

Charakterisierung von perivaskulärem Fettgewebe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jasmin Stümer

aus Mechernich

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Pfeifer
2. Gutachter: PD Dr. Dan Ehninger

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.04.2024

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. Alexander Pfeifer

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Adipositas und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	8
1.2 Die verschiedenen Fettgewebstypen	10
1.3 Perivaskuläres Fettgewebe	15
1.4 Ziel der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 PVAT Präparation	19
2.3 RNA Isolation, cDNA Reverse Transkription und qPCR	20
2.4. Auflistung der verwendeten Substanzen und Kits für die qPCR-Analysen	22
2.5 Primersequenzen	23
2.7 Histologie.....	25
2.8. Auflistung der verwendeten Substanzen und Kits für die Histologie	26
2.7 Geräte/Laboraausstattung	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 HFD-Kohorte	28
3.2 Kälteexpositionskohorte.....	38
3.3 Thermoneutralitätskohorte	46
3.4 Verschiedene Mauslinien.....	49
4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung.....	62
6. Abbildungsverzeichnis	63
7. Tabellenverzeichnis	65
8. Literaturverzeichnis	66
9. Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aorta
A. abd	Aorta abdominalis
A. asc	Aorta ascendens thoracalis
A. thor	Aorta descendens thoracalis
BAT	brown adipose tissue = braunes Fettgewebe
BMI	Body-Mass-Index
BMP7	bonemorphogenic factor 7
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding-protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Car4	Carbonic-anhydrase 4
Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A
Cox 2	Cytochrom C Oxidase Untereinheit 2
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dio2	Iodthyronin-Deiodinase Typ 2
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin 1
EtOH	Ethanol
HE	Hämatoxylin-Eosin
FDG-	F-18-Desoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
PET CT	Computertomographie
FGF21	fibroblast growth factor 21
gWAT	gonadales weißes Fettgewebe
HFD	high fat diet = Diät mit hohem Fettgehalt
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IL-6	Interleukin 6
iWAT	inguinales weißes Fettgewebe
LDL	low-density Lipoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
myf5	myogenic factor 5
ND	normal diet = normale Diät/Kost
ND5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5

Ndufa	NADH-dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha
NO	Stickstoffmonoxid
NST	non-shivering-thermogenesis
PAX	Paired-Box Gene
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
PGC1a	peroxisome proliferator-activated receptor gamma cofactor 1-alpha
PKA	Proteinkinase A
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated factor gamma
PRDM16	protein PR domain containing 16
PVAT	perivascular adipose tissue = perivaskuläres Fettgewebe
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleid acid = Ribonukleinsäure
Tbx1	T-Box-Protein 1
TGF β	Transforming growth factor beta
TMEM26	Transmembranprotein 26
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
UCP-1	Uncoupling Protein 1
WAT	white adipose tissue = weißes Fettgewebe
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Adipositas und kardiovaskuläre Erkrankungen

Adipositas

Die Prävalenz von Übergewicht hat sich laut World Health Organization (WHO) weltweit seit 1975 nahezu verdreifacht - mit weiter steigender Tendenz. Adipositas ist somit ein weltweites Problem und hat in den letzten Jahren pandemische Ausmaße erreicht (Afshin et al., 2017).

Die WHO definiert Übergewicht und krankhafte Fettleibigkeit als abnormale und übermäßige Körperfettakkumulation, welche ein Gesundheitsrisiko darstellt. Übergewicht wird am häufigsten mit Hilfe des Body-Mass-Index (BMI), dem Verhältnis von Körpergewicht in Kilogramm durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat, charakterisiert (kg/m^2). Hierbei gelten Werte zwischen 25 kg/m^2 und 29 kg/m^2 als Übergewicht und bei Werten über 30 kg/m^2 wird von Adipositas, also krankhafter Fettleibigkeit, gesprochen. Übergewicht resultiert aus einem Ungleichgewicht von Energieaufnahme und Energieverbrauch des Körpers, welches nicht nur auf eine erhöhte und hochkalorische Nahrungszufuhr, sondern auch auf eine geringe körperliche Aktivität zurück zu führen ist. Adipositas geht mit verschiedenen Komorbiditäten einher wie Diabetes mellitus Typ 2, verschiedenen Krebserkrankungen (z.B. Kolon-Karzinom, Mamma-Karzinom), Osteoarthritis und kardiovaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, peripheren arteriellen Erkrankungen sowie koronaren Herzerkrankungen (Chen et al., 2016; Meldrum et al., 2017). In diesem Kontext ist von Bedeutung, dass zwei Drittel der Todesfälle, die mit einem hohem BMI assoziiert waren, durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht werden (Afshin et al., 2017)

Auf Ebene der Fettzellen kommt es bei Übergewicht zu einer Hyperplasie und Insulinresistenz der weißen Adipozyten (Czech et al., 1977). Außerdem wird die Speicherung von Fett in Form von Fetttropfen, eine der Hauptfunktionen von weißen Fettzellen, ineffizient. Dies wiederum führt zu einer verringerten Lipogenese und einer gesteigerten Lipolyse. Das bedeutet für den Organismus eine vermehrte und unkontrollierte Freisetzung von freien Fettsäuren in den Körperkreislauf (Lee et al., 1997; Unger und Orci, 2001). Die beschriebene funktionelle Veränderung der Adipozyten führt zu zellulärem Stress und zur Infiltration von Immunzellen wie

beispielsweise Makrophagen (Weisberg et al., 2003). Daraus folgend kommt es zur low-grade Inflammation, welche sich auf das gesamte Körpersystem ausweitet (Metaflammation) (Hotamisligil, 2006). Darüber hinaus zeigt sich eine gestörte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Diese inflammatorische Komponente stellt einen wichtigen Bestandteil bei der Pathophysiologie von Adipositas, aber auch von verschiedenen Gefäßerkrankungen dar (Guilherme et al., 2008; Hotamisligil, 2006). Zwischen der von Makrophagen getriggerten chronische low-grade Inflammation und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen besteht zudem ein Zusammenhang mit der Entwicklung einer Insulinresistenz und folglich mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (Hotamisligil 2003; Lauterbach und Wunderlich, 2017).

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Laut WHO stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die weltweit häufigste Todesursache dar. Zugrunde liegend ist die Arteriosklerose, hierbei kommt es zur endothelialen Dysfunktion mit Retention von low-density Lipoproteinen (LDL). Diese werden darauffolgend modifiziert, was letztendlich zur low-grade Inflammation und der Einwanderung und Infiltration von Monozyten, den Vorläuferzellen der Makrophagen, in die Gefäßwand führt. Frühe arteriosklerotische Veränderungen bestehen aus subendothelial gelegenen Schaumzellen, den sogenannten „foam cells“. Hierbei handelt es sich um mit Cholesteroll gefüllte Makrophagen. Im Verlauf kommt es zur Akkumulation von vascular smooth muscle cells (VSMCs) sowie fettreichem nekrotischen Debris was zum weiteren Wachstum der Läsionen, der weiteren Migration von Immunzellen und zur Kalzifizierung und Ulzeration der so gebildeten arteriosklerotischen Plaques führt (Libby 2000; Lusis 2000). Dieser oben beschriebene Prozess ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Durch die Plaques kann es zur Verlegung der Blutstrombahn oder der Bildung eines Thrombus kommen. Außerdem kann ein arteriosklerotischer Plaque rupturieren. Diese Vorgänge können je nach Lokalisation einen Myokardinfarkt, Schlaganfall oder einen akuten peripheren arteriellen Verschluss verursachen (Libby, 2000; Lusis, 2000; Rader und Daugherty, 2008; Tabas et al., 2015).

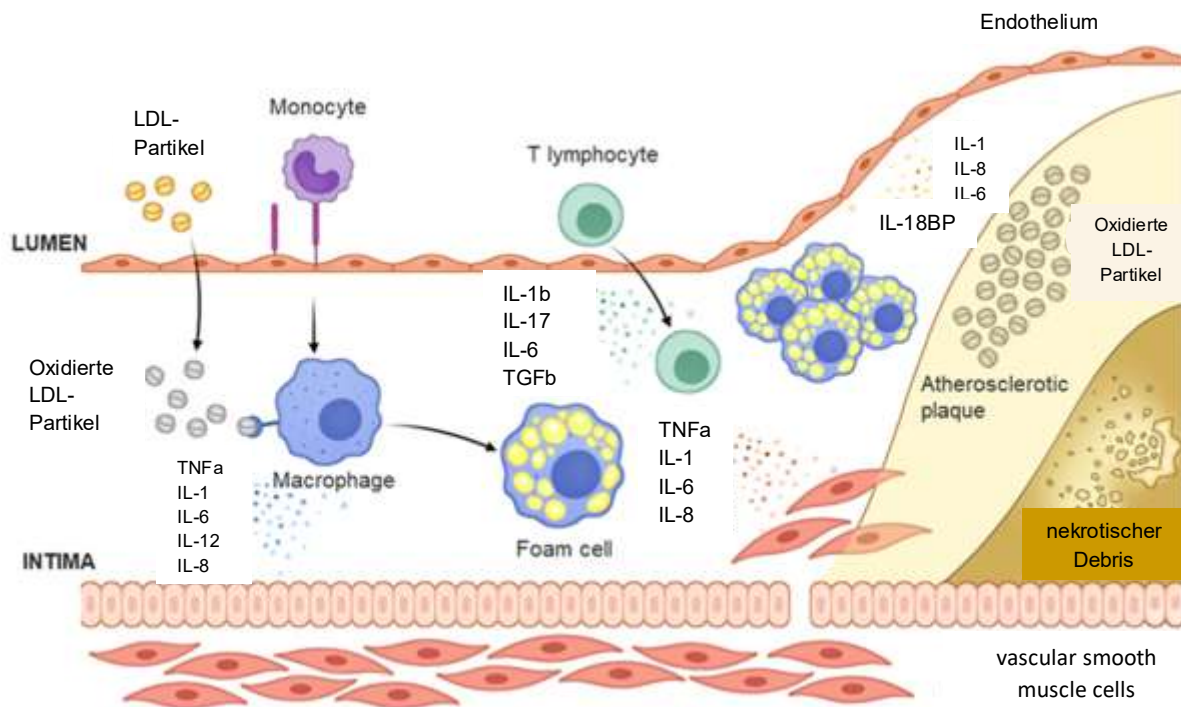


Abb. 1: Schematische Abbildung der Entstehung von Arteriosklerose (modifiziert nach Ji und Lee, 2021)

1.2 Die verschiedenen Fettgewebstypen

Fettgewebe von Säugetieren wird im Allgemeinen in drei verschiedene Typen unterteilt: Braunes und weißes Fettgewebe sowie einen dritten Zwischentyp, das beige Fettgewebe. Diese verschiedenen Fettgewebstypen besitzen jeweils ein unterschiedliches Erscheinungsbild, Proteinexpressionsmuster und unterscheiden sich auch in ihrer embryonalen Entwicklung (Pfeifer und Hoffmann 2015), was im Folgenden genauer erläutert wird:

Weißes Fettgewebe

Weißes Fettgewebe (white adipose tissue, WAT) ist über den gesamten Körper verteilt und findet sich subkutan, inguinal und viszeral. (Chen et al., 2017). Charakteristisch für weiße Fettzellen ist ein großer weißer Fetttropfen, der nahezu das gesamte Zellplasma ausfüllt und Triacylglyceride im Zytoplasma enthält. Mitochondrien befinden sich in WAT verglichen mit braunem Fettgewebe (brown adipose tissue, BAT) (s.u.) nur wenige (siehe Abb. 2). Die Hauptfunktion von WAT ist die Speicherung von Energie in Form von Triacylglyceriden, welche bei Energiebedarf (z.B. bei Hunger) durch Lipolyse, in Form von freien Fettsäuren, freigesetzt werden können. Lipolyse wird über den Neurotransmitter Norepinephrin initiiert, welcher an seinen β -adrenergen Rezeptor bindet, der auf den weißen Adipozyten exprimiert wird. Dadurch wird der second-messenger cAMP (cyclisches Adenosinemonophosphat) produziert, der dann wiederum via der Proteinkinase A (PKA) eine hormon-sensitive Lipase aktiviert. Diese bewirkt letztendlich die Freisetzung von freien Fettsäuren und Glycerin aus den Triacylglyceriden, welche durch das Blut zum Zielgewebe transportiert werden und dort zwecks Energiegewinnung weiter abgebaut werden (Duncan et al., 2007).

In den letzten Jahren hat man zudem erkannt, dass WAT ebenso ein sekretorisch aktives Organ ist und eine Vielzahl von Botenstoffen wie Adipokine, Zytokine und Steroidhormone ausschüttet. Hier sind Leptin, Resistin, Adiponektin, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α), Transforming growth factor beta (TGF β) und Interleukin 6 (IL-6) als einige wichtige Vertreter zu nennen (Chen et al., 2016; Guerre-Millo, 2002; Trayhurn und Beattie, 2002).

Embryonal entsteht weißes Fettgewebe aus dem Mesoderm. Hierbei dachte man lange Zeit, dass WAT aus myf-5 (myf-5)-negativen Vorläuferzellen entsteht. Es scheint sich bei myf-5 allerdings vor allem um einen Marker für die anatomische Position der Zellen zu handeln, denn je nach anatomischer Lokalisation können im WAT myf-5-positive sowie myf-5-negative Vorläuferzellen aufgefunden werden (Sanchez-Gurmaches und Guertin, 2014). So sind die Fettdepots, welche im Körper anterior-subkutan und retroperitoneal-viszeral liegen, vor allem myf-5-positiv, wohingegen Fettdepots, welche sich posterior-subkutan, mesenterial und perigonadal befinden, myf-5-negativ sind (Chen et al., 2017; Sanchez-Gurmaches und Guertin, 2014).

In die Regulation der Adipogenese weißer Fettzellen sind verschiedene Faktoren

involviert. Besonders peroxisome proliferator-activated factor gamma (PPAR γ) als Hauptregulator und CCAAT/enhancer-binding-proteins (C/EBPs) spielen eine wichtige Rolle bei der Adipozytendifferenzierung während der Adipogenese, wobei PPAR γ von C/EBP α reguliert wird (Barak et al., 1999; Hudak und Sul, 2013; Rosen et al., 1999; Rosen und MacDougald, 2006).

Braunes Fettgewebe

Morphologisch beinhalten braune Adipozyten im Gegensatz zu weißen Fettzellen viele, kleinere Fetttropfen, reichlich Mitochondrien für die Thermogenese und sind stark vaskularisiert, sodass die Zellen braun erscheinen (siehe Abb. 2). BAT schützt Neugeborene vor Kälte mittels non-shivering thermogenesis (NST), was die Produktion von Körperwärme ohne Muskelzittern bedeutet. Der Mechanismus der NST wird durch die Aktivierung von β_3 - und A_{2A}-Rezeptoren im braunen Fettgewebe ausgelöst (Lowell und Flier 1997; Gnad et al. 2014) und lässt sich wie folgt umschreiben: Der Protonengradient in der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran wird von der Adenosintriphosphatproduktion zwecks Wärmegenerierung entkoppelt, was mit Hilfe von Uncoupling Protein 1 (UCP-1) erfolgt. Bei dem Protein UCP-1 handelt es sich um einen mitochondrialen Transporter, der durch Kältestimuli induziert wird und als klassischer Marker für BAT gilt (Cannon und Nedergaard, 2004; Hildebrand et al., 2018; Palou et al., 1998; Pfeifer und Hoffmann, 2015).

Hierbei ist peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a) ein wichtiger transkriptionaler Koaktivator für die UCP-1- Expression (Barbera et al., 2001; Mu et al., 2021). Fibroblast growth factor 21 (FGF21) ist hierbei wiederum ein Regulator von PGC1a (Fisher et al., 2012) und spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Induktion von UCP-1 in BAT (Zouhar et al., 2021).

Während der embryonalen Entwicklung entstehen die braunen Adipozyten aus dem Mesoderm und dem zentralen Dermomyotom, wovon ebenso die Skelettmuskulatur sowie die Hautzellen abstammen (Atit et al., 2006). Myf5 sowie die Paired-box Gene 3 und 7 (Pax3 und Pax7) werden während der frühen Entwicklung von braunen Adipozyten aus Stammzellen aktiviert (Sanchez-Gurmaches und Guertin, 2014). Des Weiteren wurden einige Proteine beschrieben, die als positive Regulatoren während

der Zellentwicklung agieren wie etwa PR domain containing 16 (PRDM16), PPAR γ , Orexin und bonemorphogenic-factor 7 (BMP7) (Cohen et al., 2014; Hondares et al., 2011; Tseng et al., 2008).

Nicht nur Neugeborene, sondern auch Erwachsene besitzen BAT Depots, die durch Kältestimuli aktivierbar sind (Cannon und Nedergaard 2004). Diese Depots finden sich bei Kleinkindern interskapulär und bei Erwachsenen vor allem supraclavikulär, im Bereich des Nacken und in tieferen Regionen wie renal, perirenal, mediastinal und paraaortal (Heaton 1972). Die tatsächliche Aktivität von braunem Fettgewebe bei Erwachsenen konnte in weiteren Studien mittels F-18-Desoxyglucose-Positronen-Emissions-Computertomographie (FDG-PET-CT) nachgewiesen werden, sowie eine Korrelation zwischen BAT und BMI in verschiedenen Studien aufgezeigt werden (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Bei übergewichtigen Probanden fiel die Aktivität von BAT geringer aus, als bei normalgewichtigen Probanden. In diesem Zusammenhang zeigte sich eine negative Korrelation zwischen BMI, Körperfettanteil und BAT und eine positive Korrelation zwischen BAT und der metabolischen Stoffwechselrate, also dem Energieumsatz pro Zeiteinheit (van Marken Lichtenbelt et al., 2009).

Übergewicht führt in braunen Fettzellen zu einer Änderung des phänotypischen Erscheinungsbildes, so wandelt sich BAT in einen WAT-ähnlichen Phänotyp um, mit größeren Fetttropfen und einer verringerten Expressionsrate von klassischen braunen Fettgewebemarkern wie UCP-1 und cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (Cidea) (Shimizu et al., 2014). Diese Entdeckung im Zusammenhang mit der Möglichkeit des beschriebenen „Browning“ (siehe nachfolgender Abschnitt) in weißen Fettzellen zeigt die Plastizität des braunen Fettgewebes.

