zeigte sich mittels ^{18}F -FDG-PET-CT eine erhöhte, metabolische BAT-Aktivität durch die chronische Behandlung mit Mirabegron in Frauen¹⁵¹.

Für die Erfassung der Auswirkung des Mirabegrone auf die Herzfunktion, wurden die beladenen Pumpen 7 Tage vor dem MI implantiert. Die Tiere, die den Beta-3-Rezeptoragonisten erhielten, zeigten eine signifikante Verbesserung kardialer Funktionsparameter, die sich nach 7 Tagen (ESV und EDV) manifestierte. Dadurch, dass die EF rechnerisch aus den Werten der ESV und EDV resultiert, wurde die Signifikanz nivelliert. Allerdings erkennt man bei genauer Betrachtung der Mittelwerte auch einen positiven Einfluss auf die EF: In der Mirabegron-Gruppe lag die EF an Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe (29,3 %) bei 33,62 %, an Tag 14 bei 28,82 % (vs. Kontrolle 23,2 %) und an Tag 21 bei 31,54 % (vs. Kontrolle 23,5 %). Analog dazu präsentierten auch Zhao *et al*¹⁴⁷ eine entsprechende Verbesserung, sofern das BAT durch vorangegangene körperliche Aktivität stimuliert wurde und die Versuchstiere eine Injektion mit isolierten EV erhielten. Allerdings konnte anders als in der Arbeit von Zhao *et al* in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied im ischämischen Areal einen Tag nach MI durch die Behandlung beobachtet werden. Ein möglicher Erklärungsansatz kann erneut in der Messmethode gefunden werden. Die hier verwendete LGE-Messung erlaubt im Gegensatz zur Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (Zhao *et al*) eine wesentlich genauere Vermessung, da sie gegenüber korrekten Stoffkonzentrationen, der exakten Dicke der händisch geschnittenen Herzschnitte oder der präzisen Perfusion der Koronararterien unabhängig ist. Darüber hinaus kann durch die Kombination der *per se* kardioprotektiven körperlichen Aktivität mit den begünstigenden BAT-EV ein vermeintlich größerer Schutz des Herzens gegenüber dem MI geschaffen worden sein. Die mit Sport verbundene Sympathikusaktivierung besitzt neben einer BAT-Aktivierung mannigfaltige Effekte auf den gesamten Organismus, weshalb die Vergleichbarkeit hinsichtlich des ischämischen Areals nur eingeschränkt möglich ist.

Die potenziell verantwortlichen Ursachen für die hier dargestellten Beobachtungen sollen in den nächsten Abschnitten erörtert und diskutiert werden.

4.3 BAT im inflammatorischen Kontext nach Myokardinfarkt

Im Folgenden wurde der Einfluss des braunen Fettgewebes hinsichtlich möglicher immunmodulatorischer Effekte vor und nach MI untersucht. Um auszuschließen, dass der chirurgische Eingriff im Sinne der BAT-Ablation *per se* Auswirkungen auf

zirkulierende und kardiale Immunzellen haben könnte, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung vorgenommen, um diesen Effekt genauer zu analysieren. Zweiundsiebzig Stunden nach Anbringung der Ligaturanlage und der BAT-Entfernung bzw. der korrespondierenden BAT-*Sham* Operation konnten keine Unterschiede in den vermessenen Immunzellpopulationen, sowohl in der Zirkulation als auch im Herzen selbst, detektiert werden. Infolgedessen konnte davon ausgegangen werden, dass zu dem Zeitpunkt des MIs, welcher ebenfalls 3 Tage nach der Anbringung der Ligaturanlage stattfand, keine behandlungsbedingte Differenz hinsichtlich der Anzahl der verschiedenen Immunzellen vorlag.

Die BAT-Ablation führte jedoch 72 Stunden nach dem MI zu einer signifikanten Erhöhung von zirkulierenden Monozyten im Allgemeinen, aber auch der Ly6C^{hi} bzw. Ly6C^{int} - Subgruppen. Diese Daten sind konsistent mit Literaturangaben, da Monozyten das Knochenmark und konsekutiv die Milz 24 Stunden nach einem MI verlassen und über einen Zeitraum von mehreren Tagen im Blut detektierbar sind^{59,76}. Erst in einer späteren Phase entwickeln sich dann aus den Ly6C^{hi} reparative Ly6^{lo} -Monozyten⁷³, weshalb hier vermutet werden kann, dass zu dem untersuchten Zeitpunkt diese Konversion noch nicht stattgefunden hat. Ferner zeigten bereits zahlreiche Publikationen eine positive Korrelation der Leukozyten-Anzahl im Allgemeinen aber auch der Ly6C^{hi} -Monozyten mit der Progression bzw. der Schwere kardiovaskulärer Erkrankungen^{152,153}. Auch die Analyse der kardialen Immunzellen zu gegebenem Zeitpunkt offenbarte eine erhöhte Anzahl proinflammatorischer Immunzellsubtypen in der BAT-Ablationsgruppe. Hier ergab sich eine signifikante Erhöhung der Leukozyten im Allgemeinen, die in Analogie zu den aufgeführten Literaturverweisen ebenfalls einen unabhängigen, ungünstigen Prädiktor hinsichtlich der MI-bedingten Mortalität verkörpert¹⁵⁴. Allerdings sind die Daten bezüglich der hier gezeigten Monozyten nicht kongruent mit Literaturangaben. Nahrendorf und Kollegen postulierten eine über ca. 4 Tage nach MI persistierend hohe Monozyten-Anzahl im Herzen¹⁵⁵. In Kontrast hierzu waren aus Monozyten differenzierte Makrophagen der BAT-Ablationsgruppe in der vorliegenden Arbeit ca. dreifach erhöht. Als Erklärung können Infarkt-Modell spezifische Unterschiede in der jeweiligen Immunzellkinetik angeführt werden. Während Monozyten länger im Herzen nach permanenter Ligatur vorlagen¹⁵⁵, wies die I/R-Operation im Verhältnis mehr Makrophagen auf¹⁵⁶. Aus Monozyten differenzierte Makrophagen, die sich durch eine Expression von CCR2 und MHCII charakterisieren, sind maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt. Bajpai *et al* konnten zeigen, dass die Depletion von CCR2⁺ -Makrophagen unter anderem in einer verbesserten linksventrikulären EF und einer reduzierten Infarktgröße resultierte⁴⁹. Die Entfernung von residenten CCR2⁻ -

Makrophagen zeigte hingegen einen gegenteiligen Effekt, ein Ergebnis, welches auch in einer 2019 publizierten Studie verifiziert werden konnte⁷⁹. Obwohl residente kardiale Makrophagen (CCR2⁺MHC-II^{lo}TIMD4⁺LYVE1⁺) nur 2-5 % nach MI ausmachen, führte ihre Depletion zu einer Beeinträchtigung der Herzfunktion sowie einer verschlechterten Infarkttheilung⁷⁹. Anhand der vorliegenden Daten kann vermutet werden, dass die erhöhte Anzahl zirkulierender Ly6C^{hi}-Monozyten und kardialer aus Monozyten differenzierten Makrophagen, bedingt durch die BAT-Ablation, zumindest partial das verschlechterte *Outcome* nach MI erklären.

Die Daten bezüglich der residenten Makrophagen wirken jedoch widersprüchlich. Es kann lediglich vermutet werden, dass der initial größere Schaden, der mittels LGE-Messung wie oben beschrieben detektiert wurde, einen höheren Bedarf an reparativen Maßnahmen erfordert hat. Die These unterstützend beschreiben die Autoren um Dick *et al* CCR2⁺MHC-II^{lo}TIMD4⁺LYVE1⁺-Makrophagen als selbsterneuernd ohne nennenswerten Beitrag von immigrierenden Monozyten, sodass sich dieser Immunzellsubtyp eventuell rasch und unabhängig von den zirkulierenden Monozyten nach MI vermehrt hat⁷⁹.

