

**Rolle des braunen Fettgewebes bei kardialer
Ischämie/Reperfusion: prädiabetes-induzierte
Veränderungen und Interorgan-Kommunikation mit
Knochenmarkfett**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Rachel Nega
aus Schwalmstadt

Düsseldorf, August 2025

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

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. med. Maria Grandoch
2. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fettgewebe	1
1.1.1	Merkmale und Unterschiede verschiedener Fettgewebstypen	1
1.1.2	Braunes Fettgewebe: Metabolische Funktion und kardioprotektive Wirkung ...	4
1.1.3	Merkmale des Knochenmarkfett	8
1.1.4	Knochenmarkfett: Funktionelle Bedeutung	10
1.2	Prädiabetes	12
1.2.1	Pathophysiologie, Risikofaktoren und klinische Relevanz	12
1.2.2	Auswirkungen von Prädiabetes auf Fettgewebe	13
1.3	Der Myokardinfarkt	15
1.3.1	Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen	15
1.3.2	Definition, Pathophysiologie und Diagnostik des Myokardinfarkts	16
1.3.3	Der kardiale Metabolismus beim Myokardinfarkt	17
1.3.4	Die Immunantwort beim Myokardinfarkt	18
1.4	Extrazelluläre Vesikel: Mediatoren der Interorgan-Kommunikation	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Tierversuche	24
2.2	Tierhaltung	24
2.2.1	Verwendete Tiere	24
2.3	Fütterung und experimenteller Versuchsablauf	24
2.4	Intraperitonealer Glukosetoleranztest	26
2.5	Induktion der kardialen Ischämie/Reperfusion im <i>Closed-Chest-</i> Modell	27
2.5.1	Ligaturanlage	27
2.5.2	Induktion der kardialen Ischämie/Reperfusion	28
2.6	Chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes („BAT-Ablation“)	29
2.7	Magnetresonanztomographie	30
2.7.1	T2-Relaxometrie	30
2.7.2	Bestimmung des ischämischen Areals im Herzen	31
2.7.3	Analyse funktioneller Herzparameter	31
2.7.4	Messung des Fett- und Wassergehalts in der Tibia	32
2.8	Organentnahme und Gewebepräparation	32
2.9	Gewinnung von Blutplasma	34
2.10	Untersuchung metabolischer Parameter	35
2.10.1	Quantitative Bestimmung von NEFA	35
2.10.2	Quantitative Bestimmung von Glukose	35
2.11	Zellkulturversuch mit BodiPY™ FL C16	36
2.12	Durchflusszytometrie	37

2.12.1	Rotes Knochenmark	38
2.12.2	Kardiales Blut.....	40
2.12.3	Herz	41
2.12.4	Knochenmark (BodiPY™ FL C16-Versuch).....	42
2.13	Histologische Analysen.....	43
2.13.1	Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung.....	45
2.13.2	Gomori-Trichrom-Färbung	46
2.13.3	Mac-2 (Galectin-3)-Färbung	46
2.14	Noradrenalin ELISA.....	47
2.15	Gewinnung von Überständen des Knochenmarkfettgewebes.....	47
2.16	Multiplex Zytokin-Assay	48
2.17	Transmissionselektronenmikroskopie.....	49
2.18	Statistische Analysen.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Auswirkungen von Prädiabetes auf die Morphologie des braunen Fettgewebes ...	50
3.1.1	Einfluss von Prädiabetes auf die Aktivität des braunen Fettgewebes nach kardialer Ischämie/Reperfusion	51
3.1.2	Einfluss von Prädiabetes auf die Morphologie des braunen Fettgewebes im Kontext der kardialen Ischämie/Reperfusion	52
3.2	Auswirkungen von Prädiabetes auf die Funktionalität des braunen Fettgewebes bei kardialer Ischämie/Reperfusion	55
3.3	Einfluss von Prädiabetes auf die kardialen Effekte des braunen Fettgewebes nach kardialer Ischämie/Reperfusion	56
3.3.1	Ischämisches Areal.....	56
3.3.2	Herzfunktion.....	57
3.3.3	Kardiale Inflammation	58
3.3.4	Narbengröße und linksventrikuläre Wanddicke	60
3.4	Einfluss des braunen Fettgewebes auf das Knochenmark nach kardialer Ischämie/Reperfusion.....	61
3.4.1	Das Immun- und Stammzellreservoir im roten Knochenmark	61
3.4.2	Sekretionsprofil des roten Knochenmarks	65
3.4.3	Glukosespiegel im roten Knochenmark	66
3.5	Auswirkungen der Ablation von braunem Fettgewebe auf die systemische Inflammation bei kardialer Ischämie/Reperfusion	67
3.6	Interorgan-Kommunikation von braunem Fettgewebe und Knochenmarkfett	68
3.6.1	Lokoregionale Veränderungen im Knochenmark	68
3.6.2	Analyse des relativen Fett- und Wasseranteils im Knochenmark.....	69
3.6.3	Sekretionsprofil des Knochenmarkfetts	72
3.6.4	Lipidtransfer aus Knochenmarksadipozyten auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen.....	75
3.6.5	Extrazelluläre Vesikel im Knochenmarkfett.....	76
4	Diskussion	78

4.1	Verwendetes Prädiabetes-Modell.....	78
4.2	Der Einfluss von Prädiabetes auf die Morphologie brauner Adipozyten.....	79
4.2.1	Prädiabetesbedingte Beeinträchtigung des braunen Fettgewebes und ihr Einfluss auf dessen Aktivierung und metabolische Anpassung an eine kardiale Ischämie/Reperfusion.....	80
4.2.2	Beeinträchtigung der kardioprotektiven Wirkung des braunen Fettgewebes durch Prädiabetes nach kardialer Ischämie/Reperfusion	83
4.2.3	Prädiabetes-induzierte Veränderung der antiinflammatorischen Funktion von braunem Fettgewebe nach kardialer Ischämie/Reperfusion	85
4.2.4	Effekte des braunen Fettgewebes auf das Knochenmarkfett im Kontext der kardialen Ischämie/Reperfusion unter nicht-prädiabetischen Bedingungen.....	88
4.3	Limitationen und Ausblick	94
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	98
7	Appendix.....	99
8	Abbildungsverzeichnis.....	103
9	Tabellenverzeichnis.....	106
10	Literaturverzeichnis	107
11	Originalarbeiten	117
12	Konferenzbeiträge	118
13	Lebenslauf	119
14	Danksagung	120
15	Eidesstattliche Erklärung	121

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AOC	Fläche der Kurve, <i>area of the curve</i>
ATGL	Adipozyten-Triglyzerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
bAT	Beiges Fettgewebe, <i>beige adipose tissue</i>
BAT	Braunes Fettgewebe, <i>brown adipose tissue</i>
BMAd	Knochenmarkadipozyt, <i>bone marrow adipocyte</i>
BMAT	Knochenmarkfettgewebe, <i>bone marrow adipose tissue</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungscluster, <i>Cluster of Differentiation</i>
C/EBP α	CCAAT/Enhancer-bindendes Protein alpha, <i>CCAAT/enhancer-binding protein-alpha</i>
C/EBP β	CCAAT/Enhancer-bindendes Protein beta, <i>CCAAT/enhancer-binding protein-beta</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand, <i>C-C motif chemokine ligand</i>
CMP	Myeloide Vorläuferzellen, <i>common macrophage progenitors</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor, <i>colony stimulating factor</i>
CTBP1/2	C-terminales Bindungsprotein 1/2, <i>C-Terminal Binding Protein 1/2</i>
CXCL	C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
db/db	<i>Diabetic/diabetic</i> , genetisches Mausmodell für Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus
DG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerin-O-Acyltransferasen
EDV	End-diastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
Eotaxin	Eosinophile-chemotaktisches Chemokin, <i>eosinophil chemotactic chemokines</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESV	Endsystolisches Volumen
EV	Extrazelluläre Vesikel
FA	Freie Fettsäure, <i>fatty acid</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, <i>Fluorescence-Activated Cell Analysis</i> Durchflusszytometrie,
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FFA	Freie Fettsäuren, <i>free fatty acids</i>
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT4	Glukosetransporter 4
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	Granulozyten und Makrophagen-Vorläuferzellen, <i>granulocyte and macrophage progenitors</i>
GPAT	Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase
h	Stunden, <i>hours</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase, <i>Horseradish Peroxidase</i>
HSL	Hormon-sensitive Lipase
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, <i>hematopoietic stem and progenitor cells</i>
IL	Interleukin

ILV	Intraluminale Vesikel
INF	Interferon
I/R	Ischämie/Reperfusion
KC	Keratinozyten-anlockender Chemokin-Faktor/CXCL1, <i>Keratinocyte Chemoattractant</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knock-out</i> ; gezielte Ausschaltung eines Gens
LAL	Lysosomale saure Lipase
LANE	Landesamtes für Verbraucherschutz und Ernährung
LGE	Späte Gadolinium-Anreicherung, <i>Late-gadolium-enhancement</i>
LP	Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LSK	Lin- (Linien-negativ, <i>lineage-negative</i>) Sca-1 ⁺ (Stammzellantigen-1 positiv, <i>Stem cell antigen-1 positive</i>) Kit ⁺ (CD117 positiv)
LT	Langzeit, <i>long term</i>
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein 1, <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEP	Megakaryozyten und Erythrozyten-Vorläuferzellen, <i>megakaryocyte and erythrocyte progenitors</i>
MG	Monoacylglycerin
MGL	Monoacylglycerin-Lipase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>major histocompatibility complex</i>
MI	Myokardinfarkt
MIP-1 α	Makrophagen-inflammatorisches Protein-1alpha, <i>macrophage inflammatory protein-1alpha</i>
MIP-1 β	Makrophagen-inflammatorisches Protein-1beta, <i>macrophage inflammatory protein-1beta</i>
MPP	Multipotente Progenitorzellen
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier, <i>mammalian target of rapamycin</i>
min	Minuten
miRNA	Mikro-RNA
Myf5	Myogener Faktor 5, <i>myogenic factor 5</i>
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
MVB	Multivesikuläre Körper, <i>multivesicular bodies</i>
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NEFA	Nicht-veresterte Fettsäuren, <i>non-esterified fatty acids</i>
ob/ob	Obese/obese (genetisches Mausmodell für Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus)
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie
PDFF	Protonendichte-Fettfraktion, <i>proton density fat fraction</i>
PDWF	Protonendichte-Wasserfraktion, <i>proton density water fraction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
p.o.	Peroral
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma, <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>
PRDM16	PR-Domäne-haltiges Protein 16, <i>PR domain containing 16</i>
RANKL	Rezeptoraktivator des nukleären Faktors-kappa B-Ligand <i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RANTES	Von regulierten und normalen T-Zellen exprimiertes und sezerniertes Protein, <i>Regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
rKM	Rotes Knochenmark
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-assoziierter Transkriptionsfaktor 2, <i>Runt-related transcription factor 2</i>
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SNS	Sympathisches Nervensystem
ST	Kurzzeit, <i>short term</i>
T2DM	Diabetes Mellitus Typ 2
TCA	Citratzyklus, Tricarbonsäurezyklus, <i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TG	Triglyzeride
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β , <i>Transforming growth factor β</i>
UCP1	Entkopplungsprotein 1, <i>uncoupling protein 1</i>
Vol.-%	Volumenprozent
WAT	Weißes Fettgewebe, <i>white adipose tissue</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, <i>World Health Organization</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μL	Mikroliter
μm^2	Quadratmikrometer

1 Einleitung

1.1 Fettgewebe

1.1.1 Merkmale und Unterschiede verschiedener Fettgewebstypen

Fettgewebe ist das größte Organ des Körpers und besteht zu 99% aus Adipozyten [1]. Es wird zunehmend als zentrales Bindeglied zwischen kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes Mellitus, Insulinresistenz, Entzündungen und weiteren Erkrankungen, die mit Übergewicht in Verbindung stehen, betrachtet [2]. In der Literatur werden primär drei Fettgewebe unterschieden: das weiße Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) und das beige Fettgewebe (*beige adipose tissue*, bAT). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Mitochondriengehalts, ihres Entwicklungsursprung sowie ihrer thermogenen Genexpression [3].

Die unterschiedlichen Morphologien der drei Fettgewebe sind nachfolgend in Abbildung 1 dargestellt.

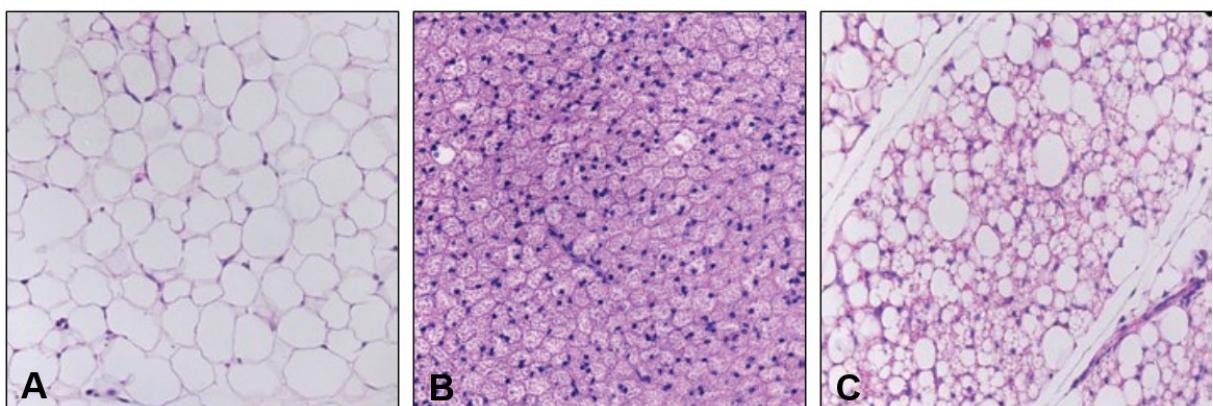


Abbildung 1: Schematische Darstellung von weißem, beigem und braunem Fettgewebe.

A. Weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), **B.** Braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT), **C.** Beiges Fettgewebe (*beige adipose tissue*, bAT). Abbildung übernommen und modifiziert mit Genehmigung von Springer Nature aus: Wang W, Seale P, Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):691–702. DOI: 10.1038/nrm.2016.96. [4]; Ausschnitte aus einer mehrteiligen Originalabbildung dargestellt.

Weiße Adipozyten zeichnen sich durch eine unilokuläre Morphologie aus, das heißt, sie enthalten einen einzigen großen zytoplasmatischen Fetttropfen, in dem Energie in Form von Triglyceriden gespeichert wird [5]. Bei erhöhtem Energiebedarf, beispielsweise infolge gesteigerter körperlicher Aktivität oder Nahrungskarenz, werden die gespeicherten Triglyceride mobilisiert und als freie Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) für den Energiestoffwechsel bereitgestellt [6, 7]. Darüber hinaus beeinflusst WAT über die Sekretion endokriner und parakriner Faktoren maßgeblich die Energiehomöostase im Organismus [8]. Der Mitochondriengehalt weißer Adipozyten ist gering [9].

Basierend auf seiner anatomischen Lokalisation im Körper wird WAT in subkutanes und viszerales Fettgewebe unterteilt. Das subkutane WAT liegt direkt unter der Haut und dient primär als thermische Isolierschicht, um den Körper vor Wärmeverlust zu schützen. Das viszerale WAT hingegen umgibt die inneren Organe und übernimmt eine mechanische Schutzfunktion gegenüber äußeren Einflüssen (s. Abbildung 2) [8]. Weiße Adipozyten gehen aus mesenchymalen Stammzellen (MSZ) hervor, bei denen es sich um multipotente Vorläuferzellen handelt [9, 10].

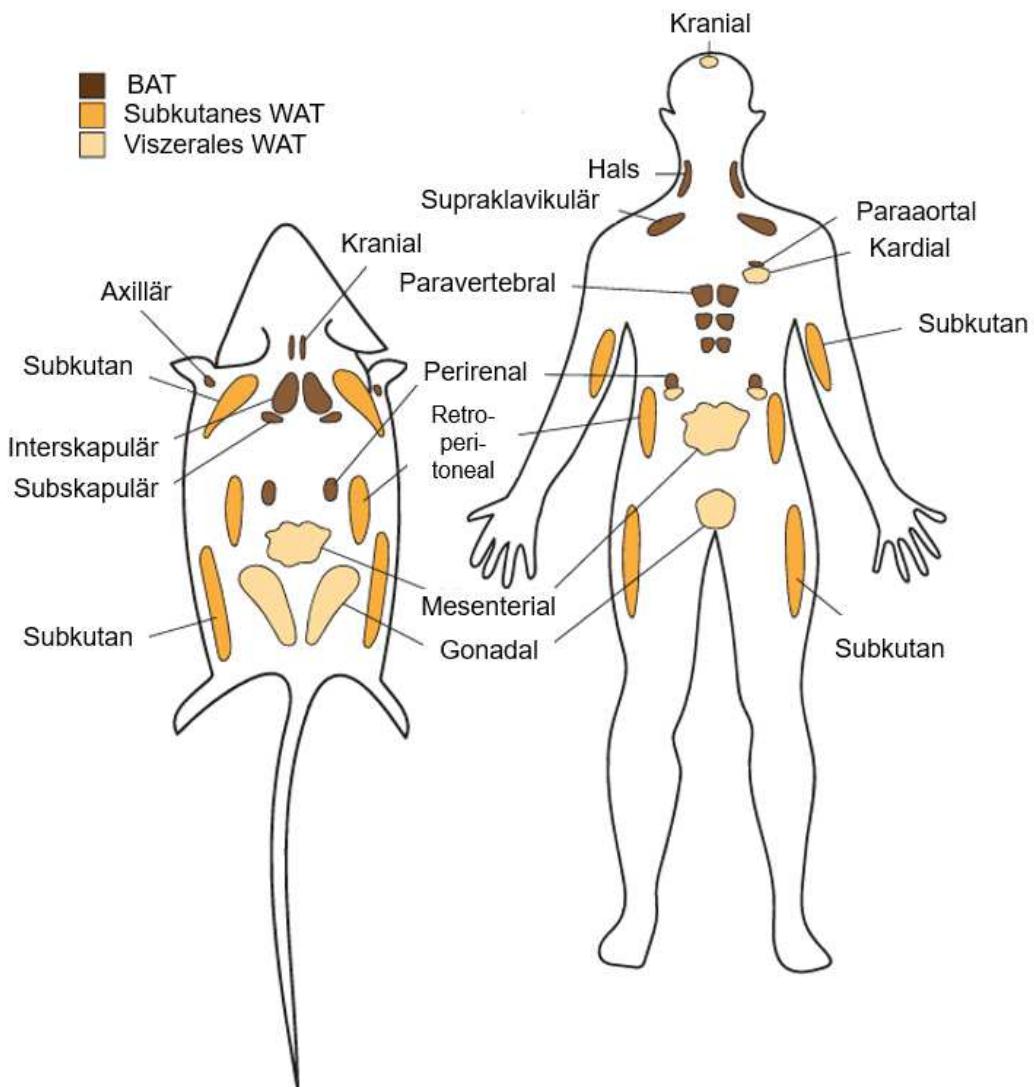


Abbildung 2: Anatomische Lokalisation von braunem Fettgewebe (BAT) und subkutanem und viszeralem weißem Fettgewebe (WAT) in Maus und Mensch.

Abbildung modifiziert nach Pollard & Carling, Thermogenic adipocytes: lineage, function and therapeutic potential. *Biochem J.* 2020 Jun 12;477(11):2071-2093. DOI: 10.1042/BCJ20200298 [8]. Die englischsprachige Originalbeschriftung wurde durch deutsche Begriffe überschrieben.

Braune Adipozyten zeichnen sich durch eine multilokuläre Morphologie aus, das heißt, sie enthalten mehreren Lipidtröpfchen in ihrem Zellinneren. Sie sind reich an Mitochondrien, die ihnen ihr charakteristisches bräunliches Erscheinungsbild verliehen (s. Abbildung 1) [5]. Eine

zentrale Rolle für die Hauptfunktion des BAT, die „zitterfreie Thermogenese“, spielt das Entkopplungsprotein 1 (*Uncoupling protein 1*, UCP1), das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. UCP1 entkoppelt den durch die Atmungskette erzeugten mitochondrialen Protonengradienten von der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese, sodass die gewonnene Energie nicht in Form von ATP, sondern als Wärme freigesetzt wird. Die zitterfreie Thermogenese ermöglicht dem BAT, aktiv zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur beizutragen [11]. Neben seiner Funktion in der Wärmehomöostase wirkt BAT als endokrines und parakrines Organ, indem es so genannte Batokine freisetzt. Diese Botenstoffe entfalten vielfältige systemische Effekte auf das Herz, das WAT, die Muskulatur und die Leber [12].

Lange Zeit wurde angenommen, dass BAT ausschließlich bei kleinen Säugetieren und Neugeborenen vorkommt. Erst durch den Einsatz von Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie (PET-CT) unter Verwendung des *Tracers* 18F-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose konnte nachgewiesen werden, dass auch beim erwachsenen Menschen funktionelles BAT existiert, das insbesondere durch Kälteexposition aktiviert wird [13].

Beim erwachsenen Menschen ist BAT unter anderem in supraklavikulären, zervikalen, kranialen, perirenalen und paravertebralen Regionen lokalisiert [14]. Im Gegensatz dazu befinden sich die größten BAT-Depots bei Neugeborenen primär im zervikalen und interskapulären Bereich (s. Abbildung 2) [8]. Diese Verteilung ist physiologisch bedeutsam, da Neugeborene aufgrund ihres höheren Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpervolumen sowie ihrer fehlenden Fähigkeit zu zittern besonders kälteempfindlich sind [15].

Die Prävalenz von BAT nimmt mit zunehmendem Alter ab und ist bei Frauen höher als bei Männern [16]. Zudem zeigt sich eine hohe interindividuelle Variabilität des BAT-Volumens, das beim Erwachsenen etwa 7 % des gesamten Körperfetts ausmacht [17].

Im Gegensatz zu WAT ist BAT myogenen Entwicklungsursprungs. Braune Adipozyten entstehen aus *myogenic factor 5 gene* (Myf5)-positiven Vorläuferzellen, die sich unter dem Einfluss mehrerer Transkriptionsfaktoren, darunter *PR domain containing 16* (PRDM16), *C-Terminal Binding Protein 1/2* (CTBP1/2) und *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ), differenzieren [18, 19].

Das beige Fettgewebe (bAT) stellt eine intermediäre Form zwischen WAT und BAT dar, da es Merkmale beider Fettgewebe aufweist. Beige Adipozyten entstehen innerhalb des WAT, ähneln jedoch in ihrer Morphologie den braunen Adipozyten. Genauso wie braune Adipozyten sind auch beige Adipozyten multilokulär und enthalten mehrere kleine Fetttropfen in ihrem Zytoplasma. Sie weisen eine relativ hohe Anzahl an Mitochondrien auf (s. Abbildung 1), die mit dem BAT-spezifischen UCP1 ausgestattet sind, was bAT die Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese verleiht [4]. Beige Adipozyten stellen im Gegensatz zu braunen Adipozyten

eine induzierbare Form thermogener Zellen dar, da sie nur infolge externer Stimuli wie chronischer Kälteexposition, körperlicher Aktivität oder die Behandlung mit β_3 -Rezeptoragonisten aus weißen Adipozyten entstehen. Dieser Prozess wird als „*Browning*“ bezeichnet [14]. Zusätzlich üben sie parakrine und endokrine Funktionen im Körper aus [20]. Im Unterschied zu braunen Adipozyten, die aus myogenen Vorläuferzellen hervorgehen, entstehen beige Adipozyten, ähnlich wie weiße Adipozyten, aus MSZ.

Eine detaillierte Übersicht über die wichtigsten Charakteristika der beschriebenen Fettgewebe ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Merkmale von weißem, braunem und beigem Fettgewebe. Abkürzungen: (-) = das Merkmal ist nicht ausgeprägt. (+) = das Merkmal ist ausgeprägt, (++) = das Merkmal ist stark ausgeprägt, WAT = weißes Fettgewebe, BAT = braunes Fettgewebe, bAT = beiges Fettgewebe. Angelehnt an [9, 10, 21].

Eigenschaft	WAT	BAT	bAT
Morphologie	Uniloculär	Multiloculär	Multiloculär
Lokalisierung	Subkutan (85 %); viszeral (10 %)	Intraskapulär, zervikal, axillär, paraaortal, supraklavicular, paravertebral	Induzierbar im WAT („ <i>Browning</i> “)
Ursprung	Mesenchymal	Myogen	Mesenchymal
Mitochondrien	+	+++	+++
UCP1-Expression	-	+++ (konstitutiv)	+++ (induzierbar)
Funktion	Speicherung und Mobilisierung von Fettsäuren, endokrines Organ	Zitterfreie Thermogenese, endokrines Organ	Zitterfreie Thermogenese (nach Induktion), endokrines Organ

1.1.2 Braunes Fettgewebe: Metabolische Funktion und kardioprotektive Wirkung

Aufgrund seiner Fähigkeit zur zitterfreien Thermogenese gilt BAT als bedeutender Regulator der Glukose- und Lipid-Homöostase [16, 22, 23].

BAT ist durch das sympathische Nervensystem (SNS) innerviert [24]. Externe Reize wie Kälteexposition aktivieren das zentrale Nervensystem, das wiederum über das SNS zur Stimulation des BAT führt und damit die Thermogenese einleitet [25, 26]. Die Aktivierung des SNS geht mit einer Freisetzung von Noradrenalin einher, das an β_3 -adrenerge Rezeptoren auf

braunen Adipozyten bindet und eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Durch die Aktivierung der Adenylatzyklase steigt die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die PKA phosphoryliert Lipasen und induziert die Lipolyse, bei der Triglyzeride in freie Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) und Glycerol gespalten werden [27, 28]. Die freigesetzten FFA dienen dem BAT sowohl als Aktivatoren des thermogenen UCP1 [27, 29] als auch als energetisches Substrat für die Wärmeproduktion. Im Rahmen der β -Oxidation werden FFA zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) abgebaut. Acetyl-CoA wird im Citratzyklus verstoffwechselt, wobei die Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FADH_2) entstehen. Diese Reduktionsäquivalente dienen als Elektronendonatoren in der mitochondrialen Atmungskette und ermöglichen die zelluläre Wärmeproduktion [25, 28, 30].

UCP1 entkoppelt die Atmungskette und ATP-Synthese voneinander [31]. Im Rahmen der Atmungskette wird durch den aktiven Elektronentransport ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut, indem kontinuierlich Protonen (H^+) aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Normalerweise sorgt der Rückstrom dieser H^+ durch die ATP-Synthase in die Mitochondrienmatrix dafür, dass die ATP-Synthase aus Adenosindiphosphat und Phosphat ATP bildet [28]. UCP1 leitet die H^+ jedoch durch seine eigenen Kanäle zurück in die Mitochondrienmatrix, so dass diese nicht die ATP-Synthase passieren und folglich kein ATP erzeugt wird. Die durch die Atmungskette erzeugte Energie wird stattdessen in Form von Wärme freigesetzt [32].

Die Verwertung von Fettsäuren im Rahmen der Thermogenese stimuliert die Glukoseaufnahme über die Glukosetransporter 1 und 4 (GLUT1/GLUT4), um die Energiespeicher kontinuierlich aufzufüllen. Die aufgenommene Glukose wird hauptsächlich der Glykolyse zugeführt und anschließend in Form von Acetyl-CoA für die *de novo* Synthese freier Fettsäuren verwendet. Weiterhin kann die aufgenommene Glukose auch als Glykogen gespeichert werden. Zusätzlich werden zirkulierende Fettsäuren über den Differenzierungscluster 36 (CD36)-Transporter aufgenommen und ebenfalls für die Thermogenese genutzt [25].

Die beschriebenen Stoffwechsel- und Signalwege in braunen Adipozyten sind nachfolgend in Abbildung 3 dargestellt.

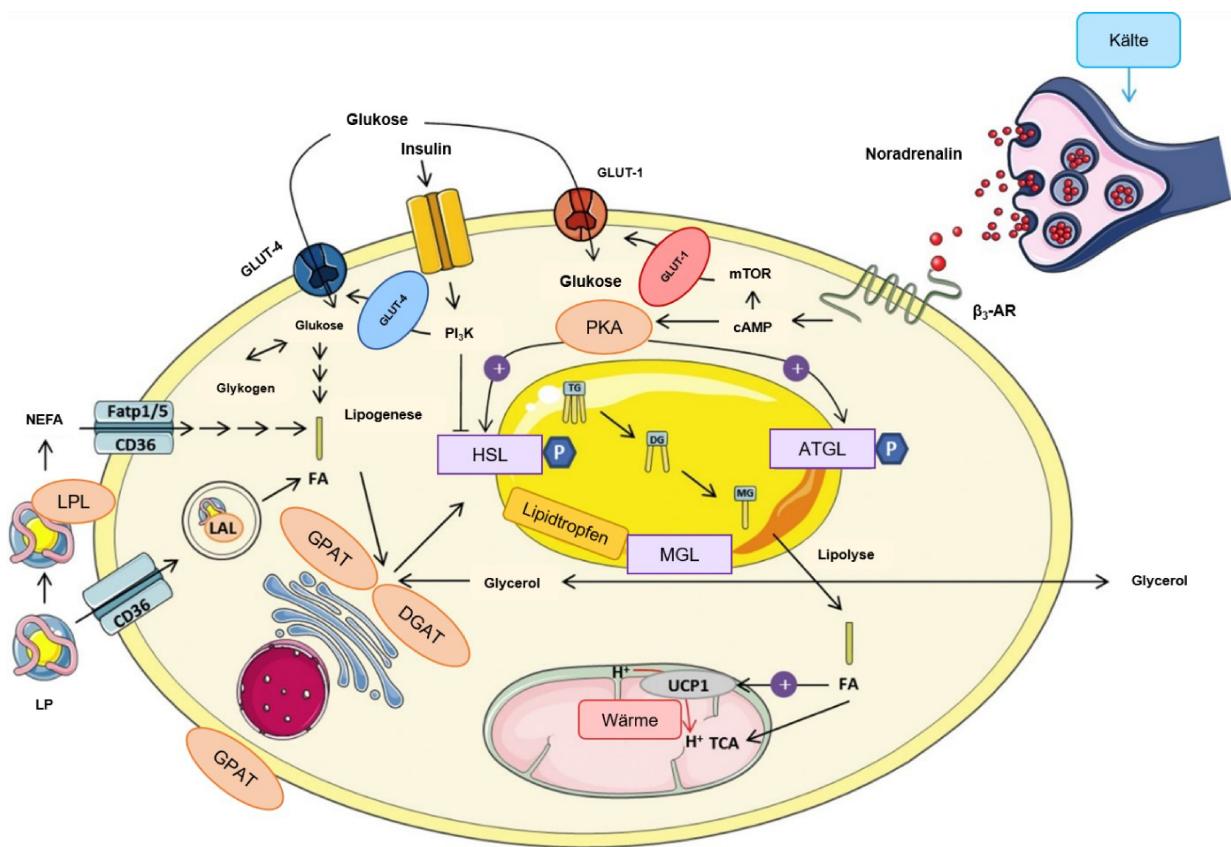


Abbildung 3: Wichtige Stoffwechsel- und Signalwege in braunen Adipozyten im Hinblick auf die Fettsäure- und Glukoseverwertung.

Als Reaktion auf Kälteexposition wird das sympathische Nervensystem aktiviert. Dieses reagiert mit der Freisetzung von Noradrenalin, das β_3 -Adrenorezeptoren auf braunen Adipozyten aktiviert. Die Aktivierung führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zirkularem Adenosinmonophosphat (cAMP), was die Glukosetransporter 1 (mTOR)-Signalweg initiiert. Zusätzlich sorgt die erhöhte cAMP-Konzentration für eine Aktivierung der Phosphokinase A (PKA), welche die Lipolyse intrazellulärer Triglyzeride induziert. Die Triglyzeride werden durch die Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (ATGL) zu Diglyceriden hydrolysiert, anschließend durch die hormonempfindliche Lipase (HSL) zu Monoacylglyceriden und schließlich durch die Monoacylglycerinlipase (MGL) zu Glycerin und einer Fettsäure (FA) gespalten. Die FA wird der mitochondriale β -Oxidation unterzogen und das entstehende Acetyl-CoA in den Citratzyklus (Tricarbonsäurezyklus, TCA) eingeschleust. Die aus diesen Prozessen hervorgehende Energie wird von UCP1 zur Wärmeerzeugung genutzt. Die entleerten Energiespeicher der braunen Adipozyten werden durch die *de-novo*-Lipogenese und Glykogensynthese aufgefüllt. Hierfür werden zirkulierende Fettsäuren über CD36 sowie Glukose über die Transporter GLUT1 und GLUT4 in braune Adipozyten aufgenommen. Nach dem Zellimport wird die Glukose entweder in Form von Glykogen gespeichert oder über Acetyl-CoA in FA umgewandelt. Die FA werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) unter Beteiligung von Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase (GPAT) und Diacylglycerin-O-Acyltransferasen (DGAT) zu Triglyzeriden verestert. Abkürzungen: β_3 -AR = β_3 -adrenerger Rezeptor, ATGL = Adipozyten-Triglyzerid-Lipase, cAMP = zirkuläres Adenosinmonophosphat, CD36 = Cluster of Differentiation 36, DGAT = Diacylglycerol-O-Acyltransferase, DG = Diacylglycerol, FA = fatty acid = freie Fettsäure, GPAT = Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase, GLUT1 = Glukose Transporter 1, GLUT4 = Glukose Transporter 4, HSL = Hormon-sensitive Lipase, LAL = Lysosomale saure Lipase, LP = Lipoprotein, LPL = Lipoproteinlipase, MG = Monoacylglycerin, MGL = Monoacylglycerin-Lipase, mTOR = mammalian target of rapamycin, NEFA = nicht-veresterte Fettsäuren, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen, PKA = Proteinkinase A, TG = Triglyzeride, TCA = Tricarbonsäurezyklus/Zitratzyklus, UCP1 = Uncoupling protein 1/Entkopplungsprotein 1. Abbildung übernommen und modifiziert mit Genehmigung von Elsevier aus: Steensels S, Ersoy BA, Fatty acid activation in thermogenic adipose tissue. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(1):79–90. DOI: [10.1016/j.bbalip.2018.07.007] [25]. Die englischsprachige Originalbeschriftung wurde durch deutsche Begriffe überschrieben.

Die Verwertung zirkulierender Lipide und Glukose sowie endogener Triglyzeride durch aktiviertes BAT kann dazu beitragen, den Blutzuckerspiegel und die Konzentration freier Fettsäuren zu senken. Darüber hinaus verbessert aktiviertes BAT die Insulinsensitivität durch den vermehrten Einbau von Insulin-abhängigen GLUT4-Transportern in die Zellmembranen brauner Adipozyten und kann so einer Insulinresistenz vorbeugen [33]. Im Einklang damit zeigen Mäuse, die einen UCP1-*Knock Out* (KO) besitzen, einen adipösen und diabetischen Phänotypen [34]. Murine Modelle zeigen darüber hinaus, dass eine gesteigerte Thermogenese im BAT mit einer erhöhten Fettsäureoxidation in der Skelettmuskulatur einhergeht [20, 35, 36]. Eine Studie von Becher *et al.* auf dem Jahr 2021 beschreibt, dass Personen mit aktivem BAT eine geringere Prävalenz für Diabetes Mellitus Typ 2 (T2DM), Dyslipidämie, koronare Herzkrankheit, Hypertonie, Herzinsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen haben [16].

Aktives BAT wirkt sich jedoch nicht nur vorteilhaft auf den Gesamtkörpermetabolismus aus, sondern wurde in den vergangenen Jahren zusätzlich als kardioprotektiv identifiziert [37, 38].

Mehrere Studien beschreiben, dass BAT nach einem MI aktiviert wird [39-42]. In einer Studie aus dem Jahr 2023 wurde nachgewiesen, dass sowohl ein Mangel an UCP1 als auch eine Defizienz des Batokins BMP3b zu einer Vergrößerung des myokardialen Infarktareals bei Mäusen führt. In derselben Studie bewirkte zudem die Transplantation von funktionstüchtigem BAT in UCP1-defiziente Mäuse eine signifikante Verkleinerung des Infarktareals im Vergleich zu entsprechenden Kontrollmäusen [41]. Lin *et al.* zeigten, dass die gezielte Deletion von β_3 -Rezeptoren auf braunen Adipozyten eine verstärkte Freisetzung von Exosomen mit induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase bewirkt, was zu einer Zunahme der durch Angiotensin II induzierten kardialen Hypertrophie und Fibrose führt [43]. Ruan *et al.* fanden heraus, dass der gezielte KO von Adenosin A2A-Rezeptoren (A_{2A}R) auf braunen Adipozyten hypertensiver Mäuse eine Dysfunktion des BAT verursacht und infolgedessen die BAT-vermittelte Sekretion von *Fibroblast growth factor 21* (FGF-21) reduziert. Dies beschleunigt die Ausprägung des durch Hypertonie induzierten kardialen *Remodelings* [44]. Eine weitere Publikation beschreibt zudem, dass dysfunktionales BAT mit einem veränderten Cholinstoffwechsel assoziiert ist, der die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigen kann [45].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BAT sich sowohl positiv auf den Metabolismus als auch auf die kardiovaskuläre Gesundheit auswirkt. Die Aktivierung des BAT stellt daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Verbesserung der Stoffwechselleistung bei Patienten mit Adipositas und T2DM dar und kann die Herzfunktion positiv beeinflussen [23].

1.1.3 Merkmale des Knochenmarkfett

Knochenmarkfett (*bone marrow adipose tissue*, BMAT) ist ein eigenständiges Fettgewebe, das erst in jüngerer Zeit intensiver beleuchtet wurde. Obwohl seine Existenz bereits 1883 beschrieben wurde [46], stand es lange Zeit nur wenig im Fokus der wissenschaftlichen Forschung [1]. Erst in den vergangenen Jahren ist eine deutliche Zunahme wissenschaftlicher Publikationen zum BMAT zu verzeichnen [47]. Während BMAT lange Zeit vor allem als passiver Raumfüller des Knochenmarks galt [48, 49], gilt BMAT mittlerweile als dynamisches Fettgewebe mit einem eigenen Entwicklungsursprung sowie molekularen und funktionellen Eigenschaften, die es eindeutig vom extramedullären WAT, BAT und bAT unterscheiden [1, 50, 51].

Der Begriff „Knochenmarkfett“ bezeichnet die im Knochenmark lokalisierten Adipozyten, die beim jungen Erwachsenen etwa 15 % des Knochenmarkvolumens ausmachen. Bis zum Alter von 65 Jahren kann dieser Anteil auf bis zu 60 % ansteigen [52]. Bezogen auf das Gesamtkörperfett gesunder Erwachsener kann BMAT mehr als 10 % ausmachen [50].

Knochenmarkadipozyten (*bone marrow adipocytes*, BMAds) gehen aus MSZ hervor, die sich in Abhängigkeit unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren entweder zu BMAds oder zu Osteoblasten differenzieren. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung zu BMAds sind unter anderem *CCAAT/Enhancer-Binding-Protein α* (c/EBP α) und PPAR- γ , während für die Differenzierung zu Osteoblasten *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) und Osterix entscheidend sind [1, 9].

Bei der Geburt besteht das Knochenmark noch hauptsächlich aus hämatopoetischen Zellen und erscheint aufgrund der erythroiden Zellen rot [53]. Mit fortschreitendem Alter steigt die Expression verschiedener altersbedingter Immunfaktoren wie IL-1 α , IL-6, *Transforming growth factor β* (TGF- β), *C-X-C Motif Chemokine Ligand* (CXCL) 2 (CXCL2), CXCL5 und *Receptor Activator of NF-κB Ligand* (RANKL) in der Knochenmarksnische. Diese Immunfaktoren führen zu einer gesteigerten Expression der adipogenen Transkriptionsfaktoren c/EBP α und PPAR- γ , was in der Differenzierung von MSZ zu BMAds resultiert [9, 54]. Die zunehmende Einlagerung von BMAds verdrängt hämatopoetische Zellen im Knochenmark, wodurch dieses makroskopisch zunehmend gelb erscheint. Da ein einzelner BMAd bis zu 30 kernhaltige hämatopoetische Zellen innerhalb des Knochenmarks verdrängen kann [55], besteht eine positive Korrelation zwischen fortschreitendem Alter und der Akkumulation von BMAT. Dieser Zusammenhang wurde durch *in-vivo*-Untersuchungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) bestätigt [56, 57].

Präadipozyten im Knochenmark können sich in zwei Subtypen von BMAds differenzieren (s. Abbildung 4), wodurch BMAT eine einzigartige Charakteristik unter den verschiedenen Fettgeweben besitzt. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihren molekularen und

physiologischen Eigenschaften voneinander [50]. Eine der beiden Untergruppen befindet sich in einer perivaskulären Nische, die verschiedene Zellpopulationen wie Osteoblasten, Endothelzellen und perivaskuläre Vorläuferzellen enthält und in das hämatopoetisch aktive Knochenmark, das auch als „rotes Knochenmark“ bezeichnet wird, eingebettet ist [58]. Das rote Knochenmark ist typischerweise in proximalen Regionen des Körpers, darunter der proximalen Tibia, dem Femur, dem Sternum, den Rippen sowie in den Brust- und Lendenwirbeln, lokalisiert [53, 58]. Diese Untergruppe der BMAds weist eine kleinere Adipozytengröße ($\sim 500 \mu\text{m}^2$) auf, besteht überwiegend aus gesättigten Fettsäuren und nimmt bis zu 45 % des Markraums ein [51, 53].

Der zweite Subtyp von BMAds (s. Abbildung 4) befindet sich im distalen Skelett, also in Körperregionen mit geringer hämatopoetischer Aktivität [59, 60]. In diesen Regionen liegen die BMAds dicht gepackt in einer relativ homogenen Nische vor, die kaum Zugang für hämatopoetische und osteogene Zellen bietet, und formen dort ein dichtes BMAT-Depot [58]. BMAds-reiche Knochenabschnitte erscheinen aufgrund der zahlreichen Adipozyten gelb und werden daher auch „gelbes“ Knochenmark genannt [61].

Diese zweite Untergruppe von BMAds zeichnen sich durch eine größere Zellgröße aus ($\sim 1000 \mu\text{m}^2$), bestehen überwiegend aus ungesättigten Fettsäuren und nehmen bis zu 90 % des Markraums ein [51, 53, 59]. Im Gegensatz zu den BMAds im proximalen Skelett, die zusätzlich zu einer großen Lipidvakuole mehrere kleinere Lipidtröpfchen im Zytoplasma erhalten, besitzen die BMAds in distalen Knochenbereichen eine unilokuläre Struktur und ähneln somit morphologisch den weißen Adipozyten [62].

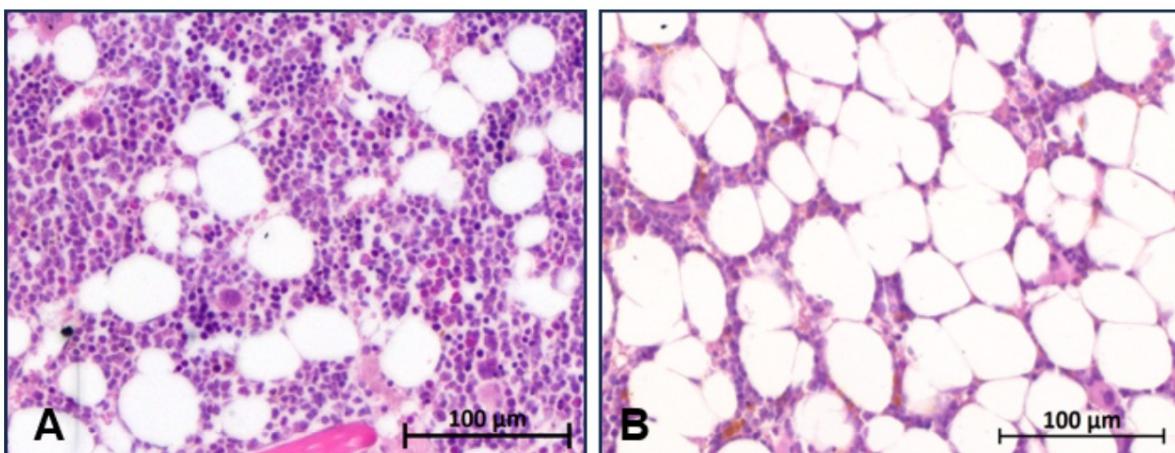


Abbildung 4: Darstellung der Subtypen von Knochenmarkadipozyten (BMAds)

A. BMAds im roten Knochenmark des proximalen Skeletts.

B. BMAds, die das dichte Knochenmarkfettgewebe (bone marrow adipose tissue, BMAT) im distalen Skelett formen. Maßstabsbalken: 100 µm.

BMAds weisen eine höhere Mitochondrianzahl auf als WAT und exprimieren, ähnlich wie BAT, mitochondriale Gene wie PGC-1 α und PRDM16 [55]. Hinsichtlich der Expression von UCP1, dem Schlüsselprotein für die zitterfreie Thermogenese im BAT, besteht bislang kein

wissenschaftlicher Konsens. Während einige Studien eine geringe UCP1-Expression im BMAT postulieren [63, 64], konnten andere Studien keine UCP1-Expression nachweisen [50, 65, 66]. Untersuchungen von Lecka-Czernik *et al.* zufolge ist die UCP1-Expression im BMAT etwa um den Faktor 1×10^5 niedriger als im BAT [55]. Eine relevante thermogene Aktivität konnte in murinen Experimenten bislang nicht beobachtet werden [67].

BMAT ist ein dynamisches Fettgewebe, dessen Volumen durch verschiedene Faktoren moduliert wird. Während Adipositas, ein Östrogendefizit, Glukokortikoide, Thiazolidindione sowie Chemo- und Strahlentherapie zu einer Zunahme von BMAT führen, bewirken Kälteexposition, körperliche Aktivität und die Behandlung mit Metformin eine Reduktion des BMAT [68, 69].

1.1.4 Knochenmarkfett: Funktionelle Bedeutung

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben, wurde BMAT lange Zeit lediglich als Raumfüller des Knochens betrachtet. Inzwischen gilt es jedoch als bedeutender Bestandteil der Mikroumgebung des Knochenmarks, der aktiv an der Knochenhomöostase, der Hämatopoese und dem Energiestoffwechsel beteiligt ist [49, 70].

Im Knochenmark befinden sich BMAds, Osteozyten und hämatopoetische Zellen in engem räumlichem Kontakt [61]. Aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs aus MSZ stehen BMAds und Osteoblasten in einem reziproken Verhältnis zueinander. Zudem sezernieren BMAds Faktoren wie Adiponektin und RANKL, die die Knochenbildung und -reparatur hemmen, gleichzeitig aber die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten fördern und somit die Knochenhomöostase negativ beeinflussen [53, 71, 72]. Eine negative Korrelation zwischen BMAT und der Knochenmasse wurde bereits wissenschaftlich bestätigt [73, 74].

Inwiefern BMAds die Hämatopoese im Knochenmark beeinflussen, ist bislang nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Bereits eine im Jahre 1974 veröffentlichte Studie von Tavassoli *et al.* zeigte bei Kaninchen eine Einschränkung der Hämatopoese nach Entfernung des BMAT [75]. In einer anderen Studie beobachteten Naveiras *et al.* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen hemmenden Effekt von BMAds auf die Hämatopoese. Adipozytenarme Regionen des murinen Knochenmarks wiesen eine höhere Dichte hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) sowie eine gesteigerte hämatopoetische Aktivität auf als adipozytenreiche Areale. Zusätzlich zeigten Mäuse mit einer genetischen Adipozytendefizienz („fettlose“ A-ZIP/F1-Mäuse), die nach Bestrahlung einer Knochenmarkstransplantation unterzogen wurden, eine schnellere hämatopoetische Regeneration im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen. Als mögliche Erklärung wurde die reduzierte Produktion von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und G-CSF diskutiert [76]. In Übereinstimmung damit zeigt

eine weitere Untersuchung, dass BMAd durch die Expression von Neurolipin-1 die Aktivität von GM-SCF reduzieren und dadurch die Granulopoese inhibieren [77].