Beiges Fettgewebe

In Unterhautfettgewebe wurden braune Fettzellen identifiziert, die durch Kälte oder Pharmaka induziert werden können, diese Adipozyten enthalten ebenso wie braune Fettzellen mehrere kleine Fetttropfen, welche allerdings in ihrer Größe variabel sind, sodass diese Adipozyten beige erscheinen (siehe Abb. 2). Beiges Fettgewebe wird häufig als Zwischentyp zwischen WAT und BAT angesehen oder als induzierbares

BAT bezeichnet, die embryonale Herkunft der beigen Adipozyten ist aktuell allerdings nicht eindeutig geklärt. Außerdem sind klassische Marker für BAT (z.B. UCP-1, Cidea) auch in beigen Adipozyten exprimiert, jedoch weniger als in BAT (Chen et al., 2016; Wu et al., 2012). Durch beispielsweise β -adrenerge Stimulation oder Kälte lässt sich die UCP-1 Expression in beigen Fettzellen steigern. Auch Marker für WAT lassen sich in beigen Fettzellen finden. Insgesamt erscheint es schwierig Marker für beiges Fettgewebe eindeutig zu spezifizieren, häufig benannte Marker für beige Adipozyten sind CD137, CD 40, Slc27a1, Carbonic-anhydrase 4 (Car4), T-Box-Protein 1 (Tbx1) und Transmembranprotein 26 (TMEM26) (Harms und Seale, 2013; Pilkington et al., 2021; Wu et al., 2012).

Zur Herkunft des beigen Fettgewebes gibt es verschiedene Hypothesen: Die beigen Fettzellen könnten de-novo aus Vorläuferzellen entstehen (Wang et al., 2013) oder beige Adipozyten sind als weiße Adipozyten maskiert und werden infolge von Kälteexposition demaskiert (Nedergaard und Cannon, 2014). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass beige Fettzellen via Interkonversion aus bereits existierenden weißen Fettzellen entstehen, was als „Transdifferenzierung“ bezeichnet wird (Vitali et al., 2012). Es wurde darüber hinaus eine sogenannte „bidirektionale Interkonversion“ zwischen den verschiedenen Fettgewebstypen beobachtet. So lässt sich WAT unter Kälteexposition „bräunen“, was durch die Exposition gegenüber warmen Temperaturen in 5 Wochen rückgängig gemacht werden konnte und sich somit erneut ein weißer Phänotyp zeigte (Rosenwald et al., 2013).

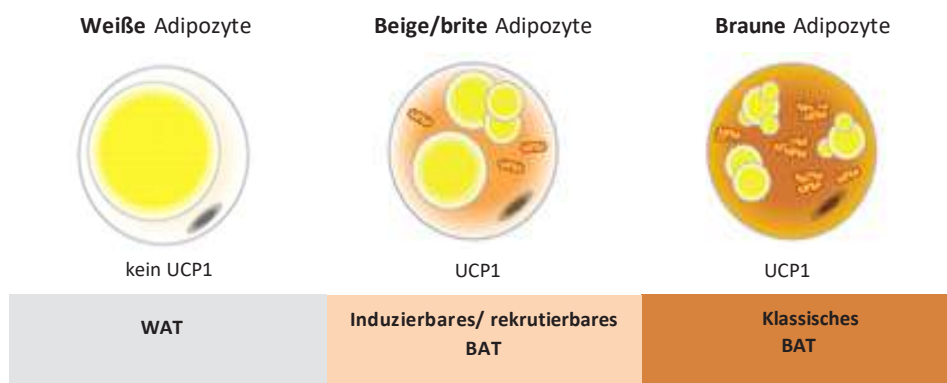


Abb. 2: Morphologie der verschiedenen Fettgewebearten (modifiziert nach Pfeifer und Hoffmann, 2015)

Lokalisation von Fettgewebe im Mausmodell

BAT ist in der Maus interskapulär in Form von zwei Fettgewebslappen lokalisiert. WAT Depots liegen beidseits gonadal (gWAT) was viszeralem Fett entspricht und inguinal (iWAT), was auch als subkutanes Fett bezeichnet wird. Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT) liegt der Aorta direkt an und wurde in dieser Arbeit von der Aorta ascendens thoracalis, Aorta descendens thoracalis und Aorta abdominalis entnommen (siehe Abb. 3)

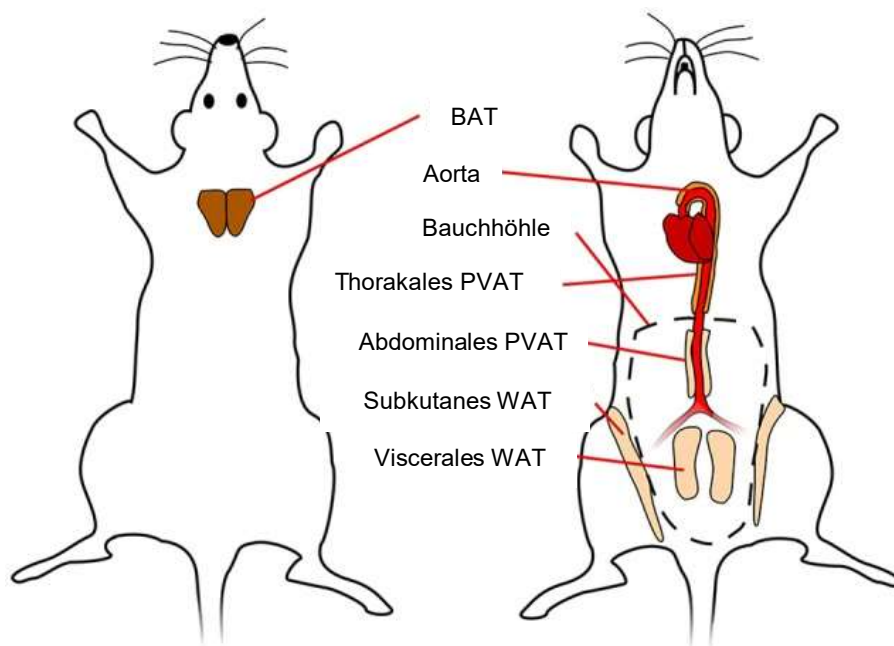


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Fettgewebedepots im Mausmodell (modifiziert nach Hildebrand et al., 2018)

1.3 Perivaskuläres Fettgewebe

Morphologische und thermogene Eigenschaften von PVAT

Das in dieser Dissertation näher zu untersuchende PVAT ist jenes Fettgewebe, welches sich in direkter anatomischer Nachbarschaft zur Adventitia, der äußeren Schicht der Gefäßwand, befindet. PVAT umgibt beim Menschen nahezu alle Blutgefäße außer Kapillaren, pulmonale und zerebralen Gefäße. Morphologisch wird PVAT meist als braunes oder beiges Fettgewebe beschrieben mit einem multilokulären Erscheinungsbild, runden Nuklei und geringen Anteilen an weißen Adipozyten, wobei sich hier Unterschiede je nach anatomischer Lokalisation und

Gewebeherkunft (murin, human) ergeben. So ist humanes PVAT, welches die Aorta thoracalis umgibt, BAT ähnlich und abdominales PVAT eher WAT zuzuordnen (Fitzgibbons et al., 2011; Omar et al., 2014). Bei übergewichtigen Mäusen wurde abdominales PVAT als WAT-ähnlich beschrieben. Zudem konnten bei PVAT der Mesenterialgefäße niedrige Expressionslevel des klassischen BAT Markers UCP-1 detektiert werden (Gálvez-Prieto et al., 2008; Omar et al., 2014; Police et al., 2009). In Genexpressionsuntersuchungen zwischen thorakalem PVAT, klassischem BAT (interskapulär) und WAT von Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich thorakales PVAT und BAT in 228 Genen (0,79 % der Gene) unter Normaldiät unterscheiden. Der Unterschied zwischen PVAT und viszeralem Fettgewebe (3,2 % der Gene) und zwischen PVAT und subkutanen Fettgewebe (4,2 % der Gene) war hingegen deutlich größer. Zwischen Genen, die typischerweise in klassischem BAT exprimiert werden wie UCP-1, Cidea und PPAR γ konnte hierbei kein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden (Fitzgibbons et al., 2011). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass PVAT entwicklungsgeschichtlich eine andere Herkunft als BAT hat. So stammt thorakales PVAT im Gegensatz zu BAT von myf-5⁻-Vorläuferzellen ab. BAT stammt von Pax3⁺-Vorläuferzellen ab, periaortale Adipozyten je nach Geschlecht von Pax3⁺- oder Pax3⁻-Vorläuferzellen (Sanchez-Gurmaches und Guertin, 2014). Insgesamt scheint jedoch die Herkunft von PVAT und insbesondere der verschiedenen PVAT Depots noch nicht abschließend geklärt zu sein. So zeigten Studien, dass PVAT und VSMCs die gleiche Herkunft zu haben scheinen. Durch Ausschalten von PPAR γ in VSMCs, kam es zu einem gänzlichen Fehlen von PVAT, wohingegen WAT und BAT sich unverändert entwickelten (Chang et al., 2012). In Kontrast dazu stehen neuere Studien, die aufzeigen konnten, dass lediglich abdominales PVAT und VSMCs die gleiche Herkunft zu haben scheinen. Vorläuferzellen für thorakales PVAT scheinen eher die gleiche Herkunft wie Fibroblasten zu haben (Angueira et al., 2021).

Die Rolle von PVAT bei kardiovaskulären Erkrankungen

Perivaskuläres Fettgewebe schüttet eine Vielzahl von Botenstoffen wie Adipokine, pro- und antiinflammatorische Zytokine sowie vasoaktive Substanzen aus (Lian und Gollasch, 2016). Zwischen Adventitia und PVAT befindet sich keine Faszie zur Abgrenzung dieser Strukturen voneinander. In diesem Kontext gibt es daher

Überlegungen PVAT als die vierte Schicht der Gefäßwand (tunica adiposa) zu bezeichnen (Hillock-Watling und Gotlieb, 2022). Dies erscheint interessant, da die sogenannte „outside-in-Theorie“ besagt, dass von außerhalb der Gefäßwand, wo sich das perivaskuläre Fett befindet, eine Einwanderung von Immunzellen in die innenliegenden Schichten des Gefäßes wie etwa der Intima stattfinden könnte (Maiellaro und Taylor, 2007). Eine Dysfunktion von PVAT ausgelöst durch Adipositas oder Alterseffekte könnte somit Einfluss auf die Gefäßgesundheit haben (Hillock-Watling und Gotlieb, 2022; Pan et al., 2019).

In Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen sind folgende Adipokine relevant: Adiponektin, welches kardio- und vaskuloprotektive Eigenschaften besitzt (Goldstein et al., 2009) und Resistin, das mit negativen Eigenschaften für das Herz-Kreislauf-System assoziiert wird. Resistin beeinflusst über das Protein Osteopontin die VSMCs (Park et al., 2014), was wiederum zur Proliferation dieser Zellen führt. Die Ansammlung von VSMCs und nekrotischem Debris ist Teil des Mechanismus der Arterioskleroseentstehung (siehe Erläuterungen auf S. 9), sodass die Ausschüttung von Resistin über Osteopontin insgesamt eine Gefäßstenose begünstigt (Panda et al., 1997; Shimizu et al., 2004). Es wurde zudem festgestellt, dass in der Adipositas die Resistinexpression ansteigt, während die Expression von kardioprotektivem Adiponektin sinkt (Gálvez et al., 2006; Lian und Gollasch, 2016; Nakamura et al., 2014; Voorde et al., 2014). Inflammatorische Zytokine, welche in Verdacht stehen an der Plaquebildung arteriosklerotischer Läsionen beteiligt zu sein, sind Monocyte-Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) sowie TGF β und IL-6 (Britton und Fox, 2011).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung sowie der Vergleich von PVAT unterschiedlicher anatomischer Herkunft (Aorta ascendens thoracalis, Aorta descendens thoracalis und Aorta abdominalis). Hierzu wird die Morphologie von PVAT mittels histologischen Färbungen untersucht. Darüber hinaus werden in PVAT exprimierte Botenstoffe z.B. Adipokine und thermogene Marker mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht. Insbesondere soll hierbei PVAT unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Hochfettdiät, Kälteexposition, Thermoneutralität) mit BAT, iWAT und gWAT verglichen werden. Fettgewebe schüttet verschiedene Botenstoffe aus, daher besteht die Möglichkeit, dass Botenstoffe aus PVAT die Gefäße und deren Funktionalität beeinflussen (Britton und Fox, 2011; Maiellaro und Taylor, 2007), was eine mögliche interessante Verbindung zwischen Adipositas und kardiovaskulären Erkrankungen darstellt. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit soll der Zusammenhang zwischen PVAT und kardiovaskulären Erkrankungen sowie die Möglichkeit PVAT durch z.B. pharmakologische Stimuli zu modulieren, weitergehend erforscht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche C57/BL6j-, 129/Sv- und BALB/c-Mäuse (Janvier Labs, Le Genest St Isle, Frankreich) verwendet. Das Futter und Wasser wurde den Mäusen zu jederzeit ad libitum verabreicht.

Die Hochfettdiät mit 60 KJ% Fett (EF D12492 (II) mod., ssniff®, Soest, GER) wurde 12 Wochen durchgeführt, hierbei waren die Mäuse zu Beginn 8 Wochen alt. Die Kontrollgruppe bekam eine Normaldiät mit 13 KJ% Fett (EF D12450B mod. LS, ssniff®, Soest, Deutschland). Zum Zeitpunkt der Gewebepräparation waren die Mäuse 20 Wochen alt.

Die Kälteexposition erfolgte (nach 3 Tagen Akklimatisierung bei 16 °C) für 7 Tage bei 4 °C. Hierbei wurden die Mäuse in einzelne Käfige separiert. Bei der Kontrollgruppe betrug die Raumtemperatur 23 °C, wobei sich 4 Mäuse in einem Käfig befanden. Zum Zeitpunkt der Gewebepräparation waren die Mäuse zwischen 9 und 10 Wochen alt.

Die Thermoneutralitätskohorte wurde für 7 Tage bei 30 °C mit jeweils 4 Mäusen in einem Käfig gehalten. Bei der Kontrollgruppe betrug die Raumtemperatur 23 °C, wobei sich ebenfalls 4 Mäuse in einem Käfig befanden. Zum Zeitpunkt der Gewebepräparation waren die Mäuse zwischen 9 und 10 Wochen alt.

Die Tierversuchsgenehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen liegt vor (Aktenzeichen 84-02.04.2016.A202).

2.2 PVAT Präparation

PVAT wurde von drei verschiedenen Abschnitten der Aorta, nämlich der Aorta ascendens thoracalis (nachfolgend als A. ascendens bezeichnet), Aorta descendens thoracalis (nachfolgend als A. thoracalis bezeichnet) und Aorta abdominalis, entnommen. PVAT der A. ascendens befindet sich in Form eines kleinen Depot auf dem Aortenbogen. Thorakal und abdominal umgibt PVAT streifenförmig die Aorta

(Abb.4). Die Präparation erfolgte mittels feiner Federschere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland).

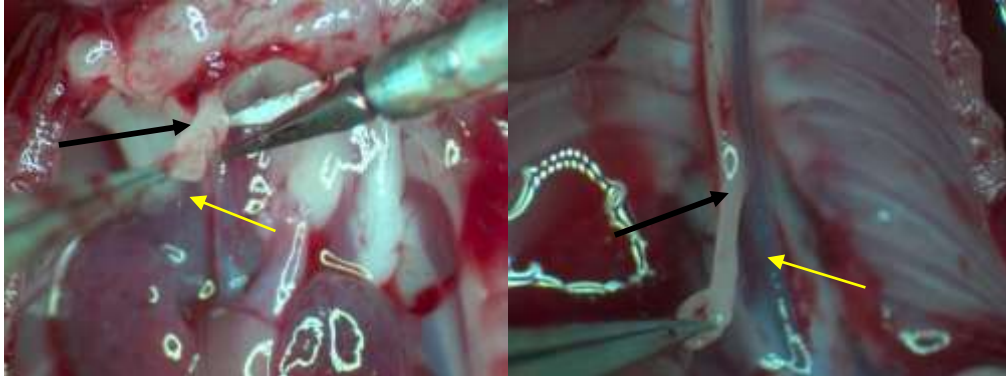


Abb. 4: Exemplarisches PVAT von der A. ascendens (links) und der A. thoracalis (rechts) der Maus. PVAT ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert, die Aorta gelb. Diese beiden Bilder sind im Rahmen einer Kooperation mit der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Bonn entstanden (andere Daten aus dieser Kooperation werden in dieser Arbeit nicht verwendet oder gezeigt).

2.3 RNA Isolation, cDNA Reverse Transkription und qPCR

Nachdem PVAT in „Biomasher II Tubes“ (Kimble®) gemörsert wurde, konnte die RNA mittels „InnuSolv Reagent“ (AnalytikJena) und „Direct-zol™ RNA Mini-Prep“ (Zymo Research) isoliert werden. Prinzipiell wird bei dem verwendeten Kit die RNA an Säulen gebunden und später mit RNase freiem Wasser gelöst. Hierbei wurde ein fakultativer DNase Verdau durchgeführt. Nach Lysierung mittels 700 µl „InnuSolv Reagent“ (AnalytikJena) und Zugabe der gleichen Menge Ethanol (EtOH) 100 % wurden die Proben zum Vermischen geschüttelt und dann in die vorgesehenen Säulen („Zymo-Spin™ IIC Column mit Collection Tube“) überführt und zentrifugiert. Nach Zugabe von „RNA Wash Buffer“ wurde erneut zentrifugiert und danach mit DNase-I und „DNA-Digestion Buffer“ für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine mögliche Amplifikation von DNA während der später folgenden qPCR zu vermeiden. Darauffolgend wurde zweimal mit „Direct-zol™-RNA PreWash“ gewaschen und zentrifugiert und dann der „RNA Wash Buffer“ dazugegeben und für 3 Minuten zentrifugiert. Zwischen den jeweiligen Zentrifugationen wurde das „Collection Tube“ geleert. Es wurde, wenn nicht anders genannt bei 14000 g und 23 °C für jeweils 1

Minute zentrifugiert. Die „Zymo-Spin™ IIC Column“ wurden in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA wurde durch Zugabe von 40 µl DNase/RNase-freiem Wasser und darauffolgendem Zentrifugieren gelöst. Bis zur weiteren Benutzung wurde sie bei -80 °C gelagert.