Auch die Anzahl neutrophiler Granulozyten war 72 Stunden nach MI in der BAT-Ablationsgruppe signifikant erhöht. Diesen Befund unterstützend wurde eine Plasma-Analyse ebenfalls 72 Stunden nach MI durchgeführt. Hier konnte in der BAT-Ablationsgruppe eine signifikante Erhöhung des G-CSF detektiert werden, welcher als Zytokin die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinflusst. Diesbezüglich konnte eine 2013 publizierte Arbeit ebenfalls ein Maximum dieses Zelltyps 3 Tage nach dem Ereignis feststellen¹⁵⁶. Hinsichtlich der Einordnung dieses Effektes liegen widersprüchliche Angaben vor, da Neutrophile nachweislich an der Schädigung der Herzmuskelzellen nach MI beteiligt sind, wobei ihrer generellen Depletion wiederum negative Konsequenzen zugeschrieben werden. Horckmans *et al* zeigte, dass die Antikörper-induzierte Neutrophilen-Depletion mit einer Verschlechterung kardialer Funktionsparameter, verstärkter Fibrose und progressiver Entwicklung einer herzinsuffizienten Lage einherging⁷⁰. Begründet wurden die Beobachtungen mit dem Ausbleiben einer NGAL-abhängigen Makropagen-Polarisation hin zu einem reparativen Phänotypen. In Kontrast hierzu zeigte eine Subanalyse einer multizentrischen randomisierten, doppel-blinden, Placebo-kontrollierten Studie, dass nach einer primären perkutanen Koronarintervention nach STEMI erhöhte Neutrophilen-Werte signifikant mit der Infarktgröße und antiproportional mit der linksventrikulären EF korrelierten¹⁵⁷. Darüber hinaus prädizierte die erhöhte Leukozyten- und Neutrophilen-Anzahl unabhängig voneinander ungünstige kardiale Ereignisse¹⁵⁷. Interessanterweise konnten

Cohen und Kollegen bereits einen Bezug von BAT zu Leukozyten im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen feststellen⁹⁵. Patienten, die im PET-CT-Scan negativ für BAT waren, zeigten wie schon beschrieben eine höhere Prävalenz kardiometabolischer Krankheiten einhergehend mit einer erhöhten Leukozyten-Anzahl⁹⁵.

24 Stunden nach der I/R-Operation konnte in der BAT-Ablationsgruppe lediglich eine tendenzielle Erhöhung an zirkulierenden Ly6C^{hi} -Monozyten detektiert werden. Diese waren erwartungsgemäß in der Anzahl den Ly6C^{lo} -Monozyten überlegen und deuteten möglicherweise bereits auf das 72 Stunden-Resultat hin. Darüber hinaus zeigte sich ein Trend hin zu einer quantitativen Erhöhung von B-Zellen in der BAT-Ablationsgruppe. An dieser Stelle muss als Limitation die geringere Stichprobengröße angeführt werden und das Vermessen der Proben an verschiedenen Geräten (Abschnitt 2.2). Eventuell nivelliert sich der gezeigte Trend durch eine Erhöhung der Probenanzahl. Die quantitative Analyse von Lymphozyten zu den entsprechenden Versuchszeitpunkten offenbarte nämlich weder in der Zirkulation noch im Herzen selbst eine Erhöhung durch die BAT-Ablation nach MI. Als Erklärung kann hierfür die Publikation von Yan *et al* herangezogen werden, welche ein Maximum der B- und T-Zellen erst an Tag 7 nach MI feststellten¹⁵⁶. Darüber hinaus gibt es in dieser Arbeit keinen Anhaltspunkt für die Beteiligung der Lymphozyten im Kontext BAT und MI. Es wäre interessant zu untersuchen, ob zu einem späteren Zeitpunkt und mittels einer differenzierteren Analyse bspw. regulatorische T-Zellen (*Tregs*) detektierbar sind, da auch dieser Zelltyp Einfluss auf das inflammatorische Geschehen nach MI nimmt¹⁵⁸.

4.3.1 Der proinflammatorische Charakter der Immunzellen

Auf Grund der Resultate der quantitativen Analyse zirkulierender und kardialer Immunzellen wurde im Folgendem eine umfassende Charakterisierung vorgenommen, um mögliche phänotypische Veränderungen der entsprechenden Zellen nach BAT-Ablation und MI bestimmen zu können. Die Einzelzellsequenzierung der Neutrophilen 72 Stunden nach der I/R-Operation zeigte, dass durch die Entfernung des BAT im Vorfeld des MIs, eine deutliche Heraufregulation von *Fos*, *Il1b* oder auch *Junb* herbeigeführt wurde. *c-Fos* ist zusammen mit *Junb* Bestandteil des Transkriptionsfaktors *Activator Protein-1* (AP1) und weist im Tiermodell des MIs einen ungünstigen Effekt auf die Infarktgröße auf¹⁵⁹. Zhang *et al* konnten durch die Applikation eines monoklonalen Antikörpers, der sich gegen *c-Fos* richtet, die Infarktgröße in Ratten reduzieren¹⁵⁹. In Analogie zu den oben aufgeführten Effekten von IL-1b kommt hinzu, dass *Toll-like receptor 4* (TLR4) neutrophiler Granulozyten über S100a8/a9 nach MI aktiviert werden

und IL-1b freisetzen, welches wiederum im Knochenmark mit hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen in Interaktion tritt und so die Granulopoese weiter unterhält¹⁶⁰. Das Transkriptionsprofil von Makrophagen zeigte in der BAT-Ablationsgruppe ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von *S100a8/9* und *Fos*, wodurch naive Neutrophile durch den Einfluss von Makrophagen hinsichtlich proentzündlicher Eigenschaften modifiziert werden konnten. Der BAT-Ablationsbedingte proinflammatorische Charakter der analysierten Neutrophilen spiegelte sich auch in der *GO-Term* Signalweg Analyse wider. Wurde im Vorfeld des MIs das BAT entfernt führte dies zu einer Veränderung des Genexpressionsprofils, was in der Beteiligung an zur Abwehr nützlichen Signalwegen, wie „Antwort auf Moleküle bakteriellen Ursprungs“, „Antwort auf oxidativen Stress“, oder „myeloide Leukozyten Migration“ resultierte. Die gleiche bioinformatische Analyse wurde für die *Cluster* der Makrophagen durchgeführt und zeigte in Analogie zu den Neutrophilen ebenfalls eine große Mitwirkung im inflammatorischen Geschehen, was durch heraufregulierte Signalwege wie „Leukozyten Migration“, „Leukozyten Chemotaxis“ oder auch „Regulation der Entzündungsantwort“ im Allgemeinen deutlich wurde. Basierend auf einer 2018 publizierten Arbeit lassen sich diese Beobachtungen unterstützen¹⁶¹. Hier wurde gezeigt, dass CCR2⁺ -Makrophagen, die auch in der vorliegenden Arbeit in der durchflusszytometrischen Analyse vermehrt vorlagen, einen stark proinflammatorischen Charakter aufweisen¹⁶¹. Mit LPS-stimulierte Makrophagen demonstrierten hier eine erhöhte *Il1b*-Expression. Es lässt sich schlussfolgern, dass die analysierten Neutrophilen und Makrophagen auf Grund der chirurgischen BAT-Entfernung im Vorfeld des MIs verstärkte proentzündliche Eigenschaften aufwiesen.

4.3.2 Metabolische Veränderungen in den Immunzellen nach MI

Nach den beobachteten quantitativen und qualitativen Unterschieden der analysierten Immunzellen wurden die zugrundeliegenden Mechanismen versucht zu beantworten. Es ist bekannt, dass sich Neutrophile je nach Stimulus metabolisch adaptieren¹⁶². Im Zusammenhang mit der Phagozytoseaktivität wird präferenziell Glukose verwendet, um die dafür notwendige Energiebereitstellung zu sichern¹⁶². Auch für die Ausbildung und Freisetzung von sogenannten *neutrophil extracellular traps* (NETs), die für die Bekämpfung von Pathogenen dienen, ist Glukose essentiell¹⁶³. Abbildung 36 zeigt in diesem Zusammenhang die Expression einiger Glykolyse-Marker sowie *Tnf* und *Il1b* als proinflammatorische Zytokine. Interessanterweise ergab sich 3 Tage nach einer isolierten BAT-Ablation in Neutrophilen eine tendenzielle Reduktion aller angeführter

Analyten. Einen Tag nach MI konnte jedoch eine drastisch erhöhte Expression sowohl der Metabolismus- als auch der Entzündungsmarker beobachtet werden. Analog hierzu demonstrierten die Daten der Einzelzellsequenzierung 72 Stunden nach MI eine erhöhte Expression von Glykolyse-Markern in Immunzellen der BAT-Ablationsgruppe. Der Zusammenhang zwischen dem glykolytischen Stoffwechselweg und der Ausbildung eines proinflammatorischen Immunzellphänotyps ist für sämtliche Immunzellen bereits gut beschrieben¹⁶⁴. Als konkretes Beispiel kann eine Studie um Lauterbach *et al* angeführt werden¹⁶⁵. Hier konnte in *Bone Marrow Derived Monocytes* (BMDM) nach LPS-Stimulation eine verstärkte Glykolyse festgestellt werden, wodurch auf Grund der nun erhöhten Konzentration von Acetyl-CoA eine verstärkte Histon-Acetylierung resultierte, welche wiederum die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und IL-12(p40) förderte¹⁶⁵. Auch die hier dargestellten qPCR-Daten der Monozyten folgten tendenziell dieser Ratio: Die BAT-Ablation und der nachfolgende MI ergab in isolierten Monozyten aus dem Knochenmark einen veränderten glykolytischen Stoffwechsel, welcher in einer erhöhten Expression der angegebenen Zytokine resultierte. Ebenso lieferten die Daten der Einzelzellsequenzierung unterstützende Ergebnisse. Bei Betrachtung sämtlicher Makrophagen-*Cluster* ergab sich eine klare Präferenz des glykolytischen Stoffwechselweges durch die erhöhte Expression entsprechender Gene.

