Aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Der Einfluss des braunen Fettgewebes auf die Morphologie und Funktion des weißen Fettgewebes im murinen Modell einer kardialen Ischämie und Reperfusion bei standardisierter vs. thermoneutraler Haltungstemperatur

Dissertation

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

vorgelegt von

Julia Carmeline Martina Müller

2025

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Meiner Mutter

Zusammenfassung

Das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT), ursprünglich als wärmeproduzierendes Organ in Säugetieren zur Regulation der Körpertemperatur beschrieben, rückte aufgrund seiner vielfältigen Funktionen im Rahmen kardiometabolischer Erkrankungen in den Fokus des Interesses. Hierbei ist neben der sogenannten zitterfreien Thermogenese auch seine sekretorische Kapazität von Bedeutung. Besonders die kardioprotektive Wirkung des BAT nach akutem Myokardinfarkt wird untersucht. Diese wird infolge einer BAT-Aktivierung durch die akute Stimulation des sympathischen Nervensystems nach Myokardinfarkt beobachtet. Darüber hinaus wird eine Interorgankommunikation zwischen BAT und weißem, vorwiegend subkutanem Fettgewebe beschrieben, welche zu einer morphologischen Veränderung im weißen Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) führt, wie die Akkumulation sogenannter beiger Adipozyten, und mit einem metabolischen Benefit einhergeht.

In der zugrundeliegenden Arbeit sollte der Einfluss des BAT nach einem Myokardinfarkt auf die Morphologie und Funktion des WAT unter standardisierten und thermoneutralen Bedingungen untersucht werden. Bisherige Untersuchungen wurden meist unter der standardisierten Haltungstemperatur von 21°C und nicht bei Thermoneutralität (30°C) der Versuchstiere durchgeführt. Dies führt durch einen dauerhaft erhöhten Sympathikotonus zu einer permanenten BAT-Aktivierung und entspricht nicht der humanen Situation, sodass eine Translation der Ergebnisse auf den Menschen nur eingeschränkt erfolgen kann.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen an männlichen C57BL/6J-Wildtyp Mäusen vergleichend bei 21°C und 30°C durchgeführt. Nach einer dreiwöchigen Akklimatisierung bei 21°C und 30°C erfolgten eine chirurgische Ablation oder Schein-Operation des interskapulären BAT sowie nachfolgend die Induktion einer myokardialen Ischämie/Reperfusion (I/R). Drei Wochen nach I/R wurde der Einfluss der chirurgischen BAT-Ablation auf die Adipozytenmorphologie, die Expression des für die zitterfreie Thermogenese erforderlichen und als *Browning*-Marker bekannten Proteins *Uncoupling protein-1* (UCP-1) und die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT untersucht.

Drei Wochen nach I/R konnte kein Effekt der BAT-Ablation auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen WAT von Tieren bei 21°C nachgewiesen werden. Auch ein Effekt der BAT-Ablation auf die Adipozytenmorphologie im subkutanen WAT vergleichend zu scheinoperierten Kontrolltieren blieb aus. Hingegen zeigte sich das UCP-1-Protein im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren tendenziell erhöht. Insgesamt war eine signifikant gesteigerte UCP-1-Expression im subkutanen WAT von Tieren bei 21°C im Vergleich zu 30°C erkennbar. Die BAT-Ablation führte zudem zu einer tendenziell reduzierten Genexpression lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT bei 21°C.

Im Gegensatz zu 21°C konnte eine signifikante Zunahme des Körpergewichts und des Gewichts des subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei 30°C drei Wochen nach I/R nachgewiesen werden. Einer Lipidakkumulation entsprechend, zeigte sich der Anteil kleiner Adipozyten, welche sich stellenweise im subkutanen WAT gruppierten, nach BAT-Ablation signifikant erniedrigt. Außerdem wurde eine signifikant größere durchschnittliche Adipozytenfläche im subkutanen WAT von Tieren mit Erhalt des BAT bei 30°C im Vergleich zu 21°C festgestellt. Bei 30°C blieb das UCP-1-Protein im subkutanen WAT von der BAT-Ablation unbeeinflusst und war nahezu nicht detektierbar. Ebenso zeigte die BAT-Ablation keinen Effekt auf die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT.

Zusammenfassend ließ sich in dieser Arbeit ein antilipolytischer Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT herausarbeiten. Dieser Effekt stellte sich in Tieren bei 21°C molekulargenetisch und in Tieren bei 30°C histomorphologisch dar. Die Darstellung des antilipolytischen Effekts der chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT auf unterschiedlicher Ebene verglichen zwischen 21°C und 30°C deutete auf einen unterschiedlichen, temperaturabhängigen Zeitverlauf dieses Effekts hin. Dies verdeutlicht die Relevanz der Haltungstemperatur von Versuchstieren für die Forschung, insbesondere vor dem Hintergrund einer Translation dieser Ergebnisse auf den Menschen.

Summary

Brown adipose tissue (BAT), originally described as a heat-producing organ in mammals for the regulation of body temperature, has been focused in research due to its function in cardiometabolic diseases. To this effect, not only the production of heat without shivering (non-shivering thermogenesis) but also the secretory capacity of BAT is involved. Especially, the cardioprotective effect of BAT after acute myocardial infarction is being investigated. This is observed as a result of BAT-activation through the acute stimulation of the sympathetic nervous system after myocardial infarction. Additionally, an communication between BAT and white, mainly subcutaneous adipose tissue has been described that is associated with metabolic benefits and accompanied by morphological changes in white adipose tissue (WAT), such as the accumulation of so-called beige adipocytes.

The aim of this work was to explore the influence of BAT on the morphology and function of WAT after myocardial infarction under standardized and thermoneutral conditions. In previous studies, most of the animals were housed under the standardized ambient temperature of 21°C and not at thermoneutrality (30°C). This leads to permanent BAT-activation due to an increased sympathetic tone at 21°C and cannot be compared to the human situation. So translation of results performed under these conditions to humans is limited.

For this reason, the present experiments were carried out in male wild-type C57BL/6J mice at 21°C and 30°C. After three weeks of acclimatization at 21°C and 30°C surgical ablation or sham operation of the interscapular BAT was performed followed by induction of myocardial ischemia/reperfusion (I/R). Three weeks post I/R, the effect of surgical BAT-ablation on the adipocytes morphology, on the expression of uncoupling protein-1 (UCP-1) that is important for non-shivering thermogenesis and also known as a browning marker and on the expression of genes encoding for lipid metabolism were investigated in subcutaneous WAT.

Three weeks post I/R, no effect of BAT-Ablation on body weight and the weight of subcutaneous WAT was detected in mice at 21°C. Also, there was no effect of BAT-ablation on the adipocytes morphology in subcutaneous WAT compared to mice with sham operation. However, UCP-1 tended to be increased in subcutaneous WAT of BAT-ablated mice. There was an overall significant increase in UCP-1-expression in subcutaneous WAT of mice at 21°C compared to 30°C. Furthermore, BAT-ablation tended to reduce the gene expression of lipolytic enzymes in subcutaneous WAT at 21°C.

In contrast to 21°C, a significant increase in body weight and the weight of subcutaneous WAT was detected in BAT-ablated mice at 30°C three weeks post I/R. Consistent with this accumulation of lipids, formation of small adipocytes grouped in subcutaneous WAT was significantly reduced after BAT-ablation. In addition, the average white adipocytes size was significantly larger in sham-operated mice at 30°C compared to 21°C. At 30°C, the expression of UCP-1 in subcutaneous WAT was unaffected by BAT-ablation and virtually undetectable. Also, BAT-ablation had no effect on the gene expression of lipolytic enzymes in subcutaneous WAT.

In summary, this study revealed an antilipolytic effect of surgical BAT-ablation on subcutaneous WAT, molecularly in mice at 21°C, histomorphologically in mice at 30°C. The presentation of this antilipolytic effect differently between 21°C and 30°C indicated a different, temperature-dependent time course. These results emphasized the importance of the housing temperature for animals in research, especially while translating these data to humans.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABHD5	*1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase*
AC	Adenylatcyclase
Acaca, Acaca1	*acetyl-coenzyme a-carboxylase-alpha 1*
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ad.	addiert
ATGL	Adipozyten-Triglyceridlipase
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	*brown adipose tissue*
BMAT	*bone marrow adipose tissue*
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	*complementary deoxyribonucleic acid*
CREB	cAMP *responsive element binding protein*
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DNA	*deoxyribonucleic acid*
dest.	destilliert
DNL	*de novo* Lipogenese
Fasn, Fasn3	*fatty acid synthase 3*
FCS	*fetal calf serum*
FGF21	*fibroblast growth factor 21*
g	Gramm
HCL	Chlorwasserstoff
HRP	*horseradish peroxidase*
HSL	Hormonsensitive Lipase
H2O2	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat
LAD	*left anterior descending*
Lipe3	*hormone-sensitive lipase 3*
MAG	Monoacylglycerin
MAGL	Monoacylglycerinlipase
Malonyl-CoA	Malonyl-Coenzym A

mg	Milligramm
mM	Millimolar
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
NaCl	Natriumchlorid
NaH2PO4	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PKA	Proteinkinase A
PnPla2	*patatin like phospholipase domain containing* 2
RNA	*ribonucleic acid*
RPL13a	*ribosomal protein L13a*
RT-qPCR	*real-time quantitative polymerase chain reaction*
SNS	*sympathetic nervous system*
TAG	Triacylglycerid
TB	Tris-Borat Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TNZ	Thermoneutrale Zone
UCP-1	*uncoupling protein-1*
WAT	*white adipose tissue*
β3-Rezeptor	adrenerger Beta-3-Rezeptor
°C	Grad-Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm²	Quadratmikrometer
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ..... **I**

Summary ..... **II**

Abkürzungsverzeichnis ..... **III**

Inhaltsverzeichnis ..... **V**

1 Einleitung **1**

1.1 Epidemiologie und klinische Relevanz des Myokardinfarkts 1

1.2 Das Fettgewebe 1

1.2.1 Weißes Fettgewebe 2

1.2.1.1 Aufbau und Funktion des weißen Fettgewebes 2

1.2.1.2 Morphologie und Funktion des weißen Fettgewebes bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen 6

1.2.2 Braunes Fettgewebe 7

1.2.2.1 Aufbau und Funktion des braunen Fettgewebes 7

1.2.2.2 Browning 9

1.2.2.3 Das braune Fettgewebe als therapeutische Zielstruktur metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen 10

1.2.3 Crosstalk zwischen weißem und braunem Fettgewebe 11

1.2.4 Die Rolle von weißem und braunem Fettgewebe beim Myokardinfarkt 12

1.3 Die Haltungstemperatur in Tierversuchen – Standardisierte Haltungstemperatur vs. Thermoneutralität 14

1.3.1 Einfluss der Haltungstemperatur auf den Stoffwechsel 14

1.3.2 Vergleichbarer Stoffwechsel von Maus und Mensch bei Thermoneutralität 15

1.3.3 Einfluss der Haltungstemperatur auf braunes und weißes Fettgewebe 16

1.3.4 Einfluss der Haltungstemperatur auf die sekretorische Funktion des braunen Fettgewebes 17

1.3.5 Einfluss der Haltungstemperatur auf die Funktion des braunen Fettgewebes bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen 17

1.3.6 Braunes Fettgewebe von Maus und Mensch ähneln sich bei Thermoneutralität 19

1.4 Ziele dieser Arbeit 20

2 Material und Methoden **21**

2.1 Geräte und Material 21

2.2 Arbeitsmittel 22
2.2.1 Substanzen 22
2.2.2 Lösungen und Puffer 23
2.2.3 Antikörper 24
2.3 Experimentelle Tierversuche 25
2.4 In vivo Experimente im Mausmodell 25
2.4.1 Verwendete Tiere und experimentelles Schema 25
2.4.2 Induktion einer myokardialen Ischämie und Reperfusion im geschlossenen Thoraxmodell / „Closed-Chest Modell“ 26
2.4.3 Chirurgische Ablation des interskapulären braunen Fettgewebes 27
2.5 Körpergewicht und Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 27
2.6 Subkutanes weißes Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren 27
2.6.1 Gewebeschnitte 27
2.6.2 Immunhistochemische Färbung/UCP-1-Färbung 28
2.6.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen 29
2.6.4 Adipozytenmorphologie 31
2.6.5 UCP-1-Flächenanteil 33
2.6.6 RNA-Isolation 33
2.6.7 cDNA-Synthese 35
2.6.8 Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) 35
2.6.9 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression 36
2.7 Statistische Auswertung 36
3 Ergebnisse 38
3.1 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes im Modell eines akuten Myokardinfarkts bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur 38
3.2 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das subkutane weiße Fettgewebe im Modell eines akuten Myokardinfarkts bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur 42
3.2.1 Adipozytenmorphologie des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 42
3.2.1.1 Durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 43

3.2.1.2 Absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 45
3.2.1.3 Prozentualer Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren 50
3.2.2 UCP-1-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren 51
3.2.3 mRNA-Expression von Markergenen der Lipogenese und Lipolyse im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren 54

4 Diskussion 57

4.1 Schlussfolgerungen 57

4.2 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes im Modell eines akuten Myokardinfarkts unter standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur 58

4.3 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das subkutane weiße Fettgewebe im Modell eines akuten Myokardinfarkts unter standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur 61
4.3.1 Adipozytenmorphologie 62
4.3.2 UCP-1-Expression 65
4.3.3 mRNA-Expression von Markergenen der Lipogenese und Lipolyse 67

4.4 Limitationen 70

4.5 Ausblick 71

5 Literaturverzeichnis 72

6 Abbildungsverzeichnis 90

7 Tabellenverzeichnis 92

8 Danksagung 93

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und klinische Relevanz des Myokardinfarkts

Kardiovaskuläre Erkrankungen, worunter im engeren Sinne die koronare Herzkrankheit (KHK), der ischämische Myokardinfarkt, der Schlaganfall, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die arterielle Hypertonie zusammengefasst werden, zählen weltweit zu den häufigsten Erkrankungen und Todesursachen. Der akute Myokardinfarkt ist zudem eine häufige Komplikation der KHK, die ihrerseits weltweit die größte Mortalität unter den kardiovaskulären Erkrankungen aufweist [1]. Auch in Deutschland zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, der akute Myokardinfarkt eingeschlossen, zu den häufigsten Todesursachen[2]. Demzufolge wird viel Forschung betrieben, um die Therapie des Myokardinfarkts zu optimieren und dessen Mortalität zu senken. Als Standardverfahren gilt die rasche Wiederherstellung des Blutflusses (Reperfusion) von verschlossenen Koronargefäßen mittels perkutaner koronarer Interventionen[3]. Trotz, dass sich die Prognose von Patienten mit akutem Myokardinfarkt bei KHK durch die Reperfusionstherapie deutlich verbessert hat, kommt es nicht selten im Rahmen dieses Verfahrens zu Myokardschäden, sogenannten Reperfusionsschäden[3]. Diese sind charakterisiert durch metabolische sowie inflammatorische Prozesse, die letztlich zu einem vermehrten Untergang von Herzmuskelzellen führen. In der Folge bleibt eine Infarktnarbe zurück und die kontraktile Leistung des betroffenen Myokards sinkt. Je nach Ausmaß des Reperfusionschadens kann eine Herzinsuffizienz resultieren. Eine Verhinderung dieses Reperfusionschadens ist somit von besonderem Interesse, um letztlich die Behandlung des akuten Myokardinfarkts zu optimieren.

1.2 Das Fettgewebe

Das Fettgewebe ist ein strukturell und funktionell vielseitiges Gewebe, beeinflusst durch endogene und umweltbezogene Faktoren. Es wird unterteilt in weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT), beiges Fettgewebe und Fettgewebe, welches im Knochenmark lokalisiert ist (*bone marrow adipose tissue*, BMAT)[4, 5].

1.2.1 Weißes Fettgewebe

1.2.1.1 Aufbau und Funktion des weißen Fettgewebes

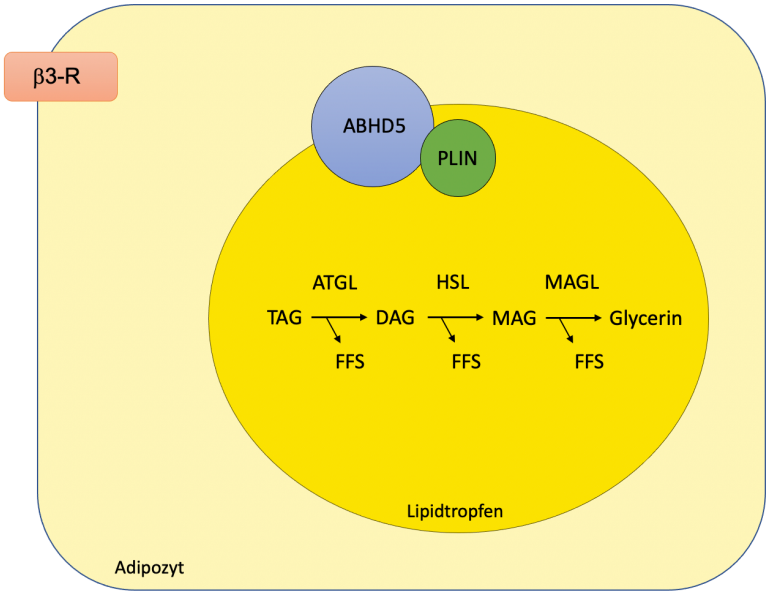
Das WAT unterteilt sich grob in subkutane und viszerale Depots. Während das subkutane WAT als Schutz vor Kälte fungiert, ist das viszerale WAT um innere Organe lokalisiert und erfüllt die Funktion als mechanisches Füll- und Stützgewebe[6]. Die Hauptaufgabe des WAT liegt in der Energiespeicherung und -bereitstellung. Weiße Adipozyten speichern Energie als Triacylglyceride (TAGs) in einem großen Lipidtropfen und verleihen dem WAT so seine typisch univakuoläre Morphologie[7]. In Zeiten eines erhöhten Energiebedarfs bzw. -verbrauchs, wie im Rahmen einer Nahrungskarenz oder Kälteexposition, werden die im Lipidtropfen gespeicherten TAGs infolge einer hydrolytischen Spaltung in unveresterte (freie) Fettsäuren und Glycerin mobilisiert und dem Organismus zur Energiegewinnung bereitgestellt[8-11]. Drei wesentliche Enzyme sind an dieser sogenannten Lipolyse beteiligt: Die Adipozyten-Triglyceridlipase (ATGL), das Hauptenzym der Lipolyse, spaltet das TAG in Diacylglycerin (DAG) und eine freie Fettsäure[12, 13]. Die Hormonsensitive Lipase (HSL) spaltet anschließend das DAG in Monoacylglycerin (MAG) und eine freie Fettsäure. Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität kann die HSL zusätzlich die Spaltung von TAG und MAG katalysieren, ist dennoch primär für die DAG-Spaltung verantwortlich[13, 14]. Zuletzt führt die Monoacylglycerinlipase (MAGL) die Spaltung von MAG in Glycerin und eine freie Fettsäure aus[15, 16]. Für eine intakte Lipolyse sind insbesondere die Aktivität der ATGL und HSL entscheidend[17].

Zudem wird zwischen einer basalen und einer simulierten Lipolyse unterschieden. Unter basalen Stoffwechselbedingungen befindet sich neben der ATGL ein Komplex aus dem Strukturprotein Perilipin und dem Co-Aktivator 1-Acylglycerol-3-phosphat-O-Acyltransferase (*1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase*, ABHD5) auf der Oberfläche des Lipidtropfens[18, 19]. Die ABHD5 kann als Co-Aktivator die hydrolytische Aktivität der ATGL steigern[13, 18, 19]. Im Komplex mit Perilipin wird die ABHD5 jedoch inaktiviert[18, 19]. Dies limitiert die hydrolytische Aktivität der ATGL unter basalen Stoffwechselbedingungen[18, 19].

In stimulierten Adipozyten, wie im Rahmen einer Kälteexposition, wird die Aktivität lipolytischer Enzyme und folglich die Kapazität der hydrolytischen Spaltung von TAGs durch eine Sympathikusaktivierung gesteigert[10, 11]. Der Sympathikus gilt bekanntlich als Hauptregulator der Lipolyse im WAT[20]. Über adrenerge Beta-3-Rezeptoren (β3-Rezeptoren) auf weißen Adipozyten vermittelt der aus sympathischen Nervenenden freigesetzte Neurotransmitter Noradrenalin eine Aktivierung der im Zytosol befindlichen Adenylatzyklase (AC), die wiederum die Synthese von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert. Die nun intrazellulär erhöhte cAMP-Konzentration stimuliert die Proteinkinase A (PKA). Im Rahmen der stimulierten Lipolyse

phosphoryliert die PKA das Strukturprotein Perilipin und die HSL. Perilipin wird folglich degradiert und dissoziiert von der ABHD5, die daraufhin die Aktivität der ATGL steigert[18, 19]. Zusätzlich beginnt die phosphorylierte HSL, die ATGL unterstützend, mit dem Abbau von gespeicherten TAGs[13, 21].

A



B

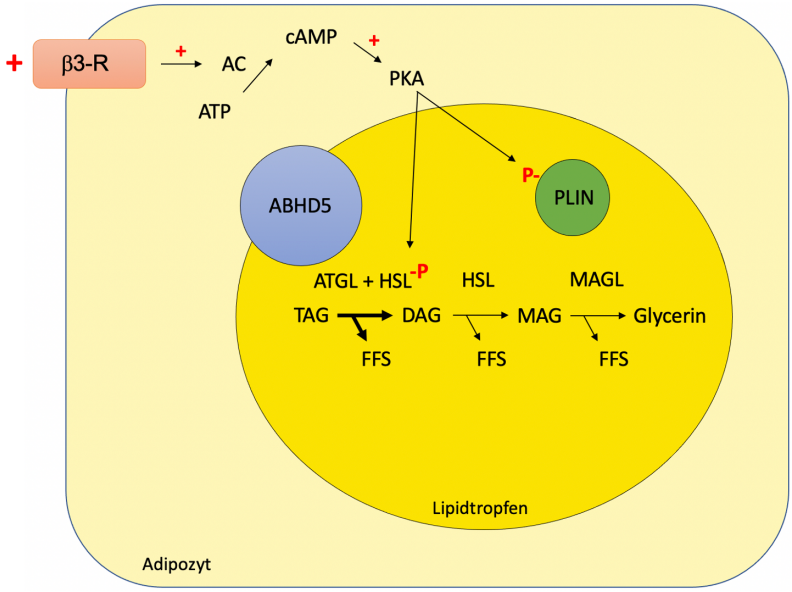


Abb. 1: Schematische Darstellung der basalen und stimulierten Lipolyse im weißen Fettgewebe

Modifizierte Darstellung der Lipolyse **A** unter basalen Stoffwechselbedingungen und **B** im stimulierten Adipozyten nach der Darstellung von Kersten S. aus dem Jahr 2023[8]. Für Details siehe Kapitel 1.2.1.1. Das rote „+“ sowie das rote „+“ mit Pfeil zeigen eine Aktivierung der entsprechend visierten Zielstruktur an. Die hervorgehobenen Pfeile zeigen einen verstärkt ablaufenden Prozess an. Das rote „P“ zeigt eine Phosphorylierung der entsprechend markierten Zielstruktur an. Abkürzungen: β3-R: adrenerger Beta-3-Rezeptor; ABHD5: *1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase*; PLIN: Perilipin; AC: Adenylatzyklase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A; ATGL: Adipozyten-Triglyceridlipase; HSL: Hormonsensitive Lipase; MAGL: Monoacylglycerinlipase; TAG: Triacylglycerin; DAG: Diacylglycerin; MAG: Monoacylglycerin; FFS: freie Fettsäure.

Die Lipolyse begleitend erfolgt eine Wiederauffüllung der Energiespeicher im WAT durch eine Reveresterung von freien Fettsäuren mit Glycerin-3-Phosphat zu TAG, die sogenannte Lipogenese. Fettsäuren werden entweder durch den Organismus selbst synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen und in Lipoproteinen als TAGs verpackt zum entsprechenden Zielort transportiert. Im Endothel von Blutgefäßen des WAT befindet sich die Lipoproteinlipase, welche TAGs aus Lipoproteinen hydrolysiert und eine Aufnahme hierbei freigesetzter Fettsäuren in den Adipozyten ermöglicht. Besonders in Zuständen überschüssiger Nahrungsenergie kommt die Lipogenese zum Einsatz[7, 22, 23]. Dabei können auch Nicht-Lipide wie Glukose für den Aufbau von TAGs verwendet werden[7]. Eine TAG-Synthese aus Nicht-Lipiden wird als *de novo* Lipogenese (DNL) bezeichnet. Nicht-Lipide wie Glukose werden nach Aufnahme in den Adipozyten zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) metabolisiert und über die Acetyl-CoA-Carboxylase (*acetyl-coenzyme a-carboxylase-alpha 1,* Acaca) zu Malonyl-Coenzym A (Malonyl-CoA) carboxyliert. Malonyl-CoA wird durch die Fettsäuresynthase (*fatty acid synthase 3,* Fasn) in Palmitinsäure umgewandelt, die erste Fettsäure, die im Rahmen der DNL entsteht. Ausgehend von Palmitinsäure erfolgt über weitere Reaktionen ,wie die Elongation und Desaturierung, eine Synthese langkettiger und komplexer Fettsäuren, die wie oben beschrieben, mit Glycerin-3-Phosphat zu TAG verestert werden.

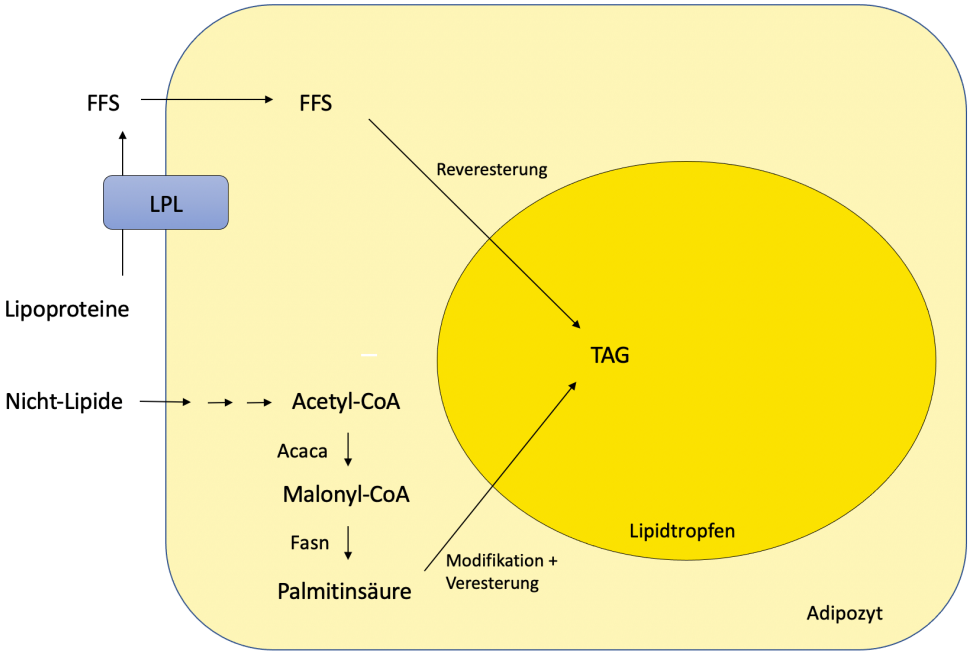


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lipogenese aus freien Fettsäuren und Nicht-Lipiden im weißen Fettgewebe

Darstellung der Lipogenese durch eine Reveresterung freier Fettsäuren, die aus zirkulierenden Lipoproteinen entstammen sowie durch den Einsatz von Nicht-Lipiden (*de novo* Lipogenese), welche über die Synthese von Palmitinsäure und eine weitere Modifikation und Veresterung zu Triacylglycerinen umgewandelt werden. Für Details siehe Kapitel 1.2.1.1. Abkürzungen: LPL: Lipoproteinlipase; FFS: freie Fettsäure; TAG: Triacylglycerin; Acetyl-CoA: Acetyl-Coenzym A; Acaca: *acetyl-coenzyme a-carboxylase-alpha 1*; Malonyl-CoA: Malonyl-Coenzym A; Fasn: *fatty acid synthase 3*.

Die Funktion als Energiespeicher ergänzend, wird das WAT als eigenständiges endokrin aktives Organ angesehen. Die vom WAT synthetisierten und sezernierten Faktoren, wie Proteine, Lipide und Zytokine, werden zusammengenommen als Adipokine bezeichnet. Adipokine beeinflussen auf autokrine, parakrine sowie endokrine Weise insbesondere metabolische und immunologische Ereignisse[24, 25]. Zwei bekannte Vertreter sind die Adipokine Adiponektin und Leptin. Adiponektin ist vor allem mit einer Insulinsensibilisierung und Limitation inflammatorischer Prozesse im WAT assoziiert, sodass erhöhte Adiponektinspiegel einen protektiven Effekt hinsichtlich der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II ausüben[26]. In Ergänzung durch eine Begünstigung des Lipidprofils mit einer anti-atherosklerotischen Wirkung senkt Adiponektin das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen[27]. Leptin greift entscheidend in den Energieumsatz des Organismus ein, indem es das Hungergefühl und infolgedessen die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Leptin wirkt appetithemmend und korreliert positiv mit dem Ausmaß des WAT[28]. Darüber hinaus wirkt Leptin proinflammatorisch, indem es Entzündungszellen wie Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine anregt[29].

1.2.1.2 Morphologie und Funktion des weißen Fettgewebes bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen

Der Lipidstoffwechsel im WAT verleiht diesem eine beachtliche Plastizität und ermöglicht eine Anpassung des WAT als Energiespeicher an unterschiedlichste Bedingungen. Wie bereits erwähnt, machen TAGs nahezu die gesamte Zellmasse weißer Adipozyten aus, sodass Veränderungen im TAG-Gehalt die Adipozytengröße beeinflussen. Der Lipidstoffwechsel wiederum und somit auch die Plastizität des WAT werden von endogenen Faktoren, wie dem Ernährungszustand und exogenen Faktoren, wie der Umgebungstemperatur (Näheres siehe Kapitel 1.3.3) reguliert[7]. So geht eine Nahrungskarenz mit einer Größenabnahme weißer Adipozyten einher, die durch eine Mobilisierung von TAGs initiiert wird[7]. Überschüssige Nahrungsenergie hingegen führt zu einer Expansion des WAT, indem weiße Adipozyten als Folge der Lipogenese hypertrophieren[30, 31]. Ab einer bestimmten Adipozytengröße werden die Speicherkapazität und folglich die Expansion des WAT durch eine Proliferation weißer Adipozyten (Hyperplasie) erweitert[30, 31]. Bei metabolischen Störungen wie im Rahmen der Adipositas kommt es zu einer pathologisch-morphologischen Anpassung des WAT, dessen Krankheitswert insbesondere von einer Zunahme des viszeralen WAT ausgeht[31, 32]. Diese löst eine Kaskade inflammatorischer Prozesse sowie eine Veränderung des Serumspiegels zirkulierender, freier Fettsäuren aus, sodass die Entstehung einer Insulinresistenz und schließlich die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ II begünstigt werden[31-33]. Hiermit assoziiert ist das metabolische Syndrom, welches sich aus einem gestörten Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel sowie der Adipositas und arteriellen Hypertonie zusammensetzt und ein wesentliches Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt[34]. Im Kontext der oben genannten metabolischen Dysfunktion des WAT bei Adipositas verändert sich auch das Profil der durch das WAT sezernierten Adipokine. So ist vor allem bekannt, dass die Serumspiegel des Adiponektins sinken und die des Leptins steigen. Zudem wird der erhöhte Leptinspiegel bei Adipositas von einer Leptinresistenz begleitet[28, 35]. Wie sich auch der unter Kapitel 1.2.1.1 beschriebenen Funktion beider Adipokine herleiten lässt, geht deren Sekretionsprofil und Wirksamkeit bei Adipositas mit einer Aggravation der metabolischen Dysbalance einher[28, 35, 36].