Die RNA größerer Gewebstücke wie iWAT, gWAT und BAT wurden mittels Phenol-Chloroform Extraktion isoliert. Die Gewebstücke wurden mit 1000 µl „InnuSolv Reagent“ (AnalytikJena) lysiert und homogenisiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Nun wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben wurden für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere klare Phase wurde danach in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipetiert und 500 µl Isopropanol (99 %) hinzugegeben. Nach erneutem Schütteln der Proben wurde für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und das gebildete Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes wurde dreimal mit 75 %-EtOH (in DEPC-H₂O) gewaschen und kräftig geschüttelt. Nach Abkippen des EtOH wurde das Pellet dann für 15 Minuten getrocknet und darauffolgend mit 30 µl RNase und DNase-freiem Wasser gelöst (10 Minuten bei 55 °C und 880 rpm schütteln). Die RNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde mit einem NanoDrop™2000 gemessen und anschließend mit einem „Transcriptor First strand cDNA synthesis Kit“ (Roche) oder mit einem „ProtoScript® First strand cDNA synthesis Kit“ (NEB) reverstranskribiert.

Die qPCR wurde je nach Primer (Tab. 2 und Tab. 3) mit „SYBR-Green“ (Roche, Life Technologies) oder „Power SYBR-Green“ (Applied Biosystems) an einem StepOnePlus Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems) als 96-well Platte oder an einem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) als 384-well Platte durchgeführt. Die Proben wurden als Duplikate aufgetragen. Als Haushaltsgen wurde Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Die verwendeten Substanzen werden in Tab. 1 und die benutzten Geräte und sonstige Materialien in Tab. 5 aufgelistet.

Die Auswertung der qPCR-Analysen erfolgte mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ - bzw. $2^{-\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die statistischen Tests wurden an den dCT-Werten

durchgeführt. Es werden jeweils der Mittelwert „mean“ und der Standardfehler des Mittelwertes „standard error of the mean“ (SEM) in den dargestellten Graphen gezeigt.

2.4. Auflistung der verwendeten Substanzen und Kits für die qPCR-Analysen

Tab. 1: Verwendete Substanzen zur RNA Isolation, cDNA Herstellung und qPCR

Produkt	Hersteller
Transcriptor First strand cDNA synthesis Kit Katalognummer: 4896886	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler® SYBR-Green I Master Katalognummer: 04707516001	Roche, Mannheim, Deutschland
ProtoScript® First strand cDNA synthesis Kit Katalognummer: E6560S	NEB, Frankfurt am Main, Deutschland
InnuSolv RNA Reagent Katalognummer: 845-Sb-2090100	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Direct-zol™ RNA Mini-Prep Katalognummer: R2052	Zymo Research Europe GMBH, Freiburg, Deutschland
Power SYBR-Green PCR Master Mix Katalognummer: 43-676-59	Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien

2.5 Primersequenzen

Die verwendeten Primer sind in zwei Tabellen dargestellt, da für die unterschiedlichen Primer-Designs unterschiedliche Reagenzien für die qPCR-Analysen benötigt werden. Für die in Tab. 2. genannten Primer (ABi) wurde der Power SYBR-Green PCR Master Mix von Applied Biosystems verwendet (Tab. 1). Für die in Tab. 3 genannten Primer (Mayer) wurde LightCycler® SYBR-Green I Master von Roche (Tab. 1) verwendet.

Tab. 2: QPCR Primer (Abi)

Name	vorwärts	rückwärts
Resistin	5'-CAG AAG GCA CAG CAG TCT TGA-3'	5'-AGT CTA TCC TTG CAC ACT GGC-3'
FGF21	5'-TGG AAC AGT GGT AGG CGC A-3'	5'-GAG AGC TCC ATC TGG CTG TTG-3'
COX2	5'-ACC TGG TGA ACT ACG ACT GC-3'	5'-GGA CTG CTC ATG AGT GGA GGA-3'
eNOS	5'-CTA TGG CAA CCA GCG TCC TG-3'	5'-GTA TGC GGC TTG TCA CCT CC-3'
ET1	5'-CTT CCA GGT CCA AGC GTT CC-3'	5'-TTG GTG AGC GCA CTG ACA TC-3'
HPRT	5'-GTC CCA GCG TCG TGA TTA GC-3'	5'-TCA TGA CAT CTC GAG CAA GTC TTT-3'
ND5	5'-AGC ATT CGG AAG CAT CTT TG-3'	5'-TTG TGA GGA CTG GAA TGC TG-3'
Ndufa	5'-AGA CGC ATC TCT GGT GTC AA-3'	5'-GCC AGG AAA ATG CTT CCT TA-3'
PGC1a	5'-TGT GGA ACT CTC TGG AAC TGC-3'	5'-TTG AAA GGG TTA TCT TGG TTG GC

Tab. 3: QPCR Primer (Mayer)

Name	vorwärts	rückwärts
HPRT	5'-ACA TTG TGG CCC TCT GTG TGC TCA-3'	5'-CTG GCA ACA TCA ACA GGA CTC GT-3'
Cidea	5'-ATT TAA GAG ACG CGG CTT TGG GAC A-3'	5'-TTT GGT TGC TTG CAG GGG ACA T-3'
Adiponectin	5'-TCC TGT TCC TCT TAA TCC TGC CCA GTC-3'	5'-GCC AGT GCT GCC GTC ATA ATG ATT C -3'
UCP-1	5'-GGT GAA CCC GAC AAC TTC CGA AGT G-3'	5'-GGG TCG TCC CTT TCC AAA GTG TTG A-3'

Die benutzten Primer (Primersequenzen siehe Tab. 2 und 3) wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland hergestellt.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde ebenso wie die Gestaltung der Graphen mit Graph Pad Prism 5 und 8 durchgeführt. Signifikante Ausreißer wurden mittels Graph Pad Outlier calculator berechnet. Hierbei wurde ein Grubbs' test, auch „ESD-Methode“ genannt, durchgeführt (mit $p < 0,05$).

Es wurden folgenden statistische Tests durchgeführt: students-t-test; multiple t-tests und Holm-Sidak Methode; One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison Test. Die jeweils durchgeführten statistischen Methoden werden im Ergebnis-Teil und in der Abbildungsunterschrift benannt.

2.7 Histologie

Die Gewebstücke wurden nach Entnahme für 48 h in wässriger Formalinlösung (PFA 4 %) fixiert und danach für 2 Minuten mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), dreimal für 20 Minuten in 50 % EtOH und dreimal für 20 Minuten in 70 % EtOH bei 4 °C gewaschen. Dann wurden die Gewebstücke dreimal 20 Minuten in 95 % EtOH und darauf folgend dreimal für 20 Minuten in 100 % EtOH bei Raumtemperatur gewaschen und dann dreimal für 10 Minuten in Xylol gegeben. Hinterher wurden die Gewebe in Paraffin über Nacht inkubiert und dann eingebettet (Leica EG1160, Leica Biosystems). Nach Aushärtung und Lagerung bei 4 °C wurden die Gewebstücke mit einem Mikrotom (Microm HM335E) in 6 µm dicke Schnitte geschnitten und 48 h bei 42 °C getrocknet. Die Proben wurden entparaffiniert und mittels Xylol (2 Minuten) und Alkohol (jeweils 2 Minuten in 100 %, 96 %, 75 %, 50 % EtOH) rehydriert und dann mit Mayers Hämalaunlösung und Eosin-Y (HE) gefärbt, wobei die Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erschienen. Abschließend wurde erneut dehydriert (jeweils 2 Minuten in 50 %, 75 %, 96 % und 100 % EtOH und 2 Minuten in Xylol). Die Schnitte wurden mit Roti®-Histokitt und einem Deckgläschen eingefasst. Zur Mikroskopie wurde ein EVOS® FL Color Imaging System (Thermo Fischer Scientific) benutzt.

Für die UCP-1 Antikörper Färbung wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten in Xylol und dann mittels Alkohol (jeweils zweimal 5 Minuten in 100 %, 96 %, 75 %, 50 % EtOH) hydriert und für zweimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser (dH₂O) gespült. Die entparaffinierten Schnitte wurden für jeweils 5 Minuten in 20 mM und 10 mM Natriumcitrat demaskiert und danach dreimal für 5 Minuten mit dH₂O gespült. Nun wurden die Schnitte für 10 Minuten in Wasserstoffperoxid inkubiert, um endogene Peroxidasen abzusättigen und erneut mit dH₂O gespült. Nach Umranden der Schnitte mit Liquidblocker wurden diese mit 2,5 % „Goat Serum“ in PBS-T (PBS + 0,1 % Tween20) für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, um freie unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Schnitte dreimal mit PBS-T gewaschen. Der UCP-1 Antikörper (in Blocking-Puffer) wurde als Primärantikörper bei einer Verdünnung von 1:500 auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschschrift wurde der zweite Antikörper „SignalStain® Boost ICH Detection Reagent, HRP, Rabbit“ (Cell signaling Technology®) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden mittels „DAB“ (Vector Laboratories) entwickelt und nach erneuter

Alkoholreihe (s.o.) bei aufsteigender Konzentration mit „Roti®-Histokitt“ und einem Deckgläschen eingefasst. Zur Mikroskopie wurde ein EVOS® FL Color Imaging System (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Die verwendeten Substanzen werden zusammenfassend in Tab. 4 und die benutzten Geräte und sonstige Materialien in Tab. 5 aufgelistet.

2.8. Auflistung der verwendeten Substanzen und Kits für die Histologie

Tab. 4: Verwendete Substanzen für die Histologie

Produkt	Hersteller
SignalStain® Boost ICH Detection Reagent, HRP, Rabbit Katalognummer: 8114S	Cell signaling Technology, Danvers, USA
Roti®-Histokitt Katalognummer: 6638.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DAB Peroxidase Substrate Kit Katalognummer: SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Mayers Hämalaun-Lösung Katalognummer: 1092490500	Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Katalognummer: 1102128	Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland

2.7 Geräte/Laboraausstattung

Tab. 5: Geräte/Laboraausstattung

Produkt	Hersteller
Biomasher II Tubes Katalognummer: 749625-0030	Kimble®, Tokio, Japan
Heraeus Megafuge 40 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Applied Biosystems StepOnePlus Real Time PCR Instrument	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
EVOS® FL Color Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Homogenizer T10 basic	IKA, Staufen, Deutschland
SB80 Wasserbad	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
HM 335 E Mikrotom	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Paraffinausgießstation EG 1160	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 HFD-Kohorte

Nach 12 Wochen HFD konnte bei den C57/BL6j-Mäusen eine signifikante Gewichtszunahme dokumentiert werden.

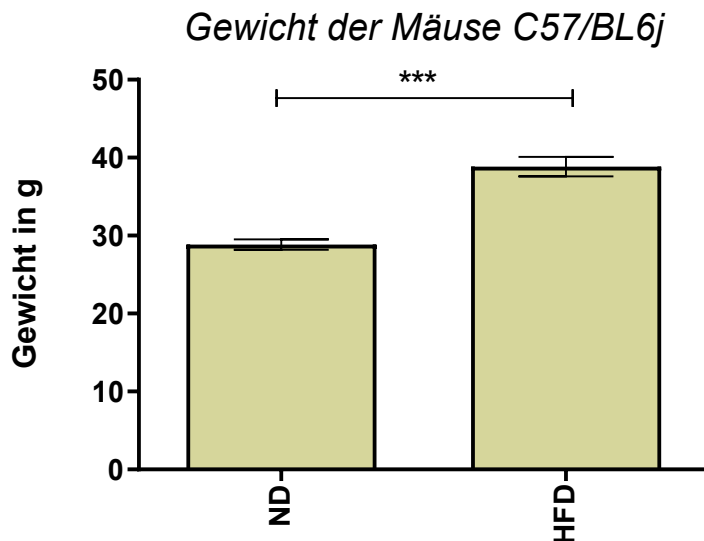
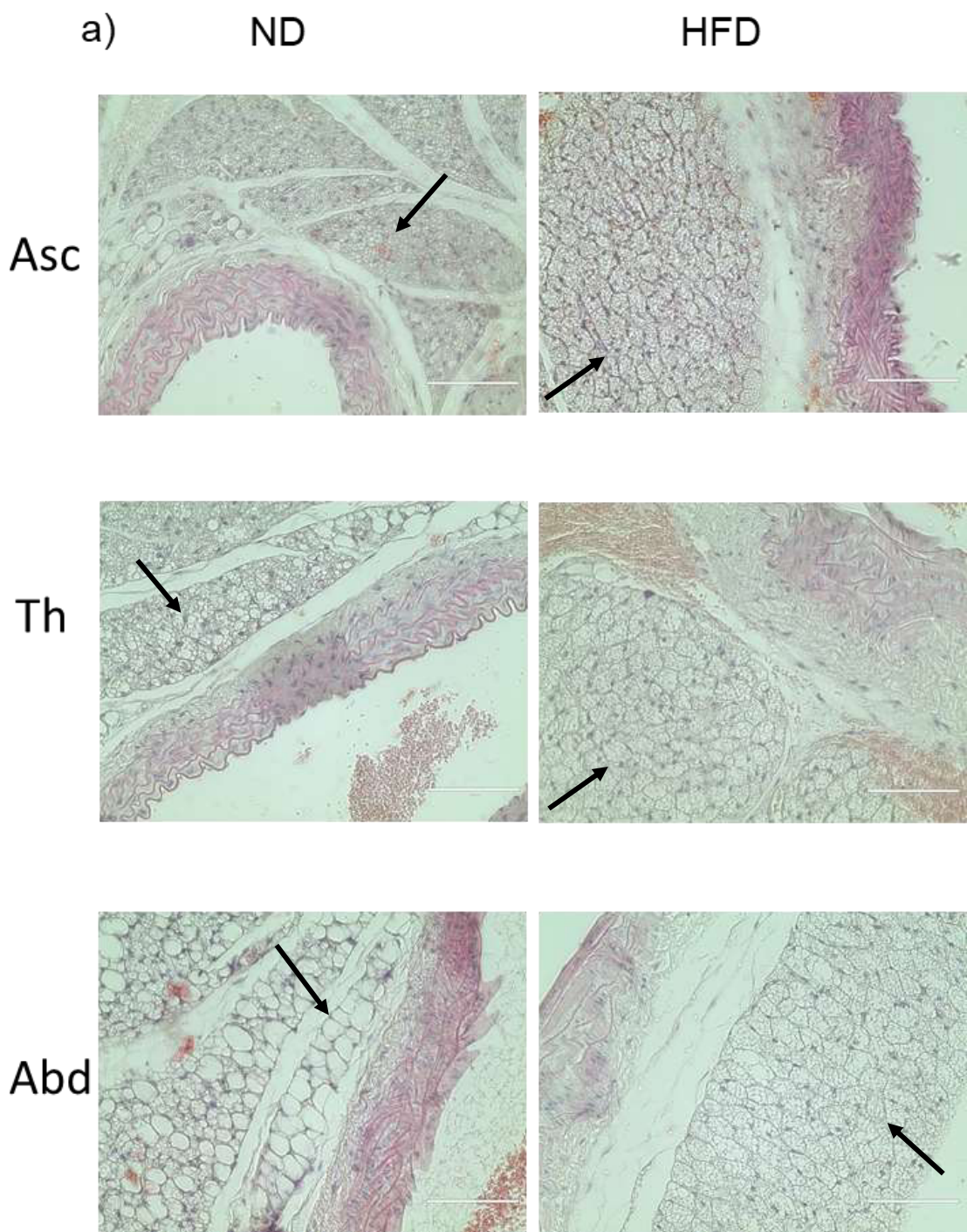


Abb. 5: Gewicht der Mäuse für die ND- und HFD-Kohorten. Die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels students t-Test, $n=10$; $p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

Histologie

In Abb. 6a und 6b ist zu erkennen, dass PVAT der A. thoracalis und A. ascendens einen braunen Fettgewebstyp mit multilokulären Fetttropfen besitzt, die variabel in der Größe sind. Zudem lässt sich PVAT in der UCP-1-Antikörper Färbung braun anfärben. In PVAT der A. abdominalis sind auch einige größere Fettgewebsvakuolen zu sehen, dementsprechend ist hier eine vergleichsweise größere Variabilität in der Größe der Fetttropfen gegeben, einige Zellen wirken siegelringartig, was weißen Adipozyten entsprechen würde. PVAT der A. abdominalis erscheint in der UCP-1-Antikörper Färbung weniger braun als PVAT der A. ascendens und der A. thoracalis. PVAT besitzt insgesamt einen braunen Phänotyp mit multilokulären Fetttropfen, welche in der Größe variieren. Auch nach HFD zeigt PVAT in allen drei Abschnitten eine deutliche Anfärbung mit dem UCP-1 Antikörper (Abb. 6b).