Es lässt sich demnach schlussfolgern, dass der durch die Einzelzellsequenzierung dargelegte metabolische *shift* hin zu einer glykolytischen Präferenz den gezeigten proinflammatorischen Phänotypen der Immunzellen erklärt.

4.4 Die Effekte von BAT auf den Metabolismus im Kontext des Myokardinfarkts

Als Surrogatparameter im metabolischen Kontext kann das Gewicht der Versuchstiere herangezogen werden. Hier ergab sich durch die BAT-Ablation ein erhöhtes Körpergewicht der Mäuse 21 Tage nach MI. Zurückzuführen ist dieser Umstand auf die Tatsache, dass den Mäusen ein Organ fehlt, welches Kalorien im Zuge der Thermogenese verbrennen kann. Diese Beobachtung ist kongruent mit der Literatur, da jegliche BAT-Aktivierung oder BAT-Transplantation mit einem erhöhten Energieumsatz und vermindertem Körpergewicht einherging^{104,107,118,120,123}. Die Mausdaten ergänzend, konnte die von Becher und Kollegen durchgeführte Humanstudie eine gegensätzliche Korrelation zwischen der BAT-Prävalenz und BMI aufzeigen⁹⁵.

Auch der Einfluss auf den Lipidstoffwechsel wurde untersucht. Vierundzwanzig Stunden nach MI konnte eine signifikante Erhöhung von NEFA-Werten in der BAT-Ablationsgruppe im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. Eine Publikation aus dem Jahr 2018 postulierte, dass für die thermogene Kapazität des BAT nicht nur die im BAT enthaltenen Lipide von Nöten sind, sondern auch solche durch die Nahrung zugeführte oder durch das weiße Fettgewebe freigesetzte Fette verwendet werden können¹⁶⁶. Nach beta-adrenerger Stimulation des weißen Fettgewebes wurde hier eine Erhöhung von freien Fettsäuren im Plasma erreicht¹⁶⁶. In der vorliegenden Arbeit konnte der MI in analoger Weise als Stimulus angenommen werden, da hiernach bekanntermaßen eine drastische Erhöhung der Katecholamin-Konzentrationen vorliegt²⁶. Es kann also vermutet werden, dass durch die Entfernung des BAT im Vorfeld des MIs die nun freigewordenen Fettsäuren nicht mehr internalisiert werden konnten, weshalb ihre Konzentration anstieg.

4.5 Limitation und Ausblick

Als Limitation der vorliegenden Arbeit kann die Methode der chirurgischen BAT-Ablation angesehen werden. Trotzdem die durchflusszytometrische Erhebung der Immunzellen keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen der BAT-Ablation und BAT-*Sham* zeigte, könnte der Operations-bedingte Stress *per se* Auswirkungen genommen haben. Ob die Entfernung des BAT im Vorfeld des MIs zu entsprechenden Veränderungen, bspw. im Lipid- oder Glukosemetabolismus geführt hat, ist ungewiss. Mögliche weitere Versuchsvorhaben könnten deshalb auf eine genetisch modifizierte Mauslinie zurückgreifen, wodurch ein chirurgischer Eingriff vermieden würde. Die Linie FVB/N-Tg(UcpDta)1Kz/J stellt diesbezüglich ein etabliertes Modell der ubiquitären, genetischen BAT-Defizienz dar¹⁶⁷.

Ferner ist eine weitere Limitation in der Auswahl nur männlicher Versuchstiere zu sehen. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Rahmen eines MIs wurden somit nicht erfasst und können auch in den hier dargestellten Zusammenhang mit dem braunen Fettgewebe nicht eingeordnet werden. Vor dem Hintergrund, dass Frauen signifikant mehr BAT aufweisen⁹⁵, bleiben auch in diesem Kontext einige Fragen offen.

Außerdem wäre es hinsichtlich möglicher translationaler Versuche obligat, den Mirabegron-Einfluss detaillierter zu analysieren. Einerseits könnte man hier, in Analogie zu den bereits angeführten Versuchen, die Wirkung des Agonisten auf das BAT selbst

charakterisieren, bspw. mittels einer *Bulk*-Sequenzierungsanalyse. Andererseits könnte Mirabegron einen direkten Effekt auf Immunzellen, mit nachgeschalteter Veränderung des Transkriptionsprofils, oder auf die entsprechende Rekrutierung haben, womit man aktiv eine BAT-vermittelte Immunmodulation erreichen könnte. Die Ratio der prophylaktischen Anwendung von Mirabegron war in der möglichen, protektiven Einflussnahme des BAT im Vorfeld des MIs begründet. Es bleibt jedoch unklar, ob eine therapeutische Gabe des Arzneimittels während oder nach einem MI ebenfalls günstige Effekte, wie die Reduktion der kardialen Inflammation, vermittelt. Zusätzlich könnte die Wahrscheinlichkeit von Re-Infarkten reduziert oder die Schwere der kardialen Verletzung positiv beeinflusst werden. Selbstverständlich müssten auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen in diesem Patientenkollektiv berücksichtigt werden, die eine breite Anwendung eventuell verbieten würde. Allerdings konnten in der vorliegenden Arbeit, im murinen Modell der kardialen Ischämie/ Reperfusion, keine negativen Auffälligkeiten z.B. hinsichtlich der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden.

5 Zusammenfassung

Die hier vorgestellten Experimente erweitern die bereits beschriebenen positiven, funktionelle Eigenschaften des braunen Fettgewebes (BAT) hinsichtlich eines günstigen Modulators im Kontext des Myokardinfarkts (MIs) um essenzielle Aspekte. Wenn das BAT im Vorfeld des MIs chirurgisch entfernt wurde, resultierte die Abwesenheit desselbigen in einer verschlechterten kardialen Funktion und nachfolgend größeren, linksventrikulären Narbe. Als zu Grunde liegende Mechanismen konnten quantitative Veränderungen zirkulierender und kardialer myeloider Leukozyten identifiziert werden. Diese zeigten eine deutliche Präferenz gegenüber glykolytischen Stoffwechselwegen, was wiederum mit der Ausbildung eines proinflammatorischen Immunzellphänotyps in Kontrast zu Immunzellen des Kontrollkollektivs, mit funktionell intaktem BAT, assoziiert war. Auf Grund dessen kann geschlussfolgert werden, dass diese den Infarktbedingten Schaden mutmaßlich vergrößerten und darüber hinaus an der weiteren Unterhaltung der Immunzellpräsenz partizipierten. BAT spielt somit eine maßgebliche Rolle zur Aufrechterhaltung der systemischen metabolischen Homöostase.

Die mannigfaltigen Effekte der BAT-Ablation wurden mittels Sekretom- und Transkriptomanalyse deutlich: Eine MI-assoziierte Aktivierung des BAT führte zu einer deutlich reduzierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, während Faktoren mit einem günstigen Wirkungsprofil verstärkt sezerniert wurden. Darüber hinaus wurde der positive Charakter des BAT nach Stimulation bereits auf Transkriptebene evident. Folglich resultierte die Entfernung des Fettgewebsdepots in einem Mangel an anti-inflammatorischen Mediatoren. Durch die prophylaktische Applikation des Beta-3-Rezeptoragonisten Mirabegron im Vorfeld des MIs konnte eine deutliche Verbesserung der kardialen Funktion nach MI verzeichnet werden. Auf Grund der Tatsache, dass kardiovaskuläre Erkrankungen trotz verbesserter akuter- und chronischer Maßnahmen die weltweit führende Todesursache darstellen, wird mit einer solchen prophylaktischen Stimulation des BAT ein neuer protektiver Lösungsansatz postuliert.

