Aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

„Analyse mediastinaler Fett-assoziierter lymphoider Cluster (FALCs) nach Inhibition der Lipolyse im murinen Myokardinfarktmodell“

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annika Gesine Hager,

2025

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Jens Fischer
Zweitgutachterin: PD Dr. Annika Raupach
Drittgutachter: Prof. Axel Gödecke

Für meine Familie

I. Zusammenfassung

Ein Myokardinfarkt stellt eine der häufigsten und schwerwiegendsten kardiovaskulären Erkrankungen dar und ist trotz therapeutischer Bemühungen mit einer deutlich erhöhten Mortalität sowie Morbidität der Patienten vergesellschaftet. Durch Sauerstoffunterversorgung kann es zu einem Zelluntergang der betroffenen Kardiomyozyten mit anschließender Fibrosierung und Umbauprozessen kommen, welche im weiteren Verlauf zu einer eingeschränkten Herzfunktion führen können. Interessant dabei, ist der Zusammenhang der postischämischen kardialen Funktion und der Lipolyse. Pathophysiologische Grundlage dieses Zusammenhangs, ist die β-adrenerge Stimulation der peripheren Lipolyse während und nach Infarkt. Dabei werden unveresterte Fettsäuren freigesetzt, die wiederrum über lipotoxische Effekte die kardiale Aktivität negativ beeinflussen können. In einigen Studien konnte eine Verbesserung der kardialen Funktion durch Inhibition der Lipolyse gezeigt werden. Ob die Inhibition der Lipolyse direkten Einfluss auf die kardiale Funktion nimmt oder diese beispielsweise über immunologische Mechanismen beeinflusst, ist nicht abschließend geklärt.

Nach einem Infarkt kommt es zu einer neutrophilen Infiltration ins Myokard. Diese neutrophile Infiltration wird über Immunzellen reguliert. Die sogenannten fett-assoziierten lymphoiden Cluster (FALCs), sind im mediastinalen FG lokalisiert und beinhalten neben Adipozyten auch Immunzellen.

Die Experimente dieser Dissertation zielen nun darauf ab, zu untersuchen, ob und inwiefern eine Inhibition der Lipolyse, Einfluss auf die Immunzellkomposition in den FALCs und damit auf die inflammatorischen Prozesse post Ischämie hat. Dazu wurde ein Ischämie-/Reperfusions-, sowie drei verschiedene Lipolyse-Inhibitionen im murinen Modell angewandt und die Beeinflussung der Zellmorphologie und Immunzellkomposition in den mediastinalen FALCs untersucht.

Eins der Hauptergebnisse der hier durchgeführten Experimente bringt neue Erkenntnisse:
Nach sieben Tage Reperfusion zeigt sich eine signifikante Abnahme der B-Zellen nach einer Lipolyse-Inhibition während und kurz nach kardialer Ischämie. Eine Abnahme der B-Zellen könnte zu einer verringerten Granulozytopoese und damit zu einer geringeren neutrophilen Infiltration führen. Dies lässt wiederrum Rückschlüsse darauf ziehen, dass die Lipolyse-Inhibition die Immunzellzusammensetzung in den Clustern beeinflusst und somit möglicherweise Einfluss auf das inflammatorische Geschehen im Myokard hat.

Dieser Zusammenhang und weitere nicht-signifikante Ergebnisse dieser Arbeit, könnten in zukünftigen Forschungsarbeiten ein Ansatz zur Etablierung einer zielgerichteten pharmakologischen Therapie für die Nachsorge von Infarktpatienten darstellen.

II. Conclusion

Myocardial infarction is one of the most common and most serious cardiovascular diseases and is, despite therapeutic efforts, associated with significantly increased mortality and morbidity in patients. Oxygen deficiency can lead to cell death of the affected cardiomyocytes with subsequent fibrosis and remodeling processes, which can lead to impaired cardiac function in the further course of the disease. There seems to be an interesting connection between post-ischemic cardiac function and lipolysis. The pathophysiological basis of this connection is the β-adrenergic stimulation of peripheral lipolysis during and after infarction. This releases free fatty acids, which in turn negatively influence cardiac activity via lipotoxic effects. Some studies have shown an improvement in cardiac function after inhibition of lipolysis. Whether the inhibition of lipolysis has a direct influence on cardiac function or influences it indirectly, for example, via immunological mechanisms, has not been conclusively clarified.
After an infarction, neutrophil infiltration into the myocardium occurs. This neutrophil infiltration is regulated by immune cells. The so-called fat-associated lymphoid clusters (FALCs) are localized in the mediastinal fatty tissue and contain adipocytes as well as immune cells.

The experiments of this dissertation are now aimed at investigating whether the inhibition of lipolysis has an influence on the immune cell composition of the FALCs and thus on the inflammatory processes post ischemia. For this purpose, an ischemia/reperfusion- and three different models of lipolysis inhibition were used in mice, to investigate the influence on the morphology and immune cell composition in the mediastinal FALCs.

One of the main results of the experiments conducted here provides new insights:
After seven days of reperfusion, there is a significant decrease in B cells after inhibition of lipolysis during and shortly after cardiac ischemia. A decrease in B cells could lead to reduced granulocytopoiesis and thus to a reduced neutrophil infiltration. This in turn allows conclusions to be drawn that lipolysis inhibition influences the immune cell composition in the clusters and thus possibly has an influence on the inflammatory process in the myocardium.

This correlation and other non-significant results of this study could represent an approach for the establishment of a targeted pharmacological therapy for the aftercare of heart attack patients in future research work.

III. Inhaltsverzeichnis

I. ZUSAMMENFASSUNG **4**

II. CONCLUSION **5**

III. INHALTSVERZEICHNIS **6**

IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS **8**

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **10**

VI. TABELLENVERZEICHNIS **11**

1 EINLEITUNG **12**

1.1 MYOKARDINFARKT 12

1.1.1 Definition und Epidemiologie *12*

1.1.2 Pathophysiologie *13*

1.1.3 Therapie *15*

1.2 KARDIALER METABOLISMUS BEI INFARKT 17

1.3 AKUTER MYOKARDINFARKT, WEIßES FETTGEWEBE UND PERIPHERE LIPOLYSE 19

1.4 ADIPOZYTEN-TRIGLYCERID-LIPASE 20

1.5 ATGL-INHIBITION FÜHRT ZU EINER VERBESSERUNG DER KARDIALEN FUNKTION 22

1.6 FETT-ASSOZIIERTE LYMPHOIDE CLUSTER 24

1.7 ZIELE DER ARBEIT 26

2 MATERIAL UND METHODEN **27**

2.1 ARBEITSMITTEL 27

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien *27*

2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien 27

2.1.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 28

2.1.1.3 Mikroskop 29

2.1.1.4 Primäre Antikörper 29

2.1.1.5 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz 29

2.1.2 Softwaresysteme *30*

2.1.3 Herstellerverzeichnis *31*

2.2 METHODEN 32

2.2.1 Verwendete Gewebe *32*

2.2.1.1 Ligatur-Anlage und Induktion der Ischämie 32

2.2.1.1 Entnahme und Einbettung 33

2.2.2 Modellreihen *34*

2.2.2.1 Ischämie/ Reperfusion 34

2.2.2.2 Modelle der Lipolyse-Inhibition 35

2.2.2.3 Genetisches ATGL-KO- Modell 37

2.2.2.4 Synthetisches DREADD-Modell ... 38
2.2.3 Histologische Methoden ... 39
2.2.3.1 Paraffinschnitte ... 39
2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung ... 39
2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung ... 40
2.2.3.4 Antikörper-Färbung: ... 42
2.2.3.5 Primärer Antikörper ... 43
2.2.3.6 Sekundärer Antikörper ... 43
2.2.4 Mikroskopieren ... 44
2.2.5 Auswertung ... 45
2.2.5.1 Auswertung der Adipozyten ... 45
2.2.5.2 Auswertung der Immunzellen ... 45
2.2.5.3 Statistische Analyse mittels Graph Pad Prism ... 46
3 ERGEBNISSE ... 47
3.1 Ischämie/ Reperfusion ... 47
3.1.1 Gesteigerte Adipozytengröße 28 Tage nach Reperfusion ... 48
3.1.2 Kardiale Ischämie zeigt keinen Einfluss auf Größe der Cluster ... 51
3.1.3 Anzahl der B-und T-Zellen in FALCs nach Ischämie unverändert ... 54
3.2 Drei Modelle der Lipolyse-Inhibition ... 60
3.2.1 Inhibition mit Atglistatin zeigt eine Abnahme der Adipozytengröße ... 61
3.2.2 Zunahme der Adipozytengröße im ATGL-KO-Modell ... 62
3.2.3 Unveränderte Größe der Adipozyten im DREADD-Modell ... 64
3.2.4 Keine Beeinflussung der Clustergröße in allen Inhibitionsmodellen ... 67
3.2.5 Abnahme der B-Zell-Anzahl in den FALCs im DREADD-Modell ... 70
3.2.5.1 Inhibition mit Atglistatin und ATGL-KO beeinflusst die Immunzellzusammensetzung nicht ... 70
3.2.5.2 Lipolyse-Inhibition mit synthetischem Rezeptor im DREADD-Modell verringert die Anzahl der B-Lymphozyten nach sieben Tagen Reperfusion ... 72
4 DISKUSSION ... 75
4.1 Zunahme der Adipozytengröße im I-/R-Modell ... 76
4.2 Fehlender Einfluss auf die Immunzellzusammensetzung und die Clustergröße im Ischämie-/Reperfusions-Modell ... 78
4.3 Abnahme der Adipozytengröße nach Inhibition mittels Atglistatin, Zunahme nach Inhibition im ATGL-KO 80
4.4 Abnahme der B-Zellanzahl und Clustergröße sieben Tage nach Reperfusion im DREADD-Modell ... 85
4.5 Limitationen ... 89
5 SCHLUSSFOLGERUNG ... 90
6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS ... 91

IV. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMA DES VERWENDETEN ISCHÄMIE-MODELLS, SELBSTERSTELLTE ABBILDUNG MIT MODULEN VON SMART SEVIER, LIZENZIERT UNTER EINER `CREATIVE COMMON ATTRIBUTION 3.0 GENERIC´ LIZENZ, HTTP://SMART.SERVIER.COM 34

ABBILDUNG 2: SCHEMA DER PHARMAKOLOGISCHEN LIPOLYSEINHIBITION MITTELS ATGLISTATIN, SELBSTERSTELLTE ABBILDUNG MIT MODULEN VON SMART SEVIER, LIZENZIERT UNTER EINER `CREATIVE COMMON ATTRIBUTION 3.0 GENERIC´ LIZENZ, HTTP://SMART.SERVIER.COM 36

ABBILDUNG 3: SCHEMA DER LIPOLYSEINHIBITION MITTELS ATGL-KO, SELBSTERSTELLTE ABBILDUNG MIT MODULEN VON SMART SEVIER, LIZENZIERT UNTER EINER `CREATIVE COMMON ATTRIBUTION 3.0 GENERIC´ LIZENZ, HTTP://SMART.SERVIER.COM 37

ABBILDUNG 4: SCHEMA DER DURCHGEFÜHRTEN LIPOLYSEINHIBITION DURCH EXPRIMIERUNG UND AKTIVIERUNG EINES SYNTHETISCHEN REZEPTORS, SELBSTERSTELLTE ABBILDUNG MIT MODULEN VON SMART SEVIER, LIZENZIERT UNTER EINER `CREATIVE COMMON ATTRIBUTION 3.0 GENERIC´ LIZENZ, HTTP://SMART.SERVIER.COM 38

ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES IMMUNFLUORESZENZ-PRINZIPS, SELBSTERSTELLTE ABBILDUNG MIT MODULEN VON SMART SEVIER, LIZENZIERT UNTER EINER `CREATIVE COMMON ATTRIBUTION 3.0 GENERIC´ LIZENZ, HTTP://SMART.SERVIER.COM 40

ABBILDUNG 6: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG IMMUNFLUORESZENTER BILDER 46

ABBILDUNG 7: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE ADIPOZYTENGRÖßE, H&E FÄRBUNG DES MEDIASTINALEN FG MIT LYMPHOIDEN CLUSTERN UND UMLIEGENDE ADIPOZYTEN IN OPERIERTEN KONTROLLEN (SHAM) UND NACH 60 -MINÜTIGER ISCHÄMIE; VERGLEICH S/I 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGE (D) NACH REPERFUSION (REP) 48

ABBILDUNG 8: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE ADIPOZYTENGRÖßE; VERGLEICH SHAM/ISCHÄMIE 24 STUNDEN (H) (GRÜN) UND 28 TAGE (D) NACH REPERFUSION (BLAU) 49

ABBILDUNG 9: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE MITTLERE ADIPOZYTENGRÖßE IN µM² ÜBER DEN ZEITVERLAUF DER ENTNAHMEZEITPUNKTE VON 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGE (D) IN SHAM/ISCHÄMIE, MITTELWERT ± SEM, N = 4-5 MÄUSE PRO GRUPPE; TWO-WAY-ANOVA, ŠIDÁK-TEST. 50

ABBILDUNG 10: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE CLUSTERGRÖßE, H&E FÄRBUNG DES MEDIASTINALEN FG MIT LYMPHOIDEN CLUSTERN UND UMLIEGENDE ADIPOZYTEN IN OPERIERTEN KONTROLLEN (SHAM) UND NACH 60 -MINÜTIGER ISCHÄMIE; VERGLEICH S/I 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGE (D) NACH REPERFUSION (REP) 51

ABBILDUNG 11: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE CLUSTERGRÖßE; VERGLEICH SHAM/ISCHÄMIE 24 STUNDEN (H) (GRÜN) UND 28 TAGE (D) NACH REPERFUSION (BLAU), 52

ABBILDUNG 12: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE MITTLERE CLUSTERGRÖßE IN µM² ÜBER DEN ZEITVERLAUF DER ENTNAHMEZEITPUNKTE VON 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGE (D) IN ISCHÄMIE/ REPERFUSION (I/R), MITTELWERT ± SEM, N = 4-5 MÄUSE PRO GRUPPE; TWO-WAY-ANOVA, ŠIDÁK-TEST. 53

ABBILDUNG 13: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG IN DEN CLUSTERN, ANTEIL DER ANTI-PAX5-POSITIVEN B- (OBEN) UND ANTI-CD3-POSITIVEN T-ZELLEN (UNTEN) AN ALLEN ZELLEN IN DEN CLUSTERN (%) NACH 24 STUNDEN REPERFUSION, SHAM (LINKS) UND NACH 60-MINÜTIGER ISCHÄMIE (RECHTS); IMMUNFLUORESZENZ-FÄRBUNG, SCHICHTBILDER MIT DREI KANÄLEN: WGA488 ZUR FÄRBUNG DES FG, DAPI ZUR ZELLKERNFÄRBUNG, SOWIE ANTI-PAX5, SOWIE ANTI-CD3 AK-FÄRBUNG. 55

ABBILDUNG 14: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG IN DEN CLUSTERN NACH 24 STUNDEN REPERFUSION, ANTEIL DER ANTI-PAX5-POSITIVEN B-ZELLEN (LINKS) UND ANTI-CD3-POSITIVEN T-ZELLEN (RECHTS) AN ALLEN ZELLEN DER CLUSTER IN %; IN SHAM UND NACH 60-MINÜTIGER-ISCHÄMIE; MITTELWERT ± SEM, N=4-5, UNGEPAARTER ZWEISEITIGER T-TEST. 56

ABBILDUNG 15: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG, ANTEIL DER ANTI-PAX5-POSITIVEN B- (OBEN) UND ANTI-CD3-POSITIVEN T-ZELLEN (UNTEN) AN ALLEN ZELLEN IN DEN CLUSTERN (%) NACH 28 TAGEN REPERFUSION, SHAM (LINKS) UND NACH 60-MINÜTIGER ISCHÄMIE (RECHTS); IMMUNFLUORESZENZ-FÄRBUNG, SCHICHTBILDER MIT DREI KANÄLEN: WGA488 ZUR FÄRBUNG DES FG, DAPI ZUR ZELLKERNFÄRBUNG, SOWIE ANTI-PAX5, SOWIE ANTI-CD3 AK-FÄRBUNG. 57

ABBILDUNG 16: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG IN DEN CLUSTERN NACH 24 STUNDEN REPERFUSION, ANTEIL DER ANTI-PAX5-POSITIVEN B-ZELLEN (LINKS) UND ANTI-CD3-POSITIVEN T-ZELLEN (RECHTS) AN ALLEN ZELLEN DER CLUSTER IN %; IN SHAM UND NACH 60-MINÜTIGER-ISCHÄMIE; MITTELWERT ± SEM, N=4-5, UNGEPAARTER ZWEISEITIGER T-TEST. 58

ABBILDUNG 17: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE B- UND T-ZELLANZAHL IM ISCHÄMIE-/REPERFUSIONS-MODELL (I/R) ALS ANTEIL DER IMMUNZELLEN IN %, 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGE (D) NACH REPERFUSION; ANTI-PAX5-POSITIVE B-ZELLEN (LINKS), ANTI-CD3-POSITIVE T-ZELLEN (RECHTS), 59

ABBILDUNG 18: ADIPOZYTENGRÖßE NACH 60-MINÜTIGER ISCHÄMIE IN KONTROLLE (VEHIKEL) UND LIPOLYSE-INHIBITION MITTELS ATGLISTATIN, 61

ABBILDUNG 19: ADIPOZYTENGRÖßE NACH 60-MINÜTIGER ISCHÄMIE IN KONTROLLE UND ATGL-KO, 63

ABBILDUNG 20: ADIPOZYTENGRÖßE NACH 60-MINÜTIGER ISCHÄMIE IN KONTROLLE UND IM DREADD-MODELL MIT 24 STUNDEN(H) REPERFUSION (VIOLETT) UND 7 TAGE(D) REPERFUSION (ORANGE) 65

ABBILDUNG 21: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER INHIBITION DER LIPOLYSE IM DREADD-MODELL AUF DIE ADIPOZYTENANZAHL, 24 STUNDEN (H) UND 7 TAGE (D) NACH REPERFUSION; VERGLEICH KONTROLLE (LINKS) UND LIPOLYSE-INHIBITION MITTELS DREADD (RECHTS) MITTELWERT ± SEM, N= 10-12, TWO-WAY-ANOVA, ŠIDÁK-TEST. 66

ABBILDUNG 22 : EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER INHIBITION DER LIPOLYSE AUF DIE RELATIVE CLUSTERGRÖßE, VERGLEICH KONTROLLE (LINKS) UND LIPOLYSE-INHIBITION (RECHTS), (1) ATGL- INHIBITION MIT ATGLISTATIN (ROT), (2) ATGL-KO (GELB); 67

ABBILDUNG 23: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER INHIBITION DER LIPOLYSE AUF DIE RELATIVE CLUSTERGRÖßE, VERGLEICH KONTROLLE (LINKS) UND LIPOLYSE-INHIBITION IM DREADD-MODELL (RECHTS), (1) NACH 24 STUNDEN(H) REPERFUSION (VIOLETT), (2) NACH 7 TAGEN (D) REPERFUSION (ORANGE); 68

ABBILDUNG 24: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER INHIBITION DER LIPOLYSE (DREADD) AUF DIE RELATIVE CLUSTERGRÖßE IM VERHÄLTNIS ZUR GESAMTFLÄCHE DES MEDIASTINALEN FG (%) ÜBER DEN ZEITVERLAUF DER ENTNAHMEZEITPUNKTE VON 24 STUNDEN (H) UND 28 TAGEN (D), MITTELWERT ± SEM, N = 6-12 MÄUSE PRO GRUPPE; TWO-WAY-ANOVA, ŠIDÁK-TEST. 69

ABBILDUNG 25: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER LIPOLYSE-INHIBITION AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG, ANTEIL DER ANTI-CD3-POSITIVER T-(OBEN) UND ANTI-PAX5-POSITIVER B-ZELLEN (UNTEN) IN LIPOLYSE-INHIBITION MIT ATGLISTATIN (1) UND IM ATGL-KNOCKOUT (KO) (2), 71

ABBILDUNG 26 : EINFLUSS DER LIPOLYSE-INHIBITION UNTER KARDIALER ISCHÄMIE AUF DIE LYMPHOIDE ZELLZUSAMMENSETZUNG, ANTEIL DER ANTI-CD3-POSITIVER T-(OBEN) UND ANTI-PAX5-POSITIVER B-ZELLEN (UNTEN) IN LIPOLYSE-INHIBITION IM DREADD-MODELL (1) NACH 24 STUNDEN (H) UND (2) NACH 7 TAGEN (D) REPERFUSION (REP), 73

ABBILDUNG 27: EINFLUSS KARDIALER ISCHÄMIE MIT ZUSÄTZLICHER INHIBITION DER LIPOLYSE IM DREADD-MODELL AUF DIE ANZAHL ANTI-PAX5-POSITIVER B- (LINKS) UND ANTI-CD3-POSITIVER T-ZELLANZAHL (RECHTS) IN %, 24H UND 7D NACH REPERFUSION IM VERGLEICH; MITTELWERT ± SEM, N=10-12, TWO-WAY-ANOVA, ŠIDÁK-TEST. 74

V. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNO	Clozapin-N-Oxid
DAMP	*Damage-associated-molecular-pattern*
DREADD	*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*
EKG	Elektrokardiografie
FALC	Fett-assoziierte-lymphoide-Cluster
FG	Fettgewebe
FS	Fettsäuren
I/R	Ischämie/ Reperfusion
HSL	Hormon-sensitive Lipase
Ig(M/G)	Immunglobulin
IGF	*Insulin-like growth factor*
IL	Interleukin
ILC	*innate-lymphpoid-cells*
ISO	Isoproterenol
i.v.	intravenös
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAG	Monoacylglycerol
MI	Myokardinfarkt
N-STEMI	*non-ST-elevated myocardial infarction*
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCI	*percutane coronary intervention*
PKA	Proteinkinase A
PPR	*pattern-recognition-receptor*
STEMI	*ST-elevated myocardial infarction*
TAC	*transverse aortic constriction*
TAG	Triacylglyceride
TLR	*toll-like*-Rezeptoren
WGA	Weizenkeimagglutinin

VI. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ALLGEMEINE CHEMIKALIEN **27**

TABELLE 2: WEITERE LÖSUNGEN **27**

TABELLE 3: GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN **28**

TABELLE 4: MIKROSKOPE **29**

TABELLE 5: PRIMÄRE ANTIKÖRPER **29**

TABELLE 6: SEKUNDÄRE AK FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZ **29**

TABELLE 7: SOFTWARESYSTEME **30**

TABELLE 8: HERSTELLERVERZEICHNIS **31**

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Ein Myokardinfarkt (MI) bezeichnet eine akute Ischämie des Herzmuskels infolge einer plötzlichen Obstruktion oder Reduktion des Blutflusses in einer oder mehreren Koronararterien. Diese hämodynamische Störung resultiert in einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffnutzung des Gewebes (Lopaschuk, 2017; Thygesen et al., 2019). Infolgedessen kommt es zu einem Untergang der Kardiomyozyten (Frangogiannis, 2015).

Epidemiologische Studien verdeutlichen die erhebliche Bürde, die MI weltweit darstellen. Sie gelten als eine der häufigsten Todesursachen mit hohen Mortalitätsraten, vor allem in Industrie- und Schwellenländern. Prädisponierende Faktoren für einen MI umfassen modifizierbare Elemente, wie eine ungesunde Lebensweise, Rauchen, erhöhte Blutfette, Bluthochdruck und Diabetes mellitus; sowie nicht-modifizierbare Risikofaktoren, wie genetische Veranlagung und Alter (Ibanez et al., 2018).

Die Lebenszeitprävalenz für einen akuten Herzinfarkt beträgt laut einer Studie des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahre 2013 rund 4,7% (“RKI - Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt,” n.d.). Diese Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter. Aufgrund des demografischen Wandels in Deutschland und der im Rahmen dessen steigenden Anzahl der über 70-jährigen, gilt es hier in die Forschung zu investieren.

Hierbei sind nicht nur die hohen Mortalitätsraten, sondern auch die Morbidität in Folge einer verminderten Herzmuskelfunktion nach MI durch ungünstige postischämische Umbauprozesse von Relevanz. Dazu ist neben einer ausreichenden primären Prävention auch eine Verbesserung der Nachsorge bedeutsam.

1.1.2 Pathophysiologie

Pathophysiologische Ursache eines MI stellt meist eine rupturierter Plaque im Rahmen einer Atherosklerose mit daraus resultierender Thrombose und Stenose oder vollständiger Okklusion dar. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, existieren beeinflussbare und unbeeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung dieser Erkrankung (Ibanez et al., 2018). Dabei entstehen „90% aller Myokardinfarkte[…] durch Faktoren einer ungesunden Lebensweise“(Yusuf et al., 2004).
Die resultierende Ischämie führt zu schwerwiegenden Störungen des Metabolismus und des Gleichgewichtes der Elektrolyte und induziert so eine Abfolge von Mechanismen, die zu einer rapiden Nekrotisierung der Kardiomyozyten führen, welche sich von der subendokardialen bis in die subepikardiale Schicht zieht (Frangogiannis, 2015).
Bereits circa vier bis sechs Stunden nach Infarkt kommt es zu einer mikroskopisch sichtbaren Koagulationsnekrose. Dem zugrunde liegt eine Signalkaskade, in Gang gesetzt durch das nekrotisierende Gewebe, welches im Verlauf zu einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion führt. An dieser Reaktion sind viele verschiedenen Immunzellen, unter anderem neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen beteiligt (Zaidi et al., 2021).
Ausgelöst wird die inflammatorische Reaktion unter anderem durch sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). DAMPs sind endogene Moleküle, zum Beispiel Hitzeschockproteine, die aus geschädigten Zellen freigesetzt werden und als Gefahrensignal, sowie als Auslöser einer inflammatorischen Reaktion dienen (Roh and Sohn, 2018). Dazu interagieren sie mit den sogenannten *pattern recognition receptors* (PRRs). Diese PRRs existieren zum einen als lösliche Rezeptoren, so wie auch als Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des adaptiven Immunsystems und helfen so bei dessen Aktivierung (Palm and Medzhitov, 2009).
Sechs bis 24 Stunden nach Infarkt bildet sich ein hyperämischer Randsaum mit einer vermehrten Anreicherung von neutrophilen Granulozyten. Diese gelangen über das Gefäßsystem gemeinsam mit anderen Blutzellen an das entzündete Gewebe. Dort wandern sie entlang eines Konzentrationsgradienten der Signalstoffe, Chemokine, durch das Endothel in die Zelle; wo sie mittels eines Transportprozesses, der als Chemotaxis bezeichnet wird, an den Entzündungsherd gelangen. Die genannten Chemokine sind Signalstoffe, wie beispielsweise C3a und C5a, welche als Teil des Komplementsystems

eine wichtige Rolle in der Immunkaskade haben. Das Komplementsystem hat unter anderem die Aktivierung von Makrophagen zur Folge, welche nekrotisiertes Gewebe phagozytieren und damit den Prozess der Wundheilung und Gewebereparatur einleiten. Der inflammatorischen Phase schließt sich dann die reparative und proliferative Phase an, welche die strukturelle Stabilisierung des Ventrikels initiiert (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Drei bis sieben Tagen post Infarkt kommt es zur Entstehung von Granulationsgewebe, sowie zu einer Unterdrückung der entzündlichen Reaktion. Fibroblasten vermehren sich, differenzieren sich in Myofibroblasten und produzieren reichlich extrazelluläre Matrixproteine, um die strukturelle Stabilität des infarzierten Ventrikels zu erhalten. Es kommt zur Fibrosierung mit Expansion der extrazellulären Matrix. Dies kann entgegen der ursprünglichen Absicht im Verlauf zu einer erheblichen Einschränkung der ventrikulären Pumpfunktion führen (Frangogiannis, 2015; Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Unter den genannten Immunzellen, die zur Aktivierung der Immunkaskade führen, finden sich unter anderem lymphatische Zellen, wie B-und T-Zellen. In den ersten sieben Tagen nach Infarkt sind dabei primär die CD8+-zytotoxischen T-Zellen vertreten. Deren Funktion ist noch nicht abschließend geklärt, aber eine Studie von Ilatovskaya et al. zeigt deren Einfluss auf die Quervernetzung der Kollagenfasern (Ilatovskaya et al., 2019). Acht Wochen nach Infarkt überwiegen hingegen die CD4+-Th2-Helferzellen, welche durch ihre Sekretion von Interleukin(IL)-4 und IL-13 eine ausschlaggebende Rolle in der Kollagensynthese und somit für den Aufbau der extrazellulären Matrix spielen (Zaidi et al., 2021). Piroth et al. konnten bei Hyaluron-Synthase-3 (Has3)-defizienten Mäusen im Ischämie-/Reperfusions-Modell (I/R) neben einer größeren Infarktnarbe und einer reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktion, interessanterweise auch eine deutlich verminderte Anzahl CD4-positiver-Zellen sowie eine Zunahme regulatorischer T- und TH17-Zellen, im Vergleich zu Has3-suffizienten Mäusen zeigen (Piroth et al., 2022). Dies lässt einen engen Zusammenhang der Hyaluronsäure-Synthese und den damit verbundenen kardialen Umbauprozessen, mit der T-Zell-gesteuerten Immunantwort nach einem MI vermuten.

Post Infarkt findet außerdem eine Rekrutierung von B-Zellen statt, welche durch Produktion von Antikörpern (AK) sowie durch die Freisetzung von lL, sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Wirkung haben können (Daley and Bénézech, 2024).

1.1.3 Therapie

Kardiovaskuläre Erkrankungen gelten in westlichen Ländern als führende Todesursache, wobei die koronare Herzkrankheit (KHK) für die Mehrzahl der Todesfälle in dieser Klassifikation verantwortlich ist (Tsao et al., 2022). Zahlreiche Studien dokumentieren einen Rückgang der Inzidenz von MI im Zusammenhang mit der verstärkten Anwendung moderner Therapiemaßnahmen. Insbesondere im letzten Jahrzehnt wurden erhebliche Fortschritte in der Akutbehandlung des MI erzielt. Reed et al. heben dabei insbesondere die Weiterentwicklung der koronaren Revaskularisation sowie pharmakologischer Therapiestrategien hervor (Reed et al., 2017).
Die sichere und rasche Diagnosestellung eines MI stellt den ersten und essenziellen Schritt für eine erfolgreiche Therapie dar. Im Fall eines ST-Hebungsinfarkts (STEMI) erfolgt unmittelbar die Akutbehandlung, welche – sofern verfügbar – in der sofortigen koronaren Revaskularisation mittels Herzkatheter besteht. Patienten, die mittels primärer perkutaner koronarer Intervention (PCI) behandelt werden, erhalten in der Regel eine duale Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure und einem P2Y12-Inhibitor, ergänzt durch ein parenteral verabreichtes Antikoagulans. Koeth et al. konnten in einer Studie eine signifikante Verbesserung der Prognose durch die PCI-Therapie nachweisen (Koeth et al., 2009).
Ist eine PCI innerhalb von 120 Minuten nicht realisierbar, stellt die medikamentöse Fibrinolyse eine sinnvolle Alternative dar. Darüber hinaus ist bei Patienten mit hohem Rezidivrisiko oder hämodynamischer Instabilität die koronare Bypass-Operation eine etablierte Therapieoption. Diese kann sowohl als Notfallintervention als auch elektiv durchgeführt werden (Ibanez et al., 2018).