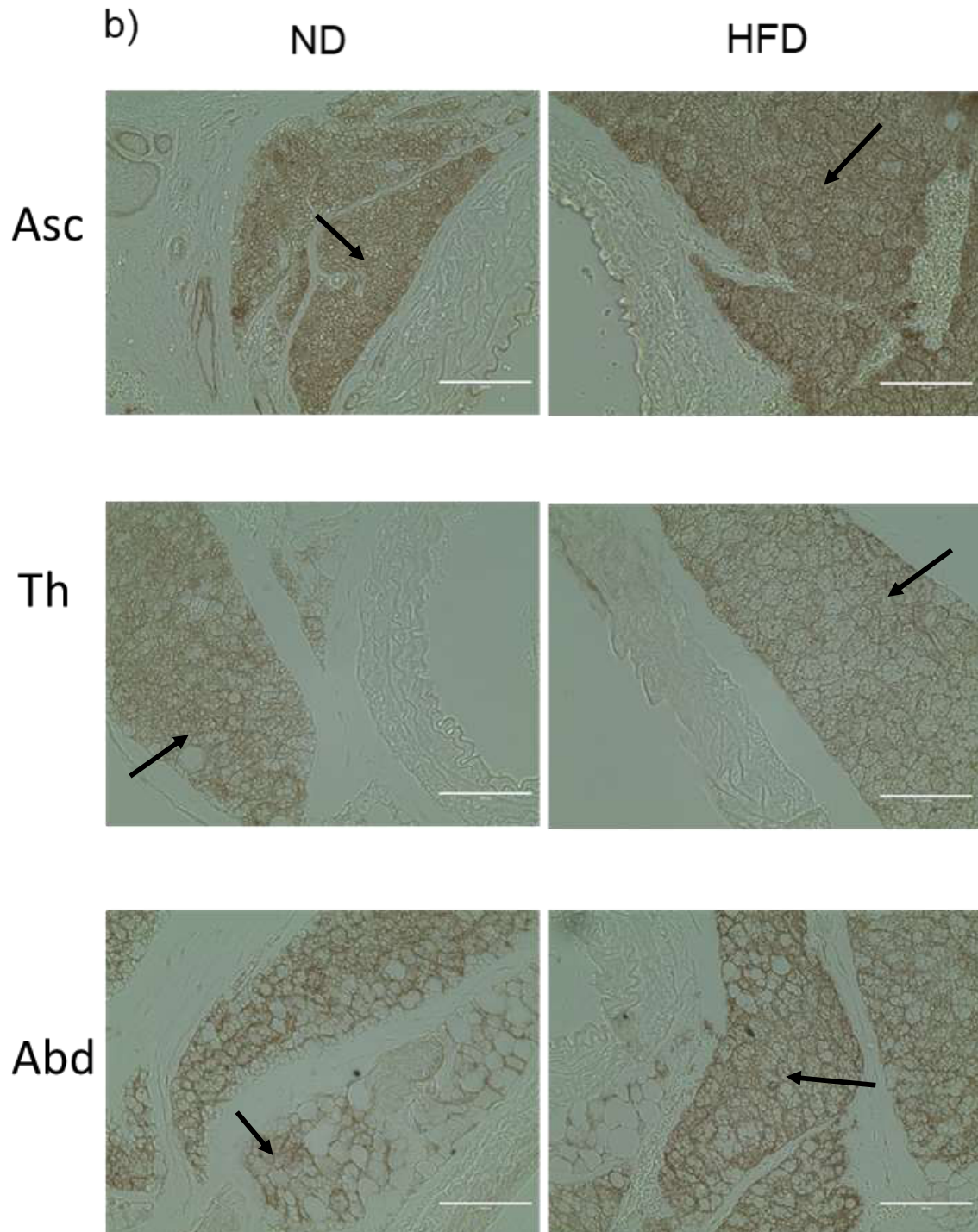


Abb. 6: a) HE-Färbung und b) UCP-1-Antikörper Färbung von PVAT unter Normaldiät und Hochfettdiät; Vergrößerung 40x, Maßstab 100 μ m, exemplarische Aufnahmen

Thermogene Marker

In PVAT der Aorta ascendens (ND 47,339 +8,296/-7,059) und thoracalis (ND 57,806 +5,439/-4,971) wurde eine höhere UCP1 Expression, als in der Aorta abdominalis (ND 14,182 +2,999/-2,475) gefunden (Abb. 7). Nach 12 Wochen Hochfettdiät zeigt sich im thorakalen perivaskulären Fettdepot (HFD 108,158 +13,025/-11,625) ein signifikanter Unterschied in der UCP-1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (ND 57,806 +5,439/-4,971), dargestellt in Abb. 7. Eine darüber hinaus durchgeführte weitere statistische Analyse dieser Daten (One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison-Test, nicht graphisch dargestellt) ergibt eine signifikant höhere UCP-1 Expression in BAT der Normaldiät-Kohorte (ND 216,120 +91,013/-64,043) verglichen mit PVAT der A. ascendens (ND 47,339 +8,296/-7,059) (**p < 0,01), A. thoracalis (ND 57,806 +5,439/ -4,971) (*p < 0,05) und A. abdominalis (ND 14,182 +2,999/-2,475) (**p < 0,001).

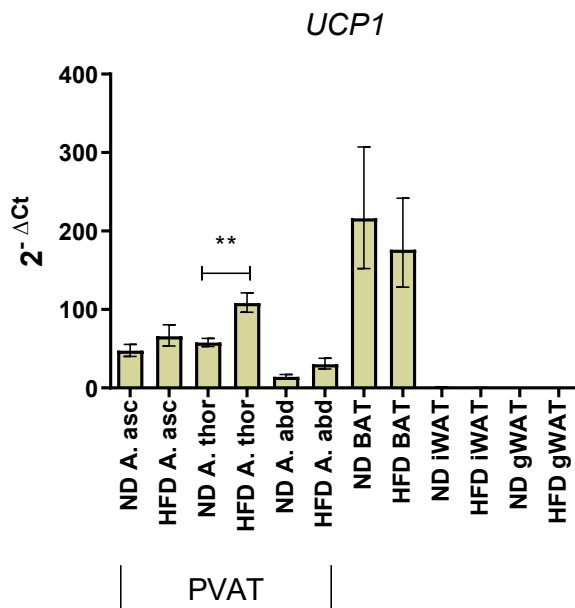


Abb. 7: Genexpression von UCP-1 in PVAT, BAT, iWAT, gWAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=3-10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

In Abb. 8 sind die Ergebnisse der qPCR-Analyse des thermogenen Markers Cytochrome C Oxidase Untereinheit 2 (Cox2) dargestellt. Bei Cox2 handelt es sich um einen Teil des Enzymkomplexes der mitochondrialen Atmungskette. Es zeigt sich ein signifikant höherer Expressionswert dieses Markers im PVAT-Depot der *A. thoracalis* nach Hochfettdiät (HFD 3185,562 +339,188/-306,548) im Vergleich zur Kontrollgruppe (ND 1994,841 +153,626/-142,641). Die Cox-2 Expression in BAT und PVAT der *A. ascendens* (ND 2273,436 +459,205/-382,038) und *A. thoracalis* (ND 1994,841 +153,626/-142,641) ist höher als in PVAT der *A. abdominalis* (ND 824,980 +94,038/-84,416).

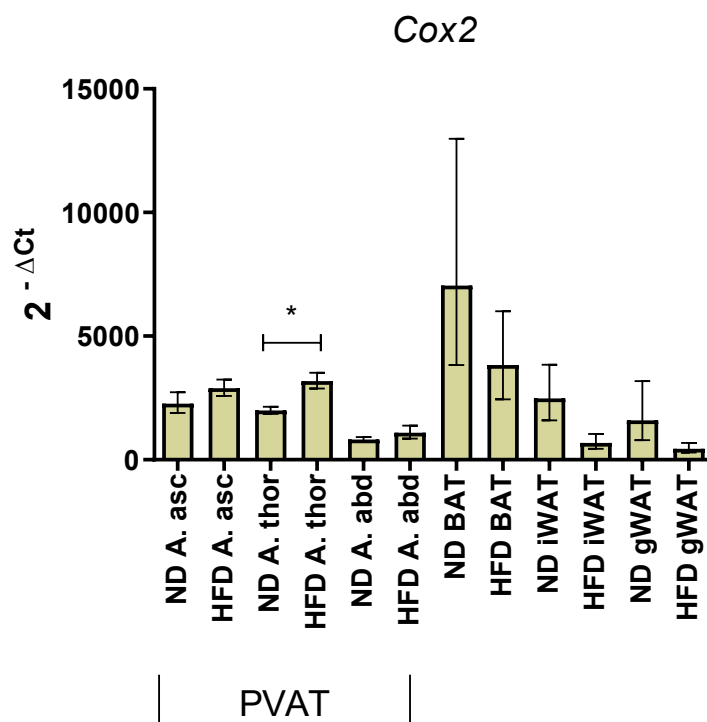


Abb. 8: Genexpression von Cox2 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=8-10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (ND5) und NADH-Dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha (Ndufa) sind mitochondriale Proteine. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression des Markers ND5 nach Hochfett-diät in den perivaskulären Fettdepots der A. thoracalis (ND 121,839 +16,835/-14,791; HFD 362,587 +170,050/-115,760) und A. abdominalis (ND 67,588 +9,676/-8,464; HFD 545,521 +92,748/-79,271) jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb.9a).

Für den Marker Ndufa ergeben sich keine signifikanten Ergebnisse (siehe Abb. 9b). Sowohl für ND5 als auch Ndufa wurden keine Analysen weiterer Depots (iWAT und gWAT) durchgeführt, da der Vergleich von PVAT und BAT bezüglich dieser mitochondrialen Marker besonders interessant erschien.

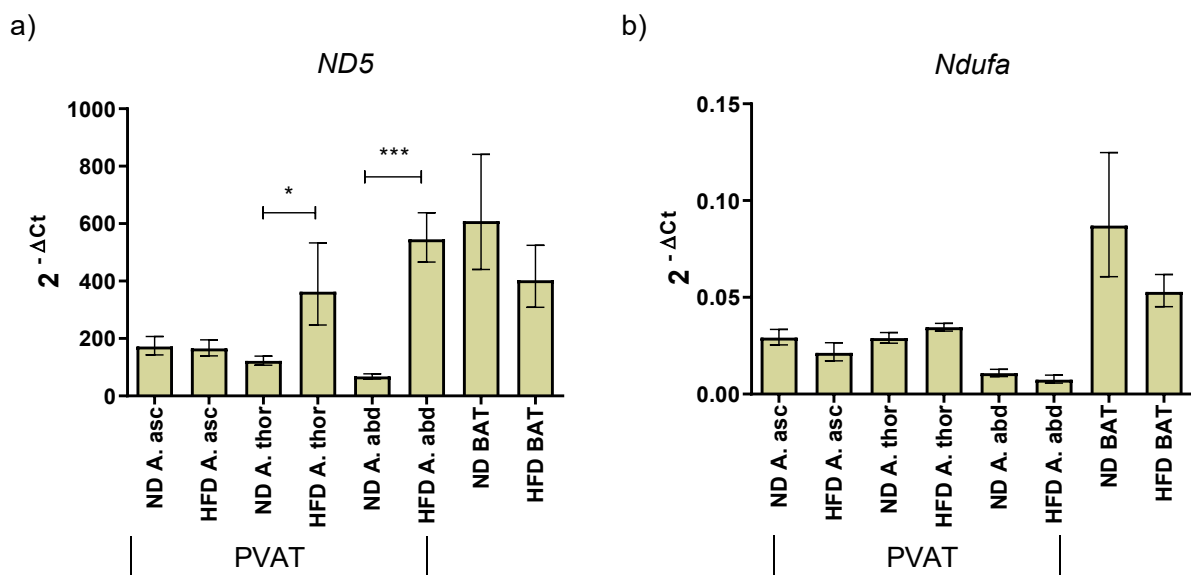


Abb. 9: Genexpression von a) ND5 und b) Ndufa in PVAT und BAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=8-10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Außerdem zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von FGF21 in den PVAT-Depots der *A. thoracalis* (ND 0,007 +0,001/-0,001; HFD 0,016 +0,002/-0,002) und *A. abdominalis* (ND 0,006 +0,001/-0,001; HFD 0,013 +0,003/-0,002) nach Hochfettdiät im Vergleich zur jeweiligen Normaldiätkohorte, dargestellt in Abb. 10. Analysen weiterer Fettdepots für den Marker FGF21 wurden nicht durchgeführt.

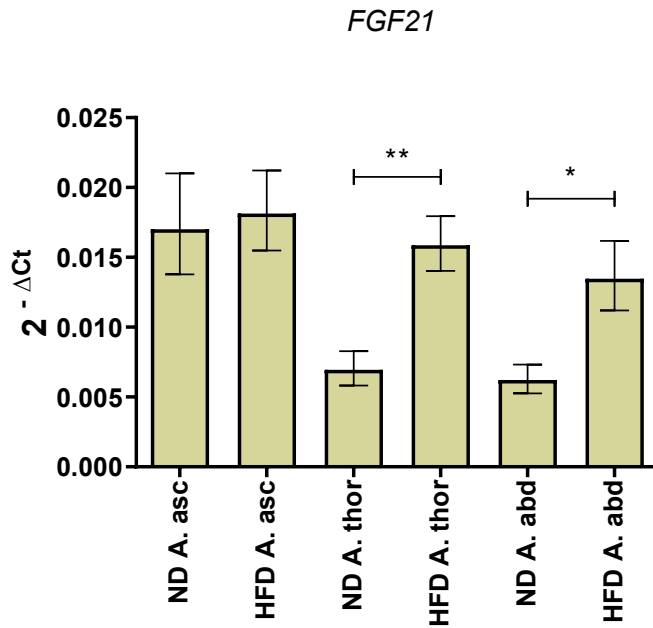


Abb. 10: Genexpression von FGF21 in PVAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Endokrine Marker

Es wurde außerdem die Expression der Adipokine Resistin und Adiponectin in den unterschiedlichen PVAT-Depots für die HFD und ND-Kohorten mittels qPCR Analysen untersucht. Weitere Fettdepots wurden an dieser Stelle nicht untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 11 dargestellt. Für Adiponectin (Abb. 11a) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Resistin (Abb. 11b) weist in den Kontrollgruppen von PVAT der *A. ascendens* (ND 8,622 ± 1,054/-0,939; HFD 3,409 ± 0,970/-0,755) und *A. thoracalis* (ND 5,969 ± 0,887/-0,772; HFD 2,246 ± 0,145/-0,136) eine signifikant höhere Genexpression auf, verglichen mit der jeweils dazugehörigen HFD-Kohorte.

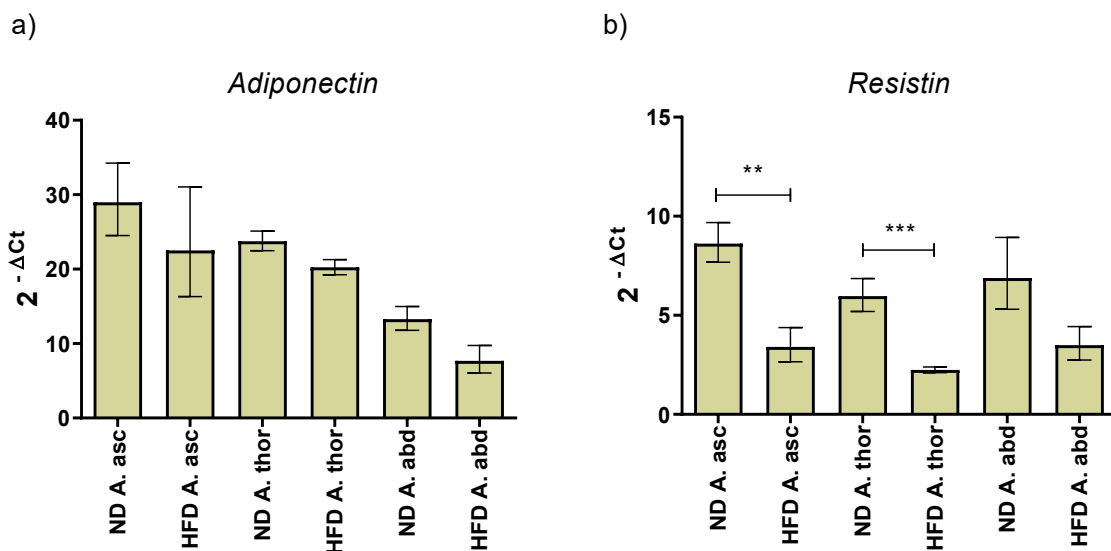


Abb. 11: Genexpression von a) Adiponectin und b) Resistin in PVAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert ±SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=9-10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Vasoaktive Marker

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptidhormon, welches vor allem vasokonstriktorisches Eigenschaften besitzt, was eine Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. Für ET-1, dargestellt in Abb. 12, ergeben sich signifikante Unterschiede in der Genexpression im perivaskulären Fettdepot der A. thoracalis (ND $0,053 \pm 0,004$; HFD $0,090 \pm 0,009$) zwischen beiden Gruppen.

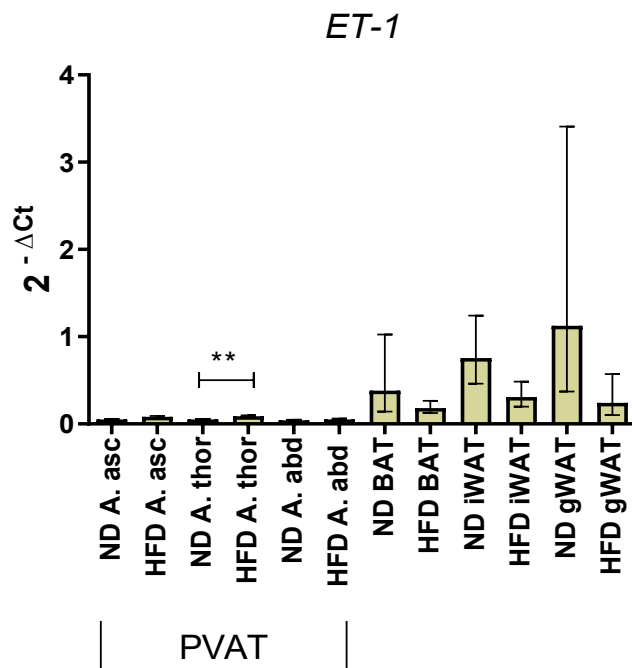


Abb. 12: Genexpression von ET-1 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, $n=4-5$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

In den qPCR-Analysen ergibt sich für eNOS in PVAT kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (siehe Abb. 13). Weitere Fettdepots wurden nicht untersucht.