6 Summary

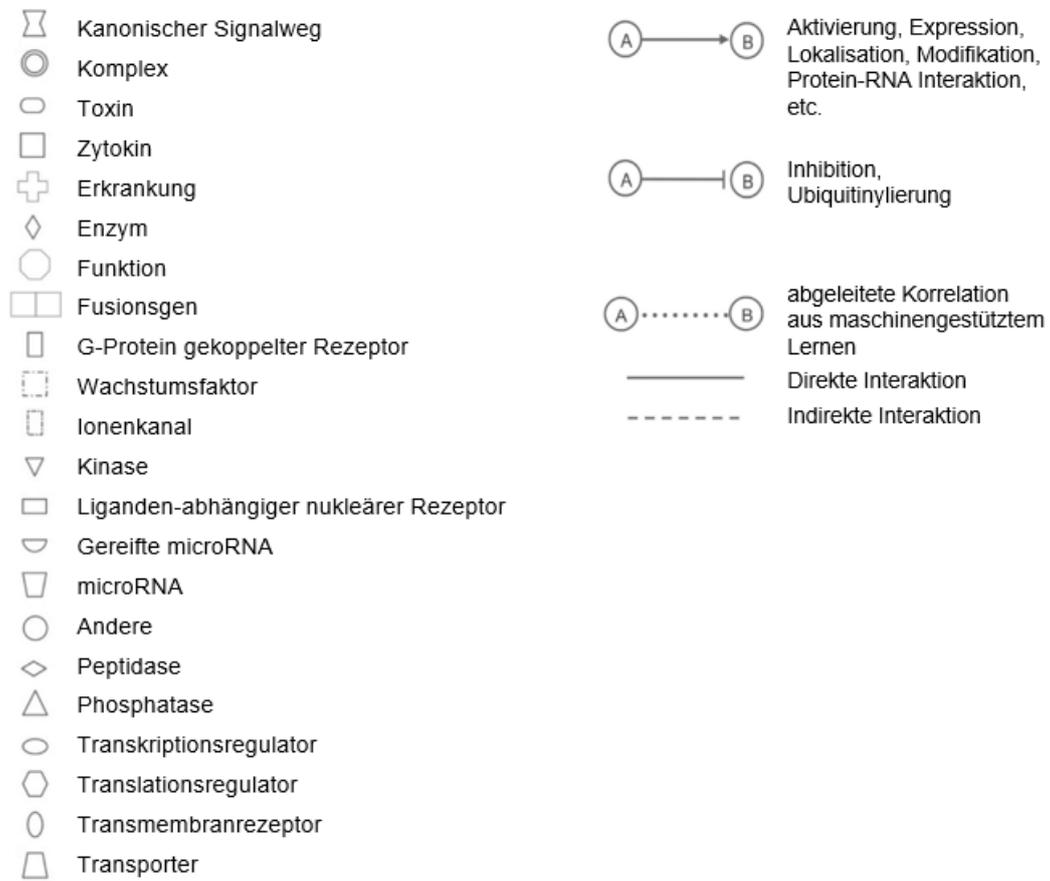
The experiments presented here extend the previously described beneficial, functional properties of brown adipose tissue (BAT) with respect to a beneficial modulator in the context of myocardial infarction (MI).

When BAT was surgically removed prior to MI, its absence resulted in worsened cardiac function and a larger left ventricular scar. The underlying mechanisms could be identified by quantitative alterations of circulating and cardiac myeloid leukocytes. Eventually, they showed a marked preference toward glycolytic pathways, which in turn was associated with the formation of a proinflammatory immune cell phenotype in contrast to immune cells of the control collective, with functionally intact BAT. Based on this, it can be concluded that these presumably magnified the infarct-related damage and, moreover, participated in the further maintenance of immune cell presence. Thus, BAT plays a crucial role in maintaining systemic metabolic homeostasis.

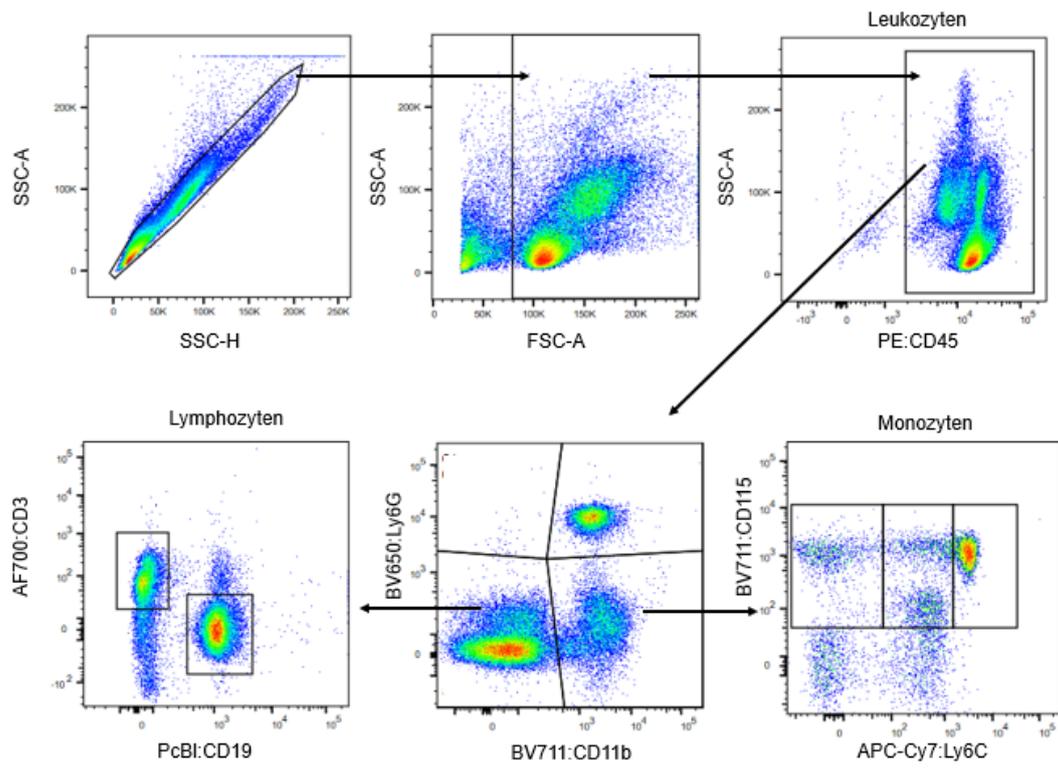
The various effects of BAT ablation were clearly demonstrated by secretome and transcriptome analyses: MI-associated activation of BAT markedly reduced the secretion of proinflammatory cytokines, whereas factors with a favorable impact profile were increasingly secreted. Moreover, the positive character of BAT after stimulation has already been evident on transcript level. Consequently, removal of this adipose tissue depot resulted in a deficiency of anti-inflammatory mediators.

Hence, there are implications for new therapeutic approaches in the cardiovascular context. By applying the beta-3-receptor agonist Mirabegron prior to MI, a significant improvement in cardiac function after MI was recorded. While cardiovascular disease is still the leading cause of death worldwide, this study highlights the importance of prophylactic BAT stimulation as a novel treatment approach to prevent such diseases.