Das postakute Management zielt primär darauf ab, die kardiale Belastung durch medikamentöse Therapie zu reduzieren. Der Einsatz von β-Blockern dient der Senkung von Herzfrequenz und myokardialer Sauerstoffnachfrage sowie der Prävention von Arrhythmien. Inhibitoren, welche das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) hemmen, werden eingesetzt, um einem ungünstigen ventrikulären Umbau im Infarktgebiet entgegenzuwirken. Zusätzlich ist die Fortführung einer dualen Plättchenhemmung, analog zur Therapie bei PCI, Standard. Alternativ kann eine Triple-Therapie, bei der ein weiteres Antikoagulans ergänzt wird, zur Sekundär- und Rezidivprophylaxe indiziert sein (Ibanez et

al., 2018; Thygesen et al., 2019). In den letzten Jahren haben Statine zunehmend an Bedeutung in der Nachsorge gewonnen, da sie das Fortschreiten der KHK signifikant reduzieren (Kinlay and Ganz, 2003).

Neben der medikamentösen Therapie stellt die Lebensstilmodifikation eine zentrale Säule in der MI-Nachsorge dar. Hierbei sind insbesondere die Kontrolle von Blutzucker und Blutdruck, eine konsequente Rauchentwöhnung, eine Gewichtsreduktion sowie regelmäßige körperliche Aktivität von hoher Bedeutung (Doughty et al., 2017).

1.2 Kardialer Metabolismus bei Infarkt

Das gesunde Herz weist einen enorm hohen Energieverbrauch auf. Um die großen Mengen an Adenosintriphosphat (ATP) zu produzieren und somit sowohl die Muskelkontraktion als auch den Elektrolythaushalt aufrechtzuerhalten, bezieht das Herz etwa 95 % seiner Energie über die oxidative Phosphorylierung. Diese verknüpft die Atmungskette mit der ATP-Synthese, wobei freie Fettsäuren (FS) und Kohlenhydrate, insbesondere Glukose, als primäre Substrate dienen. Die restliche Energie wird über die Glykolyse bereitgestellt (Lopaschuk, 2017).

Im Rahmen eines Myokardinfarkts führt der ausgeprägte Sauerstoffmangel zu einer verstärkten ATP-Produktion durch anaerobe Glykolyse. Dabei entstehen vermehrt Protonen, die zu einem Ungleichgewicht im Elektrolythaushalt und einem Calciumüberschuss in den Kardiomyozyten führen. Außerdem steigt der Laktatspiegel an, was eine Laktatazidose begünstigen kann. Diese metabolischen Veränderungen und die Anhäufung von Stoffwechselprodukten wie Laktat und Protonen beeinträchtigen die Herzfunktion zusätzlich. Während der Reperfusionsphase verschiebt sich die Energiegewinnung wieder vermehrt hin zur Fettsäureoxidation, zulasten der Glukoseoxidation (Lopaschuk, 2017).

Die reduzierte Herzleistung und das daraus resultierende verringerte Herzzeitvolumen aktivieren kompensatorische Mechanismen. Hierzu zählt die β-adrenerge Stimulation, die eine Ausschüttung von Katecholaminen bewirkt, um die Inotropie und Chronotropie zu steigern (Lopaschuk et al., 2010). Katecholamine werden in der Nebennierenrinde gebildet und sowohl aus sympathischen Nervenfasern als auch endogen aus dem Myokard freigesetzt. In den ersten zehn Minuten der Ischämie erfolgt eine massive Noradrenalin-Freisetzung durch Exozytose an den sympathischen Nervenendigungen. In der darauffolgenden Phase von 30 Minuten sammelt sich Noradrenalin im extrazellulären Raum an, wird jedoch über Carrier-Systeme rezykliert. Nach über 40 Minuten führt die erhöhte Noradrenalin-Konzentration durch gesteigerte Membranpermeabilität zur Zellnekrose (Schömig, 2019). Petersen et al. konnten zeigen, dass Patienten, die bei Aufnahme initial einen normal bis niedrigen Katecholaminspiegel nach akutem MI zeigten, bei Entlassung eine bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion aufwiesen als Patienten mit initial erhöhtem Katecholamin-Spiegel (Petersen et al., 2003). Weitere Studien untermauern den schädlichen Einfluss eines prolongierten Katecholamin-

Anstiegs, der unter anderem zu vermehrter Fibrose (Mascolo et al., 2017) und zu einem gesteigertem Sauerstoffverbrauch (Grassi et al., 2015) beiträgt.
Mit dem Anstieg der Katecholamine, kommt es außerdem zu einer vermehrten β-adrenergen Stimulation der peripheren Lipolyse (Young and Zechner, 2013), durch welche in Fettdepots gespeicherte Triacylglyceride (TAGs) in unveresterte FS und Glycerin gespalten und freigesetzt werden (Duncan et al., 2007). Dieser Prozess wird maßgeblich durch die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) und die Hormon-sensitive Lipase (HSL) katalysiert. Das Überangebot an freien FS führt zu einer Rückkopplung, die die Glukoseaufnahme hemmt und somit den Glukoseabbau in den Zellen reduziert. Dieser Regulationsmechanismus wird als „Glukose-Fettsäure-Zyklus“ oder „*Randle-Cycle*“ bezeichnet. Er beschreibt den wechselseitigen hemmenden Effekt, den Metabolite der Fettsäureoxidation auf die Glykolyse und umgekehrt Metabolite der Glykolyse auf die Fettsäureoxidation ausüben (Hue and Taegtmeyer, 2009; Randle et al., 1963).

1.3 Akuter Myokardinfarkt, weißes Fettgewebe und periphere Lipolyse

Das weiße Fettgewebe (FG) spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen. Erkrankungen wie Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus sind mit einer erhöhten Prävalenz für Myokardinfarkte vergesellschaftet (Gruzdeva et al., 2018). Physiologischerweise dient das weiße FG als Energiespeicher für katabole Stoffwechsellagen. Die gespeicherte Energie liegt in Form von TAGs vor, die im Rahmen der Lipogenese aus aktiviertem Glycerin und freien FS synthetisiert werden (Young and Zechner, 2013).

Im akuten MI aktiviert der Körper verschiedene Kompensationsmechanismen, um das verminderte Herzzeitvolumen kurzfristig auszugleichen. Wie bereits erläutert, führt die Aktivierung des Sympathikus zu einer verstärkten Ausschüttung von Katecholaminen, welche wiederum β_3-adrenerge Rezeptoren im weißen FG stimulieren. Über den $G_{\alpha s}$-Signalweg wird die Adenylatcyclase aktiviert, die die Umwandlung von ATP zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysiert. cAMP wirkt als *second messenger* und aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Die PKA aktiviert die Lipolyse durch zwei Hauptmechanismen: Erstens phosphoryliert sie das Protein Perilipin-1, das auf der Oberfläche der Lipidtropfen lokalisiert ist und diese unter Ruhebedingungen vor dem Zugriff lipolytischer Enzyme schützt (Sztalryd and Brasaemle, 2017). Durch die Phosphorylierung wird die Schutzfunktion aufgehoben und Co-Aktivatoren der ATGL freigesetzt, was zu einer erhöhten ATGL-Aktivität führt. Zweitens phosphoryliert die PKA direkt die HSL, die daraufhin zur Oberfläche transloziert und dort DAG zu Monoacylglycerol (MAG) abbaut (Holm, 2003; Miyoshi et al., 2006; Sztalryd et al., 2003). Die finale Spaltung von MAG zu Glycerin und freier FS erfolgt durch die Monoacylglycerol-Lipase (MGL). Die gesamte Lipolyse wird somit durch die Enzyme ATGL, HSL und MGL katalysiert (Young and Zechner, 2013).

Die freigesetzten freien FS werden überwiegend in Skelettmuskelgewebe, Leber und Herz aufgenommen. Besteht jedoch ein Missverhältnis zwischen dem Angebot an Lipiden und deren oxidativer Verwertung, kommt es zur intrazellulären Lipidakkumulation. Die daraus resultierenden toxischen Effekte werden als Lipotoxizität bezeichnet (Ghaben and Scherer, 2019). Dabei beschreibt eine Lipotoxizität die Konstellation aus gestörtem FS-Stoffwechsel, kardialer Lipidüberladung und kontraktiler Dysfunktion (Sharma et al., 2004).

1.4 Adipozyten-Triglycerid-Lipase

Die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) spielt eine zentrale Rolle in der Lipolyse und wird daher als vielversprechender therapeutischer Ansatz bei Stoffwechselerkrankungen betrachtet. Sie katalysiert den ersten Schritt der Lipolyse, bei dem TAG zu Diacylglycerol (DAG) und freien FS abgebaut wird (Cerk et al., 2018). Seit Entdeckung der ATGL hat sich das Verständnis der intrazellulären Mobilisierung freier FS entscheidend weiterentwickelt. Die ATGL ist in kleinen Konzentrationen im Gewebe der Muskulatur, der Leber, des Herzens und des Gastrointestinaltraktes zu finden. Zum größten Teil katalysiert das Enzym jedoch im weißen und braunen FG (Schreiber et al., 2019). Die Aktivität und Expression des Gens wird transkriptionell und post-transkriptionell reguliert (Zimmermann et al., 2004). Die Regulation des Enzyms wird dabei als eine entscheidende Schnittstelle zwischen dem Lipidangebot und dem Lipidbedarf betrachtet, da überschüssige FS die bereits genannten lipotoxischen Effekte hervorrufen können (Cerk et al., 2018).

Die freien FS dienen im Weiteren als Vorstufen für Membranlipide, wie beispielsweise Glykolipide, spielen aber auch als Liganden für nukleare Rezeptoren eine wichtige Rolle. Freie FS gelten außerdem nach Verwertung im Citratzyklus als effektivste Energiequelle, sie sind dabei dem Protein- und Kohlenhydratabbau überlegen. Demnach gilt die ATGL, aufgrund der Freisetzung freier FS, als ein Schlüsselenzym für die Energie-Homöostase des ganzen Körpers (Schreiber et al., 2019).

Auch im kardialen Metabolismus spielt die ATGL eine maßgebliche Rolle. Haemmerle et al. konnten 2006 erstmals nachweisen, dass eine genetische Inaktivierung der ATGL, durchgeführt an einem Ganzkörper-Knockout (KO), unter anderem, zu einer Akkumulation von Lipiden im Herzen, einer verminderten kardialen Funktion und im Rahmen dessen zu einem frühzeitigen Herztod führt (Haemmerle et al., 2006).

Seit einigen Jahren wird daher an einem kompetitiven Inhibitor der ATGL geforscht, dem Atglistatin, welcher spezifisch die murine ATGL in FG und Leber hemmt (Mayer et al., 2013; Schweiger et al., 2017; Thiele et al., 2021). In einer Studie von Schweiger et al. konnte ein positiver Einfluss auf die Insulinresistenz sowie die Glukosetoleranz unter Atglistatin-Gabe in Mäusen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch bei Langzeit-Behandlung mit Atglistatin, im Vergleich zu ATGL-KO Modellen, keine Lipidakkumulation (Schweiger et al., 2017). Parajuli et al. zeigten außerdem eine verbesserte kardiale

Funktion durch die Behandlung mit Atglistatin, bei druckinduzierter Herzinsuffizienz in Mausmodellen (Parajuli et al., 2018). Dabei sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen der kardioprotektiven Wirkung des Atglistatins nicht abschließend geklärt. Die Wirkung von Atglistatin wurde von unabhängigen Arbeitsgruppen in verschiedenen Spezies untersucht. Dabei konnte eine artenspezifische Wirkung der ATGL-Inhibition festgestellt werden, bisher zeigte sich dabei jedoch keine effektive Inhibition der humanen Lipolyse durch Atglistatin-Gabe (Grabner et al., 2022; Schweiger et al., 2017). Daraufhin entwickelten Grabner et al. 2022 einen selektiven Inhibitor der humanen ATGL, NG-497, dessen sichere Lipolyse-Inhibition sich jedoch, vor Anwendung im Menschen, erst in präklinischen Studien zeigen muss (Grabner et al., 2022).

1.5 ATGL-Inhibition führt zu einer Verbesserung der kardialen Funktion

Die ATGL wurde 2004 im Rahmen unabhängiger experimenteller Studien identifiziert (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zechner et al., 2005; Zimmermann et al., 2004). Seitdem stellt das Enzym einen zentralen Forschungsschwerpunkt zahlreicher Arbeitsgruppen dar. Untersuchungen an KO- sowie transgenen Mausmodellen haben seither entscheidend zum Verständnis der (patho-)physiologischen Funktionen der ATGL beigetragen (Schreiber et al., 2019). Die ATGL gilt als vielversprechendes Ziel therapeutischer Interventionen zur Verbesserung der Herzfunktion, was die im Weiteren aufgeführten Studien belegen:

Salatzki et al. untersuchten als eine der ersten Arbeitsgruppen den Einfluss der Lipolyse, spezifisch der ATGL, im Kontext einer kardialen Insuffizienz. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit einem Adipozyten-spezifischen ATGL-KO generiert. Diese Tiere wurden einer transversalen Aortenkonstriktion unterzogen, um eine druckvermittelte Herzinsuffizienz zu modellieren. Zur Beurteilung der kardialen Funktion wurden unter anderem die linksventrikuläre Muskelmasse, der diastolische linksventrikuläre Durchmesser sowie Veränderungen im Lipidom analysiert. Die KO-Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe verringerte Spiegel freier FS, eine veränderte Lipidom-Zusammensetzung sowie eine signifikant verbesserte systolische Ejektionsfraktion. Zudem wiesen sie eine reduzierte linksventrikuläre Dilatation auf.

Darüber hinaus zeigte sich im ATGL-KO eine Reduktion pro-apoptotischer Lipide. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Inhibition der ATGL im FG das Herz vor nachteiligen Veränderungen im kardialen Lipidom schützen kann. (Salatzki et al., 2018).

2018 berichteten Parajuli et al. über vergleichbare Ergebnisse: Auch diese Forschungsgruppe nutzte die Methode der transversalen Aortenkonstriktion, um eine druckinduzierte Herzinsuffizienz zu modellieren. Die ATGL-Knockout-Mäuse wiesen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Salatzki et al., eine erhöhte linksventrikuläre Ejektionsfraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Zusätzlich zum genetischen KO wurde eine pharmakologische Hemmung der ATGL mittels Atglistatin durchgeführt. Dabei zeigte sich eine reduzierte linksventrikuläre Hypertrophie, sowie Hinweise auf eine verminderte druckbedingte Belastung des Lungenkreislaufs (Parajuli et al., 2018).

In einer weiteren Studie konnten Thiele et al. die kardioprotektiven Effekte einer Lipolyse-Inhibition mittels Atglistatin in einem Mausmodell nachweisen. Zur Simulation eines

Katecholamin-vermittelten Herzschadens wurde Isoproterenol (ISO), ein Noradrenalin-Derivat, eingesetzt. Die Verabreichung von ISO führte zu einer beeinträchtigten Herzfunktion, die auf subendokardiale fibrotische und pro-apoptotische Prozesse zurückgeführt wurde, ausgelöst unter anderem durch die Katecholamin-induzierte Freisetzung freier FS. Die Behandlung mit Atglistatin, mit Beginn vor Verabreichung des ISO, führte nicht nur zu einer Verringerung der freien FS, sondern auch zu einer signifikanten Reduktion pro-fibrotischer und pro-apoptotischer Vorgänge (Thiele et al., 2021).

In einer Studie von Takahara et al. führte sowohl die pharmakologische ATGL-Inhibition mit Atglistatin, als auch der genetische ATGL-Knockout nach einer zweiwöchigen, ISO-induzierten chronischen adrenergen Stimulation, zu einer Verbesserung der zuvor ausgelösten kardialen Dysfunktion. Dabei wurde eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie und Fibrosierung, sowie eine verminderte Sekretion von Galektin-3 beobachtet. Galektin-3 spielt eine zentrale Rolle als Aktivator von Makrophagen und als Induktor pro-fibrotischer Prozesse. Damit konnte eine Abnahme der ISO-induzierten kardialen Inflammation und des kardialen Umbaus durch die Inhibition der ATGL nachgewiesen werden (Takahara et al., 2021).

Die oben genannten Arbeiten beweisen also, dass eine genetische, beziehungsweise pharmakologische ATGL-Inhibition zu einer verbesserten kardialen Funktion führt (Parajuli et al., 2018; Salatzki et al., 2018; Takahara et al., 2021; Thiele et al., 2021).

Bottermann et al. untersuchten in einer 2021 veröffentlichten Studie, inwieweit die periphere Inhibition der Lipolyse mittels Atglistatin die Pathophysiologie der myokardialen Ischämie beeinflusst. Hierzu wurde Atglistatin zur Hemmung der ATGL zwei Tage vor einer 60-minütigen kardialen Ischämie verabreicht. Sieben Tage nach Reperfusion zeigte sich eine signifikant verbesserte systolische Pumpfunktion. Interessanterweise ging diese funktionelle Verbesserung nicht mit einer Reduktion der Infarktgröße einher (Bottermann et al., 2021). Dies legt nahe, dass die protektiven Effekte der Lipolyseinhibition auf die kardiale Funktion nicht primär durch eine Verringerung des ischämischen Gewebeschadens, sondern vielmehr durch alternative Mechanismen vermittelt werden.

1.6 Fett-assoziierte lymphoide Cluster

Fett-assoziierte lymphoide Cluster (FALCs) bezeichnen Ansammlungen von Immunzellen im FG, die überwiegend aus B- und T-Lymphozyten bestehen, aber auch Makrophagen und weitere Zellen des adaptiven Immunsystems umfassen (Cruz-Migoni and Caamaño, 2016). Auch TH2-Helferzellen sind in FALCs nachweisbar; sie spielen eine zentrale Rolle bei der Proliferation von B-Zellen (Moro et al., 2010). FALCs befinden sich im viszeralen FG, insbesondere im Omentum, Mesenterium und Mediastinum, im gonadalen FG sowie im Perikard. Während im Omentum die sogenannten „*milky spots*“ (dt.: milchige Flecken) die größten lymphoiden Ansammlungen darstellen, gelten FALCs in der Peritonealhöhle, im Mediastinum und insbesondere im Perikard als primäre Orte der Immunantwort (Bénézech et al., 2015). Charakteristisch für FALCs ist ihr enger Kontakt mit umgebenden Adipozyten, da ihnen, anders als klassischen Lymphknoten, eine kapselartige Abgrenzung fehlt. Die assoziierten Adipozyten sind morphologisch heterogen und variieren in Größe und Form (Moro et al., 2010). Darüber hinaus sind FALCs stark vaskularisiert. Sie enthalten glomeruläre Gefäßstrukturen sowie postkapilläre Hochendothelvenolen, welche die Leukodiapedese ermöglichen und insbesondere in inflammatorischen Prozessen von Bedeutung sind (Daley and Bénézech, 2024).

Im Vergleich zu anderen lymphoiden Geweben fällt in den FALCs die hohe Dichte an B1- und B2-Zellen auf. B1-Zellen gelten als regenerierbare Immunzellen mit Funktionen, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, während B2-Zellen dem adaptiven Immunsystem angehören und primär humorale Immunantworten vermitteln (Jr et al., 2001). Eine aktuelle Übersichtsarbeit von Bénézech et al. beschreibt detailliert, wie FALCs im Omentum die Immunantwort koordinieren: B1-Zellen entfalten dabei überwiegend antiinflammatorische Wirkungen, wohingegen B2-Zellen durch die Sekretion autoreaktiver IgG-Antikörper und proinflammatorischer Zytokine inflammatorische Prozesse verstärken (Daley and Bénézech, 2024). Darüber hinaus konnten regulatorische B-Zellen innerhalb der FALCs identifiziert werden, die durch die Produktion von IL-10 sowie die Inhibition CD8-positiver T-Zellen immunmodulatorisch und antiinflammatorisch wirken (Lemoine et al., 2009).

Arbeiten von Jackson-Jones und Bénézech zeigen, dass bei pleuraler Inflammation – induziert durch inhalative Verabreichung von *Litomosoides sigmodontis* und *Alternaria alternata* – eine schnelle Aktivierung mediastinaler FALCs erfolgt, begleitet von einer B-

Zell-Aktivierung (Jackson-Jones and Bénézech, 2020). Solche Inflammationsprozesse gehen mit einer schnellen Neubildung von Lymphclustern, einer Umstrukturierung der zellulären Zusammensetzung sowie einer Aktivierung von B- und T-Lymphozyten einher (Cruz-Migoni and Caamaño, 2016). Die Aktivierung von B-Zellen erfolgt unter anderem über *Toll*-like-Rezeptoren (TLR), einer Klasse von *pattern recognition receptors* (PRRs), woraufhin sie zu FALCs migrieren und dort proliferieren. In diesem Kontext kommt es zur Produktion von IgM-Antikörpern (Bénézech et al., 2015). Stromazellen innerhalb der FALCs sezernieren zudem das Zytokin IL-33, welches Typ-2-*innate lymphoid cells* (ILC2) aktiviert. Diese wiederum setzen IL-5 frei, das die weitere Aktivierung von B-Zellen sowie deren IgM-Produktion stimuliert (Moro et al., 2010). Der genaue Mechanismus der IL-33-Freisetzung aus Stromazellen ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Zusätzlich zur B-Zell-Aktivierung wurde auch eine T-Zell-Antwort in FALCs beschrieben (Rangel-Moreno et al., 2009). Die meisten dieser Befunde stammen aus Studien mit murinen FALCs im Omentum oder der Pleurahöhle, lassen sich jedoch auch auf mediastinale FALCs übertragen, die eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Reaktionen, besonders im Falle eines Myokardinfarkts spielen. Hierbei kommt es infolge ischämischer Gewebeschädigung ebenfalls zu ausgeprägten Inflammationsprozessen.

Basierend auf den genannten Erkenntnissen wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Zusammensetzung der Immunzellpopulation in FALCs durch die Inhibition der Lipolyse beeinflusst wird und diese veränderte Zellkomposition das kardiale *Remodelling* nach Myokardinfarkt moduliert.

Diese Hypothese stützt sich unter anderem auf eine Studie von Horckmans et al., in der nach kardialem Infarkt, ein ausgeprägtes Wachstum des mediastinalen FG sowie ein starker Anstieg von B-Zellen, insbesondere Granulozyten-stimulierender B-Zellen, in einem Mausmodell beobachtet wurde. Diese Zellen fördern die Infiltration neutrophiler Granulozyten ins Myokard und stehen im Zusammenhang mit verstärkter Fibrosierung. Eine Entfernung des mediastinalen FG in CB2-Rezeptor-defizienten Mäusen konnte die Fibrosierung sowie die damit einhergehende Einschränkung der Herzfunktion verhindern (Horckmans et al., 2018).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten auf eine entscheidende immunregulatorische Rolle der FALCs im Rahmen ischämischer Herzerkrankungen hin.

1.7 Ziele der Arbeit

Das viszerale FG spielt bekanntermaßen eine zentrale Rolle im Immunsystem und ist wesentlich an der Regulation akuter Inflammationen sowie chronischer Erkrankungen beteiligt (Batra and Siegmund, 2012; Frühbeck, 2008).
Zahlreiche Studien weisen auf die immunologische Relevanz des mediastinalen FG und der darin lokalisierten FALCs hin. Im Rahmen eines ischämischen Ereignisses kommt es zu einer verstärkten Rekrutierung von Immunzellen in diese Strukturen, die wesentlich an der Koordination der Immunantwort beteiligt sind. Dadurch nehmen sie Einfluss auf die Herzgewebereparatur sowie das postischämische kardiale *Remodelling* (Bénézech et al., 2015; Horckmans et al., 2018). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Zellkomposition innerhalb der FALCs im Rahmen eines murinen MI-Modells detailliert zu analysieren.
Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Rolle der Lipolyse im Kontext der ischämischen Herzerkrankung. Nach einem MI ist eine Katecholamin-bedingt gesteigerte periphere Lipolyse zu beobachten, die mit erhöhten Spiegeln freier FS und einer damit verbundenen Lipotoxizität einhergeht. Diese kann zum Untergang von Kardiomyozyten beitragen und so die kardiale Dysfunktion weiter verstärken. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition der Lipolyse, einhergehend mit reduzierten Plasma-FS, lipotoxische Effekte abschwächen (Girousse et al., 2013; Perry et al., 2015; Schoiswohl et al., 2015) und die kardiale Funktion verbessern kann (Parajuli et al., 2018; Takahara et al., 2021; Thiele et al., 2021).
Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Inhibition der Lipolyse im Rahmen eines MI die Immunzellzusammensetzung in den FALCs so beeinflusst, dass es zu abgeschwächten Inflammationsprozessen kommt. Dies könnte in der Folge durch eine Modulation des kardialen *Remodellings* zu einer verbesserten Herzfunktion führen.
Zu diesem Zweck wurden verschiedene murine Lipolyse-Inhibitionsmodelle mit unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten und Inhibitionsintervallen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit evaluiert. Dabei wurde das entnommene mediastinale FG hinsichtlich Adipozytengröße, Größe der FALCs und Immunzellkomposition innerhalb der Cluster analysiert und statistisch ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1.1 Allgemeine Chemikalien

Tabelle 1: Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Verwendung	Hersteller
Roticlear	Xylolersatz	Carl Roth
Ethanol (70%, 96%, abs.)	Reinigen des Objektträgers	Technisolv- VWR
Citrat-Puffer (pH 6,0)	Antigendemaskierung	BIOZOL
Triton (t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol)	Zelllyse	Sigma-Aldrich
PAP-Pen	Hydrophober Barriere-Fettstift	DCS- Innovative Diagnostik Systeme
Roti Mount DAPI Fluor Care	Eindeckmittel	Roti Mount, Carl Roth
Hämalaun	HE-Färbung	Sigma-Aldrich
1% HCl (Salzsäure)	HE-Färbung	Carl Roth
1% Eosin	HE-Färbung	Carl Roth
Roti Mount	Eindeckmedium	RotiMount, Carl Roth

Tabelle 2: Weitere Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Phosphat-gepufferte Salzlösung (*PBS*)	0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na_2HPO_4, 0,0018 M KH_2PO_4
Tris-gepufferte Salzlösung (*TBS*)	20 mM Tris, 150 mM NaCl
Blockierungs-Lösung	20mM Tris, 137mM NaCl, 10% (V/V) fetales Kalbserum, 1% (m/V) Serumalbumin

2.1.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Automatisches Probenvorbereitungsgerät	Tissue Tek VIP	Sakura Finetek
Mikrotom	HistoCore Autocut	Leica Biosystems
Wasserbad	Inkubationsbad	GFL- Gesellschaft für Labortechnik
Objektträger	Super Frost plus	R. Langenbrick GmbH/ Marienfeld
Brutschrank	Thermo Inkubator B6120	Heraeus Group
Dampfgarer	Intellisteam	Morphy Richards
Sterile Werkbank (+Abzug)		Vinitex
Zentrifuge	Mini Spin plus	Eppendorf SE
Vortexmischer	Dual press to mix Vortex Mixer	Snijders Labs
Pipetten (10,100,1000µl)	Research Plus	Eppendorf SE
Reagenzgefäß	Safe Lock Tubes (1ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf SE
Reagenzgefäß	Cellstar Tubes (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One
Präzisionswaage	Sartorius Practum	Sartorius
Magnetrührer	RH basic 2	IKA Labor- und Analysetechnik
Magnetrührstäbe		Fisherbrand
Kühlschrank	Ultratiefkühlschrank (-20°C, -4°C)	Liebherr
Inkubationskammern	Fast Wells-Inkubationskammer	Fast Wells
Deckgläser (24x50/60mm)	Eindeckglas	Engelbrecht-Medizintechnik

2.1.1.3 Mikroskop

Tabelle 4: Mikroskope

Mikroskop	Bezeichnung	Hersteller
Lichtmikroskop	Axioster plus	Leica
Fluoreszenzlichtquelle	HXP 120C	Zeiss
Mikroskop	Axio Imager M2m	Zeiss

2.1.1.4 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Name	Nummer	Eingesetzte Verdünnung	Spezies	Hersteller
CD3	5690	1:100	Rabbit	abcam
CD19	MCA1439	1:100/ 1:200/ 1:500	Rabbit	BioRad
CD19		1:100	Rat	Invitrogen
CD19	D4V4B	1:100/ 1:200/ 1:500	Rabbit	CellSignaling
CD20	64088	1:50/ 1:100/ 1:200	Rabbit	abcam
PAX 5	109443	1:100/ 1:200/ 1:500	Rabbit	abcam
B220/ CD45-R		1:100/ 1:200	Rabbit	Novus Biologicals

2.1.1.5 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 6: Sekundäre AK für die Immunfluoreszenz

Name	Eingesetzte Verdünnung	Spezies	Hersteller
IgG Alexa Fluor 647	1:200	anti-rabbit	Invitrogen
IgG Alexa Fluor 568	1:200	anti-rabbit	Invitrogen

Weitere Fluoreszierende Materialien: Alexa Fluor 488 Konjugat von 488, Thermo Fisher

2.1.2 Softwaresysteme

Tabelle 7: Softwaresysteme

Programm	Firma	Anwendung
Image J (Freeware)	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland	Auswertung der Adipozyten und Immunfluoreszenz (Schneider et al., 2012)
Graph Pad Prism	Graph Pad Prism Software, Inc.	Statistische Analyse
Zen	Zeiss Software, Carl Zeiss	Bildverarbeitungssystem des Mikroskops
Excel	Microsoft	Tabellenkalkulation

2.1.3 Herstellerverzeichnis

Tabelle 8: Herstellerverzeichnis

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Greiner Bio-One	Solingen, Deutschland
Bio-Rad	Hercules, CA, USA
BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH	Eching, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
DCS- Innovative Diagnostik Systeme	Hamburg, Deutschland
Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	Edermünde, Deutschland
Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
GFL- Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Graphpad Software	La Jolla, CA, USA
Heraeus Group	Hanau, Deutschland
IKA- Werke	Staufen im Breisgau, Deutschland
Leica	Wetzlar, Deutschland
LI-COR	Lincoln, NE, USA
Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Morphy Richards	Mexborough, UK
R. Langenbrick Labor- und Medizintechnik	Emmendingen, Deutschland
Sakura	Staufen im Breisgau, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Snijders	Tilburg, Netherlands
Technisolv, VWR Chemicals	Radnor, Pennsylvania, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Vinitex Laboreinrichtungen GmbH	Coswig, Deutschland
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 *Verwendete Gewebe*

Alle Tierexperimente der vorliegenden Arbeit wurden gemäß nationaler Tierschutzrichtlinien durchgeführt und durch das Komitee des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV, Recklinghausen, Tierversuchsgenehmigung AZ: 81-02.04.2019.A397 und 81-02.04.2018.A079). Für die vorliegende Arbeit war kein Ethikvotum erforderlich. Die Tiere wurden unter Raumtemperatur (20-22°C) und bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Dabei wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von 10-15 Wochen verwendet. Sie hatten stets freien Zugang zu Leitungswasser und Standardfutter. Die Durchführung der Tierversuche sowie die Organentnahmen erfolgte durch Dr. med. Katharina Bottermann.