1.2.2 Braunes Fettgewebe

1.2.2.1 Aufbau und Funktion des braunen Fettgewebes

Im Gegensatz zum WAT ist BAT ein wärmeproduzierendes Organ und für die Regulation der Körpertemperatur verantwortlich[37]. Diese Funktion ist insbesondere für kleine Säugetiere wie Nagetiere und menschliche Neugeborene relevant[38]. Aber auch im erwachsenen Menschen konnten zahlreiche Studien Ende der 2000er-Jahre das Vorhandensein von BAT mittels ^{18}F-Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie-Scans nachweisen[39-41]. Anders als in Nagetieren und menschlichen Neugeborenen, die ihr größtes BAT-Depot hauptsächlich interskapulär tragen, wurde das BAT in Erwachsenen primär supraclavikulär, zervikal und mediastinal lokalisiert[42]. Hierbei zeigte sich ergänzend eine inverse Korrelation der Prävalenz von BAT mit dem Alter, BMI und der Außentemperatur[43-46].

Prinzipiell sichern zwei wesentliche Mechanismen die Regulation der Körpertemperatur von Säugetieren bei Kälte: die initiale Wärmeerzeugung durch Muskelkontraktionen, das sogenannte Kältezittern und die mit einer gewissen Latenz einsetzende Wärmeerzeugung durch BAT, welche schlussendlich die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei chronischer Kälteexposition ohne ein Kältezittern ermöglicht[37]. Die Wärmeproduktion im BAT wird daher auch als zitterfreie Thermogenese bezeichnet. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die ausgeprägte sympathische Innervation des BAT als Hauptaktivator der zitterfreien Thermogenese[37, 47]. Bei Kälte wird der Neurotransmitter Noradrenalin aus sympathischen Nervenenden im BAT freigesetzt und bindet an adrenergen β3-Rezeptoren auf braunen Adipozyten[37, 47]. Infolge einer Stimulation des adrenergen β3-Rezeptors wird identisch zur Lipolyse die AC aktiviert und katalysiert die Umwandlung von ATP in cAMP. Das cAMP wiederrum aktiviert die PKA. Die PKA initiiert die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie das *cAMP responsive element binding protein* (CREB). Diese bewirken schließlich eine Expression von Proteinen, die mit der zitterfreien Thermogenese assoziiert sind, wie das *uncoupling protein-1* (UCP-1) und die bereits eingangs beschriebene Lipoproteinlipase. UCP-1 ist das entscheidende Molekül der zitterfreien Thermogenese, welches sich innerhalb der inneren Mitochondrienmembran befindet und die oxidative Phosphorylierung von der Synthese des universalen Energieträgers ATP entkoppelt, um letztendlich Wärme an Stelle von ATP zu erzeugen. Neben der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren leitet die PKA auch die Lipolyse gespeicherter TAGs in braunen Adipozyten ein (siehe Kapitel 1.2.1.1), wodurch unter anderem die typisch multilokuläre Morphologie des BAT zustande kommt[37]. Hierbei freigesetzte Fettsäuren übernehmen zwei wesentliche Funktionen. Zum einen werden sie im Mitochondrium über die Beta-Oxidation und den Citratzyklus zu wichtigen Substraten für die Erzeugung eines Protonengradienten in der Atmungskette abgebaut, zum anderen stimulieren sie UCP-1 zur

Aufrechterhaltung der zitterfreien Thermogenese. Demzufolge ist die Lipolyse im BAT ein wichtiger Teilaspekt für den Ablauf der zitterfreien Thermogenese. Aber auch über die Nahrung aufgenommene Lipide und Glukose sowie die in Fastenzeiten lipolytisch freigesetzten Fettsäuren aus dem WAT werden vom BAT aufgenommen und können als Substrat zur Aufrechterhaltung der zitterfreien Thermogenese beitragen, sodass die Lipolyse im BAT trotz ihrer Relevanz keine Voraussetzung für den Ablauf der zitterfreien Thermogenese darstellt[48-51].

Seit ein paar Jahren ist bekannt, dass BAT nicht nur Wärme im Rahmen der zitterfreien Thermogenese produziert, sondern auch Faktoren mit autokriner, parakriner und endokriner Wirkung sezerniert. Diese Faktoren werden als braune Adipokine oder Batokine bezeichnet. Bis dato wurde noch kein Batokin entdeckt, welches ausschließlich durch das BAT und nicht auch durch andere Organe oder Gewebe produziert und sezerniert wird[52, 53]. Mutmaßlich scheint das BAT ein fakultativ sekretorisches Organ zu sein und durch seine Sekretion von Batokinen zu einer Wirkverstärkung des entsprechenden Faktors beizutragen. Zudem basiert ein Nachweis der meisten Batokine auf Genexpressionsanalysen, seltener wird der sezernierte Faktor untersucht[52].
Die Abbildung 3 trägt einige Batokine und ihre Wirkorte zusammen. Im Folgenden wird exemplarisch ein gut erforschtes Batokin hinsichtlich seiner Effekte im Fettgewebe betrachtet, der *fibroblast growth factor 21* (FGF21).

FGF21 wird in erster Linie von der Leber freigesetzt und ist für seinen positiven Effekt auf den Energiestoffwechsel bekannt[54]. So geht die Gabe von FGF21 bei Fettleibigkeit mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität, einer Normalisierung des Blutzuckers, einer Reduktion des Körperfettanteils und -gewichts und insgesamt mit einer Steigerung des Energieverbrauchs einher[55, 56]. Auch die zitterfreie Thermogenese kann durch FGF21 gesteigert werden. Dies beschränkt sich nicht nur auf das BAT[57-59]. Sogar im WAT ist FGF21 über die Induktion eines *Brownings* (Näheres zum *Browning* siehe Kapitel 1.2.2.2) mit einer Steigerung der zitterfreien Thermogenese assoziiert[59]. Die Überschneidung der metabolischen Effekte von FGF21 und der zitterfreien Thermogenese (Näheres siehe Kapitel 1.2.2.3) ließ vermuten, dass die Effekte von FGF21 auf den Energiestoffwechsel durch die von FGF21 stimulierte zitterfreie Thermogenese bedingt sein könnten[54]. Diesbezüglich besteht noch Unklarheit. Auch die Wirkung von FGF21 auf die Lipolyse im WAT ist uneindeutig. Hier konnten sowohl hemmende[60, 61] als auch aktivierende Effekte[62] beobachtet werden.

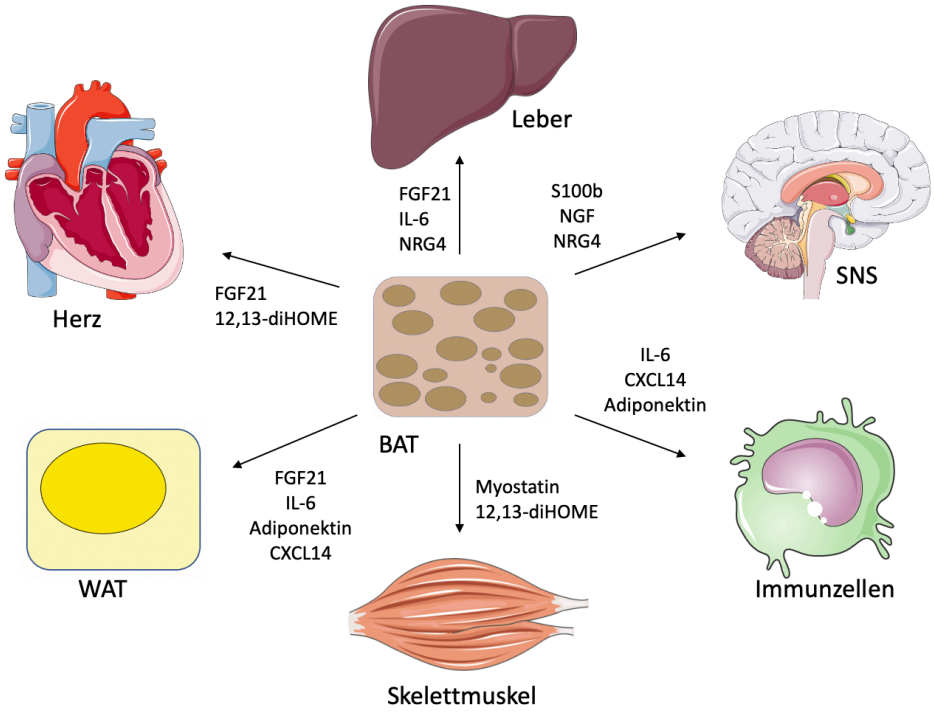


Abb. 3: Batokine und ihre Wirkorte

Die Abbildung zeigt exemplarisch einige Batokine mit entsprechendem Wirkort und basiert auf bereits publizierten Abbildungen sowie Beschreibungen zu sezernierten Batokinen durch braunes Fettgewebe[52, 53]. Die Abbildung beinhaltet Elemente von *Servier Medical Art* (lizenziert unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0). https://smart.servier.com*). Abkürzungen: BAT: *brown adipose tissue*; WAT: *white adipose tissue*; SNS: *sympathetic nervous system*; NRG4: *neuregulin 4;* IL-6: *interleukin-6*; FGF21: *fibroblast growth factor 21;* NGF: *nerve growth factor*; S100b: *protein S100b*; CXCL14: *CXC motif chemokine ligand 14*; 12,13-diHOME: *12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid*.

1.2.2.2 Browning

Seit längerem ist bekannt, dass weiße Adipozyten unter entsprechenden Bedingungen braun-ähnliche Merkmale annehmen können. Die Entstehung multilokulärer, UCP-1 exprimierender, sogenannter beiger Adipozyten im WAT wird als *Browning* bezeichnet[6, 63-65]. Sowohl im subkutanen als auch im viszeralen WAT ist ein *Browning* möglich[66, 67]. Im subkutanen WAT zeigt sich dieses deutlich stärker ausgeprägt[66, 67]. Die genaue Herkunft der beigen Adipozyten bleibt bis dato unklar. Zum einen besteht die Theorie, dass beige Adipozyten aus weißen Adipozyten entstehen, indem sie eine Transdifferenzierung durchlaufen[68, 69]. Zum anderen konnte eine *de-novo*-Differenzierung aus Vorläuferzellen beobachtet werden[70, 71].

Wie die Aktivierung brauner Adipozyten, wird die Entstehung beiger Adipozyten primär über das SNS reguliert[6, 72] und physiologisch im Rahmen einer Abkühlung der Umgebungstemperatur über adrenerge β3-Rezeptoren im WAT induziert[73-75]. Beige Adipozyten exprimieren hierbei weniger UCP-1 als braune Adipozyten[76]. Dennoch sind

beige Adipozyten thermogen funktionsfähig[77] und können einem Wärmeverlust bei eingeschränkter zitterfreier Thermogenese im BAT entgegenwirken[72, 78, 79]. Wird der Stimulus für ein *Browning* aufgehoben, bildet sich der braun-ähnliche Phänotyp beiger Adipozyten in einen weißen Phänotyp zurück[65, 80]. Dieser Vorgang wird als *Whitening* bezeichnet[65]. Ein *Whitening* wiederrum führt zu einer Veränderung auf epigenetischer Ebene, die eine stärkere Induktion thermogenetischer Merkmale bei erneutem Auslösen eines *Brownings* bewirkt[80]. Ein *Browning* stellt demzufolge ein reversibles Ereignis dar.
Die metabolische Relevanz eines *Brownings* ist noch unzureichend erforscht. Bekannt ist jedoch, dass ein *Browning* bei hochkalorischer Ernährung mit einem reduzierten Blutzucker und einer Steigerung der Insulinsensitivität sowie des Energieverbrauchs einhergeht[81]. Ebenso ist ein *Browning* mit einer Resistenz gegen ernährungsbedingte Fettleibigkeit assoziiert[78, 81]. Demzufolge wird ein therapeutischer Nutzen beiger Adipozyten in der Behandlung von Übergewicht diskutiert, ähnlich wie in Bezug auf das BAT[82] (Näheres siehe Kapitel 1.2.2.3).

1.2.2.3 Das braune Fettgewebe als therapeutische Zielstruktur metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen

BAT hat in den letzten Jahren großes Interesse als therapeutische Zielstruktur für die Behandlung von Übergewicht und -assoziierten Folgeerkrankungen erfahren. Übergewicht gehört seit langer Zeit zu den häufigsten Zivilisationskrankheiten. Weltweit hat sich die Prävalenz seit 1990 bei Erwachsenen mehr als verdoppelt und bei Jugendlichen nahezu vervierfacht[83]. Übergewicht begünstigt die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen (Schlaganfall, KHK, Myokardinfarkt). Demzufolge reduziert eine Prävention von Übergewicht auch das Risiko für die Entstehung dieser Folgeerkrankungen. Hierbei soll BAT als therapeutische Maßnahme zum Einsatz kommen, indem seine Aktivierung den Energieverbrauch durch die Metabolisierung großer Mengen an freien Fettsäuren und Glukose erhöht und einer Speicherung dieser Energie im WAT entgegenwirkt[51, 84]. So haben Studien an Mäusen gezeigt, dass eine Transplantation von BAT vor einer ernährungsbedingten Fettleibigkeit schützt und bei bestehender ernährungsbedingter sowie genetisch induzierter Fettleibigkeit zu einer Reduktion des Körperfettanteils und -gewichts führt[85, 86]. Auch wird eine verbesserte Insulinsensitivität und Glukosetoleranz in BAT-transplantierten Mäusen beschrieben[87]. Eine genetische BAT-Ablation hingegen geht mit Übergewicht, einer Hyperinsulinämie und Hyperglykämie einher[88]. Tatsächlich konnten vergleichbare Resultate bei gesunden, erwachsenen Menschen mit BAT beobachtet werden. Im Gegensatz zu Probanden ohne BAT war das Vorhandensein von BAT mit einer verstärkten Metabolisierung freier Fettsäuren und

Glukose[89, 90], einem insgesamt erhöhten Energieverbrauch sowie reduzierten Körperfettanteil[89, 91-93] und einer verbesserten Insulinsensitivität assoziiert[94]. Dies steht in Einklang mit der nachweislich geringeren Prävalenz von Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Dyslipidämie bei Patienten mit BAT[95].

Die gesteigerte Aufnahme und Verwertung freier Fettsäuren durch das BAT und die assoziierte Reduktion von TAGs und Cholesterin im Blut wirken der Entstehung einer Lipidstoffwechselstörung und einer Lipidablagerung in arteriellen Gefäßwänden (Atherosklerose) entgegen[51, 96]. Solche Lipidablagerungen bzw. atherosklerotische Plaques in den Koronararterien führen bei einer Gefäßverengung zur KHK und in Folge eines Gefäßverschlusses zu einem akuten Myokardinfarkt. Ferner kann der anti-atherogene Effekt des BAT als kardioprotektiv und Prävention eines akuten Myokardinfarkts interpretiert werden (Näheres zur Rolle des BAT beim Myokardinfarkt siehe Kapitel 1.2.4). Thoonen R et al. konnten eine kardioprotektive Wirkung durch das BAT bestätigen[97]. Bei Katecholamin-induzierter Kardiomyopathie führte eine BAT-Transplantation in UCP-1-Knockout Mäusen zu einer geringeren Myokardschädigung, einem günstigeren linksventrikulären *Remodeling* und einem insgesamt gesteigerten Überleben[97]. Auch in seiner Funktion als endokrines Organ wurden Batokine mit kardioprotektiver Eigenschaft entdeckt. So konnten Ruan CC et al. eine Abnahme kardialer Umbauprozesse bei Hypertonie durch den vom BAT sezernierten Faktor FGF21 im Mausmodell demonstrieren[98]. Im Jahre 2021 konnte die Relevanz von BAT hinsichtlich seiner kardiovaskulären Protektion sogar im Menschen nachgewiesen werden[95]. Hierbei korrelierte das Vorhandensein von BAT mit einer geringeren Prävalenz von Hypertonie, KHK, zerebrovaskulären Erkrankungen und Herzinsuffizienz[95].

1.2.3 *Crosstalk* zwischen weißem und braunem Fettgewebe

Wie bereits mehrfach erwähnt, wirkt sich die thermogene Funktion des BAT auf den Metabolismus im WAT aus. Unter anderem liegt dem ein neuronaler Kommunikationsmechanismus zugrunde. So stehen BAT und WAT durch eine Überschneidung neuronaler Verknüpfungen im wechselseitigen Austausch von Informationen bezüglich ihrer Stoffwechsellage[99-103]. Die jeweilige Information bezüglich des metabolischen Status im Fettgewebe wird über sensorische Afferenzen an das zentrale Nervensystem und von dort aus über sympathische Efferenzen an das Zielgewebe weitergeleitet[103]. Über diese neuronale Verknüpfung wird die zitterfreie Thermogenese im BAT abhängig von der Energieverfügbarkeit im WAT reguliert[100, 103, 104]. Im WAT spiegeln lipolytisch anfallende Stoffwechselprodukte die Energieverfügbarkeit desselben wider und führen zu einer gesteigerten Aktivität der sensorischen Afferenzen des WAT[104]. In der Folge

werden sympathische Efferenzen des BAT stimuliert und das Ausmaß der zitterfreien Thermogenese an die im WAT zur Verfügung stehende Energie angepasst[100, 103, 104]. So wurden unter dem Einfluss von Kälte und einer gezielten Stimulation der Lipolyse im WAT eine niedrigere UCP-1-Expression und Temperatur im BAT nach sensorischer Denervation des WAT beobachtet[100, 104]. Neben der zitterfreien Thermogenese im BAT wird auch die Lipolyse im WAT abhängig von der thermogenen Aktivität im BAT über das genannte neuronale Netzwerk zwischen BAT und WAT reguliert[100, 103, 104]. Interessanterweise zeigt sich die neuronale Verknüpfung zur Regulation der Lipolyse im WAT stärker ausgeprägt als die neuronale Verknüpfung zur Regulation der zitterfreien Thermogenese im BAT[103].

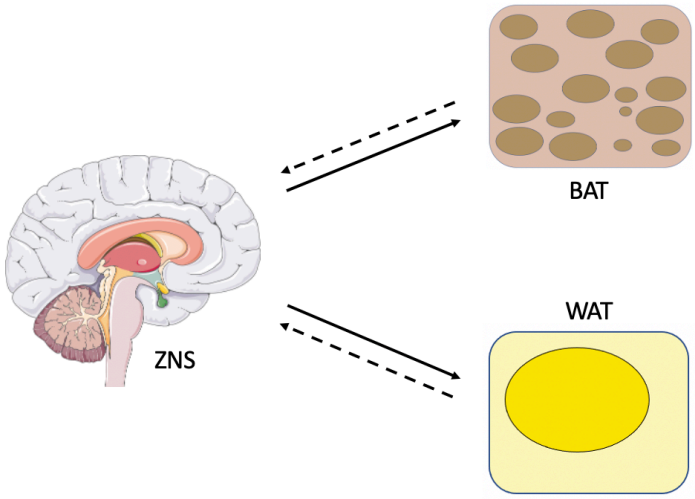


Abb. 4: Schematische Darstellung der neuronalen Verknüpfung zwischen braunem und weißem Fettgewebe

Die schematische Darstellung zeigt die neuronale Verschaltung zwischen BAT und WAT über das zentrale Nervensystem, angelehnt an bisherige Schemata nach Ryu V et al.[103]. Die gestrichelten Pfeile stellen sensorische Afferenzen und die durchgezogenen Pfeile sympathische Efferenzen dar. Die Abbildung beinhaltet Elemente von *Servier Medical Art* (lizenziert unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0). https://smart.servier.com*). Abkürzungen: BAT: *brown adipose tissue*; WAT: *white adipose tissue;* ZNS: Zentrales Nervensystem.

1.2.4 Die Rolle von weißem und braunem Fettgewebe beim Myokardinfarkt

Insgesamt ist die Funktion des WAT und BAT beim Myokardinfarkt unzureichend erforscht. Bekannt ist jedoch eine kurzzeitige, systemische Aktivierung des sympathischen Nervensystems (*sympathetic nervous system*, SNS) nach Myokardinfarkt[105, 106], welche eine temporär verstärkte Lipolyse im WAT bewirkt[107], die wiederrum das Ausmaß der Herzmuskelschädigung nach Myokardinfarkt steigert[108, 109]. So geht bereits die metabolische Anpassung des Myokards unter anaeroben Bedingungen im Rahmen eines Myokardinfarkts durch die Akkumulation schädlicher Stoffwechselnebenprodukte mit einer

für das Myokard erheblichen Lipotoxizität einher[110, 111]. Diese führt zu einem Untergang von Herzmuskelzellen und kann erst bei Reperfusion durch einen zirkulatorisch bedingten Abtransport der toxischen Stoffwechselnebenprodukte aufgehoben werden[110, 111]. Die Reperfusion verbessert jedoch auch den Transport der zuvor erwähnten sympathisch freigesetzten Fettsäuren aus dem WAT zum Myokard, was postischämisch in einer ineffizienten Energiegewinnung resultiert und die Herzmuskelschädigung aggraviert[112-114]. An dieser Stelle wurde die Metabolisierung freier Fettsäuren durch BAT als Möglichkeit einer Abschwächung der beim Myokardinfarkt vorherrschenden Lipotoxizität diskutiert. So ist bekannt, dass BAT temporär zu einem frühen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt durch die begleitende Sympathikusaktivierung aktiviert wird[97, 115]. Dies steigert die Metabolisierung lipolytisch freigesetzter Fettsäuren aus dem WAT durch das aktivierte BAT, reduziert den Transport dieser zum Myokard und schwächt auf diese Weise die für das Myokard bestehende Lipotoxizität beim Myokardinfarkt ab[116]. Da die Inhibition der Lipolyse im peripheren Fettgewebe das Ausmaß der Herzmuskelschädigung nach Myokardinfarkt nachweislich senkt[117], wird unter der Reduktion zirkulierender Fettsäuren bei Aktivierung des BAT nach Myokardinfarkt ein vergleichbarer Effekt angenommen. Demzufolge kommt dem BAT eine besondere Bedeutung als therapeutische Zielstruktur in der Therapie des Reperfusionschadens nach Myokardinfarkt zu. Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe können eine kardioprotektive Wirkung des BAT im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts tatsächlich belegen: So zeigten Mäuse mit chirurgischer BAT-Ablation eine verstärkte kardiale Inflammation, größere Infarktnarbe und schlechtere Herzfunktion nach myokardialer Ischämie/Reperfusion (I/R)[115]. Ausgegangen wurde von einer akuten Stimulation des BAT bei massiver Sympathikusaktivierung nach Myokardinfarkt[105, 106]. Diese akute Stimulation des BAT nahm nachfolgend einen positiven Einfluss auf den kardialen Inflammations- und Reparationsprozess nach akutem Myokardinfarkt und begünstigte die funktionelle Erholung des Myokards. Ob eine Reduktion zirkulierender Fettsäuren bei Aktivierung des BAT, eine Inhibition der Lipolyse im WAT oder auch eine Interaktion zwischen dem BAT und WAT nach Myokardinfarkt zugrunde liegen und an zuvor genanntem Ergebnis teil haben, ist unklar und bedarf zusätzlicher Forschung zur weiteren Abklärung.

1.3 Die Haltungstemperatur in Tierversuchen – Standardisierte Haltungstemperatur vs. Thermoneutralität

Für eine Standardisierung der Tierhaltung in Forschungseinrichtungen werden Richtlinien des *National Research Council* international zur Verfügung gestellt[118]. Die Richtlinien enthalten unter anderem Vorgaben für die Haltungstemperatur von Labormäusen. Diese soll zwischen 20 und 26 °C liegen[118]. Die meisten Studien geben eine Haltungstemperatur von 20-22°C an. Es gilt zu berücksichtigen, dass sich die standardisierte Haltungstemperatur nach einer für den forschenden Menschen komfortablen Umgebungstemperatur richtet[119]. Eine Umgebung von 20-22°C liegt für Labormäuse weit außerhalb des Wohlfühlbereichs bzw. unterhalb der für sie thermoneutralen Zone (TNZ)[118, 120]. Der Begriff „thermoneutrale Zone, TNZ" oder auch „Thermoneutralität", bezeichnet einen Bereich der Umgebungstemperatur, bei der die Körpertemperatur unter basaler Stoffwechselrate, das bedeutet ohne metabolische Wärmeproduktion oder Evaporation, reguliert werden kann[118, 121, 122]. Die Richtlinien des *National Research Council* geben für Labormäuse eine TNZ von 26 bis 34°C an[118]. Die Wahl der optimalen Temperatur innerhalb dieser TNZ richtet sich wiederrum nach dem Maus-Stamm, dem Energieverbrauch, der Anzahl der Versuchstiere pro Haltungsfläche, der Menge an Nistmaterial und der Tageszeit[120, 122-126]. So variieren die Angaben zu einer optimalen thermoneutralen Haltungstemperatur in der Literatur. Die meisten Studien, die eine thermoneutrale Haltung berücksichtigen, geben eine Temperatur von 30°C an. Die optimale, für eine Labormaus komfortable Umgebungstemperatur weicht demzufolge deutlich von der standardisierten Haltungstemperatur in Forschungseinrichtungen ab[127].

1.3.1 Einfluss der Haltungstemperatur auf den Stoffwechsel

Die Unterbringung bei einer Temperatur unterhalb der TNZ stresst den Organismus. Hierbei wird zwischen akutem Stress, der für wenige Minuten, und chronischem Stress, der bis zu mehrere Wochen anhalten kann, unterschieden. Die Reaktion des gestressten Organismus liegt unabhängig von der Stressdauer und -ursache in einer Freisetzung von Noradrenalin durch das SNS[128]. Noradrenalin kann potenziell jede Zelle mit Adrenozeptoren und somit zahlreiche physiologische Prozesse beeinflussen. Die Unterbringung einer Labormaus bei standardisierter Haltungstemperatur führt also infolge der Kältebelastung zu einer Freisetzung von Noradrenalin, welches das BAT über adrenerge β3-Rezeptoren aktiviert, um die Labormaus vor einer Auskühlung zu schützen[37]. Die Aktivierung des BAT wiederum geht mit einer Steigerung des Stoffwechsels einher[51, 84]. Somit ist die Haltungstemperatur in Forschungseinrichtungen eine wichtige Variable, die den Stoffwechsel der Versuchstiere

beeinflusst und auch Studien zum Verständnis und zur Behandlung metabolischer Erkrankungen manipulieren kann[127, 129-133 134]. Der Stoffwechsel setzt sich allgemein aus der basalen Stoffwechselrate (Grundumsatz) und dem darüber hinausgehenden Energieverbrauch zusammen. In dem *Glossary of Terms for Thermal Physiology* wird der Grundumsatz als Energieverbrauch eines nüchternen, ruhenden und wachen Organismus bei Thermoneutralität bezeichnet, bei dem keine zusätzliche Leistung zur Regulation der Körpertemperatur erbracht werden muss, wie z.B. durch die zitterfreie Thermogenese im BAT bei standardisierter Haltungstemperatur[121]. Bei standardisierter Haltungstemperatur ist daher nicht der Grundumsatz erhöht, sondern der darüber hinausgehende Energieverbrauch zur Regulation der Körpertemperatur[127].

1.3.2 Vergleichbarer Stoffwechsel von Maus und Mensch bei Thermoneutralität

Im Vergleich zu einer Labormaus lebt der Mensch mithilfe von Kleidung, Wohnungsbeheizung und weiterer Hilfsmittel stets bei Thermoneutralität[135, 136]. So sind der Stoffwechsel einer Maus unter standardisierter Haltungstemperatur und der Stoffwechsel eines Menschen nicht vergleichbar[120]. Nur bei Thermoneutralität ähneln sich der murine und menschliche Stoffwechsel[120]. Hierbei wird das Verhältnis des durchschnittlichen Energieverbrauchs zur basalen Stoffwechselrate bzw. zum Ruhestoffwechsel innerhalb eines Tages betrachtet[120, 126]. Der Ruhestoffwechsel entspricht der basalen Stoffwechselrate, jedoch unabhängig vom Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme[121]. Bei Thermoneutralität misst der tägliche, durchschnittliche Energiebedarf einer Maus und eines Menschen in etwa das 1,7-1,8-fache der basalen Stoffwechselrate bzw. des Ruhestoffwechsels[120, 126]. Unter standardisierter Haltungstemperatur zeigen Mäuse einen fast doppelt so hohen Energieverbrauch[120]. Für einen derart gesteigerten Energieverbrauch müsste der Mensch unbekleidet bei einer Umgebungstemperatur von 5°C leben[120, 137]. Erst dann wären der Stoffwechsel einer Maus unter standardisierter Haltungstemperatur und der Stoffwechsel eines Menschen vergleichbar.

Die Haltungstemperatur in Forschungseinrichtungen hat zusammenfassend einen entscheidenden Einfluss auf die Physiologie der Versuchstiere und ferner auch auf die Translation der Ergebnisse in den Menschen. Bei Thermoneutralität befinden sich Maus und Mensch beide in einer für sie komfortablen Umgebungstemperatur. Hierunter ist der murine und menschliche Stoffwechsel am ehesten vergleichbar, sodass eine Translation von wissenschaftlichen Erkenntnissen aus Stoffwechselstudien nur unter thermoneutralen Bedingungen in den Menschen erfolgen sollte[119, 120, 126]. Auch wenn die bisherigen Daten

aus Studien an Tieren unter standardisierter Haltungstemperatur für eine Translation in den Menschen ungeeignet sind, ist eine Verwendung dieser möglich, um z.B. die Auswirkungen von Stress auf physiologische und pathologische Prozesse zu verstehen[129].