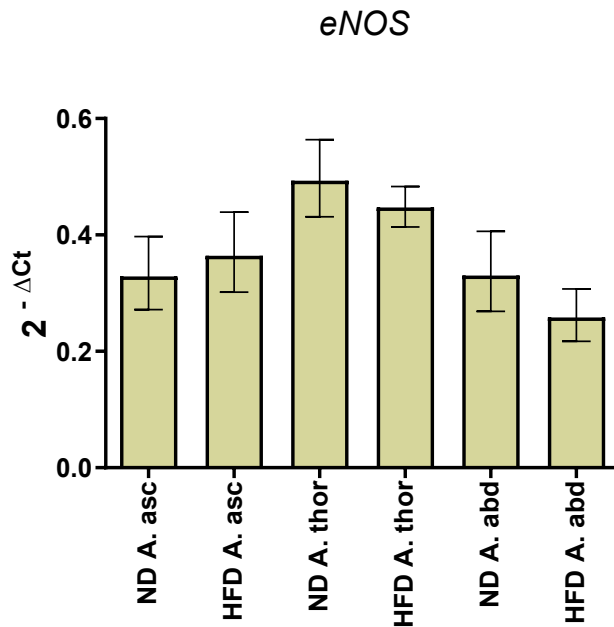
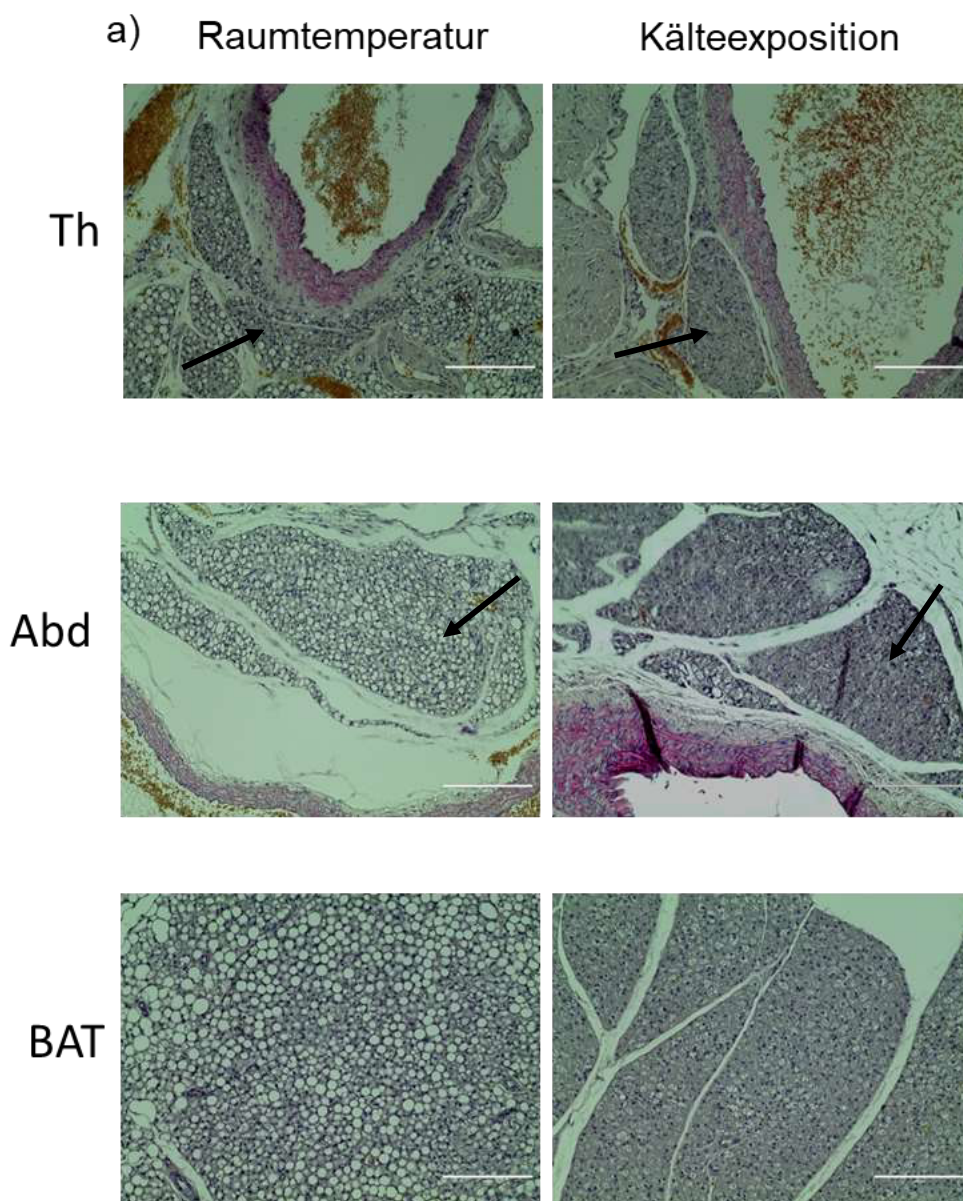


Abb. 13: Genexpression von eNOS in PVAT der ND/HFD-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=9-10; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

3.2 Kälteexpositions kohorte

Histologie

In der Histologie zeigen sich sowohl vor als auch nach Kälteexposition deutliche Ähnlichkeiten zwischen PVAT und BAT sowie eine Zunahme der „Bräunung“ von PVAT und BAT bei der UCP-1-Antikörper-Färbung nach Kälteexposition (Abb. 14b). Hierbei scheint PVAT der A. abdominalis weniger „braun“ und auch die Fetttropfen erscheinen größer im Vergleich zu PVAT der thorakalen Aorta und BAT.



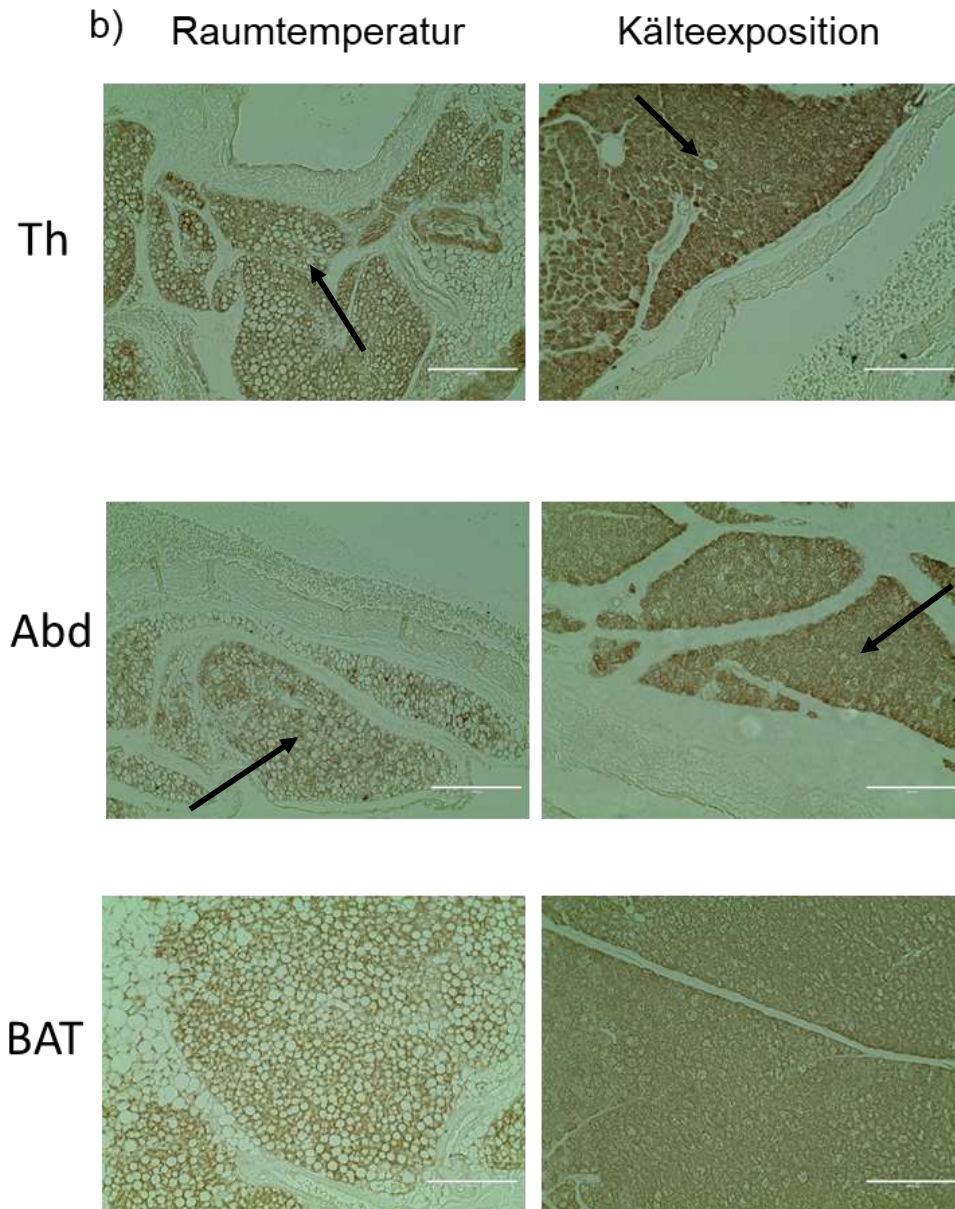


Abb. 14: a) HE-Färbung sowie b) UCP-1 Antikörper-Färbung von thorakalem und abdominalem PVAT im Vergleich zu BAT jeweils bei 23 °C (Kontrollgruppe) und 4 °C (Kälteexposition); Vergrößerung 20x, Maßstab 200 µm, exemplarische Aufnahmen

Thermogene Marker

Durch eine 7-tägige Kälteexposition mit vorheriger Akklimatisierungsphase kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Expression verschiedener klassischer Marker für braunes Fettgewebe in den verschiedenen Fettgewebedepots.

Für den thermogenen Marker UCP-1 (Abb. 15) ergeben sich in der Expositionscohorte signifikant höhere Expressionswerte in verschiedenen Fettdepots verglichen mit der Kontrollgruppe (Raumtemperatur). Somit zeigt sich in PVAT der A. ascendens (ctr 52,916 +13,286/-10,620; 4 °C 206,471 +71,515/-53,117), A. thoracalis (ctr 40,726 +13,839/-10,329; 4 °C 179,283 +41,122/-33,449) A. abdominalis (ctr 4,666 +3,197/-1,897; 4 °C 48,658 +24,426/-16,262), BAT (ctr 13,08819 +1,63458/-1,453102, 4 °C 73,30379 +28,77201/-20,66207) und iWAT (ctr 0,4764487 +0,203057/-0,1423774; 4 °C 5,445222 +2,001622/-1,46361) in der Kälteexpositions-Gruppe eine höhere UCP-1-Expression als in der jeweiligen Kontrollgruppe. Für die PVAT-Depots und BAT der jeweiligen Kontrollgruppe ergeben sich in einer zusätzlich durchgeführte Analyse (One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison-Test) keine signifikanten Unterschiede (Abb. nicht dargestellt).

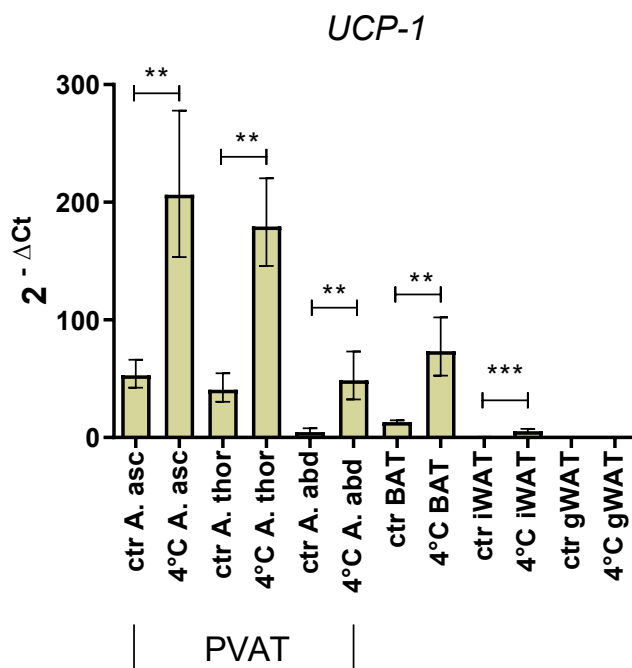


Abb. 15: Genexpression von UCP-1 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle/Kälteexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=8-12; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Auch bei der Analyse der Genexpression von Cox2 (siehe Abb. 16) zeigen sich für die perivaskulären Fettdepots der A. ascendens (ctr 950,006 +261,829/-205,258; 4 °C 2345,507 +213,574/-195,750) und A. abdominalis (ctr 263,667 +95,788/-70,262; 4 °C 990,262 +171,485/-146,172) höhere Expressionswerte von Cox2 nach Kälteexposition verglichen zur Kontrollgruppe.

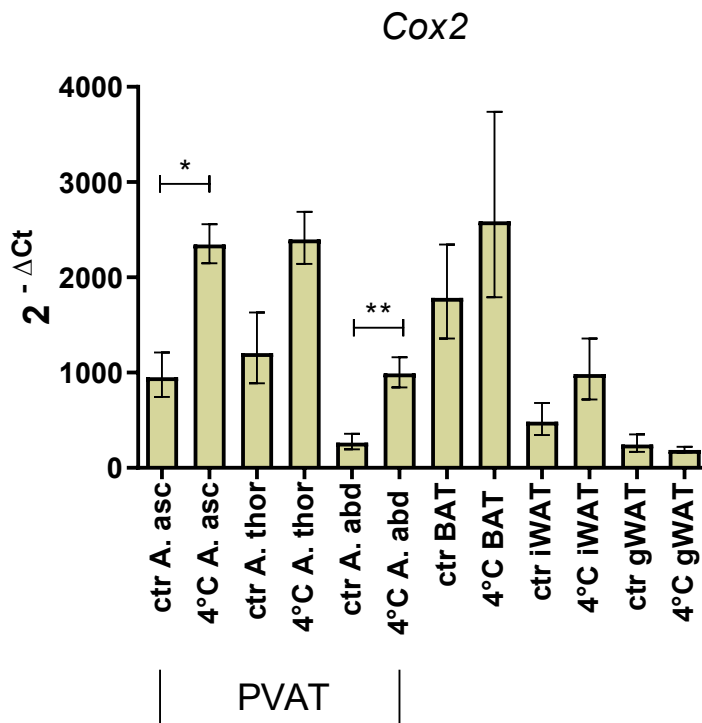


Abb. 16: Genexpression von Cox2 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle/Kälteexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=8-12; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Darüber hinaus zeigen sich bei qPCR-Analysen von PGC1a höhere Expressionslevel nach Kälteexposition in PVAT der A. ascendens (ctr 0,523 +0,115/-0,095; 4 °C 1,835 +0,452/-0,363) und A. abdominalis (ctr 0,098 +0,025/-0,020; 4 °C 0,507 +0,061/-0,054) verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 17a). Außerdem sind die Expressionswerte von PGC1a in PVAT der A. abdominalis sowohl in den Kontroll- als auch in den Kälteexpositionsgruppen niedriger als in PVAT der A. ascendens und A. thoracalis.

Für das Protein FGF21 (Abb.17b) ergeben sich signifikant höhere Expressionswerte in PVAT der A. ascendens (ctr 0,006 +0,001/-0,001; 4 °C 0,036 +0,006/-0,005), A. thoracalis (ctr 0,006 +0,002/-0,002; 4 °C 0,053 +0,008/-0,007) und A. abdominalis (ctr 0,004 +0,001/-0,001; 4 °C 0,036 +0,007/-0,006) nach Kälteexposition verglichen mit der jeweiligen Kontrollgruppe. Für die restlichen Fettdepots sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

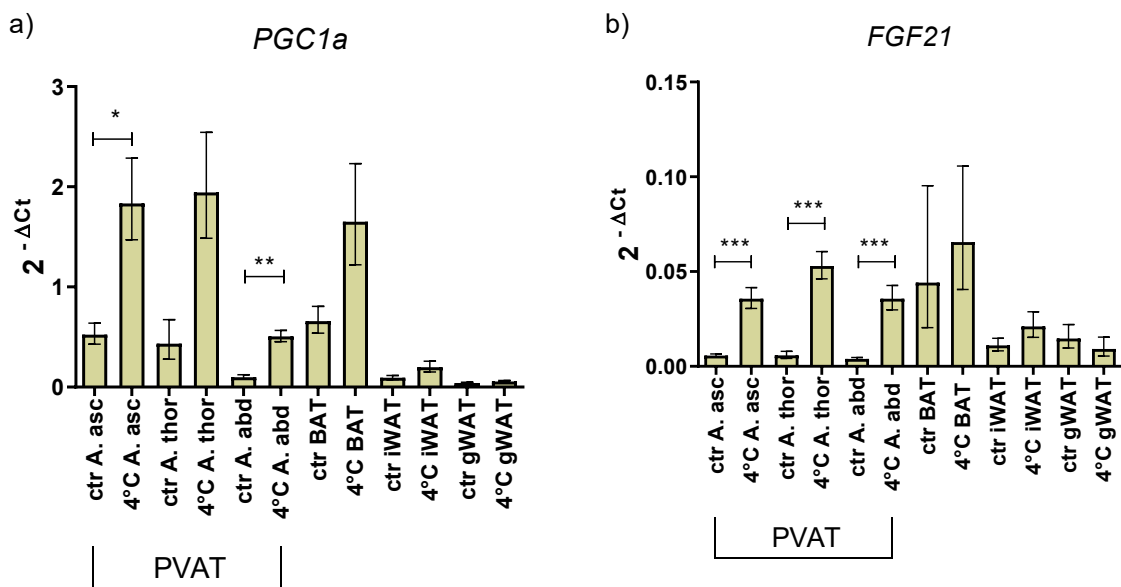


Abb. 17: Genexpression von a) PGC1a und b) FGF21 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert ±SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, a) n=4-5 b) n=8-12; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Endokrine Marker

Für das Adipokin Adiponectin (Abb. 18a) ergeben sich signifikant unterschiedliche Expressionsdaten nach Kälteeexposition in den PVAT-Depots der *A. ascendens* (ctr 17,409 +3,449/-2,879; 4 °C 5,838 +1,307/-1,068), *A. thoracalis* (ctr 18,533 +2,269/-2,021; 4 °C 5,658 +1,408/-1,127) und *A. abdominalis* (ctr 11,685 +1,644/-1,441; 4 °C 2,141 +0,626/-0,485). In allen drei genannten Fettdepots ist in der Expositionsgruppe eine niedrigere Adiponectin-Expression vorhanden als in der Kontrollgruppe.

Bei Analysen des Adipokins Resistin (Abb. 18b) zeigt sich eine signifikant niedrigere Genexpression nach Kältestimulus in PVAT der *A. thoracalis* (ctr 9,290 +1,620/-1,379; 4 °C 2,005 +0,399/-0,333).