2.2.1.1 Ligatur-Anlage und Induktion der Ischämie

Zur experimentellen Induktion eines MI in den Mäusen wurde in einem zweistufigen Verfahren zunächst eine Ligatur angelegt, die es ermöglichte, die Ischämie am geschlossenen Thorax 3-7 Tage nach der Anlage durchzuführen (Nossuli et al., 2000). Dazu wurde unter Ketamin/Xylazin-Narkose eine Ligatur um die linke Koronararterie angelegt, diese jedoch nicht zugezogen, die Fadenenden aus dem Thorax herausgeführt und in einer Hauttasche positioniert. Nach drei bis sieben Tagen erfolgte dann die Induktion der Ischämie unter Isoflurannarkose für 60 Minuten bei geschlossenem Thorax. Dabei wurde lediglich die Haut eröffnet, die angelegten Fäden aus der Hauttasche entnommen und mit Gewichten unter Spannung gesetzt, um die Ischämie auszulösen. Eine Ischämie-Zeit von 60 Minuten wurde unter ständiger Überwachung der Vitalparameter und Temperatur durchgeführt. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Buprenorphin. Bei den Sham-operierten Kontrollen, wurde die gleiche Prozedur ohne Zug auf die Fäden durchgeführt.
Diese Experimente wurden von Dominik Semmler und Dr. Katharina Bottermann durchgeführt.

2.2.1.1 Entnahme und Einbettung

Für die vorliegende Arbeit wurde das mediastinale FG durch Dr. Katharina Bottermann, Dr. Luzhou Wang und Heba Zabri nach Tötung der Versuchstiere entnommen. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet, welches eine aufwendigere Nachbereitung des Gewebes erforderlich macht, für die Strukturhaltung der Schnitte allerdings von Vorteil ist. Nach einer Übernacht-Fixierung in 4%- Formalin bei 4°C, wurden die Proben entwässert, in Paraffinblöcke eingebettet und gekühlt.

2.2.2 Modellreihen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss einer Lipolyse-Inhibition auf die FALCs nach oder während kardialer Ischämie getestet. Dafür wurden drei verschiedene Maus-Modelle zur Lipolyse-Inhibition angewandt, die zuvor einer Operation zur Induktion einer kardialen Ischämie unterzogen wurden. Zudem wurde der Einfluss der kardialen Ischämie mit anschließender Reperfusion im Vergleich zu einer Schein-Operation (Sham) zu zwei verschiedenen Entnahmezeitpunkten untersucht.
Das entnommene mediastinale Gewebe wurde dann hinsichtlich der Adipozytengröße, der Clustergröße sowie der Immunzellkomposition der FALCs eruiert.

2.2.2.1 Ischämie/ Reperfusion

Die Mäuse der I/R-Serie wurden einer kontrollierten kardialen Ischämie mit anschließender Reperfusion von 24 Stunden sowie nach 28 Tagen, wie unter 3.2.1.1 beschrieben unterzogen. Schematisch dargestellt ist das Modell in Abbildung (Abb.1). Die Operation wurde von Frau Dr. Katharina Bottermann und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

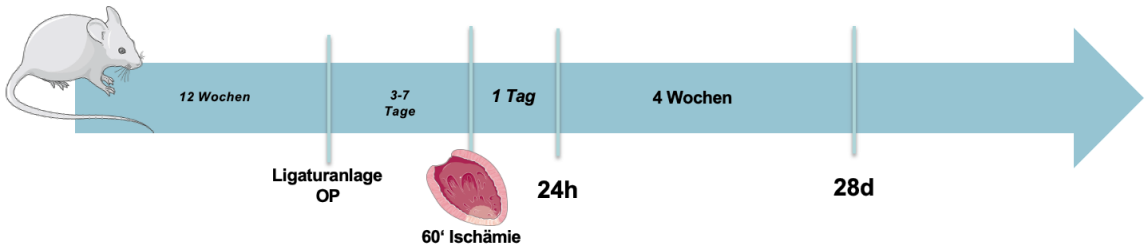

Abbildung 1: Schema des verwendeten Ischämie-Modells, selbsterstellte Abbildung mit Modulen von Smart Sevier, lizenziert unter einer `Creative Common Attribution 3.0 Generic´ Lizenz, http://smart.servier.com

2.2.2.2 Modelle der Lipolyse-Inhibition

Im Folgenden werden die angewandten Modelle der Lipolyse-Inhibition genauer erläutert. In zwei der drei Modelle wird der erste Schritt der Lipolyse, bei dem die ATGL das katalysierende Enzym ist, inhibiert. Als ein pharmakologischer Ansatz wurde dabei der kompetitive, reversible Inhibitor Atglistatin zur spezifischen Inhibition der ATGL angewandt. Der Hemmstoff wird dabei erst nach Induktion der Ischämie oral verabreicht, sodass die Lipolyse, im Rahmen dieses Modells, nur post Infarkt inhibiert wird. Als eine genetische Alternative zur Hemmung der ATGL, ist ein KO bei einer Gruppe der Mäuse induziert worden. Dies hat der Vorteil, dass im Gegensatz zum pharmakologischen Ansatz, die Lipolyse nicht ausschließlich postischämisch, sondern von Beginn an inhibiert wird. Zur Adipozyten-spezifischen Inhibition der Lipolyse über einen kurzen Zeitraum, wurde ein Modell angewandt, bei dem ein synthetischer Rezeptor exprimiert und mit Hilfe eines spezifischen Agonisten aktiviert wird, sodass es über eine Signalkaskade zu einer Lipolyseinhibition kommt. Bei dem sogenannten DREADD (*designer receptor exclusively activated by designer drug*)-Modell fand somit keine direkte Inhibition der ATGL statt.

2.2.2.2.1 Pharmakologisches Atglistatin- Inhibitionsmodell

Die ATGL ist ein Enzym, das den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Lipolyse katalysiert, wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben. Dabei wird TAG zu DAG und FS umgewandelt, wodurch die Freisetzung von FS induziert wird. Pharmakologisch kann sie effektiv und reversibel durch Atglistatin inhibiert werden (Mayer et al., 2013; Schweiger et al., 2017).

Drei bis sieben Tage nach Ligaturanlage erfolgte die Induktion der Ischämie. Nach 24 Stunden Reperfusion wurde die orale Gabe des Atglistatin-enthaltenen Futters (0,4mg/g Futter) begonnen, das mediastinale FG der Mäuse wurde am 28. Tag nach Reperfusion geerntet. Durchgeführt wurden diese Experimente von Frau Heba Zabri.

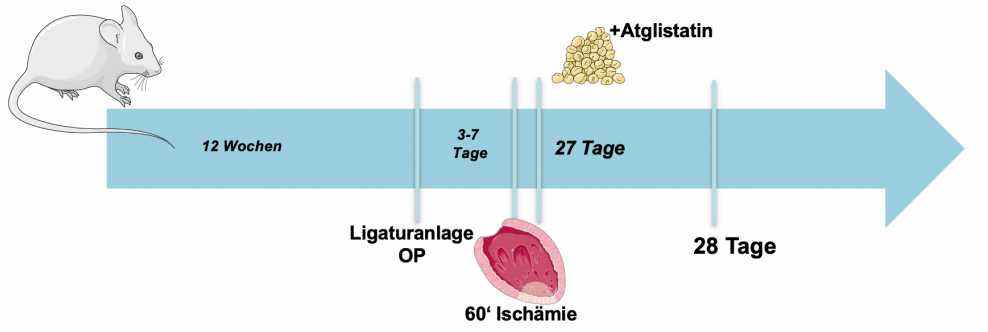

Abbildung 2: Schema der pharmakologischen Lipolyseinhibition mittels Atglistatin, selbsterstellte Abbildung mit Modulen von Smart Sevier, lizenziert unter einer `Creative Common Attribution 3.0 Generic´ Lizenz, http://smart.servier.com

2.2.2.3 Genetisches ATGL-KO- Modell

Zur Generierung der adipozytenspezifischen ATGL-defiziente Mäuse wurden die Linien B6N.129-Pnpla2^{tm1Eek}/J (ATGL-flox) (RRID:IMSR_JAX:024278) und C57BL/6-Tg(Adipoq-icre/ERT2) 1Soff/J (AdipoQiCreERT2) (RRID:IMSR_JAX:025124) der Firma The Jackson Laboratory (USA) gekreuzt (Sassmann et al., 2010; Sitnick et al., 2013). Der KO wurde zuvor mittels 4-Hydroxy-Tamoxifen-Behandlung induziert. Die zehn Wochen alten Mäuse erhielten dazu für fünf Tage 4-Hydroxy-Tamoxifen-Injektionen zur Induktion des KO. Diese Experimente wurden durchgeführt von Frau Heba Zabri.

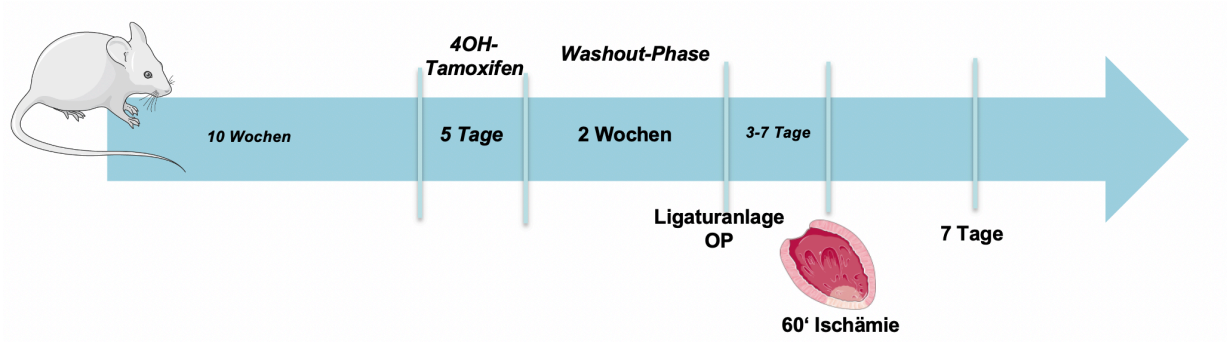

Abbildung 3: Schema der Lipolyseinhibition mittels ATGL-KO, selbsterstellte Abbildung mit Modulen von Smart Sevier, lizenziert unter einer `Creative Common Attribution 3.0 Generic´ Lizenz, http://smart.servier.com

2.2.2.4 Synthetisches DREADD-Modell

Ein weiteres Inhibitionsmodell, welches unabhängig von der ATGL fungiert, ist ein „designer receptors exclusively activated by designer drug" (DREADD). Dabei handelt es sich um modifizierte G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie binden ausschließlich synthetische Liganden, wie den DREADD-Agonisten 21, CP21. CP21 zeigte sich in präklinischen In-vitro- und In-vivo-Modellen als wirksam, wobei es weitgehend ein pharmakologisch inertes Wirkprofil aufwies (Thompson et al., 2018). Bei der G_i-Protein-gekoppelten Signalkaskade kommt es, im Gegensatz zu dem unter 2.3. erwähnten $G_{\alpha s}$-Weg, zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, zu einer verminderten Aktivität der PKA und demnach zu einer fehlenden Phosphorylierung und Aktivierung der lipolytischen Enzyme. Bei den Mäusen, die diesen synthetischen DREADD, den hM4Di- Rezeptor exprimieren, kann so effektiv nach Agonisten-Injektion, die G_i-Protein-gekoppelte Signalkaskade in Gang gesetzt und die Lipolyse inhibiert werden (Farrell and Roth, 2013; Rogan and Roth, 2011).

R26-LSL-Gi-DREADD-Mäuse (RRID:IMSR_JAX:026219) (Zhu et al., 2016) wurden mit der C57BL/6-Tg(Adipoq-icre/ERT2) 1Soff/J (RRID:IMSR_JAX:025124) der Firma The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA) gekreuzt und erhielten für fünf Tage 4-Hydroxy-Tamoxifen, um so einen adipozytenspezifischen, induzierbaren hM4Di-Rezeptor zu exprimieren. Für die Aktivierung des DREADDs wurde, kurz vor und kurz nach Ischämie, der Agonist CP21 (3mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. Das mediastinale FG der Mäuse wurde anschließend nach 24 Stunden und sieben Tagen Reperfusion entnommen. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Luzhou Wang (Wang, 2024).

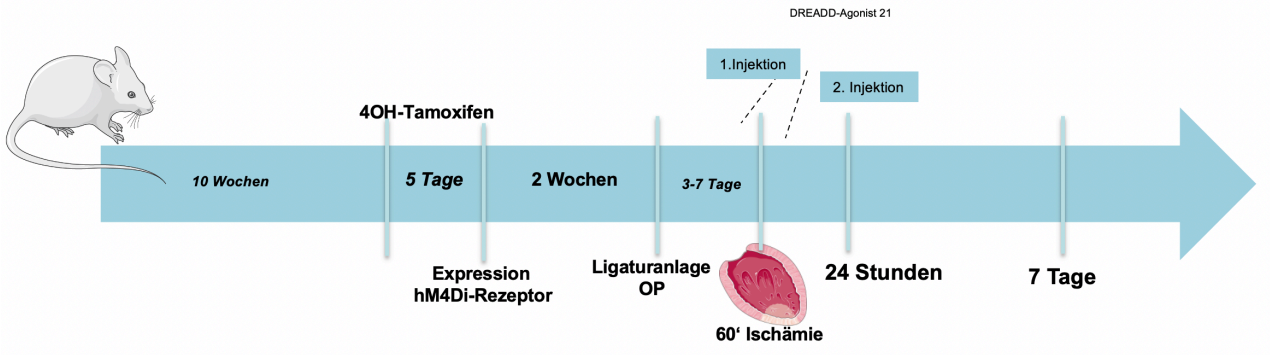

Abbildung 4: Schema der durchgeführten Lipolyseinhibition durch Exprimierung und Aktivierung eines synthetischen Rezeptors, selbsterstellte Abbildung mit Modulen von Smart Sevier, lizenziert unter einer `Creative Common Attribution 3.0 Generic´ Lizenz, http://smart.servier.com

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Paraffinschnitte

Zur Herstellung der Gewebeschnitte kam ein Mikrotom zum Einsatz. Dabei wurde durch langsames Schneiden das Paraffin schrittweise in einer Tiefe von etwa 300-400 µm entfernt, bis der größte Durchmesser des Gewebes sichtbar war. Die gewonnenen Schnitte wurden anschließend, um etwaige Falten zu glätten, in einem Heißwasserbad mit destilliertem Wasser gestreckt und auf einen Objektträger aufgebracht. Pro eingebettetes FG im Paraffinblock wurden vier bis fünf Schnittebenen mit jeweils zwei Objektträgern, auf denen je zwei Schnitte aufgebracht wurden, hergestellt. Die Schnittdicke betrug 5 µm pro Schnitt. Nach der Herstellung wurden die Schnitte für eine Stunde bei etwa 62°C im Inkubator hitzefixiert und anschließend abgekühlt, um sie für die Färbungen vorzubereiten.

2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach vorheriger Inspektion unter dem Mikroskop und Auswahl der geeignetsten Schnitte, erfolgte die Färbung gemäß dem Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbeprotokoll. Zunächst wurde eine Entparaffinisierung in drei Durchgängen à 15 Minuten mit Xylol (Roticlear) durchgeführt, gefolgt von einer Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) für jeweils zwei Minuten, um die Aufnahme der Färbung ins Gewebe zu optimieren.
Nach einer anschließenden Waschung mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und destilliertem Wasser, erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun für eine Minute. Die Schnitte wurden dann in Leitungswasser und anschließend in eine 1%-HCl-Lösung eingetaucht, bevor sie für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut wurden, um die Färbung der Zellkerne zu intensivieren. Die Plasmafärbung erfolgte mit Hilfe einer 1%-Eosin-Lösung.
Zur langfristigen Aufbewahrung und Konservierung der Schnitte wurde eine erneute Entwässerung durchgeführt, indem eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) verwendet wurde, gefolgt von einer fünfminütigen Behandlung mit Xylol (Roticlear). Abschließend wurde ein Tropfen des Eindeckmediums Rotimount unter dem Abzug mittig auf das Gewebe aufgetragen und die Schnitte anschließend eingedeckt.

2.2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung

2.2.3.3.1 Immunfluoreszenz-Prinzip

Zur Quantifizierung der lymphoiden T- und B-Zellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörper (AK) durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Ebenen verwendet, wie bei der HE-Färbung, um vergleichbare Bilder der Zellcluster zu produzieren. Bei der Immunfluoreszenz werden spezifische Proteine durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten AK sichtbar gemacht. Hierbei wurden zwei AK unterschiedlicher Spezies verwendet: Der primäre AK bindet zunächst an das Zielprotein, und anschließend bindet der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper an den primären AK, um das Zielprotein sichtbar zu machen. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit 4´,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt, um sie unter einem Fluoreszenzmikroskop zu visualisieren.

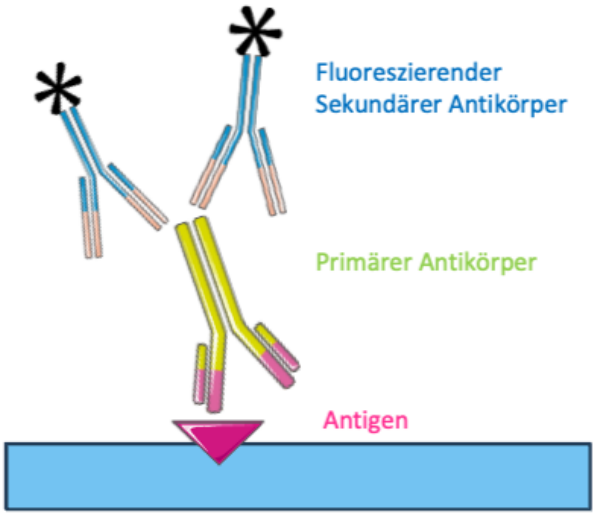

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Immunfluoreszenz-Prinzips, selbsterstellte Abbildung mit Modulen von Smart Sevier, lizenziert unter einer `Creative Common Attribution 3.0 Generic´ Lizenz, http://smart.servier.com

2.2.3.3.2 Vorversuche

Zur Darstellung der T- und B-Zellen wurden verschiedene AK vor den eigentlichen Experimenten getestet (Tabelle 4). Aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass der T-Zell-Anti-CD3-AK ein sehr gutes Fluoreszenzsignal erzeugt, weshalb dieser auch in den Experimenten dieser Dissertation Anwendung fand.
Für die B-Zell-AK wurden insgesamt sechs verschiedene AK getestet. Die verwendeten AK für die indirekte Fluoreszenz der B-Zellen umfassten den Anti-CD19-, Anti-CD20- und Anti-B220/CD45R-AK, sowie den letztlich für die Auswertung eingesetzte Anti-PAX5-AK. Die Testung verschiedener AK war notwendig, da die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung die Epitope der Antigene maskieren können, was die Bindung des AK erschwert.

2.2.3.3.2.1 T-Zellen

Als primärer AK für die Quantifizierung der T-Zellen ist ein *rabbit* Anti-CD3-AK der Firma Abcam getestet und im weiteren Verlauf verwendet worden. CD3 ist bekannt als Oberflächenmarker der T-Zellen und wird unter anderem für die Expression des T-Zellrezeptors benötigt (Jr et al., 2001).

2.2.3.3.2.2 B-Zellen

Für die Versuche der primären B-Zell-AK-Färbung wurde, nach den in 3.2.3.3.2. erwähnten Vorversuchen, schlussendlich Anti-PAX5 verwendet. PAX5 ist ein Transkriptionsfaktorprotein und ein Schlüsselregulator in der B-Zell-Entwicklung und -Reifung (PubChem, n.d.). Der verwendete Anti-PAX5-AK bindet somit das, sich in den Zellkernen der B-Zellen befindliche, PAX5. Triton-X-100 wurde nach Fixierung in Formaldehyd in vorherigen Schritten zur besseren Permeabilisierung der Zellmembranen verwendet. So wird eine erleichterte Passage der AK durch die Zellmembran ermöglicht. (Jamur and Oliver, 2010).

2.2.3.3.2.3 Sekundärer Antikörper

Im Verlauf der Experimente wurde unter anderem der rabbit Anti-IgG-AK Alexa Fluor 568 als sekundärer AK verwendet. Dieser zeigte jedoch eine zu starke Hintergrundfluoreszenz im Mikroskop. Aus diesem Grund wurde für die Fluoreszenzmarkierung der B- und T-Zellen schließlich der subklassenspezifische IgG-AK Alexa Fluor 647 Anti-rabbit eingesetzt. Zur Darstellung des FG wurde Weizenkeimagglutinin (WGA)-Alexa-488 verwendet. WGA-Alexa-488 ermöglicht die Visualisierung von Glykoproteinen und Glykolipiden in den Zellen, indem es an die GlcNAc-Rückgruppen auf der Zelloberfläche bindet. Dies ermöglicht die präzise Markierung und Darstellung dieser Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Emde et al., 2014).

2.2.3.4 Antikörper-Färbung:

2.2.3.4.1 Vorbereitung

Die Färbung der Immunzellen basierte auf dem folgenden Protokoll:
Zunächst wurden die Objektträger gemäß dem Standardverfahren für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung dreimal für jeweils 15 Minuten mit einem Xylol-Ersatz (Roticlear) behandelt, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung der Proben. Daraufhin wurde eine Antigen-Demaskierung durchgeführt, um die, durch die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung, potentiell verdeckten Epitope wiederherzustellen. Hierfür wurde ein Citrat-Puffer im Verhältnis 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt und im Dampfgarer auf eine Temperatur von 100-115 Grad Celsius erhitzt. Die Objektträger wurden währenddessen zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen.
Nachdem der Dampfgarer vollständig vorgeheizt war, wurden die Objektträger für 20 Minuten in der voreingestellten Temperatur betrieben. Anschließend wurden sie für weitere zehn Minuten auf der Arbeitsfläche abgekühlt, wobei sie im Citrat-Puffer verblieben, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.
In einem Zwischenschritt erfolgte eine erneute Waschung mit PBS sowie mit 0,3%igem Triton X100.
Die Objektträger wurden im nächsten Schritt für 60 Minuten in einer eigens hergestellten Blockierungslösung inkubiert. Diese Lösung bestand aus tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS), angereichert mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) und 1%-Bovinem Serumalbumin.

Die Inkubation erfolgte in einer abgedunkelten Feuchtkammer, um eine unspezifische Bindung zu verhindern.

2.2.3.5 Primärer Antikörper

Nach einer Blockierungs-Zeit von 60 Minuten wurden etwa 80 µl des primären AK, verdünnt im jeweiligen Verhältnis mit 1%-BSA in PBS, auf die Schnitte pipettiert. Für die Negativkontrolle wurden hingegen 80-100 µl reines 1%-BSA verwendet. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht bei 4°C in einer abgedunkelten und feuchten Färbekammer inkubiert.

2.2.3.6 Sekundärer Antikörper

Nach erneuter Waschung der Objektträger in PBS und 0,1%-Triton am zweiten Tag, erfolgte das Auftragen des sekundären AK. Dabei wurden subklassenspezifische Sekundärantikörper, wie oben erwähnt sowie WGA-Alexa-488 für die Immunfluoreszenz des FG verwendet. Auf die Schnitte wurden 80-100 µl des sekundären AK in PBS aufgetragen und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Dunkelkammer inkubiert.
Nach der Inkubation wurde das Gewebe mittig mit einem Eindeckmedium eingebettet, wobei die Prozedur unter einem Abzug durchgeführt wurde. Als Einbettmedium kam dabei Roti-Mount Fluor Care mit DAPI zum Einsatz.

2.2.4 Mikroskopieren

Nach Durchführung der Färbungen, wurden die Objektträger bei einer Temperatur von 4°C gelagert und innerhalb der darauffolgenden zwei Tage mikroskopiert. Für die Mikroskopie und Bewertung der Mikromorphologie, wurden Bilder mit dem Mikroskop, Axio-Imager-M2m, der Marke Zeiss aufgenommen. Dazu wurde regelhaft das Objektiv mit 40-facher Vergrößerung verwendet, bei größeren Clustern wurde gelegentlich auch das Objektiv mit 20-facher Vergrößerung oder die Kachelfunktion des Mikroskops eingesetzt. Bei Objektträgern, die mit der HE-Färbung behandelt wurden, ist in den meisten Fällen eine Übersichtsaufnahme mit Hilfe der Kachelfunktion erstellt worden.
Die Bilder einer Modellreihe wurden mit derselben Belichtungszeit aufgenommen, und das, in der Software angezeigte Histogramm der Negativkontrolle, übernommen, um eine hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen fand ein spezielles Immunfluoreszenz-Mikroskop der Marke Zeiss Anwendung.
Bei jeder Aufnahme wurden drei Kanäle übereinandergelegt: DAPI, WGA-Alexa-488 und Alexa-Fluor-647. Anschließend erhielt jedes Bild einen Maßstab von 1000-2000 µm.

2.2.5 Auswertung

2.2.5.1 Auswertung der Adipozyten

Die Quantifizierung der Adipozyten wurde unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ durchgeführt. Zunächst wurde das unter dem Mikroskop aufgenommene Bild als TIFF-Datei gespeichert und in die Software geladen. Der zuvor im Zeiss-Blue-Programm eingefügte Maßstab wurde dabei über die Funktion >*set-scale* übernommen. Die Adipozyten wurden manuell mittels der >*free-hand-selections*-Option im Bild markiert und automatisch im ROI-Manager erfasst. Anschließend wurden die erfassten Daten mit der Funktion >*measure* in eine Tabelle überführt und nach Excel exportiert. In Excel wurden dann Auswertungen erstellt, um die Anzahl und Größe der Fettzellen in den Gewebeschnitten zu analysieren. Zudem erfolgte eine Einteilung der Adipozyten in verschiedene Größenkategorien und eine grafische Darstellung der prozentuellen Verteilung in einem Histogramm. Die Diagramme wurden mit Graph Pad Prism erstellt.

2.2.5.2 Auswertung der Immunzellen

Eine Immunfluoreszenz-AK-Färbung und ein Fluoreszenzmikroskop erlaubten die Visualisierung und Quantifizierung der Anti-CD3-AK und Anti-PAX5-AK gefärbten Zellen innerhalb der Cluster.
Bei der Auswertung der Cluster stand der Vergleich zwischen den in der HE-Färbung sichtbaren Lymphclustern und den fluoreszierenden Lymphzellansammlungen im Vordergrund. Anhand dessen wurden die Cluster hinsichtlich ihrer Menge an fluoreszierenden Immunzellen analysiert.
Dazu wurde zunächst der Anteil der Cluster an der Gesamtfläche des Schnittes anhand der HE-Färbung berechnet und in prozentuellen Anteilen dargestellt. Hierbei wurden die Cluster mithilfe des Programmes Image-J per >*free-hand-selection* nachgezeichnet und ins Verhältnis mit der Fläche des gesamten Gewebes gesetzt.
Zur Quantifizierung der T-und B-Zellen, anhand des Anti-CD3- und Anti-PAX5-AK, sind die positiven Zellen in den Clustern bestimmt worden. Dies erfolgte zunächst per Augenmaß, dabei wurde zwischen stark positiv, positiv, negativ und stark negativ unterschieden. Zur genaueren Quantifizierung wurde im Weiteren dann die *>threshold*-Funktion des

Programmes Image-J verwendet. Dazu wurde jedes Bild vorher unter *>image >colour >split channels* in die drei genannten Kanäle unterteilt, mit der *>free-hand-selection* das Cluster umrandet und die positiven Zellen unter *>adjust >threshold* im AlexaFluor647-Kanal quantifiziert. Die durch das Programm berechnete Prozentzahl wurden nach Graph Pad Prism übertragen und mithilfe dessen eine Grafik erstellt.

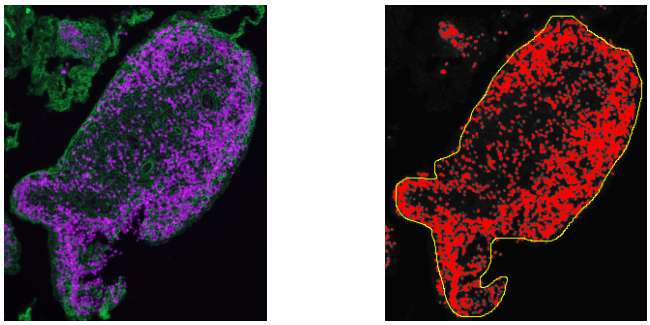

Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung immunfluoreszenter Bilder

2.2.5.3 Statistische Analyse mittels Graph Pad Prism

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm Graph Pad Prism 10.1.1. verwendet. Die Analyse zweier Gruppen wurde dabei mit einem unabhängigen zweiseitigem t-Test ausgewertet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der Two-way-ANOVA gefolgt von Šidák post Test angewendet. Unterschiede von $p<0.05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

Im vorliegenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zur Inhibition der Lipolyse und deren Einfluss auf die Immunzellzusammensetzung in den FALCs des mediastinalen Fettgewebes nach einem Myokardinfarkt präsentiert.
Aufbauend auf der in der Einleitung formulierten Hypothese, dass eine Hemmung der Lipolyse die Zusammensetzung der FALCs, insbesondere der T- und B-Zellpopulationen, beeinflussen könnte, wurden verschiedene experimentelle Modelle zur Lipolyse-Inhibition eingesetzt. Ziel war es, die Auswirkungen dieser Hemmung auf die lymphoiden Cluster im Kontext einer kardialen Ischämie zu untersuchen.

3.1 Ischämie/ Reperfusion

Zunächst wurde in allen Mausmodellen eine kardiale Ischämie induziert. Wie unter Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, erfolgte dies mittels operativer Ligaturanlage um die linken Koronararterie, gefolgt von einer 60-minütigen Ischämie-Phase.
Im Rahmen der I/R-Versuchsreihe wurde das mediastinale FG in zwei Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reperfusion entnommen: entweder nach 24 Stunden oder nach 28 Tagen. Zum Vergleich diente eine Kontrollgruppe (Sham-Gruppe), bei der die Mäuse der gleichen operativen Prozedur unterzogen wurden, jedoch ohne anschließende Induktion einer Ischämie. Auch hier erfolgte die Gewebeentnahme nach 24 Stunden bzw. nach 28 Tagen.

3.1.1 Gesteigerte Adipozytengröße 28 Tage nach Reperfusion

Um den Effekt der kardialen Ischämie auf die Morphologie der Adipozyten zu untersuchen, wurde die Größe der Adipozyten im mediastinalen Fettgewebe analysiert. Hierzu wurden H&E-Färbungen an etwa 5 µm dicken Paraffinschnitten des mediastinalen FG angefertigt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Adipozytengröße durch Messung des Durchmessers der einzelnen Adipozyten in den gefärbten Schnittpräparaten. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die histologischen H&E-Färbungen des mediastinalen Fettgewebes mit den erkennbaren lymphoiden Clustern (FALCs).