1.3.3 Einfluss der Haltungstemperatur auf braunes und weißes Fettgewebe

Auch die Morphologie, die Molekulargenetik und die Funktion des Fettgewebes werden von der Haltungstemperatur der Versuchstiere beeinflusst. Je nach Art und Lokalisation des Fettgewebes unterscheidet sich das Ausmaß des Temperatureinflusses. Die folgenden Inhalte beziehen sich auf das interskapuläre BAT und auf das subkutane, inguinale WAT von kleinen Nagetieren.

Unter standardisierter Haltungstemperatur weisen braune Adipozyten einen multilokulären, UCP-1-positiven Phänotyp auf[138]. Diese morphologische und molekulargenetische Struktur des BAT verändert sich bei Thermoneutralität. Hier treten zwischen multilokulären, UCP-1-positiven Adipozyten unilokuläre, weiß-ähnliche Adipozyten in Erscheinung[138]. Ebenso ist die Expression von Genen der zitterfreien Thermogenese wie UCP-1 deutlich erniedrigt[138-140]. Diese Veränderungen sind auf eine verringerte sympathische Aktivierung des BAT bei Thermoneutralität zurückzuführen und spiegeln seine reduzierte thermogene Kapazität wider[139]. Dies wiederum steht in Einklang mit der Tatsache, dass eine Wärmeproduktion durch das BAT zur Regulation der Körpertemperatur unter thermoneutraler Haltungstemperatur der Versuchstiere nicht erforderlich ist[121].

Ähnlich wie im BAT bei Thermoneutralität ist im WAT bei stärkerer Kälteexposition (4°C) eine Komposition aus unilokulären Adipozyten und multilokulären, überwiegend UCP-1-positiven Adipozyten zu erkennen[138]. Demnach handelt es sich um ein *Browning* (siehe Kapitel 1.2.2.2). Bei standardisierter Haltungstemperatur zeigt sich ein *Browning* deutlich geringer ausgeprägt. Diesbezüglich sind im WAT lediglich vereinzelt multilokuläre, selten UCP-1-positive Adipozyten nachweisbar[138]. Anders als im BAT wird im WAT bei Thermoneutralität kein UCP-1 exprimiert[138].

Zudem hat die Haltungstemperatur von Versuchstieren einen entscheidenden Einfluss auf den Lipidstoffwechsel und somit auf die Morphologie des WAT. So wird eine Steigerung der Lipolyse im WAT bei subthermoneutralen Temperaturen beobachtet. Hierbei resultiert die Mobilisierung von freien Fettsäuren in einer Größenabnahme weißer Adipozyten[66, 139]. Umgekehrt führt die Unterdrückung der lipolytischen Aktivität im WAT bei Thermoneutralität zu einer Hypertrophie weißer Adipozyten und infolgedessen zu einer Expansion des WAT[138, 139].

1.3.4 Einfluss der Haltungstemperatur auf die sekretorische Funktion des braunen Fettgewebes

Wie die thermogene Funktion bleibt auch die sekretorische Funktion des BAT von der Umgebungstemperatur nicht unbeeinflusst. Eine relevante sekretorische Funktion wird dem BAT im thermogen aktiven Zustand zugeschrieben[52, 141]. Es gilt zu berücksichtigen, dass nur wenig zur sekretorischen Funktion des BAT im unstimulierten Zustand bekannt ist. Zur sekretorischen Funktion des BAT bei thermoneutraler Haltung von Versuchstieren liegen bis dato keine expliziten Untersuchungen vor. Angesichts der reduzierten thermogenen Aktivität des BAT bei Thermoneutralität (siehe Kapitel 1.3.3) wird auch eine Abnahme der Sekretion von Batokinen bei Thermoneutralität angenommen[52]. Die Wirkung einzelner Batokine bekräftigt diese Annahme. Beispielsweise ist FGF21 mit einer verstärkten zitterfreien Thermogenese im BAT und einem *Browning* assoziiert[57-59], zwei Phänomene im Fettgewebe, die bei Thermoneutralität physiologisch irrelevant sind (siehe Kapitel 1.3.3). Interessanterweise widerspricht das Batokin Adiponectin der Theorie zur Sekretion von Batokinen in Abhängigkeit von der Aktivität des BAT. So konnte eine verringerte Produktion von Adiponectin durch stimuliertes BAT festgestellt werden[141]. In Anbetracht seiner Wirkung, einer Unterdrückung der zitterfreien Thermogenese im BAT[142], ist eine verringerte Produktion von Adiponectin durch stimuliertes BAT plausibel. Die Datenlage zur sekretorischen Funktion des BAT in Abhängigkeit von seiner Aktivität und der Umgebungstemperatur der Versuchstiere ist nicht nur knapp, sondern auch wenig aufschlussreich.

1.3.5 Einfluss der Haltungstemperatur auf die Funktion des braunen Fettgewebes bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen

Wie zuvor beschrieben, ist die subthermoneutrale Haltung von Versuchstieren ein Auslöser für Stress (siehe Kapitel 1.3.1). Stress führt zu einer Freisetzung von Noradrenalin und beeinflusst auf diesem Wege den Metabolismus und das Immunsystem[129, 143]. Dies wiederrum hat Auswirkungen auf Tierversuche, die menschliche Erkrankungen nachbilden, bei denen der Metabolismus und das Immunsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenese einnehmen[129, 143]. Die Tabelle 1 stellt exemplarisch den Einfluss der Haltungstemperatur von Versuchstieren auf verschiedene Erkrankungen dar. Hierbei erweisen sich die Effekte von Kälte und Thermoneutralität grundsätzlich als gegensätzlich[129, 143]. Eine Ausnahme stellt der Verlauf infektiöser Erkrankungen dar[129, 143]. Vor dem Hintergrund, dass die murine und menschliche Physiologie bei Thermoneutralität am ehesten vergleichbar sind, sollte

auch die Modellierung menschlicher Erkrankungen bei thermoneutraler Haltung der Versuchstiere erfolgen, um eine Translation der Ergebnisse in den Menschen zu ermöglichen[129, 143].

Auch die Funktion des BAT bei Übergewicht wurde in Abhängigkeit von der Haltungstemperatur der Versuchstiere untersucht. Der positive Einfluss des BAT auf metabolische Prozesse scheint durch eine Haltung der Versuchstiere bei Thermoneutralität wegzufallen. Eine mögliche Erklärung liefert die reduzierte thermogene Aktivität des BAT bei Thermoneutralität, die wiederrum mit einem reduzierten Verbrauch des BAT an freien Fettsäuren und Glukose einhergeht[139]. Ausgehend von Standard-Futter und einer unveränderten Nahrungsaufnahme, resultiert dieser verringerte Energieumsatz in einer Zunahme des Körpergewichts, der Gewichte des subkutanen und epididymalen WAT sowie in einer Verschlechterung der Insulinsensitivität und Glukosetoleranz[139]. Im Rahmen einer fettreichen Diät wurde eine Zunahme des Körpergewichts und des WAT auch bei reduzierter Nahrungsaufnahme beobachtet[139]. Es gilt zu berücksichtigen, dass der Temperatureffekt auf das Körper- und Fettgewicht im Vergleich zwischen standardisierter Haltungstemperatur und Thermoneutralität prinzipiell erst nach einer mehrwöchigen Akklimatisierung der Versuchstiere auftritt[139, 144, 145]. So konnten Pernes G et al. keine Veränderungen im Körper- und Fettgewicht nach einer 24-stündigen Akklimatisierung von Mäusen bei Thermoneutralität an die standardisierte Haltungstemperatur feststellen[146].

Erkrankungen	Standardisierte Haltungstemperatur	Thermoneutrale Haltungstemperatur
Asthma bronchiale	⇩	⇧
Metabolische Erkrankungen (Übergewicht, NAFLD)		
Atherosklerose	⇧	⇩
Morbus Alzheimer		
Krebs (Melanom, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, Fibroadenom)		
Infektionskrankheiten	⇧ ⇩	

Tabelle 1: Einfluss der Haltungstemperatur auf verschiedene Erkrankungen

Die Tabelle zeigt den Einfluss der standardisierten und thermoneutralen Haltungstemperatur von Versuchstieren auf verschiedene Erkrankungen nach James CM et al. 2023[129] und Vialard F, Olivier M. 2020[143]. Hierbei deuten Pfeile, die nach oben zeigen, auf einen aggravierenden und Pfeile, die nach unten zeigen, auf einen lindernden Effekt der Haltungstemperatur auf entsprechende Erkrankungen hin. Abkürzungen: NAFLD: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung.

1.3.6 Braunes Fettgewebe von Maus und Mensch ähneln sich bei Thermoneutralität

Ähnlich wie das murine WAT bei stärkerer Kälteexposition, setzt sich das BAT eines Erwachsenen aus unilokulären Adipozyten und multilokulären, UCP-1-positiven Adipozyten zusammen[41, 138, 147]. Bevor de Jong et al. das BAT von Mäusen unter für den Menschen relevante Bedingungen wie bei Thermoneutralität analysierten, wurde das murine WAT bei stärkerer Kälteexposition (4°C) bzw. ein *Browning* als Äquivalent für das humane BAT betrachtet[64, 148]. Mit der Analyse von de Jong et al. wurde jedoch eine stärkere Ähnlichkeit zwischen humanem BAT und BAT von Mäusen bei Thermoneutralität festgestellt[138]. Besonders die Fähigkeit des murinen BAT bei Thermoneutralität, seine unter Kälte bestehende thermogene Kapazität infolge einer Stimulation wiederzuerlangen, ist vielversprechend im Hinblick auf die Rekrutierung der energieverbrauchenden Funktion des BAT beim Erwachsenen für therapeutische Zwecke[138]. Die Erkenntnisse von de Jong et al. falsifizieren nicht die Ähnlichkeit zwischen humanem BAT und murinem WAT bei stärkerer Kälteexposition (4°C), setzen jedoch das murine BAT bei Thermoneutralität für eine Translation seiner Funktion in den Menschen an erste Stelle[138].

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interorgankommunikation zwischen BAT und WAT nach einem Myokardinfarkt unter Bedingungen zu charakterisieren, die der tatsächlichen Situation im Menschen nahekommen. Zumeist wird Forschung an Versuchstieren bei standardisierter Haltungstemperatur, nicht jedoch bei Thermoneutralität der Versuchstiere durchgeführt, was eine Translation der Ergebnisse auf den Menschen massiv einschränkt. Aus diesem Grund wurde in der zugrundeliegenden Arbeit der Einfluss einer chirurgischen BAT-Ablation auf die Adipozytenmorphologie, die Expression des Proteins UCP-1 als *Browning* Marker und die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT nach Induktion eines akuten Myokardinfarkts ergänzend zur standardisierten Haltungstemperatur (21°C) auch bei Thermoneutralität der Versuchstiere (30°C) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Material

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysewaage	2001 MP2	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Analysewaage	Scout Pro Model: SPU123	OHAUS, Parsippany, New Jersey, USA
Deckgläschen	24 x 60 mm no.1	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Dissoziator	gentleMACS™ Dissociator 130-093-235	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Inkubationsbad	Typ 1004	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Kamera	AxioCam HRc	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	AxioImager.M2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom	HistoCore Multicut	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Misch- und Heizblock	MB-102	Bioer, Hangzhou, China
NanoDrop Spectrophotometer	ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Objektträger	SuperFrost®Plus Objektträger 03-0060/weiß	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Objektträger	SuperFrost®Plus Objektträger 03-0060/gelb	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI1210	Leica, Wetzlar, Deutschland
Reaktionsgefäß	Safe-Lock farblos 2,0 ml 0030 120.094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß	SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml 72.706	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß	gentleMACS™ M Tubes 130-093-236	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Schüttelmaschine	Vortex Genius 3	Ika, Staufen, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	4376600	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Thermozykler	Mastercycler personal 5332	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Verschlussfolie	PARAFILM® M PM996	Bemis Company, Neenah, Wisconsin, USA
Wärmeschrank	Typ B 5050	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Arbeitsmittel

2.2.1 Substanzen

Tabelle 3: Verwendete Substanzen

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
BSA	1.12018.0100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Chloroform	Y015.2	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Chromogen	DAB530	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
FCS		Gibco, Life Technologies, Paisley, UK
KCl	P017.1 (M = 74,56 g/mol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH2PO4	1048731000 (M = 136,09 g/mol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	9265.1 (M = 58,44 g/mol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaH2PO4	1063461000 (M = 137,99 g/mol)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	11733038	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	205313 (gebrauchsfertig)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies Wasser aus Milli-Q® EQ 7000 Wasseraufbereitungssystem	ZEQ7000T0	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Roticlear®	A538.5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount Eindeckmedium	HP68.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma®base (Tris)	T1503	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Essigsäure 100%	3738.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 %		Zentralapotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland
Isopropanol 99,5 %	I9516	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Lösungen (gebrauchsfertig)

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Hämalaun-Lösung	1.09249.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIzol	15596018	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ethanol 96 %	PZN 11193427	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol 70 %	85825.360	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
H2O2 30 %	CP26.5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCL 10 %	0710.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Puffer (gebrauchsfertig)

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
DAB-Substratpuffer	DAB530	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
HIER Citrate Buffer pH 6.0	ZUC028-500	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Lösungen

Lösung	Ansatz
Blockierlösung	10 % 10x TBS, 10 % FCS, 1 % BSA in Aqua dest.
DAB-Lösung	DAB-Chromogen 1:20 mit DAB-Substrat mischen
Ethanol 75 %	Ethanol 100 % 3:4 mit Aqua dest. verdünnen
H2O2-Blockierlösung 3 %	H2O2 30 % 1:10 mit 1x PBS verdünnen
HCL 1 %	HCL 10 % 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
Essigsäure 0,5 %	5 ml 100 % Essigsäure in 995 ml Aqua dest.

Tabelle 7: Verwendete Puffer

Puffer	Ansatz
Citrat-Puffer	HIER Citrate Buffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
10x TB	60,57 g Tris ad. 1000 ml Aqua dest., für 1x TB 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
10x TBS	24,2 g Tris, 80,0 g NaCl ad. 1000 ml Aqua dest.
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH2PO4, 8 mM NaH2PO4 in Aqua dest.

2.2.3 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Ziel-struktur	Eingesetzte Konzentration	Katalognummer	Hersteller
Primärantikörper rabbit anti-UCP-1	UCP-1	1:200	ab10983	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper goat anti-rabbit IgG-HRP	rabbit IgG	1:200	sc2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

2.3 Experimentelle Tierversuche

Die Genehmigung der zugrundeliegenden experimentellen Tierversuche wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, mit den Aktenzeichen 81-02.04.2017.A458 und 81-02.04.2018.A079 erteilt. Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf gehalten.

Die Durchführung aller in vivo Versuche im Mausmodell, die Tötung, Proben- und Organentnahme, sowie die Aufbereitung dieser, erfolgten durch Mitarbeiter*innen des Instituts für Translationale Pharmakologie. Die histologische und molekularbiologische Aufarbeitung von Organen wurde nach ausführlicher Einarbeitung selbstständig durchgeführt.

2.4 In vivo Experimente im Mausmodell

2.4.1 Verwendete Tiere und experimentelles Schema

Für die zugrundeliegende Arbeit wurden männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse mit einem anfänglichen Körpergewicht von 24-29 g eingesetzt (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich). Alle Versuche wurden gemäß den Richtlinien für die Verwendung von Versuchstieren nach dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Jedes Tier wurde mit freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser und bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Für den gesamten Versuchszeitraum bis zur finalen Probenentnahme wurden die Tiere der 21°C-Versuchsgruppe bei standardisierter Haltungstemperatur von 21°C und die Tiere der 30°C-Versuchsgruppe in einem speziellen auf 30°C-temperierten Klimaschrank (Luftfeuchtigkeit 45-55%) gehalten.
Nach einer drei-wöchigen Akklimatisierung der Tiere bei 21°C bzw. 30°C erfolgten eine chirurgische Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation (Kontrolle) des interskapulären BAT und die Induktion einer I/R zur Inszenierung eines akuten Myokardinfarkts. Die Zuteilung der Tiere zur BAT-Ablations- oder Kontrollgruppe erfolgte randomisiert. Drei Wochen nach I/R erfolgte die Tötung der Tiere. Nach Eintritt des Todes erfolgten die Organentnahme des subkutanen WAT, die Ermittlung des postmortalen Körpergewichts sowie des Gewichts des subkutanen WAT von Tieren bei 21°C und 30°C durch Frau Annika Zimmermann, Frau Rachel Nega und Herrn Dr. rer. nat. Arne Beran.

Schlussendlich wurde der Einfluss einer chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur (21°C) und vergleichend bei thermoneutraler Haltungstemperatur (30°C) untersucht.
Im Nachfolgenden wurden Tiere bei standardisierter Haltungstemperatur als 21°C-Tiere und Tiere bei Thermoneutralität als 30°C-Tiere bezeichnet.

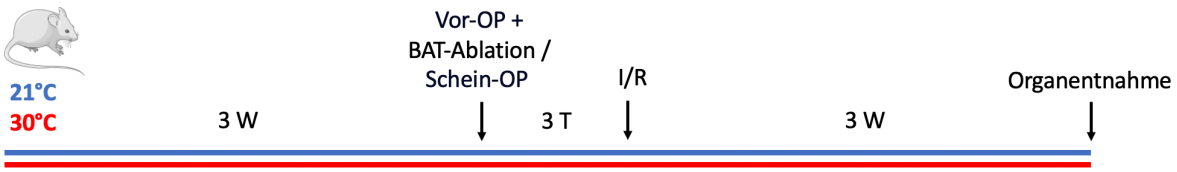


Abb. 5: Versuchsaufbau

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse mit einem anfänglichen Körpergewicht von 24-29 g wurden für den gesamten Versuchszeitraum bei 21°C oder 30°C mit freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser und bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Nach einer dreiwöchigen Akklimatisierung der Tiere bei 21°C oder 30°C erfolgten eine Vor-Operation für die Induktion einer myokardialen Ischämie/Reperfusion (I/R) zur Inszenierung eines akuten Myokardinfarkts sowie eine chirurgische Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des interskapulären BAT. Nach weiteren drei Tagen erfolgte die I/R. Drei Wochen nach I/R wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Für Details siehe Kapitel 2.4. Die Abbildung beinhaltet Elemente von *Servier Medical Art* (lizenziert unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0). https://smart.servier.com*). Abkürzungen: W: Wochen; T: Tage; OP: Operation; BAT: *brown adipose tissue*; I/R: Ischämie/Reperfusion; °C: Grad Celsius.

2.4.2 Induktion einer myokardialen Ischämie und Reperfusion im geschlossenen Thoraxmodell / *„Closed-Chest Modell“*

In dieser Arbeit richtet sich die Induktion des akuten Myokardinfarkts nach dem etablierten Modell der I/R bei geschlossenem Thorax[149-151]. Durch das sogenannte *„Closed-Chest Modell“* werden die Invasivität des Eingriffs und die inflammatorische Reaktion im Rahmen der I/R reduziert, sodass die Homöostase und strukturelle sowie funktionelle Erholung des Myokards geringer beeinflusst werden[150, 151]. Dies ermöglicht eine realitätsnähere Nachstellung des akuten Myokardinfarkts.
Die Induktion der I/R erfolgte für alle Tiere in zwei Phasen operativer Interventionen und wurde von Frau Dr. rer. nat. Simone Gorressen und Herrn Dominik Semmler vorgenommen. Für die genaue Vorgehensweise sei auf vorherige Publikationen hingewiesen[149].
In der ersten Phase erfolgte in einer Vor-Operation das Anbringen einer Ligaturanlage proximal an die linke, vordere, absteigende Koronararterie (*left anterior descending,* LAD) des Myokards. Ebenso erfolgte eine chirurgische Ablation oder Schein-Operation des BAT (siehe Kapitel 2.4.3). Nach Beendigung der Vor-Operation schloss sich eine zwei-tägige Erholungsphase aller Tiere an. Anschließend erfolgte die Induktion der eigentlichen I/R bei geschlossenem Thorax durch eine Abbindung der LAD über die zuvor genannte Ligaturanlage. Die myokardiale Ischämie wurde für 45 Minuten aufrechterhalten. Nach 45

Minuten wurde eine Reperfusion des Myokards eingeleitet, indem die Abbindung der LAD wieder aufgehoben wurde.

2.4.3 Chirurgische Ablation des interskapulären braunen Fettgewebes

Die chirurgische Ablation oder Schein-Operation des BAT erfolgte kurz nach der Vor-Operation für eine LAD-Ligaturanlage und wurde durch Herrn Dr. rer. nat. Arne Beran durchgeführt[115]. In der BAT-Ablationsgruppe wurde den Tieren das interskapuläre BAT über eine kleine Inzision am Rücken entfernt. Die Kontrolltiere erhielten ebenso eine kleine Inzision am Rücken, jedoch ohne Entfernung des interskapulären BAT. Für die genaue Vorgehensweise sei auf das Protokoll von Herrn Dr. rer. nat. Arne Berans wissenschaftlicher Arbeit hingewiesen[115].

2.5 Körpergewicht und Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

Postmortem wurden das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen WAT mittels einer Analysenwaage bestimmt.
Die Daten wurden jeweils bei 21°C- und 30°C-Tieren für beide Versuchsgruppen in *GraphPad PRISM 9.1.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) eingetragen und graphisch gegenübergestellt. Ebenso wurde das Verhältnis zwischen dem subkutanen Fettgewicht und dem Körpergewicht ermittelt, jeweils für 21°C- und 30°C-Tiere graphisch dargestellt sowie zwischen 21°C- und 30°C-Tieren graphisch verglichen.

2.6 Subkutanes weißes Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren

Die folgenden Arbeitsmethoden mit dazugehöriger Auswertung erfolgten für 21°C- und 30°C-Tiere getrennt.

2.6.1 Gewebeschnitte

Subkutanes WAT wurde für die Anfertigung von Gewebeschnitten fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet.
Folgendes Schneideprotokoll wurde eingehalten:
Mit einem Mikrotom wurde der Paraffinblock bis zum Erhalt eines großflächig zusammenhängenden Gewebes angeschnitten. Anschließend wurden konsekutiv 20

Gewebeschnitte pro Paraffinblock mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt. Hierbei wurden 2 Gewebeschnitte auf einen Objektträger aufgezogen, sodass 10 Objektträger mit je 2 Gewebeschnitten pro Paraffinblock vorlagen.
Die Gewebeschnitte trockneten über Nacht bei Raumtemperatur und wurden am nächsten Tag für eine Stunde bei 60°C hitzefixiert. Die abgekühlten Gewebeschnitte wurden bei Raumtemperatur in Präparatekästen gelagert.

2.6.2 Immunhistochemische Färbung/UCP-1-Färbung

Von den 10 Objektträgern pro Paraffinblock wurden jeweils der erste und vorletzte Objektträger für die UCP-1-Färbung verwendet, um einen möglichst großen Abstand zwischen den einzelnen Gewebeschnitten zu haben und somit das Anschneiden gleicher Zellen zu umgehen. Alle ausgewählten Gewebeschnitte wurden zeitnah und mit den gleichen Färbelösungen gefärbt, um Unterschiede in der Färbungszeit und Konzentrationsschwankungen der eingesetzten Chemikalien zu vermeiden. Zudem wurde ein Objektträger mit BAT gefärbt, ein Gewebe, welches das Antigen UCP-1 exprimiert. Auf diesem Weg wurde vorab geprüft, ob sich UCP-1 durch die vorliegende Färbemethode detektieren lässt (Positivkontrolle).
Folgendes Färbeprotokoll wurde eingehalten:
Um das Paraffin von den Gewebeschnitten zu entfernen, wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 15 Minuten in Roticlear gegeben und anschließend für je 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die absteigende Alkoholreihe umfasste je einmal die Anwendung von Ethanol 100%, Ethanol 96% und Ethanol 70%. Im Anschluss an die Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte dreimal für je 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Um das Antigen UCP-1 für eine Bindung von Antikörpern zugänglich zu machen, erfolgte eine Hitze-induzierte Demaskierung von UCP-1. Hierbei wurden die Gewebeschnitte in ein Behältnis mit vorgewärmten Citratpuffer gestellt und für 20 Minuten in einem Dampfgarer gekocht. Nach 20-minütiger Abkühlung der Gewebeschnitte bei Raumtemperatur schloss sich ein zweimaliger Waschschritt mit 1x PBS für je 5 Minuten an. Damit der Primärantikörper nicht unspezifisch an weitere Antigene, sondern spezifisch an UCP-1 bindet, wurden die Gewebeschnitte für 60 Minuten mit einer Lösung aus 10 % 10x TBS/ 10 % FCS / 1 % BSA bei Raumtemperatur blockiert. Wie bereits unter Kapitel 2.6.1 beschrieben, lagen zwei Gewebeschnitte pro Objektträger vor. Hierbei sollte ein Gewebeschnitt als Positiv- und ein Gewebeschnitt als Negativkontrolle für die UCP-1-Färbung dienen. Im Anschluss an die Blockierung wurde der Primärantikörper *rabbit anti-UCP-1*, 1:200 mit 1 % BSA / 1x PBS verdünnt, auf alle Positivkontrollen pipettiert. Die Negativkontrollen wurden ausschließlich mit 1 % BSA / 1x PBS behandelt. Über Nacht

erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte dreimal je 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Um im subkutanen Fettgewebe befindliche endogene Peroxidasen, die unspezifisch das in späteren Färbeschritten eingesetzte DAB oxidieren würden zu inaktivieren, wurden alle Gewebeschnitte für 5 Minuten mit einer Lösung aus 3 % H_2O_2 bei Raumtemperatur blockiert. DAB konnte nun in späteren Färbeschritten spezifisch durch Meerrettichperoxidasen (HRP), mit denen der Sekundärantikörper markiert ist, oxidiert und zu einem unlöslichen Präzipitat brauner Farbe umgesetzt werden. Da der mit braunem Präzipitat behaftete Sekundärantikörper den Primärantikörper und der Primärantikörper wiederrum UCP-1 bindet, wird DAB zur Färbung immunhistochemischer Nachweise eingesetzt.

An den H_2O_2-Block schloss sich ein dreimaliger Waschschritt mit 1x PBS für je 5 Minuten an. Danach wurde der Sekundärantikörper *goat anti-rabbit IgG-HRP*, 1:200 mit 1x PBS verdünnt, auf alle Gewebeschnitte pipettiert. Für 60 Minuten erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Um ungebundene Antikörperreste abzuwaschen, wurden die Gewebeschnitte nach der Inkubation dreimal für je 5 Minuten in 1x PBS gewaschen.

Die Detektion von UCP-1 fand unter der Verwendung von 1x TB und DAB statt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte für 10 Minuten mit 1x TB behandelt. Anschließend erfolgte der 10-minütige Färbungsschritt mit DAB. Um die Reaktion von HRP des Sekundärantikörpers mit DAB zu stoppen, wurden die Gewebeschnitte erneut für 5 Minuten mit 1x TB behandelt. Danach wurden die Gewebeschnitte für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen.

Als letzter Schritt schloss sich die Kernfärbung an. Die Gewebeschnitte wurden für eine Minute in Hämalaun getaucht und danach kurz mit Leitungswasser sowie 1% HCL gewaschen. Der Bläuungsschritt fand folglich für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser statt. Die Gewebeschnitte wurden nach dem Bläuungsschritt erneut für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen.

Es folgte die Entwässerung der Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von Ethanol 70%, 96% und 100% für jeweils 2 Minuten sowie in Roticlear für 5 Minuten. Zum Eindecken der Gewebeschnitte wurde Rotimount verwendet. Die gefärbten und eingedeckten Gewebeschnitte wurden trocken und lichtgeschützt in einem Präparatekasten gelagert.

2.6.3 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Mithilfe eines Zeiss *AxioImager.M2* Mikroskops wurden Aufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte angefertigt. Von den 10 Objektträgern pro Gewebeprobe, je mit einer

Positiv- und einer Negativkontrolle der vorangegangenen UCP-1-Färbung, lagen immer der erste und vorletzte Objektträger für die Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen vor. Hierbei wurde der Gewebeschnitt einer Positivkontrolle mit einem 40x Objektiv aufgenommen. Für jeden Gewebeschnitt einer Positivkontrolle wurden fünf Aufnahmen angefertigt, sodass pro Gewebeprobe insgesamt 10 Aufnahmen vorlagen. Es wurde darauf geachtet, dass die Anfertigung der einzelnen Aufnahmen pro Gewebeschnitt schematisch erfolgte, um mehrfache Aufnahmen gleicher Adipozyten zu vermeiden und eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Aufnahmen pro Gewebeschnitt zu erreichen. So wurde erst mittig im Gewebe und anschließend im Uhrzeigersinn bei 12, 3, 6 und 9 Uhr jeweils eine Aufnahme angefertigt. Die weitere Bildoptimierung der lichtmikroskopischen Aufnahmen im Sinne einer Korrektur von Schattierungen erfolgte unter Verwendung der Software *ZEN 2 pro* (Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena, Deutschland).

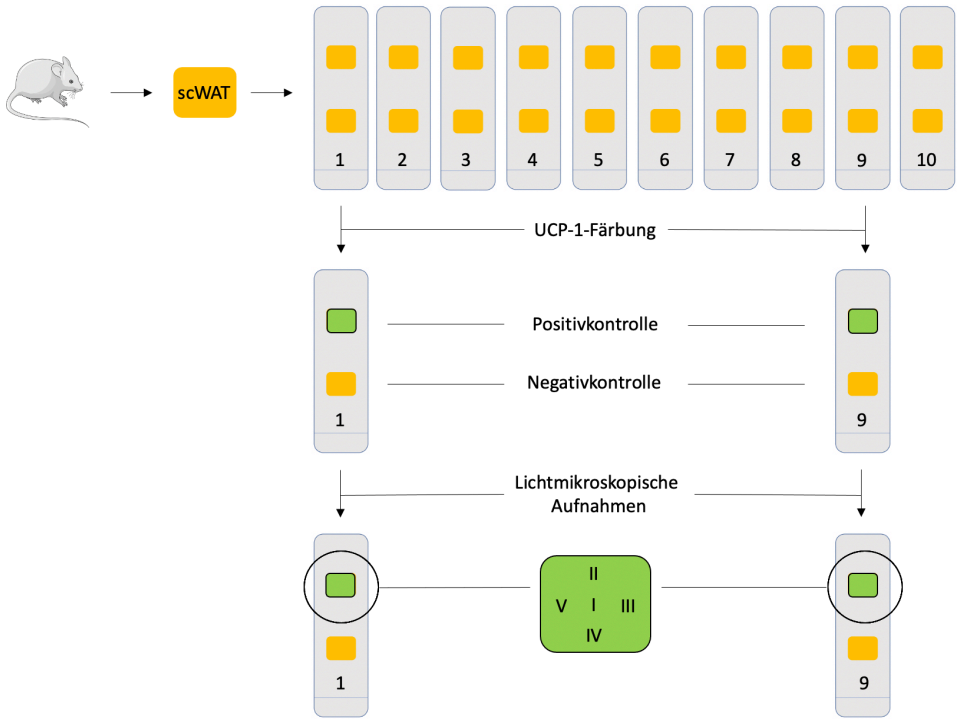


Abb. 6: Schematische Darstellung des Schnittschemas, der UCP-1-Färbung und der Anfertigung von lichtmikroskopischen Aufnahmen des subkutanen weißen Fettgewebes

Schematisch dargestellt ist die Anordnung von Gewebeschnitten des subkutanen WAT auf insgesamt 10 Objektträgern für eine Maus. Von diesen 10 Objektträgern wurden der erste und vorletzte Objektträger für die immunhistochemische Färbung/UCP-1-Färbung sowie die anschließende Anfertigung von lichtmikroskopischen Aufnahmen verwendet. Bei zwei Gewebeschnitten pro Objektträger, diente ein Gewebeschnitt als Positiv- und ein Gewebeschnitt als Negativkontrolle für die UCP-1-Färbung. Ein UCP-1-positiver Gewebeschnitt wird in der Abbildung „grün“ dargestellt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden lediglich von der Positivkontrolle angefertigt. Pro Positivkontrolle wurden fünf Aufnahmen nach oben gezeigtem Schema von I nach V erstellt. Für Details siehe Kapitel 2.6.1-3. Abkürzungen: scWAT: *subcutaneous white adipose tissue*; UCP-1: *uncoupling protein-1*. Die Abbildung beinhaltet Elemente von *Servier Medical Art* (lizenziert unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC BY 3.0). https://smart.servier.com*).