Andere Studien hingegen beschreiben BMAT als positiven Regulator der Hämatopoese. Mattiucci *et al.* zeigten *in vitro* einen unterstützenden Einfluss von BMAd auf das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen [78]. Zhou *et al.* postulieren, dass BMAd durch die Sekretion von Nischenfaktoren wie *Stem Cell Factor* (SCF) die Regeneration von hämatopoetischen Stammzellen nach Bestrahlung unterstützen. Dieser Effekt scheint jedoch auf die langen Röhrenknochen beschränkt zu sein, da in derselben Studie Adipozyten des murinen Schwanzwirbels die Hämatopoese über eine Hemmung der Angiogenese negativ beeinflussten [79].

Ebenso wie andere Fettgewebe sind auch BMAd dazu in der Lage, durch Lipolyse freie Fettsäuren bereitzustellen wobei deren Freisetzung deutlich geringer ausgeprägt ist als bei weißen Adipozyten [50, 62]. Eine Studie aus dem Jahr 2023 identifizierte BMAT als wichtige lokale Energieressource für die Hämatopoese. Zhang *et al.* zeigten, dass BMAd in der Akutphase nach einem MI Fettsäuren freisetzen, die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) als Substrat für die Fettsäureoxidation dienen und so die Notfallmyelopoese unterstützen [80].

Der Beitrag von BMAd zum Lipidmetabolismus wurde auch in weiteren Studien bestätigt [59, 62]. In einem BMAd-spezifischen Cre-Mausmodell, bei dem die Adipozyten-Triglyzerid-Lipase (ATGL, *Pnpla2*-Gen) ausgeschaltet wurde, zeigte sich eine gestörte Lipolyse der BMAd, die mit einer Hypertrophie und Hyperplasie der BMAd einherging. Während die beeinträchtigte Lipolyse unter basalen Bedingungen nur geringe Auswirkungen hatte, führte sie bei einem durch kalorische Restriktion bedingten Energiemangel zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Myelopoese und trabekulären Knochenmasse [81].

Weiterhin besitzen BMAd sowohl parakrine als auch endokrine Eigenschaften und sezernieren mitunter Botenstoffe wie Adiponektin, Leptin, CXCL1, IL6 und G-CSF [82].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass BMAT ein hochaktives Fettgewebe mit vielfältigen, bislang nicht vollständig verstandenen Funktionen ist. Es spielt eine zentrale Rolle in der Lipid- und Knochenhomöostase, der Hämatopoese sowie in endokrinen Signalwegen und trägt damit wesentlich zur systemischen Homöostase bei.

1.2 Prädiabetes

1.2.1 Pathophysiologie, Risikofaktoren und klinische Relevanz

Prädiabetes, auch als intermediäre Hyperglykämie bezeichnet, stellt einen Hochrisikostatus dar und wird als Vorstufe für die Entwicklung eines Diabetes Mellitus Typ 2 (T2DM) betrachtet [83-85]. Dieser Zustand ist durch Blutzuckerwerte gekennzeichnet, die den Normbereich überschreiten, jedoch noch nicht die diagnostischen Schwellenwerte für Diabetes erreichen [83]. Die Diagnosekriterien für Prädiabetes umfassen einen Nüchternblutzucker zwischen 100 und 125 mg/dL, eine gestörte Glukosetoleranz mit einem Blutzuckerwert von 7,8 bis 11,1 mol/L zwei Stunden nach einer oralen 75 g Glukosebelastung im Rahmen eines oralen Glukosetoleranztests und einen Hämoglobin A1c-Wert von 5,7 % bis 6,4 % [86].

Eine neuere Studie von Wagner *et al.* zeigt jedoch, dass Prädiabetes kein homogenes Krankheitsbild darstellt, sondern sich in sechs pathologisch unterschiedliche Subtypen unterteilen lässt. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrem metabolischen Profil sowie in ihrem individuellen Risiko für die Entwicklung eines T2DM [87].

Etwa 5-10 % der Betroffenen mit Prädiabetes entwickeln pro Jahr einen manifesten Diabetes, während ein vergleichbarer Anteil eine Remission mit Rückkehr zu normoglykämischen Werten zeigt. Die weltweite Prävalenz des Prädiabetes ist steigend und wird bis zum Jahr 2030 auf rund 470 Millionen Menschen geschätzt [83].

Die pathophysiologischen Mechanismen des Prädiabetes sind komplex und ähneln weitgehend denen des T2DM [84]. Eine fortschreitende Insulinresistenz in Kombination mit einer abnehmenden Insulinsekretion durch pankreatische β -Zellen führt zur Entwicklung einer Hyperglykämie und ist mit einer chronischen, niedriggradigen Entzündungsreaktion assoziiert. Weitere charakteristische Veränderungen umfassen eine endotheliale Dysfunktion, eine Zunahme der Arteriensteifheit sowie eine gestörte postprandiale Suppression der Glucagonsekretion durch pankreatische α -Zellen [88-90]. Die Insulinresistenz als pathologisches Hauptmerkmal des Prädiabetes wird aufgrund ihrer schwierigen direkten Nachweisbarkeit häufig erst spät entdeckt, wenn sich bereits eine Hyperglykämie manifestiert hat [91].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung eines Prädiabetes zählen Übergewicht und Adipositas, ein fortgeschrittenes Alter (≥ 45 Jahre), genetische Prädisposition, ungesunde Ernährung, mangelnde körperliche Aktivität sowie die steatotische Lebererkrankung [92]. Die Therapie des Prädiabetes basiert in erster Linie auf Lebensstilmodifikationen, insbesondere auf Gewichtsreduktion und erhöhter körperlicher Aktivität. Zusätzlich kann eine

medikamentöse Therapie mit Metformin zur Prävention von T2DM in Betracht gezogen werden [84].

Ähnlich wie T2DM tritt auch Prädiabetes häufig im Kontext des metabolischen Syndroms auf, das durch die Kombination aus abdomineller Adipositas, Hypertonie, Dyslipidämie und gestörter Glukosetoleranz charakterisiert ist [85, 93]. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2020 mit mehr als 10 Millionen Studienteilnehmern zeigte, dass Prädiabetes mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, koronare Herzkrankheit, Schlaganfällen und einer erhöhten Gesamt mortalität assoziiert ist [94]. Darüber hinaus gilt Prädiabetes aufgrund des gestörten Glukosestoffwechsels als Prädiktor für ein schlechteres *Outcome* nach einem akuten Myokardinfarkt (MI) [95].

1.2.2 Auswirkungen von Prädiabetes auf Fettgewebe

Das Fettgewebe, insbesondere das WAT, spielt im Kontext von Prädiabetes eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Insulinresistenz und systemischer Entzündung. Die gestörte Glukosehomöostase beeinflusst mechanistische Prozesse wie die Morphologie und Funktion der Adipozyten, die Lipidmetabolisierung sowie entzündliche Signalwege. Diese pathophysiologischen Veränderungen lassen sich bereits in frühen Stadien der gestörten Glukosehomöostase beobachten, führen gemeinsam zur Entwicklung einer Insulinresistenz und sind zentrale Mechanismen in der Entstehung des Prädiabetes [91, 96-98].

Übergewicht und Adipositas führen zu einer ausgeprägten Hypertrophie der Adipozyten sowie einer Reduktion der Mitochondrienanzahl, was mit einer gestörten mitochondrialen Biogenese einhergeht. Die daraus resultierende mitochondriale Dysfunktion beeinträchtigt zentrale Prozesse wie die Adipogenese, Lipolyse und oxidative Phosphorylierung und begünstigt so die Entwicklung einer Insulinresistenz im Fettgewebe [91]. Darüber hinaus ist sie mit einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert, die entzündliche Signalwege aktiviert und die Insulinresistenz weiter verstärkt [97].

Infolge der verstärkten Lipolyse im Fettgewebe gelangen freigesetzte FFA über die Zirkulation in periphere Organe wie die Leber und Skelettmuskulatur. Dort bilden sie ektopische Fettdepots, entfalten lipotoxische Effekte und fördern letztlich die Entwicklung einer systemischen Insulinresistenz [91, 97-99].

Ein wesentlicher Treiber der Entzündungsreaktion im Fettgewebe sind aktivierte Makrophagen [91]. Hypertrophierte Adipozyten sezernieren große Mengen des Monozyten-chemoattraktiven Proteins-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1), das die Rekrutierung von Makrophagen vermittelt. Die aktivierte Makrophagen lagern sich um nekrotische Adipozyten an, bilden sogenannte kronenartige Strukturen (*crown-like structures*, CLS) und phagozytieren die absterbenden Adipozyten. Zusätzlich fördern sie die lokale Entzündungsreaktion durch

Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, was wiederum die Insulinresistenz in peripheren Geweben wie Leber und Muskulatur fördert [91, 98, 100, 101].

Neben Makrophagen tragen auch andere Immunzelltypen, insbesondere proinflammatorische T-Lymphozyten, zu der Entstehung und Aufrechterhaltung der entzündlichen Mikroumgebung im Fettgewebe bei. Ihre vermehrte Infiltration und Zytokinfreisetzung stellt einen zusätzlichen pathophysiologischen Mechanismus des Prädiabetes dar [102-104].

Die metabolische Dysregulation führt zu einer Beeinträchtigung der endokrinen Funktion des Fettgewebes [105]. Die Sekretion protektiver Adipokine, insbesondere des insulin-sensitivierenden und entzündungshemmenden Adiponektins ist bei Prädiabetes deutlich reduziert [106-108]. Zudem ist die Leptinsekretion erhöht, verliert jedoch infolge der entstehenden Leptinresistenz ihre regulierende Wirkung auf den Energiestoffwechsel und fördert stattdessen proinflammatorische Prozesse [109, 110]. Parallel dazu werden verstärkt proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-6 freigesetzt, die nicht nur die endokrine Funktion des Fettgewebes weiter beeinträchtigen, sondern auch direkt den Zellstoffwechsel beeinflussen. TNF- α reduziert die Insulinempfindlichkeit der Adipozyten und steigert ihre Lipolyse, während IL-6 zusätzlich die hepatische Triglyzeridsekretion fördert und so zur Entstehung einer Hypertriglyzeridämie beiträgt [105].

Die durch Adipositas induzierte mitochondriale Dysfunktion betrifft auch das BAT und führt dort zu einer reduzierten Thermogenese. Infolge der verminderten mitochondrialen Aktivität kommt es zu einer Lipidakkumulation mit phänotypischer Umwandlung brauner in weiße Adipozyten. Dieser Prozess wird als „Whitening“ bezeichnet wird. Parallel dazu ist im WAT die Umwandlung weißer in metabolisch aktive beige Adipozyten reduziert. Dieser Prozess wiederum nennt sich „Browning“ [111-115].

Experimentelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass braune Adipozyten weniger anfällig für adipositasbedingte Entzündungsprozesse sind als weiße Adipozyten [116].

Während aktives, gesundes BAT mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung eines T2DM assoziiert ist (s. Abschnitt 1.1.2), gehen die durch die Insulinresistenz bedingten morphologischen und funktionellen Veränderungen des BAT mit einem Verlust seiner metabolischen Vorteile einher. Dies kann sowohl die Manifestation eines T2DM als auch eine langfristige Verschlechterung der glykämischen Kontrolle bei Personen mit Prädiabetes begünstigen [117].

1.3 Der Myokardinfarkt

1.3.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste Todesursache dar. Im Jahr 2023 wurden hierzulande 340.619 Sterbefälle (entspricht 33,9 % aller Todesfälle) gemeldet, die auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen sind [118, 119].

Die detailliertere Analyse der Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen (s. Abbildung 5) zeigt, dass die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 74.415 Todesfällen (21,4 %) sowie der akute MI mit 43.839 Todesfällen (12,6 %) die zwei häufigsten kardiovaskulären Todesursachen in Deutschland darstellen [120]. Sowohl der akute MI als auch die chronisch-ischämische Herzkrankheit beruhen auf einer ischämischen Genese, was bedeutet, dass sie infolge einer verminderten oder vollständig unterbrochenen Durchblutung des Herzgewebes (Ischämie) entstehen [121]. Als dritthäufigste kardiovaskuläre Todesursache wurde die Herzinsuffizienz mit 37.645 Todesfällen (10,8 %) registriert [120], welche eine mögliche Folgeerscheinung der chronischen ischämischen Herzkrankung sowie des akuten MI darstellt [122, 123]. Zu den fünf häufigsten kardiovaskulären Todesursachen hierzulande gehören weiterhin die hypertensive Herzkrankheit mit 24.207 Todesfällen (6,9 %) und das Vorhofflimmern/-Vorhofflimmern mit 23.469 Todesfällen (6,7 %) [120]. Beide sind bekannte Risikofaktoren der chronischen ischämischen Herzkrankung und des akuten MI [124-126].

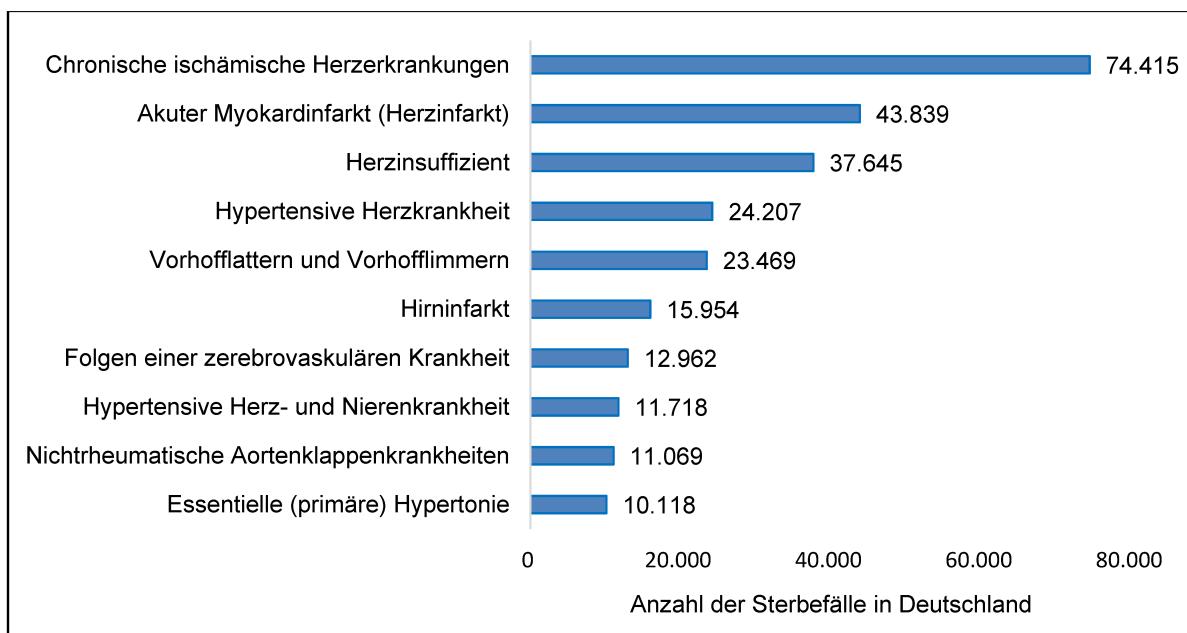


Abbildung 5: Anzahl der Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2023.

Eigene Darstellung basierend auf Daten des Statistischen Bundesamts (Destatis) [120].

1.3.2 Definition, Pathophysiologie und Diagnostik des Myokardinfarkts

Der MI stellt eine Schädigung des Herzmuskels (Myokard) dar, welche durch eine anhaltende Unterversorgung des Gewebes mit Blut und Sauerstoff (Ischämie) verursacht wird. Der Auslöser ist zumeist eine Ruptur atherosklerotischer Plaques im Rahmen der koronaren Herzkrankheit (KHK) [121]. Bei der KHK kommt es durch die Ablagerungen von Lipiden in den Gefäßwänden zu atherosklerotischen Veränderungen der Blutgefäße. Dies führt zur Bildung von Plaques, die im Falle einer Ruptur eine lokale Thrombozytenaktivierung auslösen und die Thrombenbildung initiieren [127]. Der gebildete Thrombus führt zu einer teilweisen oder vollständigen Okklusion eines Blutgefäßes und erzeugt so eine Ischämie im entsprechenden Gewebe. Je nach Lokalisation des Thrombus manifestiert dieser sich im klinischen Erscheinungsbild einer Lungenembolie, einer tiefen Beinvenenthrombose, eines Apoplex (Hirninfarkt) oder eines MI [128].

Die Symptome eines MI sind klassischerweise Brustschmerzen und Dyspnoe, können sich aber auch als Schmerzen der oberen Extremitäten, des Kiefers oder des Epigastriums sowie in Form von Müdigkeit und Herzklopfen äußern [121]. 20-30 % aller Myokardinfarkte verlaufen symptomlos [129]. Erhöhte Werte des kardialen Troponins (cTn) im Serum fungieren als obligatorischer Goldstandard für die Diagnose des MI. Veränderungen des cTn in Kombination mit klinischen Symptomen und einem Elektrokardiogramm (EKG) können bereits in der Frühphase eines MI die Diagnose ermöglichen [130]. cTn ist Bestandteil des kontraktilen Apparates der Kardiomyozyten und wird bei ihrer Zerstörung im Rahmen des MI in den Blutkreislauf freigesetzt. Da dessen Untereinheit Troponin I (cTnI) ausschließlich im Myokard vorkommt, während die Untereinheit kardiales Troponin T (cTnT) zusätzlich auch in der Skelettmuskulatur präsent ist, ist cTnI der spezifischere Biomarker für die Diagnosestellung des MI [121, 130].

In Abhängigkeit davon, ob im EKG eine charakteristische ST-Hebung erkennbar ist, wird zwischen einem ST-Hebungsinfarkt (*ST elevation myocardial infarction*, STEMI) und einem Nicht-ST-Hebungsinfarkt (*non-ST elevation myocardial infarction*, NSTEMI) unterschieden. Sichtbare ST-Hebungen weisen auf eine vollständige oder fast vollständige Okklusion einer Koronararterie hin, während ihr Fehlen zumeist prädiktiv für einen teilweisen Verschluss einer Koronararterie ist. Bei ca. 25 % der Patienten mit NSTEMI wird jedoch ebenfalls eine vollständige Blockade eines Herzkranzgefäßes beobachtet [131].

Neben der Bestimmung kardialer Troponine (cTn), der EKG-Aufzeichnung und klinischen Symptomatik spielt die Bildgebung eine zentrale Rolle in der Diagnostik des MI, da sie die Identifizierung von Thromben und Abnormalitäten der Herzwandbewegung mittels Bildgebung ermöglicht [121]. Auf Basis dieser diagnostischen Parameter erfolgt die klinische Einteilung des MI in fünf verschiedene Subtypen. Ein Typ 1 MI (akuter MI) wird durch die Ruptur oder

Erosion einer atherosklerotischen Plaque hervorgerufen. Ein Typ 2 MI entsteht aufgrund einer Dysbalance zwischen dem Sauerstoffangebot und -bedarf des Myokards, ausgelöst durch einen akuten Stressor wie eine gastrointestinale Blutung mit Hämoglobinabfall oder eine anhaltende Tachyarrhythmie. Ein Typ 3 MI wird bei Patienten mit MI-Symptomen diagnostiziert, die einen plötzlichen Herzschlag erleiden noch ehe eine Bestimmung von Biomarkern im Blut erfolgen konnte. *Post mortem* kann dieser Subtyp zu einem Typ 1 MI umklassifiziert werden, insofern die Autopsie das Vorliegen eines frischen Thrombus in einer infarktbezogenen Koronararterie ergibt. Tritt ein MI infolge einer perkutanen Koronarintervention auf, so wird der MI als Typ 4 klassifiziert. Ereignet sich ein MI infolge einer Bypass-Operation, so handelt es sich um einen Typ 5 MI [121].

1.3.3 Der kardiale Metabolismus beim Myokardinfarkt

Zur Aufrechterhaltung seiner physiologischen Funktionen ist das Herz dauerhaft auf eine ausreichende Energieversorgung in Form von ATP angewiesen [132]. Unter physiologischen, aeroben Bedingungen gewinnt das Herz den Großteil seines ATP durch oxidative Phosphorylierung, weshalb FFA das wichtigste Substrat für die kardiale Energiegewinnung darstellen. Einen nur geringeren Anteil seiner Energie gewinnt das Herz durch Glykolyse und Laktatoxidation [133]. Tritt eine Myokardischämie ein, so passt sich der Stoffwechsel des Herzens schnell an die neue anaerobe Situation an. Bereits nach 8-10 Sekunden treten infolge der kardialen Ischämie eine Reihe pathologischer Ereignisse auf, die zum Absterben der Kardiomyozyten führen [134]. Infolge des Sauerstoffmangels wird die oxidative Phosphorylierung gehemmt, um den verbleibenden Sauerstoff einzusparen [135]. Die daraus resultierende Akkumulation langkettiger Fettsäuren führt zu einer Schädigung der Kardiomyozyten und zur Hemmung der Pyruvatdehydrogenase, was wiederum in einer Inhibition der aeroben Glukoseoxidation resultiert [136]. Die stark beeinträchtigte ATP-Produktion führt zu einer Hemmung der $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase und somit zu einer Störung der kardialen Ionenhomöostase, was in einer kontraktilen Dysfunktion der Kardiomyozyten resultiert [133]. Um den entstehenden ATP-Mangel zu kompensieren, schaltet das Herz auf die anaerobe Glykolyse als einzige verbleibende Quelle zur ATP-Gewinnung um [135, 137]. Da die anaerobe Glykolyse jedoch ein äußerst ineffizienter Prozess ist, kann sie den Energiebedarf des Herzens nicht decken [137]. Zusätzlich akkumulieren Laktat und Protonen als toxische Nebenprodukte der anaeroben Glykolyse und führen zu einer intrazellulären Azidose. Die Azidose reduziert das Ansprechen kontraktiler Filamente auf Ca^{2+} -Ionen, was die myokardiale Dysfunktion weiter verschlechtert und zum Zelltod der Kardiomyozyten führt [132, 133]. Weiterhin führt die Ischämie zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit erheblicher Freisetzung von Katecholaminen, vorrangig Noradrenalin [138], welche die periphere Lipolyse stimulieren und so die Konzentration von FFA erhöhen [139].

Morphologisch sind infarzierte Kardiomyozyten durch Glykogenabbau, Schwellungen der Mitochondrien und Rupturen des Sarkolemmms gekennzeichnet [140]. Der kurzzeitig veränderte Metabolismus verlangsamt sich 40-60 min nach Einsetzen der Ischämie. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der ATP-Gehalt im Herz nur noch 10 % und die meisten Kardiomyozyten sind bereits irreversibel geschädigt [134].

Die darauffolgende Reperfusion des Myokards stellt zwar die Versorgung mit Sauerstoff und Substraten für die ATP-Produktion wieder her und ist somit unerlässlich für die Beendigung der Ischämie, verschlimmert jedoch die durch die Ischämie verursachten Myokardschäden paradoxe Weise irreversibel [140, 141]. Durch den Abtransport von Protonen und die Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers wird während der Reperfusion der pH-Wert stabilisiert und die durch die Azidose verursachte Hemmung der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten aufgehoben [140]. Allerdings führt das steigende Sauerstoffangebot zu einer metabolischen Umstellung, die negative Auswirkungen hat: Das Herz nimmt verstärkt die FFA auf, welche während der Ischämie aus den peripheren Organen freigesetzt wurden, und nutzt sie für die ATP-Synthese mittels Beta-Oxidation. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von FFA inhibiert die Glukoseoxidation, was jedoch problematisch ist, da die Fettsäureoxidation einen deutlich höheren Sauerstoffverbrauch erfordert als die Glukoseoxidation [136, 142]. In geschädigten Kardiomyozyten kann dieser ineffiziente Metabolismus den oxidativen Stress erhöhen, unter anderem durch eine verstärkte Produktion von ROS und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen in Mitochondrien, was den Reperfusionsschaden zusätzlich vergrößert [140, 143-145].

1.3.4 Die Immunantwort beim Myokardinfarkt

Der Heilungsprozess nach einem MI lässt sich in drei verschiedene Phasen unterscheiden. Innerhalb der ersten 72 Stunden nach einem MI kommt es als Reaktion auf die entstandenen Gewebsschäden und Nekrosen zu einer Entzündungsphase, in welcher der Abbau der extrazellulären Matrix und die Phagozytose nekrotischer Zellen erfolgt. Auf die Entzündungsphase folgt an Tag 4-10 nach dem MI die Reparatur- und Proliferationsphase, welche bedeutsam für die Wundheilung und Narbenbildung ist. Die Narbenbildung zielt darauf ab, einer Myokardruptur und fortlaufenden Verschlechterung der kardialen Funktion vorzubeugen. Die Reifungsphase, die letzte Phase nach einem MI, dient dem Umbau der extrazellulären Matrix und zielt auf die Wiederherstellung der kardialen Funktion ab [146].

Im Rahmen des MI kommt es zu einer sterilen Entzündungsreaktion [147]. Die durch den Verschluss einer Koronararterie verursachte Sauerstoffunversorgung und resultierende Nekrose der Kardiomyozyten im Versorgungsgebiet der betroffenen Arterie führt zu der Freisetzung großer Mengen von sogenannten *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) [148]. DAMPs fungieren als endogene Gefahrenstoffe und können u. a. Teile der

beschädigten extrazellulären Matrix, mitochondriale Bestandteile, Desoxyribonukleinsäure (DNA) und ATP sein [148, 149]. Nach ihrer Freisetzung aktivieren DAMPs spezialisierte Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*), und lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus [148]. Es werden pro-inflammatorische Chemokine und Zytokine, einschließlich *C-C motif chemokine ligand* (CCL) 2, CCL7, *C-X-C motif chemokine ligand* (CXL) 1 und CXCL2 freigesetzt, um Immunzellen aus dem Knochenmark, der Zirkulation und der Milz zu rekrutieren [147, 149, 150].

Die ersten Immunzellen, die nach der Immunzellrekrutierung das infarzierte Herzareal infiltrieren, sind im Knochenmark gebildete neutrophile Granulozyten [149, 151]. Sie lokalisieren sich insbesondere in der ischämischen Grenzzone des Herzens und adhärieren dort über die Interaktion zwischen Zelloberflächenintegrinen und Selektinen, einschließlich L-Selektin (CD62L) und CD11b, an den Endothelzellen. Entlang der Gefäßwand folgen sie einem chemotaktischen Gradienten bis sie an geeigneter Stelle parazellulär migrieren können [152, 153]. Die Hauptaufgabe der Neutrophilen besteht darin, durch die Ischämie verursachte Zelltrümmer sowie nekrotische Zellen des Myokards zu phagozytieren. Durch die Freisetzung von ROS und proteolytischen Enzymen, welche das Entzündungsgeschehen verstärken und die Apoptose von Kardiomyozyten fördern, verursachen sie jedoch kollaterale Myokardschäden und beeinträchtigen das kardiale *Remodeling* negativ [151, 152].

Monozyten machen zwar nur ca. 10 % der gesamten zirkulierenden Leukozyten im menschlichen Körper aus [150] und stellen somit eine nur kleine Immunzellpopulation dar, spielen jedoch sowohl für die Inflammations- als auch für die Heilungsphase nach MI eine entscheidende Rolle [149]. CD115⁺ Monozyten werden in Abhängigkeit der Expression des Lymphozytenantigens 6C in die zwei Subtypen Ly6C^{high}- und Ly6C^{low}-Monozyten unterschieden [154]. Ihre Rekrutierung erfolgt über *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2), dessen Liganden *CC-chemokine ligand* 2 (CCL2) und *CC-chemokine ligand* 7 (CCL7) in großem Maße im infarzierten Myokard vorkommen [150]. Zuerst wandern Ly6C^{high}-Monozyten in das entzündete Herzareal ein und fördern dort die akute Entzündung, indem sie proinflammatorische Zytokine, einschließlich Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- α), *macrophage inflammatory protein* 1- α (MIP-1 α) und IL-6, produzieren [147]. Weiterhin wirken sie phagozytotisch und proteolytisch [155]. Im infizierten Herzareal können sie sich zu proinflammatorischen Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren [156]. Ly6C^{low}-Monozyten hingegen wandern erst später in das entzündete Herzgewebe ein [155] und sezernieren dort antiinflammatorische Faktoren wie IL-10 und *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) [148, 154]. Sie fördern die Angiogenese und bewirken die Ablagerung von Kollagen sowie die Akkumulation von Myofibroblasten, wodurch sie die Wundheilung und Regeneration

des Myokards im Rahmen der Reparatur- und Proliferationsphase unterstützen. Durch die Interaktion von Ly6C^{low}-Monozyten mit der extrazellulären Matrix wird zusätzlich Fibronektin freigesetzt, welches den Infarktbereich stabilisiert und der Infarktruptur vorbeugt [150].

Monozyten können sich unter dem Einfluss des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) zu M1-Makrophagen und unter dem Einfluss des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) zu M2-Makrophagen differenzieren. M1-Makrophagen haben einen pro-inflammatorischen Phänotypen, da sie entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α sezernieren. M2-Makrophagen hingegen wirken antiinflammatorisch und fördern die Regeneration des Myokards [146]. Beide Subtypen exprimieren M1- und M2-Makrophagen CCR2 sowie den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) II [149].

Neben den aus Monozyten-differenzierten Makrophagen existiert ein weiterer Subtyp, die gewebsresidenten Makrophagen, welche aus Dottersack-Vorläuferzellen hervorgehen [157]. Sie exprimieren kein CCR2, werden aber in Abhängigkeit ihrer MHCII-Expression in MHCII^{high} und MHCII^{low} residente Makrophagen unterschieden [149]. Sie verstärken die adaptive Immunantwort, indem sie über ihren MHC II Antigene präsentieren, die von CD4 $^{+}$ T-Helferzellen erkannt werden [158].

Als Teil der adaptiven Immunantwort übernehmen die im Knochenmark gebildeten T- und B-Lymphozyten eine zentrale Funktion nach einem MI. T-Helferzellen (CD4 $^{+}$ -Zellen) steuern die Immunreaktion und beeinflussen das kardiale *Remodeling*, während zytotoxische T-Zellen (CD8 $^{+}$ -Zellen) nekrotische Ablagerungen beseitigen. Allerdings können sie auch gesunde Kardiomyozyten schädigen und durch Degranulation eine Verschlechterung der Herzfunktion begünstigen [159]. Durch die Produktion von Chemokinen und die Rekrutierung von Ly6C^{high}-Monozyten ins geschädigte Myokard fördern B-Zellen (CD19 $^{+}$ -Zellen) die Entzündungsreaktion und verstärkten die Gewebeschädigung bei dem MI [160].

1.4 Extrazelluläre Vesikel: Mediatoren der Interorgan-Kommunikation

Extrazelluläre Vesikel (EV) stellen eine heterogene Gruppe von membranumhüllten Strukturen dar (s. Abbildung 6), die von einer Vielzahl von Zellen freigesetzt werden. Sie dienen der interzellulären Kommunikation und Beseitigung nicht mehr benötigter intrazellulärer Komponenten und transportieren bioaktive Moleküle wie z. B. Proteine, Lipide und Nukleinsäure [161]. Darüber hinaus wird ihnen eine kardioprotektive Funktion [162-165] zugesprochen, weshalb sie als potenzielle Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert werden [162, 163, 166].

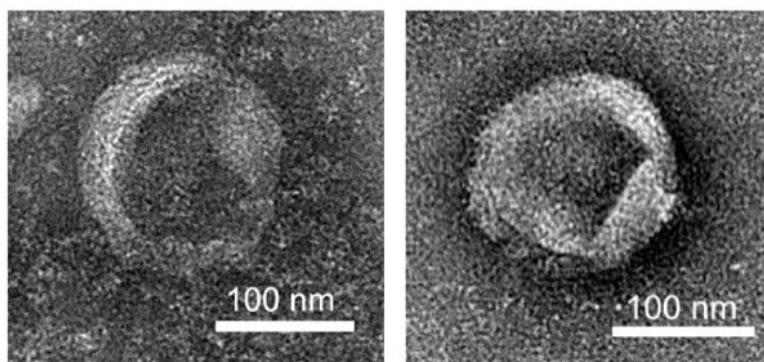


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung von extrazellulären Vesikeln (EV).

Links: EV aus dem Herzen. Rechts: EV aus der Niere.

Abbildung übernommen aus Liu *et al.*, 2023 Extracellular vesicles derived from different tissues attenuate cardiac dysfunction in murine MI models. *Biol Direct*, 2023, 18(1): p. 76. DOI: 10.1186/s13062-023-00429-y [167].

In Abhängigkeit von Ihrer Größe und Entstehung sowie der Art des bioaktiven Materials, das sie beinhalten, werden EV in drei Untergruppen unterteilt. Exosomen, auch Nanovesikel genannt, stellen mit einem Durchmesser von 40-150 nm den kleinsten Subtypen von EV dar [168]. Sie entstehen in einem mehrstufigen Prozess, welcher damit beginnt, dass sich Abschnitte der Zellmembran nach innen stülpen. Der betroffene Membranbereich wird abgeschnürt, wodurch sich intrazelluläre Vesikel, sogenannte Endosomen, bilden. Die Endosomen reifen intrazellulär zu multivesikulären Körpern (*multivesicular bodies*, MVB) heran, welche mehrere durch Einwärtsknospung der endosomalen Membran entstandene intraluminale Vesikel (ILV) in sich tragen. Durch Exozytose der MVB entstehen letztendlich Exosomen, die mit anderen Zellen interagieren und Material austauschen können [161].

Ein weiterer Subtyp von EV sind die Mikrovesikel, welche einen Durchmesser von 150-1000 nm aufweisen und durch eine direkte Abknospung der Plasmamembran (Exozytose) entstehen [168]. Auch apoptotische Körper, die einen Durchmesser von 1-5 μm besitzen und ebenfalls durch Abknospung aus ihren Ursprungszellen freigesetzt werden, werden zu den EV gezählt [169]. Ihrem Namen entsprechend werden sie von apoptotischen Zellen gebildet und

transportieren Zellfragmente wie DNA und Organellen [168]. Exosomen und Mikrovesikel transportieren hingegen vorrangig Proteine, Lipide und Nukleinsäuren [168, 170]. Eine graphische Übersicht über die Genese der drei beschriebenen EV-Subpopulationen ist in Abbildung 7 dargestellt.

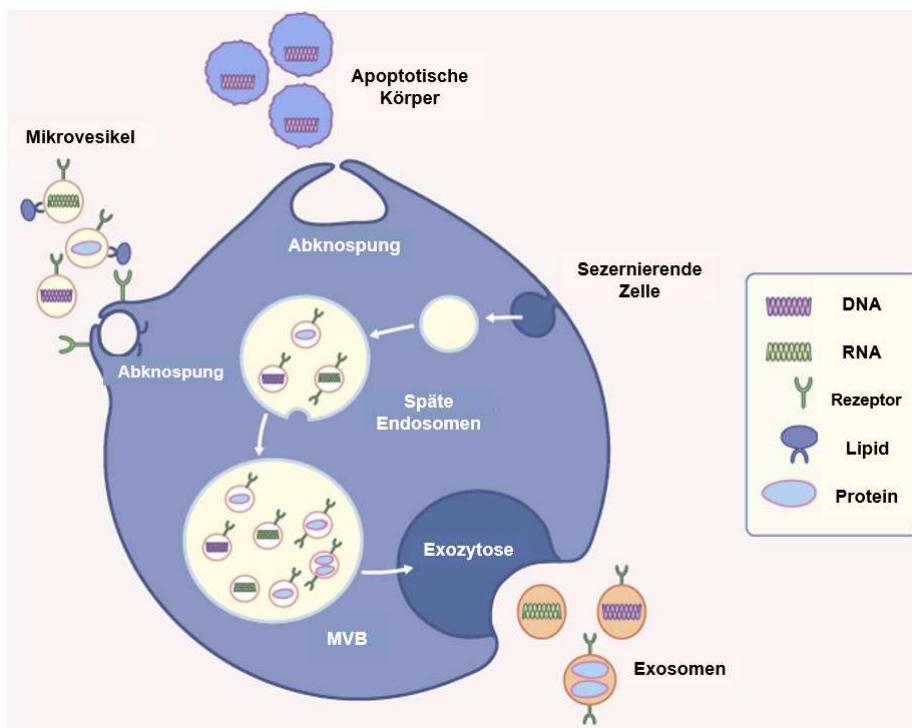


Abbildung 7: Schematische Übersicht zur Entstehung und zellulären Herkunft der drei Subtypen extrazellulärer Vesikel.

Abbildung modifiziert nach Akbar, N., et al. Extracellular vesicles in metabolic disease. *Diabetologia*, 2019; 62(12): 2179–2187. DOI: 10.1007/s00125-019-05020-0 [168]; die englischsprachige Originalbeschriftung wurde durch deutsche Begriffe überschrieben.

Die Fähigkeit, EV zu sekretieren, wurde bereits für eine Vielzahl von Organen und Geweben nachgewiesen. Neben dem Herzen wurden auch Niere, Lunge, Muskulatur, WAT, BAT und Knochenmark als EV-sezernierende Gewebe bestätigt [167, 171-175]. Rosina et al. zeigten, dass BAT zur Aufrechterhaltung seiner thermogenen Funktionalität EV nutzt, um oxidativ geschädigte mitochondriale Bestandteile zu entfernen. Ein Defekt des zugrunde liegenden Mechanismus, der die Phagozytose und Entfernung der EV durch BAT-residente Makrophagen umfasst, resultierte in einer eingeschränkten Thermogenese des murinen BAT bei Kälteexposition [174]. Martin et al. bestätigten im Rahmen eines Co-Kultivierungsmodell, dass auch zwischen aus MSZ hervorgegangenen Adipozyten und Osteoblasten ein Materialtransfer via EV *in vitro* stattfindet. Diese EV übertrugen adipogene RNA und anti-osteogene miRNA auf Osteoblasten [175, 176].

Ungeklärt bleibt nach dem derzeitigen Forschungsstand jedoch die Frage, ob BAT und BMAT im Rahmen des MI miteinander mit Hilfe von EV kommunizieren.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei zentrale Fragen untersucht:

1. Inwieweit wird die protektive Funktion des BAT im Kontext der kardialen I/R durch einen Prädiabetes beeinträchtigt?
2. Welchen Einfluss übt das BAT im Rahmen einer kardialen I/R auf das BMAT aus?

Dem BAT werden vielfältige kardiometabolische und kardioprotektive Funktionen zugeschrieben. Vorarbeiten unseres Instituts ([177], Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung) zeigten, dass intaktes BAT das kardiale *Outcome* nach I/R verbessert. Eine chirurgische Entfernung des BAT vor der I/R führte zu einem proinflammatorischen Immunzellprofil mit verstärkter Ausprägung glykolytischer Stoffwechselwege. Ob diese protektiven Effekte auch unter metabolisch dysregulierten Bedingungen wie dem Prädiabetes bestehen, ist bislang nicht bekannt.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit bei C57BL/6J-Mäusen durch eine neunwöchige hochkalorische Diät ein Prädiabetes induziert, bevor die Induktion einer kardialen I/R erfolgte. Das BAT wurde im Vorfeld der I/R chirurgisch entfernt.

Obwohl bekannt ist, dass das BAT über endokrine Mechanismen systemische Effekte vermittelt, ist bislang nicht untersucht worden, ob eine direkte Interaktion mit dem BMAT im Rahmen einer I/R besteht. Eine neuere Studie zeigt, dass das BMAT ein lokales Energiereservoir darstellt und die Notfallhämatozepte nach der I/R unterstützt [80]. Angesichts der physiologischen Bedeutung beider Fettgewebe im Rahmen des MI erscheint eine Interaktion plausibel. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden nicht-prädiabetische C57BL/6J-Mäuse mit und ohne chirurgische Entfernung des BAT untersucht und die Effekte auf das BMAT systematisch analysiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein tieferes Verständnis der Rolle des BAT im Kontext des MI zu erlangen, insbesondere unter prädiabetischen Bedingungen, die eine Vorstufe des T2DM darstellen und mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen. Darüber hinaus wird das BMAT als möglicher Interaktionspartner des BAT untersucht, um potenzielle Einflüsse beider Fettgewebe auf das kardiale *Outcome* zu identifizieren. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen langfristig zur Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen für die Prävention und Behandlung des MI beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden mit der Genehmigung des Landesamtes für Verbraucherschutz und Ernährung (LAVE), Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, unter den Aktenzeichen 81-02.04.2017.A458 und 81-02.04.2022.A297 durchgeführt.

2.2 Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere wurden unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus bei $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten. Ihnen wurde *ad libitum* entkeimtes Wasser und Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest) zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Verwendete Tiere

Für die Versuche wurden männliche C57BL/6J-Mäuse von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Ile, Frankreich) im Alter von 8-25 Wochen verwendet.

2.3 Fütterung und experimenteller Versuchsablauf

Um eine diätinduzierte Adipositas und Glukoseintoleranz zu erreichen, wurde den C57BL/6J-Mäusen ab einem Alter von 8 Wochen eine spezielle fettreiche und hochkalorische Diät (ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest) über einen Zeitraum von 9 Wochen *ad libitum* verabreicht. Der Kontrollgruppe hingegen wurde eine fettarme, normalkalorische Standarddiät (ssniff Spezialdiäten GmbH, DE-59494 Soest) *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden bis zum jeweiligen Versuchsende mit den entsprechenden Diäten gefüttert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Diäten ist nachfolgend in Tabelle 2 beschrieben.

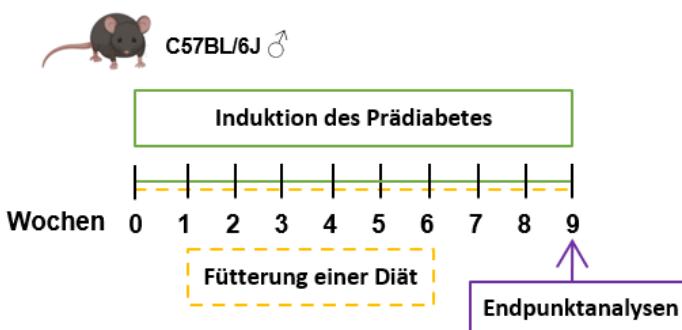
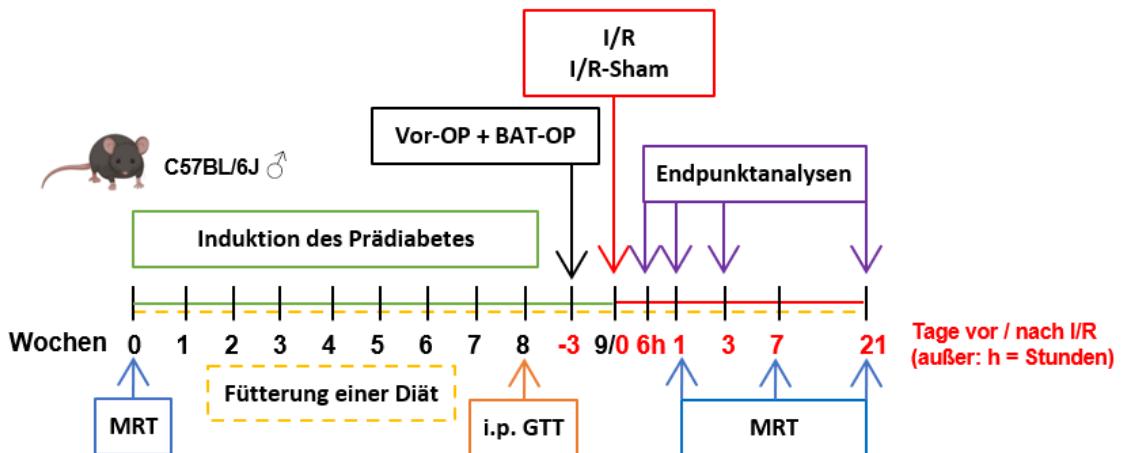
Tabelle 2: Zusammensetzung der Kontrolldiät und der diabetogenen Diät

Nährstoffe wie Vitamine, Mineralstoffe, Aminosäuren und Fettsäuren waren experimentell nicht relevant und sind daher hier nicht aufgeführt.

Rohnährstoff	Kontrolldiät	Diabetogene Diät
Rohprotein	19,0 %	20,5 %
Rohfett	3,3 %	36,0 %
Rohfaser	4,9 %	-
Rohasche	6,4 %	3,5 %
Stärke	-	-
Zucker	-	25,1 %

Zur Verifizierung des prädiabetischen Phänotyps wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen und die Gewichtsverläufe dokumentiert. Zusätzlich wurden intraperitoneale Glukosetoleranztests (*i.p* GTT) durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.4) sowie die Konzentration der NEFA und Glukose im Blutplasma ermittelt (vgl. Abschnitte 2.10.1 und 2.10.2). Die entsprechenden Ergebnisse sind im Appendix dargestellt.

Um die Rolle des BAT bei Prädiabetes sowie die Interaktion von BAT und BMAT im Kontext der I/R zu untersuchen, wurden diverse *in vivo* und *ex vivo* Analysen durchgeführt. Die experimentellen Schemata sind nachfolgend in Abbildung 8 dargestellt.

A**B****Abbildung 8: Graphische Darstellung der Versuchsabläufe.**

A. Schematische Darstellung der Experimente mit prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und Kontrollen ohne Durchführung einer I/R, B. Kumulative Darstellung der Experimente mit prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und Kontrollen inklusive der Durchführung operativer Eingriffe. Abkürzungen: I/R = Ischämie/Reperfusion, BAT = Braunes Fettgewebe, MRT = Magnetresonanztomographie.

2.4 Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Um die Glukosehomöostase zu untersuchen und die Entwicklung des Prädiabetes zu verifizieren, wurde nach 8,5-wöchiger Fütterung ein *i.p.* GTT durchgeführt. Die Tiere wurden einer 6-stündigen Nahrungskarenz ausgesetzt, um nahrungsbedingte Einflussfaktoren zu nivellieren. Nach der 6-stündigen Nahrungskarenz erfolgte eine basale Bestimmung der Blutglukosekonzentration, bevor den Tieren eine Glukoselösung (1 mg/g Körpergewicht (KG); Stocklösung 40 g Glukose-Monohydrat in 100 mL Wasser (sterilfiltriert)) *i.p.* injiziert wurde. Der Blutzucker wurde 5, 15, 30, 60, 90 und 120 min nach der Glukoseapplikation erneut gemessen. Die Bestimmung der einzelnen Blutzuckerwerte erfolgte mit einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Compact Plus, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Für die Blutzuckermessung wurde jeweils ein ca. 1,5 µL Bluttropfen verwendet, der durch einmaliges Anritzen der Schwanzvene zu Beginn gewonnen wurde.

2.5 Induktion der kardialen Ischämie/Reperfusion im *Closed-Chest-Modell*

Die Induktion der kardialen I/R erfolgte im etablierten *Closed-Chest*-Modell. Dieses Modell besteht aus zwei operativen Eingriffen, die zeitlich voneinander entkoppelt stattfinden: der Vor-OP und der eigentlichen Induktion der kardialen I/R. Zunächst erfolgt im Rahmen der Vor-OP die Anlage eines Ligaturfadens um die linke vordere absteigende Koronararterie (*left anterior descending artery (LAD)*) bei geöffnetem Thorax. Mit einem Abstand von drei Tagen wird schließlich die kardiale I/R bei geschlossenem Thorax ausgelöst.