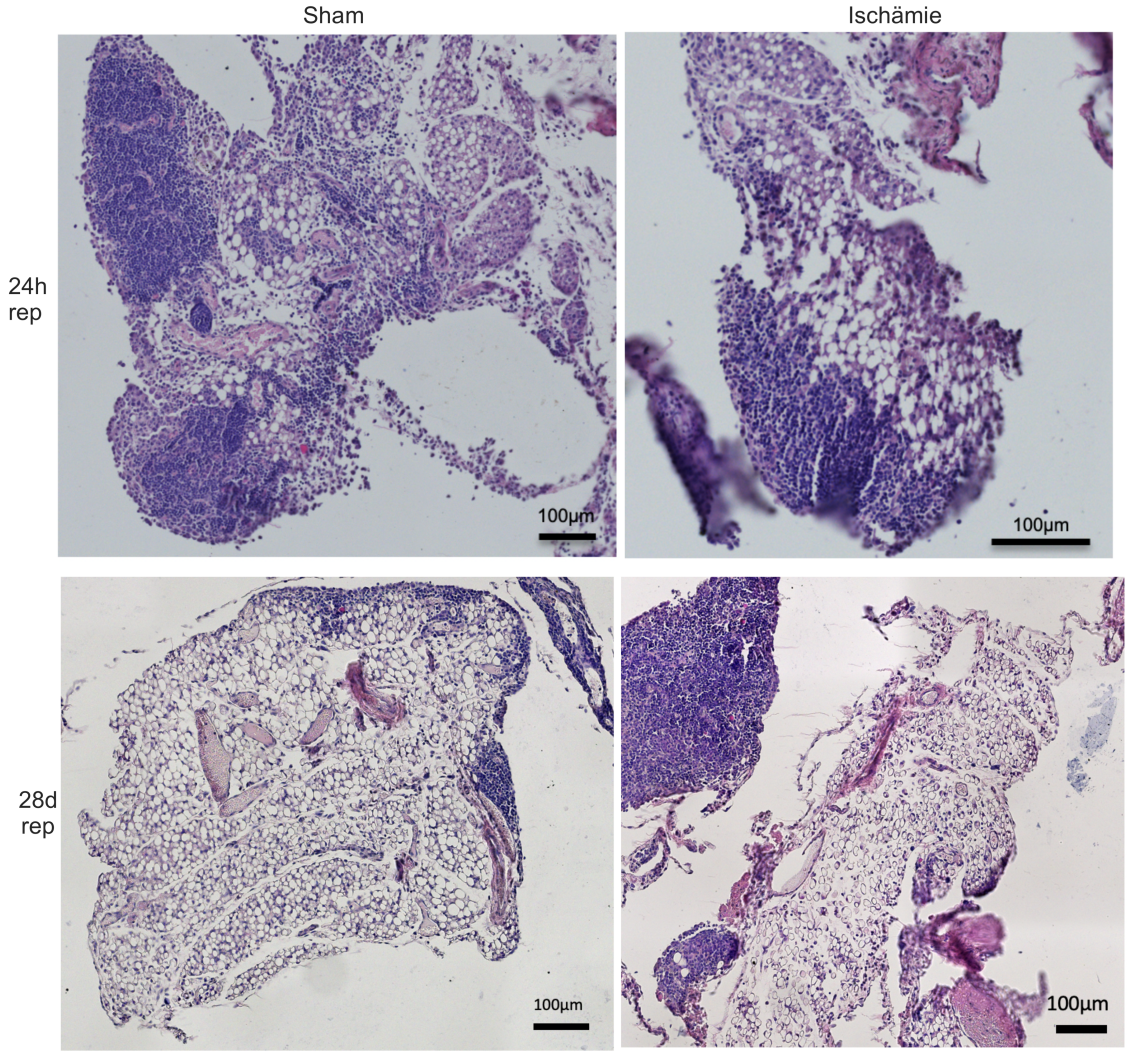

Abbildung 7: Einfluss kardialer Ischämie auf die Adipozytengröße, H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten in operierten Kontrollen (Sham) und nach 60 -minütiger Ischämie; Vergleich S/I 24 Stunden (h) und 28 Tage (d) nach Reperfusion (rep)

In Abbildung 8 wird die relative Adipozytengröße in Form eines Histogramms sowie die mittlere Größe in Form eines Balkendiagramms veranschaulicht. Dabei zeigt sich nach 28 Tagen Reperfusion ein signifikanter Unterschied. Die Auswertung ergab eine signifikante Abnahme ($p<0,0066$) der 26-50µm^2-großen, und demnach eine Zunahme der >75µm^2-großen Adipozyten nach Ischämie. Das mediastinale FG, welches nach 24-Stunden-Reperfusion entnommen wurde, zeigte keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Adipozytengröße ($p>0,01$). Tendenziell ist dabei jedoch eine Zunahme kleinerer Adipozyten sowie eine Abnahme der mittleren Adipozytengröße ($p=0,43$) nach 24 Stunden erkennbar (Abb.8).

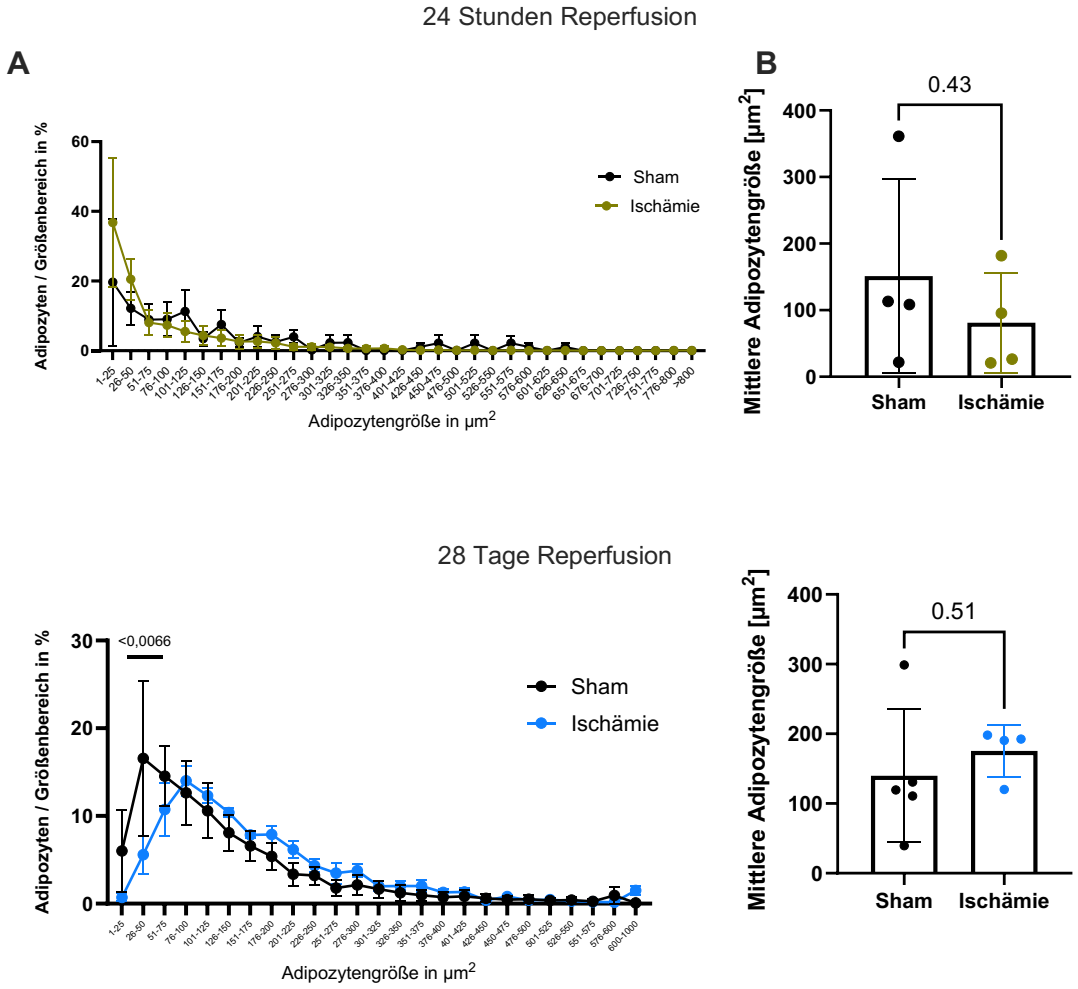

Abbildung 8: Einfluss kardialer Ischämie auf die Adipozytengröße; Vergleich Sham/Ischämie 24 Stunden (h) (grün) und 28 Tage (d) nach Reperfusion (blau)
(A) Histogramm mit Verteilung der Adipozyten pro Größenbereich (µm²) in % nach 24h (grün) und 28d (blau), Mittelwerte ± SEM, n= 4-5, Two-Way-ANOVA, Šidák-Test,
(B) Mittlere Adipozytengröße in µm², unabhängiger zweiseitiger t-Test.

Der Einfluss der kardialen Ischämie auf die Adipozytengröße wird in Abbildung 9 im direkten Vergleich der beiden Entnahmezeitpunkte veranschaulicht. Hierbei zeigt die mittlere Adipozytengröße in der Sham-Gruppe keine Dynamik zwischen den Entnahmezeitpunkten, 24 Stunden und 28 Tagen nach Reperfusion (p=0,98). Auch nach 60-minütiger Ischämie zeigt sich keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Adipozytengröße zwischen den beiden Entnahmezeitpunkten. Jedoch ist ein tendenzieller Anstieg der Adipozytengröße nach 28 Tagen im Vergleich zur Größe nach 24 Stunden Reperfusion erkennbar (p=0,35) (Abb.9).

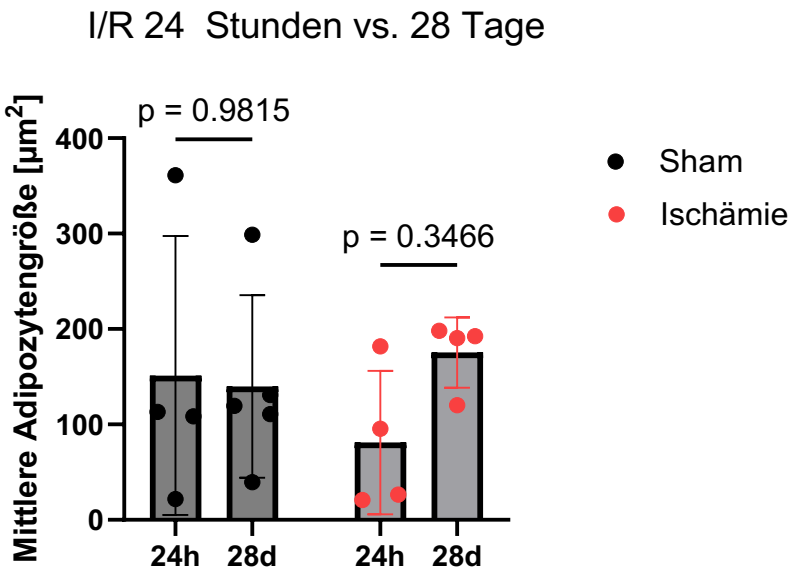

Abbildung 9: Einfluss kardialer Ischämie auf die mittlere Adipozytengröße in µm² über den Zeitverlauf der Entnahmezeitpunkte von 24 Stunden (h) und 28 Tage (d) in Sham/Ischämie, Mittelwert ± SEM, n = 4-5 Mäuse pro Gruppe; Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

3.1.2 Kardiale Ischämie zeigt keinen Einfluss auf Größe der Cluster

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte in vorherigen Studien nach kardialer Ischämie eine Aktivierung immunologischer Kaskaden beobachtet werden. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass es im Rahmen eines MI nicht nur zu einer Veränderung der Immunzellzusammensetzung, sondern möglicherweise auch zu einer Veränderung der Gesamtgröße der lymphoiden Cluster kommt. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Größe der FALCs im mediastinalen FG muriner Modelle nach 60-minütiger analysiert.

Abbildung 10 zeigt exemplarisch die lymphoiden Cluster in der Sham-Gruppe sowie post Ischämie in H&E Färbung (Abb.10).

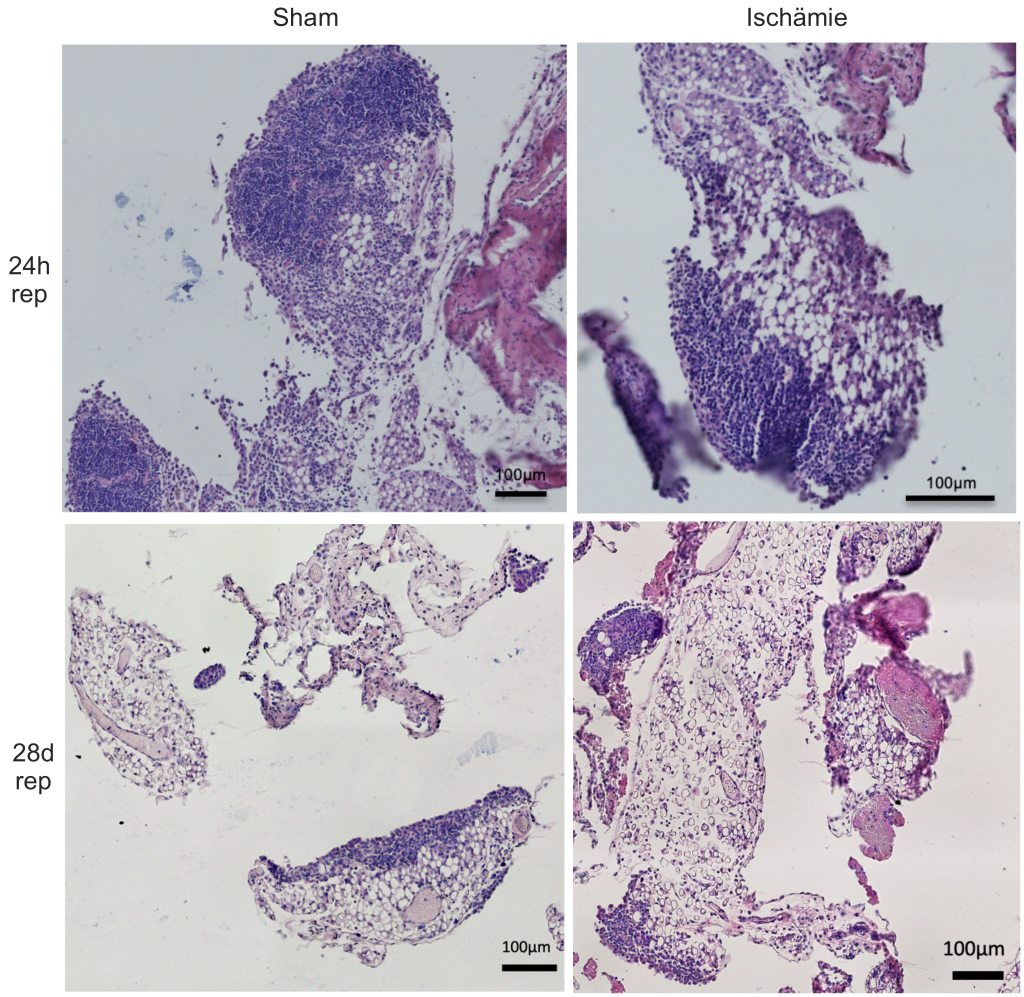

Abbildung 10: Einfluss kardialer Ischämie auf die Clustergröße, H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten in operierten Kontrollen (Sham) und nach 60 -minütiger Ischämie; Vergleich S/I 24 Stunden (h) und 28 Tage (d) nach Reperfusion (rep)

Abbildung 11 bildet die relative Clustergröße im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG ab. Dabei zeigt sich 24 Stunden post Ischämie keine signifikante Zunahme der Clustergröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,61). Nach 28 Tagen Reperfusion zeigt sich ein leichter Anstieg der Clustergröße nach Ischämie im Vergleich zur Sham-Gruppe, jedoch ist die Zunahme auch bei diesem Entnahmezeitpunkt nicht signifikant (p=0,32) (Abb.11).

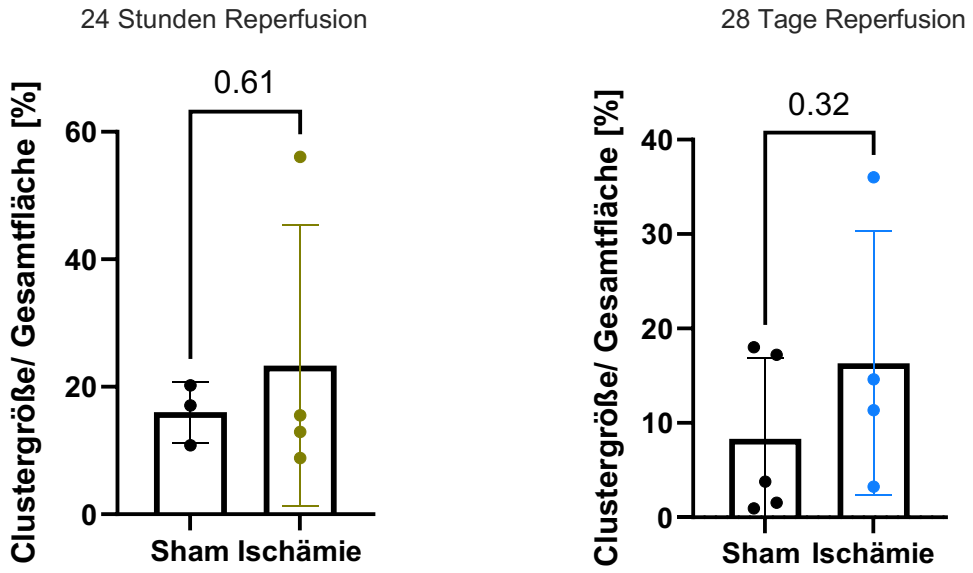

Abbildung 11: Einfluss kardialer Ischämie auf die Clustergröße; Vergleich Sham/Ischämie 24 Stunden (h) (grün) und 28 Tage (d) nach Reperfusion (blau),
Mittlere Clustergröße in µm², n=4-5, unabhängiger zweiseitiger t-Test.

Aufgrund der bestehenden Tendenz zur Zunahme der Clustergrößen post Ischämie, wurde die relative Clustergröße zusätzlich über den Zeitverlauf der Entnahmezeitpunkte nach 24 Stunden und 28 Tagen in der Sham-Gruppe und post Ischämie untersucht. Die Auswertung zeigt eine unveränderte Dynamik der Clustergröße in der Sham-Gruppe über den Zeitraum der 27 Tage (p=0,71). Auch post Ischämie zeigt sich nach 24 Stunden Reperfusion im Vergleich zum Entnahmezeitpunkt nach 28 Tagen keine relevante Dynamik (p=0,74) (Abb. 12).

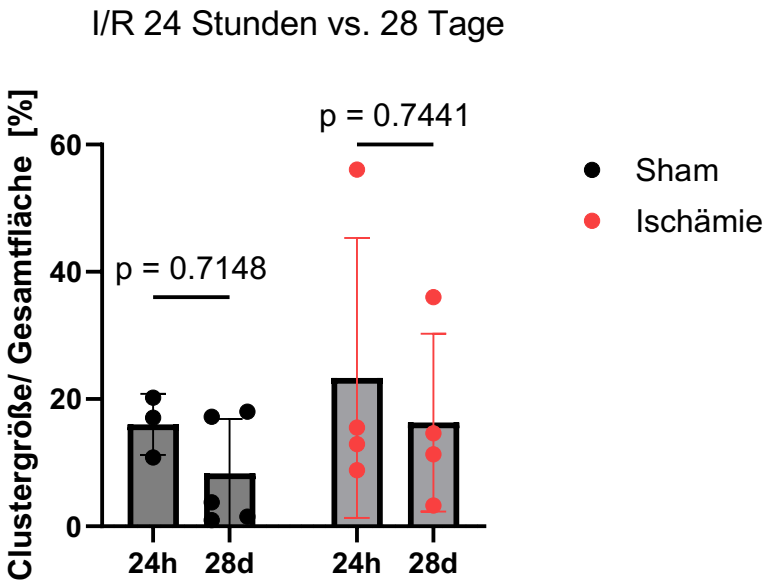

Abbildung 12: Einfluss kardialer Ischämie auf die mittlere Clustergröße in µm² über den Zeitverlauf der Entnahmezeitpunkte von 24 Stunden (h) und 28 Tage (d) in Ischämie/ Reperfusion (I/R), Mittelwert ± SEM, n = 4-5 Mäuse pro Gruppe; Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

3.1.3 Anzahl der B-und T-Zellen in FALCs nach Ischämie unverändert

Aufgrund der Annahme, dass die FALCs im mediastinalen Fettgewebe auf die durch eine kardiale Ischämie ausgelösten Entzündungs- und Umbauprozesse im Herzen reagieren, wurde neben der Analyse der Adipozyten- und Clustergröße auch die Immunzellzusammensetzung innerhalb der FALCs untersucht. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.
Zur Identifikation der B-Zellen wurde der monoklonale Antikörper gegen PAX5 verwendet, während zur Detektion der T-Zellen ein Antikörper gegen CD3 zum Einsatz kam.

24-h-Reperfusion: Nach 24 Stunden Reperfusion zeigt sich eine gleichbleibende Immunzellzusammensetzung innerhalb der Cluster. In Abbildung 13 ist exemplarisch eine Immunzellfluoreszenzfärbung gezeigt. Dabei ist weder eine sichtbar erhöhte Anzahl Fluoreszenz-positiver Signale der B-Zellen, dargestellt mit einem Anti-PAX5-AK, noch vermehrt positive Signale der T-Zellen, dargestellt mit einem Anti-CD3-AK, erkennbar. Die Auswertungen beziehen sich jeweils auf den Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb.13).

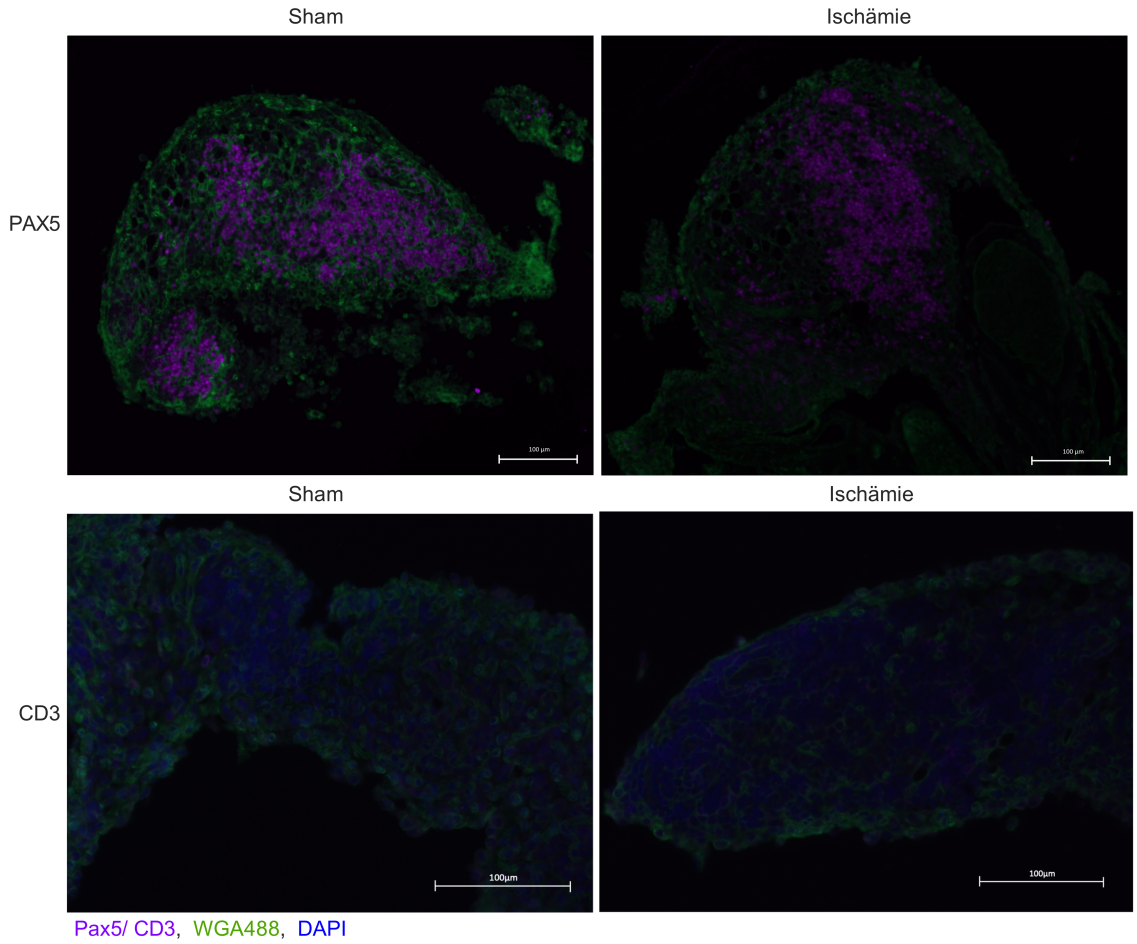

Abbildung 13: Einfluss kardialer Ischämie auf die lymphoide Zellzusammensetzung in den Clustern,
Anteil der Anti-PAX5-positiven B- (oben) und Anti-CD3-positiven T-Zellen (unten) an allen Zellen in den Clustern (%) nach 24 Stunden Reperfusion, Sham (Links) und nach 60-minütiger Ischämie (Rechts); Immunfluoreszenz-Färbung, Schichtbilder mit drei Kanälen: WGA488 zur Färbung des FG, DAPI zur Zellkernfärbung, sowie Anti-PAX5, sowie Anti-CD3 AK-Färbung.

Abbildung 14 bildet den prozentuellen Anteil der positiven (Immun-)Zellen, im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellen, 24 Stunden nach Reperfusion in den mediastinalen FALCs ab. Die Auswertung zeigt keine signifikante Zu- oder Abnahme der Anti-PAX5-positiven B-Zellen (p=0,38) oder der Anti-CD3-positiven T-Zellen (p=0,27) in der Ischämie-Gruppe gegenüber Sham-Gruppe. Betrachtet man die Anzahl Anti-PAX5-positiver Zellen, ist eine Tendenz zur Abnahme erkennbar. Die Anzahl Anti-CD3-positiver Zellen scheint hingegen post Ischämie etwas zu steigen. Diese Tendenzen gelten jeweils im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abb.14).

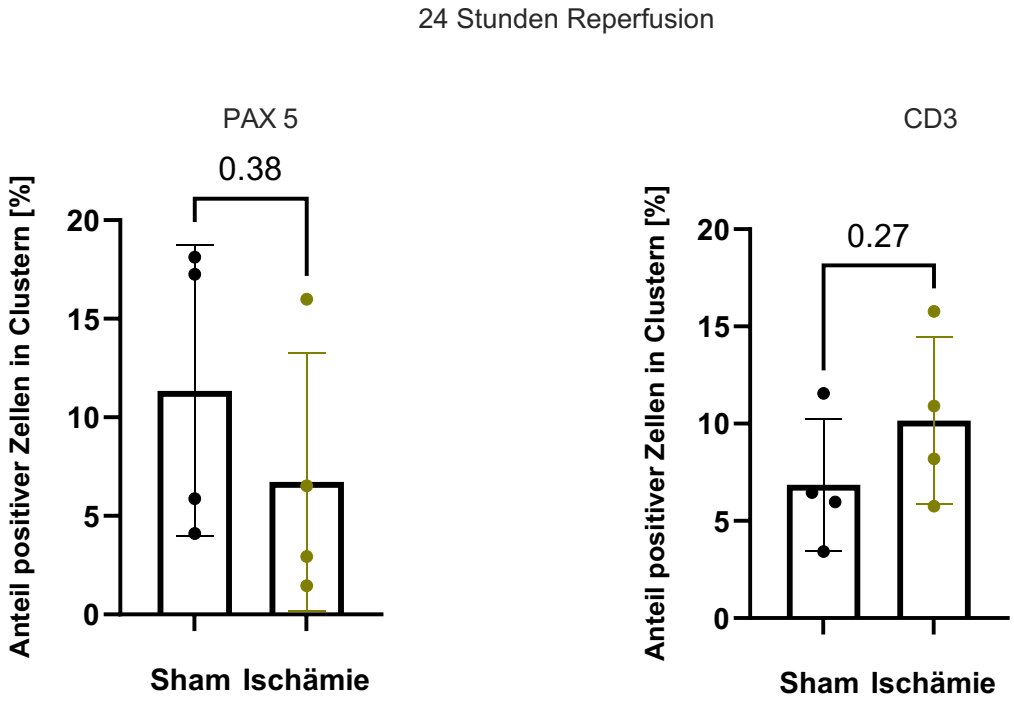

Abbildung 14: Einfluss kardialer Ischämie auf die lymphoide Zellzusammensetzung in den Clustern nach 24 Stunden Reperfusion,
Anteil der Anti-PAX5-positiven B-Zellen (links) und Anti-CD3-positiven T-Zellen (rechts) an allen Zellen der Cluster in %; in Sham und nach 60-minütiger-Ischämie;
Mittelwert ± SEM, n=4-5, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

28-Tage Reperfusion: Nach 28 Tagen zeigt sich zwischen Sham und post Ischämie weiterhin keine veränderte Immunzellzusammensetzung in den mediastinalen FALCs. Abbildung 15 stellt erneut exemplarisch eine Immunzellfluoreszenzfärbung dar (Abb.15).