2.6.4 Adipozytenmorphologie

Die Auswertung der Zellgröße und -anzahl einer lichtmikroskopischen Aufnahme erfolgte mithilfe der Software *Fiji*[152]. Durch die Verwendung eines Makros, welches von Frau Annika Zimmermann zur Verfügung gestellt wurde, konnte eine halbautomatische Auszählung und Größenbestimmung der Zellen durchgeführt werden. Diese erfolgte für eine lichtmikroskopische Aufnahme nach folgendem Ablauf:
Die lichtmikroskopische Aufnahme wurde manuell als CZI-Bildformat in *Fiji* eingefügt. Das Makro wurde gestartet. Automatisch wurden alle Zellgrenzen ab einer Fläche von einschließlich 5 µm² dargestellt. Bevor das Makro die Auswertung abschloss, konnten randständige Zellen, defekte Zellen, Paraffinlücken oder Bindegewebsstränge manuell gelöscht werden. Unterbrochene Zellgrenzen wurden manuell geschlossen, da diese sonst nicht als Zellen gewertet würden. Anschließend wurde der letzte Auswertungsschritt des Makros bestätigt. Die Anzahl und Fläche aller zu untersuchenden Zellen wurden in einer Tabelle angezeigt. Die erhobenen Daten wurden in *Excel* für die weitere Verarbeitung manuell abgespeichert. Ebenso wurden die vom Makro überarbeiteten Bilder manuell abgespeichert.

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen des subkutanen WAT fielen Gruppierungen kleiner Adipozyten auf. Die Adipozyten dieser Gruppierungen wurden schlicht als „kleine Adipozyten“ bezeichnet und sollten als gesondertes, morphologisches Merkmal betrachtet werden. Manuell wurde die durchschnittliche Fläche eines kleinen Adipozyten bestimmt, sodass eine Zuordnung der vom Makro ausgezählten Zellen zu „kleinen Adipozyten“ möglich war. Die durchschnittliche Fläche eines kleinen Adipozyten wurde nach folgendem Protokoll ermittelt:
Pro Gewebeprobe wurden die entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen als CZI-Bildformat in *ZEN 3.3 blue edition* (Carl Zeiss *Microscopy* GmbH, Jena, Deutschland) geöffnet. Pro Aufnahme wurde die Fläche 3 kleiner Adipozyten ausgemessen, wenn möglich aus unterschiedlichen Gruppierungen kleiner Adipozyten einer Aufnahme. In *Excel* wurde anschließend die durchschnittliche Fläche kleiner Adipozyten ermittelt, indem ein Mittelwert aus allen erhobenen Flächen kleiner Adipozyten bestimmt wurde. Die Ermittlung einer durchschnittlichen Fläche kleiner Adipozyten erfolgte jeweils separat für 21°C- und 30°C-Tiere. Die Fläche kleiner Adipozyten lag bei 21°C-Tieren ≥ 5 µm² und ≤ 20 µm², bei 30°C-Tieren ≥ 5 µm² und ≤ 40 µm². Adipozyten, die nicht der beobachteten Gruppierung kleiner Adipozyten angehörten, wurden ab einer Größe von > 20 µm² bei 21°C-Tieren und ab einer Größe von > 40 µm² bei 30°C-Tieren gewertet.

Nun wurden die mithilfe des Makros ausgezählten Zellen pro Aufnahme nach folgendem Ablauf in *Excel* ausgewertet:
Die Zellgrößen wurden über die Funktion *Sortieren und Filtern* der Größe nach aufsteigend sortiert. Zellen mit einer Fläche < 5 µm², die fälschlicherweise vom Makro erfasst wurden, wurden aus der Auswertung herausgenommen. Mit der *WENN-DANN-Funktion* wurden die Zellgrößen kategorisiert. Die Kategorie ≤ 5 µm² bis ≤ 20 µm² umfasste die Gesamtanzahl kleiner Adipozyten von 21°C-Tieren. Die Kategorie ≤ 5 µm² bis ≤ 40 µm² umfasste die Gesamtanzahl kleiner Adipozyten von 30°C-Tieren. Größenkategorien für Adipozyten hingegen wurden im Abstand von 250 µm² ermittelt. Die letzte Kategorie wurde als > 1500 bezeichnet und umfasste Adipozyten ab einer Fläche von > 1500 µm². Die Kategorie ≤ 250 wurde zwischen 21°C- und 30°C-Tieren unterschiedlich definiert. Adipozyten von 21°C-Tieren wurden ab einer Größe von > 20 µm² bis ≤ 250 µm² der Kategorie ≤ 250 zugeordnet. Adipozyten der 30°C-Tieren wurden ab einer Größe von > 40 µm² bis ≤ 250 µm² der Kategorie ≤ 250 zugeordnet. Für einen Vergleich der Adipozytengrößen zwischen 21°C- und 30°C-Tieren wurde die untere Grenze der Kategorie ≤ 250 von > 20 bzw. 40 µm² auf > 50 µm² gesetzt. Mit der *ZÄHLEN-WENN-Funktion* konnte anschließend die Gesamtanzahl der kleinen Adipozyten und die Anzahl der Adipozyten einer Größenkategorie bestimmt werden. Mithilfe der Gesamtanzahl und jeweiligen Größe der Adipozyten konnte die durchschnittliche Adipozytenfläche bestimmt werden. Für eine prozentuale Darstellung der Adipozyten-Größenverteilung wurde die absolute Häufigkeit der Adipozyten einer Größenkategorie durch die Gesamtanzahl der Adipozyten geteilt. Für eine prozentuale Darstellung der kleinen Adipozyten vom subkutanen weißen Fettgewebe wurde die Gesamtanzahl der kleinen Adipozyten durch die Gesamtanzahl der kleinen Adipozyten + Adipozyten geteilt. Zuletzt wurden für jede Gewebeprobe aus 10 Aufnahmen die durchschnittliche Adipozytenfläche, die mittlere absolute und prozentuale Häufigkeit der Adipozyten pro Größenkategorie und der mittlere prozentuale Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT ermittelt.

Die Aufnahmen und Auswertungen erfolgten für 21°C- und 30°C-Tiere bis zur graphischen Darstellung der Daten verblindet. Die durchschnittliche Adipozytenfläche, die absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung und der prozentuale Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT wurden jeweils für 21°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere sowie für 30°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere in *GraphPad PRISM 9.1.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) eingetragen und graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden die Daten der durchschnittlichen Adipozytenfläche sowie der absoluten und prozentualen Adipozyten-Größenverteilung zwischen 21°C- und 30°C-Tieren graphisch verglichen.

2.6.5 UCP-1-Flächenanteil

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte mithilfe der Software *Fiji*[152] und der *BioVoxxel Image Processing and Analysis Toolbox* (BioVoxxel, Mutterstadt). Hierbei wurde die Gesamtfläche braun gefärbter, UCP-1-positiver Bereiche innerhalb des subkutanen WAT ermittelt.

Folgender Ablauf wurde für die Auswertung einer lichtmikroskopischen Aufnahme eingehalten:

Die lichtmikroskopische Aufnahme wurde manuell als JPEG-Bildformat in *Fiji* eingefügt. Automatisch öffnete sich das Bild. Unter *Subtract Background* wurde die Helligkeit des Bildhintergrundes um 50% angehoben. So konnte die Braunfärbung im Bild stärker hervorgehoben werden. Dieses bearbeitete Bild wurde manuell abgespeichert. Unter *Colour Deconvolution - HDAB* wurde das Bild nun in drei Farbkanälen geöffnet. Für die weitere Auswertung wurde der Farbkanal 2 verwendet, der die Braunfärbung im Bild erkannte. Hierbei wurde nicht die Intensität, sondern der prozentuale Anteil der Braunfärbung an der gesamten Bildfläche erkannt. Unter der Anwendung eines festgelegten Schwellenwertes *(Threshold)*, der zuvor an mehreren Bildern getestet und angepasst wurde, konnte ein Maß geschaffen werden, an dem sich die Software zur Bestimmung der braun gefärbten Bildfläche orientierte. Braun gefärbte Bildflächen, die erst oberhalb des *Thresholds* erkannt wurden, gingen nicht in die Auswertung mit ein. Ebenso gingen falsch positive Braunfärbungen, die auch unter Verwendung des *Thresholds* erfasst wurden, nicht in die Auswertung mit ein. Unter *Analyze Particles* wurde die braun gefärbte Bildfläche sowohl in Pixeln als auch in Prozent angegeben. Die Bildfläche in Pixeln war jedoch nicht mit der Originalgröße des Gewebes vergleichbar. Demzufolge wurde der UCP-1-Flächenanteil eines Bildes nicht in Pixeln, sondern in Prozent von der Gesamtbildfläche angegeben. Anschließend wurde der Mittelwert des UCP-1-Flächenanteils aller Aufnahmen pro Gewebeprobe mithilfe der Software *Excel* bestimmt. Die Aufnahmen und Auswertungen erfolgten für 21°C- und 30°C-Tiere bis zur graphischen Darstellung der Daten verblindet. Der UCP-1-Flächenanteil wurde jeweils für 21°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere sowie für 30°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere in *GraphPad PRISM 9.1.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) eingetragen und graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden die Daten zwischen 21°C- und 30°C-Tieren verglichen und graphisch gegenübergestellt.

2.6.6 RNA-Isolation

Subkutanes WAT für die Genexpressionsanalyse wurde nach der Organentnahme bei -80°C gelagert.

Folgendes Protokoll wurde eingehalten:

Die Isolation der RNA aus subkutanem WAT basierte auf der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode[153] unter der Verwendung des gebrauchsfertigen TRIzol™ Reagenzes. Die Isolation der RNA erfolgte in den fünf Arbeitsschritten Homogenisierung, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, RNA-Waschen und RNA-Lösen.

Tiefgefrorenes subkutanes WAT wurde mit 1 ml TRIzol in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 1,5 Minuten dissoziiert. Das Homogenat wurde für 2 Minuten bei 1800 xg und 4°C zentrifugiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das Homogenat wurde mit 200 µl Chloroform vermischt durch ein wiederholtes, kräftiges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach der Zugabe von Chloroform wurde das Homogenat für 2 Minuten in der Zentrifuge stehen gelassen. Um eine Phasenauftrennung des Homogenats zu erzielen, schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 xg und 4°C an. Dabei bildeten sich die folgenden drei Phasen aus: eine obere, farblose, wässrige und mit RNA angereicherte Phase, eine untere, rote, organische Phenol-Chloroform-Phase und eine dazwischen liegende, trübe Interphase. In der Interphase und in der Phenol-Chloroform-Phase befinden sich die DNA und Proteine des subkutanen WAT.

Zur RNA-Präzipitation wurde die RNA-haltige, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die gefällte RNA für 30 Minuten bei 12000 xg und 4°C in der Zentrifuge pelletiert.

Im nächsten Schritt wurde der Überstand abpipettiert, das weiße RNA-Pellet in 1 ml Ethanol 75 % gewaschen und für 5 Minuten bei 7500 xg und 4°C in der Zentrifuge sedimentiert. Erneut wurde der Überstand abpipettiert. Das RNA-Pellet wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Das RNA-Pellet wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser für 5 Minuten bei 65°C unter Schütteln gelöst und anschließend bei -80°C gelagert.

Nachdem die Isolation der RNA für alle Gewebeproben erfolgt war, wurde die Messung der RNA-Quantität und -Qualität mithilfe des NanoDrop 1000 Spektrophotometers vorgenommen. Hierbei sollte die RNA mit einer Konzentration im Bereich von 80-500 ng/µl vorliegen. Konzentrationen weit unter- oder oberhalb dieses Bereichs wurden korrigiert, indem die RNA-Probe bei 65°C verdampft oder mit RNase-freiem Wasser verdünnt wurde. Die RNA-Qualität wurde durch eine Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm sichergestellt. Bei einem Absorptionsquotienten A260/280 im Bereich von 1,8-2,0 konnte von einer nicht durch DNA und Proteine verunreinigten RNA-Probe ausgegangen werden.

2.6.7 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese sollte das RNA-Volumen einer Gewebeprobe 12 µl betragen und 1 µg RNA enthalten. Die RNA wurde hierbei mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt, bis ein Ansatz von 12 µl vorlag. Die cDNA-Synthese erfolgte unter der Verwendung des *QuantiTect Reverse Transcription Kits* (Qiagen, Hilden). Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

2.6.8 *Real-Time Quantitative* PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR wurde am StepOnePlus™ Real-Time PCR System von Frau Peggy Marra-Mann durchgeführt. Für die RT-qPCR wurde der Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG verwendet. Die verwendeten Primerpaar-Sequenzen des entsprechenden Zielgens sowie des *Housekeeping*-Gens sind in Tabelle 9 aufgelistet.
Jeder RT-qPCR-Ansatz enthielt 10 µl, bestehend aus 5 µl des SuperMix, 2,5 µl des entsprechenden Primers und 2,5 µl cDNA der entsprechenden Probe. Die cDNA-Konzentration der Proben im Ansatz betrug 8,33 ng/µl.
Die RT-qPCR wurde für jedes Zielgen sowie für das *Housekeeping*-Gen einer Probe doppelt durchgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen für die RT-qPCR

Gen	Vorwärts-Primer 5´-3´	Rückwärts-Primer 5´-3´
Ribosomal Protein L13a (RPL13a)	TCCGGAAGCGGATGAATAC	CCTGGCCTCTCTTGGTCTT
*Fatty Acid Synthase 3 (*Fasn3*)*	GACTCGGCTACTGACACGAC	CGAGTTGAGCTGGGTTAGGG
Acetyl-CoA Carboxylase-alpha 1 (Acaca1)	CCTCACCCAACCCAGAAAGG	AACCTGGCTCTGCCAACTAC
Hormone-Sensitive Lipase 3 (Lipe3)	GGGCTTCCAGTTCACACCTG	GAATCGGCCACCGGTAAAGA
Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2 (PnPla2)	CTCCAAGGGGTGCGCTATG	GAGGCGGTAGAGATTGCGAA

2.6.9 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression

Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte unter Verwendung der StepOnePlus™Software Version 2.3 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). Mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode[154] war eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene möglich. Als Maß wurden die von der StepOnePlus™Software angezeigten C(t)-Werte herangezogen. Nicht alle Gewebeproben konnten im gleichen RT-qPCR-Lauf analysiert werden, sodass eine Korrektur der Daten in StepOnePlus vor weiterer Anwendung vorgenommen wurde. Anschließend wurde zur Normalisierung der mRNA-Expressionsergebnisse die mRNA-Expression der Zielgene auf die mRNA-Expression des *Housekeeping*-Gens (RPL13a) bezogen. Es folgte die Kalibrierung der relativen mRNA-Expression eines Zielgens unter Verwendung einer ausgewählten Kontrollprobe. Die Kontrollprobe repräsentierte die zum *Housekeeping*-Gen normalisierte mRNA-Expression eines Zielgens der Kontrollgruppe. Das $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Ergebnis von Proben der Kontrollgruppe wurde gemittelt. Zuletzt wurde das $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Ergebnis einer Probe auf das gemittelte $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Ergebnis von Proben der Kontrollgruppe bezogen, sodass letztendlich die x-fache, zum *Housekeeping*-Gen normalisierte mRNA-Expression eines Zielgens der BAT-Ablationgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlag. Die Daten wurden jeweils für 21°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere sowie für 30°C-Kontroll- und BAT-Ablationstiere in *GraphPad PRISM 9.1.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) eingetragen und graphisch dargestellt. Hierbei lag die relative mRNA-Expression eines Zielgens der Kontrollgruppe immer bei 1. Die entsprechende mRNA-Expression in der BAT-Ablationsgruppe entsprach dem x-fachen der Kontrollgruppe.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit der Software *GraphPad PRISM 9.1.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) ausgewertet. Ausreißer wurden mittels *Grubbs test* ermittelt.

Daten der mRNA-Expression beruhten auf einer exponentiellen Funktion. Um von einer Normalverteilung ausgehen zu können wurden diese vor Anwendung des parametrischen, ungepaarten, doppelseitigen *Student´s T-test* logarithmiert.

Alle anderen Datengruppen wurden bei vorliegender Normalverteilung und gleicher Varianz mit einem parametrischen, ungepaarten, doppelseitigen *Student´s T-test* auf Signifikanz getestet. Bei vorliegender Normalverteilung, aber unterschiedlicher Varianz sowie bei nicht vorliegender Normalverteilung wurden die Datengruppen mit dem nicht-parametrischen *Mann-Whitney test* auf Signifikanz getestet.

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung (Mittelwert ± SD) dargestellt. Bei einem *p*-Wert ≤ 0,05 wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

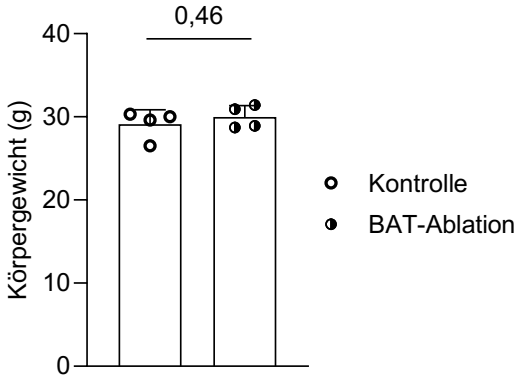
3 Ergebnisse

Im Folgenden wurden Tiere bei standardisierter Haltungstemperatur als 21°C-Tiere und Tiere bei Thermoneutralität als 30°C-Tiere bezeichnet. Alle Untersuchungen erfolgten separat für 21°C- und 30°C-Tiere. Wenn möglich, wurden die Daten zwischen 21°C- und 30°C-Tieren miteinander verglichen. Da Studien einen stärkeren Einfluss des BAT und der Umgebungstemperatur auf die Lipidspeicherung sowie die UCP-1-Expression im subkutanen WAT im Vergleich zum viszeralen WAT belegen[66, 86, 155], konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf das subkutane WAT.

3.1 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes im Modell eines akuten Myokardinfarkts bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe in Bezug auf das Körpergewicht (p = 0,46), das absolute subkutane Fettgewicht (p = 0,09) und das subkutane Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht (p = 0,10) von 21°C-Tieren festgestellt werden (Abbildung 7A, B und C). Bei standardisierter Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen WAT drei Wochen nach I/R.

A 21°C Körpergewicht



B 21°C Subkutanes Fettgewicht **C 21°C Subkutanes Fettgewicht/Körpergewicht**

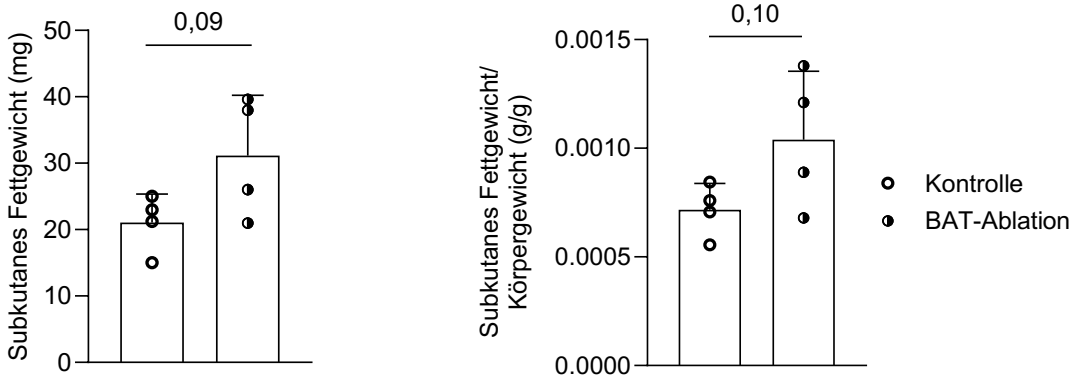


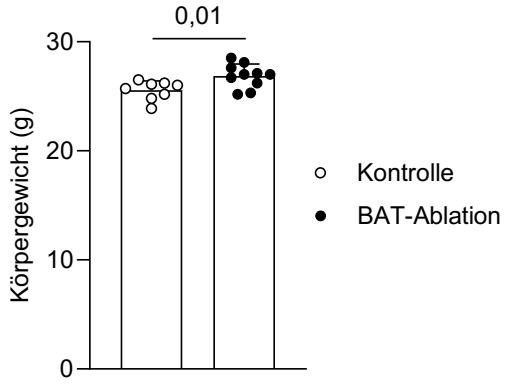
Abb. 7: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C-Tieren

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum bei 21°C mit freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. **A** Körpergewicht drei Wochen nach I/R. **B** Absolutes subkutanes Fettgewicht und **C** subkutanes Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht drei Wochen nach I/R. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A**, **B** und **C** beruhen auf n = 4,4. **A**, **B** und **C** *unpaired student´s t-test*.
g Gramm; mg Milligramm; °C Grad Celsius.

Drei Wochen nach I/R konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe von 30°C-Tieren in Bezug auf das Körpergewicht festgestellt werden (p = 0,01) (Abbildung 8A). Das Körpergewicht der BAT-Ablationstiere war hierbei signifikant erhöht. Somit hatte die chirurgische BAT-Ablation bei thermoneutraler Haltungstemperatur einen Einfluss auf das Körpergewicht drei Wochen nach I/R. Ebenso ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe von 30°C-Tieren hinsichtlich des absoluten subkutanen Fettgewichts (p < 0,0001) und des subkutanen Fettgewichts bezogen auf das Körpergewicht (p < 0,0001) drei Wochen nach I/R erkennen (Abbildung 8B und C). Das subkutane Fettgewicht der BAT-Ablationstiere war hierbei

signifikant erhöht. Somit hatte die chirurgische BAT-Ablation bei thermoneutraler Haltungstemperatur einen Einfluss auf das subkutane Fettgewicht drei Wochen nach I/R.

A 30°C Körpergewicht



B 30°C Subkutanes Fettgewicht **C 30°C Subkutanes Fettgewicht/Körpergewicht**

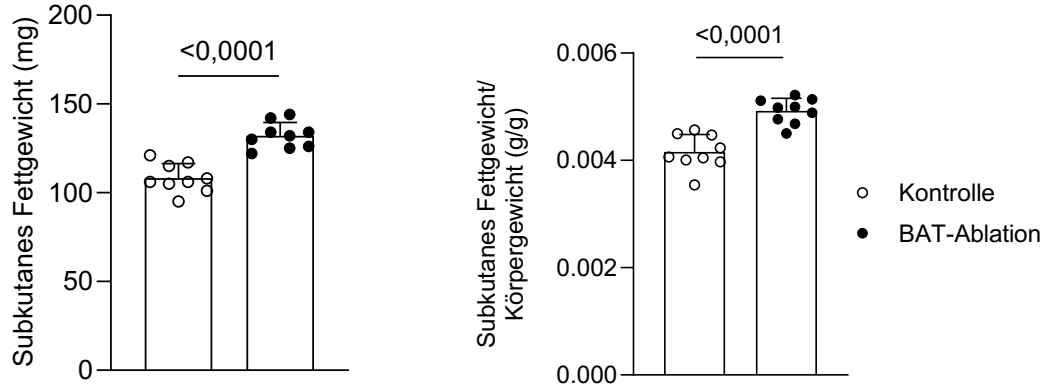


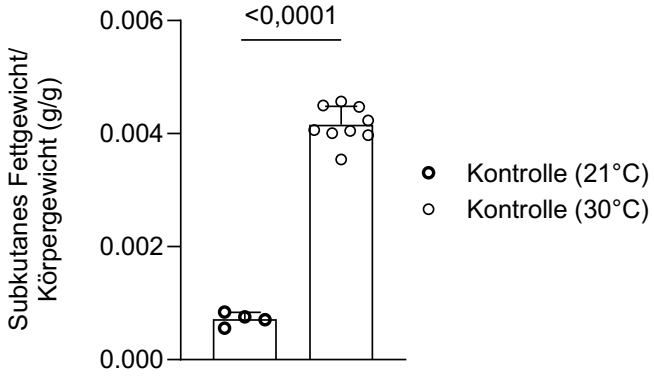
Abb. 8: Signifikante Zunahme des Körpergewichts und des subkutanen Fettgewichts von 30°C-Tieren nach chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum in einem 30°C-temperierten Klimaschrank mit freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. **A** Körpergewicht drei Wochen nach I/R. **B** Absolutes subkutanes Fettgewicht in Tieren mit BAT-Ablation bzw. in entsprechenden Kontrolltieren sowie **C** subkutanes Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht drei Wochen nach I/R. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** beruhen auf n = 8,10; **B** und **C** n = 9,9. **A**, **B** und **C** *unpaired student´s t-test*.
g Gramm; mg Milligramm; °C Grad Celsius.

Drei Wochen nach I/R konnte ein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren ($p < 0,0001$) sowie 21°C- und 30°C-BAT-Ablationstieren ($p < 0,0001$) hinsichtlich des subkutanen Fettgewichts bezogen auf das Körpergewicht festgestellt werden (Abbildung 9A und B). Hierbei zeigte sich das subkutane Fettgewicht der 30°C-Kontroll- und -BAT-Ablationstiere signifikant erhöht. Somit lag auch ein

temperaturabhängiger Effekt auf das subkutane Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht von Kontroll- und BAT-Ablationstieren drei Wochen nach I/R vor.

A Subkutanes Fettgewicht/Körpergewicht von 21°C- und 30°C-Kontrolltieren



B Subkutanes Fettgewicht/Körpergewicht von 21°C- und 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

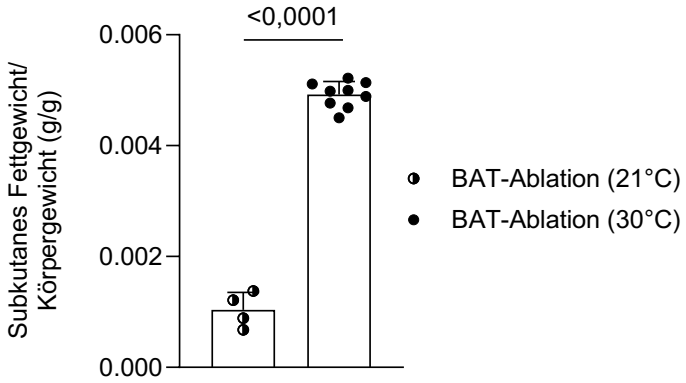


Abb. 9: Signifikanter Temperatureffekt auf das subkutane Fettgewicht/Körpergewicht von Kontrolltieren und Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum bei 21°C oder in einem 30°C-temperierten Klimaschrank mit freiem Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. **A** Subkutanes Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht von 21°C- und 30°C-Kontrolltieren drei Wochen nach I/R. **B** Subkutanes Fettgewicht bezogen auf das Körpergewicht von 21°C- und 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes drei Wochen nach I/R. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** und **B** beruhen auf n = 4,9. **A** und **B** *unpaired student´s t-test*.
g Gramm; mg Milligramm; °C Grad Celsius.

3.2 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das subkutane weiße Fettgewebe im Modell eines akuten Myokardinfarkts bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur

Wie zuvor gezeigt ging eine chirurgische BAT-Ablation mit einer signifikanten Zunahme des subkutanen Fettgewichts bei thermoneutraler Haltungstemperatur einher. Zudem zeigte sich das subkutane Fettgewicht von Tieren bei Thermoneutralität signifikant erhöht im Vergleich zu Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur. Nun sollte der Einfluss einer chirurgischen BAT-Ablation auf folgende Kriterien im subkutanen WAT vergleichend zwischen standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur der Tiere näher untersucht werden:

- Adipozytenmorphologie
- UCP-1-Expression
- mRNA-Expression von Genen, die für Enzyme der Lipogenese und Lipolyse codieren.

3.2.1 Adipozytenmorphologie des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

Für 21°C- sowie 30°C-Kontroll- und -BAT-Ablationstiere wurden jeweils die durchschnittliche Adipozytenfläche sowie die absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung ermittelt. Zudem wurden in lichtmikroskopischen Aufnahmen des subkutanen WAT Gruppierungen kleiner Adipozyten entdeckt. Die Größe dieser kleinen Adipozyten lag bei 21°C-Tieren ≥ 5 µm² und ≤ 20 µm², bei 30°C-Tieren ≥ 5 µm² und ≤ 40 µm². Adipozyten der oben genannten Gruppierungen wurden schlicht als „kleine Adipozyten“ bezeichnet und als prozentualer Anteil vom subkutanen WAT jeweils für 21°C- sowie 30°C-Kontroll- und -BAT-Ablationstiere dargestellt.

3.2.1.1 Durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe in Bezug auf die durchschnittliche Adipozytenfläche von 21°C-Tieren (p = 0,45) und 30°C-Tieren (p = 0,67) festgestellt werden (Abbildung 10A und B). Unter der jeweiligen Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf die durchschnittliche Adipozytenfläche drei Wochen nach I/R.