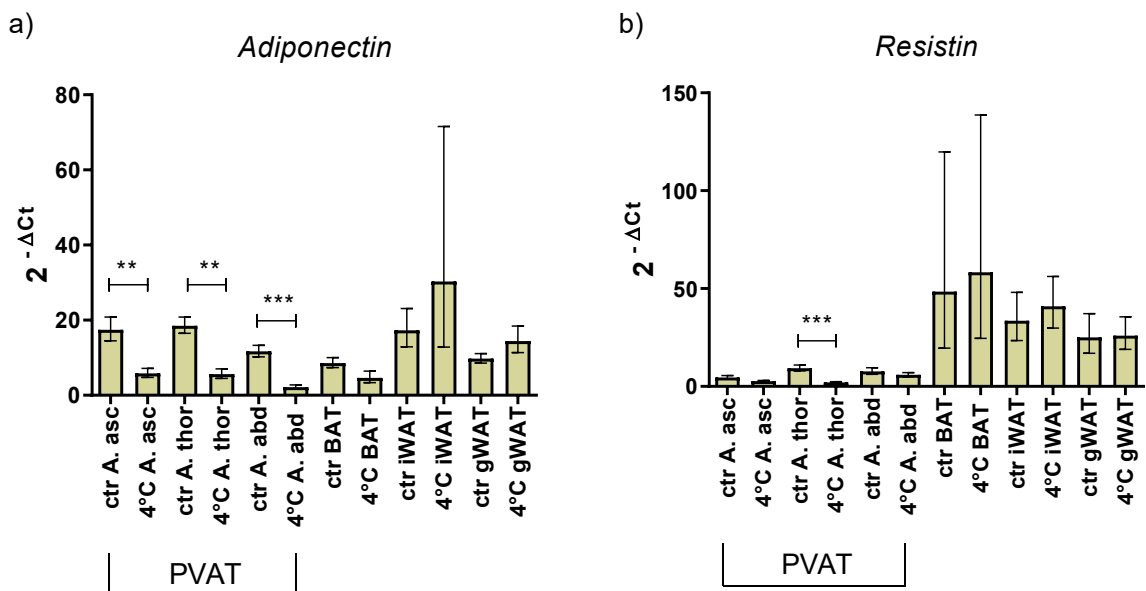


Abb. 18: Genexpression von a) Adiponectin und b) Resistin in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle/Kälteeexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert ±SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=6-12; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Vasoaktive Marker

Das Peptidhormon ET-1 hat eine höhere Genexpression in der Kälteexpositionsgruppe im PVAT-Depot der *A. ascendens* (ctr 0,057 +0,010/-0,008; 4 °C 0,165 +0,017/-0,016) und *A. thoracalis* (ctr 0,059 +0,006/-0,005; 4 °C 0,124 +0,011/-0,010) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem ergeben sich für PVAT der *A. ascendens* (4 °C 0,165 +0,017/-0,016) und *A. thoracalis* (4 °C 0,124 +0,011/-0,010) höhere ET-1 Expressionswerte als in PVAT der *A. abdominalis* (4 °C 0,052 +0,007/-0,006) nach Kälteexposition (Abb. 19).

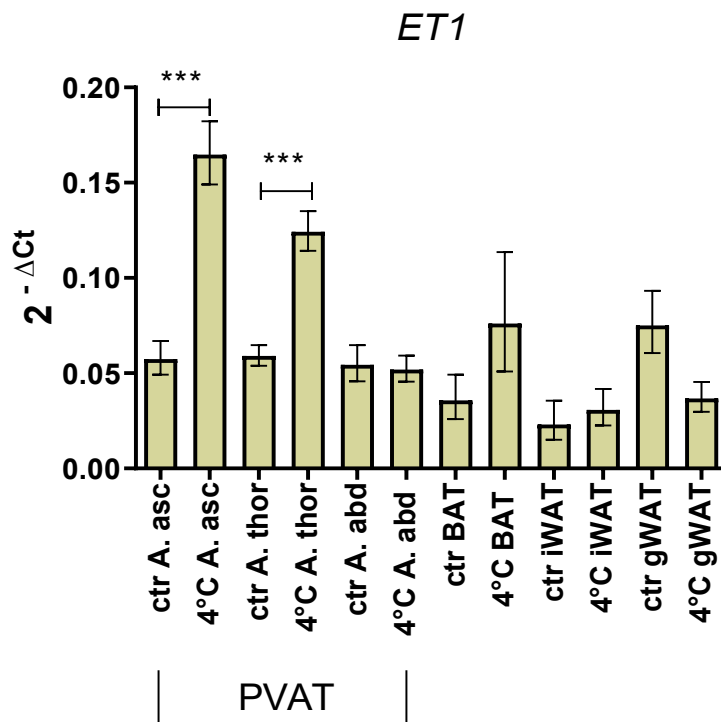


Abb. 19: Genexpression von ET-1 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle/Kälteexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=7-12; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Für eNOS ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Hier wurden nur PVAT-Depots analysiert, eine Analyse anderer Fettdepots erfolgte nicht (Abb. 20).

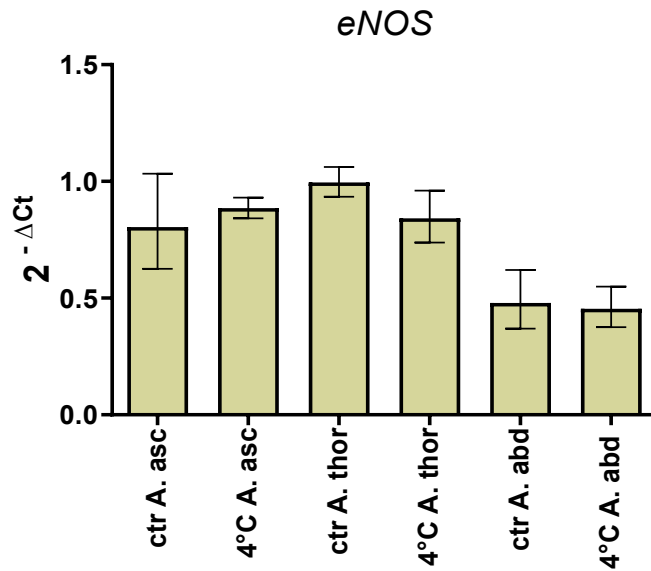


Abb. 20: Genexpression von eNOS in PVAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels multiplen t-Tests und der Holm-Sidak Methode, n=6-7; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

3.3 Thermoneutralitätskohorte

Für Mäuse ist Thermoneutralität bei 30 °C erreicht. Zur Überprüfung der morphologischen Eigenschaften von PVAT unter für die Maus thermoneutralen Bedingungen (Abb.21), sowie der Genexpression ausgewählter thermogener Marker (Abb. 22), wurden die Mäuse für eine Woche einer Temperatur von 30 °C ausgesetzt.

Histologie

Sowohl bei den PVAT-Depots als auch bei BAT erscheinen die Fettzellen unter Thermoneutralität in der HE-Färbung vergrößert im Vergleich zur Raumtemperatur-Kohorte. Hier liegt keine zusätzliche UCP-1 Färbung vor.

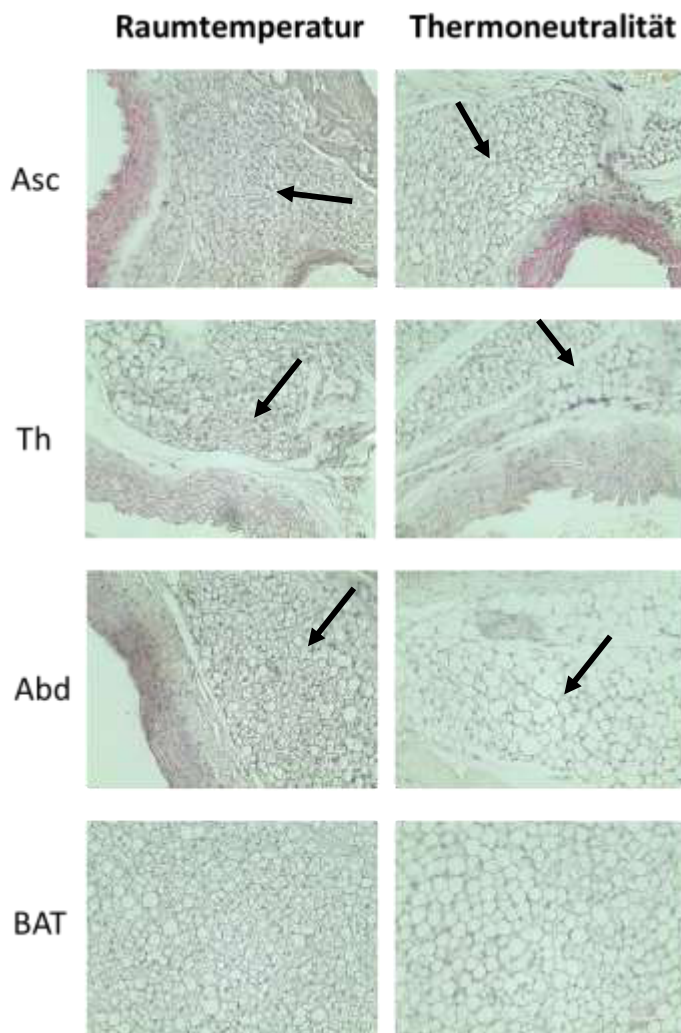


Abb. 21: HE-Färbung von PVAT im Vergleich zu BAT jeweils bei Raumtemperatur (Kontrolle) und 30 °C (Thermoneutralität); Vergrößerung 40x, Maßstab 100 µm, exemplarische Aufnahmen

Thermogene Marker

Die statistische Auswertung dieser Kohorten erfolgte mittels One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison-Test. Die Auswahl dieses Testes erfolgte, um alle Fettdepots miteinander vergleichen zu können unter neutralen thermischen Bedingungen, sodass ein Vergleich der jeweiligen Fettdepots unter Kontroll- und Expositionsbedingungen (mittels beispielsweise multiplen t-Tests) nicht ausreichend erschien.

In Abb. 22a sind die qPCR-Ergebnisse vom thermogenen Marker UCP-1 dargestellt. Es besteht ein signifikant höheres Expressionslevel in PVAT der *A. ascendens* (TN 5,666 +1,013/-0,859) und der *A. thoracalis* (TN 4,851 + 0,705/-0,615) jeweils verglichen mit PVAT der *A. abdominalis* (TN 0,363 +0,073/-0,061), iWAT (TN 0,167 +0,128/-0,072) und gWAT (TN 0,221 +0,057/-0,045) unter Thermoneutralität. Zudem weist BAT (TN 3,451+0,681/-0,569) unter thermoneutralen Bedingungen eine höhere UCP-1 Expression auf als PVAT der *A. abdominalis* (TN 0,363 +0,073/-0,061).

Ebenfalls ergibt sich für den thermogenen Marker Cidea (Abb. 22b) ein signifikant höheres Expressionslevel von PVAT der *A. ascendens* (TN 0,434+0,057/-0,051) sowie *A. thoracalis* (TN 0,305 + 0,251/-0,138) jeweils verglichen mit PVAT der *A. abdominalis* (TN 0,098 + 0,047/-0,032), iWAT (TN 0,029 + 0,004/-0,004) und gWAT (TN 0,006+ 0,003/-0,002) unter Thermoneutralität. In BAT ist (TN 0,763 + 0,043/-0,040) unter thermoneutralen Bedingungen eine höhere Cidea-Expression als in PVAT der *A. abdominalis* vorhanden.

Der mitochondriale Marker Cox2, dargestellt in Abb. 22c weist signifikant höhere Expressionslevel von PVAT der *A. ascendens* (TN 1046,481 +266,631/-212,491) und *A. thoracalis* (TN 799,512 + 597,173/-341,843) in der Thermoneutralitätskohorte auf, jeweils verglichen mit PVAT der *A. abdominalis* (TN 164,311 + 68,618/-48,404), iWAT (TN 955,707 + 130,562/-114,869) und gWAT (TN 250,168 + 56,090/-45,818). Das Fettgewebsdepot BAT (TN 2282,059 + 418,382/-353,561) weist für Cox2 ebenso ein signifikant höheres Expressionslevel unter thermoneutralen Bedingungen auf als PVAT der *A. abdominalis* (TN 164,311 + 68,618/-48,404).

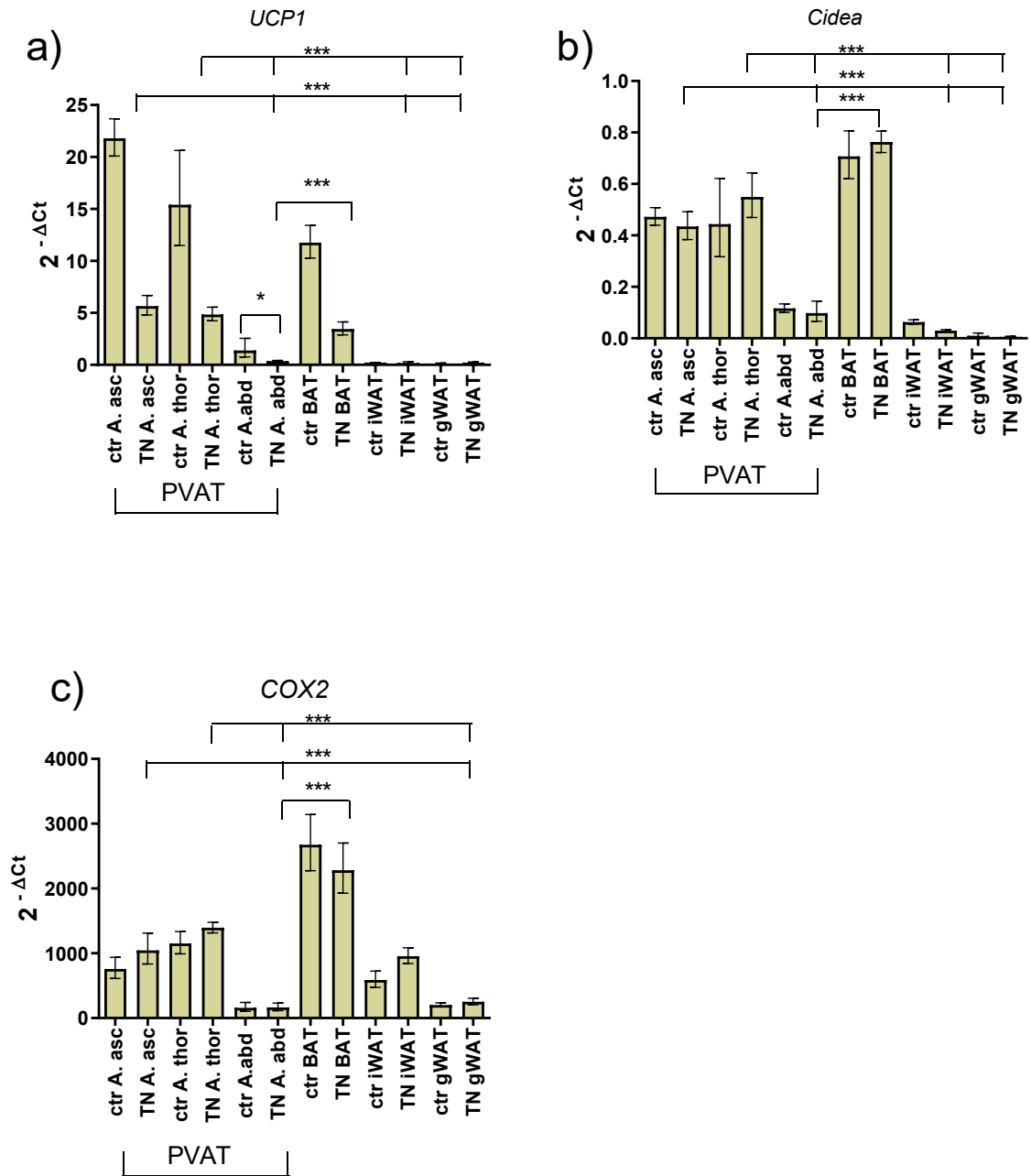


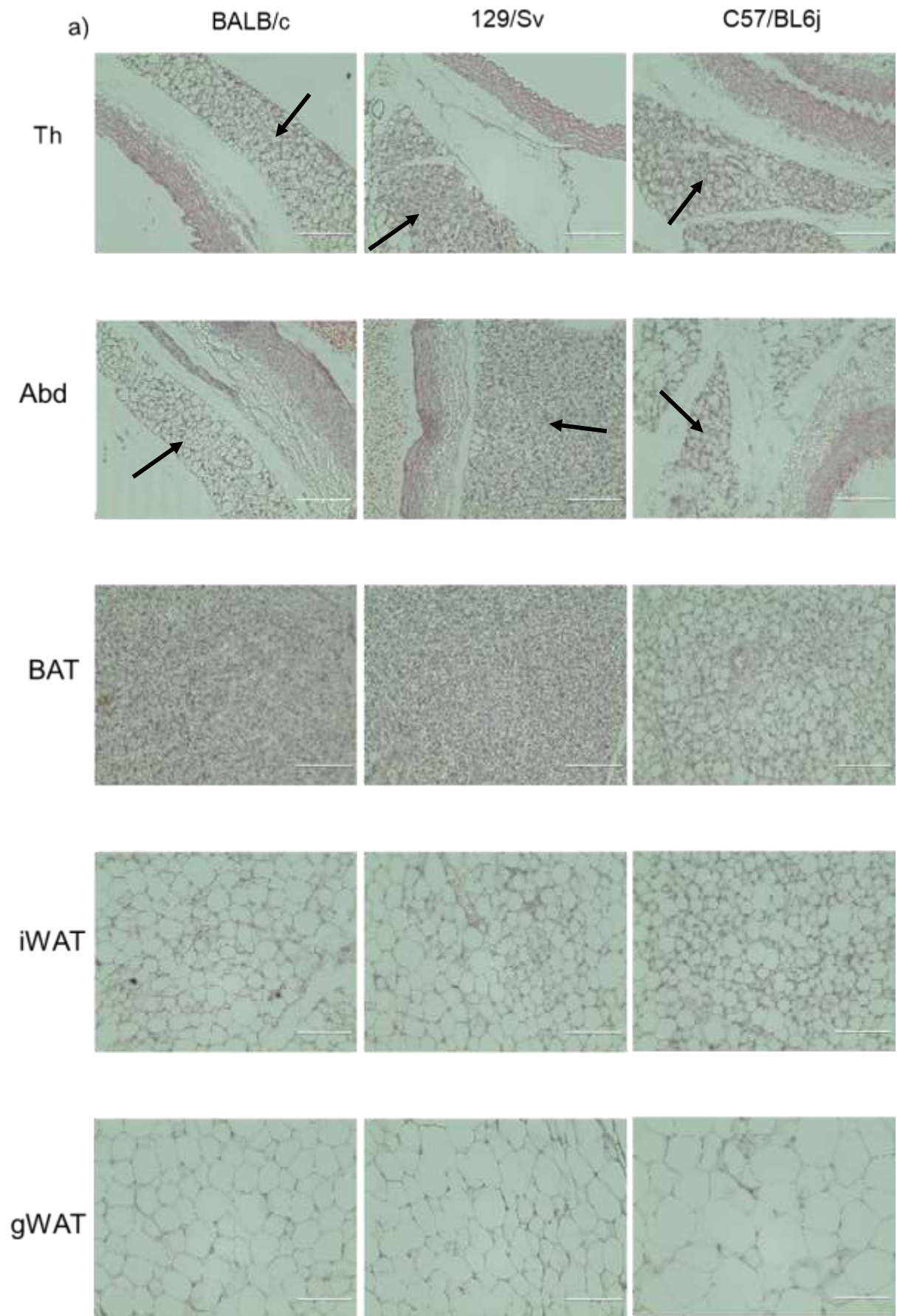
Abb. 22: Genexpression von UCP-1, b) Cidea c) Cox2 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT für die Kontrolle-/Thermoneutralitäts-Kohorten. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison Test, $n=4-5$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.4 Verschiedene Mauslinien

Zur weiteren Charakterisierung von PVAT und zur Überprüfung, ob die bereits genannten Eigenschaften von PVAT zufällig nur für C57/BL6j-Mäuse zutreffen oder ebenso für weitere Mauslinien, wurden die Fettgewebsdepots der verschiedenen Mauslinien C57/BL6j, 129/Sv und BALB/c hinsichtlich phänotypischer Erscheinung und thermogener Marker mittels qPCR untersucht.