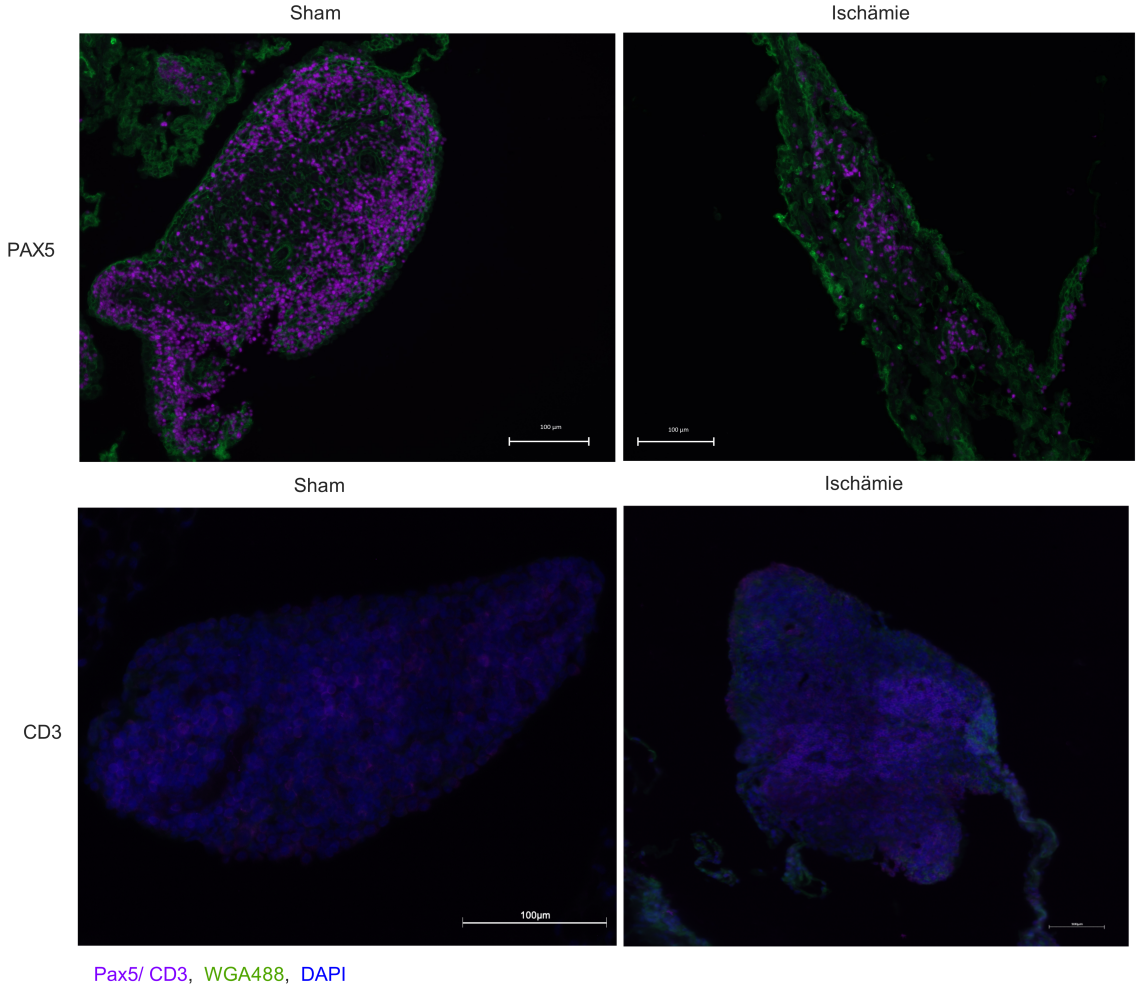

Abbildung 15: Einfluss kardialer Ischämie auf die lymphoide Zellzusammensetzung, Anteil der Anti-PAX5-positiven B- (oben) und Anti-CD3-positiven T-Zellen (unten) an allen Zellen in den Clustern (%) nach 28 Tagen Reperfusion, Sham (Links) und nach 60-minütiger Ischämie (Rechts); Immunfluoreszenz-Färbung, Schichtbilder mit drei Kanälen: WGA488 zur Färbung des FG, DAPI zur Zellkernfärbung, sowie Anti-PAX5, sowie Anti-CD3 AK-Färbung.

Abbildung 16 bildet den prozentuellen Anteil der positiven (Immun-)Zellen, im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen, 28 Tage nach Reperfusion in den mediastinalen FALCs ab. Auch hier zeigt sich keine statistisch signifikante Veränderung im Sinne einer Zu- oder Abnahme, weder bei den Anti-PAX5-positiven B-Zellen (p=0,95), noch bei den Anti-CD3-positiven T-Zellen (p=0,92)) in der Ischämie-Gruppe gegenüber Sham-Gruppe (Abb.16).

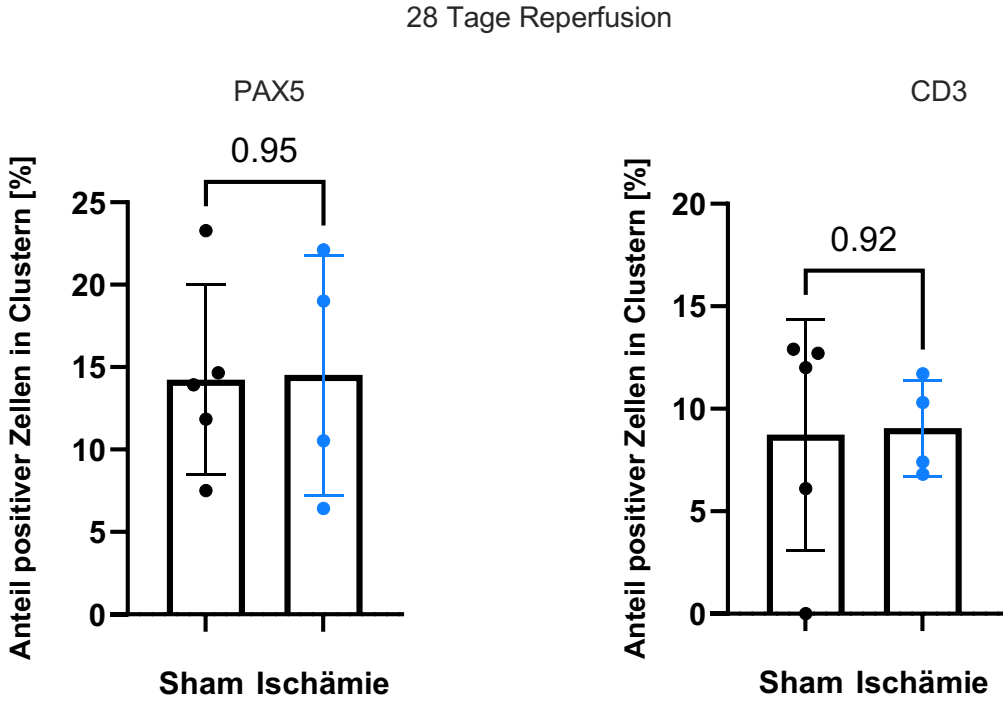

Abbildung 16: Einfluss kardialer Ischämie auf die lymphoide Zellzusammensetzung in den Clustern nach 24 Stunden Reperfusion,
Anteil der Anti-PAX5-positiven B-Zellen (links) und Anti-CD3-positiven T-Zellen (rechts) an allen Zellen der Cluster in %; in Sham und nach 60-minütiger-Ischämie;
Mittelwert ± SEM, n=4-5, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

Die zuvor dargestellten Ergebnisse deuten auf subtile Veränderungen in der Zusammensetzung der Immunzellpopulationen im zeitlichen Verlauf hin. Zur weiteren Charakterisierung dieser Dynamiken wurde daher die relative Anzahl der Anti-PAX5- und Anti-CD3-positiven Zellen zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten zwischen der Sham-Gruppe und der postischämischen Gruppe verglichen.

Abbildung 17 zeigt eine nicht-signifikante Zunahme der Anti-PAX5-positiven B-Zellen nach 28 Tagen Reperfusion und 60 Minuten Ischämie im Vergleich zur Anzahl der Zellen nach 24 Stunden Reperfusion (p=0,23) (Abb.17, links).

Die Anzahl CD3-positiver T-Zellen zeigt keine Dynamik innerhalb der 27 Tage, weder in Sham noch in Ischämie (p=0,92) (Abb. 17, rechts).

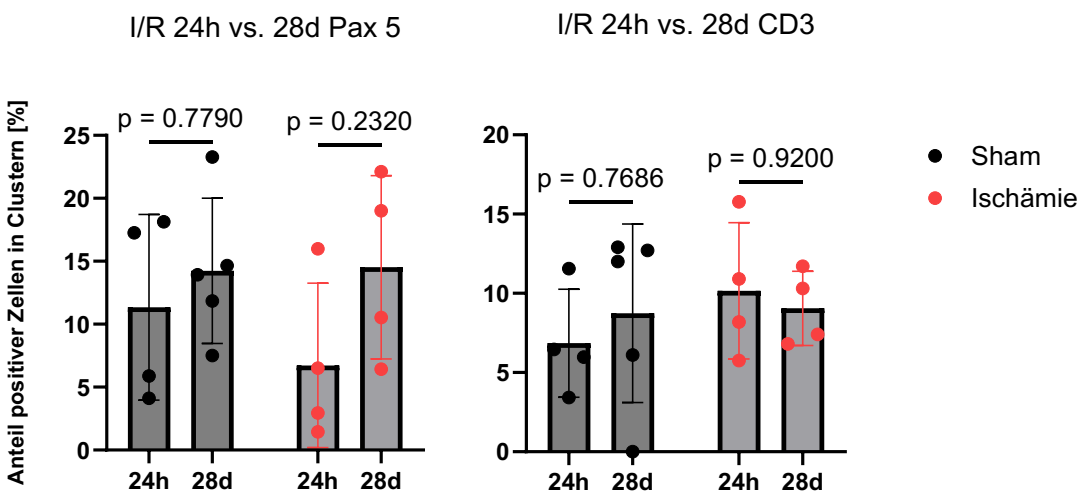

Abbildung 17: Einfluss kardialer Ischämie auf die B- und T-Zellanzahl im Ischämie-/Reperfusions-Modell (I/R) als Anteil der Immunzellen in %, 24 Stunden (h) und 28 Tage (d) nach Reperfusion; Anti-PAX5-positive B-Zellen (links), Anti-CD3-positive T-Zellen (rechts), Mittelwert ± SEM, n=4-5, Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

3.2 Drei Modelle der Lipolyse-Inhibition

Die mediastinalen FALCs stehen in direkter räumlicher Beziehung zu den umliegenden Adipozyten, was durch das Fehlen einer schützenden Kapsel der lymphoiden Strukturen bedingt ist (Moro et al., 2010). Zur Überprüfung der Hypothese, dass eine Inhibition der Lipolyse die Zusammensetzung der Immunzellpopulation in den mediastinalen FALCs beeinflusst, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Inhibitionsmodelle angewendet. Der experimentelle Aufbau dieser Modelle wird im Abschnitt 3.2.2.2 ausführlich beschrieben. Im Folgenden werden die entsprechenden Ergebnisse der jeweiligen Modelle dargestellt und analysiert.

3.2.1 Inhibition mit Atglistatin zeigt eine Abnahme der Adipozytengröße

Atglistatin hemmt als pharmakologischer Inhibitor die ATGL und somit den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipolyse. Dafür erhielten die Mäuse Futter mit beigemengten Atglistatin ab Tag 1 post Ischämie, für 27 Tage, sodass die Lipolyse in diesem Modell ausschließlich während der Reperfusion inhibiert wurde. Dabei zeigt sich, wie in Abbildung 18(B) erkennbar, eine signifikante Zunahme der Anzahl der Adipozyten im Größenbereich 1- 25µm^2 (p<0,0001), was insgesamt eine Abnahme des Adipozyten-Durchmessers durch Inhibition mittels Atglistatin bedeutet. Die mittlere Adipozytengröße ist dabei nicht signifikant verändert (p=0,24).

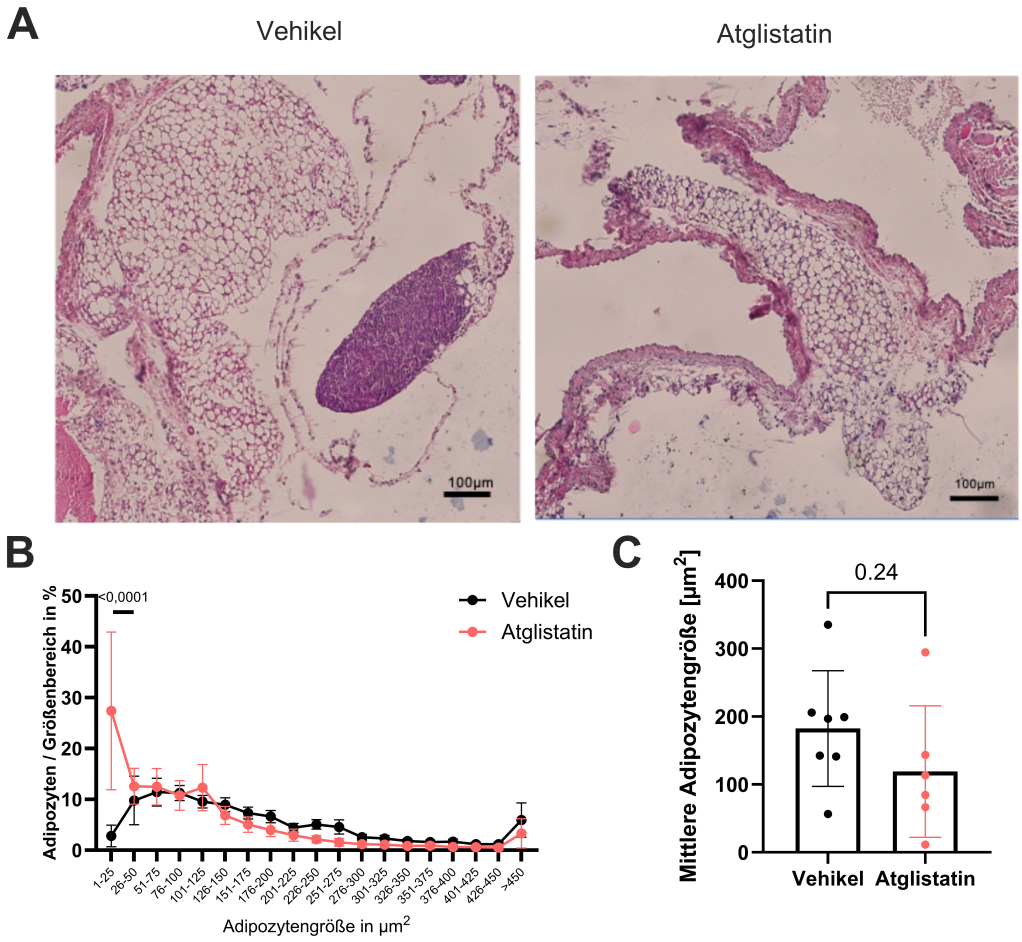

Abbildung 18: Adipozytengröße nach 60-minütiger Ischämie in Kontrolle (Vehikel) und Lipolyse-Inhibition mittels Atglistatin,
(A) H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten,
(B) Histogramm mit Verteilung der Adipozyten/ Größenbereich in µm^2 in Kontrolle und nach Atglistatin-Gabe, Mittelwerte ± SEM, n= 6-7, Two-way-ANOV, Šidák-Test,
(C) Mittlere Adipozytengröße in µm^2 in Kontrolle und Atglistatin, n=6-7, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

3.2.2 Zunahme der Adipozytengröße im ATGL-KO-Modell

Als Alternative zum pharmakologischen Inhibitionsmodell wurde in einem genetischen KO-Modell die Lipolyse durch gezielte Deletion der ATGL inhibiert. Die Induktion des KOs erfolgte bei 10 Wochen alten Mäusen, wodurch die ATGL-Expression gezielt ausgeschaltet und somit die Lipolyse nachhaltig unterbunden wurde. Die Adipozyten pro Größenbereich zeigen eine signifikante Abnahme bei einer Fläche <200µm^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem p-Wert von $p< 0.0001$ (siehe Abb. 19B). Die Adipozytengröße nimmt demnach im KO im Vergleich zur Kontrollgruppe zu.
Diese signifikante Zunahme des Durchmessers spiegelte sich auch in der Auswertung der mittleren Adipozytengröße wider ($p = 0,01$). Dabei lag die durchschnittliche Zellfläche bei etwa 500 µm² und war damit nahezu doppelt so groß wie in der Kontrollgruppe (Abb. 19C).

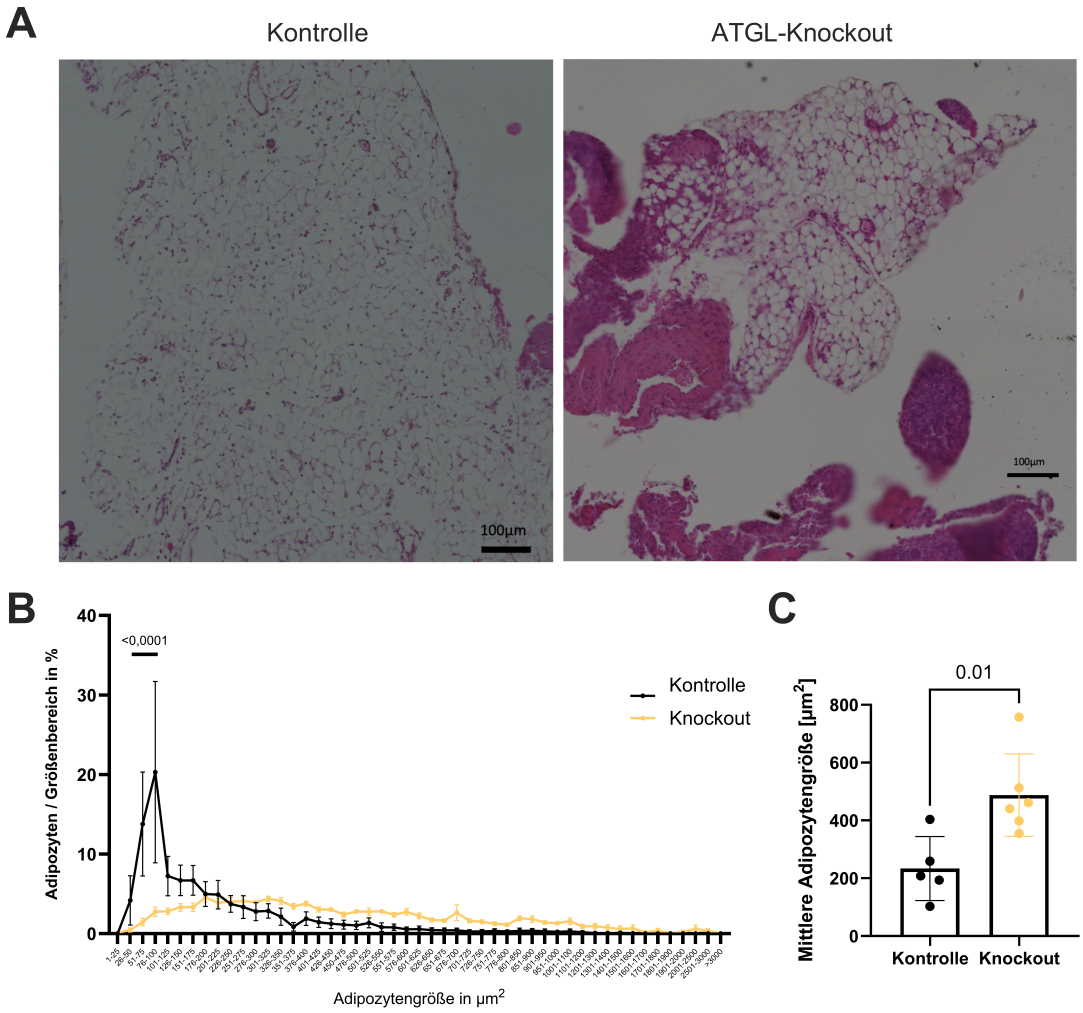

Abbildung 19: Adipozytengröße nach 60-minütiger Ischämie in Kontrolle und ATGL-KO, (A) H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten, (B) Histogramm mit Verteilung der Adipozyten/ Größenbereich in µm² in Kontrolle und Lipolyse-Inhibitionsmodell im ATGL-KO, Mittelwerte ± SEM, n=5-6, Two-way-ANOVA, Šidák-Test; (C) Mittlere Adipozytengröße in µm² in Kontrolle und KO, n=5-6, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

3.2.3 Unveränderte Größe der Adipozyten im DREADD-Modell

In diesem Inhibitionsmodell wurde ein synthetischer Rezeptor verwendet, der durch Gabe eines spezifischen Agonisten (CP21) gezielt aktiviert wurde. Die Aktivierung des Rezeptors induziert über einen G_i-gekoppelten Signalweg eine Inhibition der Lipolyse. Der Agonist wurde sowohl vor als auch nach der Ischämie verabreicht, um eine Hemmung der Lipolyse während der Ischämie und in der anschließenden Reperfusionsphase sicherzustellen. Das mediastinale Fettgewebe wurde jeweils nach 24 Stunden und nach sieben Tagen Reperfusion entnommen und analysiert.
Abbildung 20A stellt exemplarisch die Adipozytengröße in einer H&E-Färbung dar. Die Verteilung der Adipozyten pro Größenbereich ist in Abb.20B in Form eines Histogramms nach 24 Stunden und sieben Tagen Reperfusion aufgetragen. Dabei zeigt sich keine signifikante Veränderung der Adipozytengröße. Zur weiteren Quantifizierung wurde die mittlere Adipozytengröße ermittelt. Auch hierbei zeigt sich weder nach 24 Stunden ($p=0,19$), noch nach sieben Tagen Reperfusion ($p=0,28$) eine Zu- oder Abnahme des mittleren Durchmessers im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.20C).

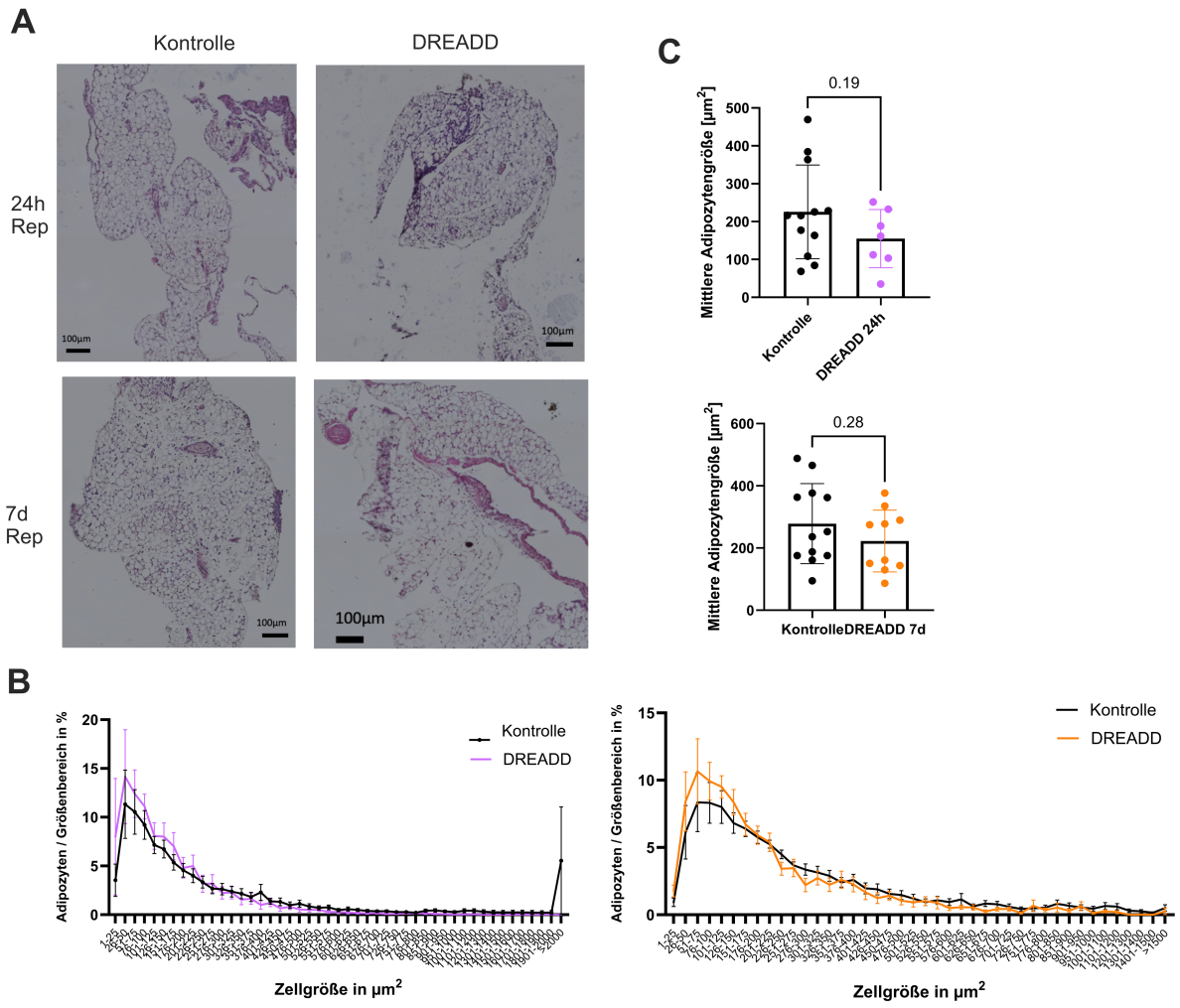

Abbildung 20: Adipozytengröße nach 60-minütiger Ischämie in Kontrolle und im DREADD-Modell mit 24 Stunden(h) Reperfusion (violett) und 7 Tage(d) Reperfusion (orange)
(A) H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten,
(B) Histogramm mit Verteilung der Adipozyten/ Größenbereich in µm² in Kontrolle und DREADD, Mittelwerte ± SEM, n= 7-11, Two-way-ANOVA, Šidák-Test,
(C) Mittlere Adipozytengröße in µm² in Kontrolle und DREADD, n= 7-11, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

Um den alleinigen Einfluss der kardialen Ischämie mit dem zusätzlichen Einfluss Lipolyse-Inhibition auf die Adipozytengröße im Verlauf der Entnahmezeitpunkte miteinander zu vergleichen, wurden die Werte gegeneinander aufgetragen. Abbildung 21 zeigt eine unveränderte Größe der Adipozyten der Kontrollgruppe, das heißt nach kardialer Ischämie ohne Inhibition der Lipolyse (p=0,45). Im DREADD-Modell ist durch Inhibition der Lipolyse eine statistisch nicht-signifikante Zunahme der Adipozytengröße erkennbar (p=0,41) (Abb. 21).

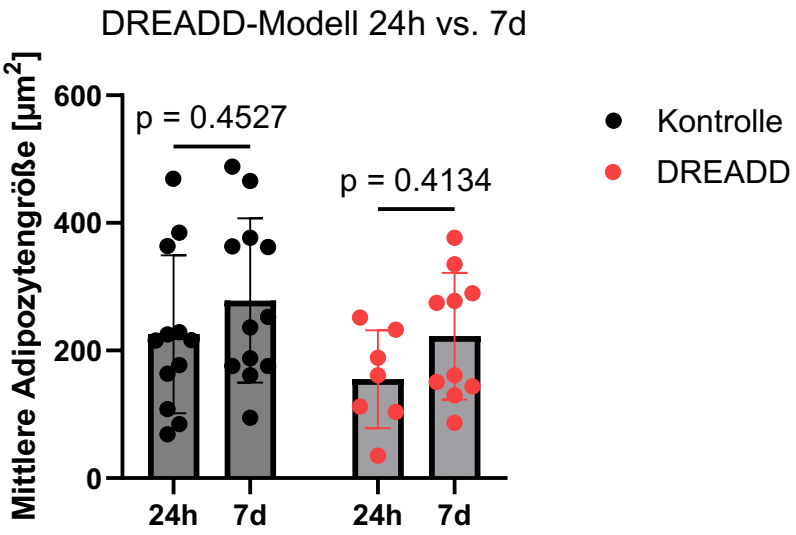

Abbildung 21: Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell auf die Adipozytenanzahl, 24 Stunden (h) und 7 Tage (d) nach Reperfusion; Vergleich Kontrolle (links) und Lipolyse-Inhibition mittels DREADD (rechts) Mittelwert ± SEM, n= 10-12, Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

3.2.4 Keine Beeinflussung der Clustergröße in allen Inhibitionsmodellen

Horckmans et al. konnten im Kontext einer kardialen Ischämie, ein Wachstum der lymphoiden Cluster im mediastinalen FG, sowie einen starken Anstieg von B-Zellen in den Clustern nachweisen (Horckmans et al., 2018). Auf Basis dieser Ergebnisse, wurde auch hier die Größe der mediastinalen FALCs nach Lipolyse-Inhibition im Rahmen eines MI beobachtet. Die Clustergröße zeigte sich in allen drei Inhibitions-Modellen in den hiesigen Experimenten jedoch nicht signifikant verändert.

Abbildung 22 bildet exemplarisch eine H&E-Färbung des mediastinalen FG (A) unter Atglistatin (1), sowie im KO-Modell (2) ab. Außerdem wurde der relative Anteil der Clustergröße an der Gesamtfläche des mediastinalen FG dargestellt. Hierbei zeigt sich sowohl in B1 (p=0,9), wie auch in B2 (p=0,37) keine statistische Signifikanz der Ergebnisse.

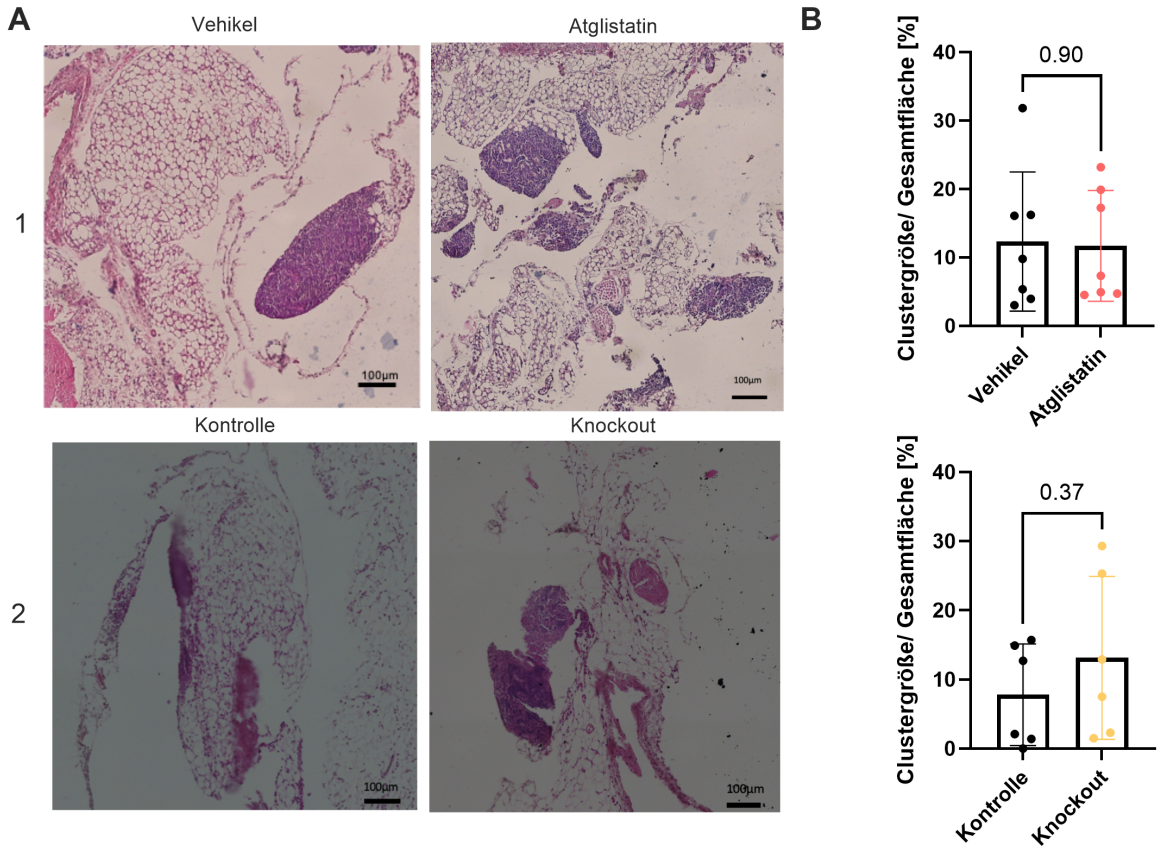

Abbildung 22 : Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Inhibition der Lipolyse auf die relative Clustergröße, Vergleich Kontrolle (Links) und Lipolyse-Inhibition (Rechts), (1) ATGL- Inhibition mit Atglistatin (Rot), (2) ATGL-KO (Gelb);
(A) H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten in Kontrolle und Lipolyseinhibition,
(B) Relative Größe des lymphoiden Clusters im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG in %, n=6-7, unabhängiger zweiseitiger t-Test.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch die lymphoiden Cluster des mediastinalen FG nach Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell in H&E-Färbung (A), 24 Stunden (1) und sieben Tage (2) nach Reperfusion (Abb.23A).