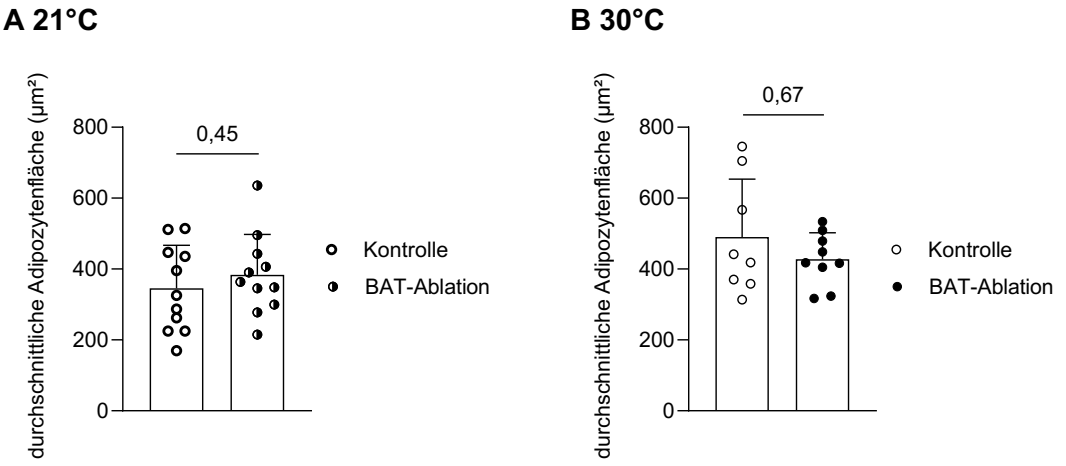


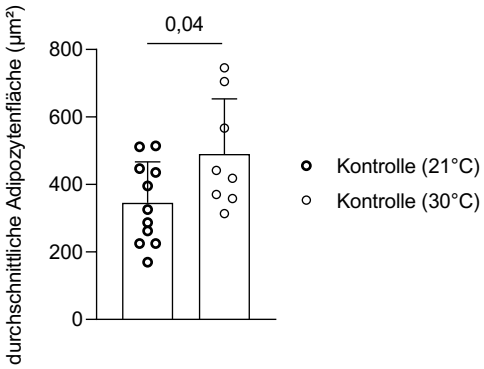
Abb. 10: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** bei 21°C oder **B** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Gezeigt ist die durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen WAT von **A** 21°C-Tieren und **B** 30°C-Tieren drei Wochen nach I/R. Der einzelne Adipozyt hat eine Fläche von **A** > 20 µm² und **B** > 40 µm². Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** beruhen auf n = 11,11; **B** n = 8,9. **A** *unpaired student´s t-test*; **B** *Mann-Whitney-test*.
µm² Quadratmikrometer; °C Grad Celsius.

Drei Wochen nach I/R konnte ein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren in Bezug auf die durchschnittliche Adipozytenfläche festgestellt werden (p = 0,04) (Abbildung 11A). Hierbei war die durchschnittliche Adipozytenfläche der 30°C-Kontrolltiere signifikant größer. Bei Kontrolltieren lag somit ein temperaturabhängiger Effekt auf die durchschnittliche Adipozytenfläche drei Wochen nach I/R vor.

Drei Wochen nach I/R war kein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-BAT-Ablationstieren in Bezug auf die durchschnittliche Adipozytenfläche erkennbar (p = 0,33) (Abbildung 11B). Bei BAT-Ablationstieren lag somit kein temperaturabhängiger Effekt auf die durchschnittliche Adipozytenfläche drei Wochen nach I/R vor.

A 21°C- und 30°C-Kontrolltiere



B 21°C- und 30°C-Tiere mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

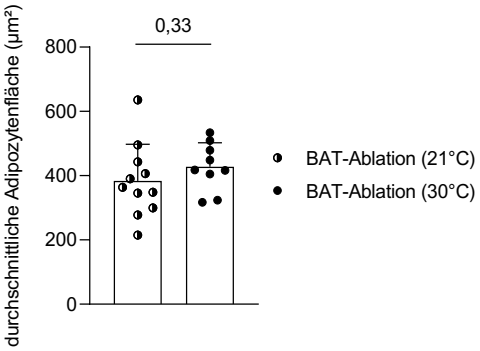


Abb. 11: Signifikant größere durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 30°C-Kontrolltieren

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum bei 21°C oder in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Gezeigt ist ein Vergleich der durchschnittlichen Adipozytenfläche des subkutanen WAT zwischen **A** 21°C- und 30°C-Kontrolltieren sowie zwischen **B** 21°C- und 30°C-BAT-Ablationtieren. Bei 21°C-Tieren hat der einzelne Adipozyt eine Fläche ab > 20 µm², bei 30°C-Tieren ab > 40 µm². Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** beruhen auf n = 11,8; **B** n = 11,9. **A** und **B** *unpaired student´s t-test*.
µm² Quadratmikrometer; °C Grad Celsius.

3.2.1.2 Absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

Im nächsten Schritt wurden die absolute und prozentuale Häufigkeit der Adipozyten für Größenkategorien im Abstand von 250 µm² ermittelt. Die Kategorie ≤ 250 wurde zwischen 21°C- und 30°C-Tieren unterschiedlich definiert. Adipozyten von 21°C-Tieren wurden mit einer Größe von > 20 µm² bis ≤ 250 µm² der Kategorie ≤ 250 zugeordnet. Adipozyten der 30°C-Tieren wurden mit einer Größe von > 40 µm² bis ≤ 250 µm² der Kategorie ≤ 250 zugeordnet. Beim Vergleich der Adipozyten der Kategorie ≤ 250 zwischen beiden Haltungstemperaturen, wurden Adipozyten erst ab einer Größe von > 50 µm² einbezogen.

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied in der absoluten sowie prozentualen Adipozyten-Größenverteilung zwischen Kontroll- und BAT-Ablationstieren beider Haltungstemperaturen beobachtet werden (Abbildung 12). Die entsprechenden *p*-Werte können der Abbildung 12 entnommen werden. Zudem verhält sich das Muster der Adipozyten-Größenverteilung zwischen Kontroll- und BAT-Ablationstieren einer Haltungstemperatur sehr ähnlich. Unter der jeweiligen Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation somit keinen Effekt auf die absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung drei Wochen nach I/R.

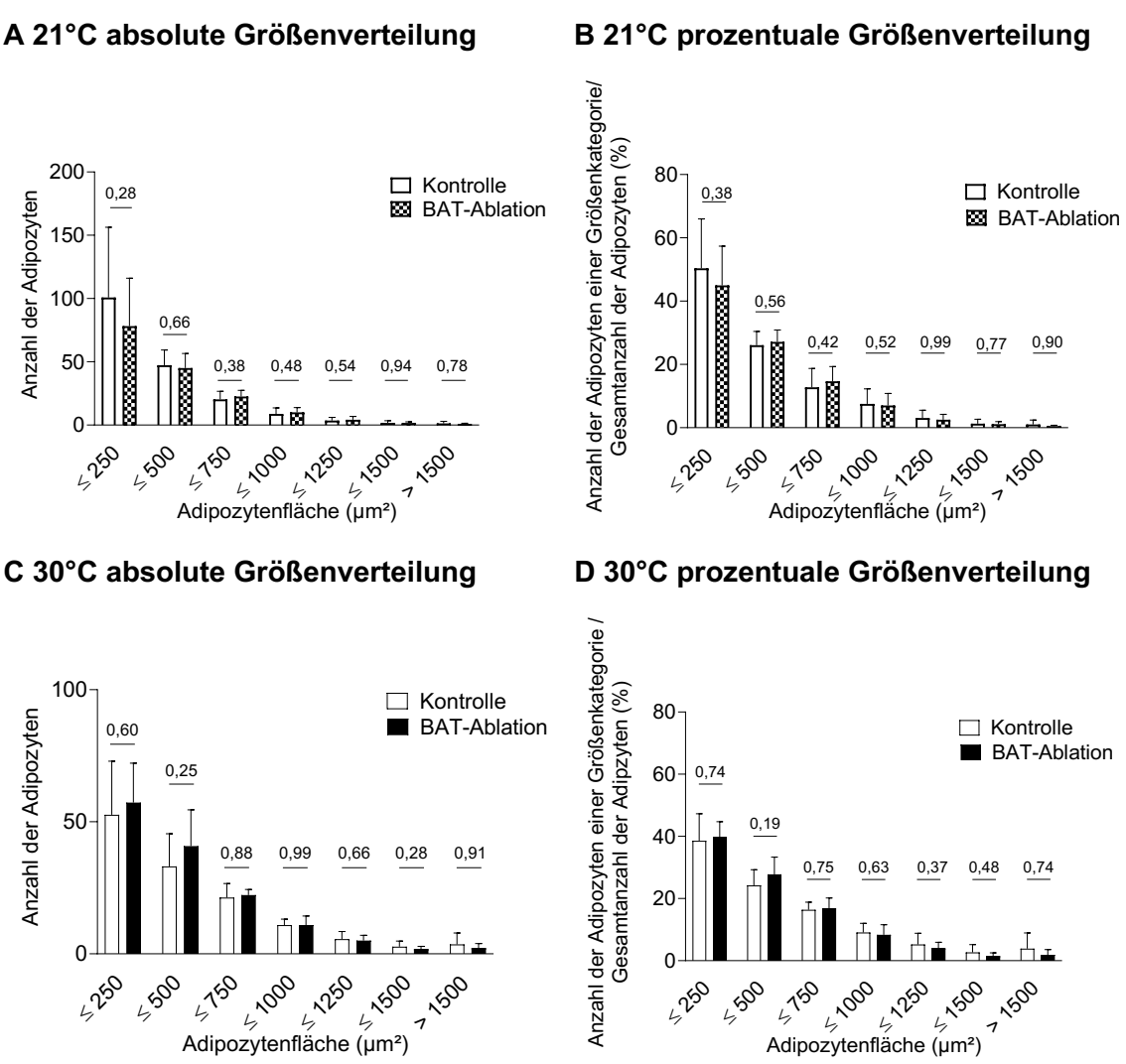


Abb. 12: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren

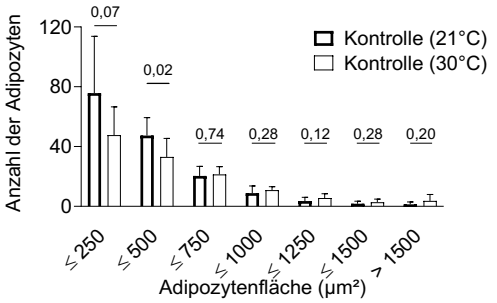
Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** und **B** bei 21°C oder **C** und **D** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Gezeigt ist die **A** und **C** absolute und **B** und **D** prozentuale Häufigkeit von Adipozyten des subkutanen WAT von **A** und **B** 21°C-Tieren und **C** und **D** 30°C-Tieren drei Wochen nach I/R pro Größenkategorie. Der einzelne Adipozyt hat eine Fläche von **A** und **B** > 20 µm² und **C** und **D** > 40 µm². Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. **A** Daten aus Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1250 beruhen auf n = 11,11; ≤ 1500 n = 11,10; > 1500 n = 11,9; **B** Daten aus Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1000 beruhen auf n = 11,11; ≤ 1250, ≤ 1500 n = 11,10; > 1500 n = 11,8; **C** Daten aus Kategorie ≤ 250, ≤ 500, ≤ 1000 bis einschließlich > 1500 beruhen auf n = 8,9; ≤ 750 n = 8,8; **D** Alle Daten beruhen auf n = 8,9. **A** und **B** Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1500 *unpaired student´s t-test;* Kategorie > 1500 *Mann-Whitney-test*; **C** Kategorie ≤ 250, ≤ 500, ≤ 1000, ≤ 1250, ≤ 1500 *unpaired student´s t-test*; Kategorie ≤ 750, > 1500 *Mann-Whitney-test*; **D** Kategorie ≤ 250 bis einschließlich 1250 *unpaired student´s t-test;* Kategorie ≤ 1500, > 1500 *Mann-Whitney-test.*
% Prozent; µm² Quadratmikrometer; °C Grad Celsius.

Anschließend wurde die Adipozyten-Größenverteilung zwischen 21°C- und 30°C-Tieren verglichen.

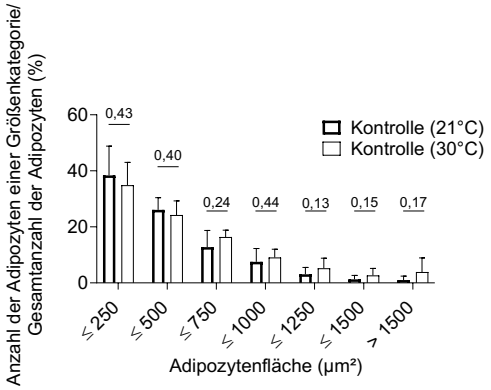
Im Vergleich zu 21°C-Kontrolltieren war die absolute Häufigkeit von Adipozyten der Kategorie ≤ 250 bei 30°C-Kontrolltieren drei Wochen nach I/R tendenziell erniedrigt (p = 0,07) (Abbildung 13A). Zudem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren in der absoluten Häufigkeit von Adipozyten der Kategorie ≤ 500 festgestellt werden (p = 0,02) (Abbildung 13A). Hierbei war die Anzahl der Adipozyten von 30°C-Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Dieser Temperatureffekt verschwand bei entsprechender prozentualer Darstellung der Daten (Abbildung 13B). In der weiteren absoluten und prozentualen Adipozyten-Größenverteilung lag kein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren und somit auch kein temperaturabhängiger Effekt vor (Abbildung 13A und B). Alle entsprechenden p-Werte können den Abbildungen 13A und B entnommen werden.

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-BAT-Ablationstieren in der absoluten und prozentualen Adipozyten-Größenverteilung festgestellt werden (Abbildung 13C und D). Die entsprechenden p-Werte können den Abbildungen 13C und D entnommen werden. Dennoch fällt hinsichtlich der prozentualen Adipozyten-Größenverteilung auf, dass 30°C-BAT-Ablationstiere tendenziell mehr Adipozyten in der Kategorie ≤ 1250 und > 1500 haben als 21°C-BAT-Ablationstiere (Abbildung 13D).

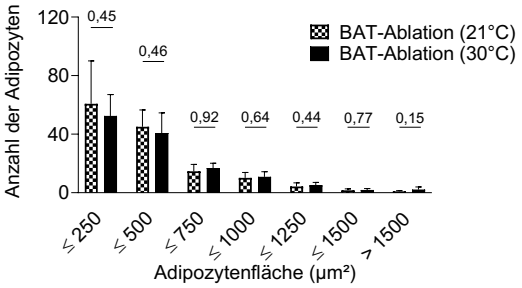
A Absolute Größenverteilung von 21°C- und 30°C-Kontrolltieren



B Prozentuale Größenverteilung von 21°C- und 30°C-Kontrolltieren



C Absolute Größenverteilung von 21°C- und 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes



D Prozentuale Größenverteilung von 21°C- und 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

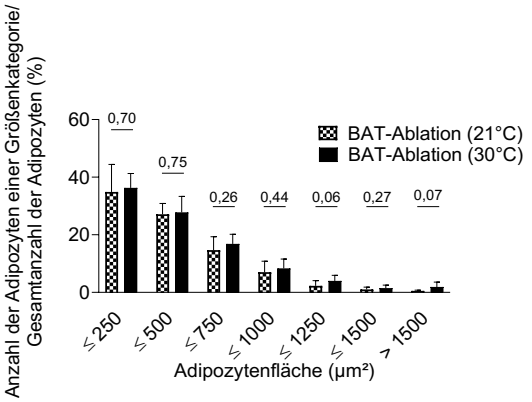


Abb. 13: Signifikant erniedrigte absolute Anzahl von Adipozyten in der Kategorie > 250 µm² bis ≤ 500 µm² des subkutanen weißen Fettgewebes bei 30°C-Kontrolltieren

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum bei 21°C oder in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Für die **A** und **B** Kontroll- und **C** und **D** BAT-Ablationgruppe wurde jeweils die **A** und **C** absolute und **B** und **D** die prozentuale Häufigkeit der Adipozyten des subkutanen WAT von 21°C- vs. 30°C-Tieren drei Wochen nach I/R pro Größenkategorie gezeigt. Einbezogen wurden Adipozyten ab einer Fläche von > 50 µm². Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. **A** und **B** Daten beruhen auf n = 11,8; **C** Daten aus Kategorie ≤ 250, ≤ 500, ≤ 1000, ≤ 1250 beruhen auf n = 11,9; ≤ 750 n = 11,8; ≤ 1500 n = 10,9; > 1500 n = 9,9; **D** Daten aus Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1500 beruhen auf n = 11,9; > 1500 n = 8,9. **A** Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1500 *unpaired student´s t-test;* Kategorie > 1500 *Mann-Whitney-test*; **B** Kategorie ≤ 250, ≤ 500, ≤ 1000, ≤ 1250, ≤ 1500 *unpaired student´s t-test;* Kategorie ≤ 750, > 1500 *Mann-Whitney-test;* **C** Kategorie ≤ 250, ≤ 500, ≤ 1000, ≤ 1250, ≤ 1500 *unpaired student´s t-test*; Kategorie ≤ 750, > 1500 *Mann-Whitney-test;* **D** Kategorie ≤ 250 bis einschließlich ≤ 1500 *unpaired student´s t-test;* Kategorie > 1500 *Mann-Whitney-test.*
% Prozent; µm² Quadratmikrometer; °C Grad Celsius.

3.2.1.3 Prozentualer Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 21°C-Kontroll- und BAT-Ablationstieren in Bezug auf den prozentualen Anteil der kleinen Adipozyten (p = 0,87) vom subkutanen WAT festgestellt werden (Abbildung 14A). Bei standardisierter Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation somit keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT drei Wochen nach I/R.
Drei Wochen nach I/R konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen 30°C-Kontroll- und BAT-Ablationstieren in Bezug auf den prozentualen Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT festgestellt werden. Hierbei war der prozentuale Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT der BAT-Ablationstiere signifikant erniedrigt (p = 0,002) (Abbildung 14B). Bei thermoneutraler Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation einen Einfluss auf den prozentualen Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen WAT drei Wochen nach I/R.

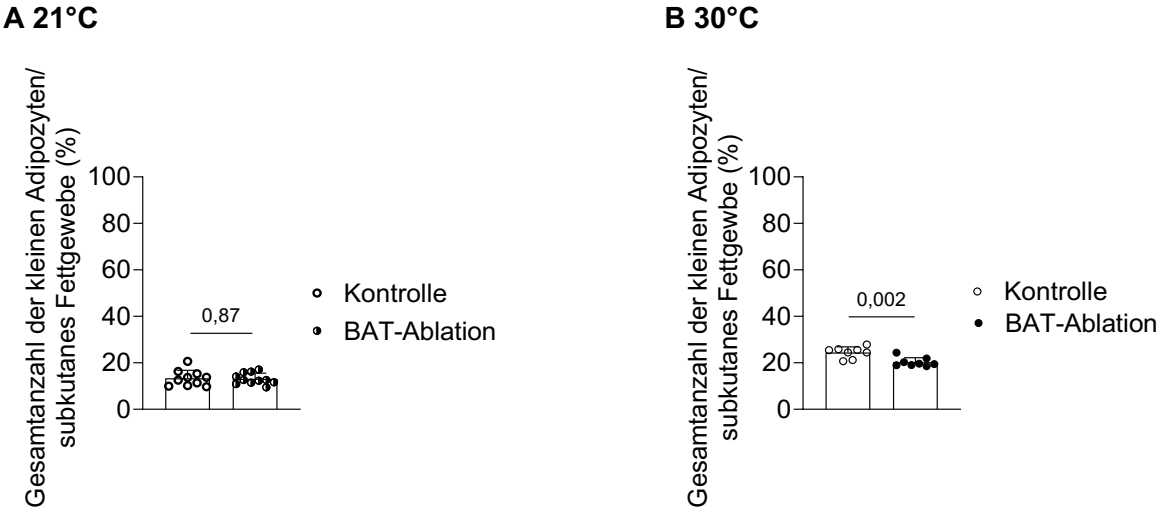


Abb. 14: Signifikant verringerter prozentualer Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen weißen Fettgewebe in 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** bei 21°C oder **B** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Für die **A** 21°C- und **B** 30°C-Tiere wurde jeweils der prozentuale Anteil der kleinen Adipozyten **A** ≥ 5 µm² und ≤ 20 µm² und **B** ≥ 5 µm² und ≤ 40 µm² vom subkutanen WAT drei Wochen nach I/R dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** beruhen auf n = 10,11; **B** n = 8,8. **A** *unpaired student´s t-test;* **B** *Mann-Whitney-test*.
% Prozent; °C Grad Celsius.

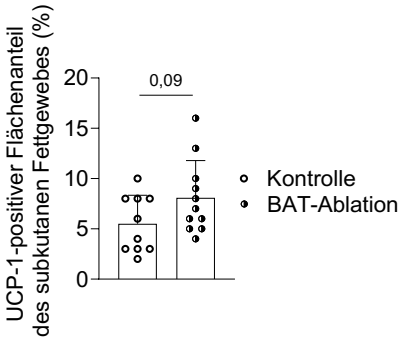
3.2.2 UCP-1-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren

Mithilfe einer immunhistochemischen Färbung erfolgte eine UCP-1-Detektion im subkutanen WAT von 21°C- und 30°C-Tieren. Hierbei beschrieb ein UCP-1-positives Signal den prozentualen Anteil der UCP-1-positiven Fläche im subkutanen WAT.

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe in Bezug auf das UCP-1-positive Signal bei 21°C-Tieren (p = 0,09) und 30°C-Tieren (p = 0,80) festgestellt werden (Abbildung 15A und C). Bei thermoneutraler Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf die UCP-1-Expression im subkutanen WAT 3 Wochen nach I/R. Hierbei war das UCP-1-positive Signal in 30°C-Kontroll- und BAT-Ablationtieren nahezu nicht detektierbar (Abbildung 15C). Bei standardisierter Haltungstemperatur hingegen war ein tendenziell erhöhtes UCP-1-positives Signal im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren erkennbar (p = 0,09) (Abbildung 15A).

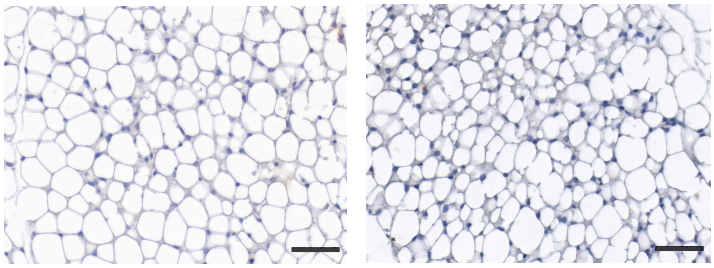
Drei Wochen nach I/R konnte ein signifikanter Unterschied zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren (p < 0,0001) sowie zwischen 21°C- und 30°C-BAT-Ablationstieren (p < 0,0001) in Bezug auf ein UCP-1-positives Signal festgestellt werden (Abbildung 15E und F). Das UCP-1-positive Signal bei 21°C-Kontroll- und BAT-Ablationstieren war signifikant erhöht. Bei Kontroll- und BAT-Ablationstieren lag somit ein temperaturabhängiger Effekt auf die UCP-1-Expression im subkutanen WAT drei Wochen nach I/R vor.

A 21°C

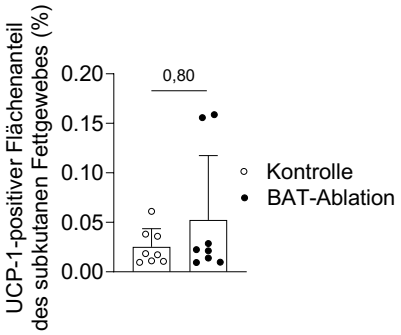


B 21°C

Kontrolle BAT-Ablation

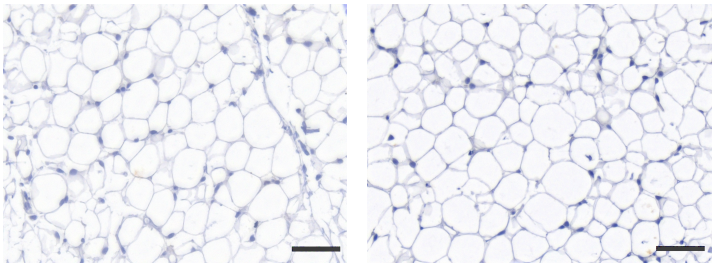


C 30°C

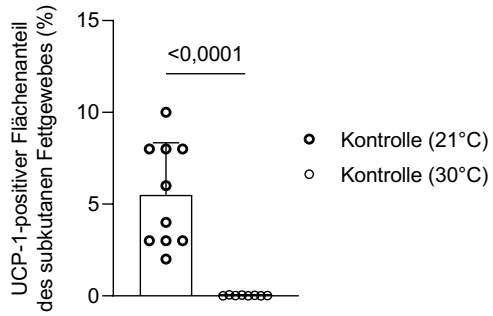


D 30°C

Kontrolle BAT-Ablation



E 21°C- und 30°C-Kontrolltiere



F 21°C- und 30°C-Tiere mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

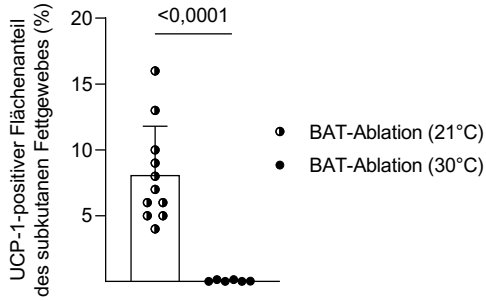


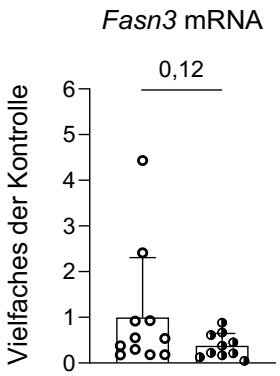
Abb. 15: Signifikanter Temperatureffekt auf die UCP-1-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von Kontrolltieren und Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** bei 21°C oder **C** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Gezeigt ist der prozentuale UCP-1-Flächenanteil vom subkutanen WAT der **A** 21°C-Tiere und **C** 30°C-Tiere drei Wochen nach I/R mit **B** und **D** repräsentativen Aufnahmen der Immunhistochemischen Färbung für UCP-1. **E** Vergleich des prozentualen UCP-1-Flächenanteils vom subkutanen WAT zwischen 21°C- und 30°C-Kontrolltieren sowie zwischen **F** 21°C- und 30°C-BAT-Ablationstieren drei Wochen nach I/R. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A** beruhen auf n = 10,11; **C** n = 8,8; **E** n = 10,8; **F** n = 11,8. **A** *unpaired student´s t-test*; **C**, **E** und **F** *Mann-Whitney-test*.
Aufnahmen B und **D:** Repräsentative Übersichtsaufnahme des subkutanen WAT in UCP-1-Färbung von Kontroll- und BAT-Ablationtier. 40-fache Vergrößerung. Maßstabbalken: 50 µm.
% Prozent; °C Grad Celsius.

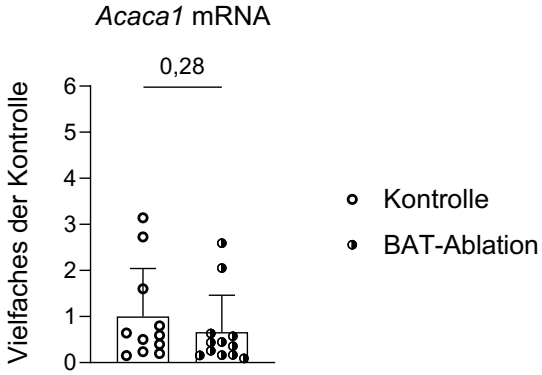
3.2.3 mRNA-Expression von Markergenen der Lipogenese und Lipolyse im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C- und 30°C-Tieren

Für die Lipogenese wurde die *Fasn3* und *Acaca1* mRNA-Expression und für die Lipolyse die *Lipe3* und *PnPla2* mRNA-Expression im subkutanen WAT mittels qPCR analysiert. Die mRNA-Expression der BAT-Ablationstiere wurde als Vielfaches der mRNA-Expression von Kontrolltieren angegeben. Aus diesem Grund ließ sich die mRNA-Expression von Enzymen des Lipidmetabolismus nicht zwischen beiden Haltungstemperaturen vergleichen.
Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe in Bezug auf die *Fasn3* und *Acaca1* mRNA-Expression bei 21°C-Tieren (p = 0,12 und p = 0,28) und 30°C-Tieren (p = 0,32 und p = 0,95) festgestellt werden (Abbildung 16). Unter der jeweiligen Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf die *Fasn3* und *Acaca1* mRNA-Expression drei Wochen nach I/R.

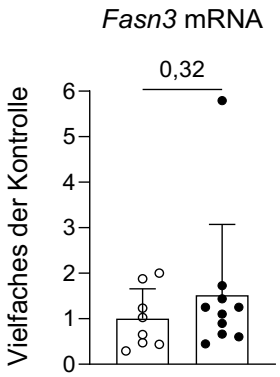
A 21°C *Fasn3*



B 21°C *Acaca1*



C 30°C *Fasn3*



D 30°C *Acaca1*

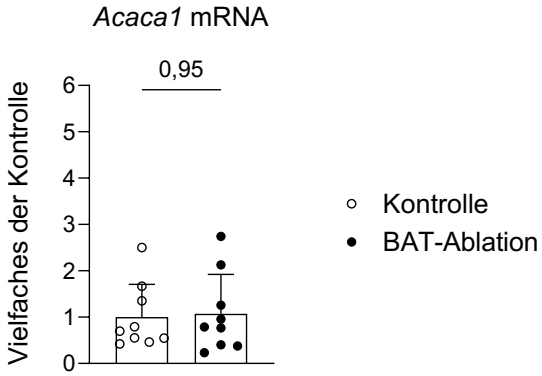


Abb. 16: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die Fasn3 und Acaca1 mRNA-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°- und 30°C-Tieren

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** und **B** bei 21°C und **C** und **D** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Die **A** und **C** *Fasn3* und **B** und **D** *Acaca1* mRNA-Expression im subkutanen WAT der BAT-Ablationstiere drei Wochen nach I/R wurde als Vielfaches der Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A**, **B**, **C** und **D** sind logarithmiert. Daten aus **A** beruhen auf n = 11,10; **B** n = 11,12; **C** n = 8,10; **D** n = 9,9. **A, B**, **C** und **D** *unpaired student´s t-test*.
°C Grad Celsius.

Drei Wochen nach I/R konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und BAT-Ablationsgruppe in Bezug auf die *Lipe3* und *PnPla2* mRNA-Expression bei 21°C-Tieren (p = 0,06 und p = 0,07) und 30°C-Tieren (p = 0,54 und p = 0,57) festgestellt werden (Abbildung 17). Allerdings war die *Lipe3* und *PnPla2* mRNA-Expression bei 21°C-BAT-Ablationstieren tendenziell erniedrigt (p = 0,06 und p = 0,07) (Abbildung 17A und B). Bei thermoneutraler Haltungstemperatur hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf die *Lipe3* und *PnPla2* mRNA-Expression drei Wochen nach I/R.