2.5.1 Ligaturanlage

Den Tieren wurde ca. 20 bis 30 min vor dem Eingriff das Analgetikum Buprenorphin (0,1 mg/kg KG, 10 µL/g KG) s.c. appliziert. Vor Beginn der Vor-OP wurden die Tiere mittels *i.p.* Injektion mit Ketamin (90 mg/kg KG)/Xylazin (15 mg/kg KG) in einer Dosierung von 10 µL/g KG narkotisiert. Nach erfolgreicher Narkotisierung wurde das Brustfell mit einem Kleintier-Akkurasierapparat (GT420 Isis, Braun/Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) entfernt und die Tiere mit Hilfe eines Venenverweilkatheters (Vasofix Brauniile G20, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) intubiert. Anschließend wurden die Tiere auf einem konstant temperierten OP-Tisch (37 bis 38 °C) fixiert und ihre Körpertemperatur wurde durchgängig mittels einer rektal eingeführten Temperatur-Messsonde überwacht. Durch das Auftragen einer Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) wurden die Augen vor dem Austrocknen geschützt.

Während der Vor-OP wurden die Tiere mit einem Raumluft/Sauerstoffgemisch (2:1) (0,1 mL/100 g KG, Atemfrequenz ca. 140/min) beatmet und die Narkose mit Hilfe eines Vaporisators mit 1-2 Vol.-% Isofluran aufrechterhalten.

Nach erfolgter Hautdesinfektion mit Betaisodona wurde unter Verwendung eines Operationsmikroskops zunächst eine ca. 1 cm lange Hautinzision gemacht, um die darunter befindlichen *Musculus pectoralis major* und *minor* freizulegen. Durch eine laterale Thorakotomie mit ca. einem cm Schnittlänge wurde der Thorax im vierten Interkostalraum geöffnet und das Herz freigelegt. Ein 7-0 Prolene Faden wurde intrakardial unterhalb der LAD plaziert. Dessen Enden wurden durch einen ca. 1 mm dicken Polyethylen-Schlauch (PE) mit 0,5 mm Innendurchmesser geführt. Anschließend wurde der Thorax mit einem 5-0 Prolene Faden verschlossen, wobei links und rechts dieser Naht jeweils ein Ende des durch den PE-Schlauch gefädelten Fadens entlanggeführt wurde. Die beiden Enden des Fadens wurden mit Hilfe einer chirurgischen Nadel anschließend links- und rechtsseitig durch die Muskelschichten geführt und rechtsseitig s.c. in einer Hauttasche platziert. Die initiale Hautinzision wurde mit Hilfe eines 5-0 Prolene-Fadens durch Einzelnähte verschlossen und das entsprechende

Hautareal desinfiziert. Die Tiere wurden abschließend von der Beatmung entwöhnt und bei erfolgreicher Rückkehr zur Spontanatmung extubiert. Die postoperative Analgesie erfolgte s.c. mit Buprenorphin (0,1 mg/kg KG, 10 µL/g KG). Zusätzlich erhielten die Tiere postoperativ Buprenorphin (1 mg/kg KG) peroral (*p.o.*) über das Trinkwasser.

In Abhängigkeit des Versuches erfolgte die Ligaturanlage durch Frau Rachel Nega, Herrn Dominik Semmler oder Herrn Dr. Zhaoping Ding. Die Induktion der kardialen I/R erfolgte durch Frau Rachel Nega, Frau Dr. Simone Gorreßen oder Herrn Dr. Zhaoping Ding.

2.5.2 Induktion der kardialen Ischämie/Reperfusion

Drei Tage nach der Ligaturanlage erfolgte die Induktion der kardialen I/R unter kontinuierlicher EKG-Kontrolle (Basic Data Acquisition Software, Harvard Aparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Den Tieren wurde ca. 20 bis 30 min vor Beginn des Eingriffes 0,1 mg/kg KG Buprenorphin in einem Volumen von 10 µL/g KG s.c. injiziert. Mit Hilfe einer Beatmungsmaske wurden die Tiere mit 3 Vol.-% Isofluran narkotisiert und anschließend auf einem konstant temperierten OP-Tisch (38 °C) fixiert. Die Körpertemperatur wurde durchgängig mit Hilfe einer rektal eingeführten Temperatur-Messsonde überwacht und konstant auf 37 bis 38 °C gehalten. Durch das Auftragen einer Augensalbe wurden die Augen vor dem Austrocknen geschützt. Die Narkose wurde über den gesamten Operationszeitraum mit 2 Vol.-% Isofluran aufrechterhalten.

Nach dem Anbringen der EKG-Elektroden und der *Baseline*-Aufnahme der elektrischen Aktivität des Herzens wurde die entsprechende Hautstelle desinfizierte und die Einzelnähte, die während der Vor-OP angebracht wurden, geöffnet. Die während der Vor-OP rechtsseitig s.c. platzierten Prolene-Fäden wurden aus der Hauttasche herausgeführt und jeweils links und rechts an 5 g schweren Gewichten befestigt. Die Prolene-Fäden wurden danach locker über an Magnethaltern befestige Retrakordrähte gelegt. Zur Induktion der kardialen Ischämie wurden die beiden Magnethalter und somit ebenso die beiden Enden des Prolene-Fadens links und rechts der Maus gleichmäßig auseinandergezogen. Das Verschieben der Magnethalter nach außen führte dazu, dass der während der Vor-OP platzierte PE-Schlauch durch den Zug der an Gewichten befestigten Fadenenden die LAD abband. Die kardiale Ischämie verursachte eine sichtbare ST-Hebung, die mittels EKG aufgezeichnet wurde. Die kardiale Ischämie wurde für 45 Minuten aufrechterhalten.

Nach Ablauf der 45 Minuten wurden die Magnethalter vorsichtig Richtung Maus geführt, um die Ischämie zu beenden. Beide Enden des Prolene-Fadens wurden kurz abgeschnitten und die Haut mittels 5/0 Prolene-Fadens durch Einzelnähte verschlossen. Die post-operative Analgesie erfolgte erneut durch Buprenorphin s.c. (0,1 mg/kg KG, 10 µL/g KG). Zusätzlich

wurde den Tieren postoperativ Buprenorphin *p.o.* (1 mg/kg KG) über das Trinkwasser verabreicht.

Um die Tiere während der Aufwachphase vor Wärmeverlust zu schützen, wurden sie weiter auf einer konstant temperierten Wärmeplatte (38 °C) gehalten.

2.6 Chirurgische Entfernung des braunen Fettgewebes („BAT-Ablation“)

Je nach Versuch erfolgte die chirurgische Entfernung („Ablation“) des interskapulären braunen Fettgewebedepots entweder unmittelbar nach Abschluss der Vor-OP oder aber ohne vorausgegangene Vor-OP. Erfolgte die BAT-OP ohne vorausgegangene Vor-OP, so wurde den Tieren zehn Minuten vor Beginn der BAT-OP Ketamin (90 mg/kg KG)/Xylazin (15 mg/kg KG) in einer Dosierung von 10 µL/g KG *i.p.* zur Narkoseeinleitung injiziert. Die präemptive Analgesie erfolgte analog Abschnitt 2.5.1.

Die Tiere wurden auf einem konstant temperierten OP-Tisch (37 bis 38 °C) fixiert und ihre Körpertemperatur wurde durchgängig mittels einer rektal eingeführten Temperatur-Messsonde überwacht. Mit einem Kleintier-Akkurasierapparat wurde das Fell im Nackenbereich der Tiere entfernt und die Hautstelle desinfiziert. Um die durch Ketamin (90 mg/kg KG)/Xylazin (15 mg/kg KG) in einer Dosierung von 10 µL/g KG induzierte Narkose aufrechtzuerhalten, wurden 2 Vol.-% Isofluran über eine Atemmaske verabreicht. Zwischen den Schulterblättern wurde eine ca. 1 cm lange Hautinzision vorgenommen. Die Cutis und Subcutis wurden vorsichtig durchtrennt und das darunterliegende Fettgewebe vorsichtig freipräpariert. Das unter dem BAT verlaufende Blutgefäß wurde mit Hilfe eines drahtlosen Kauters (Small Vessel Cauterizer Kit, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) verödet, um Blutverlust zu unterbinden. Im Falle einer BAT-Ablation wurde das BAT vorsichtig komplett herausgeschnitten. Erhielten die Tiere hingegen eine Sham-OP, so wurde das BAT wie oben beschrieben freipräpariert, das Blutgefäß jedoch nicht verödet und das BAT nicht herausgeschnitten.

Am Ende der OP wurde die Haut mit Hilfe eines 5-0 Prolene-Fadens durch Einzelnähte verschlossen und die Hautstelle desinfiziert. Um die Tiere während der Aufwachphase vor Wärmeverlust zu schützen, wurden sie auf eine konstant temperierte Wärmeplatte (38 °C) gelegt.

2.7 Magnetresonanztomographie

Die *in vivo* magnetresonanztomographischen Messungen wurden von Frau Anne Vera Flocke und Herrn Prof. Dr. Ulrich Flögel am Institut für Molekulare Kardiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden über einen Vaporisator mit Isofluran narkotisiert (Narkoseeinleitung: 2-4 Vol.-% Isofluran, Narkoseaufrechterhaltung: 1,5 Vol.-% Isofluran). Um das Austrocknen der Bindehäute zu verhindern, wurde den Tieren nach der Narkoseeinleitung eine Augensalbe aufgetragen. Anschließend wurden die Tiere in einen Probenkopf mit einem Innendurchmesser von 25 mm positioniert und in einen 9.4 T Widebore-NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin GmbH & Co. KG, Ettlingen, Deutschland) überführt. Die Ansteuerung erfolgte über eine AVANCE^{III} oder eine AVANCE^{NEO}-Konsole. Die Vitalparameter wurden kontinuierlich überwacht, einschließlich EKG-Ableitung über die Vorder- und Hinterpfoten (Klear-Trace Elektroden, CAS Medical Systems, Brüssel, Belgien) sowie Messung der Atemfrequenz mittels Drucksensor-gekoppelten Ballon (Small Animal Monitoring and Gating System, SA-Instruments, Inc., New York, USA). Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde konstant auf 37 °C gehalten.

Die Auswertung aller Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen erfolgte manuell mit der Software ParaVision 5.1 oder ParaVision360 V3.2 (Bruker BioSpin GmbH & Co. KG, Ettlingen, Deutschland).

2.7.1 T2-Relaxometrie

Die MRI-basierte Messung der T2-Relaxometrie ermöglicht die *in vivo* Messung von Veränderungen innerhalb eines Gewebes. Bei dieser Methode wird die T2-Relaxationszeit in Millisekunden gemessen.

Physikalisch beschreibt die T2-Relaxationszeit den Zerfall der Transversalmagnetisierung nach einer Radiofrequenzanregung, bei dem die Spins der Wasserstoffprotonen ihre transversale Ausrichtung im Magnetfeld durch Wechselwirkung mit benachbarten Protonen verlieren. Die T2-Relaxationszeit ist als diejenige Zeit definiert, die benötigt wird, damit die Magnetisierung in der transversalen Ebene auf etwa 37 % ihres ursprünglichen Werts abfällt [178].

Die T2-Relaxationszeit ist spezifisch für jedes Gewebe und wird durch verschiedene Faktoren, wie dem Wassergehalt, pH-Wert, Eisengehalt und der Vaskularisation beeinflusst [178, 179].

BAT beispielsweise weist aufgrund seines hohen höheren Eisen- und Mitochondriengehalts sowie seiner stärkeren Vaskularisation basal eine kürzere T2-Relaxationszeit auf als WAT [179, 180].

Der Begriff „Relaxometrie“ meint die Beobachtung des Prozesses der Rückkehr des angeregten Kernspins in ihren Ausgangszustand durch aufeinanderfolgende Bildserien [181]. Insgesamt wurden 16 Spinecho ^1H -Bilder über das entsprechende Organ aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten über T2-gewichtete *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE)-Messungen, indem die Intensitätsabnahme einzelner Pixel bestimmt wurde. Die Ermittlung der gewebespezifischen T2-Relaxationszeit in Millisekunden (ms) erfolgte manuell mit dem *Region-of-Interest* (ROI)-Tool in der ParaVision Software.

In dieser Arbeit wurden die T2-Relaxationszeiten von BAT und des Knochenmarks innerhalb der Tibia mittels MRI ermittelt. Die Messung der T2-Relaxationszeiten des BAT erfolgte sieben und 21 Tage nach der kardialen I/R. Die Messung der T2-Relaxationszeit der Tibia erfolgte vor der Vor-OP (= basal) sowie einen Tag und 21 Tage nach der kardialen I/R.

2.7.2 Bestimmung des ischämischen Areals im Herzen

Um das kardiale Infarktareal in der Akutphase nach der I/R magnetresonanztomographisch zu untersuchen, wurde den Versuchstieren einen Tag nach der I/R 100 μL des Kontrastmittels Gadopentetat-Dimeglumin (Magnevist $^{\circledR}$, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$ ca. 10 min vor der MRT-Messung *i.p.* appliziert.

Gadopentetat-Dimeglumin reichert sich verzögert in fibrotischem Herzgewebe an und wird ebenso verzögert aus diesem ausgewaschen. Zusätzlich ermöglicht die Ruptur der Zellmembranen geschädigter Kardiomyozyten bei einer kardialen I/R das Eindringen von Gadopentetat-Dimeglumin in den intrazellulären Raum, was die Abgrenzung von infarziertem zu gesundem Myokard ermöglicht [182]. Aufgrund seiner paramagnetischen Eigenschaften [183] verkürzt das eingesetzte Kontrastmittel die T1- und T2-Relaxationszeiten im Infarktareal, was die Signalintensitäten erhöht und das Infarktareal heller erscheinen lässt [182]. Diese Methode wird als „*Late-gadolium-enhancement*“ (LGE) bezeichnet.

Zur Untersuchung des Infarktareals wurden hochauflöste Gradientenecho- ^1H -Bilder aufgenommen. Mithilfe des ROI-Tools der ParaVision Software wurde das myokardiale Infarktareal erfasst und abschließend berechnet.

2.7.3 Analyse funktioneller Herzparameter

An Tag 1, 7 und 21 Tag nach der kardialen I/R wurde die Herzfunktion mittels MRT gemessen, um den Einfluss von Prädiabetes und BAT-Ablation auf das kardiale *Outcome* nach I/R zu untersuchen. Mit Hilfe von Gradientenecho- ^1H -Aufnahmen wurden verschiedene Herzebenen des linken Ventrikels angefertigt, wobei eine Aufnahme aus jeweils 16 Bildern pro Herzzyklus bestand. Anschließend wurden mithilfe des ROI-Tools der ParaVision Software das

enddiastolische Volumen (EDV), das endsystolische Volumen (ESV), das Schlagvolumen (SV) sowie die Ejektionsfraktion (EF) ermittelt und abschließend berechnet.

2.7.4 Messung des Fett- und Wassergehalts in der Tibia

Vor Versuchsbeginn (= basal) sowie an Tag 1 und 21 nach der kardialen I/R wurde die Protonendichte-Fettfraktion (PDFF) und Protonendichte-Wasserfraktion (PDWF) in der Tibia der Versuchstiere mittels MRT gemessen. Diese MRT-basierte Methode erlaubt die quantitative Bestimmung des relativen Fett- und Wasseranteils in einem Gewebe *in vivo* auf Grundlage unterschiedlicher chemischer Eigenschaften von Fett- und Wasserprotonen.

Die PDFF ist definiert als der Anteil der Signalintensität von Wasserstoffprotonen im Fettgewebe bezogen auf die gesamte Wasserstoffprotonensignalintensität (Fett + Wasser) im untersuchten Gewebe. Die PDWF beschreibt den relativen Anteil des Wassersignals an der gesamten Signalintensität [184, 185].

Die Methode beruht auf den unterschiedlichen Resonanzfrequenzen von Wasser- und Fettprotonen, die durch chemische Verschiebungen infolge ihrer molekularen Umgebung verursacht werden [186].

Zur Datenerhebung wurden hochauflöste, morphologische Spinecho-¹H-Bilder der Tibia mit und ohne Fettunterdrückung aufgenommen, ergänzt durch multi-Echo-Sequenzen zur Signaltrennung von Wasser und Fett. Die Auswertung erfolgte manuell mithilfe des ROI-Tools der ParaVision® Software, wobei das Fett- und Wassersignal getrennt quantifiziert und anschließend die PDFF und PDWF berechnet wurden.

2.8 Organentnahme und Gewebepräparation

Zur Euthanisierung wurde Kohlendioxid (CO₂) unter Verwendung einer GasDocUnit® (medres Medical Research GmbH, Köln, Deutschland) genutzt. Nach der Feststellung des Todes der jeweiligen Maus wurden die entsprechenden Körperregionen unmittelbar vor der Organentnahme mit Ethanol 70 Vol.-% desinfiziert. Die entnommenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zum Zeitpunkt der Endpunktanalyse bei -80 °C gelagert. Gewebe, die für histologische Analysen vorgesehen waren, wurden zunächst in einer 4%igen Formalinlösung für 24 h fixiert. Ausgenommen davon waren Tibiae, da sie nach der Organentnahme zunächst für 1 h bei 4 °C in PBS rehydriert wurden und anschließend für 48 h bei 4 °C mit einer 10 %igen Formalinlösung fixiert wurden. Daraufhin wurden die Tibiae 3x5 min mit PBS und weitere 3x5 min mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie 14 Tage lang mit einer 25 %igen EDTA-Entkalkerlösung bei Raumtemperatur (RT) entkalzifiziert wurden. Nach der Entkalzifizierung wurden die Knochen 10 min lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in 50 Vol.-% Ethanol gelagert. Die maschinelle

Entwässerung aller für histologische Untersuchungen entnommenen Gewebe wurde mit Hilfe eines Autotechnikons (Sakura Tissue Tek VIP, Sakura Finetek, Torrance, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die entwässerten Organe wurden abschließend in Hartparaffin eingebettet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Herzen, kardiales Blut, BAT, BMAT, rotes Knochenmark, Femura sowie Tibiae aus den Versuchstieren entnommen. Die Herzen wurden *post mortem* über die Eröffnung der Femoralarterie *in vivo* mit PBS gespült bis sie blutleer waren. Zur Gewinnung des BMAT aus der Tibia wurden zunächst die Haut und Muskulatur vom Fußansatz bis zum Ende der Tibia freipräpariert. Anschließend wurde die Tibia mit Hilfe eines Skalpells in die proximale und distale Tibiaregion separiert. Durch Zentrifugation bei $54335 \times g$ für 2 min bei RT wurden die Gewebe aus dem entsprechenden Knochenstück zentrifugiert.

Eine Illustration der Tibiaseparation ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Subtypen der BMAd wurden bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben.

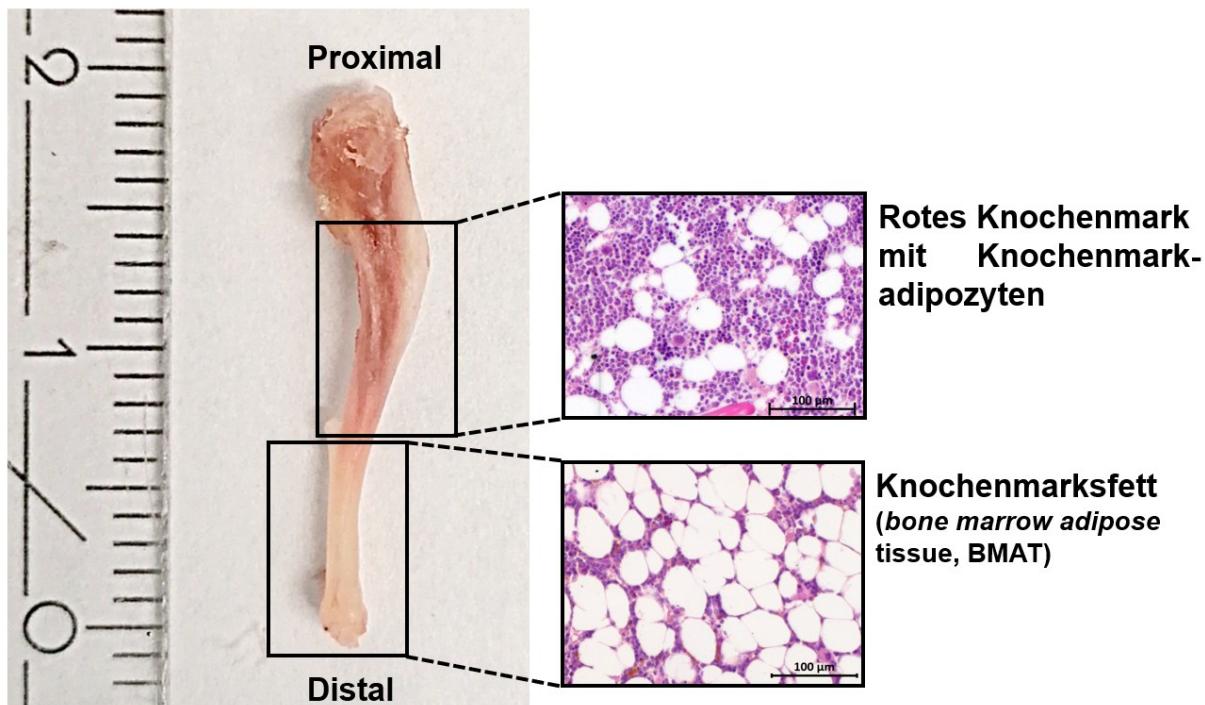


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Knochenmarkseparation in der Tibia.

Im proximalen Teil befindet sich das hämatopoetisch aktive rote Knochenmark mit den wenigen dort lokalisierten Knochenmarkadipozyten (BMAd). Im distalen Teil bilden die BMAd ein dichtes Fettgewebe (bone marrow adipose tissue, BMAT). Maßstabsbalken Lineal (links): 0,1 cm, Maßstabsbalken Mikroskopaufnahmen (rechts): 100 µm.

Die Gewinnung des vollständigen Knochenmarks aus dem unseparierten Femur erfolgte ebenfalls durch Zentrifugation bei $54335 \times g$ für 2 min bei RT.

Die für die Organaufnahme und Gewebepräparation verwendeten Puffer und Lösungen sind nachfolgend in den Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete kommerzielle Lösungen zur Organentnahme und Gewebepräparation

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Roti®-Histofix 4 % Fixierlösung	P087.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Histofix 10 % Fixierlösung	P087.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entkalker soft	6484.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Verwendete nicht kommerzielle Puffer zur Organentnahme und Gewebepräparation

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1 % PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4

2.9 Gewinnung von Blutplasma

Das kardiale Blut der euthanisierten Mäuse wurde durch Punktions des rechten Ventrikels entnommen und mit 50 µL Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA, 100 mM, s. Tabelle 5) antikoaguliert. Anschließend wurden die Blutproben für 15 min bei 800 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und für weitere 5 min bei 15871 × g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde aliquotiert und bis zur vorgesehenen Analyse bei -80 °C gelagert.

Tabelle 5: Verwendete Lösungen zur Gewinnung von Blutplasma

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	6381-92-6	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.10 Untersuchung metabolischer Parameter

2.10.1 Quantitative Bestimmung von NEFA

Um die Konzentrationen von nicht-veresterten freien Fettsäuren (*non-esterified fatty acids*, NEFA) im Blutplasma zu bestimmen, wurde ein enzymatisches Kit verwendet (NEFA-HR (2), Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland). Das Testprinzip beruht auf der enzymatischen Umsetzung der NEFA zu einem violetten Farbkomplex unter Zugabe der Enzyme Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA)-Synthetase und Acyl-CoA-Oxidase.

Das Blutplasma wurde wie unter Punkt 2.9 beschrieben gewonnen. Für die Standardreihe wurde der NEFA-Standard in den Konzentrationen 0, 0,125, 0,25, 0,5 und 1 mmol/L verdünnt. Es wurden jeweils 4 µL der Proben und Standardlösungen in eine unbeschichtete 96-Well-Platte pipettiert. Zu den 4 µL Probe und Standardlösung wurden 200 µL des Farbreagenz R1 pipettiert und die 96-Well-Platte in einem Wärmeschrank bei 37 °C für 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µL des Farbreagenz R2 hinzugegeben und die Platte für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionen der Standardreihe und Proben wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers (Synergy MX™, BioTek® Instruments, Inc., Winooski, Vermont, United States) bei 450 nm gemessen und mit der Software Gene5™ 2.05 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, United States) analysiert.

2.10.2 Quantitative Bestimmung von Glukose

Für die quantitative Bestimmung der Glukosekonzentrationen im Blutplasma und roten Knochenmark wurde ein enzymatisches Kit verwendet (GLUCOSE Liquicolor, HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden, Deutschland). Das Testprinzip beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Glukose zu Chinonimin unter Zugabe der Enzyme Glukoseoxidase und Peroxidase.

Das Blutplasma wurde wie unter Punkt 2.9 und das rote Knochenmark wie unter Punkt 2.8 beschrieben gewonnen. Für die Standardreihe wurde der Glukose-Standard in den Konzentrationen 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,8, 25, 75, 51,5, 113 mg/dL verdünnt. Für die Untersuchung des Blutplasmas wurden jeweils 10 µL der Plasmaproben, für die Analyse des roten Knochenmarks 10 µL einer 1:80-Verdünnung des roten Knochenmarks mit PBS verwendet. Zusätzlich wurden jeweils 10 µL der Standardlösungen in eine unbeschichtete 96-Well-Platte pipettiert. Zu den Proben und Standardlösungen wurden jeweils 300 µL des Farbreagenz (R1) pipettiert und die Platte in einem Wärmeschrank bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die Absorption der Proben und Standardlösungen wurde mit Hilfe eines Mikroplattenlesers (Synergy MX™, BioTek® Instruments, Inc., Winooski, Vermont, United

States) bei 500 nm gemessen und mit der Software Gene5TM 2.05 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, United States) analysiert.

2.11 Zellkulturversuch mit BodiPYTM FL C16

Im Rahmen dieses Versuches wurde der Fettsäuretransfer von BMAds auf Linien-negative (Lin⁻) HSPC *in vitro* untersucht.

Das rote Knochenmark aus den Femura, das BMAT sowie das rote Knochenmark aus beiden Tibiae wurden wie unter Abschnitt 2.8 beschrieben gewonnen und das rote Knochenmark aus Femura und Tibiae gepoolt. Unter sterilen Bedingungen wurde das BMAT mit 5 µM BODIPYTM FL C16 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), einer lipophilen Substanz, die sich in den Zellmembranen von Adipozyten anreichert, in DMEM mit 0,5 % BSA versetzt und für sechs Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Isolation der Lin⁻Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Lineage Cell Depletion Kit, mouse, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellerangaben. Mit diesem Kit wurden Lineage-Antigene exprimierende Zellen (Lin⁺) mit monoklonalen Antikörpern und MicroBeads magnetisch markiert und von den Lin⁻-Zellen abgetrennt, indem sie auf *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS[®])-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) im Magnetfeld eines MACS[®]-Separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) aus der Knochenmarkssuspension zurückgehalten werden. Da die Lin⁻-Zellen nicht magnetisch markiert wurden, wurden sie nicht auf der Säule zurückgehalten und befanden sich in der Durchflussfraktion. Nach der Isolation wurden die Lin⁻-Zellen in mit 20 % FCS (Fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS) versetztem DMEM aufgenommen. Jeweils 300.000 Lin⁻-Zellen einer Probe wurden in einem Well einer 12 Well Zellkulturplatte ausplattiert.

Nach der sechsständigen Inkubation des BMAT mit BODIPYTM FL C16 wurde das Fettgewebe zweimal mit DPBS gewaschen, um überschüssiges BODIPYTM zu entfernen und anschließend in insgesamt 120 µL DMEM mit 20 % FCS (Fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin (PS) aufgenommen. Für das Ansetzen der Co-Kultur wurde das in Medium suspendierte BMAT in einen sterilen Zellkultureinsatz mit einer 0,4 µm dicken Membran aus Polyethylenterephthalat pipettiert. Der Zellkultureinsatz wurde in das jeweilige, mit Probe versetzte Well der 12-Well-Zellkulturplatte eingesetzt. Die Co-Kultivierung erfolgte für 13 Stunden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die das BMAT enthaltende Zellkultureinssätze verworfen und die isolierten Lin⁻-Zellen zweimal mit DBPS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend wie unter Abschnitt 2.12.4 beschrieben durchflusszytometrisch analysiert.

2.12 Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung von Stamm- und Immunzellen in Blut, rotem Knochenmark und Herz wurden Analysen mittels Fluoreszenzaktivierter Zellanalyse (*Fluorescence-Activated Cell Analysis*, FACS, Durchflusszytometrie) durchgeführt. Die Gewebe wurden zu Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet und die Zellen mittel mit Fluorochromen konjugierten Antikörpern durchflusszytometrisch sichtbar gemacht.

Zur quantitativen Bestimmung der Immun- und Stammzellen aus dem Blut, roten Knochenmark und Herzen wurden zusätzlich Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland) zugesetzt. Die Einzelzellsuspensionen des Bluts, roten Knochenmarks und Herzen wurden anschließend mit dem LSRFortessa™ Durchflusszytometer (BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA) gemessen, die aus dem roten Knochenmark isolierten Lin-Stammzellen, die zuvor mit Bodipy-beladenen BMAds co-kultiviert wurden (s. Abschnitt 2.12.4), mit dem FACSymphony™ A1 Analyzer (BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA).

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo™ (BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA). Die Gating-Schemata der durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen sind in den Appendices 2-6 dargestellt. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Puffer und Lösungen sind nachfolgend in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	14190144	Gibco®, Life Technologies, Paisley, Florida, USA
BD FACSFlow™ (isotoner FACS Puffer)	41116015	BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA

Tabelle 7: Verwendete nicht kommerzielle Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PEB-Puffer	2 mM EDTA 0,5 % (v/v) BSA in DPBS
Fixierlösung	1 % (v/v) Roti®-Histofix 10 % in PBS
Hypotoner Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA

2.12.1 Rotes Knochenmark

Das rote Knochenmark wurde aus der Tibia gemäß Abschnitt 2.6 isoliert und in 1 mL PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension durch einen 70 μ m Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert und das Filtrat für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in PEB resuspendiert, und die Einzelzellsuspension für 10 min bei 4 °C mit einem *purified anti-mouse* CD16/32-Antikörper (Fc-Block) inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Antikörperbindungen zu verhindern. Zur Identifikation toter Zellen wurde ein Viabilitätsmarker (LIVE/Dead™ Fixable Aqua) hinzugegeben und die Suspension für 30 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Zur Zelfärbung wurden jeweils spezifische Antikörperkombination hinzugefügt, die gezielt Immunzellen (s. Tabelle 8) bzw. HSPC (s. Tabelle 9) markierten. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 15 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Erythrozyten mit einem hypotonem Erythrozytenlysebuffer lysiert (s. Tabelle 7), da Erythrozyten das Signal stören und nicht analysiert wurden. Das Zellpellet, das nach dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (800 x g, 4 °C, 10 min) entstand, wurde in PEB resuspendiert und die Zellen für 20 min bei RT mit einer Fixierlösung (s. Tabelle 3) fixiert. Nach einem abschließenden Waschschritt mit PEB wurden die Proben für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Die für die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen und HSPC im roten Knochenmark verwendeten Antikörper sind nachfolgend in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im roten Knochenmark

Antikörper	Klon	Hersteller
CD45-PE	30-F11	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD3-AlexaFluor 700	17A2	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD11b-PE/Dazzle 594	M1/70	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD19-PacificBlue	6D5	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD115-BrilliantViolett 711	AFS98	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6G-BrilliantViolet 650	1A8	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6C-APC/Cy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD4-FITC	RM4-5	Life Technologies Corp. Carlsbad, Kalifornien, USA
LIVE/Dead™ Fixable Aqua	-	Life Technologies, Eugene, Oregon, USA
Purified anti-mouse CD16/32 (Fc-Block)	93	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Stammzellen im roten Knochenmark

Antikörper	Klon	Hersteller
Lineage-AlexaFluor 700	145-2C11; RB6-8C5; RA3-6B2; Ter-119; M1/70	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD34 PE/Dazzle	SA376A4	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD16/32-BrilliantViolett 421	93	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD48-PE	HM48-1	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD117(c-Kit)-PE/Cy7	2B8	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Sca-1-BrilliantViolett 650	D7	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD150-PE/Cy5	TC1512F12.2	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
LIVE/Dead™ Fixable Aqua	-	Life Technologies, Eugene, Oregon, USA

2.12.2 Kardiales Blut

Das Blut wurde wie in Abschnitt 2.9 beschrieben entnommen. Zur Blockierung unspezifischer Fc-Rezeptor-vermittelten Antikörperbindungen wurden die Proben für 10 min bei 4 °C mit einem *purified anti-mouse* CD16/32-Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C mit einer spezifischen Antikörperkombination, um die gewünschten Zellpopulationen zu färben. Für die Lyse der Erythrozyten wurden die Proben für 7 min bei 4 °C mit einem hypotonen Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert und anschließend für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in PEB resuspendiert und mit einer Fixierlösung versetzt. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei RT inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Proben erneut mit PEB gewaschen und für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in PEB resuspendiert und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch erfasst.

Die für die durchflusszytometrische Analyse der zirkulierenden Immunzellen verwendeten Antikörper sind nachfolgend in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen

Antikörper	Klon	Hersteller
CD45-PE	30-F11	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD3-AlexaFluor 700	17A2	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD11b-PE/Dazzle 594	M1/70	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD19-PacificBlue	6D5	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD115- BrilliantViolett 711	AFS98	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6G- BrilliantViolett 650	1A8	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6C-APC/Cy7	HK1.4	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD4-FITC	RM4-5	Life Technologies Corp. Carlsbad, Kalifornien, USA
CD8a-AF647	53-6.7	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Purified anti-mouse CD16/32 (Fc-Block)	93	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

2.12.3 Herz

Das infarzierte Herz wurde unter Eröffnung der Femoralarterie *in vivo* mit kaltem DPBS (Gibco® Life Technologies, Paisley, UK) und Heparin (Heparin Natrium 25000 I.E./5 mL, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) gespült bis es blutleer war. Nach der Entnahme des Herzens wurde das Herzgewebe vorsichtig mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und für 30 min in 2 mL einer Verdaulösung bestehend aus Kollagenase Typ I (600 U/mL, Worthington, Lakewood, NJ, USA) und DNase I (60 U/mL, Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) in Hank's Balanced Salt solution (HBSS, Gibco Life Technologies, Paisley, UK) 37 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension über einen 100 µm und einen 40 µm Nylonfilter (Greiner Bio-One, Frankfurt, Deutschland) filtriert und für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit hypotonem Erythrozyten-Lysepuffer (s. Tabelle 7) versetzt und für 7 Minuten bei 4 °C inkubiert. Um den Erythrozyten-Lysepuffer zu inaktivieren, wurde 10 mL kaltes PBS hinzugegeben und die Suspension für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in PEB resuspendiert. Die Einzelzellsuspension wurde für 10 min bei 4 °C mit CD16/32-Antikörper (Fc-Block) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen zu unterbinden. Um tote Zellen zu markieren wurde ein Viabilitätsmarker (LIVE/Dead™ Fixable Aqua) zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Es folgte die Zugabe einer spezifischen Antikörperkombination (s. Tabelle 11) zur Färbung der Zellen sowie eine Inkubation für 15 min bei 4 °C. Im Anschluss an einen finalen Waschschritt mit PEB wurden die Proben bei für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen

Antikörper	Klon	Hersteller
CD45-AlexaFluor 488	30-F11	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b-BrilliantViolett 711	M1/70	BioLegend, San Diego, CA, USA
Ly6G-APC/Fire	1A8	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD64-APC	X54-5/7.1	BioLegend, San Diego, CA, USA
MHCII-PE/Dazzle	M5/114.15.2	BioLegend, San Diego, CA, USA
CCR2-BrilliantViolett 421	SA203G11	BioLegend, San Diego, CA, USA

Ly6C-AlexaFluor 700	HK1.4	BioLegend, San Diego, CA, USA
MertK-PE	2B10C42	BioLegend, San Diego, CA, USA
LIVE/Dead™ Fixable Aqua	-	Life Technologies, Eugene, OR, USA
CD16/32-BrilliantViolett 421	93	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

2.12.4 Knochenmark (BodiPY™ FL C16-Versuch)

Nach der Isolation und Co-Kultivierung gemäß Abschnitt 2.11 wurde das Knochenmark zweimal mit DPBS gewaschen und das durch Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und 4 °C gewonnene Zellpellet mit *Fixable Viability Stain* für 25 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschnitt mit PBS erfolgte die Färbung der verschiedenen Zellpopulationen durch Inkubation mit einem Antikörpermix (s. Tabelle 13) für 15 min bei 4 °C. Der Ansatz wurde für 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet mit PEB gewaschen. Das nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 800 x g und 4 °C gewonnene Zellpellet wurde in PEB aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Bei der Auswertung wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des von den HSPC aufgenommenen BodiPYs bestimmt.

Tabelle 12: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der aus Knochenmarkdipozytten aufgenommenen BodiPY-gekoppelten Fettsäuren in hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen des roten Knochenmarks

Antikörper	Klon	Hersteller
Lineage-AlexaFluor 700	145-2C11; RB6-8C5; RA3-6B2; Ter-119; M1/70;	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Fixable Viability Stain	/	BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA
CD34 PE/Dazzle	SA376A4	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD16/32-BrilliantViolett 421	93	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
CD117(c-Kit)-PE	2B8	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Ly6A/E (Sca-1)-RealBlue™ 744	D7	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA

2.13 Histologische Analysen

Alle Paraffinschnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (Rotationsmikrotom RM2255, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt, auf SuperFrost®Plus Objekträger (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgezogen und für 24 h bei RT getrocknet. Die Hitzefixierung der Paraffinschnitte auf den Objekträgern erfolgt für 60 min bei 62 °C. Die Aufnahmen der gefärbten Paraffinschnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss AxioObserver.Z1 Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland) gemacht. Die Auswertungen der Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbungen und der Gomori-Trichrom-Färbung erfolgte mit der Software ZEN 3.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland), die Analyse der Mac-2-Färbung mit der Software Fiji (frei zugänglich unter der GNU General Public License veröffentlicht).

Die für die histologischen Färbungen verwendeten Lösungen und Chemikalien sind nachfolgend in Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt. Die für die immunohistochemische Mac-2-Färbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 13: Verwendete kommerzielle Lösungen und Chemikalien für histologische Färbungen

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Hämalaunlösung nach Meyer	1.09249	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	32855	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bouin Fixiergemisch	6482.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung	HT1079	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Chromotrop 2R (Benzolazo-2-chromotropsäure Dinatriumsalz)	C3143-25G	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Essigsäure 100 %	6755.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Anilinblau	4002.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphorwolframsäure	12501-23-4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ROTICLEAR®	A538.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Mount	HP68.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ -Blockierlösung	CP26.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	DA-530	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Tris (Sigma7-9)	T1378	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	10711454001	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	11573397	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, Florida, USA

Tabelle 14: Zusammensetzung nicht-kommerzieller Lösungen für histologische Färbungen

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung nach Gomori	0,6 g Chromotrophe 2R 0,3 g Anilinblau 1 mL Eisessig 0,8 g Phosphorwolframsäure ad 100 mL destilliertes Wasser
Trispuffer	0,5 M Tris-HCl in destilliertem Wasser, pH 7,6
TB (10x)	Trispuffer Tris 1:10 in destilliertem Wasser
TBS (10x)	24,2 g Tris 80,0 g NaCl ad 1 L, pH 7,6
1 % BSA-Lösung	1 g BSA in 100 ml PBS
3 % H ₂ O ₂ -Blockierlösung	10 ml 30 % H ₂ O ₂ in 90 ml PBS
Blockierlösung	10 % 10x TBS 10 % FBS 1 % BSA in destilliertem Wasser

Tabelle 15: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti Ratte-Mac-2	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Kanada
Anti Ratte-IgG2a HRP	NB7126	Novus Biologicals, Inc., Littleton, Colorado, USA

2.13.1 Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung

Zur histologischen Untersuchung von BAT und BMAT wurden Färbungen mit H&E durchgeführt.

Es wurden 5 µm dicke konsekutive Paraffinschnitte der Tibia bzw. des BAT angefertigt, wobei vom BAT Quer- und von der Tibiae Längsschnitte erzeugt wurden.

Für die H&E-Färbung wurden die Objektträger zunächst dreimal für je 15 min mit ROTICLEAR® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert. Durch eine absteigende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) für jeweils 2 min erfolgte die Rehydrierung der Paraffinschnitte. Zur Blaufärbung der Zellkerne wurden die Objektträger für

eine Minute mit Hämalaun-Lösung (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Abschließend wurde das Zytoplasma durch die Behandlung mit einer 1 %igen Eosin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gefärbt. Mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) mit jeweils zweiminütiger Inkubationszeit wurden die Paraffinschnitte schließlich entwässert. Abschließend wurde das Eideckmedium Roti®-Mount verwendet, um die gefärbten Paraffinschnitte mit Deckgläsern abzudecken.

2.13.2 Gomori-Trichrom-Färbung

Zur Beurteilung der Infarktnarbe infarzierter Herzen wurde eine Trichrom-Färbung nach Gomori durchgeführt. Bei dieser Färbung werden Muskelfasern rot, die kollagenhaltige Matrix blau und Zellkerne schwarz angefärbt.

Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte der infarzierten Herzen angefertigt. Die Herzen wurden in zehn Ebenen geschnitten, wobei zwischen den Ebenen jeweils ca. 330 µm in Paraffin eingebettetes Organ verworfen wurde.

Die Objektträger wurden zunächst zweimal für je 15 min mittels ROTICLEAR® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Paraffinschnitte mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 70 % Ethanol) für jeweils zweimal 5 min. Zur Verbesserung der Fixierung und Farbstoffbindung wurden die Objektträger für 15 min in Bouin-Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) bei 58 °C im Wasserbad inkubiert, bevor sie 5 min unter fließendem Leitungswasser abgespült wurden. Es folgte die 5-minütige Färbung mit Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland). Nachdem die Objektträger erneut 5 min unter fließendem Leitungswasser abgespült worden waren, wurden sie für 25 min mit der Gomori-Färbelösung (s. Tabelle 14) inkubiert. Zur Differenzierung und Fixierung wurden sie anschließend zweimal für jeweils 2 min mit 0,5 %iger Essigsäurelösung inkubiert. Mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 % und 96 % Ethanol für jeweils 2 min, 100 % Ethanol zweimal für jeweils 2 min) wurden die Paraffinschnitte schließlich entwässert. Abschließend wurde das Eideckmedium Roti®-Mount verwendet, um die gefärbten Paraffinschnitte mit Deckgläsern abzudecken.

2.13.3 Mac-2 (Galectin-3)-Färbung

Zur histologischen Untersuchung der Makrophagen in den infarzierten Herzen prädiabetischer Mäuse wurde eine Mac-2-Färbung durchgeführt. Mac-2 (Galektin-3), ein β-Galactosid-bindendes Molekül der Lektin-Familie, stellt einen Marker für aktivierte Makrophagen dar.

Pro Herz wurden zehn 5 µm dicke Schnittebenen mit einem Abstand von jeweils 350 µm beginnend an der Herzspitze in Richtung der Koronarligatur angefertigt.

Die Objektträger wurden zunächst zweimal für jeweils 15 min mittels ROTICLEAR® (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und anschließend mit einer Blockierlösung gegen unspezifische Antikörperbindungen (10 % 10xTBS + 10 % FCS + 1 % BSA) vorbehandelt. Es folgte eine Inkubation über Nacht mit einem Primärantikörper gegen Mac-2 aus der Ratte (Verdünnung 1:600; Cedarlane, Burlington, Kanada) bei 4 °C. Am Folgetag wurden die endogenen Peroxidasen blockiert (3 % H₂O₂/PBS) und die Objektträger anschließend für 1 h bei RT mit einem sekundären anti-Ratte Antikörper (IgG2a *Horseradish* Peroxidase (HRP), Verdünnung 1:1000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, Colorado, USA) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Diaminobenzidin (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) und die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Abschließend wurde das Eindeckmedium Roti®-Mount verwendet, um die gefärbten Paraffinschnitte mit Deckgläsern abzudecken.

Für die Auswertung wurden die Schnittebenen 5, 6 und 7 verwendet.

2.14 Noradrenalin ELISA

Zur Bestimmung der Noradrenalin-Konzentration im Blutplasma wurde ein ultrasensitiver Norepinephrin-ELISA (Norepinephrin ELISA kit Ultra Sensitive, Immusmol, Bordeaux, Frankreich) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach Herstelleranweisung, wobei 2 µL der Proben bzw. Standardverdünnungen verwendet wurden. Die Absorption der Proben bzw. der Standardverdünnungen wurde mithilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers gemessen. Die 96-Well-Platte wurde mit der Software Gene5 2.05 (Bitek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Vereinigte Staaten) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA).

2.15 Gewinnung von Überständen des Knochenmarkfettgewebes

Das BMAT und das rote Knochenmark wurde wie bereits in Abschnitt 2.8 beschrieben gewonnen. Die Gewebe wurden unter sterilen Bedingungen in 120 µL DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) aufgenommen und für 24 h bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 14000 × g und 4 °C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden abpipettiert und bei -80 °C gelagert.

Die BMAT-Überstände, die für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) vorgesehen waren, wurden mittels Ultrazentrifugation weiter aufgereinigt. Dafür wurden die Überstände für

60 min bei 100.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden in 200 µL PBS aufgenommen und ein weiteres Mal für 60 min bei 100.000 x g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der finale Überstand wurde in 200 µL PBS aufgenommen und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

Die verwendeten Lösungen und Chemikalien für die Gewinnung von Überständen des BMAT sind nachfolgend in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Verwendete kommerzielle Lösungen und Chemikalien für die Gewinnung von Überständen des Knochenmarkfetts

Substanz	Katalognummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	11965092	Gibco®, Life Technologies, Paisley, Florida, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	11573397	Gibco®, Life Technologies, Paisley, Florida, USA
Penicillin-Streptomycin (PS)	15140122	Gibco®, Life Technologies, Paisley, Florida, USA
Dulbecco's Balanced Salt Solution (DPBS)	14190144	Gibco®, Life Technologies, Paisley, Florida, USA

2.16 Multiplex Zytokin-Assay

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sonja Hartwig und Herrn Dr. Stefan Lehr aus dem Deutschen Diabetes Zentrum (DDZ), Leibniz Zentrum für Diabetes-Forschung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde das Sekretionsprofil von murinen BMAT-Überständen sowie Überständen des roten Knochenmarks quantitativ mittels Multiplex-Analyse analysiert. Verwendet wurde ein Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Kit (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien USA), mit welchem folgende Chemokine und Zytokine quantitativ ermittelt wurden: Eosinophil-chemotaktisches Chemokin (Eotaxin), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17, MIP-1α, MIP-1β, TNF-α, Interferon (INF)-γ RANTES (*regulated and normal T cell expressed and secreted*) und Keratinozyten-anlockender Chemokin-Faktor/CXCL1 (KC).

2.17 Transmissionselektronenmikroskopie

In Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Ann Kathrin Bergmann von der *Core Facility* Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikum Düsseldorf wurden die aus dem BMAT isolierten Partikel elektronenmikroskopisch analysiert. Das BMAT wurde wie in Abschnitt 2.15 beschrieben aufbereitet.

Für die Analyse wurden die Proben mit einem Fixans, bestehend aus 2,5 % Glutaraldehyd und 4 % Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer (pH 7,4), im Verhältnis 1:3 oder 1:5 für 10 min fixiert. Es wurden 5 µL der Probe auf ein Kupfernetz pipettiert, dieser Ansatz für eine Minute bei RT inkubiert und anschließend wieder abgesaugt. Zur Kontrasterhöhung wurden 5 µL einer 1,5 % Uranylacetatlösung auf das Kupfernetz pipettiert und nach einer 1-minütigen Inkubation wieder abgesaugt. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male durchgeführt, bevor die Proben auf dem Kupfernetz elektronenmikroskopisch analysiert wurden. Verwendet wurde das Elektronenmikroskop Hitachi H7100 TEM (Hitachi, Tokio, Japan) mit Morada Kamera (EMTIS GmbH, Münster, Deutschland). Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 100 kV verwendet.