Die relative Clustergröße im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG ist ebenfalls in dieser Abbildung dargestellt (Abb.23B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist anhand der Diagramme ein leichter Anstieg der Clustergröße sichtbar, welcher jedoch als nicht-signifikante Dynamik, sowohl 24 Stunden (p=0,55) sowie auch sieben Tage nach Reperfusion (p=0,75) zu werten ist (Abb.23B).

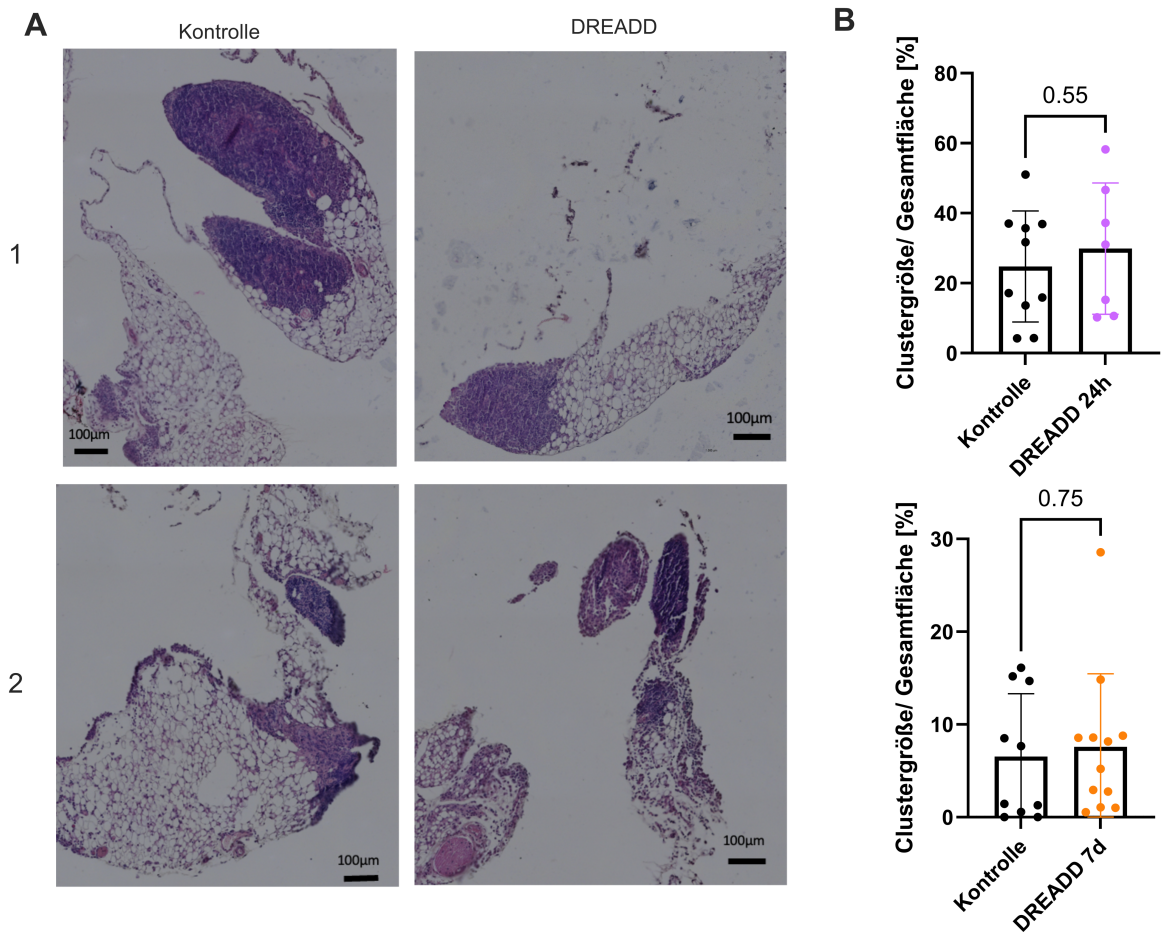

Abbildung 23: Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Inhibition der Lipolyse auf die relative Clustergröße, Vergleich Kontrolle (Links) und Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell (Rechts), (1) nach 24 Stunden(h) Reperfusion (Violett), (2) nach 7 Tagen (d) Reperfusion (Orange);
(A) H&E Färbung des mediastinalen FG mit lymphoiden Clustern und umliegende Adipozyten in Kontrolle und Lipolyse-Inhibition,
(B) Relative Größe des lymphoiden Clusters im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG in %, n=7-12, unabhängiger zweiseitiger t-Test.

Der Einfluss der alleinigen kardialen Ischämie im Vergleich mit dem zusätzlichen Einfluss der Lipolyse-Inhibition auf die Clustergröße im DREADD-Modell wurde, wie in Abbildung 24 abgebildet, nochmals genauer im Verlauf der 24 Stunden und sieben Tagen Reperfusion analysiert. Hierbei zeigt sich eine signifikante Abnahme der Clustergröße im DREADD-Modell nach sieben Tagen Reperfusion im Vergleich zur Clustergröße nach 24 Stunden Lipolyse-Inhibition (p=0,0013). In der Kontrollgruppe, nach kardialer Ischämie ohne Lipolyse-Inhibition zeigt sich hier interessanterweise ebenfalls eine signifikante Abnahme der relativen Clustergröße an der Gesamtfläche (p=0,005) (Abb.24).

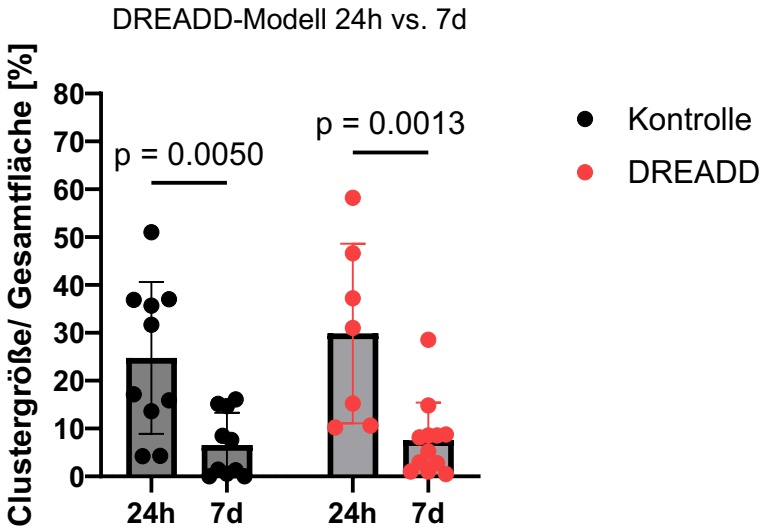

Abbildung 24: Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Inhibition der Lipolyse (DREADD) auf die relative Clustergröße im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG (%) über den Zeitverlauf der Entnahmezeitpunkte von 24 Stunden (h) und 28 Tagen (d), Mittelwert ± SEM, n = 6-12 Mäuse pro Gruppe; Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

3.2.5 Abnahme der B-Zell-Anzahl in den FALCs im DREADD-Modell

Um neben der Clustergröße auch die Immunzellzusammensetzung in den FALCs unter Lipolyse-Inhibition im Kontext kardialer Ischämie genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit B- und T-Zellen mittels immunhistochemischer Antikörperfärbung dargestellt und die fluoreszenzpositiven Signale quantitativ ausgewertet.

3.2.5.1 Inhibition mit Atglistatin und ATGL-KO beeinflusst die Immunzellzusammensetzung nicht

Die Abbildung 25 veranschaulicht exemplarisch den Anteil der positiven Anti-PAX5 positiven B-Zellen und der Anti-CD3-positiven T-Zellen nach Atglistatin-Gabe (1A) und im ATGL-KO (2A) im Vergleich zur Kontrollgruppe, in einer Immunfluoreszenz-Färbung (Abb.25A).
In Abbildung 26B ist der relative Anteil der positiven Immunzellen im Verhältnis zu allen Zellen in den lymphoiden Clustern aufgetragen. Hierbei zeigt sich kein quantitativer Anstieg der Anti-PAX5 positiven B-Zellen, weder nach Atglistatin-Gabe ($p=0,62$) (1A), noch im ATGL-KO ($p=0,23$) (1B). Auch die Anti-CD3-positiven T-Zellen sind in beiden Inhibitionsmodellen nicht signifikant in ihrer Anzahl verändert ($p=0,5$) (Abb. 25B).

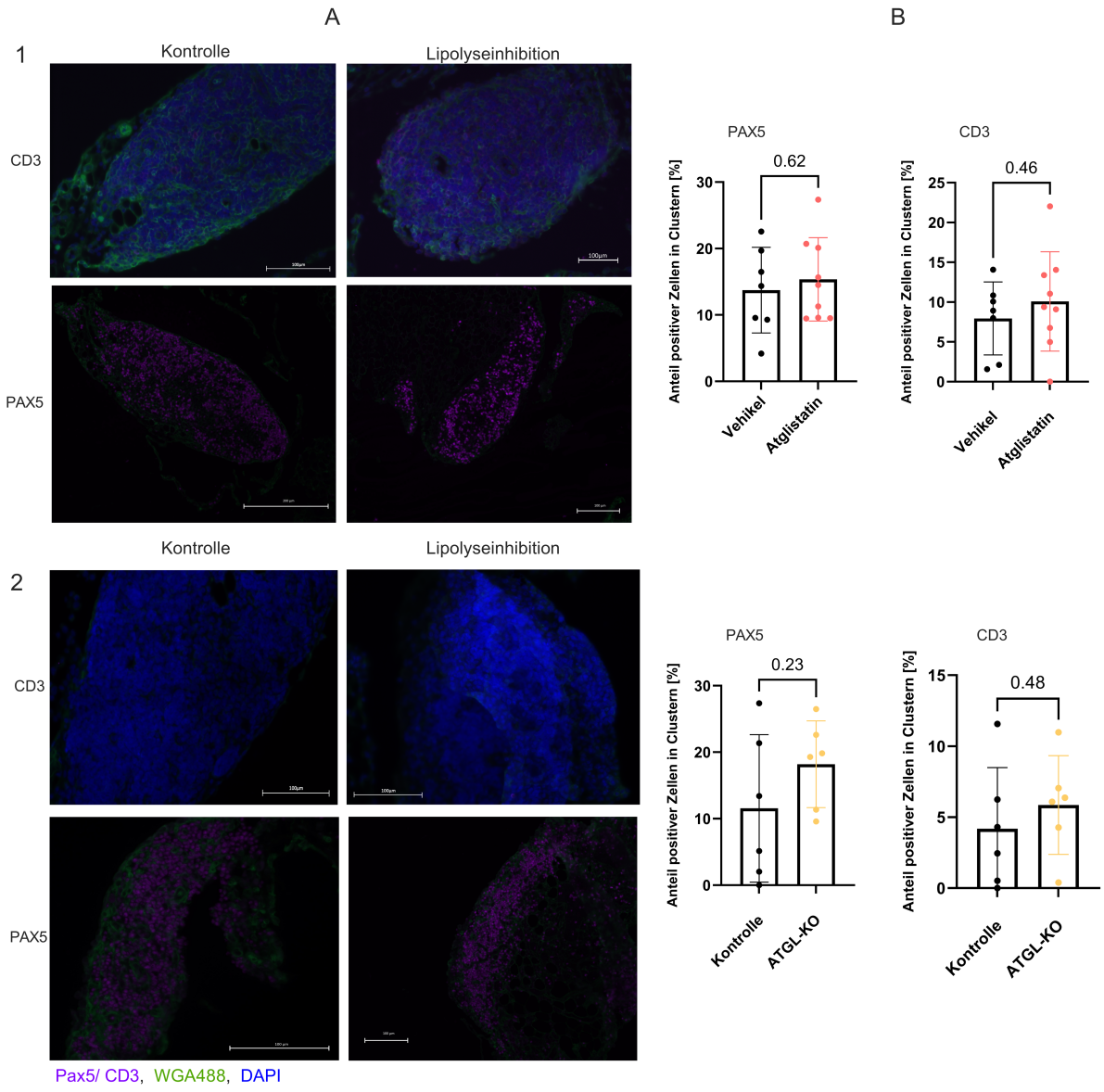

Abbildung 25: Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Lipolyse-Inhibition auf die lymphoide Zellzusammensetzung,
Anteil der Anti-CD3-positiver T-(oben) und Anti-PAX5-positiver B-Zellen (unten) in Lipolyse-Inhibition mit Atglistatin (1) und im ATGL-Knockout (KO) (2),
(A): Immunfluoreszenz-Färbung gegen CD3 (oben)/PAX5 (unten), Schichtbilder mit drei Kanälen: WGA488 zur Färbung des FG, DAPI zur Zellkernfärbung,
(B): Relativer Anteil der positiven Anti-PAX5-B- und Anti-CD3-T- Zellen in %, Mittelwert ± SEM, n= 6-7, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

3.2.5.2 Lipolyse-Inhibition mit synthetischem Rezeptor im DREADD-Modell verringert die Anzahl der B-Lymphozyten nach sieben Tagen Reperfusion

Die Inhibition der Lipolyse durch Aktivierung des synthetischen Rezeptors im DREADD-Modell zeigt eine Veränderung in der Immunzellzusammensetzung: Nach 60-minütiger Ischämie zeichnet sich 24 Stunden nach Reperfusion im DREADD-Modell bereits eine Tendenz zu einem verminderten Anteil der Anti-PAX5-positiven B-Zellsignale, im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen in den mediastinalen Clustern, ab ($p=0,14$). Diese Tendenz bestätigt sich nach sieben Tagen Reperfusion. Zu diesem Zeitpunkt konnte ein signifikant geringerer Anteil der Anti-PAX5-positiven B-Zellsignale beobachtet werden ($p=0,03$). Der Anteil der Anti-CD3-positiven T-Zellsignale zeigt hingegen keine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe, weder 24 Stunden ($p=0,23$) noch sieben Tage nach Reperfusion ($p=0,99$) (Abb.26B).

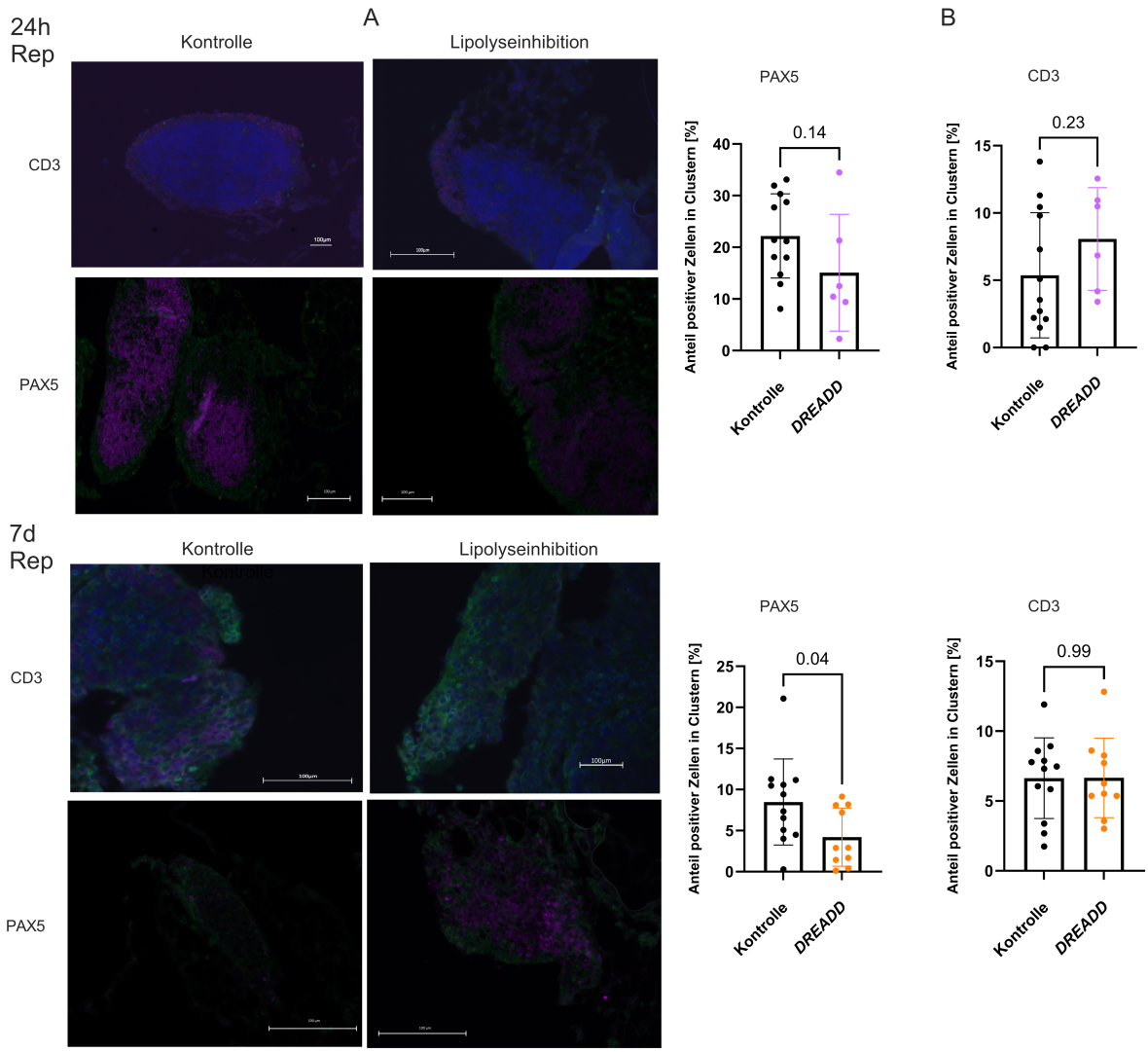

Abbildung 26 : Einfluss der Lipolyse-Inhibition unter kardialer Ischämie auf die lymphoide Zellzusammensetzung,
Anteil der Anti-CD3-positiver T-(oben) und Anti-PAX5-positiver B-Zellen (unten) in Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell (1) nach 24 Stunden (h) und (2) nach 7 Tagen (d) Reperfusion (rep),
(A): Immunfluoreszenz-Färbung gegen CD3 (oben)/PAX5 (unten), Schichtbilder mit drei Kanälen: WGA488 zur Färbung des FG, DAPI zur Zellkernfärbung,
(B): Relativer Anteil der positiven Anti-PAX5-B- und Anti-CD3-T- Zellen in %, Mittelwert ± SEM, n=10-12, ungepaarter zweiseitiger t-Test.

Im direkten Vergleich der alleinigen Ischämie und der zusätzlichen Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell, zeigt sich eine signifikante Abnahme der Anti-PAX5-positiven B-Zellsignale (p=0,007) von 24 Stunden zu sieben Tagen nach Reperfusion.
Eine signifikante Abnahme zeigt sich dabei interessanterweise sowohl nach alleiniger Ischämie ohne Inhibition (p<0,0001), wie auch nach Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell (p=0,007) (Abb. 27, links).
Im Blick auf den Anteil der Anti-CD3-positiven T-Zellen zeigt sich auch bei dieser Auswertung keine Signifikanz oder Tendenz zwischen den Entnahmezeitpunkten in der Kontrollgruppe oder im DREADD-Modell (Abb. 27, rechts).

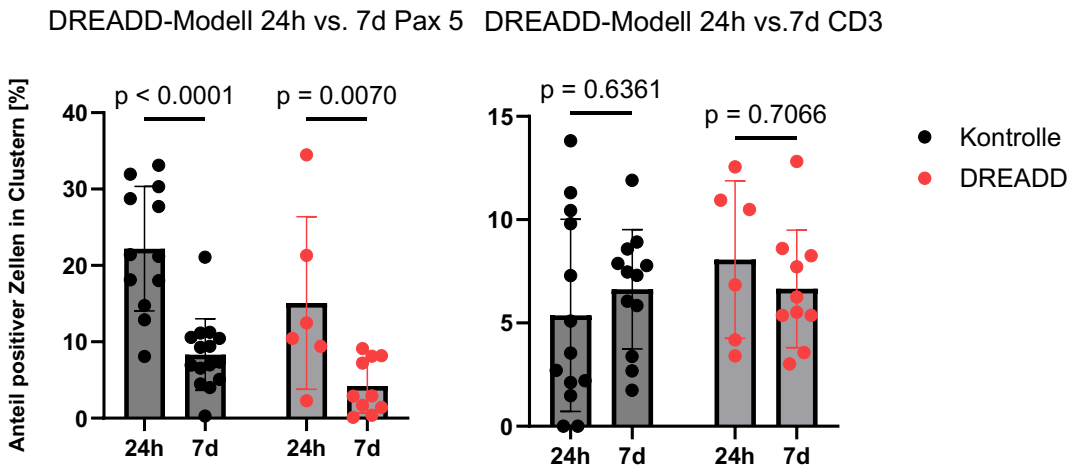

Abbildung 27: Einfluss kardialer Ischämie mit zusätzlicher Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell auf die Anzahl Anti-PAX5-positiver B- (links) und Anti-CD3-positiver T-Zellanzahl (rechts) in %, 24h und 7d nach Reperfusion im Vergleich; Mittelwert ± SEM, n=10-12, Two-way-ANOVA, Šidák-Test.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Inhibition der peripheren Lipolyse die Größe sowie die Immunzellzusammensetzung der fett-assoziierten lymphoiden Cluster (FALCs) im mediastinalen Fettgewebe nach kardialer Ischämie beeinflusst. Dazu wurden drei unterschiedliche murine Modelle der Lipolyse-Inhibition angewandt, in denen die Adipozyten- und Clustergröße sowie die Immunzellkomposition innerhalb der FALCs analysiert wurden.

Zur langfristigen Lipolyse-Inhibition wurde in zwei Modellen das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Lipolyse, die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), gezielt inhibiert, entweder pharmakologisch durch Gabe von Atglistatin oder genetisch mittels eines ATGL-Knockout-Modells (ATGL-KO). Im dritten Ansatz wurde eine temporäre Hemmung der Lipolyse durch Aktivierung eines synthetischen Rezeptors (DREADD) induziert, wobei ein spezifischer Agonist (CP21) appliziert wurde, um die Lipolyse während und unmittelbar nach der Ischämie zu unterdrücken.

Im I/R-Modell (Ischämie/Reperfusion) mit einer 60-minütigen Ischämie zeigte sich 28 Tage nach Reperfusion eine deutliche Zunahme der Adipozytengröße.

Ein signifikanter Anstieg der Adipozytengröße wurde ebenfalls im ATGL-KO-Modell beobachtet, was im Einklang mit der erwarteten Wirkung einer Lipolyse-Inhibition steht. Im Gegensatz dazu führte die pharmakologische ATGL-Inhibition mittels Atglistatin interessanterweise zu einer Abnahme der Adipozytengröße, was mit den Beobachtungen früherer Studien übereinstimmt.

Im DREADD-Modell konnte bereits nach 24 Stunden Reperfusion eine deutliche Tendenz zur Reduktion der B-Zellanzahl in den FALCs festgestellt werden, die nach sieben Tagen Reperfusion signifikant ausfiel. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass eine zeitlich begrenzte Inhibition der Lipolyse nach ischämischem Ereignis zu einer Modulation der Immunzellkomposition in den FALCs führt und damit potenziell Einfluss auf den inflammatorischen und reperativen Umbauprozess nach Myokardinfarkt nimmt.

Diese Ergebnisse der Experimente werden im Folgenden diskutiert:

4.1 Zunahme der Adipozytengröße im I-/R-Modell

Überraschenderweise wurde im I/R-Modell 28 Tage nach Reperfusion eine signifikante Zunahme der Adipozytengröße beobachtet ($p < 0,0066$) (Abb.8).

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Zunahme liegt im Hormon Adiponektin begründet, das primär von weißen Fettzellen produziert wird und in verschiedenen Studien multiple kardioprotektive Effekte gezeigt hat (Park and Sweeney, 2013). So konnten Shibata et al. in einem Adiponektin-KO-Modell den positiven Einfluss von Adiponektin auf die Infarktgröße, myokardiale Apoptose sowie eine verminderte Ausschüttung des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF-α) bei kardialer Ischämie nachweisen (Shibata et al., 2005). Weitere Studien bestätigen zusätzliche kardioprotektive Funktionen (Zhou et al., 2022).

Diese Befunde lassen vermuten, dass es im Rahmen einer myokardialen Ischämie zu einem kompensatorischen Anstieg der Adiponektin-Sekretion kommt. Diese Hypothese wird durch die Arbeit von Sung et al. gestützt, die in einem murinen Modell sieben Tage nach Ischämie einen deutlichen Anstieg der Adiponektin-Expression im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachteten (Sung et al., 2024). Eine weitere Publikation von Kojima et al. zeigt, dass nach einer anfänglichen kurzzeitigen Abnahme des Serum-Adiponektinspiegels nach myokardialer Ischämie ein erneuter Anstieg zwischen sieben und 28 Tagen Reperfusion folgt (Kojima et al., 2003; Wang et al., 2022).

Ein Anstieg des Adiponektins wiederum fördert in weißen FG die Produktion von Adipozyten, die eine höhere metabolische Aktivität aufweisen und induziert eine Hyperplasie der Adipozyten im braunen FG (Bauzá-Thorbrügge et al., 2024). Eine positive Korrelation zwischen Adipozytengröße und Adiponektin-Spiegel konnte zudem von Skurk et al. gezeigt werden (Skurk et al., 2007).

Auf Basis dieser Daten kann vermutet werden, dass es infolge der kardialen Ischämie zu einer langfristig vermehrten Sekretion von Adiponektin aus den Adipozyten des mediastinalen FG kommt, was wiederrum das Zellwachstum stimuliert. Dies könnte eine mögliche Begründung für die beobachtete Zunahme der Adipozytengröße im I/R-Modell 28 Tage nach Reperfusion sein.

Konträr zu der hier gesehen Zunahme der Adipozytengröße, zeigen viele andere Arbeiten jedoch eine Abnahme dieser, wie beispielsweise die Publikation von Wang et al., 28 Tage nach Reperfusion im I-/R- Modell im subkutanen FG (Wang et al., 2022). Auch die durch

die β-adrenerge Stimulation erhöhte Lipolyse würde erwartungsgemäß zu einer Zunahme kleinerer Adipozyten führen.
Zu beachten ist die geringe Fallzahl von vier bis fünf Tieren in der hier untersuchten I/R-Experimentreihe. Bei dieser niedrigen Anzahl steigt die Wahrscheinlichkeit eines Stichprobenfehlers. Betrachtet man die Einzelwerte im Histogramm von Abbildung 8, so zeigt sich, dass die signifikante Zunahme der Adipozytengröße hauptsächlich durch die Messung eines einzelnen Tieres beeinflusst wird (Abb.8).
Vor diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der widersprüchlichen Literaturergebnisse, ist die Aussagekraft der scheinbaren signifikanten Zunahme der Adipozytengröße kritisch zu hinterfragen. Insgesamt scheint die Adipozytengröße in den FALCs durch die kardiale Ischämie wenig beeinflusst zu werden.

4.2 Fehlender Einfluss auf die Immunzellzusammensetzung und die Clustergröße im Ischämie-/Reperfusions-Modell

Bezüglich der Clustergröße zeigt sich im I/R-Modell keine signifikante Veränderung. Dies steht im Kontrast zu Horckmans et al., die eine isolierte Größenzunahme mediastinaler B-Zellcluster drei Tage nach Infarkt beschrieben (Horckmans et al., 2018).
Im Verhältnis zur Gesamtfläche des mediastinalen FG lässt sich zwar eine tendenzielle, jedoch nicht-signifikante Vergrößerung der Cluster nach Ischämie beobachten (Abb.11-12).
Im direkten Vergleich mit Horckmans et al. fällt dabei eine Abweichung der Entnahmezeitpunkte auf. Es ist anzunehmen, dass die Clustergröße kurz nach Reperfusion stark ansteigt, ihren Höhepunkt am dritten Tag erreicht und bis zum siebten Tag wieder abnimmt. Nach 28 Tagen, wie in dieser Arbeit untersucht, wäre demnach keine signifikante Vergrößerung mehr erkennbar (Horckmans et al., 2018).
Darüber hinaus wurden in der genannten Studie ausschließlich weibliche Mäuse verwendet, die ein größeres mediastinales FG besitzen, während in dieser Arbeit nur männliche Tiere eingesetzt wurden. Auch die Art der Ischämie-Induktion unterscheidet sich: Die permanente Ligatur bei Horckmans et al. führt wahrscheinlich zu einer stärkeren Inflammation und damit zu einer ausgeprägteren Clustervergrößerung als die hier angewandte 60-minütige Ligatur.
Frühere Studien zeigen einen akuten Anstieg von B-Lymphozyten nach kardialer Ischämie sowie deren negativen Einfluss auf das Herzgewebe durch Mobilisation weiterer Immunzellen (Horckmans et al., 2018; Zouggari et al., 2013). Dabei unterscheiden sich B1- und B2-Zellen hinsichtlich ihrer pro- und antiinflammatorischen Wirkung und deren Einfluss auf die Immunregulation nach MI (Farias-Itao et al., 2019; Rosenfeld et al., 2015; Srikakulapu and McNamara, 2020; Wu et al., 2019).
Auf Grundlage dieser Studien wurde in dieser Arbeit die Immunzellzahl nach Ischämie histologisch analysiert, um mögliche Effekte der Lipolyse-Inhibition zu untersuchen. Überraschenderweise zeigte sich dabei jedoch kein signifikanter Anstieg von B- oder T-Zellen (Abb. 14,16, 17).
Im DREADD-Modell zeigt die Kontrollgruppe nach kardialer Ischämie ohne Lipolyse-Inhibition interessanterweise eine signifikante Abnahme der Clustergröße sowie eine signifikante Abnahme der B-Zellzahl sieben Tage nach Reperfusion im Vergleich zu 24

Stunden Reperfusion (Abb. 24,27). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die B-Zellzahl zunächst ansteigt, ein Maximum nach drei Tagen erreicht, wie in Horckmans et al. beschrieben, und danach wieder abnimmt. (Horckmans et al., 2018).
Das Fehlen signifikanter Veränderungen im I/R-Modell könnte auch hier an der kleinen Probenzahl liegen, welches zu einer eingeschränkten Aussagekraft führt.
Zudem sind die Entnahmezeitpunkte (24 Stunden und 28 Tage) möglicherweise nicht ideal gewählt, um den Höhepunkt der B-Zellantwort zu erfassen. Wie beschrieben, liegt der maximale Anstieg nach ungefähr drei Tagen, mit einem Rückgang bis zum siebten Tag (Horckmans et al., 2018). Auch die ausschließlich histologische Quantifizierung der B-Zellen in dieser Arbeit könnte eine Rolle spielen, da frühere Studien, wie auch die um Sabine Steffens, meist auf Durchflusszytometrie basieren, die möglicherweise genauere und quantitativere Ergebnisse liefert (Horckmans et al., 2018).