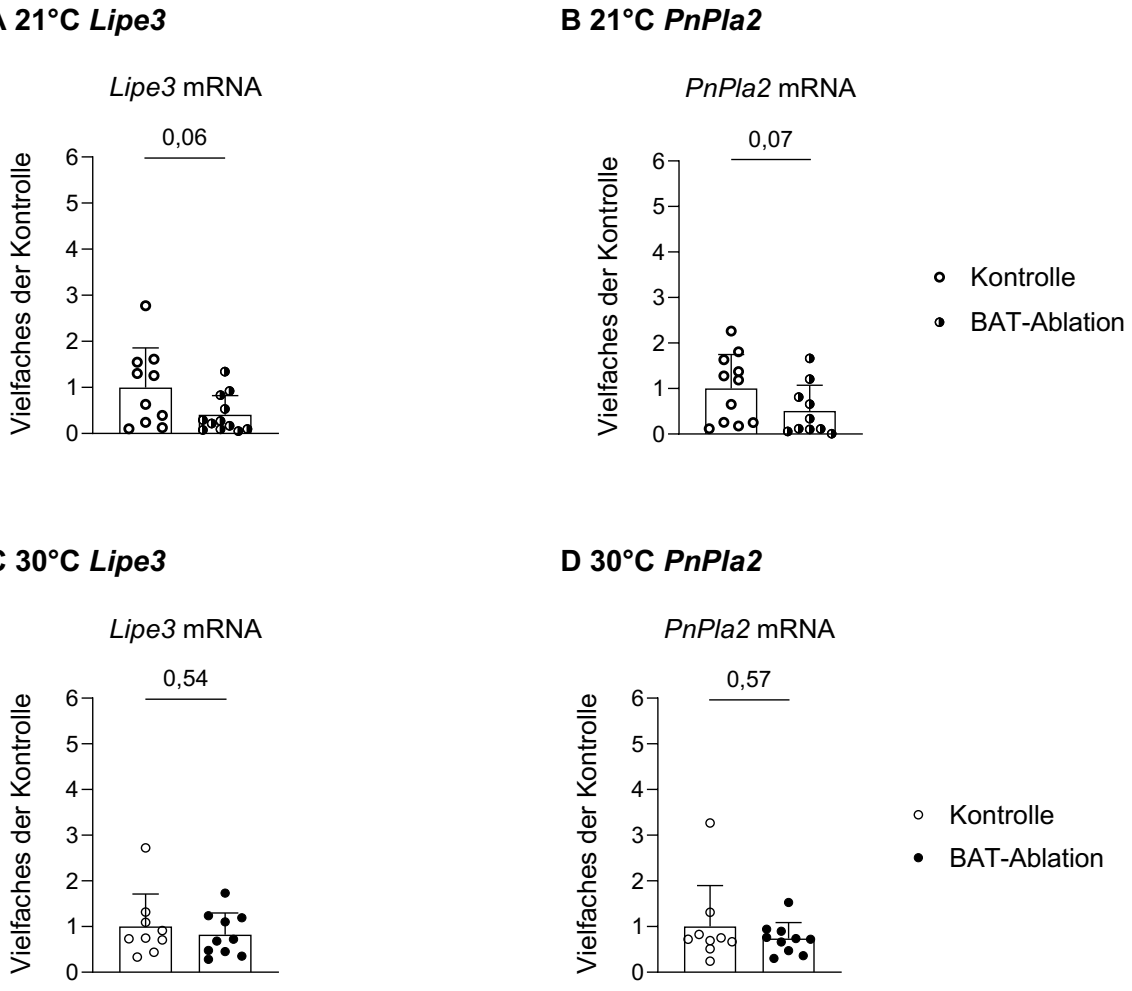


Abb. 17: Tendenziell reduzierte Lipe3 und PnPla2 mRNA-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes

Männliche, 6-9 Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden für den gesamten Versuchszeitraum **A** und **B** bei 21°C und **C** und **D** in einem 30°C-temperierten Klimaschrank gehalten. Drei Wochen nachdem die Tiere einer chirurgischen BAT-Ablation (BAT-Ablation) oder Schein-Operation des BAT (Kontrolle) und einer I/R unterzogen wurden, wurde das subkutane WAT der Tiere entnommen. Die **A** und **B** *Lipe3* und **C** und **D** *PnPla2* mRNA-Expression im subkutanen WAT von BAT-Ablationstiere drei Wochen nach I/R wurde als Vielfaches der Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD aufgeführt. Daten aus **A**, **B**, **C und D** sind logarithmiert**.** Daten aus **A** beruhen auf n = 10,12; **B** n = 11,10; **C** und **D** n = 9,10. **A**, **B**, **C** und **D** *unpaired student´s t-test*.
°C Grad Celsius.

4 Diskussion

4.1 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, die Interorgankommunikation zwischen BAT und WAT nach einem Myokardinfarkt unter Bedingungen zu charakterisieren, die der tatsächlichen Situation im Menschen nahekommen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss einer chirurgischen BAT-Ablation auf die Morphologie und Funktion des subkutanen WAT nach Induktion eines akuten Myokardinfarkts ergänzend zur standardisierten Haltungstemperatur auch bei Thermoneutralität der Tiere untersucht. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich lediglich auf das subkutane WAT, da Studien einen stärkeren Einfluss des BAT sowie der Umgebungstemperatur auf die Lipidspeicherung und die UCP-1-Expression im subkutanen WAT im Vergleich zum viszeralen WAT belegen[66, 86, 155].

Drei Wochen nach I/R konnte kein Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur nachgewiesen werden. Auch ein Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf die Adipozytenmorphologie im subkutanen WAT vergleichend zu scheinoperierten Kontrolltieren blieb in der zugrundeliegenden Arbeit aus. Dagegen zeigte sich das UCP-1-Protein im subkutanen WAT, am ehesten einer kompensatorischen Reaktion bei Kälte entsprechend, von BAT-Ablationstieren tendenziell erhöht. Insgesamt war eine signifikant gesteigerte UCP-1-Expression im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur im Vergleich zu Tieren bei thermoneutraler Haltungstemperatur erkennbar. Des Weiteren führte die chirurgische BAT-Ablation zu einer tendenziell reduzierten Genexpression lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur.

Im Gegensatz zur standardisierten Haltungstemperatur konnte eine signifikante Zunahme des Körpergewichts und des Gewichts des subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei Thermoneutralität drei Wochen nach I/R nachgewiesen werden. Auch wirkte sich die chirurgische BAT-Ablation bei thermoneutraler Haltungstemperatur auf die Adipozytenmorphologie im subkutanen WAT aus. Einer Lipidakkumulation bei Zunahme des subkutanen WAT entsprechend, zeigte sich der Anteil kleiner Adipozyten, welche sich stellenweise im subkutanen WAT gruppierten, nach chirurgischer BAT-Ablation signifikant erniedrigt. Außerdem wurde eine signifikant größere durchschnittliche Adipozytenfläche im subkutanen WAT von Tieren mit Erhalt des BAT bei thermoneutraler Haltungstemperatur im Vergleich zu Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur festgestellt. Das UCP-1-Protein im subkutanen WAT blieb von der chirurgischen BAT-Ablation bei Thermoneutralität unbeeinflusst und war nahezu nicht detektierbar. Ebenso zeigte die chirurgische BAT-Ablation keinen Effekt auf die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT von Tieren bei thermoneutraler Haltungstemperatur.

Zusammenfassend ließ sich in dieser Arbeit ein antilipolytischer Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT herausarbeiten. Sowohl die histomorphologischen als auch die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse waren mit einer reduzierten lipolytischen Aktivität im subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation vereinbar. Der bei standardisierter Haltungstemperatur lediglich molekulargenetischen und der bei thermoneutraler Haltungstemperatur histomorphologischen Darstellung des antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT lag am ehesten ein unterschiedlicher Zeitverlauf der Effektdarstellung zugrunde, welcher wiederrum durch den unterschiedlichen Temperatureinfluss auf das subkutane WAT resultiert. Im Vergleich zwischen beiden Haltungstemperaturen konnten zudem die bereits allgemein bekannte Akkumulation von Lipiden bei Thermoneutralität und die stimulierende Wirkung von Kälte auf die UCP-1-Expression bei standardisierter Haltungstemperatur im subkutanen WAT nachgewiesen werden. Die zugrundeliegenden Daten verdeutlichen, dass die Haltungstemperatur der Versuchstiere durchaus einen Einfluss auf die Forschung nimmt und Forschung insbesondere für eine besser vergleichbare Situation zum Menschen an thermoneutral gehaltenen Versuchstieren erfolgen sollte.

4.2 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes im Modell eines akuten Myokardinfarkts unter standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der chirurgischen BAT-Ablation auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen WAT bei standardisierter Haltungstemperatur drei Wochen nach Myokardinfarkt festgestellt werden. Da das BAT infolge einer Aktivierung den Energieverbrauch durch die Metabolisierung großer Mengen an freien Fettsäuren und Glukose erhöht und somit einer Speicherung dieser Energie im WAT sowie einer Zunahme des Körpergewichts entgegenwirkt[51, 84-86], wäre die chirurgische Ablation des BAT bei standardisierter Haltungstemperatur mit einem Wegfall seines Energieverbrauchs und folglich mit einer Zunahme des subkutanen WAT und Körpergewichts zu erwarten gewesen. Jedoch sei auf die kleine Stichprobengröße in Bezug auf die oben genannte Untersuchung hingewiesen, die nur eine unzureichende Aussagekraft der Ergebnisse zulässt. So haben Vorarbeiten mit einem größeren Stichprobenumfang aus der Forschungsgruppe von Frau Professor Grandoch gezeigt, dass die chirurgische BAT-Ablation bei standardisierter Haltungstemperatur drei Wochen nach Myokardinfarkt zu einem deutlichen Trend hinsichtlich einer Zunahme des Körpergewichts führte[115]. Mit einer größeren Stichprobe wäre demnach auch ein erhöhtes Körpergewicht sowie ein erhöhtes

Gewicht des subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei standardisierter Haltungstemperatur in der zugrundeliegenden Arbeit wahrscheinlich. Im Gegensatz zur standardisierten Haltungstemperatur führte die chirurgische BAT-Ablation bei thermoneutraler Haltungstemperatur drei Wochen nach Myokardinfarkt zu einem signifikant erhöhten Körpergewicht. Ebenso zeigte sich das Gewicht des subkutanen WAT signifikant erhöht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die chirurgische BAT-Ablation infolge einer Zunahme des subkutanen WAT Einfluss auf das Körpergewicht nahm. Ein derartig relevanter Einfluss des BAT auf das subkutane WAT bei bekanntlich minimaler BAT-Aktivität in thermoneutral gehaltenen Versuchstieren wurde bis dato noch nicht nachgewiesen. Jedoch wird angenommen, dass der Einfluss des BAT auf das Körper- und Fettgewicht von der Umgebungstemperatur des Organismus abhängig ist. Im Vergleich zu einer Haltung der Versuchstiere bei standardisierter Haltungstemperatur, durch die das BAT permanent aktiviert wird, geht die basale, auf ein Minimum reduzierte zitterfreie Thermogenese im BAT bei thermoneutraler Haltungstemperatur mit einer Körper- und Fettgewichtszunahme einher[139]. Die verringerte BAT-Aktivität bei Thermoneutralität spiegelt sich durch seine reduzierte sympathische Stimulation wider, dem Hauptstimulus der zitterfreien Thermogenese und des Energieverbrauchs durch das BAT[139]. Eine Zunahme des Körpergewichts von thermoneutral gehaltenen Versuchstieren resultiert daher aus einem stark reduzierten Kalorienverbrauch durch das BAT, welcher eine positive Energiebilanz mit einer Speicherung der überschüssigen Energie im WAT zur Folge hat. Da das BAT bei Thermoneutralität nur minimal Energie verbrennt, wäre vorstellbar gewesen, dass eine chirurgische Ablation dieses Organs bei thermoneutraler Haltungstemperatur keine signifikante Veränderung im Energieverbrauch und somit im Körper- und Fettgewicht bewirkt. Die zugrundeliegenden Ergebnisse demonstrierten das Gegenteil. Dies lässt vermuten, dass BAT zusätzlich zu seinem basalen Energieverbrauch über andere Mechanismen oder auch unabhängig von seinem Energieverbrauch Einfluss auf das Körper- und Fettgewicht nehmen kann. Nicht nur über die BAT-Aktivität, auch per se beeinflusst die Umgebungstemperatur das WAT. Die Lipidspeicherung im WAT wird über die sympathische Innervation desgleichen reguliert[20]. Das Ausmaß der sympathischen Innervation des WAT hängt wiederrum von der Umgebungstemperatur ab. So geht eine thermoneutrale Haltung der Versuchstiere mit einer Unterdrückung der sympathischen Aktivität im WAT und folglich mit einer Größenzunahme (Hypertrophie) weißer Adipozyten bzw. mit einer Zunahme des WAT einher[138, 139]. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigte sich das subkutane Fettgewicht der Versuchstiere bei Thermoneutralität in dieser Arbeit im Vergleich zur standardisierten Haltungstemperatur signifikant erhöht.

Eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf das Körper- und Fettgewicht zu nehmen, stellt die in neueren Studien beschriebene neuronale Verknüpfung zwischen BAT und WAT dar, durch die das BAT einen regulierenden Einfluss auf lipolytische Prozesse im WAT und somit auf

das Körper- und Fettgewicht habe[100, 103, 104]. Über diese neuronale Interorgankommunikation soll die Mobilisierung von Fettsäuren aus dem WAT zur Wiederauffüllung der Substratspeicher im BAT gesteigert werden[100, 103, 104]. Da dem eine permanente Aktivierung des BAT durch eine Haltung der Versuchstiere bei subthermoneutralen Temperaturen oder auch eine gezielte BAT-Aktivierung wie durch eine stärkere Kälteexposition oder den Einsatz von Beta-Sympathomimetika zugrunde liegt, scheint die BAT-Aktivierung eine Voraussetzung für seine stimulierende Wirkung auf die Lipolyse im WAT zu sein. Vor dem Hintergrund dieser wissenschaftlichen Annahme würde in den Versuchstieren mit permanenter BAT-Aktivierung bei standardisierter Haltungstemperatur eine Unterbrechung der neuronalen Verknüpfung zwischen BAT und subkutanem WAT nach chirurgischer BAT-Ablation zu einem Wegfall der stimulierenden Wirkung des BAT auf die Lipolyse im subkutanen WAT führen. Ähnlich zur oben aufgeführten Theorie des Energieverbrauchs würde dies mit einer Akkumulation von Lipiden im subkutanem WAT einhergehen und die tendenzielle Zunahme des Körpergewichts der Versuchstiere bei standardisierter Haltungstemperatur aus den oben genannten Vorarbeiten erklären. In den Versuchstieren bei thermoneutraler Umgebungstemperatur, eine Situation, in der die Aktivierung des BAT auf ein Minimum reduziert wird[139], ist eine Stimulation der neuronalen Verknüpfung zwischen BAT und subkutanem WAT zur Steigerung der Lipolyse im subkutanen WAT unwahrscheinlich. Unter diesen Bedingungen wäre auch nach chirurgischer Ablation des BAT und folglich einer Unterbrechung der neuronalen Verknüpfung zwischen BAT und subkutanem WAT keine relevante Veränderung der lipolytischen Aktivität im subkutanen WAT zu erwarten. Ebenso blieben das Körper- und Fettgewicht nach chirurgischer BAT-Ablation bei Thermoneutralität unbeeinflusst. Unsere Ergebnisse bei thermoneutraler Haltungstemperatur demonstrierten aber das Gegenteil. Somit wäre tatsächlich eine lipolytische Wirkung des BAT auf das subkutane WAT bei Thermoneutralität denkbar. Anderenfalls wäre vorstellbar, dass die Aktivierung des BAT nicht die alleinige Voraussetzung für eine intakte neuronale Kommunikation zwischen BAT und WAT zur Regulation der Lipolyse im WAT darstellt. Womöglich existieren neben der zitterfreien Thermogenese weitere, noch unbekannte Stimuli im BAT, die eine Aktivierung der neuronalen Verknüpfung zur Regulation der Lipolyse im WAT bewirken. Um dies beantworten zu können bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen.

Alternativ zur neuronalen Interorgankommunikation stellen Batokine einen Kommunikationsträger zwischen BAT und WAT dar. So wurden Batokine mit einem Einfluss auf thermogene und lipolytische Prozesse im WAT identifiziert[52, 53] wie das in der Einleitung beispielhaft erläuterte Batokin FGF21. Diesem wird unter anderem eine *Browning*-induzierende Wirkung im WAT anerkannt[59]. Ein *Browning* wiederrum führt zu einer reduzierten Lipidakkumulation im WAT und könnte auf diesem Wege das Körper- und

Fettgewicht beeinflussen (Näheres siehe Kapitel 1.2.2.2). Im Rahmen einer chirurgischen Entfernung des BAT fehlt dem Organismus das Organ zur Sekretion von Batokinen, sodass ein *Browning* im WAT ausbleiben und in der Folge eine Akkumulation von Lipiden resultieren würde. Dies könnte die Zunahme des Körper- und Fettgewichts der BAT-Ablationstiere dieser Arbeit erklären. Allerdings wird die zuvor genannte Theorie durch die bisherige wissenschaftliche Annahme limitiert, dass kein Batokin existiere, welches ausschließlich durch das BAT und nicht auch durch andere Organe oder Gewebe produziert und sezerniert würde[52, 53]. So könnte die bei chirurgischer Entfernung des BAT fehlende Sekretion von Batokinen durch andere Organe oder Gewebe kompensiert werden, wie beispielhaft durch die Leber in Bezug auf das Batokin FGF21[54]. Dies wiederrum könnte ein *Browning* im subkutanen WAT zur Folge haben, trotz der chirurgischen Ablation des BAT und der hierbei ausbleibenden Sekretion von *Browning*-induzierenden Batokinen durch das BAT. Des Weiteren wurde eine Freisetzung bzw. eine verstärkte Genexpression von Batokinen lediglich durch aktiviertes BAT beobachtet[52, 141]. Ähnlich wie in Bezug auf den Energieverbrauch erfolgt vermutlich keine relevante Sekretion von Batokinen durch das BAT im basalen Zustand bei Thermoneutralität. In diesem Sinne wären in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Effekte einer chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT bei thermoneutraler Haltungstemperatur zu erwarten. Eine Beteiligung von Batokinen an der Regulation des Körpergewichts von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur aus den oben genannten Vorarbeiten hingegen wäre durchaus möglich.
Zusammenfassend deuten die vorliegenden Gewichtsdaten auf eine für die Energiehomöostase erforderliche Kommunikation zwischen BAT und subkutanem WAT hin, insbesondere vor dem Hintergrund einer basalen BAT-Aktivität bei Thermoneutralität der Versuchstiere und einer somit besser vergleichbaren Situation zum Menschen.

4.3 Einfluss einer chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das subkutane weiße Fettgewebe im Modell eines akuten Myokardinfarkts unter standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis für die Interorgankommunikation zwischen BAT und WAT zu erlangen, insbesondere in einer für den Menschen vergleichbaren Situation. Wie dem Kapitel 4.2 entnommen werden kann, scheint das BAT in erster Linie vor dem Hintergrund einer basalen BAT-Aktivität in thermoneutral gehaltenen Tieren Einfluss auf die Speicherung von Lipiden im subkutanen WAT zu nehmen. Um den Einfluss des BAT auf die Lipidspeicherung im subkutanen WAT genauer zu charakterisieren, wurden die Adipozytenmorphologie, die Expression des Proteins UCP-1

und die Expression von Genen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT vergleichend zwischen standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur untersucht.

4.3.1 Adipozytenmorphologie

Die Lipidspeicherung im WAT wird insbesondere über die sympathische Innervation desgleichen reguliert. Eine Aktivierung des SNS steigert die Lipolyse und somit die Mobilisierung von Fettsäuren aus dem WAT[20]. Demnach ist auch die Adipozytengröße im WAT von der Aktivierung des SNS abhängig. So wird in Versuchstieren bei subthermoneutralen Haltungstemperaturen eine Reduktion der Adipozytengröße im WAT beobachtet[66, 138, 139]. Ein Grund hierfür ist die Stimulation der sympathischen Innervation und Lipolyse weißer Adipozyten durch Kälte. Umgekehrt führt die Unterdrückung der sympathischen Aktivität im WAT, wie etwa bei Thermoneutralität der Versuchstiere, zu einer Größenzunahme (Hypertrophie) weißer Adipozyten[138, 139].
Darüber hinaus stellt die Sympathikusaktivierung den Hauptstimulus der zitterfreien Thermogenese im BAT dar[139]. Da die Lipolyse im WAT, wie unter Kapitel 1.2.3 beschrieben, auch durch die zitterfreie Thermogenese im BAT reguliert wird[100, 103, 104], ist ein Einfluss des BAT auf die Adipozytengröße im WAT vorstellbar. Mit welcher morphologischen Veränderung die lipolytische Wirkung des BAT im WAT einhergeht und ob hierbei Unterschiede im Vergleich zwischen Versuchstieren bei Kälte und bei Thermoneutralität vorliegen, geht aus der aktuellen Literatur nicht hervor.
Die zugrundeliegende Arbeit sollte den Einfluss des BAT auf die Lipidspeicherung und Adipozytenmorphologie des subkutanen WAT im Vergleich zwischen den Zuständen einer permanenten BAT-Aktivierung bei standardisierter Haltungstemperatur und einer basalen BAT-Aktivität bei Thermoneutralität der Versuchstiere und somit einer für den Menschen besser vergleichbaren Situation charakterisieren.

Sowohl bei standardisierter als auch bei thermoneutraler Haltungstemperatur konnte in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf die durchschnittliche Adipozytengröße im subkutanen WAT drei Wochen nach Myokardinfarkt festgestellt werden. Nur im Vergleich zwischen beiden Haltungstemperaturen von Tieren mit Erhalt des BAT unterschied sich die durchschnittliche Adipozytengröße im subkutanen WAT. In Übereinstimmung mit der Literatur[138], zeigte sich der weiße Adipozyt von Tieren mit Erhalt des BAT bei Thermoneutralität im Durchschnitt größer als bei standardisierter Haltungstemperatur. Aus welchem Grund dieser Effekt im subkutanen WAT von Tieren mit chirurgischer BAT-Ablation ausblieb, ist ungewiss. Dessen ungeachtet weisen unsere Daten am ehesten darauf hin, dass dem durchschnittlich größeren weißen Adipozyten bei Thermoneutralität eine reduzierte sympathische Aktivierung und somit lipolytische Aktivität

zugrunde liegen. Folglich ist ein temperaturabhängiger Effekt auf die durchschnittliche Adipozytengröße im subkutanen WAT am naheliegendsten. Die durchschnittliche Größe weißer Adipozyten scheint durch das BAT selbst nicht beeinflusst zu werden, sowohl bei standardisierter als auch bei thermoneutraler Haltungstemperatur.
Auch bezüglich der Adipozytengrößenverteilung im subkutanen WAT blieb ein statistisch signifikanter Effekt der chirurgischen BAT-Ablation bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur drei Wochen nach Myokardinfarkt aus. Der durchschnittlich größeren weißen Adipozyten entsprechend zeigte sich im subkutanen WAT von Tieren mit Erhalt des BAT bei Thermoneutralität auch eine signifikant reduzierte absolute Anzahl von Adipozyten in der Kategorie > 250 µm² bis ≤ 500 µm² sowie ein deutlicher Trend hinsichtlich absolut weniger Adipozyten in der Kategorie > 50 µm² bis ≤ 250 µm². Zudem war die relative Anzahl der weißen Adipozyten in der Kategorie > 1000 µm² bis ≤ 1250 µm² sowie > 1500 µm² von BAT-Ablationstieren bei Thermoneutralität tendenziell erhöht. Eine Verschiebung der Adipozytenanzahl hin zu mehr größeren Adipozyten im subkutanen WAT unter den Bedingungen einer grundlegend reduzierten sympathischen Aktivität bei Thermoneutralität scheint plausibel. Aus welchem Grund sich dieser Temperatur-Effekt auf die Lipidspeicherung im subkutanen WAT derart uneinheitlich zwischen Tieren mit und ohne BAT sowie zwischen der absoluten und relativen Adipozytengrößenverteilung darstellte, blieb fraglich.

Darüber hinaus wurden Gruppierungen kleiner Adipozyten im subkutanen WAT entdeckt. Um Adipozyten dieser Gruppierungen von den restlichen Adipozyten des subkutanen WAT abzugrenzen, wurden diese schlicht als „kleine Adipozyten“ bezeichnet. Hierbei war ein Vergleich der Ergebnisse zwischen beiden Haltungstemperaturen nicht möglich, weil sich die Größe, ab der die kleinen Adipozyten detektierbar waren, zwischen beiden Haltungstemperaturen unterschied.
Der Anteil kleiner Adipozyten zeigte sich in BAT-Ablationstieren bei thermoneutraler Haltungstemperatur drei Wochen nach Myokardinfarkt signifikant erniedrigt. Um diesen Zusammenhang deuten zu können, erwies sich die unter Kapitel 4.2 genannte lipolytische Wirkung des BAT auf das WAT, vermittelt über neuronale Verknüpfungen zwischen BAT und WAT, als hilfreich[100, 103, 104]. Dieser liegt jedoch eine permanente Aktivierung des BAT durch eine Haltung der Versuchstiere bei subthermoneutralen Temperaturen oder auch eine gezielte BAT-Aktivierung wie durch eine stärkere Kälteexposition oder den Einsatz von Beta-Sympathomimetika zugrunde. Ob das BAT bei basaler Grundaktivität in thermoneutral gehaltenen Versuchstieren eine lipolytische Wirkung auf das subkutane WAT hat, ist nicht bekannt. Unsere Gewichtsdaten ließen tatsächlich eine lipolytische Wirkung des BAT auf das subkutane WAT bei Thermoneutralität vermuten. So zeigten unsere Versuchstiere eine Zunahme des subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation bei Thermoneutralität,

sprich nach einem Wegfall der lipolytischen Wirkung des BAT und einer konsekutiven Akkumulation von Lipiden im subkutanen WAT. Entsprechend ließe sich der reduzierte Anteil von kleinen weißen Adipozyten nach chirurgischer BAT-Ablation bei thermoneutraler Haltungstemperatur erklären. So wirkte die Akkumulation von Lipiden im subkutanen WAT bei einem Wegfall der lipolytischen Wirkung des BAT nach chirurgischer BAT-Ablation einer Gruppierung kleiner weißer Adipozyten entgegen.

Erstaunlicherweise blieb der oben beschriebene Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf die kleinen Adipozyten im subkutanen WAT bei standardisierter Haltungstemperatur aus. Weil sich der Versuchsaufbau zwischen 21°- und 30°-Tieren lediglich in der Haltungstemperatur unterschied, wäre eine Verzerrung des Effekts durch die Haltungstemperatur denkbar. Dies könnte wie folgt zu Stande kommen: Nach chirurgischer Ablation des BAT fehlt dem Organismus ein Organ, welches Wärme produziert, sodass die Kältebelastung des Organismus bei standardisierter Haltungstemperatur zunimmt. Kälte stimuliert bekanntlich das SNS und infolgedessen die Lipolyse im WAT[66, 139]. Bei einem gesteigerten Kälteempfinden der Versuchstiere nach chirurgischer BAT-Ablation wäre folglich eine Steigerung der ohnehin stimulierten Lipolyse im subkutanen WAT bei standardisierter Haltungstemperatur anzunehmen. Dies würde der Akkumulation von Lipiden im subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation entgegenwirken und dazu führen, dass sich der Effekt eines reduzierten Anteils kleiner weißer Adipozyten nach chirurgischer BAT-Ablation zeitlich verzögert darstellt bzw. in Bezug auf die vorliegende Arbeit zum Untersuchungszeitpunkt von drei Wochen nach Myokardinfarkt noch nicht darstellen lässt. Auf diese Weise wäre der nahezu vergleichbare Anteil kleiner Adipozyten im WAT zwischen Tieren mit Erhalt und chirurgischer Ablation des BAT bei standardisierter Haltungstemperatur erklärbar. Da Mäuse bei Thermoneutralität nicht frieren und nicht auf die Wärmeproduktion durch das BAT angewiesen sind[121], wäre eine Aktivierung des SNS mit Stimulation der Lipolyse im subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation unwahrscheinlich. So würde einer Akkumulation von Lipiden im subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation bei Thermoneutralität nicht entgegengewirkt werden. Dementsprechend zeigte sich der Anteil kleiner Adipozyten im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei Thermoneutralität bereits reduziert. Trotz dass ein direkter Einfluss der Haltungstemperatur auf die kleinen Adipozyten im subkutanen WAT nicht untersucht werden konnte, können wir schlussfolgern, dass der Effekt eines reduzierten Anteils kleiner weißer Adipozyten nach chirurgischer BAT-Ablation von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur durch Kälte verzerrt wurde und sich demnach im Vergleich zu Tieren bei Thermoneutralität noch nicht nachweisen ließ.

Zusammenfassend hatte die chirurgische BAT-Ablation keinen Einfluss auf die durchschnittliche Adipozytengröße sowie die Adipozytengrößenverteilung im subkutanen

WAT von Tieren bei standardisierter sowie thermoneutraler Haltungstemperatur. Dagegen wirkte die chirurgische BAT-Ablation einer Gruppierung kleiner Adipozyten im subkutanen WAT entgegen, am ehesten infolge einer Akkumulation von Lipiden. Dieser Effekt schien wie oben ausführlich beschrieben durch Kälte verzerrt worden zu sein.

4.3.2 UCP-1-Expression

Die Expression von UCP-1 im WAT wurde erstmals im Rahmen einer Kälteexposition von Versuchstieren beobachtet[75, 76]. Ähnlich wie im BAT, wird von einer Stimulation verschiedener Lipasen über den adrenergen β3-Rezeptor zur Aktivierung und Expression von UCP-1 in weißen Adipozyten ausgegangen, die in der Folge einen „braunen" Phänotyp annehmen[73]. Dieses Phänomen ist unter dem Begriff „*Browning*" bekannt[6]. Wie man der Morphologie entnehmen kann, speichern braune Adipozyten im WAT, sogenannte beige Adipozyten, weniger Lipide als weiße Adipozyten[138], sodass insgesamt eine Reduktion des WAT durch ein *Browning* denkbar wäre. Eine Resistenz gegen ernährungsbedingte Fettleibigkeit durch ein *Browning* konnte bereits nachgewiesen werden[78, 81]. Neben der Kälteexposition sind eine dysfunktionale zitterfreie Thermogenese im BAT und einzelne Batokine mit einer UCP-1-Expression im WAT assoziiert[53, 72, 78, 79]. Hierbei sei auf die standardisierte Haltungstemperatur der Versuchstiere und somit auf den Einfluss durch Kälte hingewiesen.
Bei Thermoneutralität konnte bisher keine Expression von UCP-1 im WAT nachgewiesen werden[76, 138]. Ob das BAT einen Einfluss auf die UCP-1-Expression im WAT bei Thermoneutralität hat, ist bislang unbekannt.
Hier wurde der Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf die UCP-1-Expression im subkutanen WAT, sowohl bei standardisierter als auch bei thermoneutraler Haltungstemperatur, geprüft.