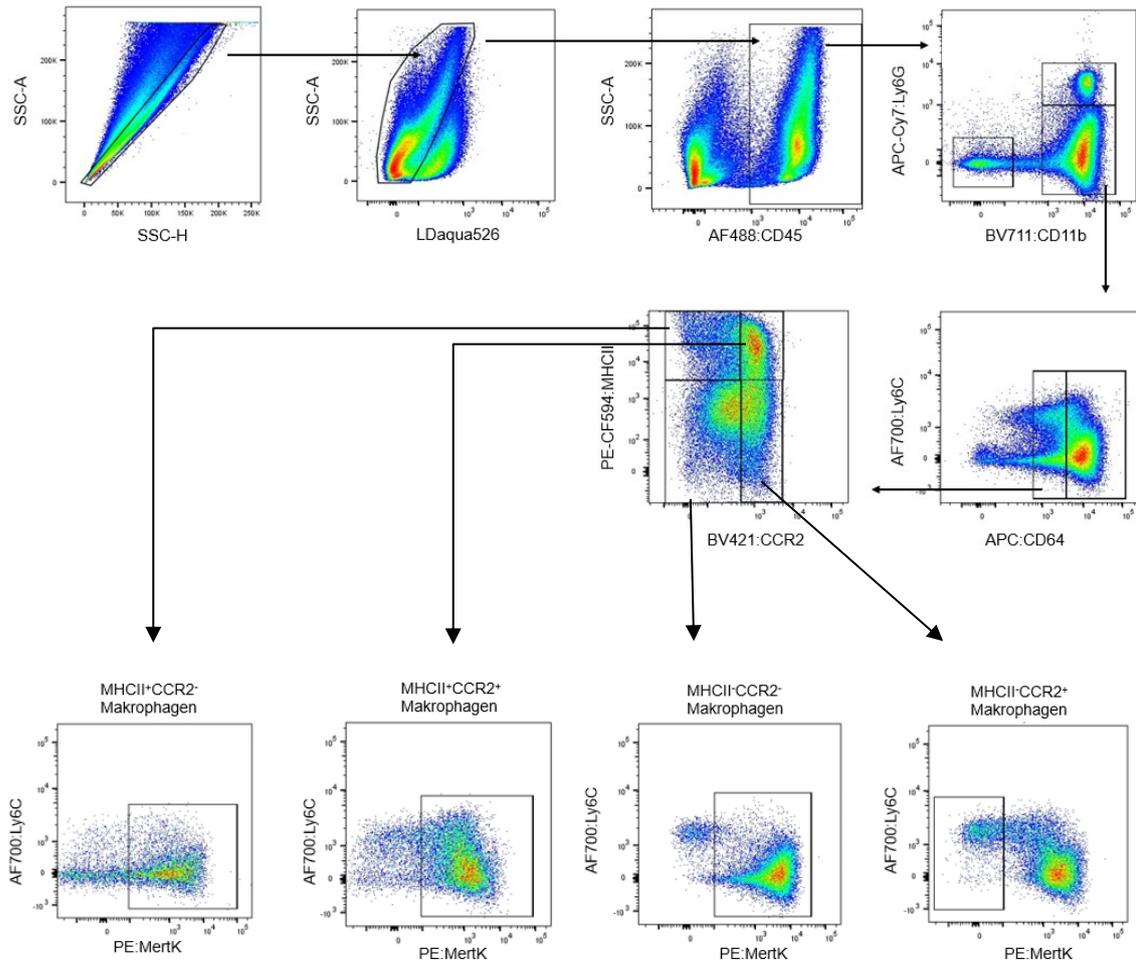
7 Appendix



Appendix 1: Legende der *Ingenuity Pathway Analysis*



Appendix 2: Gating-Schema zirkulierender Immunzellen



Appendix 3: Gating-Schema kardialer Immunzellen

| Glykolyse | | Glykolyse | |
|------------------|--|-------------------|---|
| Gen-Name | | Gen-Name | |
| <i>Acly</i> | ATP-Citrat-Lyase | <i>Abhd12</i> | <i>Abhydrolase Domain Containing 12</i> |
| <i>Aldoa</i> | Aldolase A | <i>Adipor1/2</i> | Adiponektin Receptor 1/2 |
| <i>Acp1</i> | <i>Acid Phosphatase 1</i> | <i>Apoc2</i> | Apolipoprotein C2 |
| <i>Eno1</i> | Enolase 1 | <i>Apoe</i> | Apolipoprotein E |
| <i>Atpif1</i> | ATPase-Inhibitor | <i>Atf3</i> | <i>Activating Transcription Factor 3</i> |
| <i>Gapdh</i> | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase | <i>Lipa</i> | Lipase A |
| <i>Bsg</i> | Basigin | <i>Pnpla2</i> | <i>Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2</i> |
| <i>C1qbp</i> | <i>Complement C1q Binding Protein</i> | <i>Cav1/2</i> | <i>Caveolin 1/2</i> |
| <i>Pfkl</i> | Phosphofruktokinase Typ Leber | <i>Lgals1/3/9</i> | <i>Galectin 1/3/9</i> |
| <i>Pgam1</i> | Phosphoglycerat Mutase 1 | <i>Plin2</i> | Perilipin 2 |
| <i>Pgk1</i> | Phosphoglyceratkinase | <i>Cebpa/b</i> | <i>CCAAT/enhancer binding protein a/b</i> |
| <i>Pkm</i> | Pyruvatkinase- Muskelisoenzym | <i>Fabp4</i> | <i>fatty acid binding protein 4</i> |
| <i>Gpi1</i> | Glukose-6-phosphat Isomerase 1 | <i>G0s2</i> | <i>G0/G1 Switch 2</i> |

Appendix 4: Tabelle 5: Im *Dotplot* (3.5) verwendete Gene

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten (2020) in Deutschland in Prozent. .1 | |
| Abbildung 2: Myokardinfarkt Typ 1 | 4 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Immunzellinfiltration in Abhängigkeit von der Zeit nach Myokardinfarkt..... | 12 |
| Abbildung 4: Anatomische Lokalisation der verschiedenen Adipozytenarten in Maus und Mensch. | 14 |
| Abbildung 5: Braunes Fettgewebe im Kontext einer organübergreifenden humoralen Kommunikation in kardiovaskulären Erkrankungen..... | 19 |
| Abbildung 6: Die kardiale Funktion der BAT-ablatierten Tiere und der Kontrollen bis 21 Tage nach Myokardinfarkt..... | 20 |
| Abbildung 7: Die kardiale Funktion der BAT-ablatierten Tiere und der Kontrollen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 21 |
| Abbildung 8: Chirurgische Entfernung des interskapulären braunen Fettgewebsdepot. | 25 |
| Abbildung 9: Implantation osmotischer Minipumpen..... | 26 |
| Abbildung 10: Aktivierung des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt. | 37 |
| Abbildung 11: Aktivierung des braunen Fettgewebes nach Myokardinfarkt | 38 |
| Abbildung 12: <i>Bulk</i> -Analyse des BAT nach Myokardinfarkt. | 39 |
| Abbildung 13: Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt..... | 40 |
| Abbildung 14: Sekretionsprofil des BAT nach Myokardinfarkt..... | 41 |
| Abbildung 15: Quantitative Veränderung von G-CSF 72 Stunden nach Myokardinfarkt. | 42 |
| Abbildung 16: Gewichtsdaten und histochemische Färbung der Herzen 21 Tage nach Myokardinfarkt. | 43 |
| Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen nach BAT-Ablation..... | 44 |
| Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen nach BAT-Ablation..... | 45 |
| Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen 72 Stunden nach BAT-Ablation. | 46 |
| Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 72 Stunden nach BAT-Ablation. | 47 |
| Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 48 |
| Abbildung 22: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 49 |
| Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 51 |
| Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 52 |
| Abbildung 26: Durchflusszytometrische Analyse zirkulierender T- und B-Zellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 53 |
| Abbildung 27: Der Einfluss einer BAT-Ablation auf kardiale Immunzellen 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 54 |
| Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse kardialer Lymphozyten 24 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 55 |
| Abbildung 29: <i>UMAP-Plot</i> von CD45 ⁺ , CD11b ⁺ , CD31 ⁻ vorsortierten kardialen myeloiden Immunzellen 72 Stunden nach Myokardinfarkt..... | 57 |
| Abbildung 30: <i>Volcano-Plot</i> von neutrophilen Granulozyten nach Myokardinfarkt. | 58 |
| Abbildung 31: <i>GO-Term</i> Signalweg-Analyse in neutrophilen Granulozyten. | 59 |
| Abbildung 32: Expression Glykolyse- und Lipolyse assoziierter Gene in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung in neutrophilen Granulozyten. | 60 |
| Abbildung 33: <i>Volcano-Plot</i> von Makrophagen nach Myokardinfarkt. | 61 |
| Abbildung 34: <i>GO-Term</i> Signalweg-Analyse in Makrophagen. | 62 |
| Abbildung 35: Expression Glykolyse- und Lipolyse assoziierter Gene in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung in Makrophagen..... | 63 |
| Abbildung 36: Einfluss einer BAT-Ablation mit und ohne folgenden Myokardinfarkt auf die Expression proinflammatorischer sowie metabolischer Genen in Neutrophilen. | 64 |
| Abbildung 37: Einfluss einer BAT-Ablation mit und ohne folgenden Myokardinfarkt auf die Expression proinflammatorischer sowie metabolischer Genen in Monozyten. | 65 |
| Abbildung 39: Einfluss einer BAT-Ablation auf Plasmaspiegel nicht veresterter, freier Fettsäuren nach Myokardinfarkt..... | 66 |
| Abbildung 40: T2-Relaxationszeit-Messung im BAT ohne und nach Stimulation mit Mirabegron..... | 68 |
| Abbildung 41: morphologische Unterschiede im BAT nach Mirabegron-Stimulation. | 69 |
| Abbildung 42: ¹ H-NMR Daten der kardialen Funktion nach Mirabegron-Applikation. | 70 |
| Abbildung 43: ¹ H-NMR-Daten der Infarktgröße nach Myokardinfarkt..... | 70 |
| Appendix 1: Legende der <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> | 85 |
| Appendix 2: <i>Gating</i> -Schema zirkulierender Immunzellen..... | 86 |
| Appendix 3: <i>Gating</i> -Schema kardialer Immunzellen..... | 87 |
| Appendix 4: Tabelle 6: Im <i>Dotplot</i> (3.5) verwendete Gene..... | 88 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen des Herzens | 27 |
| Tabelle 2: Antikörper für durchflusszytometrische Analysen des Blutes | 28 |
| Tabelle 3: verwendete qPCR- <i>Primer</i> | 30 |
| Tabelle 4: verwendete Antikörper für die Transkriptom-Analyse | 32 |
| Appendix 4: Tabelle 5: Im <i>Dotplot</i> (3.5) verwendete Gene..... | 89 |