4.3 Abnahme der Adipozytengröße nach Inhibition mittels Atglistatin, Zunahme nach Inhibition im ATGL-KO

In beiden Modellen, der pharmakologischen Hemmung mittels Atglistatin sowie dem genetischen KO der ATGL, erfolgt eine Inhibition des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Lipolyse. Während Atglistatin, durch Verabreichung über die Nahrung, über den gesamten Reperfusionszeitraum zugeführt wurde, führt der KO zur dauerhaften Deletion der ATGL. Beide Modelle inhibieren die Lipolyse also langfristig. Im Gegensatz zum DREADD-Modell, in dem die Lipolyse-Inhibition nur über einen begrenzten Zeitraum, kurz vor und nach Ischämie, erfolgt.

Trotz gleicher Zielstruktur zeigten sich überraschend unterschiedliche Effekte auf die Adipozytengröße:

Im ATGL-KO war, wie erwartet, eine signifikante Zunahme der Adipozytengröße nachweisbar (Abb. 19B). Dies lässt sich durch den verminderten Abbau der Triglyceride erklären, was zur Akkumulation von Lipiden in den Adipozyten und damit zu deren Hypertrophie führt. Interessanterweise berichten jedoch Studien mit Adipozyten-spezifischen ATGL-KO-Modellen keine signifikanten Veränderungen der Adipozytengröße im (peri-)gonadalen FG (Schoiswohl et al., 2015; Takahara et al., 2021). Kotzbeck et al. hingegen beobachteten in einem Ganzkörper-KO eine Zunahme der Adipozytengröße (Kotzbeck et al., 2018).

Interessanterweise zeigten sich nach 28 Tagen Reperfusion im Atglistatin-Modell vermehrt kleinere Adipozyten im Bereich 1–25 µm² (Abb. 18B). Die Diskrepanz könnte auf Unterschiede in der Inhibitionsart zurückzuführen sein: In beiden Modellen findet zwar eine langfristige Inhibition der Lipolyse statt, die Wirkung des Atglistatins nimmt jedoch mit der Zeit, im Gegensatz zum KO, ab (Mayer et al., 2013; Schweiger et al., 2017).

Mehrere Studien berichten ebenfalls über eine überraschende Abnahme der Adipozytengröße nach Inhibition der Lipolyse mit Atglistatin. Die Arbeitsgruppe um Schweiger et al. diskutiert als möglichen Erklärungsansatz eine verringerte Nahrungsaufnahme sowie eine gestörte intestinale Fettresorption infolge der Atglistatin-Gabe (Schweiger et al., 2017).

Takahara et al. konnten ebenfalls eine Abnahme der Adipozytengröße nach Atglistatin-Gabe in einem murinen Modell beobachten. Im Rahmen dieser Studie wurde durch die Gabe von ISO eine Herzinsuffizienz simuliert, welches bekanntermaßen zu einer β-

adrenergen Stimulation der peripheren Lipolyse und damit zu einer verringerten Adipozytengröße führt. Dieser Effekt wurde laut Arbeitsgruppe durch die Gabe von Atglistatin noch zusätzlich verstärkt (Takahara et al., 2021).
In einer weiteren Studie von Schweiger et al. wurde ebenfalls eine Abnahme der Adipozytengröße nach Behandlung mit Atglistatin beobachtet, diesmal in einem Modell mit diätetisch induziertem Übergewicht. Die Autoren postulieren, dass die Inhibition der Lipolyse durch Atglistatin zu einer verminderten Inflammation im Fettgewebe führt. Diese reduzierte Entzündungsaktivität wiederum könnte eine Rückbildung der inflammatorisch bedingten Hypertrophie der Adipozyten begünstigen, ein Zusammenhang, der im Rahmen der Studie auch experimentell belegt werden konnte (Schweiger et al., 2017).
Dies deckt sich mit weiteren Arbeiten, die über eine reduzierte Makrophagen-Infiltration in das weiße FG (Kosteli et al., 2010) sowie verringerte IL-6-Spiegel nach Lipolyse-Inhibition berichten (Zhang et al., 2014).
Die Reduktion freier FS durch Lipolyse-Inhibition scheint im Zusammenhang mit einer verbesserten kardialen Funktion zu stehen:
Thiele et al. konnten in einem Mausmodell mit Katecholamin-induziertem Herzschaden kardioprotektive Effekte von Atglistatin nachweisen. Die orale Verabreichung des Lipolyse-Inhibitors führte zu einer signifikanten Reduktion apoptotischer und fibrotischer Veränderungen im Myokard, was auf dessen anti-apoptotische sowie anti-fibrotische Wirkung des Atglistatin hindeutet (Thiele et al., 2021).
Auch Bottermann et al. konnten durch die präventive Gabe von Atglistatin, beginnend zwei Tage vor der Induktion des Myokardinfarkts, eine signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion bei behandelten Mäusen beobachten. Interessanterweise blieb die Infarktgröße zwischen den Gruppen unverändert, während die Kontraktilität des nicht-infarzierten Myokards signifikant erhöht war (Bottermann et al., 2021). Ob dieser funktionelle Vorteil jedoch kausal auf die Lipolyse-Inhibition zurückzuführen ist, bleibt bislang unklar. In diesem Zusammenhang ist jedoch besonders hervorzuheben, dass sich das Protokoll der Atglistatin-Gabe in der vorliegenden Arbeit deutlich von der Arbeit von Bottermann et al. unterscheidet: Hier erfolgte die Applikation erst 24 Stunden nach dem Infarkt und wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen fortgesetzt.
Dass die Lipolyse-Inhibition durch ein ATGL-KO in murinen Modellen ebenfalls protektive Effekte im Hinblick auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz entfalten kann, ist durch

mehrere Studien belegt: So konnte gezeigt werden, dass ein ATGL-KO in einem Mausmodell, gemessen an verschiedenen strukturellen und funktionellen kardialen Parametern, durch eine verbesserte systolische Ejektionsfraktion zur Prävention einer druckinduzierten Herzinsuffizienz beitragen kann (Salatzki et al., 2018). Weitere Studien konnten ebenfalls eine verbesserte Ejektionsfraktion, sowie eine verminderte linksventrikuläre Hypertrophie durch ein ATGL-KO in Mäusen mit einer Herzinsuffizienz beobachten (Parajuli et al., 2018).

Der genaue Mechanismus, über den eine langfristige Inhibition der ATGL, sei es pharmakologisch oder genetisch im KO-Modell, die kardiale Funktion beeinflusst, ist bislang nicht abschließend geklärt. Unklar bleibt insbesondere, ob die beobachteten protektiven Effekte primär auf eine Reduktion freier FS und damit auf eine verringerte Lipotoxizität zurückzuführen sind, oder ob zusätzlich eine Modulation der Immunzellzusammensetzung im mediastinalen FG eine zentrale Rolle spielt. Letzteres erscheint vor dem Hintergrund aktueller Publikationen plausibel, bedarf jedoch weiterer experimenteller Validierung.

Die Hypothese einer modifizierten Immunzellzusammensetzung durch Lipolyse-Inhibition wird durch verschiedene Studien gestützt (Kosteli et al., 2010; Zhang et al., 2014). In einem ATGL-KO-Modell zeigten Shimizu et al. eine reduzierte Zytokin-Freisetzung unter β-adrenerger Stimulation (Shimizu et al., 2012). Weitere Arbeiten beschreiben auch eine Zunahme von Immunzellen im FG unter akuter Lipolyse-Aktivierung (Kosteli et al., 2010; Mottillo et al., 2010).

Daher wurde in dieser Arbeit die Immunzellzusammensetzung in mediastinalen FALCs unter ATGL-Hemmung untersucht. Entgegen der Hypothese zeigten sich weder Veränderungen der B- oder T-Zellzahlen, noch signifikante Unterschiede in den Clustergrößen (Abb. 22, 25). Somit bleibt unklar, ob die Verbesserung der Herzfunktion nach Inhibition der ATGL immunvermittelt ist oder ob hierbei andere Mechanismen zugrunde liegen.

Interessanterweise gibt es in diesem Kontext auch Studien, die auf protektive Effekte von ATGL hinweisen. Lettieri Barbato et al. zeigten beispielsweise eine durch ATGL vermittelte Unterdrückung inflammatorischer Zytokine im Alter (Lettieri Barbato et al., 2014). Dies deutet darauf hin, dass die ATGL-Modulation zu einer deutlich komplexeren Beeinflussung des FG-Metabolismus und dessen Immunregulation führt.

Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Lipolyse-Inhibition und Immunreaktion werden besonders deutlich bei der Betrachtung von Adiponektin und dessen Einfluss auf B-Zellen. Mehrere Studien, darunter auch die Arbeit von Schweiger et al., zeigen, dass eine pharmakologische Hemmung der ATGL durch Atglistatin mit einem Anstieg der Adiponektin-Spiegel einhergeht (Schweiger et al., 2017). Adiponektin ist ein Hormon mit ausgeprägten antiinflammatorischen Eigenschaften, das über verschiedene Signalwege auf das Immunsystem wirkt. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass Adiponektin die B-Zell-vermittelte Inflammation unterdrücken kann, beispielsweise im Kontext einer akuten Colitis (Obeid et al., 2017). Auf welcher molekularen Ebene Adiponektin die Reifung und Expansion von B-Zellen reguliert, ist bislang nicht abschließend geklärt. Dieser Theorie nach müsste ein durch Atglistatin vermittelter Anstieg von Adiponektin mit einer Reduktion der B-Zellzahl einhergehen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine signifikante Veränderung der B-Zellanzahl unter Lipolyse-Inhibition mit Atglistatin und im ATGL-KO beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die komplexen und multifaktoriellen Wechselwirkungen zwischen ATGL-Inhibition, Adiponektin-Spiegeln und den entzündlichen Prozessen nach kardialer Ischämie die isolierte Bewertung einzelner Immunzelltypen erschweren. Möglicherweise wirken hier verschiedene Mechanismen gleichzeitig, die sich in ihrer Gesamtheit auf die Immunzellzusammensetzung auswirken, ohne dass sich dies eindeutig auf die B-Immunzellanzahl zurückführen lässt.

Die protektiven Effekte einer ATGL-Inhibition auf die kardiale Funktion könnten möglicherweise auch auf Veränderungen anderer Immunzellen, wie Makrophagen, zurückzuführen sein. Kosteli et al. beobachteten einen Rückgang der Makrophagen-Infiltration durch genetische Deletion der ATGL in einem murinen KO (Kosteli et al., 2010). Auch Takahara et al. konnten eine Abnahme der Makrophagen-Rekrutierung bei einem Katecholamin-induzierten Herzschaden in einem Mausmodell unter Atglistatin nachweisen (Takahara et al., 2021).
Weitere Studien deuten zudem auf eine Rolle der ATGL in immunologischen Prozessen hin. So berichten Aflaki et al. in einem ATGL-KO-Modell von einer verminderten Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie einer erhöhten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Aflaki et al., 2011). Eine Studie von van Dierendonck et al. zeigt darüber hinaus, dass die Inhibition der ATGL die Immunantwort

beeinflussen kann: Bei entzündungsbedingter Aktivierung von Makrophagen kommt es zur vermehrten Expression des sogenannten *hypoxia-inducible lipid-droplet-associated* (HILPDA)-Proteins. Dieses hemmt physiologisch die ATGL in Makrophagen, was zu einer Anreicherung von TAG und einer Reduktion proinflammatorischer Mediatoren führt (van Dierendonck et al., 2022).

Vor dem Hintergrund dieser Daten erscheint eine Quantifizierung der Makrophagen in den mediastinalen FALCs unter Bedingungen der ATGL-Inhibition sinnvoll, um den Einfluss der Triglyzerid-Akkumulation und der ATGL-vermittelten Lipolyse auf die Immunantwort gezielter zu untersuchen.

Auch in diesem Inhibitionsmodell sind die gewählten Entnahmezeitpunkte kritisch zu hinterfragen. Schoiswohl et al. berichten über eine signifikante Zunahme lokaler Entzündungszeichen bereits 24 Stunden nach akuter Lipolyse-Stimulation, erkennbar an sogenannten *crown-like structures*, also Makrophagen-Ansammlungen, die sich um nekrotisches Gewebe sammeln (Strissel et al., 2007). Dieser Anstieg wird im ATGL-KO inhibiert (Schoiswohl et al., 2015). Im Rahmen dieser Experimente erfolgte die Entnahme des mediastinalen Fettgewebes sieben Tage nach Reperfusion. Es ist daher denkbar, dass die initiale Immunreaktion zu diesem Zeitpunkt bereits soweit abgeklungen war, dass sie mit den hier eingesetzten histologischen Methoden nicht mehr adäquat erfasst werden konnte.

Eine zusätzliche Limitation des pharmakologischen ATGL-Inhibitionsmodells stellt die bislang fehlende Wirksamkeit von Atglistatin im Menschen dar (Schweiger et al., 2017).

4.4 Abnahme der B-Zellanzahl und Clustergröße sieben Tage nach Reperfusion im DREADD-Modell

Eine Publikation von Luzhou Wang, eine Mitarbeiterin derselben Arbeitsgruppe, beschreibt eine signifikant verbesserte systolische Funktion sieben Tage nach Reperfusion im DREADD-Modell. Zur Erklärung dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die akute Inhibition der Lipolyse zu einer reduzierten Konzentration zirkulierender freier FS sowie zu einem erniedrigten Insulinspiegel führt. Dies begünstigt eine Akkumulation des *second messengers* cAMP, welcher wiederum eine gesteigerte Aktivität der PKA bewirkt. Die verstärkte PKA-Aktivität führt letztlich zu einer positiven lusitropen und inotropen Wirkung, wodurch die postischämische systolische Kontraktilität verbessert wird (Wang, 2024).

In Anlehnung an die Annahmen von Wang wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese formuliert, dass die Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell die Immunzellzusammensetzung in den mediastinalen FALCs moduliert und dadurch eine verminderte neutrophile Infiltration ins Myokard bewirkt, was letztlich zu einer Verbesserung der kardialen Funktion nach Ischämie führt. Nach 60-minütiger Ischämie und einer siebentägigen Reperfusion zeigt sich im DREADD-Modell tatsächlich eine signifikante Abnahme der B-Zellzahl (Abb. 26). Diese Abnahme wird zusätzlich durch den signifikanten Rückgang der B-Zellen im direkten Vergleich der Zeitpunkte, 24 Stunden und sieben Tage nach Reperfusion im DREADD-Modell bestätigt (Abb. 27). Damit einhergehend zeigt sich eine Abnahme der relativen Clustergröße sieben Tagen nach Reperfusion im DREADD-Modell (Abb. 24). Der genaue Mechanismus, der zur Reduktion der B-Zellen sowie einer verringerten Clustergröße infolge der akuten Lipolyse-Inhibition führt, ist bislang noch nicht geklärt.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte Adiponektin sein: Interessanterweise zeigte eine Studie von O'Mara et al., dass die Stimulation β3-adrenerger Rezeptoren neben einer gesteigerten metabolischen Aktivität und erhöhtem Energieverbrauch im braunen Fettgewebe auch mit einer erhöhten Lipolyse-Rate sowie erhöhten Adiponektin-Spiegeln einhergeht (O'Mara et al., 2020). Die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung der DREADD-Mäuse mit dem Agonisten CP21 führt zu einer Aktivierung des G_i-Signalweges und über diese Kaskade zu einer Lipolyse-Inhibition (Wang et al., 2021). Aufgrund dieser Inhibition wäre dementsprechend eine Verringerung des Adiponektin-Spiegels zu

erwarten.

Che et al. konnten in einer Publikation ebenfalls einen Zusammenhang von Adiponektin und B-Zellen nachweisen. Im Rahmen dieser Studie zeigte sich durch Expression von Adiponektin eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung der B-Zellen (Che et al., 2021).

Eine Verminderung des Adiponektin-Spiegels infolge der DREADD-vermittelten akuten Lipolyse-Inhibition könnte demnach einen fehlenden Anstieg oder sogar eine Abnahme der B-Zell-Population bewirken. Diese Hypothese stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die beobachtete Reduktion der B-Zell-Anzahl im DREADD-Modell dar. Allerdings ist der genaue Mechanismus, über den Adiponektin die Reifung und Proliferation von B-Zellen beeinflusst, bislang noch nicht geklärt.

Entgegen dieser Hypothese zeigte die Untersuchung im Rahmen der Dissertation von Luzhou Wang keine Beeinflussung, im Sinne einer Abnahme der Adiponektin-Genexpression, 24 Stunden nach Reperfusion (Wang, 2024). Der genaue Einfluss der Lipolyse-Inhibition auf den Adiponektin-Spiegel sowie der Zusammenhang zwischen Adiponektin und Immunzellen, insbesondere B-Zellen, im mediastinalen Fettgewebe sind daher noch eingehender zu untersuchen.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die Reduktion der B-Zellzahl ist der Einfluss des Hormons Leptin. Dieses, von Adipozyten produzierte Hormon, spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Energiehaushalts und des Zellstoffwechsels. Leptin besitzt zudem entzündungshemmende, antioxidative und angioprotektive Eigenschaften, die einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Herz-Kreislauf-Systems leisten (Poetsch et al., 2020). Wang et al. stellte eine signifikant verringerte Leptin-Genexpression im inguinalen FG nach 60-minütiger kardialer Ischämie und sieben Tagen Reperfusion fest. Diese Abnahme ging zudem mit einer Akkumulation von Makrophagen nach sieben Tagen einher (Wang et al., 2022). In einer weiteren Studie führte die Stimulation des G_i-Signalwegs im DREADD-Modell zur Hemmung der Lipolyse und zeigte dabei einen signifikanten Anstieg der Leptin-Produktion bereits zwei Stunden nach der CNO-Gabe (Caron et al., 2019).

Dies verdeutlicht, dass die Hemmung der Lipolyse zu einem Anstieg des Leptins führt und dadurch möglicherweise die Immunreaktion nach einer kardialen Ischämie beeinflusst. Dass Leptin eine regulierende Rolle im Zusammenspiel zwischen Energiestoffwechsel und

Immunsystem spielt, ist bekannt (Fantuzzi and Faggioni, 2000; Pérez-Pérez et al., 2017). Der Einfluss von Leptin auf B-Zellen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. So zeigt eine Studie von Frasca et al., dass Leptin unter anderem den Antikörperklassenwechsel der B-Zellen beeinflusst und dabei zu einer Verringerung der von B-Zellen produzierten IgG-AK führt (Frasca et al., 2020). Um den genauen Zusammenhang zwischen Leptin, der Rekrutierung und Anzahl von B-Zellen sowie der Immunreaktion in den mediastinalen FALCs nach kardialer Ischämie umfassend zu verstehen, sind weitere Studien erforderlich. Neben Leptin und Adiponektin nehmen möglicherweise auch weitere Hormone Einfluss auf die B-Zellaktivität. Wang et al. konnten zeigen, dass es nach akuter Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell und der Induktion eines Myokardinfarkts mit 30-minütiger Reperfusion zu einer Reduktion des zirkulierenden Insulinspiegels kommt (Wang, 2024). Insulin ist, wie der Name schon andeutet, strukturell dem *Insulin-like growth factor* (IGF) ähnlich. Sowohl Insulin als auch IGF beeinflussen den Stoffwechsel auf vielfältige Weise, vor allem durch die Förderung des Anabolismus und die Hemmung des Katabolismus. Dabei nutzen sie gemeinsame Signalwege (Hakuno and Takahashi, 2018). In diesem Zusammenhang konnten Landreth et al. in einer Studie zeigen, dass IGF eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Vorläuferzellen der B-Zellen ausübt (Landreth et al., 1992). Umgekehrt würde eine geringere Aktivierung der IGF-Signalwege, etwa durch einen niedrigeren Insulinspiegel, vermutlich zu einer reduzierten Proliferation und folglich zu einer Abnahme der B-Zellen führen. Ob der Insulinspiegel im DREADD-Modell tatsächlich durch die akute Lipolyse-Inhibition oder durch andere Faktoren beeinflusst wird, ist bislang jedoch noch nicht abschließend untersucht (Wang, 2024). Neben der Lipolyse-Inhibition könnte auch eine IGF-Resistenz, ausgelöst durch Inflammationsprozesse, wie in vorigen Arbeiten beschrieben, Grund für eine verminderte Proliferation und damit einer Abnahme der B-Zellen sein (Jain et al., 1998; White, 2002). Eine Modulation des Insulinspiegels nimmt darüber hinaus auch direkten Einfluss auf die kardiale Funktion, indem es den kardialen Stoffwechsel, Hypertrophie- und Autophagieprozesse, sowie das Überleben der Kardiomyozyten beeinflusst (Abel, 2021).

Wang et al. berichten zudem, dass die akute Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell zu einer Abnahme freier FS führt(Wang, 2024). Es alternative Theorie ist, dass dieser Rückgang der freien FS die Immunzellzusammensetzung beeinflusst und sich dadurch die

beobachtete Abnahme der B-Zellanzahl erklärt. Dass freie FS die Proliferation peripherer Lymphozyten beeinflussen, ist bereits seit Langem bekannt (Mertin and Hughes, 2009; Weymann, 1977). Dabei lässt sich vor allem eine Hemmung der T-Zell-Proliferation beobachten, während die Auswirkungen auf B-Zellen weniger ausgeprägt sind (Buttke, 1984; Radzikowska et al., 2019). Allerdings zeigen Veröffentlichungen hierzu teils widersprüchliche Ergebnisse, wie eine Übersichtsarbeit von Radzikowska ausführlich darlegt. Ursache dafür sind unter anderem die unterschiedlichen, nicht standardisierten experimentellen Methoden zur Bestimmung des Einflusses von freien FS auf die Immunreaktion. Zudem sind chronische Erkrankungen häufig multifaktoriell bedingt, wobei verschiedene Faktoren jeweils separat sowohl die Lipidzusammensetzung als auch die Immunantwort beeinflussen können (Radzikowska et al., 2019). Diese Erkenntnisse aus der Übersichtsarbeit werden durch eine Publikation von Rockett et al. untermauert, welche aufzeigt, dass die Annahme, die Aktivierung von Lymphozyten werde durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung ungesättigter Fettsäuren verändert, nicht uneingeschränkt anwendbar ist (Rockett et al., 2010).

Die Abnahme der B-Zell-Anzahl lässt sich demnach nicht eindeutig und ausschließlich auf die Reduktion der freien FS zurückführen. Es ist durchaus denkbar, dass die Kombination aus einem niedrigeren Insulinspiegel, einer Reduktion der freien FS, einer Abnahme des Adiponektins und einem Anstieg des Leptins, hervorgerufen durch die akute Lipolyse-Inhibition, sowohl die Immunzellzusammensetzung positiv beeinflusst als auch die kardiale Funktion verbessert.

Die genauen Mechanismen, durch die diese Einflussnahme auf die Immunzellen erfolgt, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Nichtsdestotrotz zeigt die akute Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell anhand der vorliegenden Ergebnisse bereits ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial zur Verbesserung der kardialen Funktion nach einem Infarkt.

4.5 Limitationen

Im Rahmen dieser Dissertation sind durch verschiedene Einflussfaktoren Limitationen entstanden, die berücksichtigt werden müssen.

Eine der wesentlichen Hauptlimitationen stellt die geringe Probenzahl im I/R-Modell dar: So konnten nach 24 Stunden lediglich mediastinale Fettgewebsproben von vier und nach 28 Tagen von fünf Tieren gewonnen werden. Daher sind die in den Ergebnissen des I/R-Modells beobachteten Signifikanzen nur eingeschränkt aussagekräftig.

Zudem ist zur präziseren Analyse der Immunzellzahlen eine ergänzende Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie neben der immunhistochemischen Zellfärbung ratsam.

Der AK Anti-PAX5, der in dieser Dissertation zur Immunfluoreszenz der B-Zellen verwendet wurde, markiert das Transkriptionsfaktorprotein PAX5, welches in den frühen Stadien, jedoch weniger in den späten Stadien der B-Zelldifferenzierung exprimiert wird. Daher besteht die Möglichkeit, dass zu den gewählten Entnahmezeitpunkten im Rahmen dieser Dissertation, keine optimale immunofluoreszente Darstellung der B-Zellen stattgefunden hat und darunter auch die quantitative Bestimmung dieser beeinflusst wurde.

Da einige der zuvor genannten Publikationen einen Zusammenhang zwischen der Lipolyse-Inhibition und der Rekrutierung sowie Aktivität von Makrophagen belegen (Horckmans et al., 2018; Kosteli et al., 2010; Takahara et al., 2021; Wang, 2024) und mediastinale FALCs eine hohe Anzahl dieser Zellen enthalten, wäre zur umfassenderen Untersuchung der Vorgänge innerhalb der Cluster auch eine quantitative Analyse der Makrophagen empfehlenswert.

Für zukünftige Studien bietet sich zudem an, mehrere Entnahme- und Messzeitpunkte zu wählen, da die aktuell gewählten Zeitpunkte möglicherweise nicht die zeitlichen Maxima der Zellakkumulationen abbilden, wie bereits zuvor erläutert. So könnte ein tiefergehendes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Lipolyse und Immunzellzusammensetzung ermöglicht werden.

5 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Lipolyse und Immunzellkomposition in den FALCs zu beleuchten. Die Hypothese, dass eine Inhibition der Lipolyse über eine veränderte Zusammensetzung und eine verminderte Proliferation der Immunzellen, zu einem positiven Einfluss auf die kardiale Funktion nach Ischämie führt, konnte hier teilweise bestätigt werden.

Dabei zeigte sich bei langfristiger Inhibition der Lipolyse durch pharmakologische und genetische Inhibition der ATGL, keine Veränderung hinsichtlich der Clustergröße, sowie der Immunzellkomposition.

Die akute Inhibition der Lipolyse im DREADD-Modell hingegen zeigt in dieser Arbeit eine signifikante Abnahme der B-Zellen parallel zu einer verbesserten kardialen Auswurfleistung, welche in einer Dissertation von Luzhou Wang, Mitglied derselben Arbeitsgruppe, nachgewiesen werden konnte (Wang, 2024). Dieses Ergebnis legt nahe, dass es durch eine akute Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell über verschiedene Mechanismen, die noch nicht hinreichend beleuchtet wurden, zu einer verminderten Immunreaktion in den FALCs kommt, was in der Folge zu der beobachteten verbesserten kardialen Funktion nach einer Ischämie beitragen könnte.

Diese Erkenntnisse geben Anlass zu weiterführenden Forschungsarbeiten, bei denen die oben genannten Limitationen berücksichtigt werden sollten. Aufbauend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen zur akuten Lipolyse-Inhibition im DREADD-Modell könnten zukünftige Studien die zugrunde liegenden Mechanismen der beobachteten Verbesserung der kardialen Auswurfleistung weiter untersuchen. Dabei erscheint eine quantitative Analyse weiterer Immunzellpopulationen, insbesondere der Makrophagen, sowie eine differenziertere Charakterisierung der bereits untersuchten B- und T-Zellen von besonderem Interesse. Ergänzend könnten zukünftige Arbeiten außerdem den Einfluss der akuten Lipolyse-Inhibition im Kontext einer kardialen Ischämie mit Blick auf hormonelle Veränderungen beleuchten – insbesondere im Hinblick auf Leptin, Adiponektin und Insulin –, um potenzielle systemische Regulationsmechanismen besser zu verstehen.

Damit leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle der mediastinalen FALCs nach Lipolyse-Inhibition im Kontext kardialer Ischämie, bietet zugleich neue Perspektiven und legt die Grundlage für weiterführende Forschung.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Abel, E.D., 2021. Insulin signaling in the heart. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 321, E130–E145. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00158.2021

Aflaki, E., Balenga, N.A.B., Luschnig-Schratl, P., Wolinski, H., Povoden, S., Chandak, P.G., Bogner-Strauss, J.G., Eder, S., Konya, V., Kohlwein, S.-D., Heinemann, A., Kratky, D., 2011. Impaired Rho GTPase activation abrogates cell polarization and migration in macrophages with defective lipolysis. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 68, 3933–3947. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0688-4

Batra, A., Siegmund, B., 2012. The Role of Visceral Fat. Dig. Dis. 30, 70–74. https://doi.org/10.1159/000335722

Bauzá-Thorbrügge, M., Vujičić, M., Chanclón, B., Palsdottir, V., Pillon, N.J., Benrick, A., Wernstedt Asterholm, I., 2024. Adiponectin stimulates Sca1+CD34--adipocyte precursor cells associated with hyperplastic expansion and beiging of brown and white adipose tissue. Metabolism. 151, 155716. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155716

Bénézech, C., Luu, N.-T., Walker, J.A., Kruglov, A.A., Loo, Y., Nakamura, K., Zhang, Y., Nayar, S., Jones, L.H., Flores-Langarica, A., McIntosh, A., Marshall, J., Barone, F., Besra, G., Miles, K., Allen, J.E., Gray, M., Kollias, G., Cunningham, A.F., Withers, D.R., Toellner, K.M., Jones, N.D., Veldhoen, M., Nedospasov, S.A., McKenzie, A.N.J., Caamaño, J.H., 2015. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. Nat. Immunol. 16, 819–828. https://doi.org/10.1038/ni.3215

Bertero, E., Maack, C., 2018. Metabolic remodelling in heart failure. Nat. Rev. Cardiol. 15, 457–470. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0044-6

Bottermann, K., Granade, M.E., Oenarto, V., Fischer, J.W., Harris, T.E., 2021. Atglistatin Pretreatment Preserves Remote Myocardium Function Following Myocardial Infarction. J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 26, 289–297. https://doi.org/10.1177/1074248420971113

Buttke, T.M., 1984. Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids. I. Differential effects on mouse B and T lymphocytes. Immunology 53, 235–242.

Caron, A., Reynolds, R.P., Castorena, C.M., Michael, N.J., Lee, C.E., Lee, S., Berdeaux, R., Scherer, P.E., Elmquist, J.K., 2019. Adipocyte Gs but not Gi signaling regulates whole-body glucose homeostasis. Mol. Metab. 27, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.06.019

Cerk, I.K., Wechselberger, L., Oberer, M., 2018. Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview. Curr. Protein Pept. Sci. 19, 221–233. https://doi.org/10.2174/1389203718666170918160110

Che, N., Sun, X., Gu, L., Wang, X., Shi, J., Sun, Y., Xu, L., Liu, R., Wang, J., Zhu, F., Peng, N., Xiao, F., Hu, D., Lu, L., Qiu, W., Zhang, M., 2021. Adiponectin Enhances B-Cell Proliferation and Differentiation via Activation of Akt1/STAT3 and Exacerbates Collagen-Induced Arthritis. Front. Immunol. 12, 626310. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626310

Communications, E., n.d. Klinische Pathophysiologie [WWW Document]. URL https://eref.thieme.de/ebooks/1120274#/ebook_1120274_SL48226062 (accessed 6.21.22).