In der vorliegenden Arbeit konnte unter beiden Haltungstemperaturen kein statistisch signifikanter Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf die UCP-1-Expression im subkutanen WAT drei Wochen nach Myokardinfarkt festgestellt werden. Nur bei standardisierter Haltungstemperatur zeigte sich tendenziell eine stärkere UCP-1-Expression im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren verglichen zu Tieren mit Erhalt des BAT. Dies ist vermutlich auf ein kompensatorisches *Browning* bei Verlust der zitterfreien Thermogenese nach chirurgischer BAT-Ablation zurückzuführen. So konnten im Rahmen einer dysfunktionalen zitterfreien Thermogenese im BAT bei simultaner Kälteexposition eine verstärkte UCP-1-Expression und eine erhöhte Temperatur im WAT zur Kompensation des Wärmeverlustes beobachtet werden[72, 78, 79].Hierbei blieb unklar, über welchen Mechanismus die Information der dysfunktionalen zitterfreien Thermogenese im

BAT das WAT erreichte. Diskutiert wird ein Austausch über sensorische Afferenzen des BAT, die eine reduzierte BAT-Temperatur oder sezernierte Faktoren als Ausdruck der dysfunktionalen zitterfreien Thermogenese registrieren und diese Information an das WAT weiterleiten würden[79]. Da im vorliegenden Modell von einer Unterbrechung neuronal-endokriner Mechanismen zwischen BAT und subkutanem WAT nach chirurgischer BAT-Ablation ausgegangen werden kann, scheint der tendenziell stärkeren UCP-1-Expression im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei standardisierter Haltungstemperatur ein anderer Mechanismus zugrunde zu liegen. Vermutlich nahmen die BAT-Ablationstiere den Wärmeverlust durch das fehlende BAT in einer für sie ohnehin kalten Umgebung bei standardisierter Haltungstemperatur schlichtweg als zusätzliche Kältebelastung wahr, wodurch die Stimulation des SNS und folglich der UCP-1-Expression im subkutanen WAT gesteigert wurden. Auch unsere Ergebnisse bei Thermoneutralität sind mit dieser Überlegung vereinbar. Unabhängig vom BAT ließ sich nahezu kein UCP-1 im subkutanen WAT bei Thermoneutralität detektieren. Weil Mäuse bei Thermoneutralität nicht frieren und nicht auf die Wärmeproduktion durch das BAT angewiesen sind[121], löste der Verlust des BAT vermutlich keinen Kältereiz aus. Folglich würden die Aktivierung des SNS und einer UCP-1-Expression im subkutanen WAT ausbleiben, was die vorliegenden Ergebnisse bestätigen konnten.

Im Vergleich zwischen beiden Haltungstemperaturen zeigte sich die UCP-1-Expression im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur signifikant erhöht. Wie bereits erläutert, ist Kälte ein Auslöser für die UCP-1-Expression im WAT[75, 76] und liefert somit eine Erklärung für diese Beobachtung. Daten von de Jong JMA et al.[138] bestätigen den Einfluss der Umgebungstemperatur auf die UCP-1-Expression im WAT. Während kein Nachweis einer UCP-1-Expression im WAT bei Thermoneutralität gelang, waren reichlich UCP-1-positive Adipozyten im WAT unter dem Einfluss von Kälte erkennbar[138]. Hierbei war die UCP-1-Expression im WAT von Tieren bei 5°C stärker ausgeprägt als bei standardisierter Haltungstemperatur[138]. Mit einfachen Worten: eine stärkere Kältebelastung steigerte auch die UCP-1-Expression im WAT.

Zusammenfassend bestätigen die zugrundeliegenden Untersuchungen die bisherige wissenschaftliche Feststellung, dass eine UCP-1-Expression im subkutanen WAT von Tieren bei Thermoneutralität ausbleibt. Zudem konnte gezeigt werden, dass BAT hierbei keine Rolle spielt. Mutmaßlich liefern die vorliegenden Ergebnisse erstmals den Nachweis dafür, dass BAT keinen Einfluss auf die UCP-1-Expression im subkutanen WAT von Tieren bei Thermoneutralität hat. Zuletzt scheint eine Expression von UCP-1 nicht an dem in den Kapiteln 4.2 und 4.3.1 beschriebenen Effekt des BAT auf die Lipidspeicherung im subkutanen WAT von thermoneutral gehaltenen Versuchstieren beteiligt zu sein.

4.3.3 mRNA-Expression von Markergenen der Lipogenese und Lipolyse

Zuletzt wurde der Einfluss einer chirurgischen BAT-Ablation auf die Expression von Markergenen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT bei standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur untersucht. Dies könnte zum Verständnis der bisher beobachteten Effekte einer chirurgischen BAT-Ablation auf das Körper- und Fettgewicht sowie die Adipozytenmorphologie im subkutanen WAT beitragen. Jedoch lässt unsere Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Markergenen des Lipidstoffwechsels im subkutanen WAT lediglich einen Vergleich zwischen BAT-Ablationstieren und Tieren mit Erhalt des BAT, aber keinen Vergleich der Ergebnisse zwischen beiden Haltungstemperaturen der Versuchstiere zu. Bis dato sind keine direkte Wirkung des BAT sowie kein direkter Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Genexpression lipogener und lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT bekannt.

Sowohl bei standardisierter als auch bei thermoneutraler Haltungstemperatur konnte kein statistisch signifikanter Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf die Genexpression lipogener und lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT drei Wochen nach Myokardinfarkt festgestellt werden. Nur bei standardisierter Haltungstemperatur zeigte sich ein deutlicher Trend hinsichtlich einer reduzierten Genexpression lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren im Vergleich zu Tieren mit Erhalt des BAT. Einen Erklärungsansatz liefert die bereits unter Kapitel 4.2 beschriebene, stimulierende Wirkung des BAT auf die Lipolyse im WAT[100, 103, 104]. Demzufolge würde der lipolytische Effekt des BAT auf das subkutane WAT nach chirurgischer BAT-Ablation entfallen und zu einer reduzierten lipolytischen Aktivität im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren führen. Die zuvor genannte, tendenziell reduzierte Genexpression lipolytischer Enzyme im subkutanen WAT der BAT-Ablationtiere bei standardisierter Haltungstemperatur steht mit dieser Theorie in Einklang.

Interessanterweise blieb dieser antilipolytische Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf molekulargenetischer Ebene im subkutanen WAT von Tieren bei Thermoneutralität aus. Dagegen führte die chirurgische BAT-Ablation in thermoneutralen Tieren zu einer histomorphologischen Veränderung im subkutanen WAT, wie unter Kapitel 4.3.1 erläutert, mit dem Resultat einer relativen Reduktion von kleinen weißen Adipozyten. Auch diese Entdeckung ließ sich durch einen Wegfall der lipolytischen Wirkung des BAT mit konsekutiver Akkumulation von Lipiden und weniger kleinen Adipozyten im subkutanen WAT erklären (siehe Kapitel 4.3.1). Bezüglich der verschiedenartigen Darstellung des antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT verglichen zwischen beiden Haltungstemperaturen, sprich auf molekulargenetischer Ebene bei standardisierter Haltungstemperatur und auf histomorphologischer Ebene bei

thermoneutraler Haltungstemperatur, sollte berücksichtigt werden, dass es sich um zwei unterschiedliche und zeitlich voneinander abhängige Untersuchungsansätze handelte: Während Genexpressionsanalysen Auskunft über die Regulation entsprechender Gene geben, spiegeln histomorphologische Aspekte eine Veränderung auf Proteinebene wider, der wiederrum eine molekulargenetische Veränderung voraus geht. Somit scheint sich der antilipolytische Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT bei standardisierter Haltungstemperatur tendenziell erst molekulargenetisch und noch nicht histomorphologisch darzustellen. Zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt nach Myokardinfarkt wäre auch eine histomorphologische Veränderung im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei standardisierter Haltungstemperatur denkbar. Bei thermoneutraler Haltungstemperatur hingegen zeigte sich der antilipolytische Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf histomorphologischer Ebene im subkutanen WAT zum Untersuchungszeitpunkt drei Wochen nach Myokardinfarkt zeitlich weiter fortgeschritten. Zusammengenommen scheint sich der antilipolytische Effekt der chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT verglichen zwischen standardisierter und thermoneutraler Haltungstemperatur zeitversetzt darzustellen. Einen möglichen Grund für die zeitlich verzögerte Darstellung des antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur liefert die in dem Kapitel 4.3.1 beschriebene Effektverzerrung durch Kälte. Der stimulierende Einfluss durch Kälte auf die Lipolyse im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur, der sich nach chirurgischer BAT-Ablation, eines gesteigerten Kälteempfindens zufolge, verstärkt, wirkt dem antilipolytischen Effekt der chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT entgegen und führt dazu, dass sich dieser zeitlich verzögert präsentiert verglichen zu den Untersuchungen der Tiere bei Thermoneutralität (detaillierte Erklärung unter Kapitel 4.3.1). Unter der Berücksichtigung, dass eine molekulargenetische Veränderung einer histomorphologischen Veränderung vorausgeht, erklärt dies die lediglich tendenziell molekulargenetische Darstellung des antilipolytischen Effekts der chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur und die bereits histomorphologische Darstellung bei thermoneutraler Haltungstemperatur der Tiere, bei der eine Effektverzerrung durch Kälte ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 4.3.1). In gleicher Weise würde sich rückblickend das von der chirurgischen BAT-Ablation noch unbeeinflusste Gewicht des subkutanen WAT von Tieren bei standardisierter Haltungstemperatur und das hingegen signifikant erhöhte Gewicht des subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren bei thermoneutraler Haltungstemperatur erklären.

Zusammenfassend zeigte sich ein deutlicher Trend zur reduzierten Expression lipolytischer Markergene im subkutanen WAT nach chirurgischer BAT-Ablation bei standardisierter Haltungstemperatur. Wie oben erläutert, stellte sich dieser antilipolytische Effekt in

thermoneutral gehaltenen Tieren nicht molekulargenetisch, sondern zeitversetzt und demnach histomorphologisch in einem reduzierten relativen Anteil kleiner weißer Adipozyten dar. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse untermauern dennoch die anfängliche Vermutung, dass dem Einfluss der chirurgischen BAT-Ablation auf die Lipidspeicherung im subkutanen WAT tatsächlich eine antilipolytische Wirkung zugrunde liegt. Aus welchem Grund die Expression von Markergenen der Lipogenese nicht von der chirurgischen BAT-Ablation beeinflusst wurde, blieb unklar. Gezielte Untersuchungen bezüglich eines Einflusses des BAT auf die Lipogenese im WAT liegen bis dato nicht vor. Somit liefert die zugrundeliegende Arbeit erstmals einen indirekten Nachweis dafür, dass BAT scheinbar keinen Einfluss auf die Lipogenese im subkutanen WAT hat.

Abschließend konnte in der vorliegenden Arbeit ein antilipolytischer Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT herausgearbeitet werden, insbesondere unter Bedingungen, die der tatsächlichen Situation im Menschen nahekommen, sprich bei Thermoneutralität der Versuchstiere. So führte die chirurgische BAT-Ablation in erster Linie bei thermoneutraler Haltungstemperatur zu einer Zunahme des Körpergewichts und des subkutanen WAT der Versuchstiere. Die hierbei makroskopisch festgestellte Speicherung von Lipiden im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren präsentierte sich histomorphologisch in einem reduzierten relativen Anteil kleiner weißer Adipozyten. Molekulargenetisch zeigte sich interessanterweise kein Einfluss der chirurgischen BAT-Ablation auf den Lipidstoffwechsel im subkutanen WAT. Lediglich bei standardisierter Haltungstemperatur war ein deutlicher Trend zur reduzierten Expression lipolytischer Markergene im subkutanen WAT von BAT-Ablationstieren nachweisbar, während ein antilipolytischer Effekt der chirurgischen BAT-Ablation auf histomorphologischer Ebene im subkutanen WAT bei standardisierter Haltungstemperatur ausblieb. Dieser verschiedenartigen Darstellung des antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation im subkutanen WAT verglichen zwischen beiden Haltungstemperaturen lag am ehesten ein unterschiedlicher Zeitverlauf der Effektdarstellung zugrunde, welcher wiederrum durch den unterschiedlichen Temperatureinfluss auf das subkutane WAT resultiert. Die zugrundeliegende Arbeit verdeutlicht die Relevanz der Haltungstemperatur von Versuchstieren für die Forschung, insbesondere vor dem Hintergrund einer Translation dieser Ergebnisse auf den Menschen.

4.4 Limitationen

Eine Limitation für die Interpretation der Ergebnisse stellte das zugrundeliegende Modell des Myokardinfarkts ohne entsprechende Vergleichsgruppe mit Versuchstieren ohne Induktion eines akuten Myokardinfarkts dar. Demzufolge blieb die Bedeutung der hier festgestellten Interorgankommunikation zwischen BAT und WAT im Rahmen eines Myokardinfarkts unklar, insbesondere vor dem Hintergrund der kardioprotektiven Funktion des BAT, welche in Vorarbeiten der Forschungsgruppe von Frau Professor Grandoch herausgearbeitet werden konnte. Zudem kann ein Einfluss des Myokardinfarkts per se auf die Daten dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. So ist anerkannt, dass eine akute Myokardischämie mit einer kurzzeitigen, systemischen Aktivierung des SNS einhergeht[105, 106] und temporär die Lipolyse im WAT verstärkt[107]. Weil das SNS der Hauptaktivator des BAT ist[37, 47], liegt auch eine temporäre Aktivierung des BAT nach Myokardinfarkt nahe. Vorarbeiten der Forschungsgruppe von Frau Professor Grandoch bestätigten dies. So konnte eine signifikante Hochregulation der UCP-1-mRNA im BAT zu einem frühen Zeitpunkt nach Myokardinfarkt nachgewiesen werden[115]. Darüber hinaus ist die Aktivierung des BAT bekanntlich mit einer Stimulation der Lipolyse im WAT assoziiert[100, 103, 104], sodass eine Stimulation der Lipolyse im WAT über die Aktivierung des BAT nach Myokardinfarkt denkbar wäre. In den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.3 wurde zudem eine Verzerrung des in dieser Arbeit herausgearbeiteten antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT durch Kälte diskutiert. Ähnlich zu dieser Überlegung wäre eine Verzerrung des antilipolytischen Effekts einer chirurgischen BAT-Ablation auf das subkutane WAT durch die akute Myokardischämie, welche temporär die Lipolyse im WAT verstärkt. Mit anderen Worten: eine temporär verstärkte Lipolyse im subkutanen WAT nach akuter Myokardischämie könnte dem antilipolytischen Effekt einer chirurgischen BAT-Ablation entgegenwirken mit einer folglich zeitlich verzögerten Darstellung dieses Effekts. Da die Untersuchungen jedoch drei Wochen nach dem Myokardinfarkt und nicht zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt wurden, ist ein Einfluss der kurzzeitigen Sympathikusaktivierung nach Myokardinfarkt auf das BAT und subkutane WAT der Versuchstiere unwahrscheinlich.

Eine weitere Limitation der Ergebnisse ergab sich im Hinblick auf die chirurgische BAT-Ablation, welche lediglich das interskapuläre BAT-Depot umfasste. Trotz der Entfernung des interskapulären und somit des größten BAT-Depots[37] ist ein Einfluss belassener kleiner BAT-Depots auf das subkutane WAT von BAT-Ablationstieren möglich.

Ferner galt es zu berücksichtigen, dass die Gewebeproben von Versuchstieren bei standardisierter Haltungstemperatur aus Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe entstammten. Störeinflüsse auf den damaligen Versuchsdurchlauf, die im

zugrundeliegenden Experiment ebenso vorliegen, abweichen oder ausbleiben könnten, sind möglich und könnten die vorliegenden Ergebnisse beeinflusst haben.

4.5 Ausblick

Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervorging, stellte sich die antilipolytische Wirkung einer chirurgischen BAT-Ablation in Abhängigkeit von der Haltungstemperatur der Versuchstiere unterschiedlich im subkutanen WAT dar. Dies verdeutlicht die Relevanz der Haltungstemperatur von Versuchstieren für die Forschung, insbesondere vor dem Hintergrund einer Translation der Ergebnisse auf den Menschen. Für eine besser vergleichbare Situation zum Menschen und eine Translation von Forschung an Versuchstieren in den Menschen sollte ergänzend zur standardisierten Haltungstemperatur der Versuchstiere auf eine vergleichende Durchführung der Versuche in thermoneutralen Versuchstieren geachtet werden.

5 Literaturverzeichnis

(1) WHO. *The top 10 causes of death*. 2021. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death (Letzter Zugriff am 11.10.2024).

(2) Statistisches Bundesamt. *Todesursachenstatistik*. 2023. https://www-genesis.destatis.de/datenbank/beta/statistic/23211/table/23211-0001 (Letzter Zugriff am 12.10.2024).

(3) Neumann, F. J.; Sousa-Uva, M.; Ahlsson, A.; Alfonso, F.; Banning, A. P.; Benedetto, U.; Byrne, R. A.; Collet, J. P.; Falk, V.; Head, S. J.; et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* **2019**, *40* (2), 87-165. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy394 From NLM.

(4) Hardouin, P.; Rharass, T.; Lucas, S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol (Lausanne)* **2016**, *7*, 85. DOI: 10.3389/fendo.2016.00085 From NLM.

(5) Ikeda, K.; Maretich, P.; Kajimura, S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* **2018**, *29* (3), 191-200. DOI: 10.1016/j.tem.2018.01.001 From NLM.

(6) Park, A.; Kim, W. K.; Bae, K. H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* **2014**, *6* (1), 33-42. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i1.33 From NLM.

(7) Sakers, A.; De Siqueira, M. K.; Seale, P.; Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **2022**, *185* (3), 419-446. DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.016 From NLM.

(8) Kersten, S. The impact of fasting on adipose tissue metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **2023**, *1868* (3), 159262. DOI: 10.1016/j.bbalip.2022.159262 From NLM.

(9) Brito, N. A.; Brito, M. N.; Bartness, T. J. Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2008**, *294* (5), R1445-1452. DOI: 10.1152/ajpregu.00068.2008 From NLM.

(10) Gilgen, A.; Maickel, R. P.; Nikodijevic, O.; Brodie, B. B. Essential role of catecholamines in the mobilization of free fatty acids and glucose after exposure to cold. *Life Sci (1962)* **1962**, *1*, 709-715. DOI: 10.1016/0024-3205(62)90138-8 From NLM.

(11) Vallerand, A. L.; Zamecnik, J.; Jones, P. J.; Jacobs, I. Cold stress increases lipolysis, FFA Ra and TG/FFA cycling in humans. *Aviat Space Environ Med* **1999**, *70* (1), 42-50. From NLM.

(12) Zimmermann, R.; Strauss, J. G.; Haemmerle, G.; Schoiswohl, G.; Birner-Gruenberger, R.; Riederer, M.; Lass, A.; Neuberger, G.; Eisenhaber, F.; Hermetter, A.; et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **2004**, *306* (5700), 1383-1386. DOI: 10.1126/science.1100747 From NLM.

(13) Lass, A.; Zimmermann, R.; Oberer, M.; Zechner, R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* **2011**, *50* (1), 14-27. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.10.004 From NLM.

(14) Haemmerle, G.; Zimmermann, R.; Hayn, M.; Theussl, C.; Waeg, G.; Wagner, E.; Sattler, W.; Magin, T. M.; Wagner, E. F.; Zechner, R. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* **2002**, *277* (7), 4806-4815. DOI: 10.1074/jbc.M110355200 From NLM.

(15) Tornqvist, H.; Belfrage, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem* **1976**, *251* (3), 813-819. From NLM.

(16) Karlsson, M.; Contreras, J. A.; Hellman, U.; Tornqvist, H.; Holm, C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* **1997**, *272* (43), 27218-27223. DOI: 10.1074/jbc.272.43.27218 From NLM.

(17) Schweiger, M.; Schreiber, R.; Haemmerle, G.; Lass, A.; Fledelius, C.; Jacobsen, P.; Tornqvist, H.; Zechner, R.; Zimmermann, R. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* **2006**, *281* (52), 40236-40241. DOI: 10.1074/jbc.M608048200 From NLM.

(18) Granneman, J. G.; Moore, H. P.; Granneman, R. L.; Greenberg, A. S.; Obin, M. S.; Zhu, Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* **2007**, *282* (8), 5726-5735. DOI: 10.1074/jbc.M610580200 From NLM.

(19) Granneman, J. G.; Moore, H. P.; Krishnamoorthy, R.; Rathod, M. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* **2009**, *284* (50), 34538-34544. DOI: 10.1074/jbc.M109.068478 From NLM.

(20) Bartness, T. J.; Liu, Y.; Shrestha, Y. B.; Ryu, V. Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol* **2014**, *35* (4), 473-493. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.04.001 From NLM.

(21) Clifford, G. M.; Londos, C.; Kraemer, F. B.; Vernon, R. G.; Yeaman, S. J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* **2000**, *275* (7), 5011-5015. DOI: 10.1074/jbc.275.7.5011 From NLM.

(22) Yost, T. J.; Jensen, D. R.; Haugen, B. R.; Eckel, R. H. Effect of dietary macronutrient composition on tissue-specific lipoprotein lipase activity and insulin action in normal-weight subjects. *Am J Clin Nutr* **1998**, *68* (2), 296-302. DOI: 10.1093/ajcn/68.2.296 From NLM.

(23) Wang, H.; Eckel, R. H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**, *297* (2), E271-288. DOI: 10.1152/ajpendo.90920.2008 From NLM.

(24) Coelho, M.; Oliveira, T.; Fernandes, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* **2013**, *9* (2), 191-200. DOI: 10.5114/aoms.2013.33181 From NLM.

(25) Lehr, S.; Hartwig, S.; Sell, H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl* **2012**, *6* (1-2), 91-101. DOI: 10.1002/prca.201100052 From NLM.

(26) Harwood, H. J., Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* **2012**, *63* (1), 57-75. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.12.010 From NLM.

(27) Goldstein, B. J.; Scalia, R. G.; Ma, X. L. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **2009**, *6* (1), 27-35. DOI: 10.1038/ncpcardio1398 From NLM.

(28) Farooqi, I. S.; O'Rahilly, S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol* **2014**, *223* (1), T63-70. DOI: 10.1530/joe-14-0480 From NLM.

(29) Carbone, F.; La Rocca, C.; Matarese, G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie* **2012**, *94* (10), 2082-2088. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.05.018 From NLM.

(30) Hirsch, J.; Batchelor, B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* **1976**, *5* (2), 299-311. DOI: 10.1016/s0300-595x(76)80023-0 From NLM.

(31) Krotkiewski, M.; Björntorp, P.; Sjöström, L.; Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* **1983**, *72* (3), 1150-1162. DOI: 10.1172/jci111040 From NLM.

(32) Chait, A.; den Hartigh, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med* **2020**, *7*, 22. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00022 From NLM.

(33) Mittendorfer, B.; Magkos, F.; Fabbrini, E.; Mohammed, B. S.; Klein, S. Relationship between body fat mass and free fatty acid kinetics in men and women. *Obesity (Silver Spring)* **2009**, *17* (10), 1872-1877. DOI: 10.1038/oby.2009.224 From NLM.

(34) Lavie, C. J.; Milani, R. V.; Ventura, H. O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol* **2009**, *53* (21), 1925-1932. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.12.068 From NLM.

(35) Considine, R. V.; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; McKee, L. J.; Bauer, T. L.; et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* **1996**, *334* (5), 292-295. DOI: 10.1056/nejm199602013340503 From NLM.

(36) Ahl, S.; Guenther, M.; Zhao, S.; James, R.; Marks, J.; Szabo, A.; Kidambi, S. Adiponectin Levels Differentiate Metabolically Healthy vs Unhealthy Among Obese and Nonobese White Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100* (11), 4172-4180. DOI: 10.1210/jc.2015-2765 From NLM.

(37) Cannon, B.; Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **2004**, *84* (1), 277-359. DOI: 10.1152/physrev.00015.2003 From NLM.

(38) Cannon, B.; de Jong, J. M. A.; Fischer, A. W.; Nedergaard, J.; Petrovic, N. Human brown adipose tissue: Classical brown rather than brite/beige? *Exp Physiol* **2020**, *105* (8), 1191-1200. DOI: 10.1113/ep087875 From NLM.

(39) Virtanen, K. A.; Lidell, M. E.; Orava, J.; Heglind, M.; Westergren, R.; Niemi, T.; Taittonen, M.; Laine, J.; Savisto, N. J.; Enerbäck, S.; et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **2009**, *360* (15), 1518-1525. DOI: 10.1056/NEJMoa0808949 From NLM.

(40) van Marken Lichtenbelt, W. D.; Vanhommerig, J. W.; Smulders, N. M.; Drossaerts, J. M.; Kemerink, G. J.; Bouvy, N. D.; Schrauwen, P.; Teule, G. J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **2009**, *360* (15), 1500-1508. DOI: 10.1056/NEJMoa0808718 From NLM.

(41) Zingaretti, M. C.; Crosta, F.; Vitali, A.; Guerrieri, M.; Frontini, A.; Cannon, B.; Nedergaard, J.; Cinti, S. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb j* **2009**, *23* (9), 3113-3120. DOI: 10.1096/fj.09-133546 From NLM.

(42) Nedergaard, J.; Bengtsson, T.; Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**, *293* (2), E444-452. DOI: 10.1152/ajpendo.00691.2006 From NLM.

(43) Ouellet, V.; Routhier-Labadie, A.; Bellemare, W.; Lakhal-Chaieb, L.; Turcotte, E.; Carpentier, A. C.; Richard, D. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of 18F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **2011**, *96* (1), 192-199. DOI: 10.1210/jc.2010-0989 From NLM.

(44) Persichetti, A.; Sciuto, R.; Rea, S.; Basciani, S.; Lubrano, C.; Mariani, S.; Ulisse, S.; Nofroni, I.; Maini, C. L.; Gnessi, L. Prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ^{18}F-FDG-detected brown adipose tissue in humans living in a temperate zone of Italy. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e63391. DOI: 10.1371/journal.pone.0063391 From NLM.

(45) Saito, M.; Okamatsu-Ogura, Y.; Matsushita, M.; Watanabe, K.; Yoneshiro, T.; Nio-Kobayashi, J.; Iwanaga, T.; Miyagawa, M.; Kameya, T.; Nakada, K.; et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **2009**, *58* (7), 1526-1531. DOI: 10.2337/db09-0530 From NLM.

(46) Yoneshiro, T.; Aita, S.; Matsushita, M.; Okamatsu-Ogura, Y.; Kameya, T.; Kawai, Y.; Miyagawa, M.; Tsujisaki, M.; Saito, M. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)* **2011**, *19* (9), 1755-1760. DOI: 10.1038/oby.2011.125 From NLM.

(47) Morrison, S. F.; Nakamura, K.; Madden, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* **2008**, *93* (7), 773-797. DOI: 10.1113/expphysiol.2007.041848 From NLM.

(48) Schreiber, R.; Diwoky, C.; Schoiswohl, G.; Feiler, U.; Wongsiriroj, N.; Abdellatif, M.; Kolb, D.; Hoeks, J.; Kershaw, E. E.; Sedej, S.; et al. Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab* **2017**, *26* (5), 753-763.e757. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.004 From NLM.

(49) Shin, H.; Ma, Y.; Chanturiya, T.; Cao, Q.; Wang, Y.; Kadegowda, A. K. G.; Jackson, R.; Rumore, D.; Xue, B.; Shi, H.; et al. Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab* **2017**, *26* (5), 764-777.e765. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.09.002 From NLM.

(50) Chitraju, C.; Fischer, A. W.; Farese, R. V., Jr.; Walther, T. C. Lipid Droplets in Brown Adipose Tissue Are Dispensable for Cold-Induced Thermogenesis. *Cell Rep* **2020**, *33* (5), 108348. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108348 From NLM.

(51) Bartelt, A.; Bruns, O. T.; Reimer, R.; Hohenberg, H.; Ittrich, H.; Peldschus, K.; Kaul, M. G.; Tromsdorf, U. I.; Weller, H.; Waurisch, C.; et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **2011**, *17* (2), 200-205. DOI: 10.1038/nm.2297 From NLM.

(52) Villarroya, J.; Cereijo, R.; Gavaldà-Navarro, A.; Peyrou, M.; Giralt, M.; Villarroya, F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol* **2019**, *243* (2), R19-r27. DOI: 10.1530/joe-19-0295 From NLM.

(53) Gavaldà-Navarro, A.; Villarroya, J.; Cereijo, R.; Giralt, M.; Villarroya, F. The endocrine role of brown adipose tissue: An update on actors and actions. *Rev Endocr Metab Disord* **2022**, *23* (1), 31-41. DOI: 10.1007/s11154-021-09640-6 From NLM.

(54) Fisher, F. M.; Maratos-Flier, E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* **2016**, *78*, 223-241. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105339 From NLM.

(55) Coskun, T.; Bina, H. A.; Schneider, M. A.; Dunbar, J. D.; Hu, C. C.; Chen, Y.; Moller, D. E.; Kharitonenkov, A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* **2008**, *149* (12), 6018-6027. DOI: 10.1210/en.2008-0816 From NLM.

(56) Xu, J.; Lloyd, D. J.; Hale, C.; Stanislaus, S.; Chen, M.; Sivits, G.; Vonderfecht, S.; Hecht, R.; Li, Y. S.; Lindberg, R. A.; et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* **2009**, *58* (1), 250-259. DOI: 10.2337/db08-0392 From NLM.

(57) Hondares, E.; Rosell, M.; Gonzalez, F. J.; Giralt, M.; Iglesias, R.; Villarroya, F. Hepatic FGF21 expression is induced at birth via PPARalpha in response to milk intake and contributes to thermogenic activation of neonatal brown fat. *Cell Metab* **2010**, *11* (3), 206-212. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.02.001 From NLM.

(58) Hondares, E.; Iglesias, R.; Giralt, A.; Gonzalez, F. J.; Giralt, M.; Mampel, T.; Villarroya, F. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* **2011**, *286* (15), 12983-12990. DOI: 10.1074/jbc.M110.215889 From NLM.

(59) Fisher, F. M.; Kleiner, S.; Douris, N.; Fox, E. C.; Mepani, R. J.; Verdeguer, F.; Wu, J.; Kharitonenkov, A.; Flier, J. S.; Maratos-Flier, E.; et al. FGF21 regulates PGC-1α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* **2012**, *26* (3), 271-281. DOI: 10.1101/gad.177857.111 From NLM.