2.18 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (*standard deviation*, SD) angegeben. Statistische Ausreißer wurden mit dem Grubbs-Test ermittelt und aus den Analysen ausgeschlossen. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Waren die Daten normalverteilt, wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Datensätze der *unpaired Student's t-Test* angewendet. Bei fehlender Normalverteilung wurde der *Mann-Whitney-Test* angewendet. Zur Analyse mehrerer unabhängiger Datensätze wurde eine *Two-way ANOVA* durchgeführt, gefolgt von einem multiplem Vergleichstest nach Sidak. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkungen von Prädiabetes auf die Morphologie des braunen Fettgewebes

Zunächst wurde der Einfluss von Prädiabetes auf die Morphologie des BAT untersucht. Prädiabetes wurde durch eine neunwöchige Fütterung mit einer hochkalorischen Diät gemäß Abschnitt 2.3 induziert. Die erfolgreiche Induktion, einschließlich der Entwicklung von Übergewicht, Glukoseintoleranz und Insulinresistenz, wurde gemäß den Abschnitte 2.3, 2.4, 2.10.1 und 2.10.2 überprüft (Ergebnisse s. Appendix 1).

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wiesen prädiabetische Mäuse im Vergleich zu den nicht-prädiabetischen Kontrolltieren ein signifikant höheres Gewicht des interskapulären BAT-Depots auf. Zudem zeigte das BAT unter prädiabetischen Bedingungen einen makroskopisch erkennbaren Verlust seines tiefbraunen Erscheinungsbildes und erschien deutlich heller.

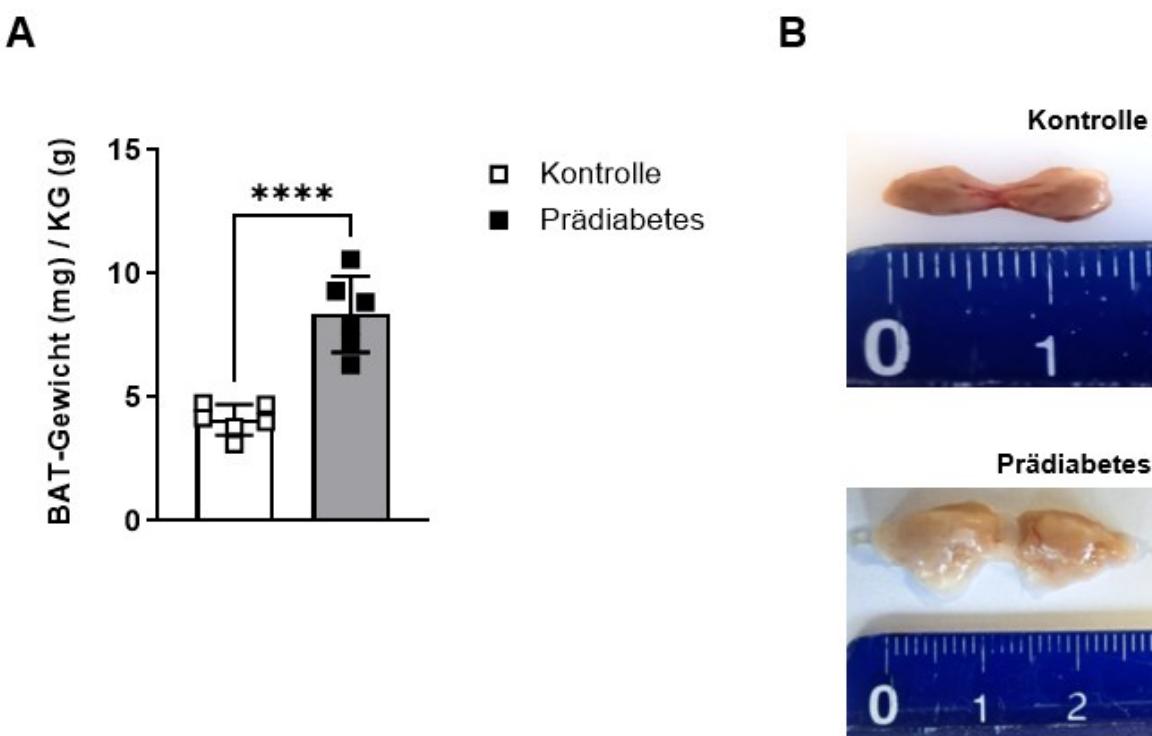


Abbildung 10: Prädiabetes führt zu einer Vergrößerung des interskapulären braunen Fettgewebes.

Analyse des interskapulären braunen Fettgewebes (BAT) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen nach neunwöchiger Fütterung (n=6). **A.** BAT-Gewicht (mg)/Körpergewicht (KG, g), **B.** Repräsentative Aufnahmen des interskapulären BAT-Depots von Kontrollen (oben) und prädiabetischen Mäusen (unten), **C.** Exemplarische Aufnahmen des BAT von Kontrollen (oben) und prädiabetischen Mäusen (unten). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test; ***p \leq 0,0001.

Die H&E-Färbung des BAT (s. Abschnitt 2.13.1) zeigte, dass Prädiabetes mit einer signifikanten Vergrößerung der braunen Adipozyten einhergeht. Mit zunehmender Adipozytengröße nahm auch die Anzahl der Adipozyten pro μm^2 im Gesichtsfeld des Paraffinschnitts im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich ab. Morphologisch ähnelten die Adipozyten unter prädiabetischen Bedingungen zunehmend weißen Adipozyten (s. Abbildung 11).

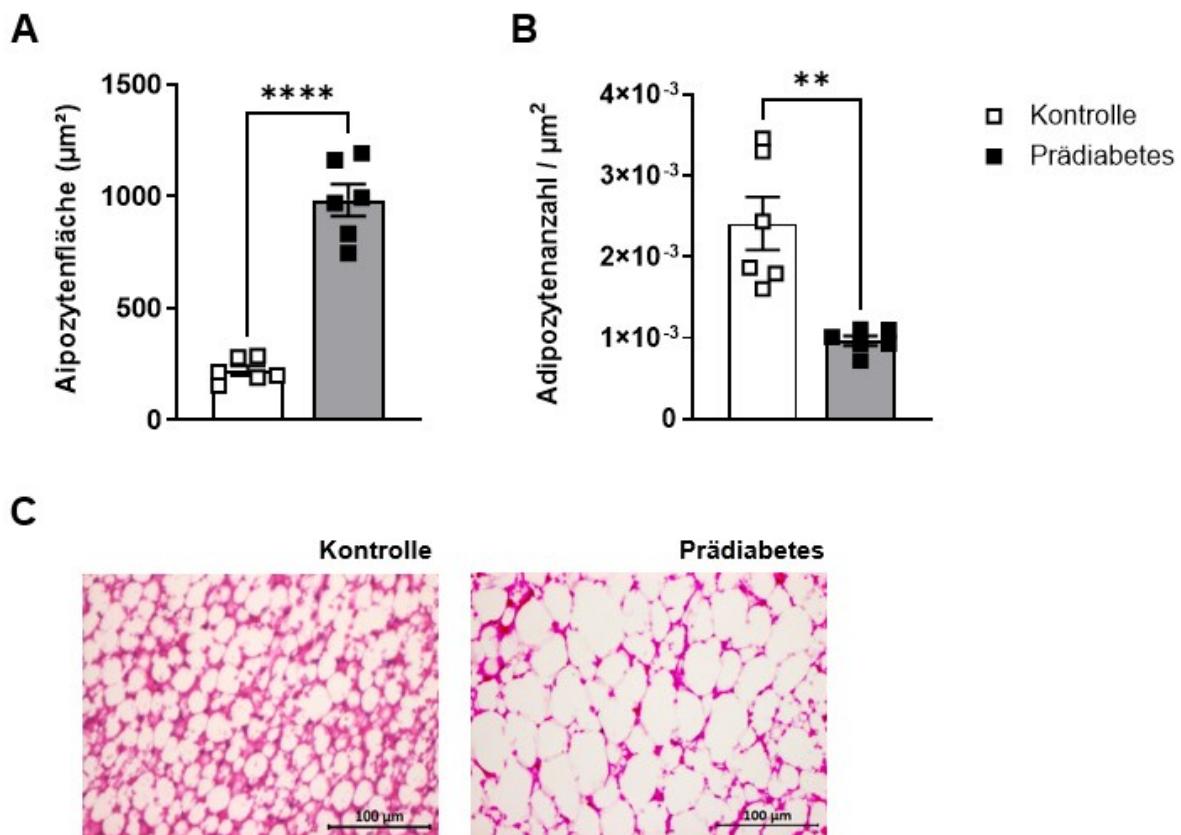


Abbildung 11: Durch Prädiabetes verändern braune Adipozyten ihre Morphologie und weisen charakteristische Merkmale weißer Adipozyten auf.

Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbungen des braunen Fettgewebes (BAT) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen nach neunwöchiger Fütterung ($n=6$). **A.** Adipozytengröße (μm^2), **B.** Adipozytenanzahl pro μm^2 , **C.** Repräsentative Aufnahmen des BAT (Maßstabsbalken: 100 μm). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,0001$.

3.1.1 Einfluss von Prädiabetes auf die Aktivität des braunen Fettgewebes nach kardialer Ischämie/Reperfusion

Im Rahmen der I/R kommt es zu einer Aktivierung des BAT ([179], Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung). Um zu untersuchen, ob dies auch zutrifft, wenn ein Prädiabetes vorliegt, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Ulrich Flögel (Institut für Molekulare Kardiologie) eine T2-Relaxometrie des BAT gemäß Abschnitt 2.7.1 vorgenommen. Die Messungen erfolgten an Tag 7 und 21 nach Induktion der kardialen I/R.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, war die T2-Relaxationszeit des BAT bei prädiabetischen Mäusen sowohl an Tag 7 als auch 21 nach der kardialen I/R signifikant höher als bei den Kontrollmäusen. Somit ging Prädiabetes im Vergleich zu einer physiologischen Stoffwechsellage mit einer Reduktion der postischämischen BAT-Aktivität einher.

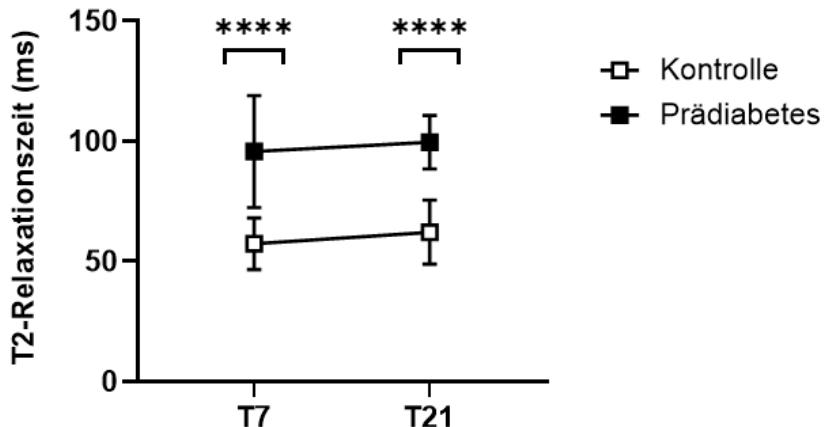


Abbildung 12: Prädiabetes führt zu einer geringeren Aktivität des braunen Fettgewebes nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion.

T2-Relaxationszeiten von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen an Tag 7 und 21 nach der I/R (n=10). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; ***p \leq 0,0001.

3.1.2 Einfluss von Prädiabetes auf die Morphologie des braunen Fettgewebes im Kontext der kardialen Ischämie/Reperfusion

Im Anschluss wurde untersucht, wie sich Prädiabetes und die damit einhergehende reduzierte BAT-Aktivität bei einer kardialen I/R auf die Morphologie des BAT auswirken. Wie in Abbildung 13 dargestellt, war das interskapuläre BAT-Depot prädiabetischer Tiere – ähnlich wie bereits unter basalen Bedingungen (s. Abschnitt 3.1) - auch nach der kardialen I/R signifikant schwerer als bei den nicht-prädiabetischen Kontrolltieren. Die kardiale I/R führte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion des BAT-Gewichts, wobei das Ausmaß des Gewichtsverlusts zwischen den beiden Gruppen vergleichbar war (s. Abbildung 13B).

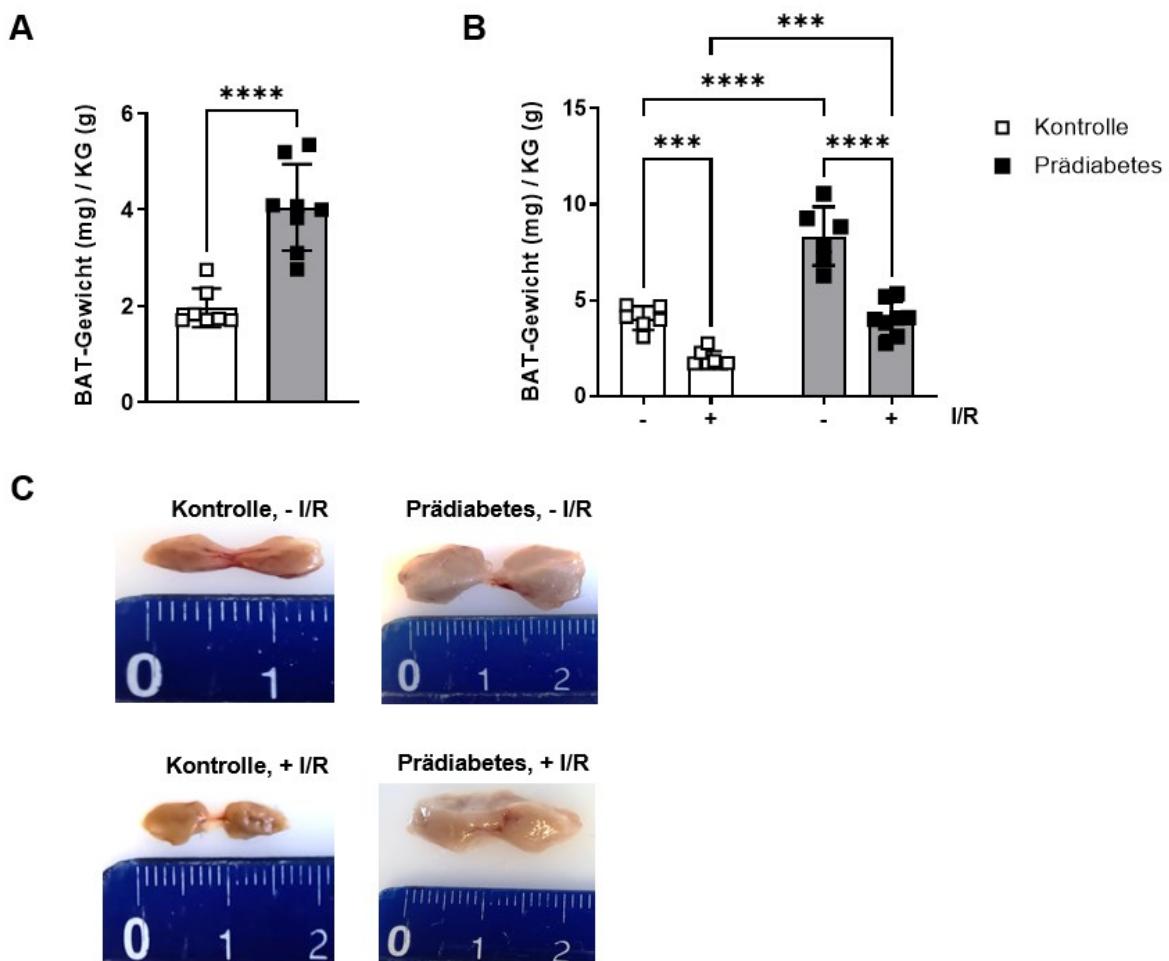


Abbildung 13: Das Gewicht des interskapulären braunen Fettgewebes ist nach kardialer Ischämie/Reperfusion unter prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Bedingungen gleichermaßen reduziert.

Gewicht des interskapulären braunen Fettgewebes (BAT, normalisiert auf das Körpergewicht) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen. **A.** BAT-Gewicht drei Tage nach der I/R („+ I/R“) (n=7,8), **B.** Veränderung des BAT-Gewicht durch die I/R im Vergleich zum Ausgangswert nach neunwöchiger Fütterung („- I/R“) (n=6,7,6,8), **C.** Exemplarische Aufnahmen des BAT von Kontrollen (links) und prädiabetischen Mäusen (rechts) ohne („- I/R“) und mit I/R („+ I/R“). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test (A) und zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest (B); ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001.

Die H&E-Färbung des interskapulären BAT-Depots, das drei Tage nach der kardialen I/R aus prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Mäusen entnommen wurde, zeigte, dass die brauen Adipozyten unter prädiabetischen Bedingungen auch nach der I/R deutlich größer blieben als in der Kontrollgruppe (s. Abbildung 14A). In den ausgewerteten Paraffinschnitten war zudem die Anzahl der Adipozyten pro μm^2 im analysierten Gesichtsfeld bei prädiabetischen Tieren signifikant geringer als bei nicht-prädiabetischen Tieren (s. Abbildung 14B).

Unabhängig vom metabolischen Status führte die I/R in beiden Gruppen zu einer signifikanten Verringerung der Adipozytengröße. Dieser Effekt war unter nicht-prädiabetischen Bedingungen jedoch deutlich ausgeprägter als bei prädiabetischen Tieren (s. Abbildung 14C).

In den analysierten Paraffinschnitten zeigte sich zudem bei nicht-prädiabetischen Tieren eine durch die I/R bedingte Abnahme der Adipozytenzahl pro μm^2 im untersuchten Gesichtsfeld. Dieser Effekt war bei prädiabetischen Tieren nicht zu beobachten (s. Abbildung 14D).

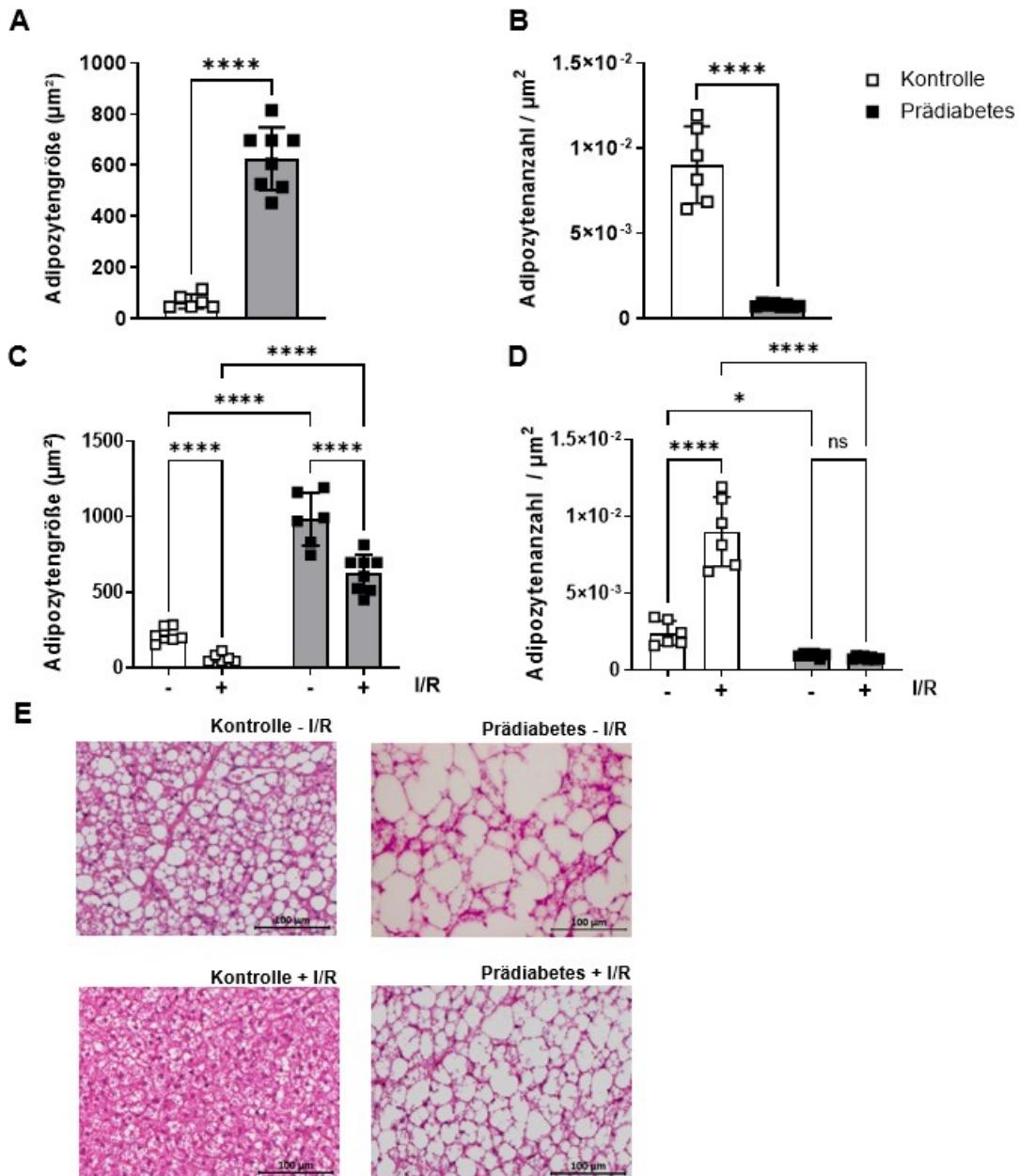


Abbildung 14: Prädiabetes beeinträchtigt die Lipolyse brauner Adipozyten nach der kardialen Ischämie/Reperfusion.

H&E-Färbungen des braunen Fettgewebes (BAT) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen. **A.** Adipozytentypgröße (μm^2) (n=6,8), **B.** Adipozytenanzahl/ μm^2 (n=6,8), **C.** Veränderung der Adipozytentypgröße (μm^2) durch die I/R im Vergleich zum Ausgangswert nach neunwöchiger Fütterung („- I/R“) (n=6,6,6,8), **D.** Veränderung der Adipozytenanzahl pro μm^2 durch die I/R im Vergleich zum Ausgangswert nach neunwöchiger Fütterung („- I/R“) (n=6,6,6,8), **E.** Repräsentative Aufnahmen des BAT (Maßstabsbalken: 100 μm). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test (A, B) und zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest (C, D); ****p \leq 0,0001.

3.2 Auswirkungen von Prädiabetes auf die Funktionalität des braunen Fettgewebes bei kardialer Ischämie/Reperfusion

Wie in Abschnitt 1.1.2 erläutert, verwendet BAT für seine zentrale Funktion der zitterfreien Thermogenese primär NEFA und Glukose als Substrate.

Um zu untersuchen, ob die durch den Prädiabetes induzierten Veränderungen des BAT Auswirkungen auf die zitterfreie Thermogenese haben, wurde das interskapuläre BAT-Depot drei Tage vor der Induktion der I/R gemäß Abschnitt 2.6 chirurgisch entfernt. Die NEFA- und Glukosekonzentrationen im Blutplasma prädiabetischer und nicht-prädiabetischer wurden drei Tage nach der I/R als Surrogatparameter für die Thermogenese gemäß Abschnitt 2.10 analysiert.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, führte die BAT-Ablation bei nicht-prädiabetischen Tieren zu einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden NEFA-Konzentration, während dieser Effekt unter prädiabetischen Bedingungen nicht beobachtet wurde. Auf die Glukosekonzentration im Blutplasma hatten weder die BAT-Ablation noch der Prädiabetes einen Einfluss.

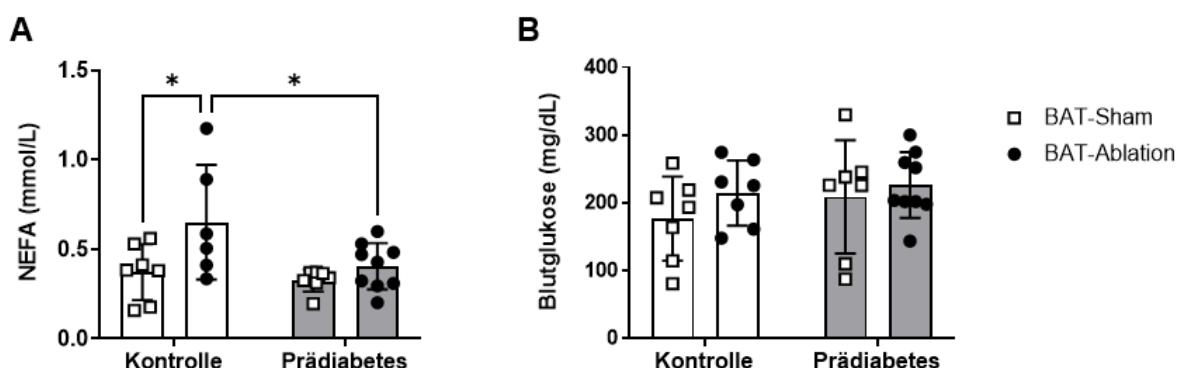


Abbildung 15: Bei Prädiabetes bewirkt die Entfernung des braunen Fettgewebes keinen Anstieg der zirkulierenden freien Fettsäuren nach kardialer Ischämie/Reperfusion.

Analyse der Konzentrationen freier Fettsäuren (NEFA) und Glukose im Blutplasma von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP drei Tage nach der kardialen I/R (n=7,7,7,9). **A.** NEFA-Konzentration, **B.** Blutglukose-Konzentration. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05.

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist das BAT stark sympathisch innerviert und wird durch die Bindung von Noradrenalin an β_3 -Adrenorezeptoren auf braunen Adipozyten aktiviert. Um zu überprüfen, ob der bei Prädiabetes ausbleibende Anstieg zirkulierender NEFA nach der BAT-Ablation mit einer veränderten sympathischen Aktivität einhergeht, wurde die Noradrenalkonzentration im Blutplasma von BAT-ablatierten und BAT-Sham-operierten prädiabetischen Mäusen sowie nicht-prädiabetischen Kontrollen einen Tag nach der I/R

gemäß Abschnitt 2.14 bestimmt. Wie Abbildung 16 zeigt, hatte weder die BAT-Ablation noch Prädiabetes einen Einfluss auf die sympathische Aktivität.

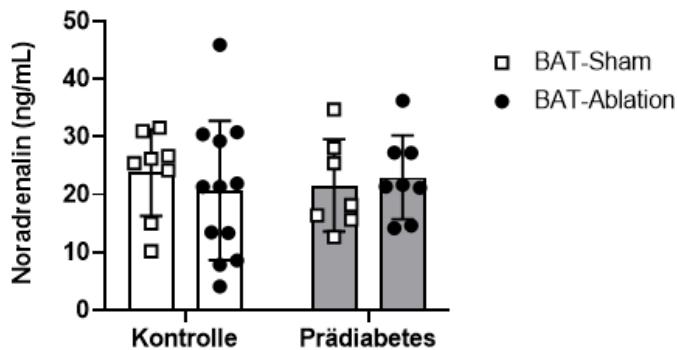


Abbildung 16: Die Entfernung des braunen Fettgewebes beeinflusst die sympathische Aktivität nach kardialer Ischämie/Reperfusion weder unter prädiabetischen noch unter nicht-prädiabetischen Bedingungen.

Bestimmung der Konzentration von Noradrenalin im Blutplasma von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP einen Tag nach der I/R (n=8,12,7,8). Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

3.3 Einfluss von Prädiabetes auf die kardialen Effekte des braunen Fettgewebes nach kardialer Ischämie/Reperfusion

3.3.1 Ischämisches Areal

Wie in Abschnitt 1.1.2 erläutert, werden dem BAT zahlreiche positive kardiovaskuläre Effekte zugeschrieben. Zur Untersuchung des Einflusses von BAT auf das Herz wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Flögel die Größe des ischämischen Areals im Herzen von BAT-ablasierten und BAT-Sham-operierten Mäusen sowohl unter prädiabetischen als auch unter Kontrollbedingungen mittels *Late-Gadolinium-Enhancement* analysiert (s. Abschnitt 2.7.2).

Wie Abbildung 17 zeigt, hatte die chirurgische Entfernung des BAT unter beiden Stoffwechselbedingungen keinen Einfluss auf die Größe des ischämischen Areals im Myokard.



Abbildung 17: Braunes Fettgewebe beeinflusst die Größe des ischämischen Areals nach der kardialen Ischämie/Reperfusion weder unter prädiabetischen noch unter prädiabetischen Bedingungen.

A. Bestimmung des ischämischen Areals im Herzen von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP einen Tag nach der I/R mittels MRT (n=6,8,8,9), B. Repräsentative Aufnahme eines mit Gadolinium angereicherten ischämischen Areals im Herzen einer prädiabetischen BAT-Sham-Maus an Tag 1 nach der kardialen I/R. Das ischämische Areal (hellgrau) ist durch gelbe Pfeile markiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

3.3.2 Herzfunktion

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Ablation des BAT bei nicht-prädiabetischen Mäusen zu einer anhaltenden Verschlechterung der Herzfunktion nach einer kardialen I/R führt ([177], Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung). Um zu untersuchen, ob die kardioprotektive Wirkung des BAT durch Prädabetes verändert wird, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrich Flögel funktionelle Herzparameter von BAT-ablatierten und BAT-Sham-operierten prädiabetischen Mäusen gemäß 2.7.3 erfasst. Die Messungen erfolgten an den Tagen 1, 7 und 21 nach der I/R.

Wie in Abbildung 18 dargestellt, führte die BAT-Ablation im prädiabetischen Modell zu einer signifikanten, jedoch nur transienten Verschlechterung der Herzfunktion. Die Ejektionsfraktion (EF) und das Schlagvolumen (SV) waren im Vergleich zur BAT-Sham-Gruppe signifikant reduziert, jedoch ausschließlich an Tag 7 nach der I/R. Diese funktionelle Beeinträchtigung war weder an Tag eins noch an Tag 21 nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte das endsystolische Volumen (SV) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an Tag 1 und Tag 7, war jedoch an Tag 21 in den BAT-ablatierten Mäusen im Vergleich zu den BAT-Sham-Tieren signifikant erhöht.

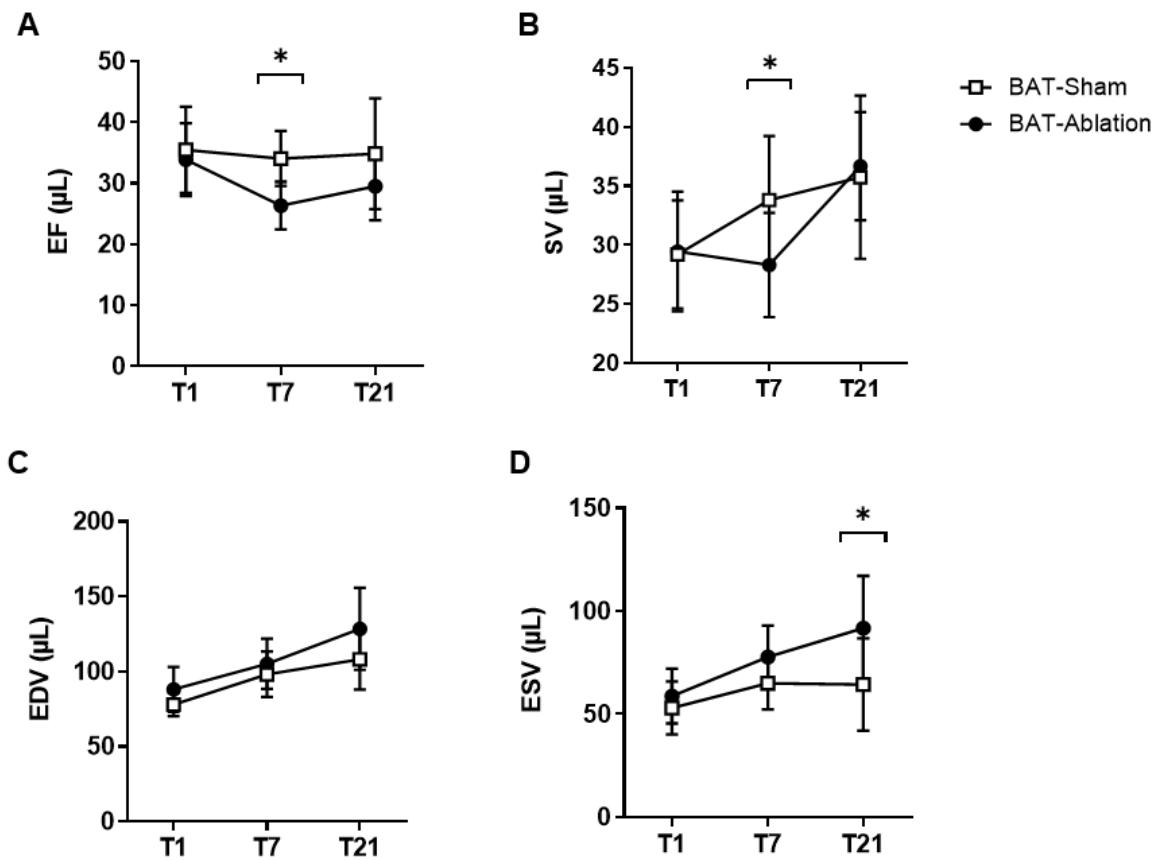


Abbildung 18: Unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen verursacht die Entfernung des braunen Fettgewebes eine transiente Verschlechterung der Herzfunktion.

Magnetresonanztomographische Analyse der Herzfunktion prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP an den Tagen (T) 1, 7 und 21 nach der kardialen I/R (n=8, 8).

A. Ejektionsfraktion (EF), **B.** Schlagvolumen (SV), **C.** Enddiastolisches Volumen (EDV), **D.** Endsysstolisches Volumen (ESV). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

3.3.3 Kardiale Inflammation

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die BAT-Ablation bei nicht-prädiabetischen Mäusen mit einer erhöhten Infiltration myeloider Zellpopulationen in das infarzierte Myokard assoziiert ist ([177], Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung).

Um zu untersuchen, inwiefern die BAT-Ablation die kardiale Entzündungsreaktion nach der I/R unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen beeinflusst, wurden an Tag 3 nach der I/R durchflusszytometrische Analysen kardialer Immunzellen gemäß Abschnitt 2.12.3 durchgeführt.

Wie Abbildung 19 zeigt, ergaben sich zum untersuchten Versuchszeitpunkt in keinem der untersuchten Immunzelltypen Unterschiede zwischen BAT-Sham- und BAT-ablasierten prädiabetischen Mäusen.

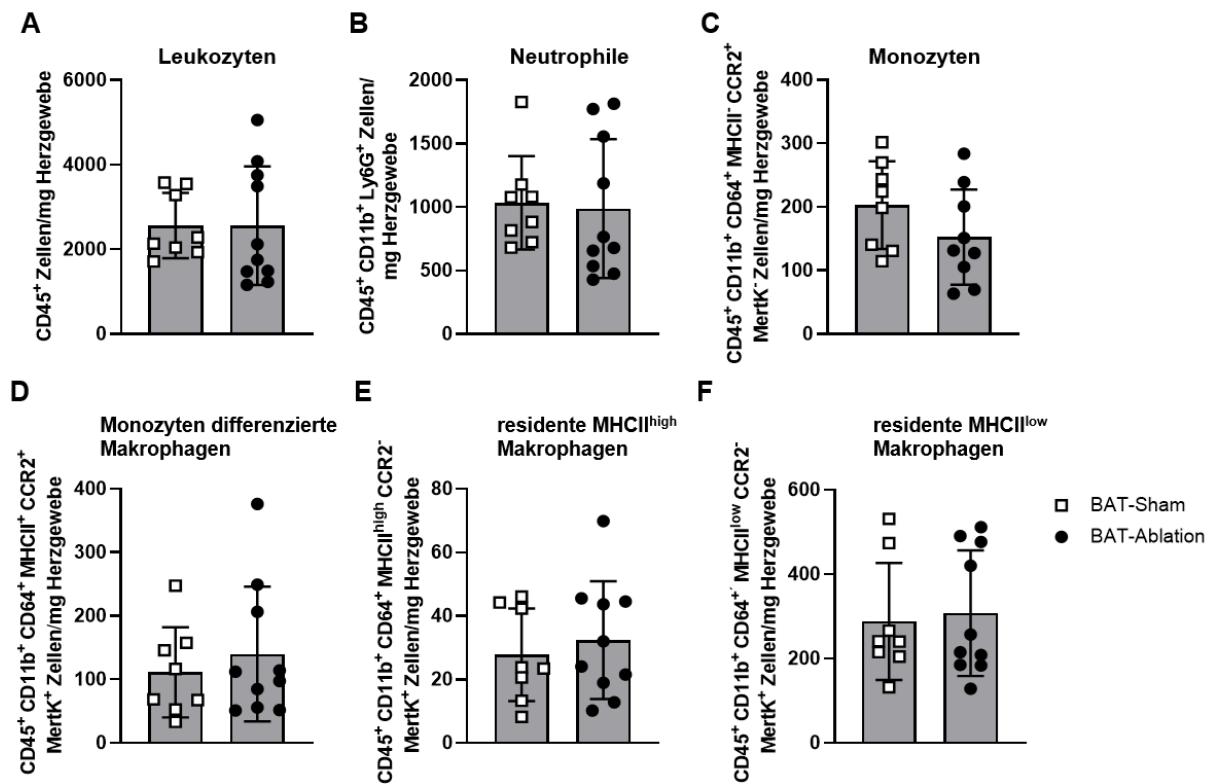


Abbildung 19: Die Ablation von braunem Fettgewebe hat bei Prädabetes keinen Einfluss auf die Akkumulation myeloider Zellen im infarzierten Herzen.

Durchflusszytometrische Analyse von kardialen Immunzellen prädibetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP an Tag 3 nach der I/R (n=8,10). Die Immunzellanzahl wurde auf das Herzgewicht (in mg) normalisiert. **A.** Leukozyten, **B.** Neutrophele, **C.** Monozyten, **D.** Monozyten differenzierte Makrophagen, **E.** residente MHCII^{high}-Makrophagen, **F.** residente MHCII^{low}-Makrophagen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test.

Um die kardiale Inflammation auch histologisch zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Mac-2-Färbung an Herzschnitten prädibetischer Mäuse an Tag 3 nach der I/R durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.13.3). Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl aktiverter Makrophagen zwischen BAT-Sham-operierten und BAT-ablatierten Mäuse.

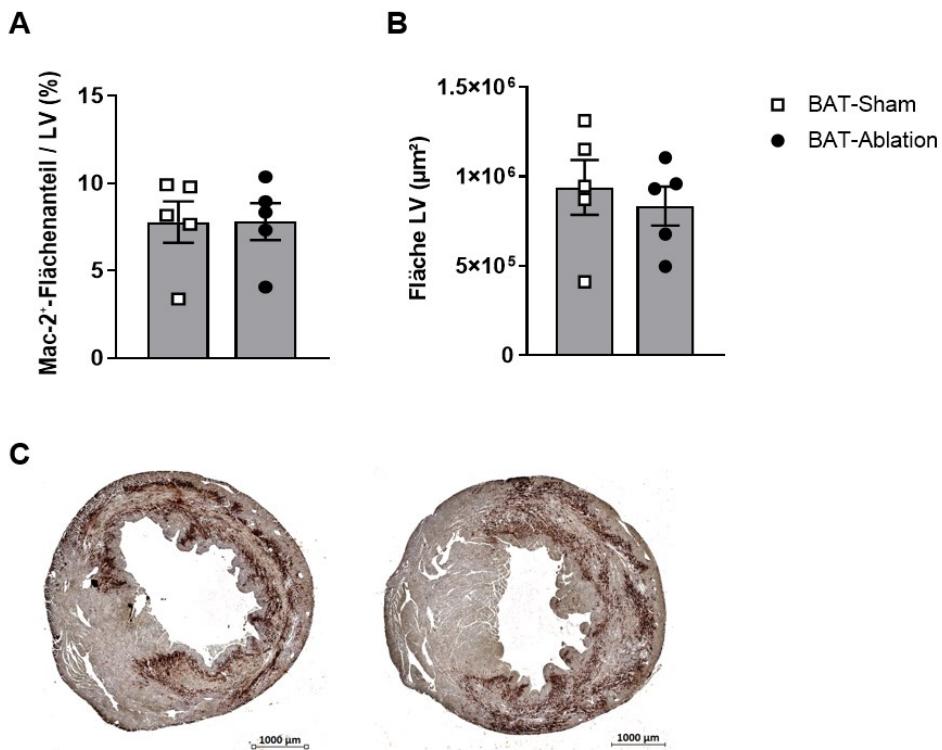


Abbildung 20: Die Ablation von braunem Fettgewebe hat bei Prädiabetes keinen Einfluss auf die Anzahl der Makrophagen im infarzierten Herzen.

Mac-2-Färbung des braunen Fettgewebes (BAT) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Sham bzw. BAT-Ablation drei Tage nach der kardialen I/R (n=5). **A.** Mac-2⁺-Flächenanteil/linker Ventrikel (LV) (%), **B.** Fläche des LV, **C.** Repräsentative Aufnahmen der Herzen BAT-sham-operierter (links) und BAT-ablatiater (rechts) Mäuse (Maßstabsbalken: 1000 μ m). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test.

3.3.4 Narbengröße und linksventrikuläre Wanddicke

Um die Auswirkungen einer BAT-Ablation auf strukturelle Veränderungen des Herzens nach einer kardialen I/R unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen zu untersuchen, wurde eine Gomori-Trichrom-Färbung infarziertes Herzen an Tag 21 nach der I/R gemäß Abschnitt 2.13.2 durchgeführt.

Abbildung 21 zeigt, dass unter nicht-prädiabetischen Bedingungen die chirurgische Entfernung des BAT zu einer signifikant größeren Narbengröße und einer Verringerung der linksventrikulären Wanddicke im Vergleich zur BAT-Sham-OP führt. Die repräsentativen Aufnahmen der Gomori-Trichrom-Färbung veranschaulichen, dass die infarzierten Herzen stoffwechselgesunder BAT-ablatiater Tiere eine ausgeprägte dilative Charakteristik aufweisen, die bei den BAT-Sham-operierten Kontrollen nicht beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu zeigten prädiabetische Herzen keine derartigen Veränderungen.

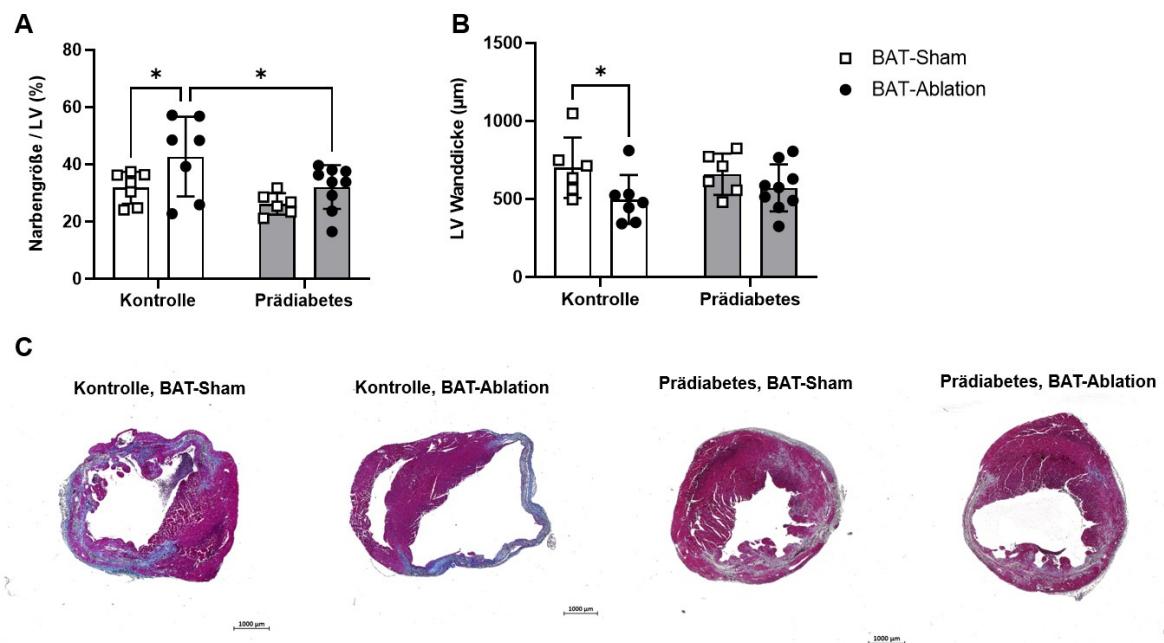


Abbildung 21: Die Ablation des braunen Fettgewebes hat bei Prädiabetes keinen Effekt auf die Narbengröße und linksventrikuläre Wanddicke.

Gomori-Trichrom-Färbung von infarzierten Herzen prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP an Tag 21 nach der kardialen I/R (n=7,7,6,9). **A.** Narbengröße / linker Ventrikel (LV) (%), **B.** Linksventrikuläre (LV) Wanddicke (µm) (n=6,7,6,9), **C.** Repräsentative Aufnahmen von Gomori-gefärbten Herzen, Maßstabsbalken: 1000 µm. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05.

3.4 Einfluss des braunen Fettgewebes auf das Knochenmark nach kardialer Ischämie/Reperfusion

3.4.1 Das Immun- und Stammzellreservoir im roten Knochenmark

Um die Unterschiede im kardialen *Outcome* zwischen den Kontrollen und prädiabetischen Mäusen weiter zu untersuchen, wurden zunächst die HSPC und Immunzellen gemäß 2.12.1 durchflusszytometrisch analysiert. Die *Gating*-Schemata sind in Appendix 2 und Appendix 3 dargestellt.

Unter prädiabetischen Bedingungen hatte die BAT-Ablation keinen Effekt auf die Anzahl der HSPC im roten Knochenmark (s. Abbildung 22). In nicht-prädiabetischen Kontrolltieren hingegen führte die BAT-Ablation zu einer signifikanten Erhöhung der absoluten Zellzahlen von LSK⁺-HSPC, Langzeit (*long term*, LT)-HSPC, Kurzzeit (*short term*, ST)-HSPC sowie Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen (*granulocyte and macrophage progenitors*, GMP). Zusätzlich zeigten die (Lin⁻-Zellen unter diesen Bedingungen einen Trend zu einer erhöhten Zellanzahl. Darüber hinaus waren die absoluten Zellzahlen von LSK⁺-HSPC, LT-HSPC, ST-HSPC, multipotenten Progenitorzellen (MPP) Typ 2 und MPP3&4, myeloiden Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors* (CMP), GMP sowie Megakaryozyten- und

Erythrozyten-Vorläuferzellen (*megakaryocyte and erythrocyte progenitors*, MEP) nach BAT-Ablation in den nicht-prädiabetischen Mäusen signifikant höher als in den prädiabetischen.