10 Literatur

1. WHO, Cardiovascular diseases (CVDs); 2022 [Stand: 10.01.2022].
2. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland; 2019 [Stand: 10.01.2022].
3. WHO reveals leading causes of death and disability worldwide: 2000-2019; 2022 [Stand: 27.01.2022].
4. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17(11):1410–22.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(9):2045–51. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179705.
6. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu C-Y et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116(1):39–48. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675355.
7. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; 377(12):1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.
8. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116(22):2634–53. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397.
9. Thiele H, Bauersachs J, Mehilli J, Möllmann H, Landmesser U, Jobs A. Kommentar zu den 2020er Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zum Management des akuten Koronarsyndroms bei Patienten ohne persistierende ST-Strecken-Hebung. *Kardiologie* 2021; 15(1):19–31.
10. Thygesen K, Mair J, Katus H, Plebani M, Venge P, Collinson P et al. Recommendations for the use of cardiac troponin measurement in acute cardiac care. *Eur Heart J* 2010; 31(18):2197–204.
11. Cohn PF, Fox KM, Daly C. Silent myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 108(10):1263–77. doi: 10.1161/01.CIR.0000088001.59265.EE.
12. Chan MY, Sun JL, Newby LK, Shaw LK, Lin M, Peterson ED et al. Long-term mortality of patients undergoing cardiac catheterization for ST-elevation and non-ST-elevation myocardial infarction. *Circulation* 2009; 119(24):3110–7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.799981.
13. Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P et al. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. *Circulation* 2017; 136(20):1908–19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798.
14. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* 2018; 138(20):e618–e651. doi: 10.1161/CIR.0000000000000617.
15. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 2013; 113(5):603–16. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095.
16. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90(1):207–58. doi: 10.1152/physrev.00015.2009.
17. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest* 1987; 79(2):359–66.
18. Goodwin GW, Taegtmeyer H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(4):H1490–501. doi: 10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1490.

19. Stanley WC, Meadows SR, Kivilo KM, Roth BA, Lopaschuk GD. beta-Hydroxybutyrate inhibits myocardial fatty acid oxidation in vivo independent of changes in malonyl-CoA content. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(4):H1626-31. doi: 10.1152/ajpheart.00332.2003.
20. Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 44(6):968–75.
21. Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM et al. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest* 2007; 117(12):3930–9.
22. Puthanveetil P, Wan A, Rodrigues B. FoxO1 is crucial for sustaining cardiomyocyte metabolism and cell survival. *Cardiovasc Res* 2013; 97(3):393–403.
23. Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE, Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997; 166(1-2):85–94.
24. Vermeulen RP, Hoekstra M, Nijsten MW, van der Horst IC, van Pelt LJ, Jessurun GA et al. Clinical correlates of arterial lactate levels in patients with ST-segment elevation myocardial infarction at admission: a descriptive study. *Crit Care* 2010; 14(5):R164.
25. Lazzeri C, Valente S, Chiostrì M, Gensini GF. Clinical significance of lactate in acute cardiac patients. *World J Cardiol* 2015; 7(8):483–9. doi: 10.4330/wjc.v7.i8.483.
26. Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* 1990; 82(3 Suppl):II13-22.
27. Karakas M, Koenig W. Sympathetic nervous system: a crucial player modulating residual cardiovascular risk. *Circ Res* 2013; 112(1):13–6. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.281097.
28. Kurien VA, Oliver MF. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Progress in cardiovascular diseases* 1971; 13(4):361–73.
29. McVeigh JJ, Lopaschuk GD. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *Am J Physiol* 1990; 259(4 Pt 2):H1079-85. doi: 10.1152/ajpheart.1990.259.4.H1079.
30. Cooper RH, Randle PJ, Denton RM. Stimulation of phosphorylation and inactivation of pyruvate dehydrogenase by physiological inhibitors of the pyruvate dehydrogenase reaction. *Nature* 1975; 257(5529):808–9.
31. Batenburg JJ, Olson MS. Regulation of pyruvate dehydrogenase by fatty acid in isolated rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 1976; 251(5):1364–70.
32. Liu Q, Docherty JC, Rendell JC, Clanachan AS, Lopaschuk GD. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(4):718–25. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01803-4.
33. Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 2007; 101(4):335–47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.150417.
34. Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P et al. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2001; 107(7):813–22.
35. Kessler G, Friedman J. Metabolism of Fatty Acids and Glucose. *Circulation* 1998; 98(13). doi: 10.1161/circ.98.13.1350/a.
36. Apstein CS, Taegtmeyer H. Glucose-insulin-potassium in acute myocardial infarction: the time has come for a large, prospective trial. *Circulation* 1997; 96(4):1074–7. doi: 10.1161/01.cir.96.4.1074.

37. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J et al. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* 1971; 43(1):67–82. doi: 10.1161/01.cir.43.1.67.
38. Zhang Z, Ding L, Jin Z, Gao G, Li H, Zhang L et al. Nebivolol protects against myocardial infarction injury via stimulation of beta 3-adrenergic receptors and nitric oxide signaling. *PLOS ONE* 2014; 9(5):e98179. doi: 10.1371/journal.pone.0098179.
39. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15(7):602–11.
40. Ballesteros I, Rubio-Ponce A, Genua M, Lusito E, Kwok I, Fernández-Calvo G et al. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell* 2020; 183(5):1282–1297.e18.
41. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. corrected. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological Reviews* 2014; 66(1):1–79.
42. Tittel AP, Heuser C, Ohliger C, Llanto C, Yona S, Hämmerling GJ et al. Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods* 2012; 9(4):385–90.
43. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; 22(3):285–94.
44. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(3):159–75.
45. Lämmermann T, Afonso PV, Angermann BR, Wang JM, Kastenmüller W, Parent CA et al. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* 2013; 498(7454):371–5.
46. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(12):826–37.
47. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(6):392–404.
48. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo J-L, Iwamoto Y, Gorbato R et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* 2012; 125(2):364–74.
49. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I et al. Tissue Resident CCR2- and CCR2+ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res* 2019; 124(2):263–78.
50. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (New York, N.Y.)* 2007; 317(5838):666–70.
51. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang X-F, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research* 2014; 2(1):1.
52. Si Y, Tsou C-L, Croft K, Charo IF. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(4):1192–203.
53. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 2014; 5:514.
54. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, Winther MPJ de, Donners MMPC. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 2014; 17(1):109–18.

55. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013; 38(1):79–91.
56. Wu Y, Hirschi KK. Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8:617879.
57. Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 2002; 99(1):111–20.
58. Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo J-L, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E et al. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; 55(15):1629–38. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.089.
59. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(2):117–29.
60. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* 2014; 11(5):255–65.
61. King KR, Aguirre AD, Ye Y-X, Sun Y, Roh JD, Ng RP et al. IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. *Nat Med* 2017; 23(12):1481–7.
62. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005; 96(8):881–9. doi: 10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a.
63. Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation* 2009; 119(10):1355–7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846105.
64. Sager HB, Heidt T, Hulsmans M, Dutta P, Courties G, Sebas M et al. Targeting Interleukin-1 β Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2015; 132(20):1880–90. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016160.
65. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 2016; 119(1):91–112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.
66. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology* 2013; 190(9):4451–7.
67. Proebstl D, Voisin M-B, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* 2012; 209(6):1219–34.
68. Boufenzler A, Lemarié J, Simon T, Derive M, Bouazza Y, Tran N et al. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res* 2015; 116(11):1772–82. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305628.
69. Ali M, Pulli B, Courties G, Tricot B, Sebas M, Iwamoto Y et al. Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2016; 1(7):633–43.
70. Horckmans M, Ring L, Duchene J, Santovito D, Schloss MJ, Drechsler M et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J* 2017; 38(3):187–97.
71. Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Comprehensive Physiology* 2015; 5(4):1877–909.
72. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; 18(12):733–44.

73. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35(5):1066–70.
74. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science (New York, N.Y.)* 2013; 339(6116):161–6. doi: 10.1126/science.1230719.
75. Cai Z, Xie Q, Hu T, Yao Q, Zhao J, Wu Q et al. S100A8/A9 in Myocardial Infarction: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8:603902.
76. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science (New York, N.Y.)* 2009; 325(5940):612–6. doi: 10.1126/science.1175202.
77. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; 204(12):3037–47.
78. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(45):16029–34.
79. Dick SA, Macklin JA, Nejat S, Momen A, Clemente-Casares X, Althagafi MG et al. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction. *Nat Immunol* 2019; 20(1):29–39.
80. Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Asakura Y, Takahashi T, Ishikawa S et al. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; 39(2):241–6. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01721-1.
81. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60(16):1512–20. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019.
82. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJA. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American Journal of Pathology* 2007; 170(3):818–29.
83. Thackeray JT, Bengel FM. Molecular Imaging of Myocardial Inflammation With Positron Emission Tomography Post-Ischemia: A Determinant of Subsequent Remodeling or Recovery. *JACC Cardiovasc Imaging* 2018; 11(9):1340–55.
84. Park A, Kim WK, Bae K-H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells* 2014; 6(1):33–42.
85. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews* 2010; 11(1):11–8.
86. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front. Endocrinol.* 2016; 7:85.
87. Naot D, Cornish J. Cytokines and Hormones That Contribute to the Positive Association between Fat and Bone. *Front. Endocrinol.* 2014; 5:70.
88. Suchacki KJ, Tavares AAS, Mattiucci D, Scheller EL, Papanastasiou G, Gray C et al. Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis. *Nat Commun* 2020; 11(1):3097.
89. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2018; 29(3):191–200.

90. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008; 454(7207):961–7. doi: 10.1038/nature07182.
91. Rajakumari S, Wu J, Ishibashi J, Lim H-W, Giang A-H, Won K-J et al. EBF2 determines and maintains brown adipocyte identity. *Cell metabolism* 2013; 17(4):562–74.
92. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 2014; 3(1):4–9. doi: 10.4161/adip.26232.
93. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84(1):277–359.
94. Urisarri A, González-García I, Estévez-Salguero Á, Pata MP, Milbank E, López N et al. BMP8 and activated brown adipose tissue in human newborns. *Nat Commun* 2021; 12(1):5274.
95. Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ, Eljalby M, Marx SJ, Wibmer AG et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat Med* 2021; 27(1):58–65.
96. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; 360(15):1500–8. doi: 10.1056/NEJMoa0808718.
97. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2001; 60(3):319–28.
98. Prusiner SB, Cannon B, Lindberg O. Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 1. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration. *European Journal of Biochemistry* 1968; 6(1):15–22.
99. Asano A, Kimura K, Saito M. Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J Vet Med Sci* 1999; 61(4):403–9.
100. Mahdaviani K, Chess D, Wu Y, Shirihai O, Aprahamian TR. Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism* 2016; 65(1):26–35.
101. Tseng Y-H, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 2008; 454(7207):1000–4. doi: 10.1038/nature07221.
102. Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ et al. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 2012; 149(4):871–85.
103. Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J, Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nature reviews. Endocrinology* 2017; 13(1):26–35.
104. Gunawardana SC, Piston DW. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* 2012; 61(3):674–82. doi: 10.2337/db11-0510.
105. Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA et al. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 2014; 63(12):4057–63.
106. Chartoumpekis DV, Habeos IG, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Kyriazopoulou VE, Papavassiliou AG. Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* 2011; 17(7-8):736–40.
107. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149(12):6018–27.
108. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005; 115(6):1627–35.
109. Fisher fM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development* 2012; 26(3):271–81.

110. Hondares E, Gallego-Escuredo JM, Flachs P, Frontini A, Cereijo R, Goday A et al. Fibroblast growth factor-21 is expressed in neonatal and pheochromocytoma-induced adult human brown adipose tissue. *Metabolism* 2014; 63(3):312–7.
111. Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301(4):H1425–37. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2011.
112. Wolf Y, Boura-Halfon S, Cortese N, Haimon Z, Sar Shalom H, Kuperman Y et al. Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure. *Nat Immunol* 2017; 18(6):665–74.
113. Pirzgalska RM, Seixas E, Seidman JS, Link VM, Sánchez NM, Mahú I et al. Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine. *Nat Med* 2017; 23(11):1309–18.
114. Omran F, Christian M. Inflammatory Signaling and Brown Fat Activity. *Front. Endocrinol.* 2020; 11:156.
115. Alcalá M, Calderon-Dominguez M, Bustos E, Ramos P, Casals N, Serra D et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci Rep* 2017; 7(1):16082.
116. Nisoli E, Briscini L, Giordano A, Tonello C, Wiesbrock SM, Uysal KT et al. Tumor necrosis factor alpha mediates apoptosis of brown adipocytes and defective brown adipocyte function in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14):8033–8. doi: 10.1073/pnas.97.14.8033.
117. Sakamoto T, Nitta T, Maruno K, Yeh Y-S, Kuwata H, Tomita K et al. Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310(8):E676-E687. doi: 10.1152/ajpendo.00028.2015.
118. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 2013; 123(8):3404–8.
119. Austin MA, McKnight B, Edwards KL, Bradley CM, McNeely MJ, Psaty BM et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation* 2000; 101(24):2777–82. doi: 10.1161/01.cir.101.24.2777.
120. Eiselein L, Wilson DW, Lamé MW, Rutledge JC. Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(6):H2745-53. doi: 10.1152/ajpheart.00686.2006.
121. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ilttrich H, Peldschus K et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 2011; 17(2):200–5.
122. Iwen KA, Backhaus J, Cassens M, Walth M, Hedesan OC, Merkel M et al. Cold-Induced Brown Adipose Tissue Activity Alters Plasma Fatty Acids and Improves Glucose Metabolism in Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102(11):4226–34.
123. Grandoch M, Flögel U, Virtue S, Maier JK, Jelenik T, Kohlmorgen C et al. 4-Methylumbelliferone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue. *Nat Metab* 2019; 1(5):546–59.
124. Kwak SH, Park BL, Kim H, German MS, Go MJ, Jung HS et al. Association of variations in TPH1 and HTR2B with gestational weight gain and measures of obesity. *Obesity* 2012; 20(1):233–8. doi: 10.1038/oby.2011.253.
125. Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ et al. Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med* 2015; 21(2):166–72.

126. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe, P. Padmini S. J., Bartelt A, Schlein C, Worthmann A et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun* 2015; 6(1):6356.
127. Ruan C-C, Kong L-R, Chen X-H, Ma Y, Pan X-X, Zhang Z-B et al. A2A Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell metabolism* 2018; 28(3):476-489.e5.
128. Liu SQ, Roberts D, Kharitononkov A, Zhang B, Hanson SM, Li YC et al. Endocrine protection of ischemic myocardium by FGF21 from the liver and adipose tissue. *Sci Rep* 2013; 3(1):2767.
129. Thoonen R, Ernande L, Cheng J, Nagasaka Y, Yao V, Miranda-Bezerra A et al. Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2015; 84:202–11. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.002.
130. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991; 83(3):836–44.
131. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 2012; 487(7407):325–9.
132. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 2):H2147-54.
133. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH et al. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(4):H1049-55.
134. Kleveland O, Kunszt G, Bratlie M, Ueland T, Broch K, Holte E et al. Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J* 2016; 37(30):2406–13.
135. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular research* 2010; 87(3):424–30.
136. Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N. In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *The FASEB Journal* 2004; 18(7):911–3. doi: 10.1096/fj.03-1148fje.
137. Bottermann K, Granade ME, Oenarto V, Fischer JW, Harris TE. Atglistatin Pretreatment Preserves Remote Myocardium Function Following Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2021; 26(3):289–97. doi: 10.1177/1074248420971113.
138. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2001; 1504(1):82–106.
139. Orn S, Breland UM, Mollnes TE, Manhenke C, Dickstein K, Aukrust P et al. The chemokine network in relation to infarct size and left ventricular remodeling following acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology* 2009; 104(9):1179–83.
140. Montecucco F, Braunersreuther V, Lenglet S, Delattre BMA, Pelli G, Buatois V et al. CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice. *European heart journal* 2012; 33(15):1964–74.