(60) Li, X.; Ge, H.; Weiszmann, J.; Hecht, R.; Li, Y. S.; Véniant, M. M.; Xu, J.; Wu, X.; Lindberg, R.; Li, Y. Inhibition of lipolysis may contribute to the acute regulation of plasma FFA and glucose by FGF21 in ob/ob mice. *FEBS Lett* **2009**, *583* (19), 3230-3234. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.09.012 From NLM.

(61) Arner, P.; Pettersson, A.; Mitchell, P. J.; Dunbar, J. D.; Kharitonenkov, A.; Rydén, M. FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - a possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Lett* **2008**, *582* (12), 1725-1730. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.04.038 From NLM.

(62) Inagaki, T.; Dutchak, P.; Zhao, G.; Ding, X.; Gautron, L.; Parameswara, V.; Li, Y.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Esser, V.; et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* **2007**, *5* (6), 415-425. DOI: 10.1016/j.cmet.2007.05.003 From NLM.

(63) Petrovic, N.; Walden, T. B.; Shabalina, I. G.; Timmons, J. A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* **2010**, *285* (10), 7153-7164. DOI: 10.1074/jbc.M109.053942 From NLM.

(64) Wu, J.; Boström, P.; Sparks, L. M.; Ye, L.; Choi, J. H.; Giang, A. H.; Khandekar, M.; Virtanen, K. A.; Nuutila, P.; Schaart, G.; et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **2012**, *150* (2), 366-376. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.016 From NLM.

(65) Rosenwald, M.; Perdikari, A.; Rülicke, T.; Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* **2013**, *15* (6), 659-667. DOI: 10.1038/ncb2740 From NLM.

(66) Jia, R.; Luo, X. Q.; Wang, G.; Lin, C. X.; Qiao, H.; Wang, N.; Yao, T.; Barclay, J. L.; Whitehead, J. P.; Luo, X.; et al. Characterization of cold-induced remodelling reveals depot-specific differences across and within brown and white adipose tissues in mice. *Acta Physiol (Oxf)* **2016**, *217* (4), 311-324. DOI: 10.1111/apha.12688 From NLM.

(67) Merlin, J.; Sato, M.; Nowell, C.; Pakzad, M.; Fahey, R.; Gao, J.; Dehvari, N.; Summers, R. J.; Bengtsson, T.; Evans, B. A.; et al. The PPARγ agonist rosiglitazone promotes the induction of brite adipocytes, increasing β-adrenoceptor-mediated mitochondrial function and glucose uptake. *Cell Signal* **2018**, *42*, 54-66. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.09.023 From NLM.

(68) Himms-Hagen, J.; Melnyk, A.; Zingaretti, M. C.; Ceresi, E.; Barbatelli, G.; Cinti, S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **2000**, *279* (3), C670-681. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C670 From NLM.

(69) Barbatelli, G.; Murano, I.; Madsen, L.; Hao, Q.; Jimenez, M.; Kristiansen, K.; Giacobino, J. P.; De Matteis, R.; Cinti, S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2010**, *298* (6), E1244-1253. DOI: 10.1152/ajpendo.00600.2009 From NLM.

(70) Sanchez-Gurmaches, J.; Guertin, D. A. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun* **2014**, *5*, 4099. DOI: 10.1038/ncomms5099 From NLM.

(71) Long, J. Z.; Svensson, K. J.; Tsai, L.; Zeng, X.; Roh, H. C.; Kong, X.; Rao, R. R.; Lou, J.; Lokurkar, I.; Baur, W.; et al. A smooth muscle-like origin for beige adipocytes. *Cell Metab* **2014**, *19* (5), 810-820. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.025 From NLM.

(72) Cao, Q.; Jing, J.; Cui, X.; Shi, H.; Xue, B. Sympathetic nerve innervation is required for beigeing in white fat. *Physiol Rep* **2019**, *7* (6), e14031. DOI: 10.14814/phy2.14031 From NLM.

(73) Jimenez, M.; Barbatelli, G.; Allevi, R.; Cinti, S.; Seydoux, J.; Giacobino, J. P.; Muzzin, P.; Preitner, F. Beta 3-adrenoceptor knockout in C57BL/6J mice depresses the occurrence of brown adipocytes in white fat. *Eur J Biochem* **2003**, *270* (4), 699-705. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03422.x From NLM.

(74) Loncar, D. Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* **1991**, *266* (1), 149-161. DOI: 10.1007/bf00678721 From NLM.

(75) Young, P.; Arch, J. R.; Ashwell, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* **1984**, *167* (1), 10-14. DOI: 10.1016/0014-5793(84)80822-4 From NLM.

(76) Waldén, T. B.; Hansen, I. R.; Timmons, J. A.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2012**, *302* (1), E19-31. DOI: 10.1152/ajpendo.00249.2011 From NLM.

(77) Shabalina, I. G.; Petrovic, N.; de Jong, J. M.; Kalinovich, A. V.; Cannon, B.; Nedergaard, J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* **2013**, *5* (5), 1196-1203. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.10.044 From NLM.

(78) Schulz, T. J.; Huang, P.; Huang, T. L.; Xue, R.; McDougall, L. E.; Townsend, K. L.; Cypess, A. M.; Mishina, Y.; Gussoni, E.; Tseng, Y. H. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature* **2013**, *495* (7441), 379-383. DOI: 10.1038/nature11943 From NLM.

(79) Nguyen, N. L.; Barr, C. L.; Ryu, V.; Cao, Q.; Xue, B.; Bartness, T. J. Separate and shared sympathetic outflow to white and brown fat coordinately regulates thermoregulation and beige adipocyte recruitment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2017**, *312* (1), R132-r145. DOI: 10.1152/ajpregu.00344.2016 From NLM.

(80) Roh, H. C.; Tsai, L. T. Y.; Shao, M.; Tenen, D.; Shen, Y.; Kumari, M.; Lyubetskaya, A.; Jacobs, C.; Dawes, B.; Gupta, R. K.; et al. Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity. *Cell Metab* **2018**, *27* (5), 1121-1137.e1125. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.03.005 From NLM.

(81) Seale, P.; Conroe, H. M.; Estall, J.; Kajimura, S.; Frontini, A.; Ishibashi, J.; Cohen, P.; Cinti, S.; Spiegelman, B. M. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest* **2011**, *121* (1), 96-105. DOI: 10.1172/jci44271 From NLM.

(82) Thyagarajan, B.; Foster, M. T. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2017**, *31* (2). DOI: 10.1515/hmbci-2017-0016 From NLM.

(83) WHO. *Obesity and overweight*. 2022. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight (Letzter Zugriff am 13.10.2024).

(84) Labbé, S. M.; Caron, A.; Bakan, I.; Laplante, M.; Carpentier, A. C.; Lecomte, R.; Richard, D. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *Faseb j* **2015**, *29* (5), 2046-2058. DOI: 10.1096/fj.14-266247 From NLM.

(85) Liu, X.; Zheng, Z.; Zhu, X.; Meng, M.; Li, L.; Shen, Y.; Chi, Q.; Wang, D.; Zhang, Z.; Li, C.; et al. Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism. *Cell Res* **2013**, *23* (6), 851-854. DOI: 10.1038/cr.2013.64 From NLM.

(86) Liu, X.; Wang, S.; You, Y.; Meng, M.; Zheng, Z.; Dong, M.; Lin, J.; Zhao, Q.; Zhang, C.; Yuan, X.; et al. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. *Endocrinology* **2015**, *156* (7), 2461-2469. DOI: 10.1210/en.2014-1598 From NLM.

(87) Stanford, K. I.; Middelbeek, R. J.; Townsend, K. L.; An, D.; Nygaard, E. B.; Hitchcox, K. M.; Markan, K. R.; Nakano, K.; Hirshman, M. F.; Tseng, Y. H.; et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **2013**, *123* (1), 215-223. DOI: 10.1172/jci62308 From NLM.

(88) Lowell, B. B.; V, S. S.; Hamann, A.; Lawitts, J. A.; Himms-Hagen, J.; Boyer, B. B.; Kozak, L. P.; Flier, J. S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* **1993**, *366* (6457), 740-742. DOI: 10.1038/366740a0 From NLM.

(89) Ouellet, V.; Labbé, S. M.; Blondin, D. P.; Phoenix, S.; Guérin, B.; Haman, F.; Turcotte, E. E.; Richard, D.; Carpentier, A. C. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* **2012**, *122* (2), 545-552. DOI: 10.1172/jci60433 From NLM.

(90) Chondronikola, M.; Volpi, E.; Børsheim, E.; Porter, C.; Annamalai, P.; Enerbäck, S.; Lidell, M. E.; Saraf, M. K.; Labbe, S. M.; Hurren, N. M.; et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes* **2014**, *63* (12), 4089-4099. DOI: 10.2337/db14-0746 From NLM.

(91) Matsushita, M.; Yoneshiro, T.; Aita, S.; Kameya, T.; Sugie, H.; Saito, M. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *Int J Obes (Lond)* **2014**, *38* (6), 812-817. DOI: 10.1038/ijo.2013.206 From NLM.

(92) Yoneshiro, T.; Aita, S.; Matsushita, M.; Kayahara, T.; Kameya, T.; Kawai, Y.; Iwanaga, T.; Saito, M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* **2013**, *123* (8), 3404-3408. DOI: 10.1172/jci67803 From NLM.

(93) Cypess, A. M.; Weiner, L. S.; Roberts-Toler, C.; Franquet Elía, E.; Kessler, S. H.; Kahn, P. A.; English, J.; Chatman, K.; Trauger, S. A.; Doria, A.; et al. Activation of human brown adipose tissue by a β3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* **2015**, *21* (1), 33-38. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.12.009 From NLM.

(94) Iwen, K. A.; Backhaus, J.; Cassens, M.; Waltl, M.; Hedesan, O. C.; Merkel, M.; Heeren, J.; Sina, C.; Rademacher, L.; Windjäger, A.; 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), 4226-4234. DOI: 10.1210/jc.2017-01250 From NLM.

(95) Becher, T.; Palanisamy, S.; Kramer, D. J.; Eljalby, M.; Marx, S. J.; Wibmer, A. G.; Butler, S. D.; Jiang, C. S.; Vaughan, R.; Schöder, H.; et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat Med* **2021**, *27* (1), 58-65. DOI: 10.1038/s41591-020-1126-7 From NLM.

(96) Berbée, J. F.; Boon, M. R.; Khedoe, P. P.; Bartelt, A.; Schlein, C.; Worthmann, A.; Kooijman, S.; Hoeke, G.; Mol, I. M.; John, C.; et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6356. DOI: 10.1038/ncomms7356 From NLM.

(97) Thoonen, R.; Ernande, L.; Cheng, J.; Nagasaka, Y.; Yao, V.; Miranda-Bezerra, A.; Chen, C.; Chao, W.; Panagia, M.; Sosnovik, D. E.; et al. Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **2015**, *84*, 202-211. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.05.002 From NLM.

(98) Ruan, C. C.; Kong, L. R.; Chen, X. H.; Ma, Y.; Pan, X. X.; Zhang, Z. B.; Gao, P. J. A(2A) Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell Metab* **2018**, *28* (3), 476-489.e475. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.06.013 From NLM.

(99) Harris, R. B. Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Obesity (Silver Spring)* **2012**, *20* (7), 1355-1364. DOI: 10.1038/oby.2012.95 From NLM.

(100) Nguyen, N. L. T.; Xue, B.; Bartness, T. J. Sensory denervation of inguinal white fat modifies sympathetic outflow to white and brown fat in Siberian hamsters. *Physiol Behav* **2018**, *190*, 28-33. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.02.019 From NLM.

(101) Ryu, V.; Bartness, T. J. Short and long sympathetic-sensory feedback loops in white fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2014**, *306* (12), R886-900. DOI: 10.1152/ajpregu.00060.2014 From NLM.

(102) Ryu, V.; Garretson, J. T.; Liu, Y.; Vaughan, C. H.; Bartness, T. J. Brown adipose tissue has sympathetic-sensory feedback circuits. *J Neurosci* **2015**, *35* (5), 2181-2190. DOI: 10.1523/jneurosci.3306-14.2015 From NLM.

(103) Ryu, V.; Watts, A. G.; Xue, B.; Bartness, T. J. Bidirectional crosstalk between the sensory and sympathetic motor systems innervating brown and white adipose tissue in male Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2017**, *312* (3), R324-r337. DOI: 10.1152/ajpregu.00456.2015 From NLM.

(104) Garretson, J. T.; Szymanski, L. A.; Schwartz, G. J.; Xue, B.; Ryu, V.; Bartness, T. J. Lipolysis sensation by white fat afferent nerves triggers brown fat thermogenesis. *Mol Metab* **2016**, *5* (8), 626-634. DOI: 10.1016/j.molmet.2016.06.013 From NLM.

(105) Vetter, N. J.; Strange, R. C.; Adams, W.; Oliver, M. F. Initial metabolic and hormonal response to acute myocardial infarction. *Lancet* **1974**, *1* (7852), 284-288. DOI: 10.1016/s0140-6736(74)92595-1 From NLM.

(106) Little, R. A.; Frayn, K. N.; Randall, P. E.; Stoner, H. B.; Morton, C.; Yates, D. W.; Laing, G. S. Plasma catecholamines in the acute phase of the response to myocardial infarction. *Arch Emerg Med* **1986**, *3* (1), 20-27. DOI: 10.1136/emj.3.1.20 From NLM.

(107) Wang, L.; Zabri, H.; Gorressen, S.; Semmler, D.; Hundhausen, C.; Fischer, J. W.; Bottermann, K. Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner. *Front Physiol* **2022**, *13*, 1036945. DOI: 10.3389/fphys.2022.1036945 From NLM.

(108) Kjekshus, J. K.; Mjos, O. D. Effect of inhibition of lipolysis on infarct size after experimental coronary artery occlusion. *J Clin Invest* **1973**, *52* (7), 1770-1778. DOI: 10.1172/jci107358 From NLM.

(109) Kurien, V. A.; Oliver, M. F. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* **1971**, *13* (4), 361-373. DOI: 10.1016/s0033-0620(71)80012-9 From NLM.

(110) Hendrickson, S. C.; St Louis, J. D.; Lowe, J. E.; Abdel-aleem, S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* **1997**, *166* (1-2), 85-94. DOI: 10.1023/a:1006886601825 From NLM.

(111) Lopaschuk, G. D.; Ussher, J. R.; Folmes, C. D.; Jaswal, J. S.; Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **2010**, *90* (1), 207-258. DOI: 10.1152/physrev.00015.2009 From NLM.

(112) Liu, Q.; Docherty, J. C.; Rendell, J. C.; Clanachan, A. S.; Lopaschuk, G. D. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. *J Am Coll Cardiol* **2002**, *39* (4), 718-725. DOI: 10.1016/s0735-1097(01)01803-4 From NLM.

(113) Turer, A. T.; Stevens, R. D.; Bain, J. R.; Muehlbauer, M. J.; van der Westhuizen, J.; Mathew, J. P.; Schwinn, D. A.; Glower, D. D.; Newgard, C. B.; Podgoreanu, M. V. Metabolomic profiling reveals distinct patterns of myocardial substrate use in humans with

coronary artery disease or left ventricular dysfunction during surgical ischemia/reperfusion. *Circulation* **2009**, *119* (13), 1736-1746. DOI: 10.1161/circulationaha.108.816116 From NLM.

(114) Taniguchi, M.; Wilson, C.; Hunter, C. A.; Pehowich, D. J.; Clanachan, A. S.; Lopaschuk, G. D. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2001**, *280* (4), H1762-1769. DOI: 10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1762 From NLM.

(115) Beran, A. Die Bedeutung des braunen Fettgewebes im murinen Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2022.

(116) Peres Valgas da Silva, C.; Shettigar, V. K.; Baer, L. A.; Abay, E.; Madaris, K. L.; Mehling, M. R.; Hernandez-Saavedra, D.; Pinckard, K. M.; Seculov, N. P.; Ziolo, M. T.; et al. Brown adipose tissue prevents glucose intolerance and cardiac remodeling in high-fat-fed mice after a mild myocardial infarction. *Int J Obes (Lond)* **2022**, *46* (2), 350-358. DOI: 10.1038/s41366-021-00999-9 From NLM.

(117) Maroko, P. R.; Kjekshus, J. K.; Sobel, B. E.; Watanabe, T.; Covell, J. W.; Ross, J., Jr.; Braunwald, E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* **1971**, *43* (1), 67-82. DOI: 10.1161/01.cir.43.1.67 From NLM.

(118) National Research Council Committee for the Update of the Guide for the, C.; Use of Laboratory, A. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academies Press (US) Copyright © 2011, National Academy of Sciences., 2011.

(119) Gordon, C. J. The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. *Physiol Behav* **2017**, *179*, 55-66. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.05.026 From NLM.

(120) Fischer, A. W.; Cannon, B.; Nedergaard, J. Optimal housing temperatures for mice to mimic the thermal environment of humans: An experimental study. *Mol Metab* **2018**, *7*, 161-170. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.10.009 From NLM.

(121) Glossary of terms for thermal physiology : Second edition. *Pflugers Arch* **1987**, *410* (4-5), 567-587. DOI: 10.1007/bf00586542 From NLM.

(122) Kingma, B.; Frijns, A.; van Marken Lichtenbelt, W. The thermoneutral zone: implications for metabolic studies. *Front Biosci (Elite Ed)* **2012**, *4* (5), 1975-1985. DOI: 10.2741/e518 From NLM.

(123) Škop, V.; Guo, J.; Liu, N.; Xiao, C.; Hall, K. D.; Gavrilova, O.; Reitman, M. L. Mouse Thermoregulation: Introducing the Concept of the Thermoneutral Point. *Cell Rep* **2020**, *31* (2), 107501. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.03.065 From NLM.

(124) Gaskill, B. N.; Gordon, C. J.; Pajor, E. A.; Lucas, J. R.; Davis, J. K.; Garner, J. P. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol Behav* **2013**, *110-111*, 87-95. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.12.018 From NLM.

(125) Toth, L. A.; Trammell, R. A.; Ilsley-Woods, M. Interactions Between Housing Density and Ambient Temperature in the Cage Environment: Effects on Mouse Physiology and Behavior. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **2015**, *54* (6), 708-717. From NLM.

(126) Keijer, J.; Li, M.; Speakman, J. R. What is the best housing temperature to translate mouse experiments to humans? *Mol Metab* **2019**, *25*, 168-176. DOI: 10.1016/j.molmet.2019.04.001 From NLM.

(127) Cannon, B.; Nedergaard, J. Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J Exp Biol* **2011**, *214* (Pt 2), 242-253. DOI: 10.1242/jeb.050989 From NLM.

(128) Kvetnansky, R.; Sabban, E. L.; Palkovits, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* **2009**, *89* (2), 535-606. DOI: 10.1152/physrev.00042.2006 From NLM.

(129) James, C. M.; Olejniczak, S. H.; Repasky, E. A. How murine models of human disease and immunity are influenced by housing temperature and mild thermal stress. *Temperature (Austin)* **2023**, *10* (2), 166-178. DOI: 10.1080/23328940.2022.2093561 From NLM.

(130) Dudele, A.; Rasmussen, G. M.; Mayntz, D.; Malte, H.; Lund, S.; Wang, T. Effects of ambient temperature on glucose tolerance and insulin sensitivity test outcomes in normal and obese C57 male mice. *Physiol Rep* **2015**, *3* (5). DOI: 10.14814/phy2.12396 From NLM.

(131) Feldmann, H. M.; Golozoubova, V.; Cannon, B.; Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal

stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* **2009**, *9* (2), 203-209. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.12.014 From NLM.

(132) Giles, D. A.; Ramkhelawon, B.; Donelan, E. M.; Stankiewicz, T. E.; Hutchison, S. B.; Mukherjee, R.; Cappelletti, M.; Karns, R.; Karp, C. L.; Moore, K. J.; et al. Modulation of ambient temperature promotes inflammation and initiates atherosclerosis in wild type C57BL/6 mice. *Mol Metab* **2016**, *5* (11), 1121-1130. DOI: 10.1016/j.molmet.2016.09.008 From NLM.

(133) Giles, D. A.; Moreno-Fernandez, M. E.; Stankiewicz, T. E.; Graspeuntner, S.; Cappelletti, M.; Wu, D.; Mukherjee, R.; Chan, C. C.; Lawson, M. J.; Klarquist, J.; et al. Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat Med* **2017**, *23* (7), 829-838. DOI: 10.1038/nm.4346 From NLM.

(134) Yamauchi, C.; Fujita, S.; Obara, T.; Ueda, T. Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intakes, and hematology in mice. *Jikken Dobutsu* **1983**, *32* (1), 1-11. DOI: 10.1538/expanim1978.32.1_1 From NLM.

(135) Maloney, S. K.; Fuller, A.; Mitchell, D.; Gordon, C.; Overton, J. M. Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology (Bethesda)* **2014**, *29* (6), 413-420. DOI: 10.1152/physiol.00029.2014 From NLM.

(136) Ganeshan, K.; Chawla, A. Warming the mouse to model human diseases. *Nat Rev Endocrinol* **2017**, *13* (8), 458-465. DOI: 10.1038/nrendo.2017.48 From NLM.

(137) Erikson, H.; Krog, J.; Andersen, K. L.; Scholander, P. F. The critical temperature in naked man. *Acta Physiol Scand* **1956**, *37* (1), 35-39. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1956.tb01339.x From NLM.

(138) de Jong, J. M. A.; Sun, W.; Pires, N. D.; Frontini, A.; Balaz, M.; Jespersen, N. Z.; Feizi, A.; Petrovic, K.; Fischer, A. W.; Bokhari, M. H.; et al. Human brown adipose tissue is phenocopied by classical brown adipose tissue in physiologically humanized mice. *Nat Metab* **2019**, *1* (8), 830-843. DOI: 10.1038/s42255-019-0101-4 From NLM.

(139) Cui, X.; Nguyen, N. L.; Zarebidaki, E.; Cao, Q.; Li, F.; Zha, L.; Bartness, T.; Shi, H.; Xue, B. Thermoneutrality decreases thermogenic program and promotes adiposity in high-fat diet-fed mice. *Physiol Rep* **2016**, *4* (10). DOI: 10.14814/phy2.12799 From NLM.

(140) Kalinovich, A. V.; de Jong, J. M.; Cannon, B.; Nedergaard, J. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* **2017**, *134*, 127-137. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.01.007 From NLM.

(141) Ali Khan, A.; Hansson, J.; Weber, P.; Foehr, S.; Krijgsveld, J.; Herzig, S.; Scheideler, M. Comparative Secretome Analyses of Primary Murine White and Brown Adipocytes Reveal Novel Adipokines. *Mol Cell Proteomics* **2018**, *17* (12), 2358-2370. DOI: 10.1074/mcp.RA118.000704 From NLM.

(142) Qiao, L.; Yoo, H.; Bosco, C.; Lee, B.; Feng, G. S.; Schaack, J.; Chi, N. W.; Shao, J. Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia* **2014**, *57* (5), 1027-1036. DOI: 10.1007/s00125-014-3180-5 From NLM.

(143) Vialard, F.; Olivier, M. Thermoneutrality and Immunity: How Does Cold Stress Affect Disease? *Front Immunol* **2020**, *11*, 588387. DOI: 10.3389/fimmu.2020.588387 From NLM.

(144) Goldgof, M.; Xiao, C.; Chanturiya, T.; Jou, W.; Gavrilova, O.; Reitman, M. L. The chemical uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) protects against diet-induced obesity and improves energy homeostasis in mice at thermoneutrality. *J Biol Chem* **2014**, *289* (28), 19341-19350. DOI: 10.1074/jbc.M114.568204 From NLM.

(145) Hoevenaars, F. P.; Bekkenkamp-Grovenstein, M.; Janssen, R. J.; Heil, S. G.; Bunschoten, A.; Hoek-van den Hil, E. F.; Snaas-Alders, S.; Teerds, K.; van Schothorst, E. M.; Keijer, J. Thermoneutrality results in prominent diet-induced body weight differences in C57BL/6J mice, not paralleled by diet-induced metabolic differences. *Mol Nutr Food Res* **2014**, *58* (4), 799-807. DOI: 10.1002/mnfr.201300285 From NLM.

(146) Pernes, G.; Morgan, P. K.; Huynh, K.; Mellett, N. A.; Meikle, P. J.; Murphy, A. J.; Henstridge, D. C.; Lancaster, G. I. Characterization of the circulating and tissue-specific alterations to the lipidome in response to moderate and major cold stress in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2021**, *320* (2), R95-r104. DOI: 10.1152/ajpregu.00112.2020 From NLM.

(147) Cypess, A. M.; White, A. P.; Vernochet, C.; Schulz, T. J.; Xue, R.; Sass, C. A.; Huang, T. L.; Roberts-Toler, C.; Weiner, L. S.; Sze, C.; et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* **2013**, *19* (5), 635-639. DOI: 10.1038/nm.3112 From NLM.

(148) Sharp, L. Z.; Shinoda, K.; Ohno, H.; Scheel, D. W.; Tomoda, E.; Ruiz, L.; Hu, H.; Wang, L.; Pavlova, Z.; Gilsanz, V.; et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* **2012**, *7* (11), e49452. DOI: 10.1371/journal.pone.0049452 From NLM.

(149) Petz, A.; Grandoch, M.; Gorski, D. J.; Abrams, M.; Piroth, M.; Schneckmann, R.; Homann, S.; Müller, J.; Hartwig, S.; Lehr, S.; et al. Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury. *Circ Res* **2019**, *124* (10), 1433-1447. DOI: 10.1161/circresaha.118.313285 From NLM.

(150) Kim, S. C.; Boehm, O.; Meyer, R.; Hoeft, A.; Knüfermann, P.; Baumgarten, G. A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion. *J Vis Exp* **2012**, (65), e3896. DOI: 10.3791/3896 From NLM.

(151) Nossuli, T. O.; Lakshminarayanan, V.; Baumgarten, G.; Taffet, G. E.; Ballantyne, C. M.; Michael, L. H.; Entman, M. L. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2000**, *278* (4), H1049-1055. DOI: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049 From NLM.

(152) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **2012**, *9* (7), 676-682. DOI: 10.1038/nmeth.2019 From NLM.

(153) Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1987**, *162* (1), 156-159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999 From NLM.

(154) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262 From NLM.

(155) Okamatsu-Ogura, Y.; Fukano, K.; Tsubota, A.; Uozumi, A.; Terao, A.; Kimura, K.; Saito, M. Thermogenic ability of uncoupling protein 1 in beige adipocytes in mice. *PLoS One* **2013**, *8* (12), e84229. DOI: 10.1371/journal.pone.0084229 From NLM.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der basalen und stimulierten Lipolyse im weißen Fettgewebe 4

Abb. 2: Schematische Darstellung der Lipogenese aus freien Fettsäuren und Nicht-Lipiden im weißen Fettgewebe 5

Abb. 3: Batokine und ihre Wirkorte 9

Abb. 4: Schematische Darstellung der neuronalen Verknüpfung zwischen braunem und weißem Fettgewebe 12

Abb. 5: Versuchsaufbau 26

Abb. 6: Schematische Darstellung des Schnittschemas, der UCP-1-Färbung und der Anfertigung von lichtmikroskopischen Aufnahmen des subkutanen weißen Fettgewebes 30

Abb. 7: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf das Körpergewicht und das Gewicht des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C-Tieren 39

Abb. 8: Signifikante Zunahme des Körpergewichts und des subkutanen Fettgewichts von 30°C-Tieren nach chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes 40

Abb. 9: Signifikanter Temperatureffekt auf das subkutane Fettgewicht/Körpergewicht von Kontrolltieren und Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes 41

Abb. 10: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 43

Abb. 11: Signifikant größere durchschnittliche Adipozytenfläche des subkutanen weißen Fettgewebes von 30°C-Kontrolltieren 44

Abb. 12: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die absolute und prozentuale Adipozyten-Größenverteilung des subkutanen weißen Fettgewebes von 21°C- und 30°C-Tieren 46

Abb. 13: Signifikant erniedrigte absolute Anzahl von Adipozyten in der Kategorie > 250 µm² bis ≤ 500 µm² des subkutanen weißen Fettgewebes bei 30°C-Kontrolltieren 49

Abb. 14: Signifikant verringerter prozentualer Anteil der kleinen Adipozyten vom subkutanen weißen Fettgewebe in 30°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes50

Abb. 15: Signifikanter Temperatureffekt auf die UCP-1-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von Kontrolltieren und Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes 53

Abb. 16: Kein Effekt der chirurgischen Ablation des braunen Fettgewebes auf die Fasn3 und Acaca1 mRNA-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°- und 30°C-Tieren 55

Abb. 17: Tendenziell reduzierte Lipe3 und PnPla2 mRNA-Expression im subkutanen weißen Fettgewebe von 21°C-Tieren mit chirurgischer Ablation des braunen Fettgewebes 56

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss der Haltungstemperatur auf verschiedene Erkrankungen 18

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien 21

Tabelle 3: Verwendete Substanzen 22

Tabelle 4: Verwendete Lösungen (gebrauchsfertig) 23

Tabelle 5: Verwendete Puffer (gebrauchsfertig) 23

Tabelle 6: Verwendete Lösungen 23

Tabelle 7: Verwendete Puffer 23

Tabelle 8: Verwendete Antikörper 24

Tabelle 9: Verwendete Primersequenzen für die RT-qPCR 35

8 Danksagung

Letzten Endes gab es sehr viele Personen, die mich in meiner Arbeit unterstützt und ermutigt haben. Ein besonders großer Dank gilt Frau Prof. Maria Grandoch für die Ermöglichung dieser Promotion in ihrer Forschungsgruppe. Für ihre immerwährend zuverlässige Betreuung und Erreichbarkeit sowie die Möglichkeit, Kenntnisse im wissenschaftlichen Arbeiten zu erlangen, bin ich sehr dankbar. Auch Herrn Prof. Ulrich Flögel danke ich sehr für die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Zudem möchte ich Herrn Dr. Arne Beran danken, der mir in dieser Arbeit jederzeit zur Seite stand und durch zahlreiche Gespräche zu neuen Denkansätzen verholfen hat. Für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Frau Annika Zimmermann bedanken. Dies hat mir den Umgang mit experimenteller Forschung erleichtert und für die Entwicklung praktischer Fähigkeiten im Labor sehr geholfen. Ein großer Dank gilt außerdem allen weiteren Kollegen im pharmakologischen Institut für das freundschaftliche Miteinander und ihre Hilfsbereitschaft. Die Zusammenarbeit hat mir viel Spaß gemacht und mich in meiner Arbeit vorangetrieben.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Mutter aussprechen. Sie hat mich stets unterstützt, in schwierigeren Phasen ermutigt und in jeder Entscheidung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bestärkt.

Vielen Dank!