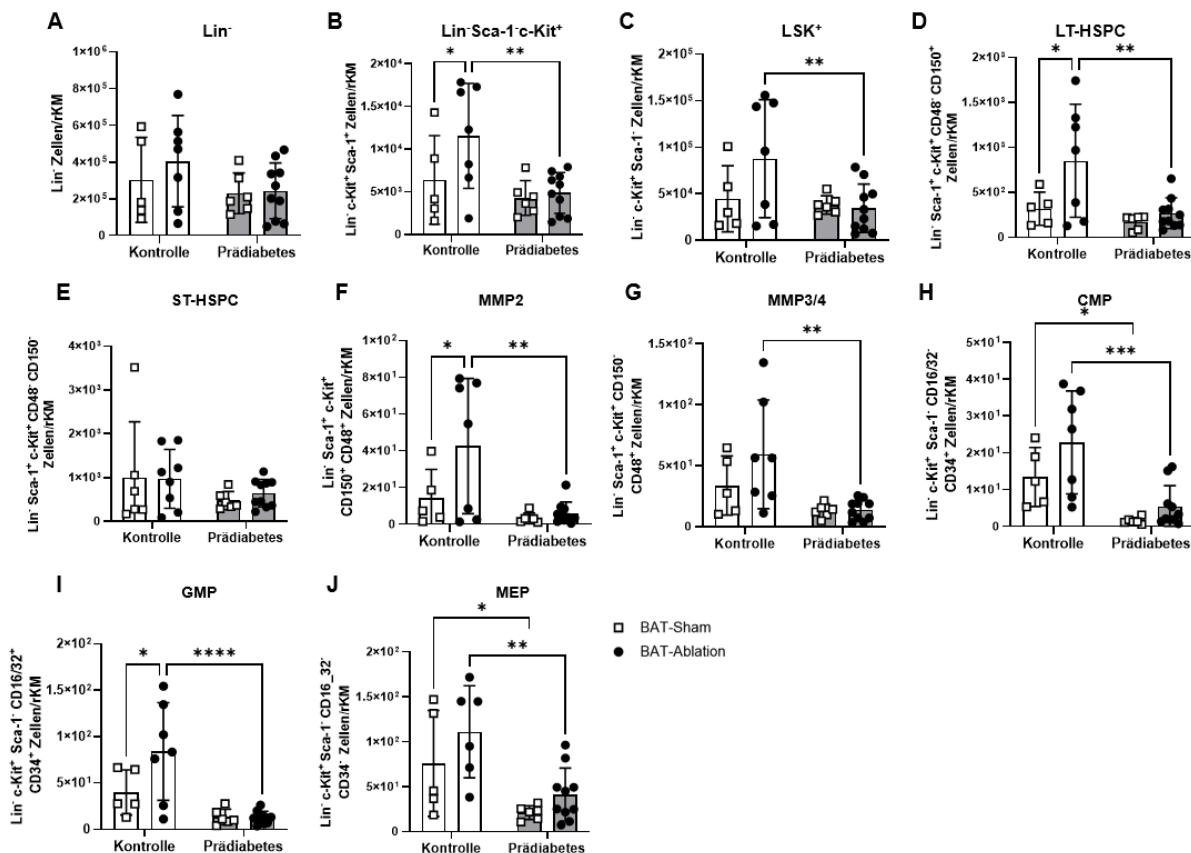


Abbildung 22: In der Akutphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion erhöht die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse von HSPC im roten Knochenmark (rKM) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP an Tag 1 nach der I/R (n=5,7,6,10). **A.** Linien-negative (Lin⁻) Zellen, **B.** Lin⁻Sca-1+c-Kit⁺-Zellen, **C.** LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺Kit⁺)-Zellen, **D.** CD34+ Langzeit; long term (LT)-HSPC, **E.** CD34+ Kurzzeit; short term (ST)-HSPC (n=8,9), **F.** multipotente Progenitorzellen (MPP) Typ 2, **G.** multipotente Progenitorzellen (MPP) Typ 3&4, **H.** myeloide Vorläuferzellen; common myeloid progenitors (CMP), **I.** Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen; granulocyte/macrophage progenitors (GMP), **J.** Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzellen; megakaryocyte/erythrocyte progenitors (MEP). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001.

Während die BAT-Ablation unter prädiabetischen Bedingungen an Tag 1 nach der I/R keinen Einfluss auf die reifen Immunzellen im roten Knochenmark hatte, bewirkte sie unter nicht-prädiabetischen Bedingungen eine ausgeprägte proinflammatorische Reaktion, die sich in einem signifikanten Anstieg der Gesamtzahl der Leukozyten zeigte (s. Abbildung 23A). Die detaillierte Analyse der myeloiden Subpopulationen ergab eine signifikante Zunahme der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten, insbesondere der Ly6^{high}- und Ly6^{medium}-Monozyten, durch die BAT-Ablation (s. Abbildung 23B-F). Im Gegensatz dazu blieben die lymphoiden Subpopulationen (s. Abbildung 23G-K) unter diesen Bedingungen unverändert.

Darüber hinaus war die absolute Anzahl der folgenden Immunzellsubpopulationen im roten Knochenmark von BAT-ablatierten nicht-prädiabetischen Mäuse im Vergleich zu BAT-ablatierten prädiabetischen Tieren signifikant erhöht: Leukozyten, Neutrophile, Monozyten, Ly6C^{high} und Ly6C^{medium} Monozyten, Lymphozyten, B-Zellen und T-Helferzellen.

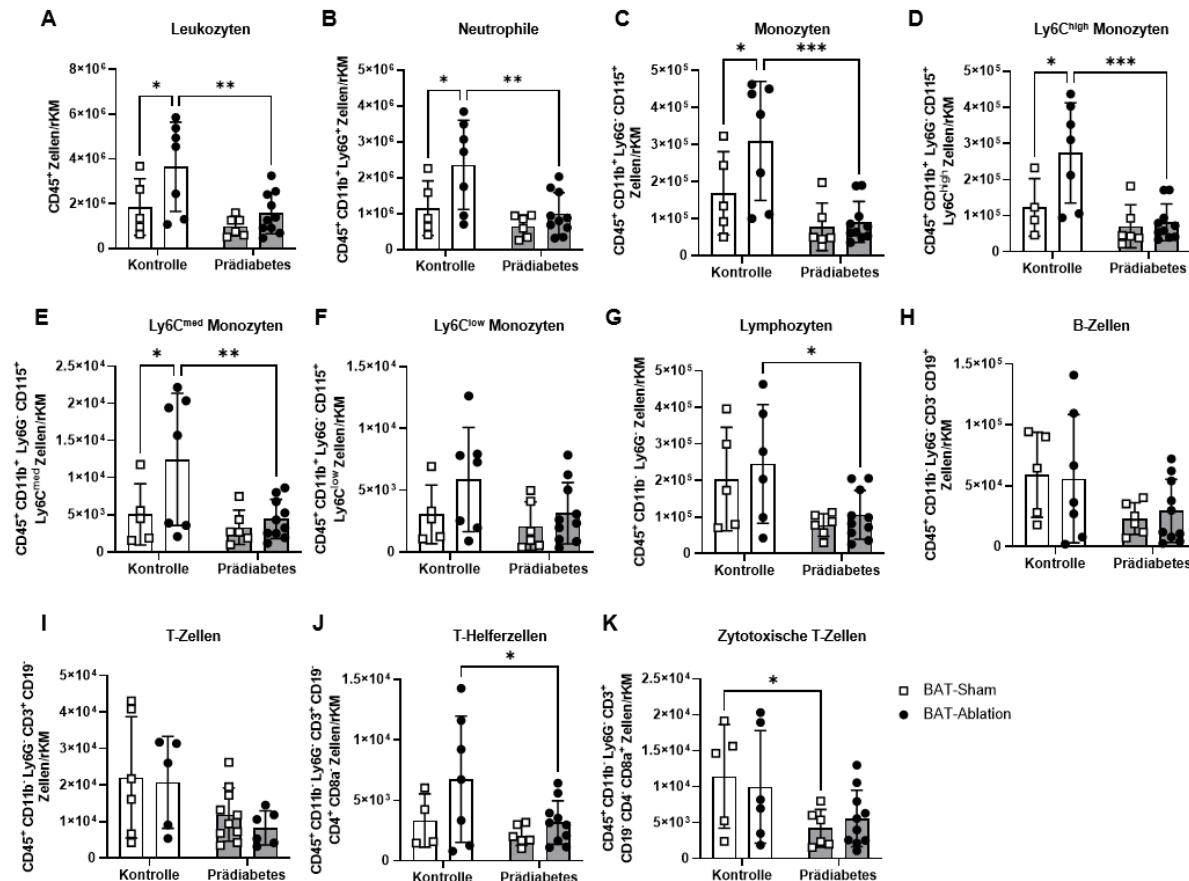


Abbildung 23: In der Akutphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion erhöht die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl reifer Immunzellen im roten Knochenmark ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse reifer CD45⁺ Immunzellen im roten Knochenmark (rKM) von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP einen Tag nach der I/R (n=5,6,6,10). **A.** Leukozyten, **B.** Neutrophile, **C.** Monozyten, **D.** Ly6C^{high} Monozyten, **E.** Ly6C^{medium} Monozyten, **F.** Ly6C^{low} Monozyten, **G.** Lymphozyten, **H.** B-Zellen, **I.** T-Zellen, **J.** T-Helferzellen, **K.** Zytotoxische T-Zellen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

Um zu untersuchen, ob die durch die BAT-Ablation induzierte Verstärkung der Immunantwort im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse auch in der Spätphase nach kardialer I/R fortbesteht, wurden die durchflusszytometrischen Analysen für diese Gruppe an Tag 21 nach der kardialen I/R erneut durchgeführt. Wie in Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt, zeigte sich in der Spätphase nach der I/R kein Effekt der BAT-Ablation auf HSPC und reife Immunzellen.

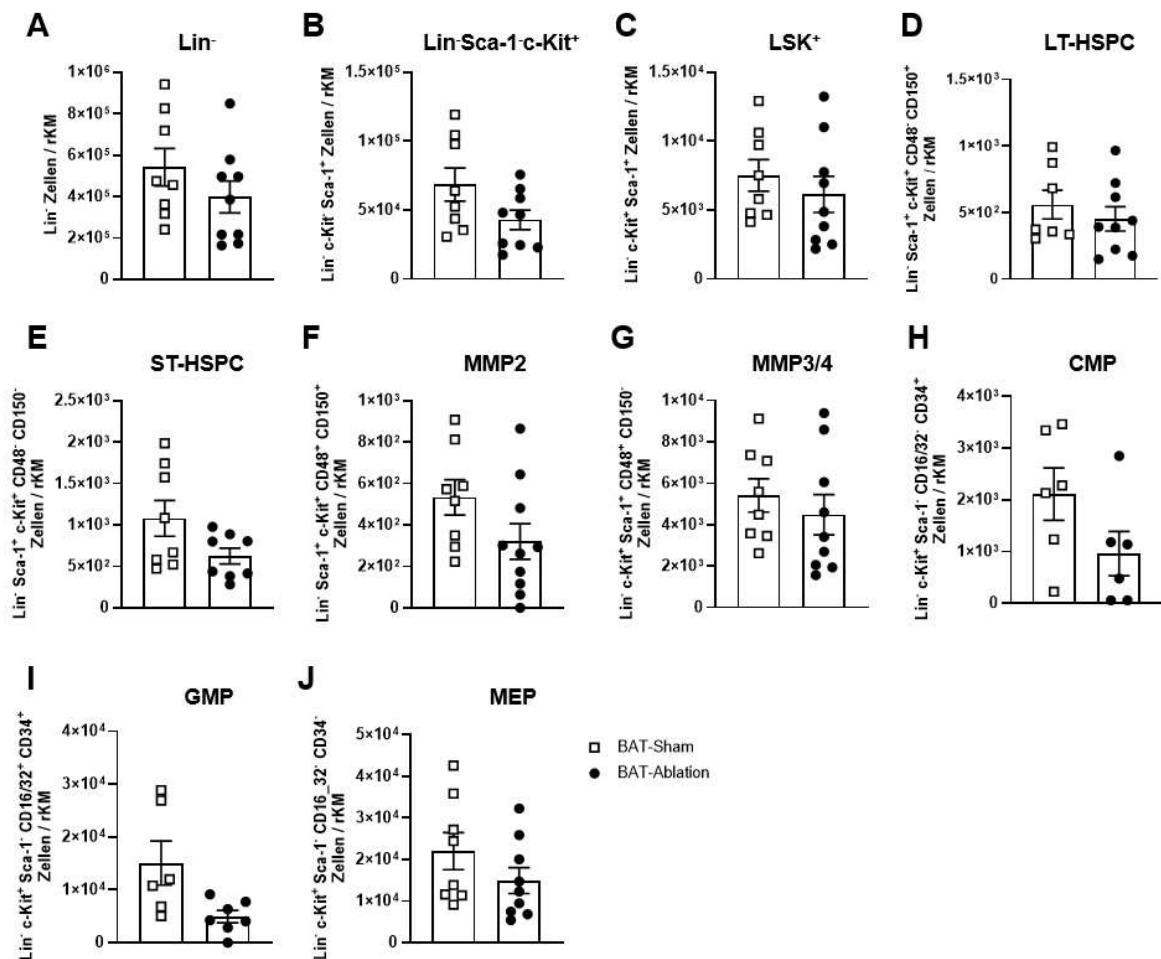


Abbildung 24: In der Spätphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion hat die Ablation des braunen Fettgewebes keinen Einfluss auf die Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.

Durchflusszytometrische Analyse von HSPC im roten Knochenmark (rKM) prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP 21 Tage nach der I/R. **A.** Linien-negative (Lin⁻) Zellen (n=8,9), **B.** Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (n=8,9), **C.** LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) Zellen (n=8,9), **D.** CD34⁻ Langzeit; long term (LT)-HSPC (n=7,9), **E.** CD34⁺ Kurzzeit; short term (ST)-HSPC (n=8,9), **F.** Multipotente Progenitorzellen (MPP) Typ 2 (n=8,9), **G.** Multipotente Progenitorzellen (MPP) Typ 3&4 (n=8,9), **H.** Myeloide Vorläuferzellen; common myeloid progenitors (CMP) (n=6,6), **I.** Granulozyten und Makrophagen-Vorläuferzellen (n=6,6); granulocyte/macrophage progenitors (GMP) (n=6,7), **J.** Megakaryozyten und Erythrozyten-Vorläuferzellen; megakaryocyte/erythrocyte progenitors (MEP) (n=8,9). Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test.

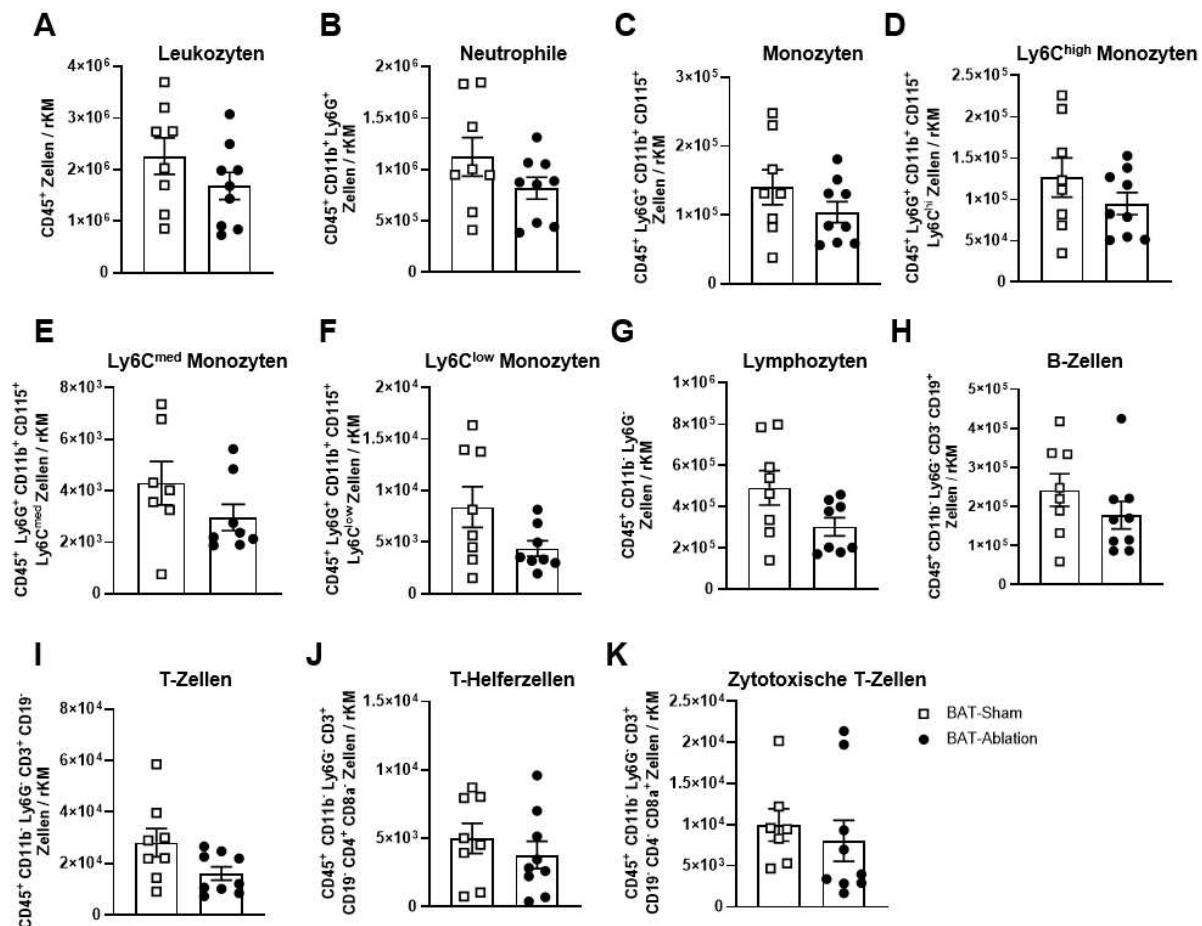


Abbildung 25: In der Spätphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion beeinflusst die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl reifer Immunzellen im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse nicht.

Durchflusszytometrische Analyse reifer CD45⁺ Immunzellen im roten Knochenmark (rKM) nicht-prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP 21 Tage nach der I/R. **A.** Leukozyten (n=8,9), **B.** Neutrophile Granulozyten (n=8,9), **C.** Monozyten (n=8,9), **D.** Ly6^{Chigh} Monozyten (n=8,9), **E.** Ly6C^{medium} Monozyten (n=7,8), **F.** Ly6C^{low} Monozyten (n=8,8), **G.** Lymphozyten (n=8,8), **H.** B-Zellen (n=8,9), **I.** T-Zellen (n=8,9), **J.** T-Helferzellen (n=8,9), **K.** Zytotoxische T-Zellen (n=7,9). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test bzw. Mann-Whitney-Test.

3.4.2 Sekretionsprofil des roten Knochenmarks

Da sich die BAT-Ablation lediglich unter nicht-prädiabetischen Bedingungen auf die Inflammationsantwort im roten Knochenmark auswirkte, wurden im nächsten Schritt mittels Multiplex-Immunoassay (s. Abschnitt 2.16) die Konzentration von Zytokinen und Chemokinen im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse an Tag 1 nach der kardialen /R untersucht.

Wie Abbildung 26 zeigt, führte die BAT-Ablation zu einem signifikanten Anstieg von MIP-1 β (CCL4), einem proinflammatorischen Zytokin, das die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung vermittelt [187]. Auf alle weiteren analysierten Zytokine und Chemokine hatte die BAT-Ablation keinen signifikanten Effekt.

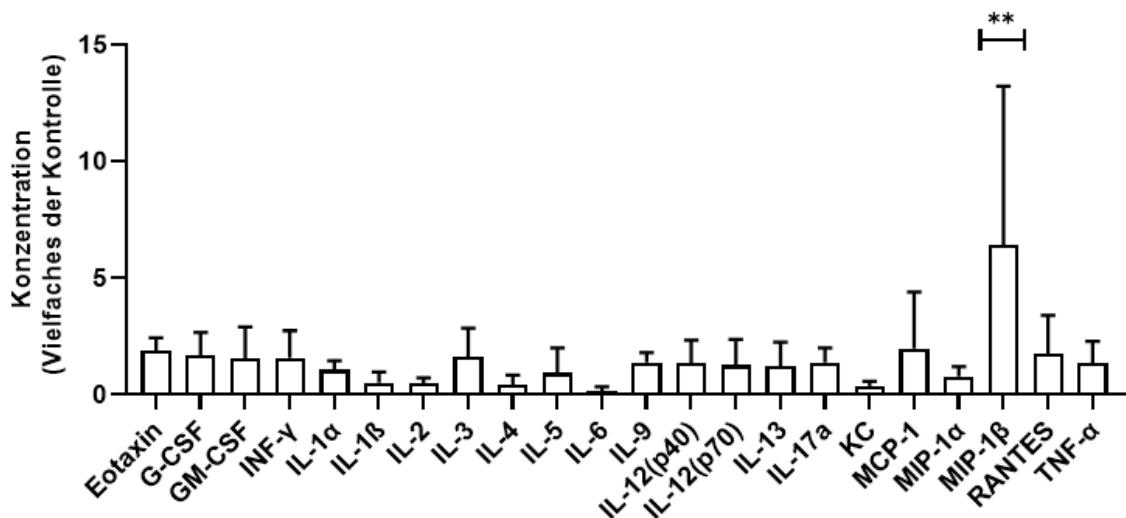


Abbildung 26: Die Ablation des braunen Fettgewebes bewirkt eine marginale proinflammatorische Immunantwort im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.

Ergebnisse des Multiplex-Immunoassays von Zellkulturüberständen vom roten Knochenmark nicht-prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP an Tag 1 nach der kardialen I/R. Dargestellt sind die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen als Vielfaches der Kontrolle (= BAT-Sham). Die ermittelten Konzentrationen wurden auf das Gewicht des roten Knochenmarks normalisiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. Die Anzahl der Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze sind jeweils in eckigen Klammern hinter den Behandlungsgruppen (BAT-Sham bzw. BAT-Ablation) angegeben. *Eosinophil chemotactic chemokines* (Eotaxin) (n=4,5 [n=1,3]), *G-CSF* (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n=3,5 [n=1,3]), *GM-CSF* (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (n=4,3 [n=1,5]), *Interferon-γ* (INF-γ) (n=4,5, [n=1,3]), *Interleukin (IL)-1α* (n=3,5 [n=1,3]), *IL-1β* (n=4,5 [n=1,3]), *IL-2* (n=2,4 [n=3,4]), *IL-3* (n=4,4 [n=1,4]), *IL-4* (n=4,5 [n=1,3]), *IL-5* (n=4,5 [n=1,3]), *IL-6* (n=3,3 [n=1,4]), *IL-9* (n=3,4 [n=2,4]), *IL-10* (n=3,5 [n=2,3]), *IL-12 (p40)* (n=5,4 [n=1,3]), *IL-12 (p70)* (n=4,4 [n=1,4]), *IL-13* (n=2,3 [n=3,5]), *IL-17A* (n=4,4 [n=1,4]), *keratinocyte-derived chemokine/CXCL-1* (KC) (n=4,5 [n=1,3]), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (n=4,5 [n=1,3]), *macrophage inflammatory protein-1α* MIP-1α (n=4,5 [n=1,3]), *macrophage inflammatory protein-1β* (MIP)-1β (n=3,5 [n=1,3]), *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted/CCL5* (RANTES) (n=4,5 [n=1,3]), *Tumor-Nekrose-Faktor-α* (TNF-α) (n=4,5 [n=1,3]). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Einfaktorielle ANOVA; **p \leq 0,01.

3.4.3 Glukosespiegel im roten Knochenmark

Um zu klären, ob die ausbleibende Verstärkung der Immunzellantwort infolge der BAT-Ablation unter prädiabetischen Bedingungen mit einer veränderten Glukoseverfügbarkeit im roten Knochenmark zusammenhängt, wurde die Glukosekonzentration in diesem Gewebe bestimmt. Die Analyse erfolgte an prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Mäusen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP an Tag 3 nach der kardialen I/R gemäß Abschnitt 2.10.2.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte der metabolische Status der Mäuse keinen signifikanten Einfluss auf die Glukosekonzentration im roten Knochenmark. Es ließ sich jedoch ein Trend zu etwa 50 % höheren Glukosewerten bei prädiabetischen Mäusen beobachten, der statistisch keine Signifikanz erreichte. Ebenso bewirkte die BAT-Ablation keine signifikante Veränderung, wobei sie bei den stoffwechselgesunden Kontrollmäusen tendenziell zu einem

Anstieg und bei den prädiabetischen Tieren zu einer Abnahme der Glukosekonzentration führte.

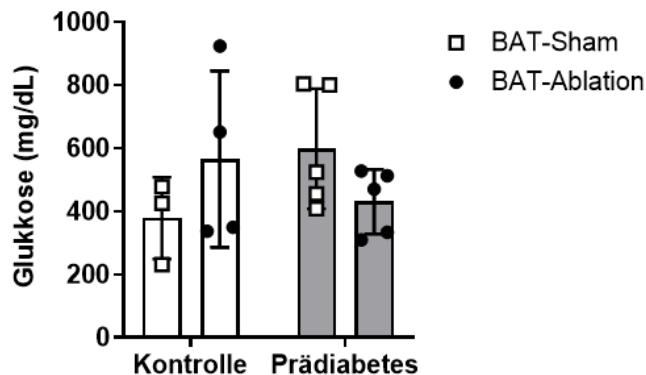


Abbildung 27: Weder Prädiabetes noch braunes Fettgewebe beeinflussen die Glukosekonzentration im roten Knochenmark signifikant.

Glukosekonzentration im roten Knochenmark von prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen und nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP an Tag 3 nach der I/R (n=3,4,5,5). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest.

3.5 Auswirkungen der Ablation von braunem Fettgewebe auf die systemische Inflammation bei kardialer Ischämie/Reperfusion

Um zu prüfen, ob die BAT-Ablation auch die systemische Immunantwort beeinflusst, wurden am Versuchsendzeitpunkt (Tag 21 nach der I/R), die zirkulierenden Immunzellen gemäß Abschnitt 2.12.2 analysiert.

Abbildung 28 veranschaulicht, dass bei prädiabetischen Mäusen die BAT-Ablation die systemische Immunantwort nicht beeinflusste, wohingegen sie unter nicht-prädiabetischen Bedingungen eine Erhöhung der Gesamtzahl von Monozyten sowie eine signifikante Zunahme der proinflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten in der Zirkulation bewirkte.

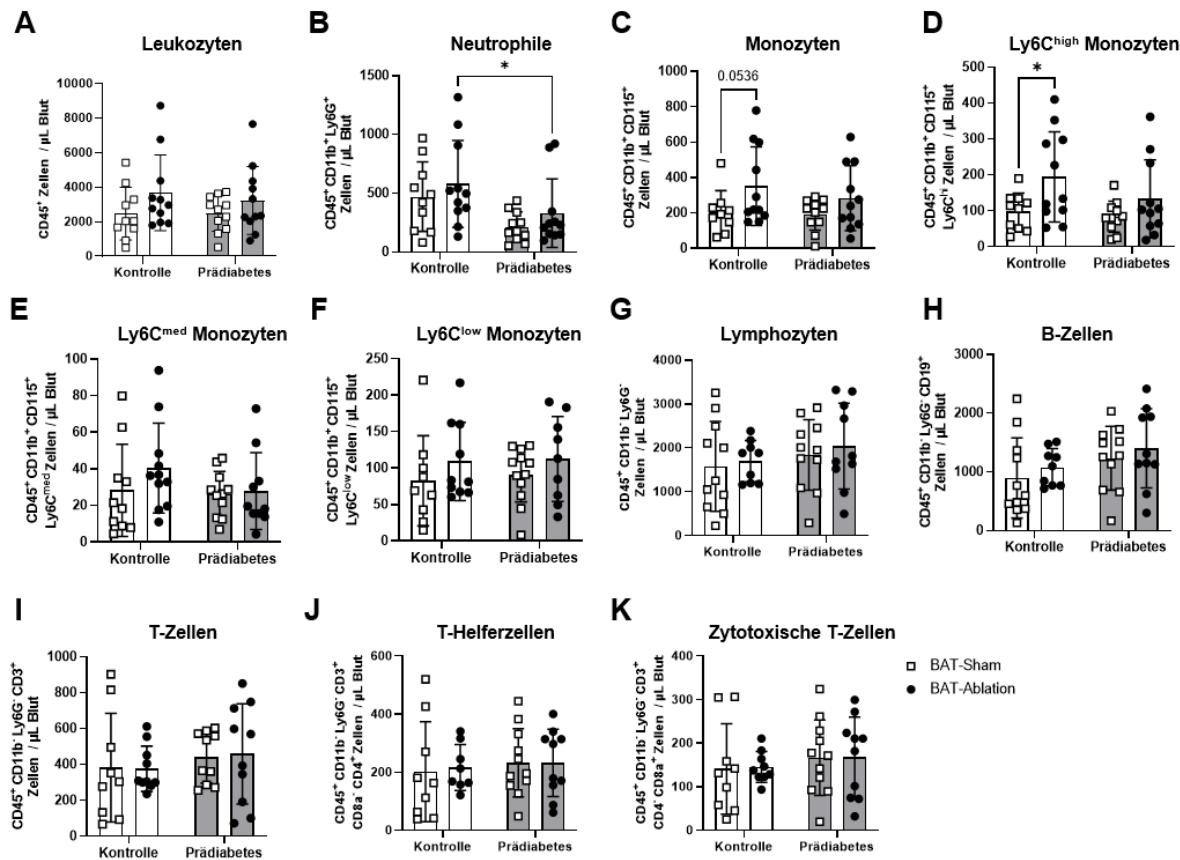


Abbildung 28: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen zu einer Verstärkung der systemischen Entzündungsreaktion nach kardialer Ischämie/Reperfusion.

Durchflusszytometrische Analyse von Immunzellen im Blut prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse und der nicht-prädiabetischen Kontrollen mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP an Tag 21 nach der I/R (n=5,6,6,10). **A.** Leukozyten, **B.** Neutrophele, **C.** Monozyten, **D.** Ly6^{Chigh}-Monozyten, **E.** Ly6^{medium}-Monozyten, **F.** Ly6^{low}-Monozyten, **G.** Lymphozyten, **H.** B-Zellen, **I.** T-Zellen, **J.** T-Helferzellen, **K.** Zytotoxische T-Zellen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05.

3.6 Interorgan-Kommunikation von braunem Fettgewebe und Knochenmarkfett

3.6.1 Lokoregionale Veränderungen im Knochenmark

Um zu untersuchen, ob die BAT-Ablation das Knochenmark lokoregional moduliert, wurde eine T2-Relaxometrie der Tibia gemäß Abschnitt 2.7.1 durchgeführt. Dafür wurden die T2-Relaxationszeiten des proximalen und des distalen Knochenkompartiments der Tibia nicht-prädiabetischer Mäuse mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP gemäß Abschnitt 2.7.1 gemessen. Die Messungen wurden basal (=vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 und 21 nach der I/R durchgeführt.

Wie in Abbildung 29 dargestellt, wurden im proximalen Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse zu keinem der Untersuchungszeitpunkte Unterschiede zwischen den Gruppen

festgestellt (s. Abbildung 29B). An Tag 21 nach der I/R zeigte sich im BMAT-reichen distalen Knochenmark BAT-ablatiaterter Mäuse eine ausgeprägte Tendenz zu einer verlängerten T2-Relaxationszeit im Vergleich zur BAT-Sham-Gruppe (s. Abbildung 29C).

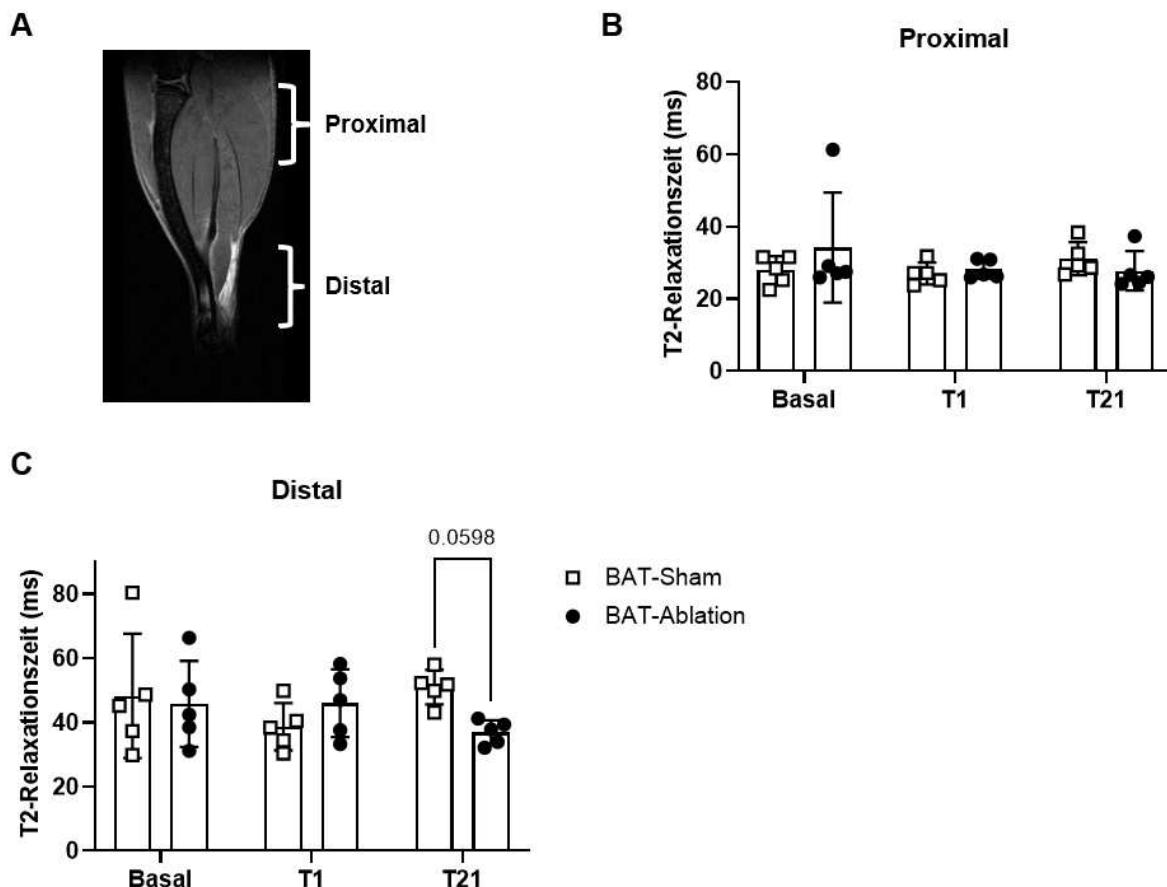


Abbildung 29: Braunes Fettgewebe verursacht postischämisch lokoregionale Veränderungen im Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.

Magnetresonanztomographische Messung der T2-Relaxationszeit in der proximalen und distalen Tibia von nicht-prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP basal (= vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 (T1) und 21 (T21) nach der I/R (n=5,5). **A.** Repräsentative Darstellung der Tibia (basal) in der Magnetresonanztomographie mit den entsprechenden Kompartimenten, **B.** Proximale Tibia, **C.** Distale Tibia. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05. **p \leq 0,01.

3.6.2 Analyse des relativen Fett- und Wasseranteils im Knochenmark

Um zu klären, ob die Unterschiede in der T2-Relaxationszeit des BMAT zwischen BAT-Sham und BAT-Ablation durch Veränderung des lokalen Fettgehalts bedingt sind, wurde der relative Fettgehalt des Knochenmarks in der Tibia mittels PDFF gemäß Abschnitt 2.7.4 bestimmt. Die magnetresonanztomographischen Messungen wurden basal (=vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 und 21 nach der I/R durchgeführt.

Abbildung 30 zeigt, dass im proximalen Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede in der PDFF zwischen der BAT-Ablation-Gruppe

und der BAT-Sham-Gruppe auftraten (s. Abbildung 30B). Im BMAT-reichen distalen Knochenmark (s. Abbildung 30C) hingegen wurde an Tag 21 nach der I/R in der BAT-Sham-Gruppe ein signifikant höherer Fettgehalt im Vergleich zum Basalwert und dem Wert an Tag 1 nach der I/R beobachtet. Bei Mäusen mit BAT-Ablation blieb der Anstieg des Fettgehalts in der distalen Tibia über den Beobachtungszeitraum aus. An Tag 21 nach der I/R war der Fettgehalt im distalen Knochenmark bei Mäusen mit BAT-Ablation schließlich signifikant niedriger als bei Mäusen, denen das BAT nicht chirurgisch entfernt wurde.

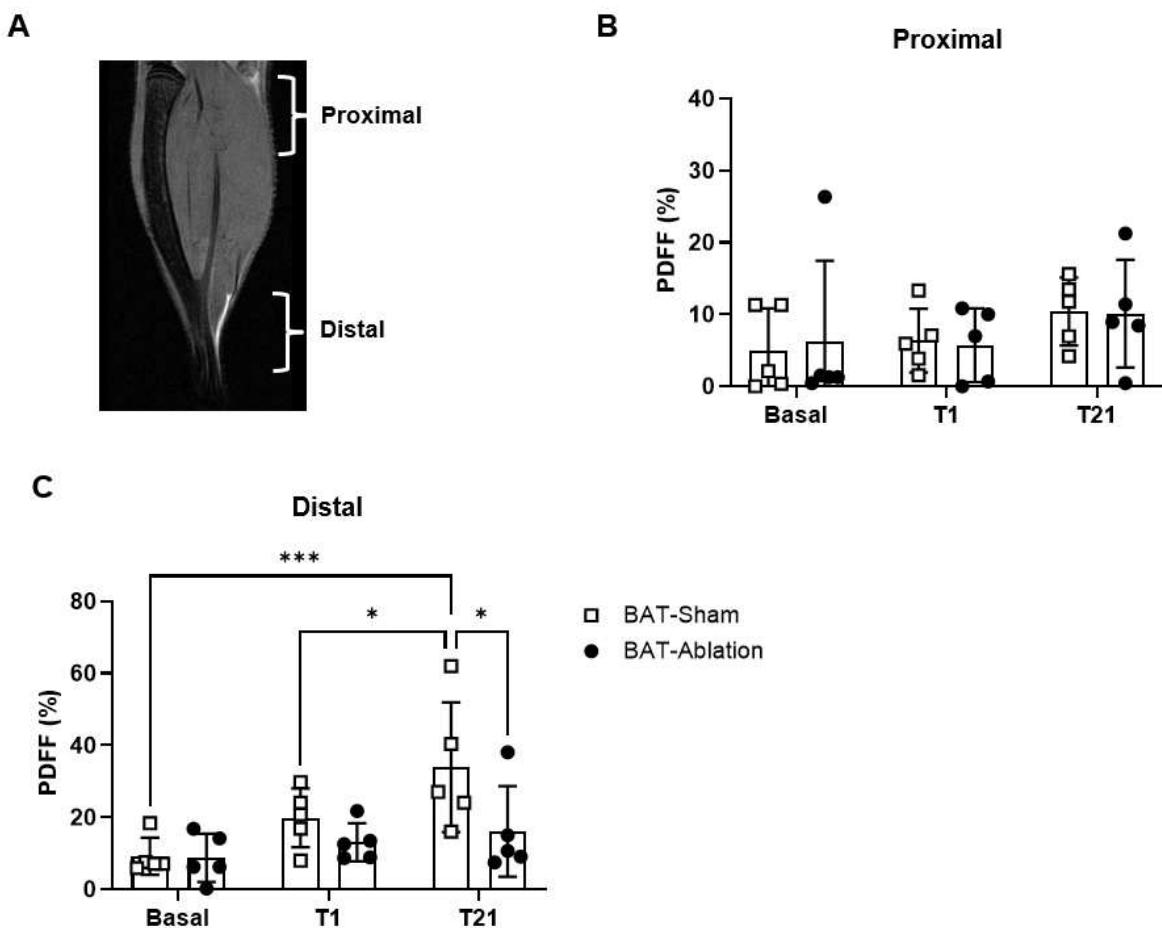


Abbildung 30: Die Ablation des braunen Fettgewebes verhindert den postischämischen Anstieg des Fettgehalts im distalen Knochenmark.

Magnetresonanztomographische Messung der Protonendichte-Fett-Fraktion (PDFF) in der proximalen und distalen Tibia von nicht-prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP basal (= vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 (T1) und 21 (T21) nach der kardialen I/R (n=5,5). **A.** Repräsentative Darstellung der Tibia (basal) in der Magnetresonanztomographie mit den entsprechenden Kompartimenten, **B.** Proximale Tibia, **C.** Distale Tibia. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05. ***p \leq 0,001.

Zusätzlich wurde gemäß Abschnitt 2.7.4, die PDWF bestimmt, um den relativen Wasseranteil innerhalb der Tibia zu quantifizieren. Die Messungen erfolgten – analog zur PDFF – zu drei Zeitpunkten: basal (= vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 und 21 nach der I/R.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, zeigte sich in der proximalen Tibia kein Einfluss des BAT auf den relativen Wassergehalt über den gesamten Beobachtungszeitraum (s. Abbildung 31A). Im Gegensatz dazu war im BMAT-reichen distalen Knochenmark (s. Abbildung 31B) der BAT-Sham Gruppe der relative Wasseranteil an Tag 21 sowohl im Vergleich zum Basalwert als auch zum Wert an Tag 1 nach der I/R signifikant verringert. Im Vergleich zur BAT-Sham Gruppe war die PDWF in diesem Knochenkompartiment bei BAT-ablatiervierten Tieren an Tag 21 schließlich signifikant größer.

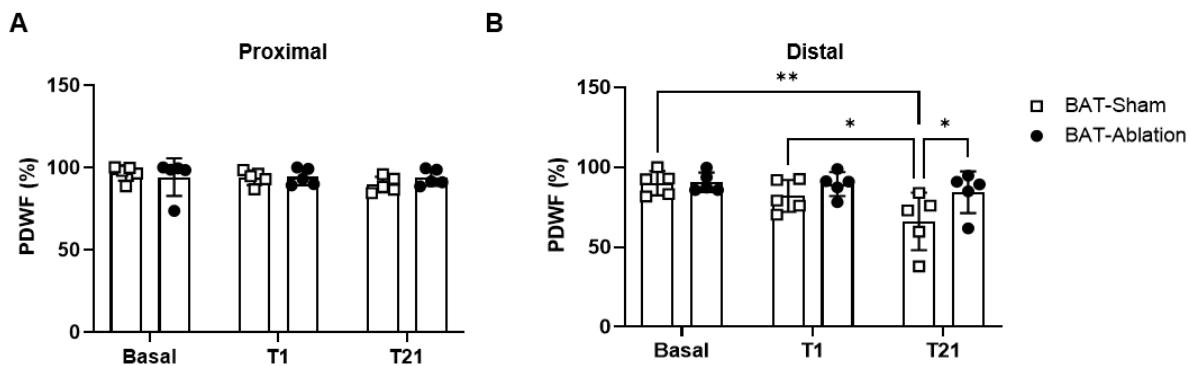


Abbildung 31: Das Fehlen von braunem Fettgewebe verhindert die postischämische Abnahme des relativen Wasseranteils im distalen Knochenmark.

Magnetresonanztomographische Messung der Protonendichte-Wasser-Fraktion (PDWF) im proximalen und distalen Knochenmarkkompartiment von nicht-prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP basal (= vor der Ligaturanlage und BAT-OP) sowie an Tag 1 und 21 nach der kardialen I/R (n=5,5). **A.** Proximale Tibia, **B.** Distale Tibia. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p \leq 0,05. **p \leq 0,05.

Zur histologischen Charakterisierung des BMAT wurde eine H&E-Färbung der distalen Tibia gemäß Abschnitt 2.13.1 durchgeführt. Hierzu wurden die Tibiae der Tiere an Tag 21 nach der I/R *post mortem* entnommen. Wie die nachfolgende Abbildung 32 zeigt, waren die BMAds in der BAT-Ablation-Gruppe im Vergleich zur BAT-Sham-Gruppe signifikant kleiner. Zudem war die Anzahl der BMAds gegenüber der BAT-Sham-Gruppe im analysierten Gesichtsfeld signifikant erhöht.

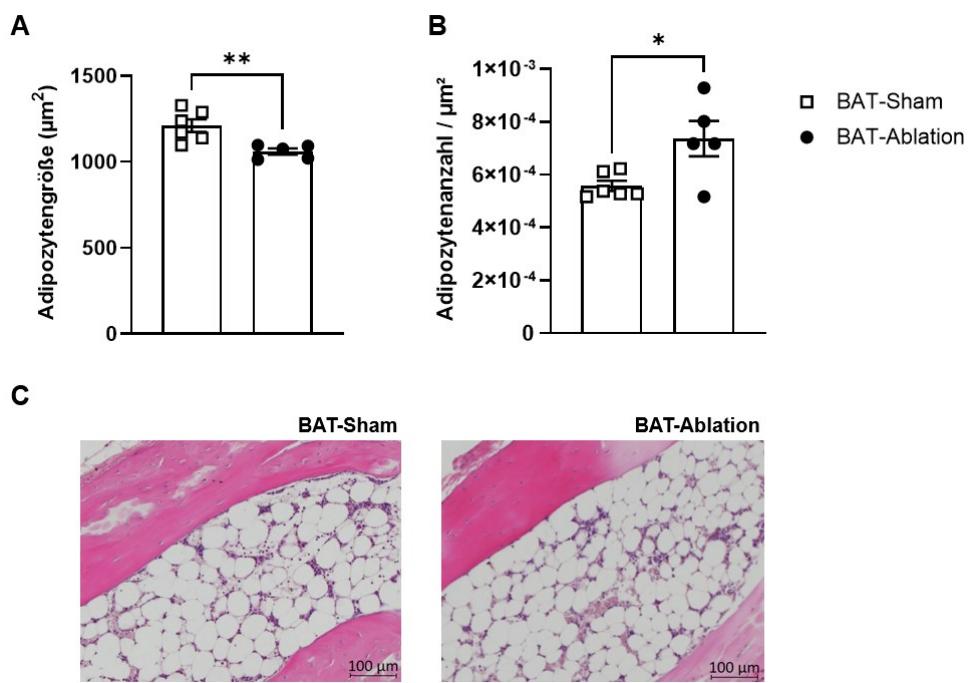


Abbildung 32: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt zu einer Verkleinerung der Knochenmarkadipozyten infolge der kardialen Ischämie/Reperfusion.

Hämatoxylin & Eosin (H&E)-Färbung der distalen Tibia von nicht-prädiabetischen C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP 21 Tage nach der kardialen I/R (n=6,5). **A.** Adipozytentgröße (μm^2), **B.** Adipozytenanzahl/ μm^2 , **C.** Repräsentative Aufnahmen des BMAT in der distalen Tibia BAT-Sham-operierter (links) und BAT-ablatierter Tiere (rechts). Maßstabsbalken: 100 μm . Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest; *p $\leq 0,05$. **p $\leq 0,01$.

3.6.3 Sekretionsprofil des Knochenmarkfetts

Um zu untersuchen, ob das Fehlen von BAT die Sekretionsaktivität im BMAT beeinflusst, wurde ein Multiplex-Immunoassay (s. Abschnitt 2.16) zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen im BMAT durchgeführt. Analysiert wurde zunächst der Einfluss der BAT-Ablation unter basalen Bedingungen, anschließend auch im Kontext der kardialen I/R.

Wie Abbildung 33 dargestellt, führte die chirurgische Entfernung des BAT bereits in Abwesenheit des zusätzlichen inflammatorischen Stimulus der kardialen I/R zu einer leicht erhöhten inflammatorischen Aktivität im BMAT. Diese äußerte sich in einer signifikant gesteigerten Sekretion des keratinozytenabgeleiteten Chemokins (*keratinocyte-derived chemokine*, KC, CXCL1).