Histologie

In Abb. 23a sind die verschiedenen Fettgewebsdepots in einer HE-Färbung dargestellt. PVAT ähnelt morphologisch BAT der dazugehörigen Mauslinie. Das gezeigte weiße Fettgewebe (iWAT und gWAT) beinhaltet hingegen große Fetttropfen, mit einem Zellkern, der an den Rand der Zelle gedrängt ist, was als Siegelringform bezeichnet wird. Zwischen den verschiedenen Mauslinien sind in der histologischen Untersuchung nur geringe Unterschiede zu erkennen. PVAT und BAT der 129/Sv-Mäuse haben etwas kleinere Fetttropfen als das PVAT der C57/BL6j-Mäuse. In der UCP-1 Antikörper Färbung (Abb. 23b) erscheint PVAT und BAT der 129/Sv-Mauslinie besonders braun verglichen mit den C57/BL6j- und BALB/c-Mäusen. Bezüglich der UCP-1 Färbung ist besonders der Vergleich von BAT und PVAT in dieser Arbeit von Interesse. In der UCP-1 Färbung von iWAT sind zwischen großen Fettzellen auch kleinere Fettzellen zu erkennen, allerdings ist die Anfärbbarkeit ausgesprochen gering. Dementsprechend ist bei gWAT ebenso von einer kaum erkennbaren Färbung auszugehen, weshalb hierauf verzichtet wurde. Hierzu passend ist die UCP-1 Expression für iWAT und gWAT in der qPCR ebenfalls sehr gering (siehe Abb. 24).



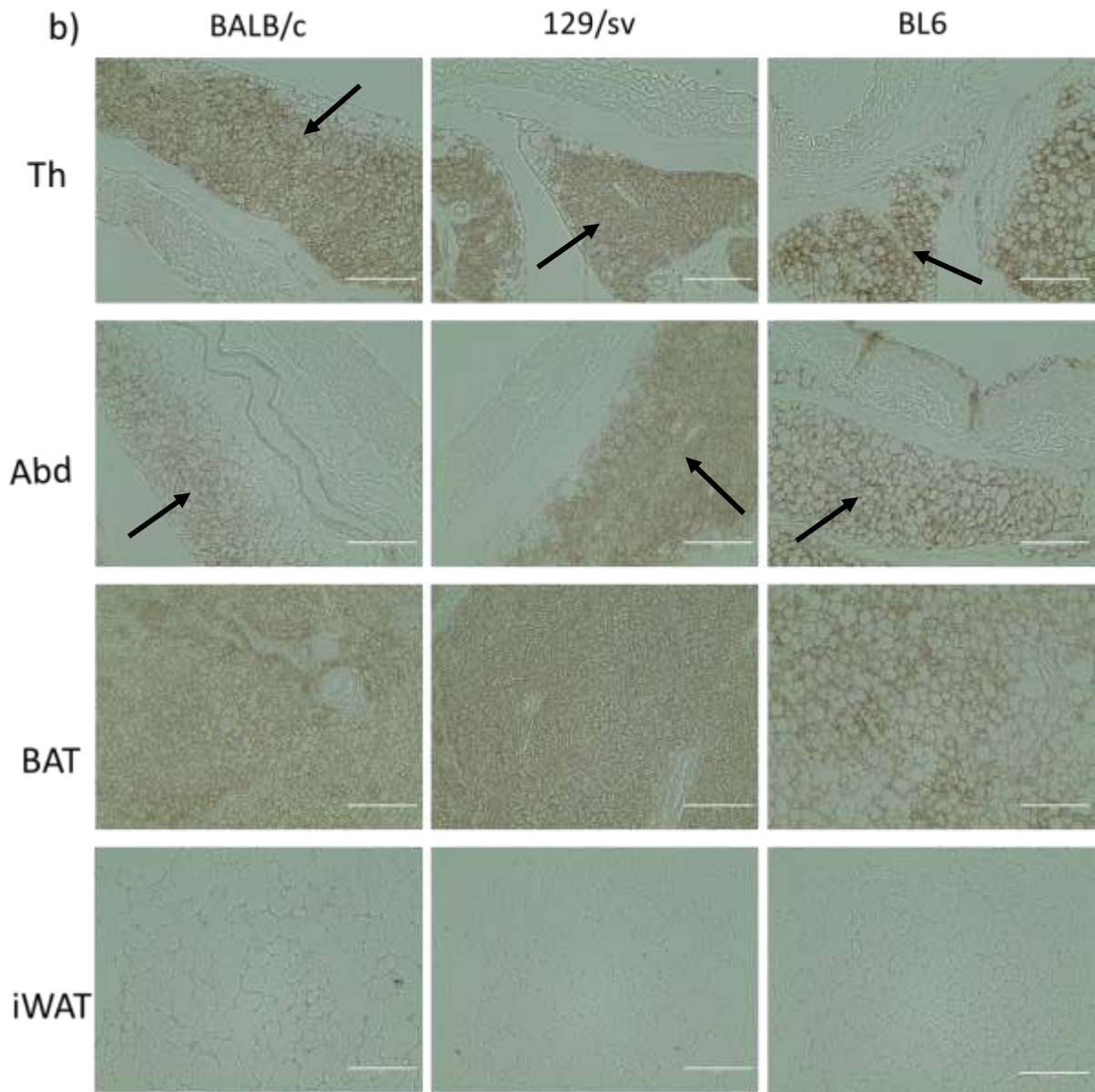


Abb. 23: a) HE Färbung und b) UCP-1-Antikörper Färbung von PVAT der A. thoracalis, A. abdominalis, BAT und bei a) zusätzlich gWAT von C57/BL6j-, 129/Sv- und BALB/c-Mäusen; Vergrößerung 40x, Maßstab 100 µm, exemplarische Aufnahmen

Thermogene Marker

Für jedes Fettdepot (PVAT der A. ascendens, PVAT der A. thoracalis, PVAT der A. abdominalis, BAT, iWAT, gWAT) wurden die drei verschiedenen Mauslinien mittels One-way ANOVA und Newmans-Keuls Multiple-Comparison Test statistisch verglichen.

In Abb. 24a zeigt sich beim Vergleich der UCP-1 Expression von PVAT der A. thoracalis ein signifikant höheres Expressionslevel der C57/BL6j-Mäuse (BL6 41,725, +15,399/-11,248) sowie der 129/Sv-Mäuse (129/Sv 38,900 +12,552/-9,490) im Vergleich zur UCP-1 Expression in thorakalem PVAT der BALB/c-Mäuse (BALB/c 10,810 + 13,630/- 8,573). Im abdominalen PVAT unterscheiden sich die UCP-1 Expressionslevel im PVAT der C57/BL6j-Mäuse (BL6 1,504 +0,787/-0,517) signifikant von den 129/Sv-Mäusen (129/Sv 13,809 +2,138/-1,851) und den BALB/c-Mäusen (BALB/c 4,651 +1,185/-0,944). Ebenso signifikant unterschiedliche Expressionslevel weisen PVAT der A. abdominalis der 129/Sv und BALB/c-Kohorten auf. In der 129/Sv-Kohorte findet sich verglichen mit den C57/BL6j- und BALB/c-Kohorten die höchste UCP-1 Expression, hingegen zeigt sich im PVAT der C57/BL6j-Kohorte das geringste Expressionslevel.

Für Cox2, dargestellt in Abb.24b, zeigt sich ein signifikant höheres Expressionslevel von PVAT der A. ascendens der 129/Sv-Kohorte (129/Sv 1753,749 +249,776/-218,636) als in PVAT der C57/BL6j-Kohorte (BL6 496,444 +264,375/-172,508). Ebenso ist die Cox2-Expression in PVAT der A. abdominalis bei den 129/Sv-Mäusen (129/Sv 475,403 +40,505/-37,325) höher als in der C57/BL6j-Gruppe (BL6 208,094 +24,933/-22,265).

In Abb. 24c zeigt sich in der qPCR für den Marker PGC1a beim thorakalen PVAT eine höhere Expression in der C57/BL6j-Kohorte (BL6 1,146 +0,499/-0,348) verglichen mit der 129/Sv- (129/Sv 0,472 +0,118/-0,094) und BALB/c-Kohorte (BALB/c 0,431 +0,110/-0,088).

Im abdominalen PVAT in der BALB/c-Kohorte (BALB/c 0,084 +0,029/-0,022) ist das Expressionslevel von PGC1a signifikant niedriger sowohl im Vergleich mit der C57/BL6j-Kohorte (BL6 0,221 +0,048/-0,040) als auch verglichen mit der 129/Sv-Kohorte (129/Sv 0,200 +0,035/-0,030).

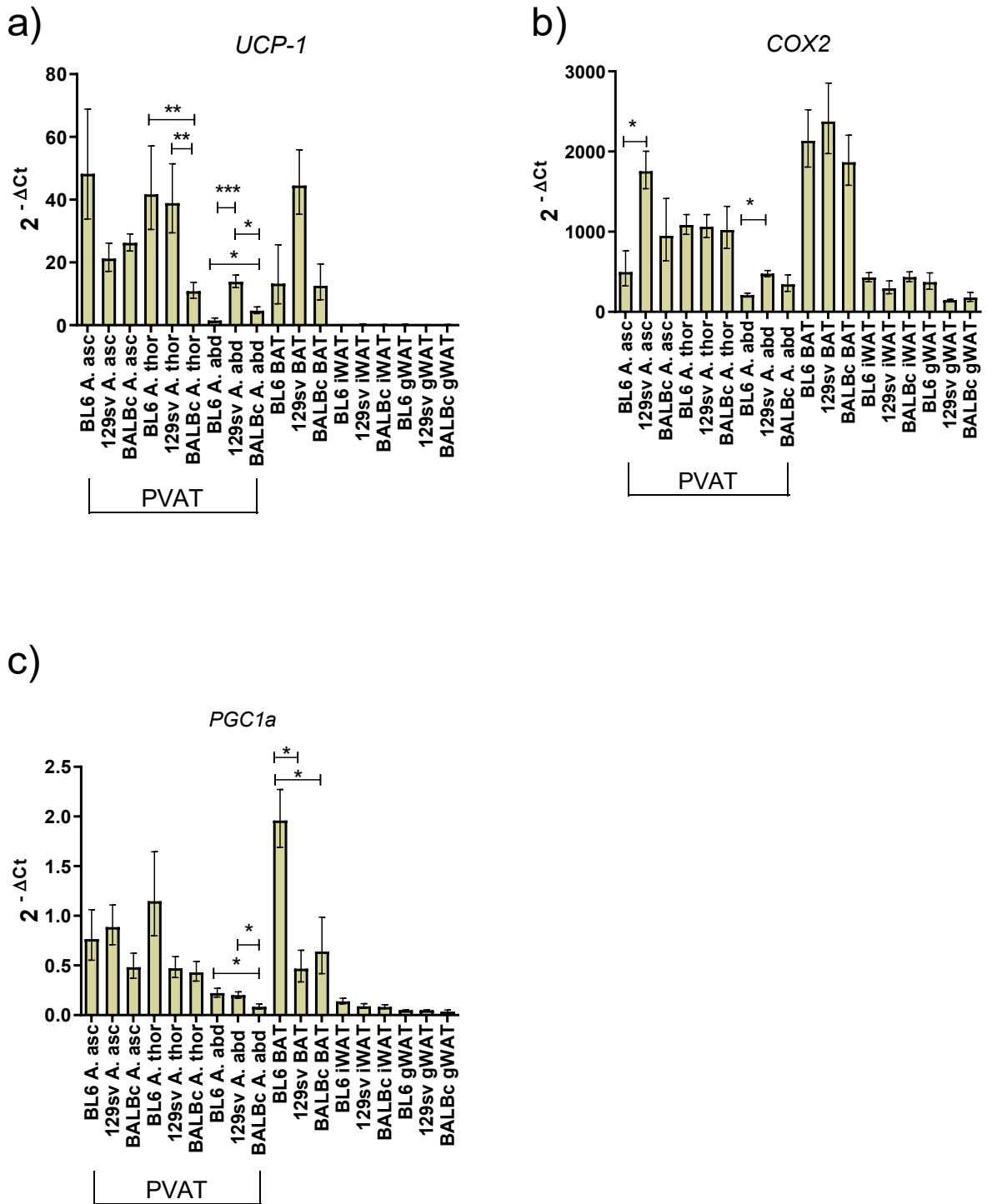


Abb. 24: Genexpression von a) UCP-1 b) Cox2 und c) PGC1a in PVAT, BAT, iWAT und gWAT von Mäusen der Linien C57/BL6j, 129/Sv und BALB/c. HPRT wurde als Haushaltsgen verwendet, die Ergebnisse werden in einem Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt, statistische Auswertung mittels One-Way ANOVA und Newman-Keuls Multiple-Comparison Test, n=3-7; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

4. Diskussion

In dieser Dissertation konnte demonstriert werden, dass PVAT sowohl morphologisch als auch im Hinblick auf die Expression „BAT-typischer“ thermogener Marker dem braunen Fettgewebe ähnlich ist und von klassischem weißem Fettgewebe abzugrenzen ist.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass PVAT (von Mäusen und Ratten) je nach Lokalisation BAT oder WAT ähnliche Charakteristika aufweist (Fitzgibbons et al., 2011; Gálvez-Prieto et al., 2008; Police et al., 2009). Thorakales PVAT ähnelt BAT sowohl morphologisch als auch in der Genexpression und es zeigte sich in einer Studie von Fitzgibbons et al. (2011), dass sich murines BAT und murines thorakales PVAT in lediglich 0,79 % der Gene unter Normaldiät signifikant voneinander unterscheiden. Analysen der Genexpression typischer thermogener Marker (z.B. UCP-1, Cidea) ergaben für BAT und PVAT keine signifikanten Unterschiede (siehe Erläuterungen auf S. 16). Darüber hinaus hat PVAT in Abgrenzung zu beigem Fettgewebe auch z.B. unter Abwesenheit eines Kältestimulus eine BAT-typische Morphologie (Fitzgibbons et al., 2011). In weiteren Microarray-Analysen zeigte sich ein dem BAT ähnliches Genexpressionsprofil, wobei thorakales PVAT höhere Expressionslevel von z.B. UCP-1 und PRDM16 aufwies als abdominelles PVAT (Tran et al., 2018). Eine qPCR-Analyse bestätigte eine höhere UCP-1 Expression in thorakalem PVAT als in abdominellem PVAT (Tran et al., 2018).

Unterschiede zwischen den verschiedenen PVAT-Depots konnten auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, sodass unter thermoneutralen Bedingungen PVAT der A. abdominalis signifikant geringere Expressionslevel thermogener Marker wie UCP-1, COX2 und Cidea aufwies verglichen mit BAT (Abb. 22).

In früheren Studien wurde humanem abdominellem PVAT ein eher weißer Phänotyp zugesprochen (Chatterjee et al., 2009; Omar et al. 2014) ebenso abdominellen PVAT von Ratten (Padilla et al., 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass murines PVAT morphologisch eher ein multilokuläres Erscheinungsbild besitzt, welches sich ebenso in Untersuchungen verschiedener Mauslinien (C57/BL6j, 129sv und BALB/c) darstellen ließ, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung (Abb. 23). Hier fiel besonders auf, dass PVAT der A. abdominalis von BALB/c-Mäusen signifikant geringere Expressionswerte für UCP-1 und PGC1a als PVAT von 129/sv und BL6-

Mäusen aufwies (Abb. 24). Dies zeigte sich auch in der UCP-1 Antikörper-Färbung, PVAT der A. abdominalis von BALB/c Mäusen erschien weniger braun angefärbt und zeigte größere Fetttropfen (Abb. 23).

Die Expression von WAT-typischen Genen sowie die Expression von Adipokinen wie Resistin ist in abdominellem PVAT höher als in thorakalem PVAT (Tran et al., 2018).

Zu beachten ist, dass nicht nur die Lokalisation von PVAT, sondern auch das Alter der Mäuse die Morphologie des Fettgewebes zu beeinflussen scheint (Padilla et al. 2013). In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die BAT-Masse und Aktivität mit zunehmendem Alter auch beim Menschen abnimmt (Pfannenberger et al., 2010).