141. Tian M, Yuan Y-C, Li J-Y, Gionfriddo MR, Huang R-C. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Diseases and Translational Medicine* 2015; 1(1):18–26.
142. Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E et al. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(2):373–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000253886.44609.ae.
143. Li Y, Zhao Y, Qiu C, Yang Y, Liao G, Wu X et al. Role of eotaxin-1/CCL11 in sepsis-induced myocardial injury in elderly patients. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(5):4463–73.
144. Cui X, Jing J, Wu R, Cao Q, Li F, Li K et al. Adipose tissue-derived neurotrophic factor 3 regulates sympathetic innervation and thermogenesis in adipose tissue. *Nat Commun* 2021; 12(1):5362.
145. Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I et al. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(8):1902–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.248930.
146. Pinckard KM, Shettigar VK, Wright KR, Abay E, Baer LA, Vidal P et al. A Novel Endocrine Role for the BAT-Released Lipokine 12,13-diHOME to Mediate Cardiac Function. *Circulation* 2021; 143(2):145–59. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049813.
147. Zhao H, Chen X, Hu G, Li C, Guo L, Zhang L et al. Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection. *Circ Res* 2022; 130(10):1490–506. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.320458.
148. Kwong RY, Chan AK, Brown KA, Chan CW, Reynolds HG, Tsang S et al. Impact of unrecognized myocardial scar detected by cardiac magnetic resonance imaging on event-free survival in patients presenting with signs or symptoms of coronary artery disease. *Circulation* 2006; 113(23):2733–43.
149. Shimizu I, Walsh K. The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Curr Obes Rep* 2015; 4(2):224–9.
150. Kotzbeck P, Giordano A, Mondini E, Murano I, Severi I, Venema W et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *Journal of Lipid Research* 2018; 59(5):784–94.
151. O'Mara AE, Johnson JW, Linderman JD, Brychta RJ, McGehee S, Fletcher LA et al. Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2020; 130(5):2209–19.
152. Friedman GD, Klatsky AL, Siegelaub AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1974; 290(23):1275–8.
153. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 2007; 117(1):195–205.
154. Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy. *Circulation* 2000; 102(19):2329–34.
155. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010; 121(22):2437–45. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346.
156. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2013; 62:24–35.
157. Chia S, Nagurney JT, Brown DFM, Raffel OC, Bamberg F, Senatore F et al. Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular

- function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *American Journal of Cardiology* 2009; 103(3):333–7.
158. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American Journal of Pathology* 2010; 176(5):2177–87.
 159. Zhang S, Zhang M, Goldstein S, Li Y, Ge J, He B et al. The effect of c-fos on acute myocardial infarction and the significance of metoprolol intervention in a rat model. *Cell Biochem Biophys* 2013; 65(2):249–55.
 160. Sreejit G, Abdel-Latif A, Athmanathan B, Annabathula R, Dhyani A, Noothi SK et al. Neutrophil-Derived S100A8/A9 Amplify Granulopoiesis After Myocardial Infarction. *Circulation* 2020; 141(13):1080–94.
 161. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med* 2018; 24(8):1234–45.
 162. Kumar S, Dikshit M. Metabolic Insight of Neutrophils in Health and Disease. *Front. Immunol.* 2019; 10:2099.
 163. Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Moreno-Altamirano MMB, López-Villegas EO, Sánchez-García FJ. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. *Immunology* 2015; 145(2):213–24.
 164. Soto-Herederó G, Gómez de Las Heras MM, Gabandé-Rodríguez E, Oller J, Mittelbrunn M. Glycolysis - a key player in the inflammatory response. *The Febs Journal* 2020; 287(16):3350–69.
 165. Lauterbach MA, Hanke JE, Serefidou M, Mangan MSJ, Kolbe C-C, Hess T et al. Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase. *Immunity* 2019; 51(6):997-1011.e7.
 166. Shin H, Ma Y, Chanturiya T, Cao Q, Wang Y, Kadegowda AKG et al. Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell metabolism* 2017; 26(5):764-777.e5.
 167. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 1993; 366(6457):740–2.

11 Originalarbeiten

Katarzyna Hackert, Susanne Homann, Shakila Mir, Arne Beran, Simone Gorreßen, Florian Funk, Jens W. Fischer, Maria Grandoch und Joachim Schmidt *4-Methylumbelliferone Attenuates Macrophage Invasion and Myocardial Remodeling in Pressure-Overloaded Mouse Hearts. Hypertension, Vol. 77, No. 6, 2021*

Elisa Duregotti, Christina Reumiller, Ursula Mayr, Maria Hasman, Lukas Schmidt, Sean A. Burnap, Konstantinos Theofilatos, Javier Barallobre-Barreiro, Arne Beran, Maria Grandoch, Alessandro Viviano, Marjan Jahangiri und Manuel Mayr *Reduced Secretion Of Neuronal Growth Regulator 1 Contributes To Impaired Adipose-Neuronal Crosstalk in Obesity* In Revision: Nature Communications, 2022

12 Kongressbeiträge

Cardiovascular Disease Symposium (CaVaD) – It's a heart story, 2021, online (Vortrag)

13 Lebenslauf

Zur Person:

Geboren: 06. Mai 1993 in Duisburg-Rheinhausen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulische und universitäre Ausbildung:

| | |
|---------------------------------|---|
| 2012 | Abitur am Gymnasium Adolfinum in Moers |
| Okt. 2012 | Studium an der Hochschule Rhein-Waal Studienfach: Arbeits- und Organisationspsychologie |
| April 2013- Oktober 2017 | Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf |
| Dezember 2017- Dezember 2018 | Praktisches Jahr im Rahmen des Pharmaziestudiums als „Pharmazeut im Praktikum“ |
| Dezember 2017- Juni 2018 | Beschäftigung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Mathias Kasack am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie mit dem Themenschwerpunkt Onkologie, dabei genauer im Ansatz die Cis-Platin Resistenz von Tumorzellen zu überwinden |
| Juni 2018- Dezember 2018 | Beschäftigung in der Pharmako ³ - Apotheke in Düsseldorf |
| Januar 2019 | Drittes Staatsexamen |
| Februar 2019 - heute | Beginn der Promotion am Institut für translationale Pharmakologie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Maria Grandoch mit dem Thema: „Die Bedeutung des braunen Fettgewebes im murinen Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion“. |

14 Danksagung

Es gibt letztlich sehr viele Personen, bei denen ich mich für die letzten Jahre bedanken möchte. Zum einen gilt natürlich ein großer Dank Frau Prof. Maria Grandoch für das Vertrauen, die Möglichkeit die Promotion in ihrem Arbeitskreis durchführen zu können und das freundschaftliche Miteinander. Den zuletzt genannten Punkt möchte ich besonders hervorheben, da mir zu jeder Zeit Verständnis und Hilfe offenbart wurde. Herzlichen Dank! Herrn Prof. Joachim Altschmied danke ich sehr für die Übernahme des Korreferates.

Außerdem möchte ich zwei Personen danken, die den mitunter frustreichen Alltag sehr erträglich gemacht haben: Katja Wegener und Annika Zimmermann. Vielen Dank für die Zeit und vor allem für die Möglichkeit über wichtige Themen emotional, vor allem von meiner Seite aus, diskutieren zu können!

Ein großer Dank gilt zudem auch Dr. Rebekka Schneckmann. Einerseits für das Korrekturlesen meiner Dissertation, andererseits, und das wiegt wesentlich mehr, für die vielen (Fach-)Gespräche und dem damit verbundenen Austausch. Vielen Dank!

Für die Hilfe im Labor möchte ich mich vor allem bei Kerstin Freidel bedanken!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ich bin sehr glücklich darüber mehrere Felse in der Brandung bei mir zu wissen. Diese Unterstützung ist alles andere als selbstverständlich und Worte finden hier nicht das richtige Ausmaß meiner Dankbarkeit.

Eine Person möchte ich jedoch hier an dieser Stelle ganz besonders hervorheben. Meine Mutter, Sabine Beran. Ihr gilt sicherlich der größte Dank.

Vielen Dank!

15 Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den XX.XX.XXXX

Arne Beran