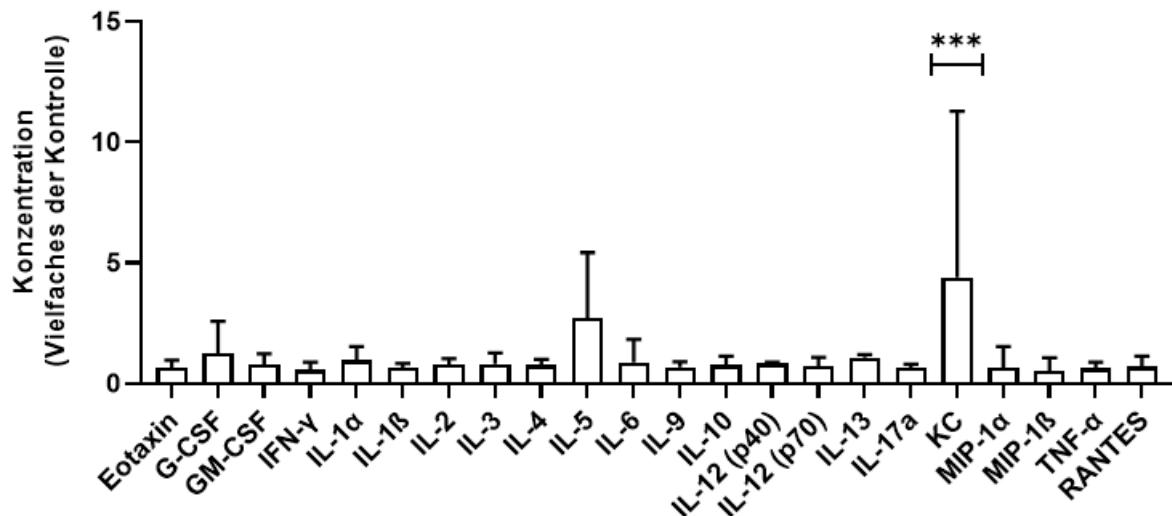


Abbildung 33: Die Ablation des braunen Fettgewebes verursacht einen Anstieg des inflammatorischen KC/CXCL1 im Knochenmarkfett nicht-prädiabetischer Mäuse.

Ergebnisse des Multiplex-Immunoassays von BMAT-Überständen nicht-prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP einen Tag nach der I/R. Dargestellt sind die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen als Vielfaches der Kontrolle (= BAT-Sham). Die ermittelten Konzentrationen wurden auf das BMAT-Gewicht normalisiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. Die Anzahl der Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze sind jeweils in eckigen Klammern hinter den Behandlungsgruppen (BAT-Sham bzw. BAT-Ablation) angegeben. *Eosinophil chemotactic chemokines* (Eotaxin) (n=6,5 [n=2,3]), *Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor* (G-CSF) (n=5,6 [n=2,1]), *Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor* (GM-CSF) (n=5,6 [n=2,1]), *Interferon-γ* (INF-γ) (n= 6,7 [n=2,1]), *Interleukin(IL)-1α* (IL-1α) (n=8,8 [n=0,0]), *IL-1β* (n=6,5 [n=2,3]), *IL-2* (n=6,6 [n=2,2]), *IL-3* (n=6,6 [n=2,2]), *IL-4* (n=6,6 [n=2,2]), *IL-5* (n=6,5 [n=2,3]), *IL-6* (n=6,7 [n=2,1]), *IL-9* (n=4,4 [n=4,4]), *IL-10* (n=6,5 [n=2,3]), *IL-12 (p40)* (n=5,4 [n=3,4]), *IL-12 (p70)* (n=6,7 [n=2,1]), *IL-13* (n=6,4 [n=2,4]), *IL-17A* (n=6,6 [n=2,2]), *keratinocyte-derived chemokine/CXCL1* (KC) (n=5,5 [n=2,2]), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (n=7,6 [n=1,2]), *macrophage inflammatory protein-1α* (MIP-1α) (n=6,7 [n=1,0]), *macrophage inflammatory protein-1β* (MIP-1β) (n=6,7 [n=2,1]), *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted/CCL5* (RANTES) (n=7,7 [n=1,1]), *Tumor-Nekrose-Faktor-α* (TNF-α) (n=6,7 [n=2,1]). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Einfaktorielle ANOVA, ***p \leq 0,001.

Im Gegensatz bewirkte die BAT-Ablation im Kontext der kardialen I/R keine Veränderung der sekretorischen Aktivität des BMAT (s. Abbildung 34).

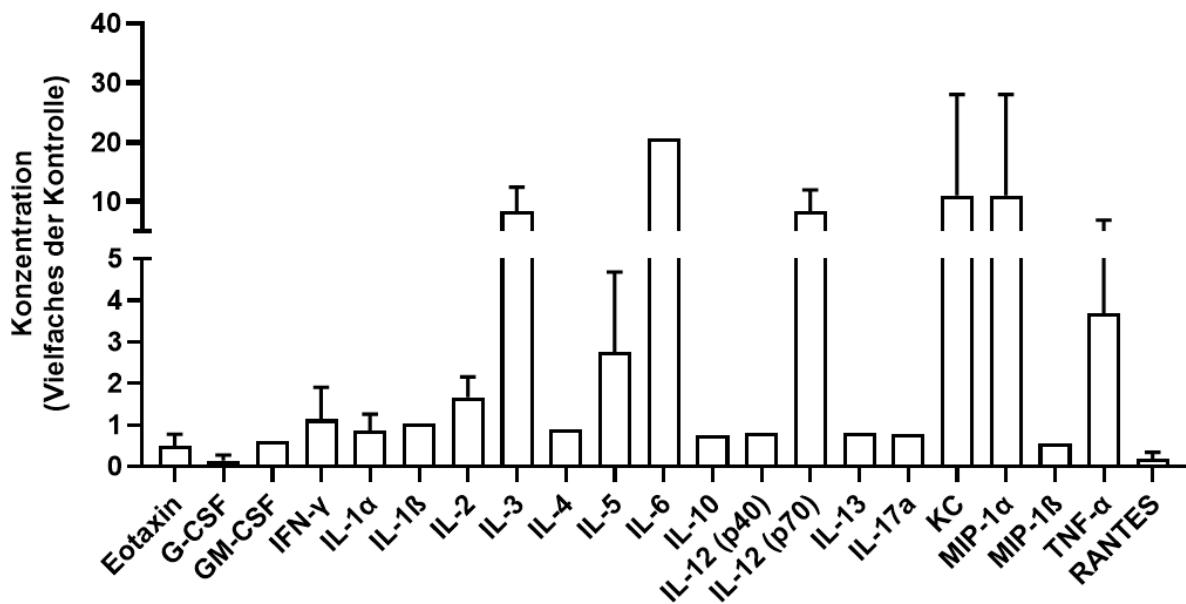


Abbildung 34: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt postischämisch zu keiner Veränderung des Sekretionsprofils des Knochenmarkfetts nach kardialer Ischämie/Reperfusion. Ergebnisse des Multiplex-Immunoassays von BMAT-Überständen nicht-prädiabetischer C57BL/6J-Mäuse mit BAT-Ablation und BAT-Sham-OP an Tag 1 nach der I/R. Dargestellt sind die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen als Vielfaches der Kontrolle (= BAT-Sham). Die ermittelten Konzentrationen wurden auf das BMAT-Gewicht normalisiert. Die Daten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sonja Hartwig und Dr. Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Deutschland) erhoben. Die Anzahl der Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze sind jeweils in eckigen Klammern hinter den Behandlungsgruppen (BAT-Sham bzw. BAT-Ablation) angegeben. *Eosinophil chemotactic chemokines* (Eotaxin) (n=4,5 [n=1,3]), *Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor* (G-CSF) (n=4,3 [n=1,3]), *Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor* (GM-CSF) (n=1,2 [n=4,6]), *Interferon(INF)-γ* (n= 3,4 [n=2,4]), *Interleukin (IL)-1α* (n=5,5 [n=0,2]), *IL-1β* (n=2,2 [n=3,6]), *IL-2 (Interleukin-2)* (n=4,4 [n=1,4]), *IL-3 (n=2,3 [n=2,5])*, *IL-4 (n=1,2 [n=4,6])*, *IL-5 (n=3,3 [n=2,5])*, *IL-6 (n=3,3 [n=1,4])*, *IL-10 (n=1,2 [n=4,6])*, *IL-12 (p40) (n=1,2 [n=4,6])*, *IL-12 (p70) (n=3,4 [n=1,4])*, *IL-13 (n=1,2 [n=4,6])*, *IL-17A (n=1,2 [n=4,6])*, *keratinocyte-derived chemokine/CXCL-1 (KC)* (n=4,6 [n=0,3]), *monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)* (n=3,3 [n=2,5]), *macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α)* (n=3,6 [n=0,1]), *macrophage inflammatory protein-1β (MIP-1β)* (n=2,2 [n=1,4]), *Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted/CCL5 (RANTES)* (n=4,3 [n=0,3]), *Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α)* (n=4,5 [n=0,3]). IL-9 ist nicht dargestellt, da [n=5,6] unterhalb der Erfassungsgrenze lagen. Bei Gruppen mit n=2 wurde auf die Darstellung von Standardabweichungen verzichtet. Die Daten sind als Mittelwerte ± SD angegeben. Einfaktorielle ANOVA.

3.6.4 Lipidtransfer aus Knochenmarksadipozyten auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

Angesichts der verstärkten Immunantwort im roten Knochenmark in der Akutphase sowie des ausbleibenden Anstiegs des Fettgehalts im BMAT in der Spätphase nach der I/R infolge der BAT-Ablation wurde die Hypothese aufgestellt, dass die BAT-Ablation den Fettsäuretransfer von BMAds auf HSPC verstärkt, was langfristig zu einem geringeren Fettgehalt im BMAT führt. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden gemäß den Abschnitten 2.11 und 2.12.4 aus dem roten Knochenmark isolierte Lin⁻-Zellen mit BMAds co-kultiviert, deren endogenen Fettsäuren mit BODIPY™ FL C₁₆ gekoppelt waren. Anschließend wurde die MFI des BodiPY-Signals in den Lin⁻-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Das Gating-Schema ist in Appendix 6 dargestellt.

Wie Abbildung 35 zeigt, verursachte die BAT-Ablation keinen Anstieg des BodiPY⁺-Signals in den Lin⁻-Zellen.

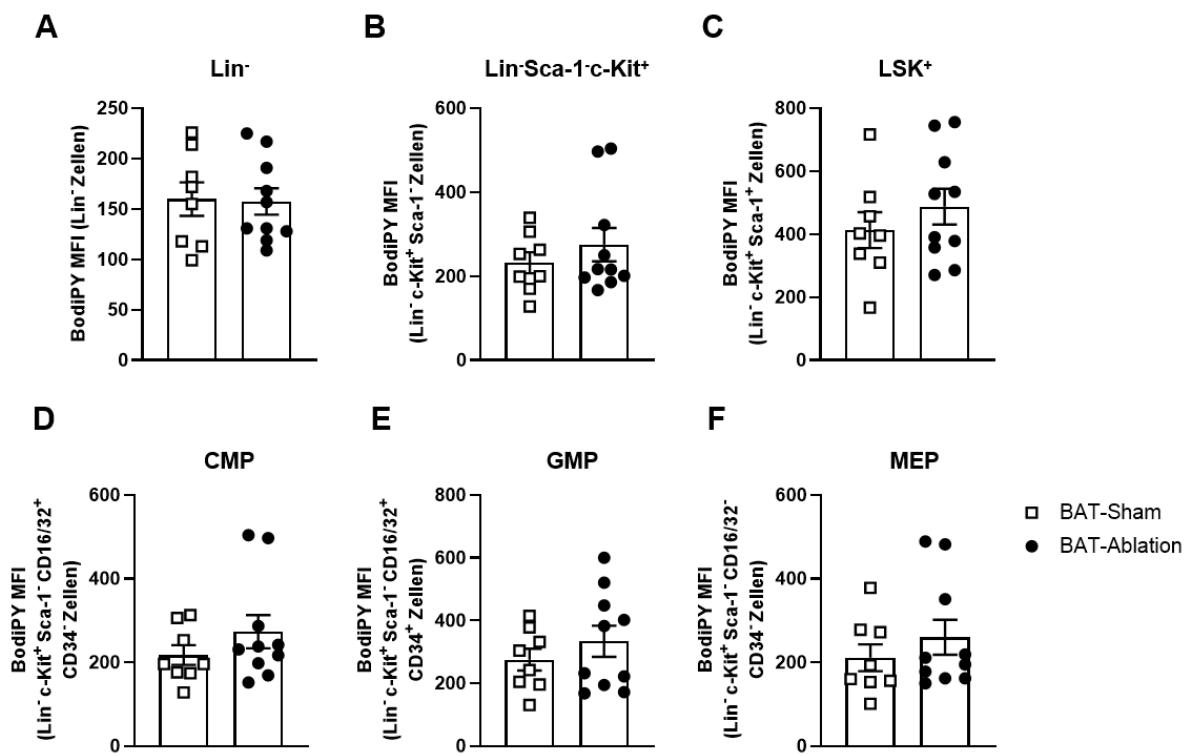


Abbildung 35: Braunes Fettgewebe beeinflusst den Transfer von gelabelten Fettsäuren aus dem Knochenmarkfett auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen im Rahmen der Notfallhämatopoese nicht.

Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) BodiPY⁺ HSPC im Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen mit BAT-Ablation bzw. BAT-Sham-OP einen Tag nach der kardialen I/R (n=8,10). **A.** Linien-negative (Lin⁻) Zellen, **B.** Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺, **C.** LSK⁺ (Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺) Zellen, **D.** Gemeinsame myeloide Vorläuferzellen; *common myeloid progenitors* (CMP), **E.** Granulozyten- und Makrophagen-Vorläuferzellen; *granulocyte/macrophage progenitors* (GMP), **F.** Megakaryozyten- und Erythrozyten-Vorläuferzellen; *megakaryocyte/erythrocyte progenitors* (MEP). Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Ungepaarter Student's t-Test bzw. Mann-Whitney Test.

3.6.5 Extrazelluläre Vesikel im Knochenmarkfett

Neben dem bereits untersuchten Fettsäuretransfer wurde die Interaktion zwischen BAT und das BMAT auch im Hinblick auf eine mögliche Interorgan-Kommunikation über EV analysiert. Hierfür wurde das BMAT gemäß Abschnitt 2.12 aufbereitet und die daraus isolierten Partikel entsprechend Abschnitt 2.15 mittels TEM ultrastrukturell analysiert. Das charakteristische Erscheinungsbild von EVs wurde bereits in Abschnitt 1.4 beschrieben.

Die Proben wurden sechs Stunden sowie an Tag 1 und 3 nach der I/R- bzw. I/R-Sham-OP entnommen.

Die TEM ergab eindeutig, dass es sich bei den isolierten Partikeln nicht um EV mit ihrer charakteristischen Morphologie handelte, sondern sehr wahrscheinlich eher um Proteine und/oder Zelltrümmer (s. Abbildung 36).

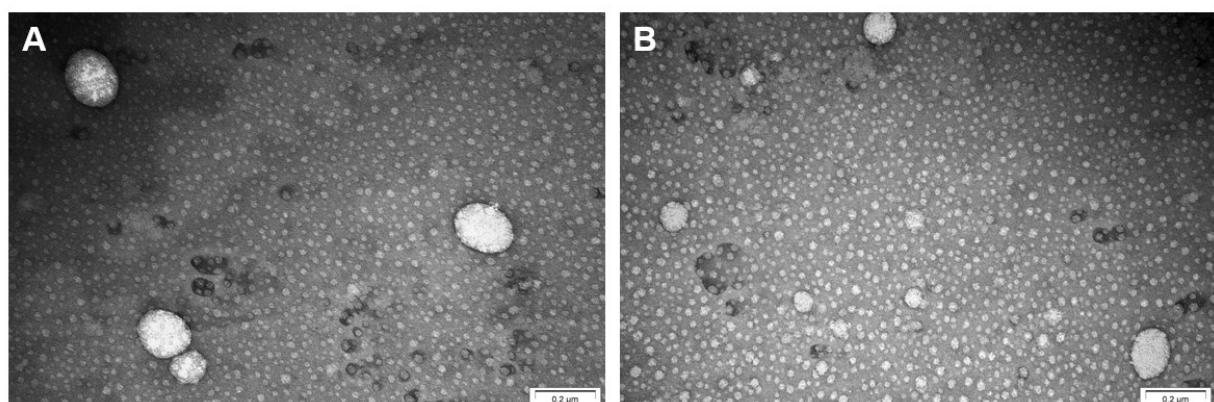


Abbildung 36: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der aus dem Knochenmarkfett isolierten Partikeln von Mäusen mit Ischämie/Reperfusion oder entsprechender Sham-OP.

A. I/R-Sham (T3 nach der I/R-Sham-OP; Maßstabsbalken: 0,2 μ m), **B.** I/R (T3 nach der I/R; Maßstabsbalken: 0,2 μ m). Die Aufnahmen sind in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ann Kathrin Bergmann aus der Core Facility Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikum Düsseldorf entstanden.

Darüber hinaus wurde das BMAT auch im Kontext einer BAT-Ablation auf das Vorhandensein von EV untersucht. Hierzu wurde das BMAT von Mäusen analysiert, bei denen drei Tage vor der I/R-Induktion entweder eine BAT-Ablation oder eine BAT-Sham-OP durchgeführt worden war.

Die TEM-Analyse der aus beiden Gruppen isolierten Partikel, die 21 Tage nach der I/R isoliert wurden, zeigte eindeutig, dass es sich auch hierbei nicht um EV handelte (s. Abbildung 37).

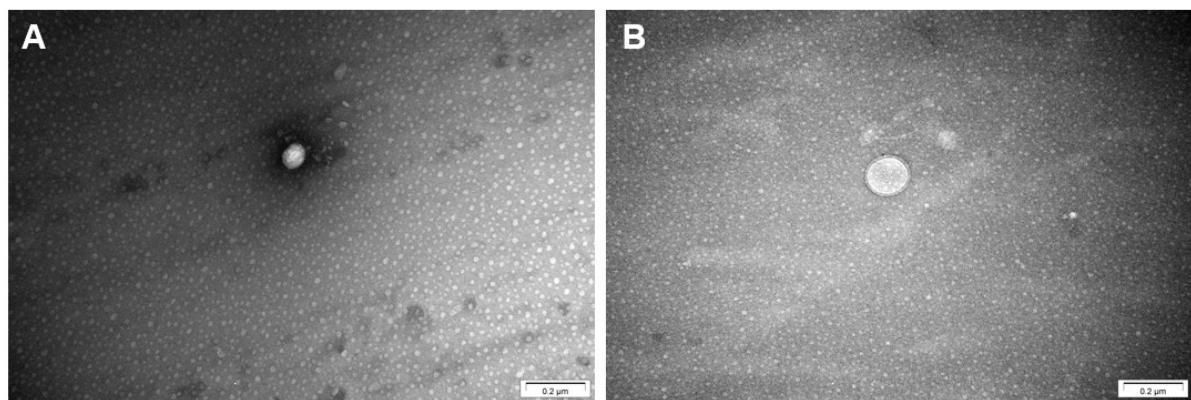


Abbildung 37: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der aus dem Knochenmarkfett isolierten Partikel postischämischer Mäuse nach BAT-Ablation und entsprechender Sham-OP.

A. I/R + BAT-Sham (T21 nach der I/R; Maßstabsbalken: 0,2 μ m), **B.** I/R + BAT-Ablation (T21 nach der I/R; Maßstabsbalken: 0,2 μ m). Die Aufnahmen sind in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ann Kathrin Bergmann aus der Core Facility Elektronenmikroskopie des Universitätsklinikum Düsseldorf entstanden.

4 Diskussion

Prädiabetes, als Vorstufe des Typ-2-Diabetes mellitus, ist mit zahlreichen metabolischen und inflammatorischen Veränderungen verbunden, die das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen (vgl. Abschnitt 1.2). Diese Veränderungen betreffen unter anderem das BAT, dem eine Vielzahl protektiver Effekte auf den Metabolismus und das Herz-Kreislaufsystem zugeschrieben werden (vgl. Abschnitte 1.1.1 und 1.1.2). In dieser Arbeit wurde untersucht, wie Prädiabetes die morphologischen und funktionellen Eigenschaften des BAT im Kontext einer kardialen I/R beeinflusst und inwiefern eine Interorgan-Kommunikation mit dem bislang wenig erforschten BMAT existiert.

4.1 Verwendetes Prädiabetes-Modell

Zur Induktion des prädiabetischen Phänotyps wurde ein etabliertes Modell der diätinduzierten Adipositas (*diet-induced obesity* (DIO)-Modell) eingesetzt, das auf einer fettreichen und hochkalorischen Diät basiert. Die neunwöchige Fütterung dieser Diät führt zuverlässig zur Ausprägung typischer prädiabetischer Merkmale, darunter Fettleibigkeit, gestörte Insulinsensitivität und eine systemische niedriggradige Entzündung [188, 189]. In Übereinstimmung mit der Literatur entwickelten auch die in dieser Arbeit eingesetzten männlichen C57BL/6J-Mäuse einen ausgeprägten prädiabetischen Phänotyp, der durch Übergewicht, Glukoseintoleranz und Insulinresistenz gekennzeichnet war (vgl. Appendix 1).

Das verwendete Mausmodell stellt eine geeignete experimentelle Grundlage zur Untersuchung prädiabetischer Stoffwechselveränderungen dar und weist eine hohe Übertragbarkeit auf die klinische Situation des Menschen auf. Die Zusammensetzung der Diät im DIO-Modell spiegelt typische Ernährungsgewohnheiten (z. B. fett- und zuckerreiche Nahrung), die auch bei betroffenen Patienten beobachtet werden, wider und führt bei Mäusen zu vergleichbaren metabolischen Veränderungen wie beim Menschen [188]. Neben der gestörten Glukosehomöostase induziert das DIO-Modell weiterhin das Auftreten einer milden Neuropathie und gestörten Wundheilung. Es ermöglicht die Untersuchung des langsamen, progressiven Verlaufs der Insulinresistenz und spiegelt somit die Frühphase der Pathogenese des menschlichen Prädiabetes realistisch wider [190].

4.2 Der Einfluss von Prädiabetes auf die Morphologie brauner Adipozyten

Der Einfluss eines Prädiabetes auf verschiedene Fettgewebe wurde bereits unter Punkt 1.2.2 ausführlich dargestellt. Aufbauend darauf wurde zunächst untersucht, inwiefern Prädiabetes die Morphologie des BAT verändert. Anschließend wurde analysiert, wie sich diese prädiabetes-induzierten Veränderungen auf die morphologische und funktionelle Adaption des BAT im Kontext einer kardialen I/R auswirken.

Prädiabetes führte zu einer vollständigen Veränderung des charakteristischen Erscheinungsbildes brauner Adipozyten. Während gesundes BAT aufgrund der hohen Mitochondriendichte durch eine multilokuläre Struktur und eine braune Färbung gekennzeichnet ist, konnten diese typischen Merkmale in der Prädiabetesgruppe nicht beobachtet werden. Prädiabetes induzierte ein *Whitening* [113] der braunen Adipozyten, was zu einem Verlust des beschriebenen Erscheinungsbilds von BAT führte (vgl. Abbildung 10). *Whitening* bedeutet in diesem Kontext, dass die braunen Adipozyten eine weiße-Adipozyten-ähnliche Morphologie annehmen, die durch eine große, unilokuläre Zellform infolge vermehrter Lipidspeicherung gekennzeichnet ist. Im Einklang damit war die Größe der braunen Adipozyten unter prädiabetischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (vgl. Abbildung 11).

Es ist bereits bekannt, dass das sogenannte *Whitening* brauner Adipozyten durch diverse Faktoren wie Fettleibigkeit, Leptinrezeptor- und Lipasemangel sowie eine gestört β-adrenerge Signalübertragung ausgelöst werden kann und letztendlich zum Absterben brauner Adipozyten führt [191].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten (vgl. Abbildung 11) deuten möglicherweise auf Letzteres hin, bedürfen jedoch weiterer Validierung. Da die Quantifizierung lediglich pro Gesichtsfeld und nicht im gesamten BAT erfolgte, lässt sich nicht eindeutig beurteilen, ob die unter nicht-prädiabetischen Bedingungen beobachtete I/R-bedingte Reduktion tatsächlich auf einen Zellverlust zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher erscheint derzeit, dass die verringerte Zellzahl im Gesichtsfeld primär durch die vermehrte Lipidspeicherung und die damit einhergehende Verröhrerung der Adipozyten im Rahmen des „*Whitening*“ bedingt ist.

Da das „*Whitening*“ brauner Adipozyten mit einer erhöhten Lipidspeicherung einhergeht [113, 114], ist das signifikant größere BAT-Gewicht bei prädiabetischen Mäusen im Vergleich zu nicht-prädiabetischen Mäusen (vgl. Abbildung 10) erwartungsgemäß.

4.2.1 Prädiabetesbedingte Beeinträchtigung des braunen Fettgewebes und ihr Einfluss auf dessen Aktivierung und metabolische Anpassung an eine kardiale Ischämie/Reperfusion

Die histologische Analyse des BAT nach der I/R offenbarte deutliche Unterschiede zwischen prädiabetischen und stoffwechselgesunden Mäusen (s. Abbildung 14). Zwar war in beiden Gruppen eine Verkleinerung der braunen Adipozyten infolge der I/R erkennbar, jedoch war dieser Effekt unter prädiabetischen Bedingungen deutlich abgeschwächt (s. Abbildung 14C). Zudem war die Adipozytenanzahl im analysierten Gesichtsfeld bei stoffwechselgesunden Mäusen nach der I/R signifikant größer als bei Mäusen ohne I/R. Diese Veränderung war bei prädiabetischen Tieren nicht zu beobachten (s. Abbildung 14D).

Die Lipolyse im BAT wird durch die Freisetzung von Noradrenalin angestoßen, das an β_3 -Rezeptoren auf braunen Adipozyten bindet und eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert [25]. Entzündliche Prozesse können diesen β -adrenergen Tonus im BAT nachweislich beeinträchtigen [21]. Da auch Prädiabetes mit einer erhöhten Entzündungsaktivität im BAT einhergeht [21], liegt die Annahme nahe, dass unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen die β -adrenerge Aktivierbarkeit des BAT beeinträchtigt ist.

Diese Annahme wird durch die MRT-Ergebnisse gestützt, die zeigten, dass die T2-Relaxationszeit in der Prädiabetesgruppe nach der I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängert und die BAT-Aktivierung somit reduziert war (vgl. Abbildung 12).

Die dem beeinträchtigten β -adrenergen Tonus im BAT zugrundeliegenden Mechanismen sind nach aktuellem Forschungsstand nicht vollständig verstanden. Eine PET-Studie am Menschen zeigte unter Basalbedingungen eine verminderte Bindung selektiver Liganden von Noradrenalintransportern an die entsprechenden Zielstrukturen im BAT adipöser im Vergleich zu normalgewichtigen Patienten [192]. Ob diese Beobachtung auf eine tatsächlich reduzierte Dichte von Noradrenalintransportern, eine reduzierte Anzahl sympathischer Nervenfasern oder lediglich auf die möglicherweise reduzierte Anzahl brauner Adipozyten bei Adipositas zurückzuführen ist, blieb in der Originalarbeit offen. Tierexperimentelle Studien an Mäusen zeigten darüber hinaus, dass Adipositas mit einer Abnahme der β_3 -adrenergen Rezeptoren im WAT und einer verminderten Noradrenalin-induzierten Lipolyse einhergeht, was zur Entwicklung einer Katecholaminresistenz weißer Adipozyten führt [193-195].

Die Analyse der systemischen Noradrenalkonzentration im Blutplasma an Tag 1 nach der kardialen I/R (vgl. Abbildung 16) zeigte, dass der metabolische Status keinen Einfluss auf die systemische Sympathikusaktivität bei Mäusen mit intaktem BAT („BAT-Sham“) hat und sich

auch die chirurgische Entfernung des BAT weder unter prädiabetischen noch unter nicht-prädiabetischen Bedingungen auf die Noradrenalininkonzentration im Plasma auswirkte.

Diesen Ergebnissen zufolge bleibt die systemische Aktivität des Sympathikus unter den gegebenen Versuchsbedingungen erhalten. Die in dieser Arbeit beobachtete funktionelle Einschränkung des BAT im prädiabetischen Zustand deutet somit stark auf eine intrinsische Dysfunktion des BAT hin. Zukünftige Studien sollten gezielt die Expression und Funktionalität β_3 -adrenerger Rezeptoren im BAT untersuchen. Mögliche experimentelle Ansätze umfassen den Proteinnachweis von β_3 -Adrenorezeptoren in BAT-Lysaten mittels Western Blot, die Analyse der *Adrb3*-Expression (Gen, das den β_3 -Adrenorezeptor kodiert) mittels qRT-PCR sowie die histologische Detektion sympathischer Nervenfasern im BAT, beispielsweise durch Immunfluoreszenzfärbung von Tyrosinhydroxylase.

Die vermutete intrinsischen Dysfunktion des BAT im prädiabetischen Zustand könnte sowohl eine beeinträchtige Lipolyse als auch eine verminderte thermogene Aktivierung der braunen Adipozyten umfassen. Dies würde auch erklären, warum die braunen Adipozyten in der Prädiabetesgruppe nach I/R histologisch weniger stark geschrumpft sind als in der Kontrollgruppe (vgl. Abbildung 13). Diese Beobachtung untermauert die Annahme, dass gespeicherte Lipide im BAT unter Stressbedingungen wie einer kardialen I/R bei Prädiabetes weniger effizient mobilisiert werden können als bei physiologischer Stoffwechsellage. Möglicherweise trägt auch die für Prädiabetes charakteristische verminderte Insulinsensitivität [196] zu der reduzierten metabolischen Anpassungsreaktion brauner Adipozyten bei. In zukünftigen Arbeiten wäre die weiterführende Analyse zur Lipidmobilisierung im BAT unter prädiabetischen Bedingungen sinnvoll, die unter anderem die Untersuchung von Lipolyse-Markern wie ATGL und HSL in braunen Adipozyten mittels qRT-PCR einschließen sollten.

Auffällig war zudem, dass sich nach der I/R nur bei stoffwechselgesunden Tieren eine Zunahme der Adipozytenzahl im BAT beobachten ließ (vgl. Abbildung 14). Diese Reaktion blieb bei prädiabetischen Tieren aus. Das Fehlen dieser Anpassungsreaktion bei Prädiabetes könnte auf eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellproliferation und/oder Differenzierung brauner Adipozyten, möglicherweise bedingt durch eine gestörte β_3 -adrenerge Signalübertragung im BAT, hinweisen. Da jedoch lediglich ein repräsentatives Gesichtsfeld eines Paraffinschnitts analysiert wurde und nicht das gesamte BAT-Gewebe, kann diese Hypothese ohne weitere Validierung nicht abschließend bestätigt werden. Nahe liegender erscheint zum derzeit, dass die unter Prädiabetes beobachtete Vergrößerung der Adipozyten zu einer geringeren Anzahl von braunen Adipozyten pro Gesichtsfeld führte.

Zusammenfassend zeigten die histologischen und magnetresonanztomographischen Ergebnisse, dass Prädiabetes mit einer eingeschränkten Plastizität und verminderten zellulären Adaptionsfähigkeit des BAT im Kontext der I/R einhergeht. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit einer verringerten Aktivierbarkeit des BAT unter prädiabetischen Bedingungen, wobei die zugrundeliegende Kausalität nicht eindeutig geklärt ist.

Beobachtet wurde zudem, dass die I/R-bedingte Reduktion des BAT-Gewichts bei nicht-prädiabetischen Mäusen trotz der stärkeren Abnahme der Adipozytengröße ähnlich ausfiel wie bei prädiabetischen Mäusen (vgl. Abbildung 13). Mehrere Faktoren könnten diese Beobachtung erklären. Einerseits könnte eine verstärkte Infiltration von Immunzellen sowie eine erhöhte Fibrose des BAT unter nicht-prädiabetischen Bedingungen dem Gewichtsverlust des BAT entgegenwirken. Zudem könnte die nach der I/R beobachtete Zunahme der braunen Adipozyten in dieser Gruppe auf eine verstärkte Proliferation neuer Adipozyten hinweisen, die den Gewichtsverlust des BAT ausgleicht. Eine weitere mögliche Erklärung ist eine verstärkte Ödembildung im BAT nicht-prädiabetischer Mäuse im Vergleich zu der Prädiabetesgruppe.

Die Kälteinduzierte Aktivierung von BAT führt zu einer Verstärkung der zitterfreien Thermogenese [33]. Da auch eine kardiale I/R nachweislich eine Aktivierung des BAT bewirkt [41, 179], wurde untersucht, ob Prädiabetes die Konzentration zirkulierender NEFA und Glukose im Blutplasma beeinflusst, da diese als Surrogatparameter der zitterfreien Thermogenese gelten. Zusätzlich wurde analysiert, welchen Einfluss die chirurgische Entfernung des BAT (vgl. Abschnitt 2.6) auf diese Parameter hat (s. Abbildung 15).

An Tag 3 nach der I/R unterschieden sich die Konzentrationen zirkulierender NEFA und Glukose zwischen prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Mäusen mit intaktem BAT („BAT-Sham“) nicht. Infolge der BAT-Ablation zeigte sich jedoch unter nicht-prädiabetischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg der systemischen NEFA-Konzentration, während dieser Effekt in der Prädiabetesgruppe ausblieb. Die Glukosekonzentration blieb hingegen in beiden Gruppen unverändert, was im Einklang mit der Literatur steht, die Fettsäuren als das primäre Substrat der zitterfreien Thermogenese beschreibt [197].

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass das BAT im prädiabetischen Zustand funktionell eingeschränkt ist und dies insbesondere Auswirkungen auf die Lipidmobilisierung hat. Der ausbleibende Anstieg der NEFA-Konzentration infolge der BAT-Ablation unter prädiabetischen Bedingungen deutet daraufhin, dass der Beitrag des BAT zur Lipidhomöostase bereits aufgrund des gestörten Stoffwechsels reduziert ist. Infolgedessen führt seine Entfernung zu keiner zusätzlichen Erhöhung der NEFA-Konzentration im Plasma, da prädiabetisches BAT

ohnehin nicht auf den I/R-Stimulus reagieren und den NEFA-Verbrauch für die zitterfreie Thermogenese initiieren kann.

Wie in Abschnitt 1.2.2 erläutert, kommt es bei Prädiabetes zu einer verstärkten Fettsäureaufnahme in die Leber und Muskulatur, was die Bildung ektoper Lipiddepots verursacht [99, 198]. Es ist denkbar, dass diese Organe nicht nur die verstärkte Lipolyse des WAT bei Prädiabetes kompensieren, sondern auch die reduzierte Lipidverwertung durch das dysfunktionale BAT und somit die Lipotoxizität und Insulinresistenz in Leber und Muskulatur weiter verschlechtert wird. Zukünftige Studien zur Bestimmung des NEFA-Turnovers, beispielsweise mittels *in vivo* verabreichter isotopenmarkierter NEFA, könnten wichtige Informationen hierzu liefern. Der fehlende Anstieg der NEFA-Spiegel nach BAT-Ablation bei Prädiabetes deutet jedoch klar auf eine eingeschränkte metabolische Funktion des BAT bei Prädiabetes hin.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse die bedeutende Rolle eines funktionellen BAT für die Regulation zirkulierender NEFA nach der kardialen I/R.

4.2.2 Beeinträchtigung der kardioprotektiven Wirkung des braunen Fettgewebes durch Prädiabetes nach kardialer Ischämie/Reperfusion

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, hat BAT bei verschiedenen kardialen Erkrankungen kardioprotektive Effekte. Um zu untersuchen, ob diese Wirkung durch die beschriebenen prädiabetesbedingten Veränderungen im BAT beeinträchtigt wird, wurden verschiedene experimentelle Ansätze verwendet.

Zunächst wurde mittels ¹H-NMR-basierten LGE (vgl. Abschnitt 2.7.2) untersucht, welchen Einfluss die BAT-Ablation unter prädiabetischen Bedingungen auf das ischämische Areal nach einer I/R hat. Die Größe der akuten myokardialen Schädigung wurde durch die BAT-Ablation weder unter Kontroll- noch unter prädiabetischen Bedingungen beeinflusst (vgl. Abbildung 17). Die LGE-Ergebnisse weisen darauf hin, dass die initiale Nekrose infolge der I/R unabhängig vom metabolischen Status und dem Vorhandensein von BAT ist.

Während magnetresonanztomographische und histologische Untersuchungen (vgl. Abschnitte 2.7.3 und 2.13.2) ergaben, dass die BAT-Ablation unter nicht-prädiabetischen Bedingungen mit einer persistierenden Reduktion der EF (Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung), einer verstärkten Narbenbildung und linksventrikulären Wandausdünnung sowie einem dilatativem Phänotypen einhergehen (vgl. Abbildung 21), waren diese Veränderungen in der vorliegenden Arbeit unter prädiabetischen Bedingungen nicht zu beobachten (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 21). Hier zeigte sich lediglich eine transiente Reduktion der EF an Tag 7 nach der I/R, die sich bis Tag 21 normalisierte (vgl. Abbildung 18). Das ESV war ausschließlich zum Untersuchungsendzeitpunkt (Tag 21 nach der I/R) erhöht (vgl. Abbildung 18). Zusätzlich wurde

eine Verstärkung der myokardialen Inflammation infolge der BAT-Ablation ausschließlich unter nicht-prädiabetischen Bedingungen beobachtet (Nega, Beran *et al.*, in Vorbereitung, vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20).

Die Auswirkungen der BAT-Ablation in Abhängigkeit vom Stoffwechselstatus lassen sich am plausibelsten durch die bereits dargelegte Dysfunktionalität des BAT durch den Prädiabetes erklären. Da die kardioprotektiven Effekte des BAT durch den Prädiabetes vermutlich bereits reduziert sind (z. B. durch den Verlust (kardio)protektiver Batokine wie FGF21 [44], iNOS [43] und BMP3B [41]), hat dessen Entfernung weniger dramatische Konsequenzen als bei stoffwechselgesunden Mäusen. Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie bekräftigt, in der die Transplantation von gesundem BAT bei Mäusen mit hochkalorischer Diät einer infarktbedingten Vergrößerung des linken Ventrikels und somit dem kardialen *Remodeling* entgegenwirkt [41-44, 199].

Basierend auf der eingeschränkten Funktionalität von BAT bei Prädiabetes wäre zu erwarten, dass sowohl prädiabetische Mäuse mit dysfunktionalem BAT als auch solche mit chirurgisch entferntem BAT postischämisch eine schlechtere kardiale Funktion aufweisen als stoffwechselgesunde Kontrolltiere. Interessanterweise war dies nicht der Fall. Die Beobachtungen lassen sich offensichtlich nicht alleine durch die Dysfunktionalität des BAT erklären, sondern deuten vielmehr auf zusätzliche adaptive Kompensationsmechanismen im prädiabetischen Organismus hin, die den Verlust der kardioprotektiven Wirkung des BAT ausgleichen und somit das kardiale *Outcome* normalisieren. Eine kompensatorische Aktivierung des WAT durch verstärktes *Browning*, also durch die Umwandlung weißer in beige Adipozyten, erscheint im Kontext des bestehenden Prädiabetes unwahrscheinlich, da das mit Adipositas assoziierte inflammatorische Milieu *Browning*-Prozesse beeinträchtigt [115]. Möglicherweise könnte stattdessen der bei T2DM beobachtete Rückgang des Glukose- und Laktatstoffwechsel zugunsten eines verstärkten Fettsäurestoffwechsels im Kontext der I/R vorrübergehend schützend wirken und die fehlende kardioprotektive Wirkung des BAT kompensieren [189, 200]. Eine im Jahr 2024 veröffentlichte Studie zeigte zudem, dass das Herz unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen nach einer kardialen I/R selbst kompensatorisch reagieren kann. Zwar wiesen in dieser Studie prädiabetische Mäuse eine verminderte Kontraktilität im Bereich des Septums auf, jedoch spiegelte sich diese regionale Funktionseinschränkung nicht in den globalen kardialen Funktionsparametern wie EF, EDV und ESV wider [189].

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse jedoch deutlich die Bedeutung des funktionell intakten BAT und zeigen, dass seine kardioprotektive Wirkung durch Prädiabetes weitgehend aufgehoben wird.

4.2.3 Prädiabetes-induzierte Veränderung der antiinflammatorischen Funktion von braunem Fettgewebe nach kardialer Ischämie/Reperfusion

Die Rolle des Immunsystems im Kontext der kardialen I/R wurde bereits im Abschnitt 1.3.4 erörtert. Im roten Knochenmark befinden sich neben reiferen Zellen des adaptiven Immunsystems Vorläuferzellen, die für die Bildung sämtlicher Blutzellen entscheidend sind [201]. Um die Auswirkungen der BAT-Ablation auf das Entzündungsgeschehen nach der I/R im Kontext des Prädiabetes zu untersuchen, wurden Stamm- und Immunzellen im hämatopoetisch aktiven roten Knochenmark von prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Mäusen mit BAT-Ablation oder BAT-Sham-OP mittels Durchflusszytometrie (vgl. 2.12.1) analysiert.

In der frühen Phase nach der I/R (Tag 1) wurde eine deutliche Veränderung der Hämatopoese im roten Knochenmark durch die BAT-Ablation beobachtet, die jedoch ausschließlich unter nicht-prädiabetischen Bedingungen auftrat. In nicht-prädiabetischen Tieren kam es zu einer signifikanten Erhöhung der absoluten Zellzahlen von Lin⁺Sca-1⁺c-Kit⁺-Zellen, LSK⁺-Zellen, ST-HSPC und CMP (vgl. Abbildung 22). Besonders die Zunahme der LSK⁺-Zellen, die multipotente HSPC sind, deutet auf eine verstärkte Stammzellaktivierung nach der I/R durch die BAT-Ablation hin. Die erhöhte Bildung von ST-HSPC, die schnell agierende HSPC darstellen [202], weisen auf eine Notwendigkeit der schnellen Differenzierung nach der I/R hin. Die Zunahme der CMP, Vorläuferzellen der myeloiden Linie [203], spricht zudem für eine verstärkte Myelopoese infolge der BAT-Ablation.

Unter physiologischen Bedingungen sezerniert BAT eine Reihe von antiinflammatorischen Batokinen (vgl. Abschnitt 1.1.2). Entfallen diese Schutzfaktoren, z. B. durch eine BAT-Ablation, ist eine Veränderung der Immunantwort naheliegend. Besonders die beobachtete vermehrte Bildung von CMP nach BAT-Ablation ist in diesem Kontext plausibel, da neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen eine zentrale Rolle in der frühen Entzündungsphase nach der I/R spielen (vgl. Abschnitt 1.3.4).

Der nächste Schritt bestand darin zu prüfen, ob die BAT-Ablation auch Auswirkungen auf die reifen Immunzellen im roten Knochenmark hat. In der Tat zeigte die durchflusszytometrische Analyse eine Erhöhung der absoluten Anzahl von Leukozyten sowie myeloiden Subtypen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Ly6C^{high}-Monozyten) im Vergleich zur BAT-Sham-Gruppe (vgl. Abbildung 23), wobei diese Effekte unter prädiabetischen Bedingungen nicht zu beobachten waren.

Die signifikante Zunahme der proinflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten, nicht jedoch der Ly6C^{low}-Monozyten, steht im Einklang mit publizierten Ergebnissen, die beschreiben, dass die reparativen Ly6C^{low}-Monozyten erst in der späteren Heilungsphase nach einer kardialen I/R eine Rolle spielen [150]. Die Analyse der Lymphozyten zeigte weder im Knochenmark noch in

der Zirkulation (vgl. Abbildung 28) eine Beteiligung am Entzündungsgeschehen. Lymphozyten erreichen ihren Peak erst an Tag 7 nach der I/R [204], weshalb es plausibel erscheint, dass an Tag 1 nach der I/R noch keine erhöhte Produktion im Knochenmark detektiert werden konnte. Zum derzeitigen Forschungsstand ist nicht bekannt, ob BAT überhaupt einen Einfluss auf die Lymphozytenantwort im Kontext der I/R hat.

Mechanistisch könnte die verstärkte Immunantwort nach BAT-Ablation mit der gesteigerten Ausschüttung des proinflammatorischen Chemokins MIP-1 β im roten Knochenmark zusammenhängen (vgl. Abbildung 26). MIP-1 β beeinflusst HSZ, indem es ihre Aktivierung unterstützt und die Differenzierung zugunsten der myeloiden Zelllinie fördert [205, 206]. In Anbetracht der erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Ly6C^{high}-Monozyten nach BAT-Ablation, erscheint eine Beteiligung von MIP-1 β an der gesteigerten Hämatopoese nach BAT-Ablation plausibel. Weiterhin könnten auch die aufgrund der BAT-Ablation systemisch erhöhten NEFA-Spiegel (vgl. Abbildung 15) die Entzündung im roten Knochenmark verstärken, da bekannt ist, dass ungesättigte NEFA durch Agonisierung des *Toll-like receptor 4* (TLR4, CD284) die Immunantwort fördern [207-209].

Wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, sind Hyperglykämie und chronische niedriggradige Entzündung zentrale Merkmale von Prädiabetes. Hyperglykämie führt aufgrund von Veränderungen in der Mikroumgebung des Knochenmarks (Stammzellnische) zu einem Defekt bei der Mobilisierung von HSZ [210]. Ein Defekt in der endothelialen Produktion von CXC-Motiv-*Chemokine* 12 (CXCL12), einem Retentionsfaktor für HSZ, bewirkt eine Dysregulation der Hämatopoese zugunsten der Myelopoese [211]. Denkbar ist, dass HSZ durch die chronische Verstärkung der Myelopoese bei Prädiabetes erschöpft sind und daher weniger stark auf den zusätzlichen Stressfaktor der BAT-Ablation im Kontext der I/R reagieren. Zudem könnte die bereits beschriebene Dysfunktion des BAT bei Prädiabetes, die sich unter anderem in einer verminderten Aktivierung des BAT nach der kardialen I/R zeigt (vgl. Abbildung 12), die Immunzellregulation beeinträchtigen und die Hämatopoese nach der I/R einschränken. Eine Bestimmung der CXCL12-Konzentration im roten Knochenmark könnte darüber Aufschluss geben und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Glukosekonzentration im roten Knochenmark unterschied sich in der Frühphase nach der I/R nicht signifikant zwischen BAT-ablatierten und BAT-Sham-operierten Tieren, weder unter prädiabetischen noch unter nicht-prädiabetischen Bedingungen (vgl. Abbildung 27). Dies spricht zunächst gegen eine direkte Beteiligung des lokalen Glukoseangebots an den beobachteten hämatopoetischen Veränderungen, wobei methodische Limitationen berücksichtigt werden müssen. Zum einen erlaubt die *ex vivo*-Analyse keine Aussage über die

dynamische Glukoseaufnahme und -verwertung im intakten Gewebe, zum anderen entfällt bei dieser Methode die funktionelle Interaktion des roten Knochenmarks mit seiner Mikroumgebung. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass bei prädiabetischen Mäusen ein Trend zu etwa 50 % höheren Glukosewerten zu beobachten war und die BAT-Ablation bei stoffwechselgesunden Kontrollmäusen tendenziell zu einem Anstieg, bei prädiabetischen Tieren jedoch zu einer Abnahme der Glukosekonzentration führte, diese Effekte allerdings keine statistische Signifikanz erreichten, erscheinen ergänzende *in vivo*-Analysen zur Validierung der Befunde erforderlich. Sinnvoll wäre beispielsweise die Verfolgung applizierter isotopenmarkierter Glukose (z. B. ^2H) mittels MRT im Organismus. Diese Analyse erlaubt die Untersuchung metabolischer Prozesse unter physiologischen Bedingungen und könnte somit sensitivere Hinweise auf prädiabetesbedingte Unterschiede liefern.

Die Beobachtung, dass an Tag 21 nach der kardialen I/R unter nicht-prädiabetischen Bedingungen eine erhöhte Anzahl zirkulierender Monozyten, insbesondere Ly6C^{high}-Monozyten, nachweisbar war (vgl. Abbildung 28), obwohl die Hämatopoese im roten Knochenmark zu diesem Zeitpunkt nicht mehr verstärkt war (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25), deutet auf eine dysregulierte Auflösung der systemischen Inflammation durch die BAT-Ablation bei physiologischer Stoffwechselleage hin.