Cruz-Migoni, S., Caamaño, J., 2016. Fat-Associated Lymphoid Clusters in Inflammation and Immunity. Front. Immunol. 7. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00612

Daley, A.D., Bénézech, C., 2024. Fat-associated lymphoid clusters: Supporting visceral adipose tissue B cell function in immunity and metabolism. Immunol. Rev. 324, 78–94. https://doi.org/10.1111/imr.13339

Doughty, K.N., Del Pilar, N.X., Audette, A., Katz, D.L., 2017. Lifestyle Medicine and the Management of Cardiovascular Disease. Curr. Cardiol. Rep. 19, 116. https://doi.org/10.1007/s11886-017-0925-z

Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Sul, H.S., 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. Annu. Rev. Nutr. 27, 79–101. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734

Emde, B., Heinen, A., GÃ¶decke, A., Bottermann, K., 2014. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. Eur. J. Histochem. 58. https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2448

Fantuzzi, G., Faggioni, R., 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. J. Leukoc. Biol. 68, 437–446.

Farias-Itao, D.S., Pasqualucci, C.A., Nishizawa, A., da Silva, L.F.F., Campos, F.M., Bittencourt, M.S., da Silva, K.C.S., Leite, R.E.P., Grinberg, L.T., Ferretti-Rebustini, R.E. de L., Jacob-Filho, W., Suemoto, C.K., 2019. B Lymphocytes and Macrophages in the Perivascular Adipose Tissue Are Associated With Coronary Atherosclerosis: An Autopsy Study. J. Am. Heart Assoc. 8, e013793. https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013793

Farrell, M.S., Roth, B.L., 2013. Pharmacosynthetics: Reimagining the pharmacogenetic approach. Brain Res. 1511, 6–20. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.09.043

Frangogiannis, N.G., 2015. Pathophysiology of Myocardial Infarction. Compr. Physiol. 5, 1841–1875. https://doi.org/10.1002/cphy.c150006

Frasca, D., Diaz, A., Romero, M., Blomberg, B.B., 2020. Leptin induces immunosenescence in human B cells. Cell. Immunol. 348, 103994.

https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103994
Frühbeck, G., 2008. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 456, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_1
Ghaben, A.L., Scherer, P.E., 2019. Adipogenesis and metabolic health. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 242–258. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z
Girousse, A., Tavernier, G., Valle, C., Moro, C., Mejhert, N., Dinel, A.-L., Houssier, M., Roussel, B., Besse-Patin, A., Combes, M., Mir, L., Monbrun, L., Bézaire, V., Prunet-Marcassus, B., Waget, A., Vila, I., Caspar-Bauguil, S., Louche, K., Marques, M.-A., Mairal, A., Renoud, M.-L., Galitzky, J., Holm, C., Mouisel, E., Thalamas, C., Viguerie, N., Sulpice, T., Burcelin, R., Arner, P., Langin, D., 2013. Partial Inhibition of Adipose Tissue Lipolysis Improves Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity Without Alteration of Fat Mass. PLOS Biol. 11, e1001485. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001485
Grabner, G.F., Guttenberger, N., Mayer, N., Migglautsch-Sulzer, A.K., Lembacher-Fadum, C., Fawzy, N., Bulfon, D., Hofer, P., Züllig, T., Hartig, L., Kulminskaya, N., Chalhoub, G., Schratter, M., Radner, F.P.W., Preiss-Landl, K., Masser, S., Lass, A., Zechner, R., Gruber, K., Oberer, M., Breinbauer, R., Zimmermann, R., 2022. Small-Molecule Inhibitors Targeting Lipolysis in Human Adipocytes. J. Am. Chem. Soc. 144, 6237–6250. https://doi.org/10.1021/jacs.1c10836
Grassi, G., Seravalle, G., Mancia, G., 2015. Sympathetic activation in cardiovascular disease: evidence, clinical impact and therapeutic implications. Eur. J. Clin. Invest. 45, 1367–1375. https://doi.org/10.1111/eci.12553
Gruzdeva, O., Uchasova, E., Dyleva, Y., Borodkina, D., Akbasheva, O., Belik, E., Karetnikova, V., Brel, N., Kokov, A., Kashtalap, V., Barbarash, O., 2018. Relationships between epicardial adipose tissue thickness and adipo-fibrokine indicator profiles post-myocardial infarction. Cardiovasc. Diabetol. 17, 40. https://doi.org/10.1186/s12933-018-0679-y
Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., Zechner, R., 2006. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science 312, 734–737. https://doi.org/10.1126/science.1123965
Hakuno, F., Takahashi, S.-I., 2018. 40 YEARS OF IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. https://doi.org/10.1530/JME-17-0311

Holm, C., 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. Biochem. Soc. Trans. 31, 1120–1124. https://doi.org/10.1042/bst0311120

Horckmans, M., Bianchini, M., Santovito, D., Megens, R.T.A., Springael, J.-Y., Negri, I., Vacca, M., Di Eusanio, M., Moschetta, A., Weber, C., Duchene, J., Steffens, S., 2018. Pericardial Adipose Tissue Regulates Granulopoiesis, Fibrosis, and Cardiac Function After Myocardial Infarction. Circulation 137, 948–960. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028833

Hue, L., Taegtmeyer, H., 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 297, E578–E591. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00093.2009

Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M.J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A.L.P., Crea, F., Goudevenos, J.A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M.J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., ESC Scientific Document Group, Collet, J.-P., Kristensen, S.D., Aboyans, V., Baumbach, A., Bugiardini, R., Coman, I.M., Delgado, V., Fitzsimons, D., Gaemperli, O., Gershlick, A.H., Gielen, S., Harjola, V.-P., Katus, H.A., Knuuti, J., Kolh, P., Leclercq, C., Lip, G.Y.H., Morais, J., Neskovic, A.N., Neumann, F.-J., Niessner, A., Piepoli, M.F., Richter, D.J., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Steg, P.G., Terkelsen, C.J., Thygesen, K., Windecker, S., Zamorano, J.L., Zeymer, U., Windecker, S., Aboyans, V., Agewall, S., Barbato, E., Bueno, H., Coca, A., Collet, J.-P., Coman, I.M., Dean, V., Delgado, V., Fitzsimons, D., Gaemperli, O., Hindricks, G., Iung, B., Jüni, P., Katus, H.A., Knuuti, J., Lancellotti, P., Leclercq, C., McDonagh, T., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Richter, D.J., Roffi, M., Shlyakhto, E., Simpson, I.A., Zamorano, J.L., Chettibi, M., Hayrapetyan, H.G., Metzler, B., Ibrahimov, F., Sujayeva, V., Beauloye, C., Dizdarevic-Hudic, L., Karamfiloff, K., Skoric, B., Antoniades, L., Tousek, P., Terkelsen, P.J., Shaheen, S.M., Marandi, T., Niemelä, M., Kedev, S., Gilard, M., Aladashvili, A., Elsaesser, A., Kanakakis, I.G., Merkely, B., Gudnason, T., Iakobishvili, Z., Bolognese, L., Berkinbayev, S., Bajraktari, G., Beishenkulov, M., Zake, I., Lamin, H.B., Gustiene, O., Pereira, B., Xuereb, R.G., Ztot, S., Juliebø, V., Legutko, J., Timóteo, A.T., Tatu-Chiţoiu, G., Yakovlev, A., Bertelli, L., Nedeljkovic, M., Studenčan, M., Bunc, M., García de Castro, A.M., Petursson, P., Jeger, R., Mourali, M.S., Yildirir, A., Parkhomenko, A., Gale, C.P., 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Eur. Heart J. 39, 119–177. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393

Ilatovskaya, D.V., Pitts, C., Clayton, J., Domondon, M., Troncoso, M., Pippin, S., DeLeon-

Pennell, K.Y., 2019. CD8+ T-cells negatively regulate inflammation post-myocardial infarction. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 317, H581–H596. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00112.2019
Jackson-Jones, L.H., Bénézech, C., 2020. FALC stromal cells define a unique immunological niche for the surveillance of serous cavities. Curr. Opin. Immunol. 64, 42–49. https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.03.008
Jain, S., Golde, D.W., Bailey, R., Geffner, M.E., 1998. Insulin-like growth factor-I resistance. Endocr. Rev. 19, 625–646. https://doi.org/10.1210/edrv.19.5.0348
Jamur, M.C., Oliver, C., 2010. Permeabilization of cell membranes. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 588, 63–66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9
Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Yan, W., Sims, H.F., Gibson, B., Gross, R.W., 2004. Identification, Cloning, Expression, and Purification of Three Novel Human Calcium-independent Phospholipase A2 Family Members Possessing Triacylglycerol Lipase and Acylglycerol Transacylase Activities*. J. Biol. Chem. 279, 48968–48975. https://doi.org/10.1074/jbc.M407841200
Jr, C.A.J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., Jr, C.A.J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., 2001. Immunobiology, 5th ed. Garland Science.
Kinlay, S., Ganz, P., 2003. Early statin therapy in acute coronary syndromes. Semin. Vasc. Med. 3, 419–424. https://doi.org/10.1055/s-2004-817691
Koeth, O., Zahn, R., Gitt, A.K., Bauer, T., Juenger, C., Senges, J., Zeymer, U., Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction Plus Study Group, 2009. Clinical benefit of early reperfusion therapy in patients with ST-elevation myocardial infarction usually excluded from randomized clinical trials (results from the Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction Plus [MITRA Plus] registry). Am. J. Cardiol. 104, 1074–1077. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.05.054
Kojima, S., Funahashi, T., Sakamoto, T., Miyamoto, S., Soejima, H., Hokamaki, J., Kajiwara, I., Sugiyama, S., Yoshimura, M., Fujimoto, K., Miyao, Y., Suefuji, H., Kitagawa, A., Ouchi, N., Kihara, S., Matsuzawa, Y., Ogawa, H., 2003. The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. https://doi.org/10.1136/heart.89.6.667
Kosteli, A., Sugaru, E., Haemmerle, G., Martin, J.F., Lei, J., Zechner, R., Ferrante, A.W., 2010. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. J. Clin. Invest. 120, 3466–3479. https://doi.org/10.1172/JCI42845
Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E., Murano, I., Severi, I., Venema, W., Cecchini,

M.P., Kershaw, E.E., Barbatelli, G., Haemmerle, G., Zechner, R., Cinti, S., 2018. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. J. Lipid Res. 59, 784–794. https://doi.org/10.1194/jlr.M079665

Landreth, K.S., Narayanan, R., Dorshkind, K., 1992. Insulin-like Growth Factor-I Regulates Pro-B Cell Differentiation. Blood 80, 1207–1212. https://doi.org/10.1182/blood.V80.5.1207.1207

Lemoine, S., Morva, A., Youinou, P., Jamin, C., 2009. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? Ann. N. Y. Acad. Sci. 1173, 260–267. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04651.x

Lettieri Barbato, D., Tatulli, G., Aquilano, K., Ciriolo, M.R., 2014. Inhibition of age-related cytokines production by ATGL: a mechanism linked to the anti-inflammatory effect of resveratrol. Mediators Inflamm. 2014, 917698. https://doi.org/10.1155/2014/917698

Lopaschuk, G.D., 2017. Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future. Can. J. Cardiol. 33, 838–849. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.013

Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., Stanley, W.C., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. Physiol. Rev. 90, 207–258. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009

Mascolo, A., Sessa, M., Scavone, C., De Angelis, A., Vitale, C., Berrino, L., Rossi, F., Rosano, G., Capuano, A., 2017. New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. Int. J. Cardiol. 227, 734–742. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.10.069

Mayer, N., Schweiger, M., Romauch, M., Grabner, G.F., Eichmann, T.O., Fuchs, E., Ivkovic, J., Heier, C., Mrak, I., Lass, A., Höfler, G., Fledelius, C., Zechner, R., Zimmermann, R., Breinbauer, R., 2013. Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. Nat. Chem. Biol. 9, 785–787. https://doi.org/10.1038/nchembio.1359

Mertin, J., Hughes, D., 2009. Specific Inhibitory Action of Polyunsaturated Fatty Acids on Lymphocyte Transformation Induced by PHA and PPD. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 48, 203–210. https://doi.org/10.1159/000231306

Miyoshi, H., Souza, S.C., Zhang, H.-H., Strissel, K.J., Christoffolete, M.A., Kovsan, J., Rudich, A., Kraemer, F.B., Bianco, A.C., Obin, M.S., Greenberg, A.S., 2006. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. 281, 15837–15844.

https://doi.org/10.1074/jbc.M601097200
Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., Koyasu, S., 2010. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. Nature 463, 540–544. https://doi.org/10.1038/nature08636
Mottillo, E.P., Shen, X.J., Granneman, J.G., 2010. beta3-adrenergic receptor induction of adipocyte inflammation requires lipolytic activation of stress kinases p38 and JNK. Biochim. Biophys. Acta 1801, 1048–1055. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.04.012
Nossuli, T.O., Lakshminarayanan, V., Baumgarten, G., Taffet, G.E., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., Entman, M.L., 2000. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. 278, H1049–H1055. https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049
Obeid, S., Wankell, M., Charrez, B., Sternberg, J., Kreuter, R., Esmaili, S., Ramezani-Moghadam, M., Devine, C., Read, S., Bhathal, P., Lopata, A., Ahlensteil, G., Qiao, L., George, J., Hebbard, L., 2017. Adiponectin confers protection from acute colitis and restricts a B cell immune response. J. Biol. Chem. 292, 6569–6582. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712646
O'Mara, A.E., Johnson, J.W., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Fletcher, L.A., Fink, Y.A., Kapuria, D., Cassimatis, T.M., Kelsey, N., Cero, C., Sater, Z.A., Piccinini, F., Baskin, A.S., Leitner, B.P., Cai, H., Millo, C.M., Dieckmann, W., Walter, M., Javitt, N.B., Rotman, Y., Walter, P.J., Ader, M., Bergman, R.N., Herscovitch, P., Chen, K.Y., Cypess, A.M., 2020. Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. J. Clin. Invest. 130, 2209–2219. https://doi.org/10.1172/JCI131126
Palm, N.W., Medzhitov, R., 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunol. Rev. 227, 221–233. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x
Parajuli, N., Takahara, S., Matsumura, N., Kim, T.T., Ferdaoussi, M., Migglautsch, A.K., Zechner, R., Breinbauer, R., Kershaw, E.E., Dyck, J.R.B., 2018. Atglistatin ameliorates functional decline in heart failure via adipocyte-specific inhibition of adipose triglyceride lipase. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 315, H879–H884. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00308.2018
Park, M., Sweeney, G., 2013. Direct effects of adipokines on the heart: focus on adiponectin. Heart Fail. Rev. 18, 631–644. https://doi.org/10.1007/s10741-012-9337-8
Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Fernández-Riejos, P., Martín-González, J., Segura-

Egea, J.J., Sánchez-Margalet, V., 2017. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. Cytokine Growth Factor Rev. 35, 71–84. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.03.001

Perry, R.J., Camporez, J.-P.G., Kursawe, R., Titchenell, P.M., Zhang, D., Perry, C.J., Jurczak, M.J., Abudukadier, A., Han, M.S., Zhang, X.-M., Ruan, H.-B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S.M., Sul, H.S., Birnbaum, M.J., Davis, R.J., Cline, G.W., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2015. Hepatic Acetyl CoA Links Adipose Tissue Inflammation to Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. Cell 160, 745–758. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012

Petersen, C.L., Nielsen, J.R., Petersen, B.L., Kjaer, A., 2003. Catecholaminergic activation in acute myocardial infarction: time course and relation to left ventricular performance. Cardiology 100, 23–28. https://doi.org/10.1159/000072388

Piroth, M., Gorski, D.J., Hundhausen, C., Petz, A., Gorressen, S., Semmler, D., Zabri, H., Hartwig, S., Lehr, S., Kelm, M., Jung, C., Fischer, J.W., 2022. Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response. Matrix Biol. 112, 116–131. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2022.08.008

Poetsch, M.S., Strano, A., Guan, K., 2020. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. Front. Endocrinol. 11, 354. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00354

Prabhu, S.D., Frangogiannis, N.G., 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. Circ. Res. 119, 91–112. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577

PubChem, n.d. PAX5 - paired box 5 (human) [WWW Document]. URL https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/PAX5/human (accessed 2.17.24).

Radzikowska, U., Rinaldi, A.O., Çelebi Sözener, Z., Karaguzel, D., Wojcik, M., Cypryk, K., Akdis, M., Akdis, C.A., Sokolowska, M., 2019. The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses. Nutrients 11, 2990. https://doi.org/10.3390/nu11122990

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., 1963. THE GLUCOSE FATTY-ACID CYCLE ITS ROLE IN INSULIN SENSITIVITY AND THE METABOLIC DISTURBANCES OF DIABETES MELLITUS. The Lancet 281, 785–789. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)91500-9

Rangel-Moreno, J., Moyron-Quiroz, J.E., Carragher, D.M., Kusser, K., Hartson, L., Moquin, A., Randall, T.D., 2009. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity 30, 731–743. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.03.014

Reed, G.W., Rossi, J.E., Cannon, C.P., 2017. Acute myocardial infarction. Lancet Lond. Engl. 389, 197–210. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30677-8

RKI - Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt [WWW Document], n.d. URL https://www.rki.de/DE/Content/GesundAZ/K/Koronare_Herzkrankheit/Koronare_Herzkrankheit_node.html (accessed 6.3.22).

Rockett, B.D., Salameh, M., Carraway, K., Morrison, K., Shaikh, S.R., 2010. n-3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo. J. Lipid Res. 51, 1284–1297. https://doi.org/10.1194/jlr.M000851

Rogan, S.C., Roth, B.L., 2011. Remote Control of Neuronal Signaling. Pharmacol. Rev. 63, 291–315. https://doi.org/10.1124/pr.110.003020

Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. Immune Netw. 18, e27. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27

Rosenfeld, S.M., Perry, H.M., Gonen, A., Prohaska, T.A., Srikakulapu, P., Grewal, S., Das, D., McSkimming, C., Taylor, A.M., Tsimikas, S., Bender, T.P., Witztum, J.L., McNamara, C.A., 2015. B-1b Cells Secrete Atheroprotective IgM and Attenuate Atherosclerosis. Circ. Res. 117, e28-39. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306044

Salatzki, J., Foryst-Ludwig, A., Bentele, K., Blumrich, A., Smeir, E., Ban, Z., Brix, S., Grune, J., Beyhoff, N., Klopfleisch, R., Dunst, S., Surma, M.A., Klose, C., Rothe, M., Heinzel, F.R., Krannich, A., Kershaw, E.E., Beule, D., Schulze, P.C., Marx, N., Kintscher, U., 2018. Adipose tissue ATGL modifies the cardiac lipidome in pressure-overload-induced left ventricular failure. PLoS Genet. 14, e1007171. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007171

Sassmann, A., Offermanns, S., Wettschureck, N., 2010. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. Genes. N. Y. N 2000 48, 618–625. https://doi.org/10.1002/dvg.20665

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9, 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Schoiswohl, G., Stefanovic-Racic, M., Menke, M.N., Wills, R.C., Surlow, B.A., Basantani, M.K., Sitnick, M.T., Cai, L., Yazbeck, C.F., Stolz, D.B., Pulinilkunnil, T., O'Doherty, R.M., Kershaw, E.E., 2015. Impact of Reduced ATGL-Mediated Adipocyte Lipolysis on Obesity-Associated Insulin Resistance and Inflammation in Male Mice. Endocrinology 156, 3610–3624. https://doi.org/10.1210/en.2015-1322

Schömig, A., 2019. Adrenerge Mechanismen im Herzinfarkt: Kardiale und systemische Katecholaminfreisetzung, Beta-Rezeptoren und Beta-Rezeptorenblocker. De Gruyter.
Schreiber, R., Xie, H., Schweiger, M., 2019. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids 1864, 880–899. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.008
Schweiger, M., Romauch, M., Schreiber, R., Grabner, G.F., Hütter, S., Kotzbeck, P., Benedikt, P., Eichmann, T.O., Yamada, S., Knittelfelder, O., Diwoky, C., Doler, C., Mayer, N., De Cecco, W., Breinbauer, R., Zimmermann, R., Zechner, R., 2017. Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. Nat. Commun. 8, 14859. https://doi.org/10.1038/ncomms14859
Sharma, S., Adrogue, J.V., Golfman, L., Uray, I., Lemm, J., Youker, K., Noon, G.P., Frazier, O.H., Taegtmeyer, H., 2004. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 18, 1692–1700. https://doi.org/10.1096/fj.04-2263com
Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., Walsh, K., 2005. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nat. Med. 11, 1096–1103. https://doi.org/10.1038/nm1295
Shimizu, I., Yoshida, Y., Katsuno, T., Tateno, K., Okada, S., Moriya, J., Yokoyama, M., Nojima, A., Ito, T., Zechner, R., Komuro, I., Kobayashi, Y., Minamino, T., 2012. p53-Induced Adipose Tissue Inflammation Is Critically Involved in the Development of Insulin Resistance in Heart Failure. Cell Metab. 15, 51–64. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.006
Sitnick, M.T., Basantani, M.K., Cai, L., Schoiswohl, G., Yazbeck, C.F., Distefano, G., Ritov, V., DeLany, J.P., Schreiber, R., Stolz, D.B., Gardner, N.P., Kienesberger, P.C., Pulinilkunnil, T., Zechner, R., Goodpaster, B.H., Coen, P., Kershaw, E.E., 2013. Skeletal muscle triacylglycerol hydrolysis does not influence metabolic complications of obesity. Diabetes 62, 3350–3361. https://doi.org/10.2337/db13-0500
Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., Hauner, H., 2007. Relationship between Adipocyte Size and Adipokine Expression and Secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab. 92, 1023–1033. https://doi.org/10.1210/jc.2006-1055
Srikakulapu, P., McNamara, C.A., 2020. B Lymphocytes and Adipose Tissue Inflammation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 40, 1110–1122.

https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312467
Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., Obin, M.S., 2007. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. Diabetes 56, 2910–2918. https://doi.org/10.2337/db07-0767
Sung, H.K., Tang, J., Jahng, J.W.S., Song, E., Chan, Y.K., Lone, A.H., Peterson, J., Abdul-Sater, A., Sweeney, G., 2024. Ischemia-induced cardiac dysfunction is exacerbated in adiponectin-knockout mice due to impaired autophagy flux. Clin. Transl. Sci. 17, e13758. https://doi.org/10.1111/cts.13758
Sztalryd, C., Brasaemle, D.L., 2017. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. Biochim. Biophys. Acta 1862, 1221–1232. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.009
Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J.T., Contreras, J.A., Kimmel, A.R., Londos, C., 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. J. Cell Biol. 161, 1093–1103. https://doi.org/10.1083/jcb.200210169
Takahara, S., Ferdaoussi, M., Srnic, N., Maayah, Z.H., Soni, S., Migglautsch, A.K., Breinbauer, R., Kershaw, E.E., Dyck, J.R.B., 2021. Inhibition of ATGL in adipose tissue ameliorates isoproterenol-induced cardiac remodeling by reducing adipose tissue inflammation. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 320, H432–H446. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00737.2020
Thiele, A., Luettges, K., Ritter, D., Beyhoff, N., Smeir, E., Grune, J., Steinhoff, J.S., Schupp, M., Klopfleisch, R., Rothe, M., Wilck, N., Bartolomaeus, H., Migglautsch, A.K., Breinbauer, R., Kershaw, E.E., Grabner, G.F., Zechner, R., Kintscher, U., Foryst-Ludwig, A., 2021. Pharmacological inhibition of adipose tissue Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. Cardiovasc. Res. cvab182. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab182
Thompson, K.J., Khajehali, E., Bradley, S.J., Navarrete, J.S., Huang, X.P., Slocum, S., Jin, J., Liu, J., Xiong, Y., Olsen, R.H.J., Diberto, J.F., Boyt, K.M., Pina, M.M., Pati, D., Molloy, C., Bundgaard, C., Sexton, P.M., Kash, T.L., Krashes, M.J., Christopoulos, A., Roth, B.L., Tobin, A.B., 2018. DREADD Agonist 21 Is an Effective Agonist for Muscarinic-Based DREADDs in Vitro and in Vivo. ACS Pharmacol. Transl. Sci. 1, 61–72. https://doi.org/10.1021/acsptsci.8b00012
Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Chaitman, B.R., Bax, J.J., Morrow, D.A., White, H.D., ESC Scientific Document Group, 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). Eur. Heart J. 40, 237–269. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462

Tsao, C.W., Aday, A.W., Almarzooq, Z.I., Alonso, A., Beaton, A.Z., Bittencourt, M.S., Boehme, A.K., Buxton, A.E., Carson, A.P., Commodore-Mensah, Y., Elkind, M.S.V., Evenson, K.R., Eze-Nliam, C., Ferguson, J.F., Generoso, G., Ho, J.E., Kalani, R., Khan, S.S., Kissela, B.M., Knutson, K.L., Levine, D.A., Lewis, T.T., Liu, J., Loop, M.S., Ma, J., Mussolino, M.E., Navaneethan, S.D., Perak, A.M., Poudel, R., Rezk-Hanna, M., Roth, G.A., Schroeder, E.B., Shah, S.H., Thacker, E.L., VanWagner, L.B., Virani, S.S., Voecks, J.H., Wang, N.-Y., Yaffe, K., Martin, S.S., 2022. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation 145, e153–e639. https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000001052

van Dierendonck, X.A.M.H., Vrieling, F., Smeehuijzen, L., Deng, L., Boogaard, J.P., Croes, C.-A., Temmerman, L., Wetzels, S., Biessen, E., Kersten, S., Stienstra, R., 2022. Triglyceride breakdown from lipid droplets regulates the inflammatory response in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. 119, e2114739119. https://doi.org/10.1073/pnas.2114739119

Villena, J.A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K.-H., Sul, H.S., 2004. Desnutrin, an Adipocyte Gene Encoding a Novel Patatin Domain-containing Protein, Is Induced by Fasting and Glucocorticoids: ECTOPIC EXPRESSION OF DESNUTRIN INCREASES TRIGLYCERIDE HYDROLYSIS*. J. Biol. Chem. 279, 47066–47075. https://doi.org/10.1074/jbc.M403855200

Wang, L., 2024. The acute inhibition of lipolysis using DREADD system does not reverse MI-induced changes in subcutaneous white adipose tissue, but improves cardiac systolic function. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Wang, L., Zabri, H., Gorressen, S., Semmler, D., Hundhausen, C., Fischer, J.W., Bottermann, K., 2022. Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner. Front. Physiol. 13, 1036945. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1036945

Wang, L., Zhu, L., Meister, J., Bone, D.B.J., Pydi, S.P., Rossi, M., Wess, J., 2021. Use of DREADD Technology to Identify Novel Targets for Antidiabetic Drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 61, 421–440. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030220-121042

Weymann, 1977. Effect of Fatty Acid Mixtures on Phytohaemagglutinin-Stimulated Lymphocytes of Different Species.

White, M.F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 283, E413-422. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2001

Wu, L., Dalal, R., Cao, C.D., Postoak, J.L., Yang, G., Zhang, Q., Wang, Z., Lal, H., Kaer,

L.V., 2019. IL-10–producing B cells are enriched in murine pericardial adipose tissues and ameliorate the outcome of acute myocardial infarction. Proc. Natl. Acad. Sci. 116, 21673–21684. https://doi.org/10.1073/pnas.1911464116

Young, S.G., Zechner, R., 2013. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. Genes Dev. 27, 459–484. https://doi.org/10.1101/gad.209296.112

Yusuf, S., Hawken, S., Ôunpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. The Lancet 364, 937–952. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9

Zaidi, Y., Aguilar, E.G., Troncoso, M., Ilatovskaya, D.V., DeLeon-Pennell, K.Y., 2021. Immune regulation of cardiac fibrosis post myocardial infarction. Cell. Signal. 77, 109837. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109837

Zechner, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., 2005. Lipolysis: pathway under construction. Curr. Opin. Lipidol. 16, 333–340. https://doi.org/10.1097/01.mol.0000169354.20395.1c

Zhang, W., Mottillo, E.P., Zhao, J., Gartung, A., VanHecke, G.C., Lee, J.-F., Maddipati, K.R., Xu, H., Ahn, Y.-H., Proia, R.L., Granneman, J.G., Lee, M.-J., 2014. Adipocyte lipolysis-stimulated interleukin-6 production requires sphingosine kinase 1 activity. J. Biol. Chem. 289, 32178–32185. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.601096

Zhou, Z., Liu, C., Xu, S., Wang, J., Guo, F., Duan, S., Deng, Q., Sun, J., Yu, F., Zhou, Y., Wang, M., Wang, Y., Zhou, L., Jiang, H., Yu, L., 2022. Metabolism regulator adiponectin prevents cardiac remodeling and ventricular arrhythmias via sympathetic modulation in a myocardial infarction model. Basic Res. Cardiol. 117, 34. https://doi.org/10.1007/s00395-022-00939-2

Zhu, H., Aryal, D.K., Olsen, R.H.J., Urban, D.J., Swearingen, A., Forbes, S., Roth, B.L., Hochgeschwender, U., 2016. Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. Genes. N. Y. N 2000 54, 439–446. https://doi.org/10.1002/dvg.22949

Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R., 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science 306, 1383–1386. https://doi.org/10.1126/science.1100747

Zouggari, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P., Simon, T., Sage, A.P., Guérin, C., Vilar, J.,

Caligiuri, G., Tsiantoulas, D., Laurans, L., Dumeau, E., Kotti, S., Bruneval, P., Charo, I.F., Binder, C.J., Danchin, N., Tedgui, A., Tedder, T.F., Silvestre, J.-S., Mallat, Z., 2013. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. Nat. Med. 19, 1273–1280. https://doi.org/10.1038/nm.3284

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit tatkräftig unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Katharina Bottermann und ihrer Arbeitsgruppe Luzhou Wang und Heba Zabri, für die wunderbare Betreuung, die mich nicht nur bei der Arbeit im Labor unterstützt, sondern mir auch das Verfassen der Dissertation erleichtert haben.

Herrn Professor Fischer danke ich für die Erstbetreuung und Inspiration in Form von Anregungen und Verbesserungsvorschlägen.
Frau PD Dr. rer. nat Annika Raupach danke ich für die freundliche Übernahme der Ko-Betreuung.

Ein großer Dank gilt auch der AG Fischer für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, welche stets geprägt war von einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und gegenseitiger Unterstützung.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich ganz herzlich bedanken, für die liebevolle und aufmerksame Unterstützung während des Verfassens der Arbeit und über das Studium hinweg. Danke für eure Motivation und Liebe.

Außerdem danke ich meinen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die keine Mühen gescheut haben, mich während der Studienzeit zu motivieren und in schwierigen Zeiten immer zu unterstützen. Ohne euren Rückhalt und eure Unterstützung, wäre ich sicherlich nicht da, wo ich jetzt stehe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.