Proinflammatorische Ly6C^{high}-Monozyten werden klassischerweise in der ersten Phase nach einem MI aus dem Knochenmark und der Milz in das verletzte Myokard rekrutiert [138] und dominieren dort an Tag 1-4 nach der Ischämie, während reparative Ly6C^{low}-Monozyten in der Spätphase die Entzündungsreaktion auflösen [212]. Obwohl keine Daten zur Monozyteninfiltration des Myokards an Tag 21 nach der I/R vorliegen, kann die erhöhte Konzentration der Ly6C^{high}-Monozyten in der Zirkulation infolge der BAT-Ablation als Hinweis auf eine gestörte Immunhomöostase bei fehlendem BAT gedeutet werden. Da dieser Monozytensubtyp in der frühen Phase nach dem MI funktionell relevant ist [212], ist es plausibel, dass ihr spätes Vorkommen im Blut eher Ausdruck einer systemischen Dysregulation ist als einer verlängerten Wirkung im verletzten Myokard.

Als mögliche Ursachen für die langfristig erhöhten proinflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten in der Zirkulation könnte das Fehlen antiinflammatorischer Batokine infolge der BAT-Ablation in Betracht gezogen werden. Intaktes BAT sezerniert entzündungshemmende Faktoren wie z. B. FGF-21, die zur Begrenzung der Immunantwort beitragen [42, 213, 214]. Zudem sollte auch die Milz als sekundäres Monozytenreservoir berücksichtigt werden [150]. Es ist denkbar, dass die BAT-Ablation über veränderte Batokinspiegel oder andere Mechanismen zu einer verlängerten Monozytenmobilisierung aus der Milz führt, ohne dass die hämatopoetische Aktivität im Knochenmark zu diesem Zeitpunkt erhöht ist. Nichtdestotrotz könnte die erhöhte

Anzahl der Monozyten, insbesondere Ly6C^{high}-Monozyten, auch auf eine pathologisch gesteigerte Mobilisierung und Rekrutierung von Immunzellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation hinweisen, ohne dass die Hämatopoese im Knochenmark selbst angeregt ist.

In dieser Arbeit konnte unter prädiabetischen Bedingungen weder durchflusszytometrisch noch histologisch eine verstärkte Entzündungsreaktion im Herzen infolge der BAT-Ablation nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19 und Abbildung 20). Im Gegensatz dazu zeigten Vorarbeiten ([177], Nega, Beran *et. al.*, in Vorbereitung), dass unter nicht-prädiabetischen Bedingungen die chirurgische Entfernung des BAT mit einer erhöhten Infiltration inflammatorischer Zellen im Myokard einhergeht. Diese Ergebnisse unterstützen die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass im Kontext des Prädiabetes eine abgeschwächte, postischämische Immunantwort infolge der BAT-Ablation vorliegt. Die fehlende Entzündungsreaktion im Herzgewebe prädiabetischer Mäuse ([177], Nega, Beran *et. al.*, in Vorbereitung) korreliert mit der ausbleibenden myeloiden Aktivierung im roten Knochenmark und deutet auf eine frühpostischämische systemische Beeinträchtigung der Immunantwort bei gestörtem Stoffwechsel hin. Zusätzlich lassen sich die durchflusszytometrischen Ergebnisse des roten Knochenmarks mit den Daten zur Herzfunktion sowie den Ergebnissen der Gomori-Färbung (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 21) korrelieren. Es scheint plausibel, dass unter normoglykämischen Bedingungen die durch die BAT-Ablation induzierte verstärkte Bildung myeloider Immunzellen im roten Knochenmark zu einer verstärkten Infiltration von Immunzellen in das geschädigte Myokard führt, was in der Folge in einer Verschlechterung der kardialen Funktion, einer reduzierten Wanddicke und einer vergrößerten Narbenbildung resultiert.

4.2.4 Effekte des braunen Fettgewebes auf das Knochenmarkfett im Kontext der kardialen Ischämie/Reperfusion unter nicht-prädiabetischen Bedingungen

4.2.4.1 Strukturelle Auswirkungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass intaktes BAT unter nicht-prädiabetischen Bedingung essenziell für die späte postischämische Adaption des BMAT ist, während diese Anpassungsprozesse nach BAT-Ablation ausbleiben. In Tieren mit intaktem BAT („BAT-Sham“) kam es über einen Zeitraum von 21 Tagen nach kardialer I/R zu einem signifikanten Anstieg der PDFF im distalen Knochenmark, begleitet von einer Reduktion der PDWF und einer gegenüber der BAT-Ablation-Gruppe verlängerten T2-Relaxationszeit an Tag 21.

Diese Veränderungen waren spezifisch für die distale Tibia, die vorrangig BMAT beinhaltet und blieben im proximalen Knochenmark aus. In der BAT-Ablation-Gruppe traten diese

Veränderungen nicht auf (vgl. Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31). Ergänzend zeigten histologische Analysen der distalen Tibia von Tieren mit intaktem BAT signifikant größere, aber dafür weniger BMAds im Vergleich zur BAT-Ablation-Gruppe (vgl. Abbildung 32).

Da die Anzahl der Adipozyten bei BAT-ablatierten Tieren zumindest im analysierten Gesichtsfeld signifikant höher war als in den BAT-Sham-Gruppe, das intrazelluläre Lipidvolumen pro Fettzelle jedoch geringer, resultiert insgesamt ein niedrigerer relativer Fettanteil (PDFF) in der distalen Tibia BAT-ablatierter Tiere im Vergleich zu BAT-Sham-Tieren. Ebenso spiegelt die in der BAT-Ablation-Gruppe beobachtete kürzere T2-Relaxationszeit bei gleichzeitig signifikant erhöhter PDWF den erhöhten Anteil intrazellulären Wassers wider, was mit der stark erhöhten Anzahl kleiner Adipozyten konsistent ist.

Da intrazelluläres Wasser aufgrund seiner eingeschränkten Beweglichkeit infolge von Wechselwirkungen mit biologischen Makromolekülen zu einer schnelleren Dephasierung der Zellspins führt, weist es eine kürzere T2-Relaxationzeit auf als freies, extrazelluläres Wasser [215]. Die histologischen Ergebnisse deuten somit auf das vermehrte Vorliegen unreifer, nicht vollständig ausdifferenzierter BMAds infolge der BAT-Ablation hin.

Insgesamt legen die MRT-Ergebnisse und histologischen Befunde eine Rolle des BAT in der langfristigen strukturellen Modulation des BMAT im Rahmen einer I/R dar und deuten zudem auf mögliche funktionelle Veränderungen hin. Die in der BAT-Ablation-Gruppe beobachtete Zunahme kleiner BMAds im analysierten Gesichtsfeld bei gleichzeitig verringelter Adipozytengröße und fehlendem Anstieg der PDFF lässt zwei mögliche Mechanismen vermuten. Einerseits könnte der Verlust regulatorischer BAT-Signale zu einer gestörten Reifung und Differenzierung von BMAds führen. Diese Hypothese wird insbesondere durch die histologischen Befunde stark unterstützt. Andererseits ist ein erhöhter Lipidverbrauch im Sinne einer kompensatorischen Mobilisierung denkbar, bei der das BMAT infolge der BAT-Ablation vermehrt zur systemischen Energieversorgung beiträgt. Beides würde den fehlenden Anstieg der PDFF im Kontext der I/R erklären.

Beide Hypothesen lassen sich auf Grundlage der vorliegenden Daten und bislang fehlenden Literatur zur Interaktion von BAT und BMAT nicht abschließend bewerten, verdeutlichen jedoch die zentrale Rolle von BAT in der funktionellen Regulation des BMAT im Kontext der kardialen I/R. Ungewiss ist auch, ob die beschriebenen Veränderungen in der BAT-Sham-Gruppe, insbesondere die Zunahme der PDFF, zumindest teilweise auf die altersbedingte Akkumulation von BMAT [68] zurückzuführen ist, während diese Akkumulation in der BAT-Ablation-Gruppe aufgrund der beschriebenen potenziellen Mechanismen maskiert wird. Sicher ist, dass die beobachteten Effekte nicht aufgrund systemisch erhöhter Noradrenalininspiegel

ausgelöst wurden, da sich die zirkulierenden Noradrenalkonzentrationen zwischen BAT-Sham und BAT-Ablation nicht unterschieden (vgl. Abbildung 16) und somit andere Mechanismen die unidirektionale Interorgan-Kommunikation vermitteln müssen.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus näher zu beleuchten, wäre in zukünftigen Arbeiten der Einsatz von BAT-konditioniertem Medium in einem *in vitro*-Modell ein sinnvoller experimenteller Ansatz. Präadipozyten aus der distalen Tibia sollten mit BAT-konditioniertem Medium stimuliert und anschließend differenziert werden, um potenzielle Effekte von sezernierten Mediatoren des BAT auf das BMAT zu untersuchen. Die Analyse der adipogenen Differenzierung sollte sowohl morphologisch (z. B. mittels Oil Red O-Färbung) als auch molekularbiologisch durch die Expressionsanalyse adipogener Marker (u. a. *Ppary*) erfolgen. Zusätzlich sollte die Expression lipolyseassozierter Enzyme wie ATGL und HSL sowie die Freisetzung von FFA und Glycerin ins Kulturmedium quantifiziert werden, um mögliche Veränderungen im Lipidstoffwechsel der BMAds zu erfassen.

4.2.4.2 Funktionelle Auswirkungen

Angesichts der strukturellen Veränderungen des BMAT infolge der BAT-Ablation sowie der verstärkten Immunantwort im roten Knochenmark wurde die Hypothese aufgestellt, dass BAT indirekt über das BMAT die hämatopoetische Nische und Immunaktivität moduliert. Dies könnte die verstärkte myeloide Immunantwort im roten Knochenmark stoffwechselgesunder Mäuse nach BAT-Ablation erklären (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23). Über die Freisetzung dieser Immunzellen in den systemischen Kreislauf und deren potenzielle Migration in das geschädigte Myokard könnte dieser Mechanismus zur Verschlechterung des kardialen *Outcomes* beitragen.

Kürzlich publizierte Erkenntnisse zeigen, dass BMAds ihre Fettsäuren an HSZ abgeben, um die akute inflammatorische Phase nach dem MI energetisch zu unterstützen [80]. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die chirurgische Entfernung des BAT diesen Lipidtransfer verstärkt und dadurch den in der distalen Tibia beobachteten ausbleibenden Anstieg des Fettgehalts nach der I/R bei gleichzeitiger Verstärkung der Hämatopoiese verursachen könnte. Diese Hypothese erschien besonders unter dem Aspekt plausibel, dass intaktes BAT ein wichtiger systemischer Konsument zirkulierender Fettsäuren ist [25] und dessen Verlust zu einer Destabilisierung des systemischen Lipidmilieus führen könnte, was wiederum das metabolisch aktive BMAT aktivieren könnte.

Obwohl eine verstärkte Immunantwort und ein geringerer Fettanteil in der BMAT-reichen distalen Tibia festgestellt wurden, lieferte das durchgeführte Co-Kultur-Experiment mit Lin-Zellen keine Hinweise auf einen erhöhten Transfer der Bodipy-markierten Lipide aus BMAds auf HSZ infolge der BAT-Ablation (vgl. Abbildung 35). Diese Ergebnisse schließen eine BAT-

abhängige Modulation des direkten Fettsäuretransfers von BMAdS auf HSZ in der Frühphase nach I/R aus und lassen somit die Ursache des im Gegensatz zur BAT-Sham-Gruppe fehlenden BMAT-Anstiegs weiterhin ungeklärt.

Für zukünftige Experimente wäre es folglich von Interesse, auch reife Immunzellen des roten Knochenmarks als potenzielle Zielzellen eines Lipid-regulierten Einflusses zu untersuchen, da die regulatorische Wirkung freier Fettsäuren auf Immunzellen – insbesondere auf Makrophagen – im Fettgewebe bereits beschrieben ist [216]. Weitere Co-Kultur-Experimente mit isolierten myeloiden Zellen und konditioniertem BMAT-Medium könnten hierüber Aufschluss geben.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit das BAT das Sekretionsprofil des BMAT unter nicht-prädiabetischen Bedingungen sowohl im Kontext einer kardialen I/R als auch ohne I/R beeinflusst. Die beobachtete Zunahme der KC-Sekretion im BMAT infolge der BAT-Ablation (vgl. Abbildung 33) deutet auf eine proinflammatorische Reprogrammierung des BMAT hin, die bereits unter basalen Bedingungen nachweisbar ist. KC (CXCL1) ist ein Chemokin, das eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten spielt [217]. Die erhöhte Sekretion legt nahe, dass BAT unter physiologischen Bedingungen hemmend auf die inflammatorische Aktivität des BMAT wirkt.

Interessanterweise beeinflusste die BAT-Ablation die KC-Sekretion im Rahmen der kardialen I/R nicht (vgl. Abbildung 34), was auf einen kontextabhängigen Effekt hindeutet. Als Ursache der fehlenden Modulation können postischämische strukturelle Veränderungen im Fett- und Wassergehalt des BMAT ausgeschlossen werden, da diese erst an Tag 21 nach I/R nachweisbar waren (vgl. Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32), während die Zytokinanalyse bereits an Tag 1 nach der I/R durchgeführt wurde. Stattdessen ist anzunehmen, dass funktionelle, akut inflammatorische Reprogrammierungen im BMAT infolge der BAT-Ablation bereits vorliegen und im Kontext der I/R eine Kompensation der KC-Sekretion ermöglichen. Eine mögliche Erklärung könnte in einem *Ceiling*-Effekt der inflammatorischen Aktivierung des BMAT nach I/R liegen, bei dem die KC-Produktion durch systemische Stimuli maskiert wird.

Die Ergebnisse der quantitativen Zytokin- und Chemokinanalyse zum postischämischen Zeitpunkt sind mit Vorsicht zu interpretieren, da viele Konzentrationen unterhalb der Nachweigrenze lagen und somit nur eine begrenzte Anzahl auswertbarer Ergebnisse zur Verfügung stand. Ergänzend zu der sekretorischen Analyse des BMAT sollten zukünftige Studien durchflusszytometrische Untersuchung des BMAT inkludieren, ob die BAT-Ablation eine inflammatorische, durch Immunzellinfiltration entstehende, Mikroumgebung im BMAT verursacht.

Insgesamt stützen die Ergebnisse die Hypothese einer funktionellen Interorgan-Kommunikation zwischen BAT und BMAT, bei der das BAT unter physiologischen Bedingungen die Immunhomöostase im BMAT mitregulieren könnte. Die Tatsache, dass dieser Effekt bereits ohne zusätzliche ischämische Belastung des Organismus auftritt, spricht für eine konstitutive Interaktion beider Fettgewebe. Die Interaktion von BAT und BMAT wurde bisher wissenschaftlich nicht adressiert, weshalb keine Studien zu möglichen zugrundeliegenden molekularen Signalwegen existieren.

4.2.4.3 Kommunikationswege zwischen braunem Fettgewebe und Knochenmarkfett

In der vorliegenden Arbeit wurden Partikel aus BMAT isoliert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der I/R mittels TEM charakterisiert. Da TEM als einziges Verfahren die ultrastrukturelle Beurteilung von EVs ermöglicht [218], konnte in den untersuchten Proben keine morphologische Evidenz für klassische EV festgestellt werden. Ein zusätzlicher Nachweis typischer EV-Proteine (z. B. CD9, CD63 und CD81) [168] mittels Western-Blot wäre formal ergänzend in Erwägung zu ziehen gewesen, ist jedoch angesichts der eindeutig negativen TEM-Ergebnisse nicht erforderlich. Somit konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass BMAT postischämisch keine EV sekretiert und auch eine BAT-Ablation dies in der Spätphase nach der I/R nicht moduliert.

In zukünftigen Studien sollten weitere potenzielle Interaktionswege zwischen BAT und BMAT über bislang nicht adressierte Mechanismen untersucht werden. Dies sollte unter anderem die Analyse freier zirkulierender miRNA als alternativen Mediator einschließen, da bereits bekannt ist, dass BAT über miRNA kommuniziert [12, 219, 220]. Zusätzlich sollte die noradrenerge Signalübertragung im BMAT in Abhängigkeit vom BAT untersucht werden sowie die Ausbildung möglicher neuronaler Netzwerke zwischen beiden Fettgeweben, da sowohl BAT als auch BMAT durch das sympathische Nervensystem innerviert sind [25, 221, 222]. Plausibel erscheint auch eine Kommunikation über Lipidmediatoren wie NEFA, da BMAT durch Lipolyse NEFA in die Zirkulation abgibt [62, 223]. Co-Kultivierungsexperimente mit NEFA in BAT-ablatierten und BAT-Sham-operierten Tieren könnten einen möglichen experimentellen Ansatz darstellen.

Eine graphische Darstellung der in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse ist Abbildung 38 zu entnehmen.

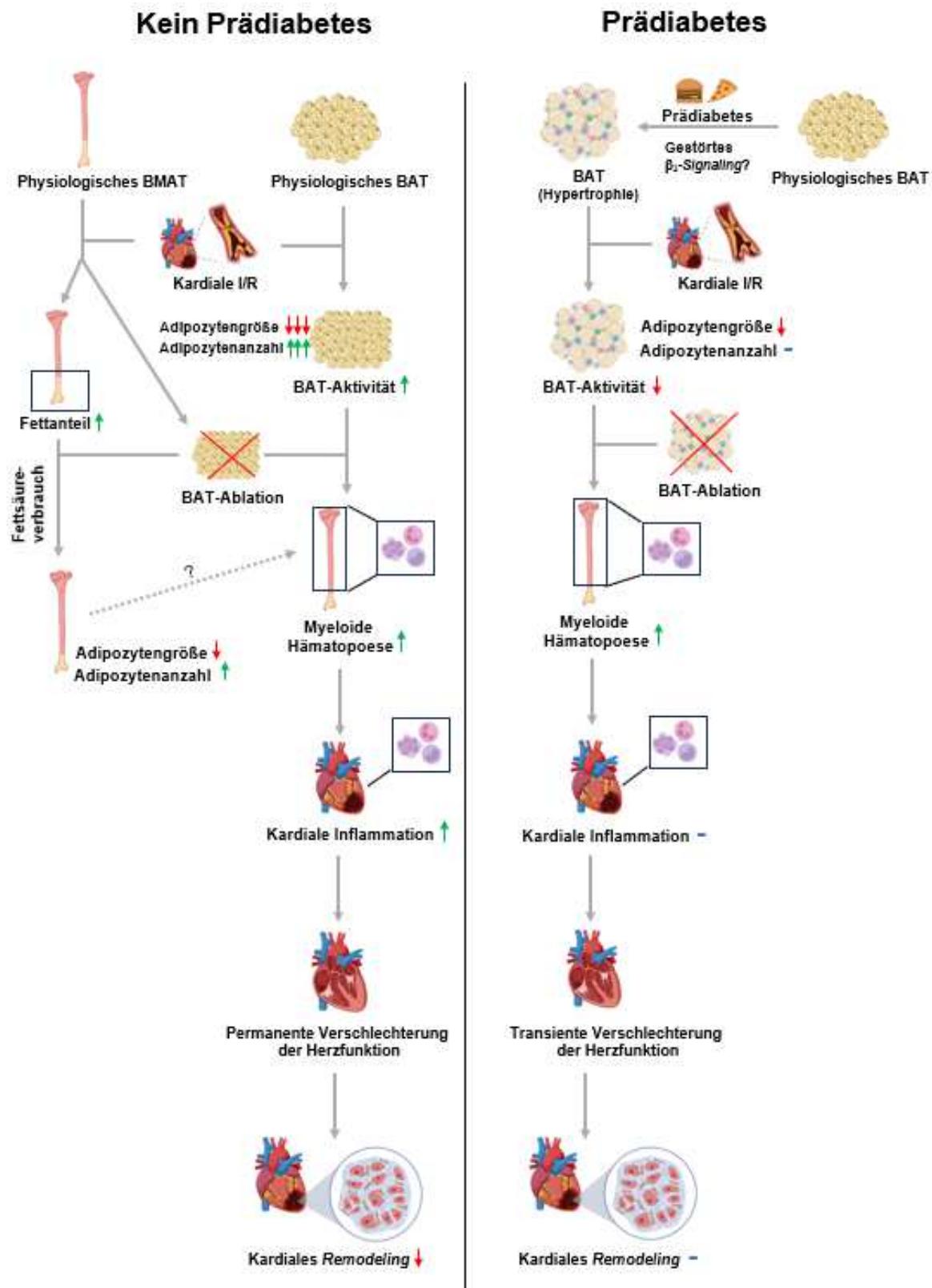


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Effekte von braunem Fettgewebe vor und nach kardialer Ischämie/Reperfusion im stoffwechselgesunden Zustand (links) und bei Prädiabetes (rechts).

Im stoffwechselgesunden Zustand führt die chirurgische Ablation von BAT zu einer verstärkten myeloiden Hämatopoese im roten Knochenmark. Dies geht mit einer erhöhten kardialen Immunantwort einher, die zu einer anhaltenden Verschlechterung der Herzfunktion führt und das kardiale *Remodeling* beeinträchtigt. Bei Prädiabetes zeigt das BAT einen Verlust phänotypischer Merkmale und eine eingeschränkte Funktionalität. Infolgedessen bleibt der negative Einfluss einer BAT-Ablation auf das kardiale *Outcome* im Vergleich zum stoffwechselgesunden Zustand aus. Abkürzungen: BAT = braunes Fettgewebe, I/R = kardiale Ischämie/Reperfusion. ↑ = Zunahme, ↓ = Abnahme, - = gleichbleibend. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

4.3 Limitationen und Ausblick

Trotz relevanter Erkenntnisse weist die vorliegende Arbeit Limitationen auf, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Eine wesentliche Limitation stellt die chirurgische Entfernung des BAT dar. Der mit dem Eingriff einhergehende operative Stress kann systemische Reaktionen induzieren, die unabhängig von der eigentlichen BAT-Ablation physiologische Prozesse wie die Immunantwort beeinflussen können. Um diese potentielle Verzerrung möglichst gering zu halten, wurden Sham-Operationen durchgeführt. Dennoch sollten zur zusätzlichen Absicherung der Ergebnisse in zukünftigen Experimenten auch gentechnisch veränderte Mauslinien wie z. B. FVB/N-Tg(UcpDTA)1Kz/J genutzt werden. Bei dieser Mauslinie wird durch die gezielte Expression des Diphtherie-Toxin-A unter der Kontrolle des *Ucp1*-Promoters eine selektive und systemische Depletion brauner Adipozyten ermöglicht [34].

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist die fehlende Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Unterschiede, da für die Experimente ausschließlich männliche Mäuse verwendet wurden. Da Frauen im Vergleich zu Männern über mehr BAT verfügen [16, 224, 225] und Männer bis zu einem mittleren Alter über ein größeres BMAT-Volumen aufweisen [55, 226], könnten sich experimentell unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit vom Geschlecht ergeben. Zukünftige Studien sollten daher zusätzlich auch Untersuchungen an weiblichen Mäusen inkludieren.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der unidirektionale Einfluss des BAT auf das BMAT untersucht. Der Einsatz einer Mauslinie mit gezielter Depletion von BMAT, wie beispielsweise das OSX-FAC-*Ppary*-KO-Modell [74], könnte eine sinnvolle Ergänzung sein und zukünftig wertvolle Erkenntnisse über die bidirektionalen Einflüsse zwischen BAT und BMAT liefern.

Die vorliegende Arbeit belegt eindeutige (kardio)protektive Effekte des BAT im Kontext der I/R unter stoffwechselgesunden Bedingungen und zeigt, dass Prädiabetes zu einer funktionellen Dysregulation des BAT führt, die diese Effekte aufhebt. Damit liefert sie wertvolle Ergebnisse über die physiologische Bedeutung des Prädiabetes auf die BAT-Funktionalität. Die

zugrundeliegenden Mechanismen dieser Dysfunktion konnten jedoch nicht vollumfänglich identifiziert werden.

Im Hinblick auf die experimentellen Befunde stellt eine gestörte β_3 -adrenerge Reaktivität bzw. Störung der intrazellulären β_3 -vermittelten Signaltransduktion im BAT den plausibelsten hypothetischen Mechanismus der verminderten BAT-Reaktivität nach der I/R dar. Dieser Signalweg ist essenziell für alle zentralen Funktionen des BAT und könnte daher eine einheitliche Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten Ergebnisse liefern. Zukünftige Studien sollten diesen Mechanismus gezielt untersuchen und auch die pharmakologische Reaktivierung dieses Signalwegs („*proof of concept*“) inkludieren.

Zwar existieren bereits Ansätze zur Aktivierung des BAT beim Menschen, mitunter durch den selektiven β_3 -Rezeptor-Agonisten Mirabegron [227] und den β_2 -Rezeptor-Agonisten Salbutamol [228], diese unterscheiden jedoch nicht zwischen stoffwechselgesunden und metabolisch beeinträchtigen Patienten und sind bislang lediglich experimenteller Natur. Die Untersuchung weiterer Wirkstoffkandidaten sollte daher zukünftig in den Fokus der Forschung treten.

Da die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig belegen, dass Prädiabetes zu einer Dysfunktionalität des BAT führt, ist eine lediglich therapeutische Aktivierung des BAT bei prädiabetischen Patienten nicht zielführend. Stattdessen erscheint ein zweistufiger Therapiesatz plausibel, bei dem zunächst die Funktionalität des BAT wiederhergestellt wird, bevor eine gezielte BAT-Aktivierung erfolgt. Geeignete Wirkstoffkandidaten für die Wiederherstellung der BAT-Funktion bei Prädiabetes könnten Vertreter der PPAR γ -Agonisten (z. B. Rosiglitazon) und FGF21-Analoga sein, da sie teils oder gar vollständig unabhängig von der β_3 -Reaktivität brauner Adipozyten agieren. PPAR γ -Agonisten induzieren die Differenzierung brauner Adipozyten und fördern die Expression thermogener Gene im BAT [229, 230]. FGF21-Analoga erhöhen die Expression thermogener Gene und fördern das „*Browning*“ weißer Adipozyten [231, 232]. Beide Wirkstoffklassen könnten dazu beitragen, das BAT strukturell und funktionell zu rekonstituieren und die Reaktionsfähigkeit auf adrenerge Stimulation dadurch zu verbessern. Aufbauend darauf könnte in einem zweiten Schritt eine pharmakologische Aktivierung durch β_3 -Agonisten (z. B. Mirabegron) erfolgen, um das BAT gezielt zu aktivieren.

Zudem sollten präventive Maßnahmen zum Erhalt der BAT-Funktion angestrebt werden, um das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen so früh wie möglich zu senken. Diese Maßnahmen decken sich weitgehend mit den Empfehlungen zur konventionellen Behandlung des Prädiabetes (vgl. Abschnitt 1.2.1), da gezielte Lebensstilmodifikationen in einem sehr frühen Stadium möglicherweise nicht nur das Fortschreiten des Prädiabetes verlangsamen würden, sondern auch dem Funktionsverlust des BAT entgegenwirken könnten.

Obwohl der Hauptfokus dieser Arbeit auf dem Einfluss von Prädiabetes auf das BAT bei kardialer I/R lag, zeigten sich unter nicht-prädiabetischen Bedingungen Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen BAT und BMAT. Die durch die BAT-Ablation induzierten strukturellen Veränderungen im BMAT deuten darauf hin, dass intaktes BAT im stoffwechselgesunden Zustand das Knochenmarkmilieu indirekt über metabolische Prozesse des BMAT beeinflussen könnte. Wie in Abschnitt 4.2.4.2 beschrieben, sollte diese potenzielle Signalachse in zukünftigen Studien näher untersucht werden, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die durch die BAT-Ablation verstärkte Immunantwort im roten Knochenmark möglicherweise zum verschlechterten kardialen *Outcome* nach der I/R beiträgt. Translationale postischämische Studien am Menschen könnten dazu beitragen, die klinische Relevanz der tierexperimentellen Befunde besser zu beurteilen.

5 Zusammenfassung

Prädiabetes stellt eine Vorstufe des Typ-2-Diabetes mellitus dar und ist mit vielfältigen metabolischen und inflammatorischen Veränderungen assoziiert, die das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Dem braunen Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT) kommt aufgrund seiner Fähigkeit, Lipide und Glukose im Rahmen der zitterfreien Thermogenese zu verstoffwechseln, eine protektive Rolle bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen zu. Inwieweit Prädiabetes diese Funktion im Rahmen einer kardialen Ischämie/Reperfusion (I/R) beeinflusst, ist bislang unzureichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Prädiabetes auf die Funktionalität des BAT im Rahmen der I/R zu untersuchen. Zudem wurde analysiert, ob das BAT unter nicht-prädiabetischen Bedingungen strukturelle und funktionelle Veränderungen im Knochenmarkfett (*bone marrow adipose tissue*, BMAT) infolge der I/R bewirkt. Zur Induktion des Prädiabetes wurden männliche C57BL/6J-Mäuse über einen Zeitraum von neun Wochen mit einer diabetogenen Diät behandelt. Drei Tage vor der I/R erfolgte eine chirurgische Entfernung des BAT („BAT-Ablation“), um dessen Einfluss auf das Herz und Knochenmark in Gegenwart und Abwesenheit von Prädiabetes zu analysieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass Prädiabetes zu einem „Whitening“ des BAT führt, das das BAT dysfunktional macht und dessen kardioprotektive Effekte abschwächt. Während die BAT-Ablation unter nicht-prädiabetischen Bedingungen eine signifikante Verschlechterung des kardialen *Outcomes* mit einer vergrößerten linksventrikulären Narbe, einer reduzierten kardialen Wanddicke sowie einer verstärkten Entzündungsreaktion zur Folge hatte, blieben diese nachteiligen Effekte bei prädiabetischen Mäusen aus. Folglich ist unter prädiabetischen Bedingungen nicht mehr von einer kardioprotektiven Wirkung des BAT auszugehen.

Zudem war die BAT-Ablation unter nicht-prädiabetischen Bedingungen nicht nur mit einem proinflammatorischen Phänotyp des hämatopoetisch aktiven roten Knochenmarks assoziiert, sondern beeinflusste auch das BMAT strukturell. Die BAT-Ablation verhinderte den Anstieg des BMAT-Volumens infolge der I/R und führte zu einer gesteigerten Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen unter Basalbedingungen. Ein vermehrter Verbrauch von Fettsäuren des BMAT im Rahmen der Notfallhämatopoese konnte als Ursache für die ausbleibende BMAT-Expansion ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse zur Rolle des BAT bei prädiabetischer Stoffwechsellage und belegen erstmals einen Einfluss des BAT auf das BMAT im Kontext der I/R. Diese Ergebnisse könnten langfristig zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beitragen, die auf eine gezielte Erhaltung bzw. Reaktivierung der BAT-Funktion abzielen.

6 Summary

Prediabetes is considered a precursor of type 2 diabetes mellitus and is associated with a wide range of metabolic and inflammatory changes that increase the risk of cardiovascular disease. Due to its ability to metabolize lipids and glucose via non-shivering thermogenesis, brown adipose tissue (BAT) has been attributed a protective role in metabolic and cardiovascular disorders. However, the extent to which prediabetes affects this function in the context of cardiac ischemia/reperfusion (I/R) is insufficiently understood.

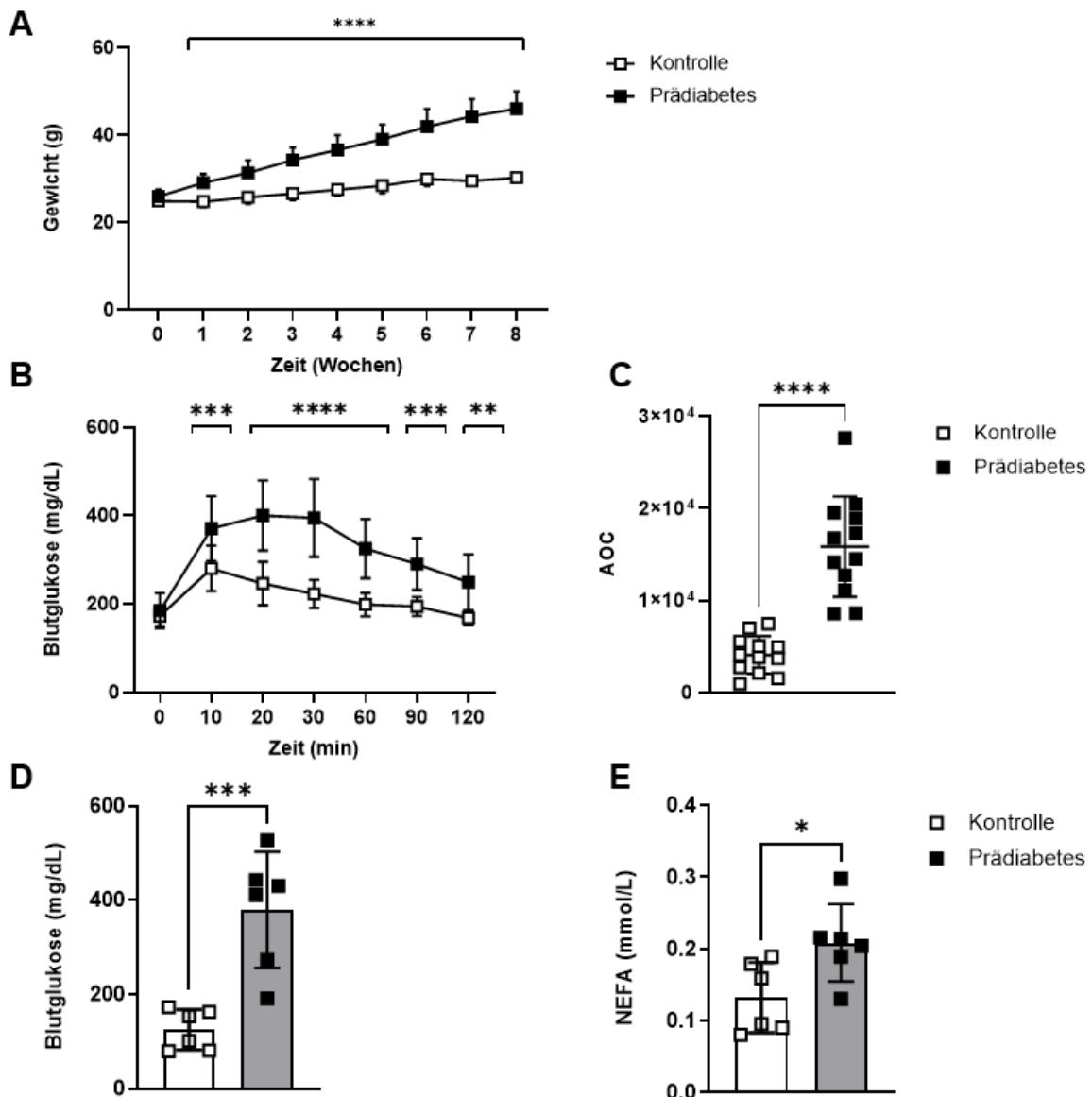
The aim of this study was to examine the impact of prediabetes on BAT functionality in the setting of I/R. In addition, it was analyzed whether BAT causes structural and functional changes in bone marrow adipose tissue (BMAT) following I/R under non-prediabetic conditions. To induce prediabetes, male C57BL/6J mice were treated with a diabetogenic diet for nine weeks. Three days prior to I/R, BAT was surgically removed (“BAT ablation”) to assess its effects on the heart and bone marrow in the presence and absence of prediabetes.

The results demonstrate that prediabetes induces a “whitening” of BAT, leading to BAT dysfunction and attenuation of its cardioprotective effects. While BAT ablation under non-prediabetic conditions significantly worsened cardiac outcome, as evidenced by an enlarged left ventricular scar, reduced myocardial wall thickness, and an amplified inflammatory response, these detrimental effects were not observed in prediabetic mice. Consequently, BAT can no longer be regarded as cardioprotective in the context of prediabetes.

Moreover, BAT ablation in non-prediabetic mice was not only associated with a proinflammatory phenotype of the hematopoietically active red bone marrow, but also induced structural alterations in BMAT. BAT ablation prevented the I/R-induced increase in BMAT volume and led to enhanced secretion of proinflammatory cytokines under basal conditions. Increased consumption of fatty acids from BMAT in the context of emergency hematopoiesis could be ruled out as a cause of the absent BMAT expansion.

These results provide new insights into the role of BAT under prediabetic conditions and, for the first time, demonstrate an influence of BAT on BMAT in the context of I/R. In the long term, these results may contribute to the development of novel therapeutic strategies aimed at the targeted preservation or reactivation of BAT function.

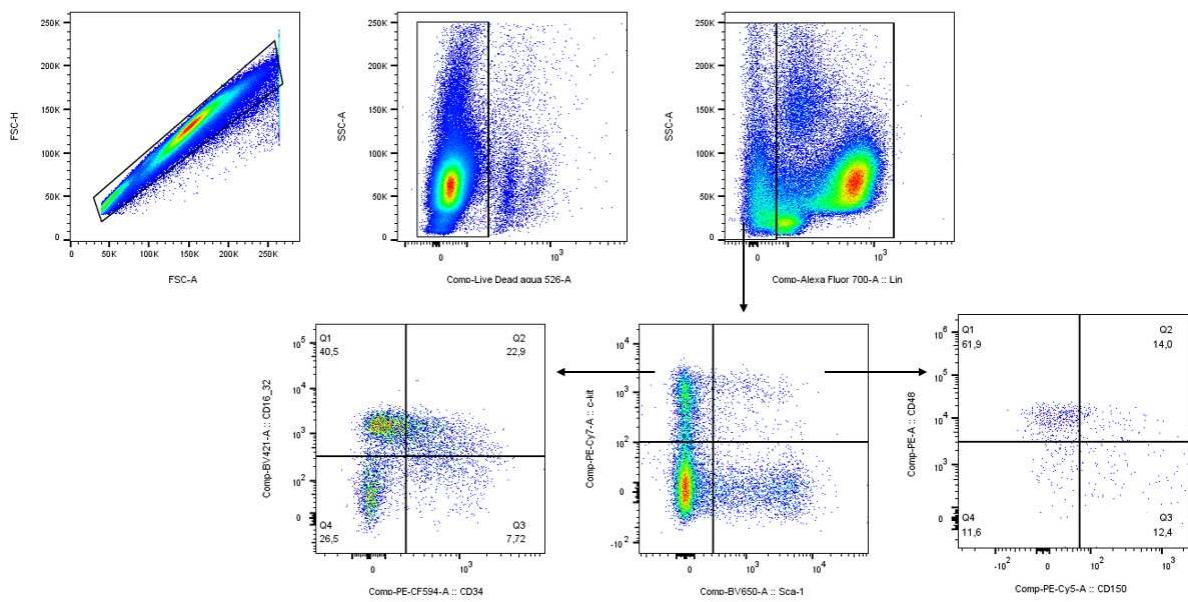
7 Appendix



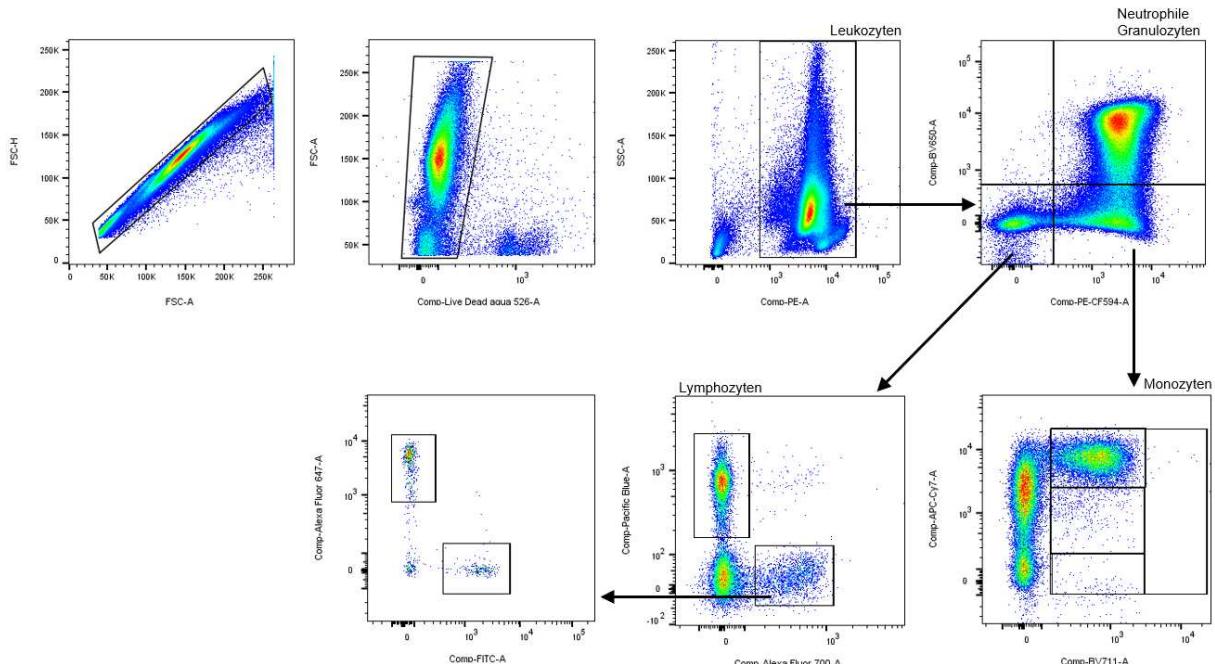
Appendix 1: Validierung des Diet-induced Obesity (DIO)-Modells zur Induktion eines Prädiabetes.

A. Gewichtsverläufe von C57BL/6J-Mäuse, die acht Wochen lang eine Kontrolldiät („Kontrolle“) oder eine hochkalorische Diät („Prädiabetes“) ad libitum erhalten haben (n=23,25), **B, C.** Ergebnisse des intraperitonealen Glukosetoleranztests nach acht Wochen der jeweiligen Diät (n=12):

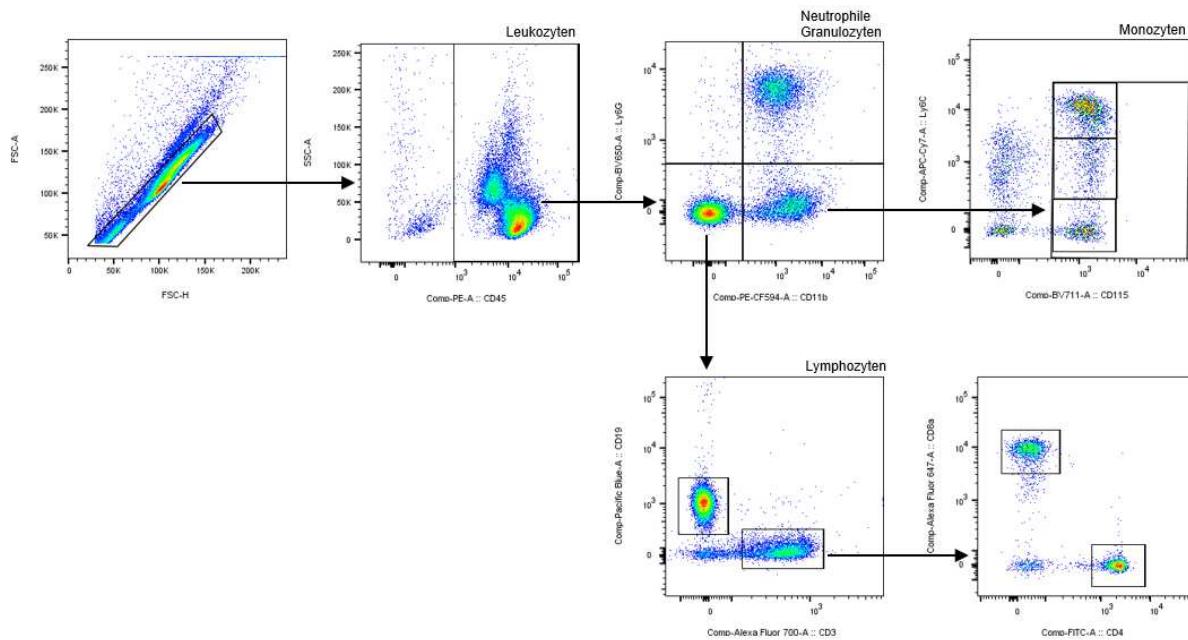
B. Blutglukosekonzentration zu definierten Zeitpunkten nach intraperitonealer Glukoseinjektion und **C.** Fläche der Kurve (Area of the Curve (AOC)), Konzentration von **D.** Glukose und **E.** nicht-veresterten freien Fettsäuren (non-esterified fatty acids, NEFA) im Blutplasma (n=6). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zweifaktorielle ANOVA und Sidak's multipler Vergleichstest (A, B) und ungepaarter Student's t-Test (C, D, E), *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001.



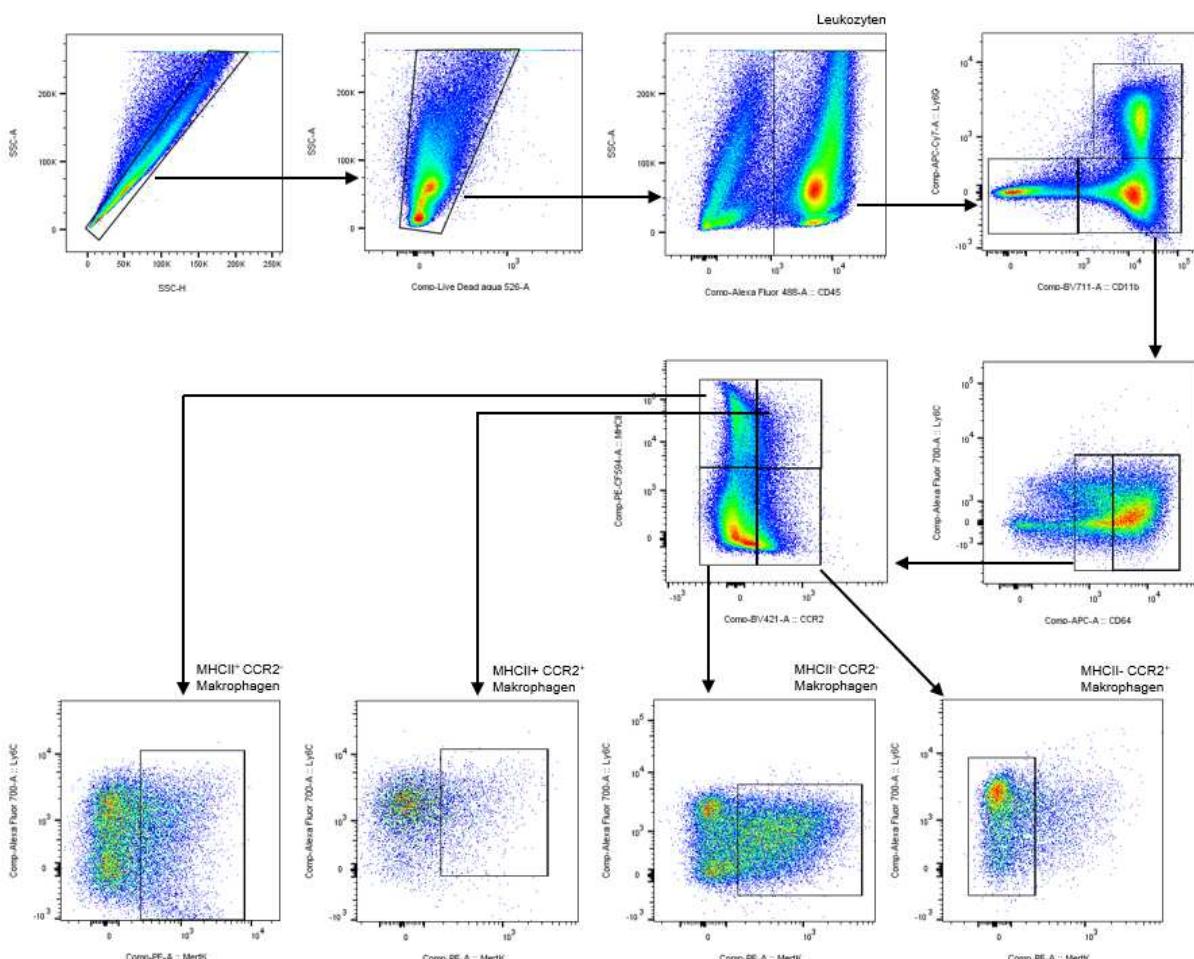
Appendix 2: Gating-Schema von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark



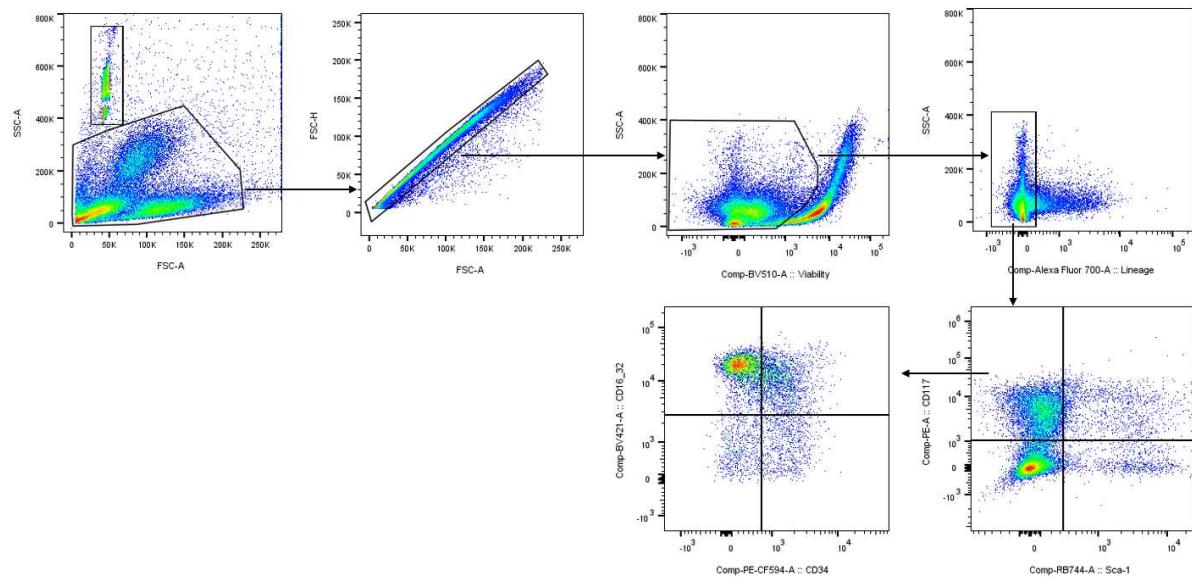
Appendix 3: Gating-Schema von Immunzellen im roten Knochenmark



Appendix 4: Gating-Schema zirkulierender Immunzellen



Appendix 5: Gating-Schema kardialer Immunzellen



Appendix 6: Gating-Schema hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark (BodiPY™ FL C16-Versuch)

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von weißem, beigem und braunem Fettgewebe.	1
Abbildung 2: Anatomische Lokalisation von braunem Fettgewebe (BAT) und subkutanem und viszeralem weißen Fettgewebe (WAT) in Maus und Mensch.	2
Abbildung 3: Wichtige Stoffwechsel- und Signalwege in braunen Adipozyten im Hinblick auf die Fettsäure- und Glukoseverwertung.	6
Abbildung 4: Darstellung der Subtypen von Knochenmarkadipozyten (BMAdS)	9
Abbildung 5: Anzahl der Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2023.	15
Abbildung 6: Repräsentative Darstellung von extrazellulären Vesikeln (EV).	21
Abbildung 7: Schematische Übersicht zur Entstehung und zellulären Herkunft der drei Subtypen extrazellulärer Vesikel.	22
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Versuchsabläufe.	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Knochenmarkseparation in der Tibia.	33
Abbildung 10: Prädiabetes führt zu einer Vergrößerung des interskapulären braunen Fettgewebes.	50
Abbildung 11: Durch Prädiabetes verändern braune Adipozyten ihre Morphologie und weisen charakteristische Merkmale weißer Adipozyten auf.	51
Abbildung 12: Prädiabetes führt zu einer geringeren Aktivität des braunen Fettgewebes nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion.	52
Abbildung 13: Das Gewicht des interskapulären braunen Fettgewebes ist nach kardialer Ischämie/Reperfusion unter prädiabetischen und nicht-prädiabetischen Bedingungen gleichermaßen reduziert.	53
Abbildung 14: Prädiabetes beeinträchtigt die Lipolyse brauner Adipozyten nach der kardialen Ischämie/Reperfusion.	54
Abbildung 15: Bei Prädiabetes bewirkt die Entfernung des braunen Fettgewebes keinen Anstieg der zirkulierenden freien Fettsäuren nach kardialer Ischämie/Reperfusion.	55
Abbildung 16: Die Entfernung des braunen Fettgewebes beeinflusst die sympathische Aktivität nach kardialer Ischämie/Reperfusion weder unter prädiabetischen noch unter nicht-prädiabetischen Bedingungen.	56
Abbildung 17: Braunes Fettgewebe beeinflusst die Größe des ischämischen Areals nach der kardialen Ischämie/Reperfusion weder unter prädiabetischen noch unter prädiabetischen Bedingungen.	57
Abbildung 18: Unter prädiabetischen Stoffwechselbedingungen verursacht die Entfernung des braunen Fettgewebes eine transiente Verschlechterung der Herzfunktion.	58

Abbildung 19: Die Ablation von braunem Fettgewebe hat bei Prädiabetes keinen Einfluss auf die Akkumulation myeloider Zellen im infarzierten Herzen.	59
Abbildung 20: Die Ablation von braunem Fettgewebe hat bei Prädiabetes keinen Einfluss auf die Anzahl der Makrophagen im infarzierten Herzen.	60
Abbildung 21: Die Ablation des braunen Fettgewebes hat bei Prädiabetes keinen Effekt auf die Narbengröße und linksventrikuläre Wanddicke.	61
Abbildung 22: In der Akutphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion erhöht die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen.	62
Abbildung 23: In der Akutphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion erhöht die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl reifer Immunzellen im roten Knochenmark ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen.	63
Abbildung 24: In der Spätphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion hat die Ablation des braunen Fettgewebes keinen Einfluss auf die Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.	64
Abbildung 25: In der Spätphase nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion beeinflusst die Ablation des braunen Fettgewebes die Anzahl reifer Immunzellen im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse nicht.	65
Abbildung 26: Die Ablation des braunen Fettgewebes bewirkt eine marginale proinflammatorische Immunantwort im roten Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.	66
Abbildung 27: Weder Prädiabetes noch braunes Fettgewebe beeinflussen die Glukosekonzentration im roten Knochenmark signifikant.	67
Abbildung 28: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt ausschließlich bei nicht-prädiabetischen Mäusen zu einer Verstärkung der systemischen Entzündungsreaktion nach kardialer Ischämie/Reperfusion.	68
Abbildung 29: Braunes Fettgewebe verursacht postischämisch lokoregionale Veränderungen im Knochenmark nicht-prädiabetischer Mäuse.	69
Abbildung 30: Die Ablation des braunen Fettgewebes verhindert den postischämischen Anstieg des Fettgehalts im distalen Knochenmark.	70
Abbildung 31: Das Fehlen von braunem Fettgewebe verhindert die postischämische Abnahme des relativen Wasseranteils im distalen Knochenmark.	71
Abbildung 32: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt zu einer Verkleinerung der Knochenmarkadipozyten infolge der kardialen Ischämie/Reperfusion.	72
Abbildung 33: Die Ablation des braunen Fettgewebes verursacht einen Anstieg des inflammatorischen KC/CXCL1 im Knochenmarkfett nicht-prädiabetischer Mäuse.	73

Abbildung 34: Die Ablation des braunen Fettgewebes führt postischämisch zu keiner Veränderung des Sekretionsprofils des Knochenmarkfetts nach kardialer Ischämie/Reperfusion.....	74
Abbildung 35: Braunes Fettgewebe beeinflusst den Transfer von gelabelten Fettsäuren aus dem Knochenmarkfett auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen im Rahmen der Notfallhämatopoese nicht.....	75
Abbildung 36: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der aus dem Knochenmarkfett isolierten Partikeln von Mäusen mit Ischämie/Reperfusion oder entsprechender Sham-OP.....	76
Abbildung 37: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der aus dem Knochenmarkfett isolierten Partikel postischämischer Mäuse nach BAT-Ablation und entsprechender Sham-OP.....	77
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Effekte von braunem Fettgewebe vor und nach kardialer Ischämie/Reperfusion im stoffwechselgesunden Zustand (links) und bei Prädiabetes (rechts).	94

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Merkmale von weißem, braunem und beigem Fettgewebe.....	4
Tabelle 2: Zusammensetzung der Kontrolldiät und der diabetogenen Diät	25
Tabelle 3: Verwendete kommerzielle Lösungen zur Organentnahme und Gewebepräparation	34
Tabelle 4: Verwendete nicht kommerzielle Puffer zur Organentnahme und Gewebepräparation	34
Tabelle 5: Verwendete Lösungen zur Gewinnung von Blutplasma	34
Tabelle 6: Verwendete kommerzielle Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen.....	37
Tabelle 7: Verwendete nicht kommerzielle Puffer und Lösungen für durchflusszytometrische Analysen.....	37
Tabelle 8: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellen im roten Knochenmark	39
Tabelle 9: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der hämatopoetischen Stammzellen im roten Knochenmark	39
Tabelle 10: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse zirkulierender Immunzellen	40
Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse kardialer Immunzellen	41
Tabelle 12: Verwendete Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse der aus Knochenmarkdipozyten aufgenommenen BodiPY-gekoppelten Fettsäuren in hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen des roten Knochenmarks	42
Tabelle 13: Verwendete kommerzielle Lösungen und Chemikalien für histologische Färbungen	44
Tabelle 14: Zusammensetzung nicht-kommerzieller Lösungen für histologische Färbungen	45
Tabelle 15: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbungen	45
Tabelle 16: Verwendete kommerzielle Lösungen und Chemikalien für die Gewinnung von Überständen des Knochenmarkfetts	48

10 Literaturverzeichnis

1. Rosen, C.J. and M.C. Horowitz, *Nutrient regulation of bone marrow adipose tissue: skeletal implications of weight loss*. Nat Rev Endocrinol, 2023. **19**(11): p. 626-638.
2. Mallick, R., et al., *Fatty Acids and their Proteins in Adipose Tissue Inflammation*. Cell Biochem Biophys, 2024. **82**(1): p. 35-51.
3. Luo, L. and M. Liu, *Adipose tissue in control of metabolism*. J Endocrinol, 2016. **231**(3): p. R77-r99.
4. Wang, W. and P. Seale, *Control of brown and beige fat development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(11): p. 691-702.
5. Betz, M.J. and S. Enerbäck, *Human Brown Adipose Tissue: What We Have Learned So Far*. Diabetes, 2015. **64**(7): p. 2352-60.
6. Ceddia, R.B., *The role of AMP-activated protein kinase in regulating white adipose tissue metabolism*. Mol Cell Endocrinol, 2013. **366**(2): p. 194-203.
7. Göransson, O., F. Kopietz, and M.H. Rider, *Metabolic control by AMPK in white adipose tissue*. Trends Endocrinol Metab, 2023. **34**(11): p. 704-717.
8. Pollard, A.E. and D. Carling, *Thermogenic adipocytes: lineage, function and therapeutic potential*. Biochem J, 2020. **477**(11): p. 2071-2093.
9. Wang, Y., et al., *Bone marrow adipocyte: Origin, biology and relationship with hematological malignancy*. Int J Lab Hematol, 2024. **46**(1): p. 10-19.
10. Park, A., W.K. Kim, and K.H. Bae, *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 33-42.
11. Bienboire-Frosini, C., et al., *The Role of Brown Adipose Tissue and Energy Metabolism in Mammalian Thermoregulation during the Perinatal Period*. Animals (Basel), 2023. **13**(13).
12. Yang, F.T. and K.I. Stanford, *Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review)*. Curr Obes Rep, 2022. **11**(1): p. 1-9.
13. Suchacki, K.J., W.P. Cawthon, and C.J. Rosen, *Bone marrow adipose tissue: formation, function and regulation*. Curr Opin Pharmacol, 2016. **28**: p. 50-6.
14. Ikeda, K., P. Maretich, and S. Kajimura, *The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes*. Trends Endocrinol Metab, 2018. **29**(3): p. 191-200.
15. Urisarri, A., et al., *BMP8 and activated brown adipose tissue in human newborns*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 5274.
16. Becher, T., et al., *Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 58-65.
17. Worku, M.G., et al., *Prevalence and Associated Factor of Brown Adipose Tissue: Systematic Review and Meta-Analysis*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 9106976.
18. Seale, P., et al., *PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch*. Nature, 2008. **454**(7207): p. 961-7.
19. Kajimura, S., et al., *Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex*. Genes Dev, 2008. **22**(10): p. 1397-409.
20. Whitehead, A., et al., *Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1905.
21. Villarroya, F., et al., *Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease*. J Intern Med, 2018. **284**(5): p. 492-504.
22. Crandall, J.P., T.J. Fraum, and R.L. Wahl, *Brown Adipose Tissue: A Protective Mechanism Against "Preprediabetes"?* J Nucl Med, 2022. **63**(9): p. 1433-1440.
23. Hanssen, M.J., et al., *Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus*. Nat Med, 2015. **21**(8): p. 863-5.
24. Bartness, T.J., C.H. Vaughan, and C.K. Song, *Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2010. **34 Suppl 1(0 1)**: p. S36-42.
25. Steensels, S. and B.A. Ersoy, *Fatty acid activation in thermogenic adipose tissue*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019. **1864**(1): p. 79-90.
26. van Marken Lichtenbelt, W.D., et al., *Cold-activated brown adipose tissue in healthy men*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1500-8.

27. Zhang, Z., et al., *Non-shivering Thermogenesis Signalling Regulation and Potential Therapeutic Applications of Brown Adipose Tissue*. Int J Biol Sci, 2021. **17**(11): p. 2853-2870.
28. Betz, M.J. and S. Enerbäck, *Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(2): p. 77-87.
29. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 277-359.
30. Labb  , S.M., et al., *In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis*. Faseb J, 2015. **29**(5): p. 2046-58.
31. Ricquier, D., *Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 85.
32. Fedorenko, A., P.V. Lishko, and Y. Kirichok, *Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria*. Cell, 2012. **151**(2): p. 400-13.
33. Orava, J., et al., *Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin*. Cell Metab, 2011. **14**(2): p. 272-9.
34. Lowell, B.B., et al., *Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 740-2.
35. Kong, X., et al., *Brown Adipose Tissue Controls Skeletal Muscle Function via the Secretion of Myostatin*. Cell Metab, 2018. **28**(4): p. 631-643.e3.
36. Liu, X., et al., *Brown adipose tissue transplantation improves whole-body energy metabolism*. Cell Res, 2013. **23**(6): p. 851-4.
37. Pinckard, K.M. and K.I. Stanford, *The Heartwarming Effect of Brown Adipose Tissue*. Mol Pharmacol, 2022. **102**(1): p. 460-471.
38. Pereira, R.O. and S.I. McFarlane, *The Role of Brown Adipose Tissue in Cardiovascular Disease Protection: Current Evidence and Future Directions*. Int J Clin Res Trials, 2019. **4**(2).
39. Thoonen, R., et al., *Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **84**: p. 202-11.
40. Hou, D., et al., *Uncoupling protein 1 knockout aggravates isoproterenol-induced acute myocardial ischemia via AMPK/mTOR/PPAR   pathways in rats*. Transgenic Res, 2022. **31**(1): p. 107-118.
41. Mart  -P  mies, I., et al., *Brown Adipose Tissue and BMP3b Decrease Injury in Cardiac Ischemia-Reperfusion*. Circ Res, 2023. **133**(4): p. 353-365.
42. Xu, Z., et al., *The protective role of brown adipose tissue in cardiac cell damage after myocardial infarction and heart failure*. Lipids Health Dis, 2024. **23**(1): p. 338.
43. Lin, J.R., et al., *Brown Adipocyte ADRB3 Mediates Cardioprotection via Suppressing Exosomal iNOS*. Circ Res, 2022. **131**(2): p. 133-147.
44. Ruan, C.C., et al., *A(2A) Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21*. Cell Metab, 2020. **32**(4): p. 689.
45. Yoshida, Y., et al., *Brown adipose tissue dysfunction promotes heart failure via a trimethylamine N-oxide-dependent mechanism*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 14883.
46. Steele, R., *Hygenic Physiology: Skin and Bone*. 1883.
47. Labella, R., et al., *Next Generation Bone Marrow Adiposity Researchers: Report From the 1(st) BMAS Summer School 2021*. Front Endocrinol (Lausanne), 2022. **13**: p. 879588.
48. Li, Z. and O.A. MacDougald, *Preclinical models for investigating how bone marrow adipocytes influence bone and hematopoietic cellularity*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2021. **35**(4): p. 101547.
49. Marinelli Busilacchi, E., E. Morsia, and A. Poloni, *Bone Marrow Adipose Tissue*. Cells, 2024. **13**(9).
50. Suchacki, K.J., et al., *Bone marrow adipose tissue is a unique adipose subtype with distinct roles in glucose homeostasis*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 3097.

51. Li, Q., Y. Wu, and N. Kang, *Marrow Adipose Tissue: Its Origin, Function, and Regulation in Bone Remodeling and Regeneration*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 7098456.
52. Morris, E.V. and C.M. Edwards, *The role of bone marrow adipocytes in bone metastasis*. J Bone Oncol, 2016. **5**(3): p. 121-123.
53. Li, Z., et al., *Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues*. Bone, 2018. **110**: p. 134-140.
54. Ambrosi, T.H. and T.J. Schulz, *The emerging role of bone marrow adipose tissue in bone health and dysfunction*. J Mol Med (Berl), 2017. **95**(12): p. 1291-1301.
55. Turner, R.T., S.A. Martin, and U.T. Iwaniec, *Metabolic Coupling Between Bone Marrow Adipose Tissue and Hematopoiesis*. Curr Osteoporos Rep, 2018. **16**(2): p. 95-104.
56. De Bisschop, E., et al., *Fat fraction of lumbar bone marrow using in vivo proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Bone, 1993. **14**(2): p. 133-6.
57. Griffith, J.F., et al., *Bone marrow fat content in the elderly: a reversal of sex difference seen in younger subjects*. J Magn Reson Imaging, 2012. **36**(1): p. 225-30.
58. Craft, C.S., et al., *Molecular differences between subtypes of bone marrow adipocytes*. Curr Mol Biol Rep, 2018. **4**(1): p. 16-23.
59. Scheller, E.L., et al., *Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7808.
60. Austin, M.J., et al., *Turning the spotlight on bone marrow adipocytes in haematological malignancy and non-malignant conditions*. Br J Haematol, 2023. **201**(4): p. 605-619.
61. Veldhuis-Vlug, A.G. and C.J. Rosen, *Clinical implications of bone marrow adiposity*. J Intern Med, 2018. **283**(2): p. 121-139.
62. Scheller, E.L., et al., *Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to β -adrenergic stimulation*. Bone, 2019. **118**: p. 32-41.
63. Enerbäck, S., et al., *Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese*. Nature, 1997. **387**(6628): p. 90-4.
64. Lecka-Czernik, B., et al., *Marrow Adipose Tissue: Skeletal Location, Sexual Dimorphism, and Response to Sex Steroid Deficiency*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 188.
65. Pham, T.T., et al., *Human Bone Marrow Adipose Tissue is a Metabolically Active and Insulin-Sensitive Distinct Fat Depot*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(7): p. 2300-10.
66. Craft, C.S., et al., *Bone marrow adipose tissue does not express UCP1 during development or adrenergic-induced remodeling*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 17427.
67. Iwaniec, U.T., et al., *Room temperature housing results in premature cancellous bone loss in growing female mice: implications for the mouse as a preclinical model for age-related bone loss*. Osteoporos Int, 2016. **27**(10): p. 3091-101.
68. Li, Y., Y. Meng, and X. Yu, *The Unique Metabolic Characteristics of Bone Marrow Adipose Tissue*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 69.
69. Horowitz, M.C., et al., *Bone marrow adipocytes*. Adipocyte, 2017. **6**(3): p. 193-204.
70. Cawthorn, W.P., et al., *Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction*. Cell Metab, 2014. **20**(2): p. 368-375.
71. Takeshita, S., et al., *Age-related marrow adipogenesis is linked to increased expression of RANKL*. J Biol Chem, 2014. **289**(24): p. 16699-710.
72. Lewis, J.W., et al., *Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease*. Bone Res, 2021. **9**(1): p. 1.
73. Verma, S., et al., *Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis*. J Clin Pathol, 2002. **55**(9): p. 693-8.
74. Li, Z., et al., *Constitutive bone marrow adipocytes suppress local bone formation*. JCI Insight, 2022. **7**(21).
75. Tavassoli, M., A. Maniatis, and W.H. Crosby, *Induction of Sustained Hemopoiesis in Fatty Marrow*. Blood, 1974. **43**(1): p. 33-38.

76. Naveiras, O., et al., *Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 259-63.
77. Belaid-Choucair, Z., et al., *Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1556-64.
78. Mattiucci, D., et al., *Bone marrow adipocytes support hematopoietic stem cell survival*. J Cell Physiol, 2018. **233**(2): p. 1500-1511.
79. Zhou, B.O., et al., *Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(8): p. 891-903.
80. Zhang, S., et al., *Bone marrow adipocytes fuel emergency hematopoiesis after myocardial infarction*. Nat Cardiovasc Res, 2023. **2**(12): p. 1277-1290.
81. Li, Z., et al., *Lipolysis of bone marrow adipocytes is required to fuel bone and the marrow niche during energy deficits*. Elife, 2022. **11**.
82. Scheller, E.L., et al., *Marrow Adipose Tissue: Trimming the Fat*. Trends Endocrinol Metab, 2016. **27**(6): p. 392-403.
83. Tabák, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development*. Lancet, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
84. Echouffo-Tcheugui, J.B., et al., *Diagnosis and Management of Prediabetes: A Review*. Jama, 2023. **329**(14): p. 1206-1216.
85. Punthakee, Z., R. Goldenberg, and P. Katz, *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome*. Can J Diabetes, 2018. **42 Suppl 1**: p. S10-s15.
86. Blond, M.B., et al., *The prediabetes conundrum: striking the balance between risk and resources*. Diabetologia, 2023. **66**(6): p. 1016-1023.
87. Wagner, R., et al., *Pathophysiology-based subphenotyping of individuals at elevated risk for type 2 diabetes*. Nat Med, 2021. **27**(1): p. 49-57.
88. Brannick, B. and S. Dagogo-Jack, *Prediabetes and Cardiovascular Disease: Pathophysiology and Interventions for Prevention and Risk Reduction*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2018. **47**(1): p. 33-50.
89. Cerf, M.E., *Beta cell dysfunction and insulin resistance*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 37.
90. Fernández-Real, J.M. and W. Ricart, *Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 278-301.
91. Chen, L., et al., *Label-free optical metabolic imaging of adipose tissues for prediabetes diagnosis*. Theranostics, 2023. **13**(11): p. 3550-3567.
92. The Lancet Diabetes, E., *Prediabetes: much more than just a risk factor*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2025. **13**(3): p. 165.
93. Huang, P.L., *A comprehensive definition for metabolic syndrome*. Dis Model Mech, 2009. **2**(5-6): p. 231-7.
94. Cai, X., et al., *Association between prediabetes and risk of all cause mortality and cardiovascular disease: updated meta-analysis*. Bmj, 2020. **370**: p. m2297.
95. Gao, S., et al., *Impact of prediabetes on long-term cardiovascular outcomes in patients with myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries*. Diabetol Metab Syndr, 2021. **13**(1): p. 103.
96. Smith, U. and B.B. Kahn, *Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids*. J Intern Med, 2016. **280**(5): p. 465-475.
97. Pal, S.C. and N. Méndez-Sánchez, *Insulin resistance and adipose tissue interactions as the cornerstone of metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2023. **29**(25): p. 3999-4008.
98. Guilherme, A., et al., *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 367-77.
99. Sattar, N. and J.M. Gill, *Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat?* BMC Med, 2014. **12**: p. 123.
100. Kawai, T., M.V. Autieri, and R. Scalia, *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. Am J Physiol Cell Physiol, 2021. **320**(3): p. C375-c391.

101. Sartipy, P. and D.J. Loskutoff, *Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7265-70.
102. Cinkajzlová, A., M. Mráz, and M. Haluzík, *Adipose tissue immune cells in obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases*. J Endocrinol, 2021. **252**(1): p. R1-r22.
103. Liu, R., et al., *Regulatory T Cells Control Effector T Cell Inflammation in Human Prediabetes*. Diabetes, 2022. **71**(2): p. 264-274.
104. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2133-2223.
105. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
106. Spranger, J., et al., *Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus*. Lancet, 2003. **361**(9353): p. 226-8.
107. Abdalla, M.M.I., *Therapeutic potential of adiponectin in prediabetes: strategies, challenges, and future directions*. Ther Adv Endocrinol Metab, 2024. **15**: p. 20420188231222371.
108. Jiang, Y., et al., *Adiponectin levels predict prediabetes risk: the Pathobiology of Prediabetes in A Biracial Cohort (POP-ABC) study*. BMJ Open Diabetes Res Care, 2016. **4**(1): p. e000194.
109. Albosta, M. and J. Bakke, *Intermittent fasting: is there a role in the treatment of diabetes? A review of the literature and guide for primary care physicians*. Clin Diabetes Endocrinol, 2021. **7**(1): p. 3.
110. Bungau, S., et al., *Interactions between leptin and insulin resistance in patients with prediabetes, with and without NAFLD*. Exp Ther Med, 2020. **20**(6): p. 197.
111. Cypess, A.M., et al., *Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 635-9.
112. Ghesmati, Z., et al., *An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications*. Rev Endocr Metab Disord, 2024. **25**(2): p. 279-308.
113. Lapa, C., et al., *Whitening and Impaired Glucose Utilization of Brown Adipose Tissue in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16795.
114. Ziqubu, K., et al., *An insight into brown/beige adipose tissue whitening, a metabolic complication of obesity with the multifactorial origin*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1114767.
115. Lucchini, F.C., et al., *ASK1 inhibits browning of white adipose tissue in obesity*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1642.
116. Dowal, L., et al., *Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 9067049.
117. Jalali, M., et al., *Severity of adipose tissue dysfunction is associated with progression of pre-diabetes to type 2 diabetes: the Tehran Lipid and Glucose Study*. BMC Public Health, 2024. **24**(1): p. 121.
118. World Health Organization. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2021; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
119. Statista. *Todesfälle nach den häufigsten Todesursachen in Deutschland bis 2023*. 2024; Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/158441/umfrage/anzahl-der-todesfaelle-nach-todesursachen/>.
120. Statistisches Bundesamt. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>. 2024 [12.01.2025]; Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>.
121. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.

122. Gerber, Y., et al., *Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective*. Circ Heart Fail, 2016. **9**(1): p. e002460.
123. Vedin, O., et al., *Significance of Ischemic Heart Disease in Patients With Heart Failure and Preserved, Midrange, and Reduced Ejection Fraction: A Nationwide Cohort Study*. Circ Heart Fail, 2017. **10**(6).
124. Camen, S., et al., *Risk Factors, Subsequent Disease Onset, and Prognostic Impact of Myocardial Infarction and Atrial Fibrillation*. J Am Heart Assoc, 2022. **11**(7): p. e024299.
125. Volpe, M. and G. Gallo, *Atrial fibrillation and ischaemic heart disease: should we use acetylsalicylic acid beside anticoagulants?* Eur Heart J Suppl, 2020. **22**(Suppl L): p. L166-L169.
126. Razo, C., et al., *Effects of elevated systolic blood pressure on ischemic heart disease: a Burden of Proof study*. Nat Med, 2022. **28**(10): p. 2056-2065.
127. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
128. Alkarithi, G., et al., *Thrombus Structural Composition in Cardiovascular Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021. **41**(9): p. 2370-2383.
129. Parmley, W.W., *Prevalence and clinical significance of silent myocardial ischemia*. Circulation, 1989. **80**(6 Suppl): p. I-68-73.
130. Wu, Y., et al., *Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Myocardial Infarction*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 617277.
131. Mitsis, A. and F. Gragnano, *Myocardial Infarction with and without ST-segment Elevation: a Contemporary Reappraisal of Similarities and Differences*. Curr Cardiol Rev, 2021. **17**(4): p. e230421189013.
132. Schirone, L., et al., *An Overview of the Molecular Mechanisms Associated with Myocardial Ischemic Injury: State of the Art and Translational Perspectives*. Cells, 2022. **11**(7).
133. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
134. Jennings, R.B., et al., *Development of cell injury in sustained acute ischemia*. Circulation, 1990. **82**(3 Suppl): p. I-2-12.
135. Zuurbier, C.J., et al., *Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(11): p. 5937-5954.
136. Jiang, M., et al., *Mitochondrial Metabolism in Myocardial Remodeling and Mechanical Unloading: Implications for Ischemic Heart Disease*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 789267.
137. Hendrickson, S.C., et al., *Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion*. Mol Cell Biochem, 1997. **166**(1-2): p. 85-94.
138. Dutta, P., et al., *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 325-9.
139. Surendran, A., et al., *Impact of myocardial reperfusion on human plasma lipidome*. iScience, 2022. **25**(2): p. 103828.
140. Heusch, G., *Myocardial ischemia/reperfusion: Translational pathophysiology of ischemic heart disease*. Med, 2024. **5**(1): p. 10-31.
141. Zhang, M., et al., *Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets*. Signal Transduct Target Ther, 2024. **9**(1): p. 12.
142. Kessler, G. and J. Friedman, *Metabolism of fatty acids and glucose*. Circulation, 1998. **98**(13): p. 1351.
143. Granger, D.N. and P.R. Kviety, *Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept*. Redox Biol, 2015. **6**: p. 524-551.
144. González-Montero, J., et al., *Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities*. World J Cardiol, 2018. **10**(9): p. 74-86.
145. Menendez-Montes, I., et al., *Mitochondrial fatty acid utilization increases chromatin oxidative stress in cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(34).
146. Kologrivova, I., et al., *Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 664457.

147. Anzai, A., S. Ko, and K. Fukuda, *Immune and Inflammatory Networks in Myocardial Infarction: Current Research and Its Potential Implications for the Clinic*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
148. Viola, M., S.C.A. de Jager, and J.P.G. Sluijter, *Targeting Inflammation after Myocardial Infarction: A Therapeutic Opportunity for Extracellular Vesicles?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
149. Epelman, S., P.P. Liu, and D.L. Mann, *Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 117-29.
150. Dutta, P. and M. Nahrendorf, *Monocytes in myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(5): p. 1066-70.
151. Ma, Y., *Role of Neutrophils in Cardiac Injury and Repair Following Myocardial Infarction*. Cells, 2021. **10**(7).
152. Puhl, S.L. and S. Steffens, *Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution?* Front Cardiovasc Med, 2019. **6**: p. 25.
153. Daseke, M.J., 2nd, et al., *Neutrophil signaling during myocardial infarction wound repair*. Cell Signal, 2021. **77**: p. 109816.
154. Kratofil, R.M., P. Kubes, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(1): p. 35-42.
155. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
156. Peet, C., et al., *Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2020. **116**(6): p. 1101-1112.
157. Yap, J., et al., *Macrophages in cardiac remodelling after myocardial infarction*. Nat Rev Cardiol, 2023. **20**(6): p. 373-385.
158. Lafuse, W.P., D.J. Wozniak, and M.V.S. Rajaram, *Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair*. Cells, 2020. **10**(1).
159. Liu, J., et al., *The roles of Th cells in myocardial infarction*. Cell Death Discov, 2024. **10**(1): p. 287.
160. Zouggari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
161. van Niel, G., G. D'Angelo, and G. Raposo, *Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(4): p. 213-228.
162. Jansen, F., et al., *MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(6): p. e001249.
163. Khan, K., et al., *Extracellular Vesicles as a Cell-free Therapy for Cardiac Repair: a Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Preclinical Trials in Animal Myocardial Infarction Models*. Stem Cell Rev Rep, 2022. **18**(3): p. 1143-1167.
164. Vicencio, J.M., et al., *Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(15): p. 1525-36.
165. Giricz, Z., et al., *Cardioprotection by remote ischemic preconditioning of the rat heart is mediated by extracellular vesicles*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **68**: p. 75-8.
166. Huang, S., et al., *Plasma extracellular vesicles microRNA-208b-3p and microRNA-143-3p as novel biomarkers for sudden cardiac death prediction in acute coronary syndrome*. Mol Omics, 2023. **19**(3): p. 262-273.
167. Liu, X., et al., *Extracellular vesicles derived from different tissues attenuate cardiac dysfunction in murine MI models*. Biol Direct, 2023. **18**(1): p. 76.
168. Akbar, N., et al., *Extracellular vesicles in metabolic disease*. Diabetologia, 2019. **62**(12): p. 2179-2187.
169. Wendt, S., et al., *Evaluation of the cardioprotective potential of extracellular vesicles - a systematic review and meta-analysis*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15702.
170. Lai, J.J., et al., *Exosome Processing and Characterization Approaches for Research and Technology Development*. Adv Sci (Weinh), 2022. **9**(15): p. e2103222.
171. Kulaj, K., et al., *Adipocyte-derived extracellular vesicles increase insulin secretion through transport of insulinotropic protein cargo*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 709.

172. Lee, H., et al., *Identification of miRNA-rich vesicles in bronchoalveolar lavage fluid: Insights into the function and heterogeneity of extracellular vesicles*. J Control Release, 2019. **294**: p. 43-52.
173. Ma, S., et al., *Skeletal muscle-derived extracellular vesicles transport glycolytic enzymes to mediate muscle-to-bone crosstalk*. Cell Metab, 2023. **35**(11): p. 2028-2043.e7.
174. Rosina, M., et al., *Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue*. Cell Metab, 2022. **34**(4): p. 533-548.e12.
175. Gautheron, F., et al., *Bone marrow-derived extracellular vesicles carry the TGF- β signal transducer Smad2 to preserve hematopoietic stem cells in mice*. Cell Death Discov, 2023. **9**(1): p. 117.
176. Martin, P.J., et al., *Adipogenic RNAs are transferred in osteoblasts via bone marrow adipocytes-derived extracellular vesicles (EVs)*. BMC Cell Biol, 2015. **16**: p. 10.
177. Beran, A., *Die Bedeutung des braunen Fettgewebes im murinen Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion*. 2023, Heinrich-Heine-Universität: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=62043>.
178. Chavhan, G.B., et al., *Principles, techniques, and applications of T2*-based MR imaging and its special applications*. Radiographics, 2009. **29**(5): p. 1433-49.
179. Grandoch, M., et al., *4-Methylumbellifrone improves the thermogenic capacity of brown adipose tissue*. Nat Metab, 2019. **1**(5): p. 546-559.
180. Cai, Z., et al., *Non-invasive mapping of brown adipose tissue activity with magnetic resonance imaging*. Nat Metab, 2024. **6**(7): p. 1367-1379.
181. Nikiforaki, K. and K. Marias, *MRI Methods to Visualize and Quantify Adipose Tissue in Health and Disease*. Biomedicines, 2023. **11**(12).
182. Ueda, J., et al., *Conditions for late gadolinium enhancement MRI in myocardial infarction model rats that better reflect microscopic tissue staining*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 18308.
183. Honrao, C., et al., *Gadolinium-Based Paramagnetic Relaxation Enhancement Agent Enhances Sensitivity for NUS Multidimensional NMR-Based Metabolomics*. Molecules, 2021. **26**(17).
184. Idilman, I.S., et al., *Proton density fat fraction: magnetic resonance imaging applications beyond the liver*. Diagn Interv Radiol, 2022. **28**(1): p. 83-91.
185. MacEwan, I.J., et al., *Proton density water fraction as a biomarker of bone marrow cellularity: validation in ex vivo spine specimens*. Magn Reson Imaging, 2014. **32**(9): p. 1097-101.
186. Schmeel, F.C., et al., *Proton density fat fraction MRI of vertebral bone marrow: Accuracy, repeatability, and reproducibility among readers, field strengths, and imaging platforms*. J Magn Reson Imaging, 2019. **50**(6): p. 1762-1772.
187. Jarczak, D. and A. Nierhaus, *Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(19).
188. Avtanski, D., et al., *Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity*. Animal Model Exp Med, 2019. **2**(4): p. 252-258.
189. Heller, K., et al., *Magnetic resonance reveals early lipid deposition in murine prediabetes as predictive marker for cardiovascular injury*. Npj Imaging, 2024. **2**(1): p. 36.
190. The Jackson Laboratory. *Choosing Among Type II Diabetes Mouse Models*. 2015 [cited 2025 30.04.2025]; Available from: https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2015/july/choosing-among-type-ii-diabetes-mouse-models?utm_source=chatgpt.com.
191. Kotzbeck, P., et al., *Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation*. J Lipid Res, 2018. **59**(5): p. 784-794.
192. Sanchez-Rangel, E., et al., *Norepinephrine transporter availability in brown fat is reduced in obesity: a human PET study with [(11)C] MRB*. Int J Obes (Lond), 2020. **44**(4): p. 964-967.

193. Valentine, J.M., et al., *β 3-Adrenergic receptor downregulation leads to adipocyte catecholamine resistance in obesity*. J Clin Invest, 2022. **132**(2).
194. Guo, T., et al., *Adipocyte ALK7 links nutrient overload to catecholamine resistance in obesity*. Elife, 2014. **3**: p. e03245.
195. Alcalá, M., et al., *Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 94.
196. Sakamoto, T., et al., *Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016. **310**(8): p. E676-e687.
197. Mousel, E., et al., *Cold-induced thermogenesis requires neutral-lipase-mediated intracellular lipolysis in brown adipocytes*. Cell Metab, 2025. **37**(2): p. 429-440.e5.
198. Samuel, V.T. and G.I. Shulman, *Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links*. Cell, 2012. **148**(5): p. 852-71.
199. Peres Valgas da Silva, C., et al., *Brown adipose tissue prevents glucose intolerance and cardiac remodeling in high-fat-fed mice after a mild myocardial infarction*. Int J Obes (Lond), 2022. **46**(2): p. 350-358.
200. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy revisited*. Circulation, 2007. **115**(25): p. 3213-23.
201. Mercier, F.E., C. Ragu, and D.T. Scadden, *The bone marrow at the crossroads of blood and immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **12**(1): p. 49-60.
202. Al-Amoodi, A.S., et al., *Refining the migration and engraftment of short-term and long-term HSCs by enhancing homing-specific adhesion mechanisms*. Blood Adv, 2022. **6**(15): p. 4373-4391.
203. Mitroulis, I., et al., *Myelopoiesis in the Context of Innate Immunity*. J Innate Immun, 2018. **10**(5-6): p. 365-372.
204. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **62**: p. 24-35.
205. Broxmeyer, H.E., et al., *Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta abrogates the capacity of MIP-1 alpha to suppress myeloid progenitor cell growth*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2586-94.
206. Lee, D., et al., *CCL4 enhances preosteoclast migration and its receptor CCR5 downregulation by RANKL promotes osteoclastogenesis*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 495.
207. Coenen, K.R., et al., *Impact of macrophage toll-like receptor 4 deficiency on macrophage infiltration into adipose tissue and the artery wall in mice*. Diabetologia, 2009. **52**(2): p. 318-28.
208. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. Cell Metab, 2009. **10**(5): p. 419-29.
209. Li, B., et al., *A global perspective on the crosstalk between saturated fatty acids and Toll-like receptor 4 in the etiology of inflammation and insulin resistance*. Prog Lipid Res, 2020. **77**: p. 101020.
210. Kojima, H., J. Kim, and L. Chan, *Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(4): p. 178-87.
211. Hoyer, F.F., et al., *Bone Marrow Endothelial Cells Regulate Myelopoiesis in Diabetes Mellitus*. Circulation, 2020. **142**(3): p. 244-258.
212. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
213. Planavila, A., et al., *Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2019.
214. Ziqubu, K., et al., *Brown adipose tissue-derived metabolites and their role in regulating metabolism*. Metabolism, 2024. **150**: p. 155709.
215. Hazlewood, C.F., et al., *Nuclear magnetic resonance transverse relaxation times of water protons in skeletal muscle*. Biophys J, 1974. **14**(8): p. 583-606.

216. Kosteli, A., et al., *Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue*. J Clin Invest, 2010. **120**(10): p. 3466-79.
217. Zhou, C., et al., *The role of CXCL family members in different diseases*. Cell Death Discov, 2023. **9**(1): p. 212.
218. Welsh, J.A., et al., *Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches*. J Extracell Vesicles, 2024. **13**(2): p. e12404.
219. Zhao, H., et al., *Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection*. Circ Res, 2022. **130**(10): p. 1490-1506.
220. Thomou, T., et al., *Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues*. Nature, 2017. **542**(7642): p. 450-455.
221. Wee, N.K.Y., et al., *Shared Autonomic Pathways Connect Bone Marrow and Peripheral Adipose Tissues Across the Central Neuraxis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 668.
222. Robles, H., et al., *Characterization of the bone marrow adipocyte niche with three-dimensional electron microscopy*. Bone, 2019. **118**: p. 89-98.
223. Tran, M.A., et al., *Interplay of alpha-2 and beta adrenoceptors in the control of free fatty acid release from bone marrow adipose tissue*. J Pharmacol Exp Ther, 1984. **230**(1): p. 228-31.
224. Tam, C.S., V. Lecoultrre, and E. Ravussin, *Brown adipose tissue: mechanisms and potential therapeutic targets*. Circulation, 2012. **125**(22): p. 2782-91.
225. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
226. Kugel, H., et al., *Age- and sex-specific differences in the ¹H-spectrum of vertebral bone marrow*. J Magn Reson Imaging, 2001. **13**(2): p. 263-8.
227. Cypess, A.M., et al., *Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist*. Cell Metab, 2015. **21**(1): p. 33-8.
228. Straat, M.E., et al., *Stimulation of the beta-2-adrenergic receptor with salbutamol activates human brown adipose tissue*. Cell Rep Med, 2023. **4**(2): p. 100942.
229. Ohno, H., et al., *PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein*. Cell Metab, 2012. **15**(3): p. 395-404.
230. Kroon, T., et al., *PPAR γ and PPAR α synergize to induce robust browning of white fat in vivo*. Mol Metab, 2020. **36**: p. 100964.
231. Fisher, F.M., et al., *FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 271-81.
232. Stanic, S., et al., *Prolonged FGF21 treatment increases energy expenditure and induces weight loss in obese mice independently of UCP1 and adrenergic signaling*. Biochem Pharmacol, 2024. **221**: p. 116042.

11 Originalarbeiten

Veröffentlicht:

Constantin Mann, Carolin van Alst, Simone Gorresen, Rachel Nega, Dobromir Dobrev, Maria Grandoch, Anke C. Fender

Ischemia does not provoke the full immune training repertoire in human cardiac fibroblasts.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2024 April 23; DOI: 10.1007/s00210-024-03107-6

In Vorbereitung:

Rachel Nega^{*}, Arne Beran^{*}, Vera Flocke, Zhaoping Ding, Katja Wegener, Maren Döring, Lena M. Klünsch, Anna Kirkopoulos, Christian Hundhausen, Viola Niemann, Simone Gorresen, Anne Petz, Alexander Lang, Norbert Gerdes, Tobias Lautwein, Karl Köhrer, Aaron M. Cypess, Ulrich Flögel[#], Maria Grandoch[#]

Brown adipose tissue shapes the immunometabolic response after myocardial infarction.

12 Konferenzbeiträge

Postervorträge:

Rachel Nega, Anne Vera Flocke, Arne Beran, Simone Gorreßen, Ulrich Flögel, Maria Grandoch

Diet-induced obesity and insulin resistance affect the immunomodulatory function of brown adipose tissue

90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), 03.04.-06.04.2024, Mannheim

13 Lebenslauf

Person

Name	Rachel Nega
Geburtsdatum	23.03.1995
Geburtsort	Schwalmstadt
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Promotion

09/2021– 03/2025 Promotion am Institut für Translationale Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Thesis: „Rolle des braunen Fettgewebes bei kardialer Ischämie/Reperfusion: prädiabetes-induzierte Veränderungen und Interorgan-Kommunikation mit Knochenmarkfett“

Betreuerin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch, Co-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Verteidigung: 12/2025

Studium

03/2021 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Thesis: „Einführung eines therapeutischen Drug Monitorings kontinuierlich applizierter Beta-Laktam-Antibiotika auf der Intensivstation“

01/2019 Approbation als Apothekerin

11/2017-10/2018 Praktisches Jahr im Rahmen des Pharmiestudiums am Klinikum Kassel und der Internationalen Ludwigs-Apotheke in München

10/2013-09/2017 Pharmiestudium an der Philipps-Universität Marburg

Schule

09/2005- 06/2013 Gymnasium Stiftsschule St. Johann, Amöneburg

09/2001 -08/2005 Grundschule Mengsberg-Momberg

14 Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Maria Grandoch für die Möglichkeit, meine Promotion an ihrem Institut durchzuführen, herzlich danken. Ich bin sehr dankbar, an so einem spannenden und facettenreichen Forschungsprojekt gearbeitet zu haben und Teil eines so tollen Teams gewesen zu sein.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller danke ich für die Übernahme des Koreferats und die konstruktiven und lehrreichen jährlichen Betreuungsgespräche.

Ein weiterer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Ulrich Flögel, der mir jederzeit eine große Hilfe bei jeglichen Fragen rund um die Magnetresonanztomografie war.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Translationale Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die jahrelange tolle Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Kerstin Freidel für die großartige experimentelle Unterstützung und ihre humorvolle Art, die meinen Laboralltag stets verschönert hat.

Ein riesiges Dankeschön gilt auch Frau Dr. Simone Gorreßen und Herrn Dominik Semmler aus dem Institut für Pharmakologie, die meine unzähligen Stunden in der ZETT durch viele lustige und motivierende Gespräche bereichert haben. Herrn Dominik Semmler bin ich sehr dankbar, dass er mir die operativen Eingriffe für die Induktion der Ischämie/Reperfusion beigebracht hat und dabei zu jedem Zeitpunkt extrem unterstützend und geduldig war. Ein besonderes Dankeschön richtet sich zudem an Herrn Dr. Christian Hundhausen, der mich zu jedem Zeitpunkt meiner Promotion unterstützt hat und stets ein offenes Ohr hatte.

Wenn aus Kolleginnen Freundinnen werden, darf man sich doppelt glücklich schätzen. Besonders dankbar bin ich Viola Niemann und Maren Döring, die mir besonders im letzten Promotionsjahr eine große persönliche Stütze waren. Ich bin dankbar für den ganzen fachlichen und emotionalen Austausch, unsere Cola- und Kaffeepausen, Krisengespräche und vieles mehr. Ebenso danke ich Dr. Katja Heller und Dr. Shakila Mir-Uyani für die tolle gemeinsame Zeit und die ganzen schönen Momente innerhalb und abseits der Arbeitszeit. Ohne euch vier wäre es nur halb so schön gewesen.

Zuletzt möchte ich meinem privaten Umfeld ein großes Dankeschön entgegenbringen. Ich bin unfassbar dankbar, so viele tolle Menschen in meinem Leben zu haben, die mich jederzeit unterstützen. Neben meinen Freunden bin ich besonders meinen Eltern zum Dank verpflichtet, da sie schon immer meine größten Unterstützer waren. Ein letztes Dankeschön richtet sich an meinen Freund Felix, der mir durch seine Geduld, motivierenden Worte, wertvollen Ratschläge und sein großes Einfühlungsvermögen jahrelang eine großartige Unterstützung war. Vielen Dank euch allen!

15 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 07.08.2025

Rachel Nega