Da in dieser Arbeit vor allem junge Mäuse (8-20 Wochen) untersucht wurden, könnte dies eine mögliche Erklärung für das multilokuläre, allerdings unterschiedlich ausgeprägte Erscheinungsbild von abdominellem PVAT unter verschiedenen Bedingungen bieten. In der Kontrollgruppe zur HFD waren die Mäuse bei der Gewebepreparation bereits 20 Wochen alt, hier zeigt sich in den histologischen Untersuchungen PVAT der A. abdominalis phänotypisch weniger klassischem BAT entsprechend (siehe Abb. 6). Zusätzlich ergeben sich in den PVAT-Depots der Normaldiät-Kohorten (Mäuse 20 Wochen alt) signifikant niedrigere UCP-1 Expressionswerte als in BAT der Normaldiät-Kohorte.

Die Kontrollgruppen in der Kälteexpositionskohorte zeigten diese signifikanten Unterschiede jedoch nicht (Mäuse 9-10 Wochen alt).

Dieser Effekt konnte in anderen Studien ebenso aufgezeigt werden, so wiesen ältere Mäuse nach Kälteexposition weniger „Browning“ in PVAT auf (Pan et al., 2018).

HFD

Nach HFD kommt es in klassischem BAT zu sogenanntem „Whitening“, was bedeutet, dass sich die Fetttropfen vergrößern und morphologisch dem Aussehen von weißen Adipozyten angleichen. In histologischen Untersuchungen von PVAT von Ratten wurde allerdings eine Zunahme der Zahl an Fettzellen mit großen Fetttropfen im abdominalen PVAT nach Hochfettdiät beobachtet (Sasoh et al., 2021). In weiteren Studien an Ratten konnte nach einer kurzzeitigen HFD (für 72h) eine Reduktion der

Genexpression thermogener Gene wie PRDM16 und Iodthyronin-Deiodinase Typ 2 (Dio2) in PVAT nachgewiesen werden. Die Genexpression von PGC1a, Cidea und FGF21 blieben sowohl in PVAT als auch in BAT unverändert. In derselben Studie konnte ebenso gezeigt werden, dass thermogene Marker in PVAT mehr Veränderungen nach 72h HFD aufwiesen als in BAT (Aldiss et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit konnte ein gegenteiliger Effekt nachgewiesen werden: In PVAT aller drei untersuchten Fettdepots kam es nach HFD zu einem Prozess der als „Browning“ bezeichnet wird. In den Fettzellen sind viele kleine multilokuläre Fetttropfen entstanden und in der UCP-1 Antikörper-Färbung erschien PVAT brauner als in der Kontrollgruppe (Abb. 6). Auch die thermogenen Marker UCP-1, Cox2, ND5 und FGF21 waren nach 12 Wochen HFD in PVAT der *A. thoracalis* signifikant erhöht, verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 7-10). Auch in PVAT der *A. abdominalis* war ein signifikanter Unterschied für ND5 (Abb. 9a) und FGF21 (Abb. 10) in der qPCR-Analyse nachweisbar.

Shimizu et al. stellten die Hypothese auf, dass es durch Adipositas, provoziert durch 8 Wochen HFHS Diät, zu „Whitening“ durch mitochondrialen Verlust und Dysfunktion in BAT kommt, was sowohl morphologisch sichtbar war, also auch durch die Reduktion der mitochondrialen Gene ND5 und *Ndufa* in BAT bestätigt wurde (Shimizu et al., 2014).

Eine signifikante Reduktion dieser Gene in BAT konnte nach 12 Wochen HFD in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, in PVAT der *A. thoracalis* und *A. abdominalis* kam es zur Expressionssteigerung von ND5. Es handelt sich hierbei um mitochondriale Proteine, sodass dies eventuell ein Hinweis auf eine höhere Mitochondrienanzahl bzw. eine Steigerung des Mitochondriengehalts in PVAT verglichen mit BAT nach HFD hinweisen könnte. Interessant erscheint in diesem Kontext ein Review von Fromme und Klingenspor (2011). Hier wurde der Effekt von HFD auf die UCP-1 Produktion (mRNA- oder Proteingehalt) in klassischem BAT von verschiedenen Mauslinien und Ratten untersucht. Hier gab es sowohl Studien die eine Hochregulation, eine Runterregulation sowie Arbeiten, die keinen Unterschied für UCP-1-Expression nach HFD, zeigten. Insgesamt variierten die Ergebnisse in diesen zusammengefassten Studien stark. Dabei ergab sich eine schwierige Vergleichbarkeit durch z.B. die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen wie verschiedene Mauslinien, den Fettgehalt der eingesetzten Diäten und die Temperatur, bei welcher die Mäuse gehalten wurden, wobei es unklar blieb, welcher dieser Faktoren die unterschiedlichen

Ergebnisse ausmachte (Fromme und Klingenspor, 2011). Ebenso unterscheiden sich die Ergebnisse der o.g. verschiedenen Studien und dieser Doktorarbeit bezüglich des Effektes der HFD auf die Genexpression thermogener Marker in PVAT.

Kälteexposition

Es ist allgemein bekannt, dass ein Kältereiz zur Aktivierung und Rekrutierung von BAT führt und außerdem in weißem Fettgewebe einen Prozess auslöst, der als „Browning“ bezeichnet wird. So wandeln sich weiße Adipozyten in beige Adipozyten um (Cousin et al., 1992; Lo und Sun, 2013; Rosenwald et al., 2013).

In Studien an Frettchen konnte gezeigt werden, dass auch thorakales PVAT eine hohe Kapazität für „Browning“ durch Kälteexposition besitzt (Reynés et al., 2019). Dieser Effekt konnte ebenso bei Mäusen nachgewiesen werden, so zeigte sich nach einwöchiger Kälteexposition eine Erhöhung thermogener Marker wie UCP-1 in aortalem PVAT verglichen mit Mäusen unter Thermoneutralität (30°C) (Angueira et al., 2021). Nach einwöchiger Kälteexposition kam es in den im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten drei PVAT-Depots ebenso zu einer Steigerung der Expression des typischen BAT Markers UCP-1 (Abb.15) und auch morphologisch zu einer Bräunung von PVAT in der UCP-1 Antikörper-Färbung (Abb.14). Auch in BAT und iWAT waren die Expressionslevel von UCP-1 nach Kälteexposition erhöht, verglichen mit der Kontrolle bei Raumtemperatur (Abb.15). Bereits in früheren Studien konnte demonstriert werden, dass Mitochondrien, isoliert aus iWAT, durch Kälteexposition nahezu die gleichen UCP-1-Level wie in Mitochondrien des klassischen, interskapulären BAT erreichten, sodass iWAT nach Kälteexposition als „brite“ oder als beiges Fett bezeichnet werden kann. Auch in den wenigen vorhandenen Mitochondrien des nicht stimulierten Gewebes war UCP-1 nachweisbar, sodass man von einer Steigerung bereits existenter Zellen ausging, welche durch Kälte rekrutiert werden können (Shabalina et al. 2013). Es bleibt ungeklärt, ob es sich bei den oben genannten Effekten um einen kurzfristigen, reversiblen Effekt handelt, da die Kälteexposition lediglich 7 Tage dauerte und im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Folgeuntersuchungen stattfanden.

Mauslinien

Es wurden die PVAT Depots verschiedener Mauslinien bezüglich der phänotypischen Erscheinung sowie der Expression einiger klassischer thermogener Marker untersucht. In vorausgehenden Publikationen konnte gezeigt werden, dass iWAT und interskapuläres BAT von den als Adipositas-resistent geltenden 129/Sv-Mäusen „brauner“ aussieht als von C57/BL6-Mäusen (Shabalina et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden: Auch PVAT der 129/Sv-Mäuse erscheint in der UCP-1 Antikörper Färbung braun und besteht aus multilokulären Fettzellen, es erscheint brauner als PVAT der C57/BL6j- und BALB/c-Mäuse und die Fettzellen erscheinen kleiner (Abb. 23). In den qPCR-Analysen ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen den drei Mauslinien, sodass PVAT der 129/Sv- und C57/BL6j-Mäuse teilweise eine höhere Expression thermogener Marker als BALB/c-Mäuse aufwiesen. Die Unterschiede zwischen C57/BL6- und 129/Sv-Mäusen konnten nur teilweise quantifiziert werden (Abb. 24). Insgesamt gibt dies einen Hinweis darauf, dass PVAT je nach Mauslinie unterschiedliche thermogene Eigenschaften besitzt, wie es auch für andere Fettdepots zuvor bereits beobachtet wurde.

Inflammation

PVAT hat eine besondere Bedeutung für das Herz-Kreislauf-System aufgrund seiner direkten anatomischen Nähe zu den Gefäßen. In PVAT werden zahlreiche Botenstoffe gebildet und ausgeschüttet, welche unter anderem den Gefäßtonus beeinflussen können und somit an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein könnten (Brown et al., 2014). „Browning“ von PVAT wird mit einer Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils assoziiert (Aldiss et al., 2017; Villarroya et al., 2018; Xiong et al., 2017), so führte beispielsweise Kälteexposition in Studien an Frettchen zu einer Abnahme pro-inflammatorischer Marker in PVAT (Reynés et al., 2017). Bei einer durch Diät induzierten Adipositas kommt es in PVAT im Mausmodell zu einer geringeren Expression von anti-inflammatorischen Markern wie Adiponektin und IL-10 und einer Steigerung von pro-inflammatorischen Botenstoffen wie TNF α , IL1 β , MCP-1 und Markern für Makrophagen z.B. F4/80 (Xia et al., 2016). Dieser Effekt konnte ebenfalls in histologischen Untersuchungen an PVAT von Ratten nachgewiesen

werden. Nach Hochfettdiät zeigte sich hier eine erhöhte Makrophagen-Infiltration sowie erhöhte MCP-1-Level in abdominellem PVAT (Sasoh et al., 2021). Abdominellem PVAT wird außerdem ein eher pro-inflammatorischer Phänotyp zugeschrieben, sodass die Expression von inflammatorischen Genen z.B. Leptin, TNF- α , MCP-1, IL-6 und Markern für Immuneinfiltration in thorakalem PVAT geringer ausfiel als in abdominellem PVAT (Padilla et al., 2013). Auch in Untersuchungen von menschlichen Gewebeproben von Patienten mit Erkrankungen der Koronargefäße, zeigte sich im PVAT eine Hochregulation von proatherogenen Mediatoren (Mazzotta et al., 2021), sodass dysfunktionales PVAT im Zusammenhang mit Adipositas eine mögliche Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen im Sinne der „outside-in“ Theorie (Maiellaro und Taylor, 2007) spielen könnte.

Gefäßtonus

In mehreren Studien konnte eine Beteiligung von PVAT am Gefäßtonus nachgewiesen werden, so wird PVAT unter physiologischen Bedingungen ein anti-kontraktiler Effekt zugeschrieben (Barp et al., 2021; Soltis und Cassis et al., 1991). In PVAT wird ebenso wie im Endothelium vasodilatatorisch wirkendes Stickstoffmonoxid (NO) produziert (Chang et al. 2012), sodass auch eine Isoform der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in PVAT nachgewiesen werden konnte (Araujo et al., 2015; Nava und Llorens, 2019; Victorio et al., 2016; Xia et al., 2016). Hierbei unterscheidet sich die eNOS Genexpression im PVAT je nach Lokalisation (thorakal oder abdominal), allerdings nicht die eNOS Expression des Endotheliums. In Versuchsreihen mit Ratten zeigte sich ein antikontraktiler Effekt, also eine geringere Kontraktion als Antwort auf Phenylephrin, sowohl mit als auch ohne Endothelium, in thorakalem PVAT (Victorio et al., 2016). Darüber hinaus zeigte sich in Studien von Xia et al. 2016 nach 20 Wochen HFD im Mausmodell (C57BL/6J) unter Abwesenheit von PVAT kein Unterschied in der NO-abhängigen Vasodilatation der Aorta im Myograph. Unter Anwesenheit von PVAT zeigte sich jedoch eine geringere Vasodilatation in der HFD Kohorte. Auch die NO-Produktion mit und ohne Acetylcholin als Stimulus war in der HFD Gruppe geringer. In immunhistochemischen Analysen sowie in mRNA- und Protein-Analysen ergaben sich jedoch keine Unterschiede der eNOS Produktion zwischen der HFD- und ND-Gruppen, lediglich Unterschiede in der Phosphorylierung (Xia et al., 2016).

Auch in dieser Arbeit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der eNOS Expression von PVAT zwischen HFD- und ND-Kohorten nach 12 Wochen HFD (Abb.13), ebenso konnten keine Expressionsunterschiede nach Kälteexposition für eNOS nachgewiesen werden (Abb. 20).

Endothelin-1 ist ein starker Vasokonstriktor und wird vom Endothelium, aber auch von anderen Geweben produziert (Yanagisawa et al., 1988) und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose (Anggrahini et al., 2009; Li et al., 2013). Eine ET-1 Überexpression führt zu oxidativem Stress, Immuneinfiltration, Erniedrigung von HDL und geht daraus resultierend mit der Progression von Arteriosklerose und abdominalen Aortenaneurysmbildung einher (Li et al., 2013). ET-1 ist auch in PVAT nachweisbar. Die Expression in PVAT der A. ascendens und A. thoracalis war nach Kälteexposition (Abb. 19) sowie in der HFD-Kohorte in PVAT der A. thoracalis signifikant erhöht im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Hierbei bleibt unklar, ob sich die Expressionssteigerung von ET-1 in PVAT tatsächlich auf die Gefäßkontraktilität auswirkt.

Adipokine

Adiponectin wird von Fettzellen ausgeschüttet und gilt im Allgemeinen als vaskuloprotektiv (Antonopoulos et al., 2015; Xita und Tsatsoulis, 2012). Es besitzt darüber hinaus vasodilatatorische Eigenschaften (Fésüs et al., 2007) und beeinflusst die Insulin-Sensitivität (Kadowaki und Yamauchi, 2005). Durch Übergewicht kommt es beim Menschen zu sinkenden Plasmaspiegeln von Adiponectin, was z.B. mit ischämischen Herzerkrankungen assoziiert ist (Matsuda et al., 2002).

In den durchgeführten Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation kam es nach 12 Wochen HFD in PVAT zu keiner signifikanten Reduktion der Adiponectin-Expression im Vergleich zur ND-Kohorte (Abb. 11). Kälteexposition führte jedoch zu einer Reduktion der Adiponectin-Expression in allen drei untersuchten PVAT-Depots (Abb. 18), sodass offen bleibt, ob Kälteexposition trotz Reduktion einiger proinflammatorischer Zytokine (Reynés et al., 2017) tatsächlich rein vaskuloprotektiv wirkt.

Ein weiteres Adipokin ist Resistin, welches an VSMC-Proliferation und daraus resultierender Restenose arterieller Läsionen beteiligt ist (Panda et al., 1997; Park et al., 2014; Shimizu et al., 2004) und somit mit negativen Effekten auf die Gefäßgesundheit verbunden ist. Interessanterweise war sowohl nach HFD (Abb. 11) als auch nach Kälteexposition (Abb. 18) die Resistin-Expression in PVAT der A. thoracalis im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant reduziert. Diese gleichartigen Effekte bei beiden Untersuchungskonditionen scheinen interessant im Hinblick darauf zu sein, dass sowohl die Kälteexposition als auch HFD zu „Browning“ in PVAT geführt haben. Ob und in welcher Form ein Zusammenhang zwischen „Browning“ von PVAT und der Expression von Resistin besteht bleibt unklar. Allgemein wird „Browning“ von PVAT aber mit einer Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils assoziiert (Aldiss et al., 2017; Villarroya et al., 2018; Xiong et al., 2017).

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PVAT der *A. ascendens thoracalis*, *A. descendens thoracalis* und *A. abdominalis* unter verschiedenen Konditionen sowie in verschiedenen Mauslinien einen BAT-ähnlichen Phänotyp besitzt und wurde somit als braunes Fettgewebe charakterisiert. Dennoch scheint es zwischen diesen drei PVAT Depots Unterschiede sowohl morphologisch als auch bezüglich der thermogenen Eigenschaften zu geben.

Sowohl nach Kälteexposition als auch nach HFD kommt es in PVAT zu einem Vorgang der als „Browning“ bezeichnet wird. In mehreren Studien ist man zuvor davon ausgegangen, dass es durch HFD zu keinen Veränderungen in PVAT kommt oder sogar der gegenteilige Effekt, ein sogenanntes „Whitening“, stattfindet. Mögliche Erklärungen für diesen festgestellten Unterschied zu vorausgehenden Studien, wären das Alter der Versuchstiere oder die verschiedene Gewebeherkunft (z.B. verschiedene Mauslinien), sowie die verwendeten Diäten (HFD, HFHS) und deren Dauer, sodass es hier weiterführender Untersuchungen und genauerer Differenzierung erfordert.

Was diese Ergebnisse im Hinblick auf den Gefäßtonus und das inflammatorische Profil von PVAT im Zusammenhang mit Adipositas und weiteren assoziierten Erkrankungen wie kardiovaskulären Erkrankungen bedeutet, bedarf weiterer ausgiebiger Analysen und bleibt in der vorliegenden Arbeit unbeantwortet.

Zusammenfassend werden von PVAT zahlreiche Botenstoffe ausgeschüttet, die das Potential besitzen, die Gefäße und somit auch die Gefäßgesundheit sowohl günstig als auch ungünstig zu beeinflussen. PVAT scheint an menschlichem Gewebe kaum erforscht zu sein, sodass die Übertragbarkeit der Eigenschaften von PVAT des Mausmodells auf den Menschen weiterer Forschung bedarf.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Abbildung der Entstehung von Arteriosklerose	10
Abb. 2:	Morphologie der verschiedenen Fettgewebsarten	14
Abb. 3:	Vereinfachte Darstellung der Fettgewebsdepots im Mausmodell	15
Abb. 4:	Exemplarisches PVAT von der Aorta ascendens und der Aorta thoracalis	20
Abb. 5:	Gewicht der Mäuse für die ND- und HFD-Kohorten	28
Abb. 6:	HE-Färbung und UCP-1-Antikörper Färbung von PVAT (ND- und HFD-Kohorten)	29-30
Abb. 7:	Genexpression von UCP-1 in PVAT, BAT, iWAT, gWAT der ND/HFD-Kohorten	31
Abb. 8:	Genexpression von Cox2 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der ND/HFD-Kohorten	32
Abb. 9:	Genexpression von a) ND5 und b) Ndufa in PVAT und BAT der ND/HFD-Kohorten	33
Abb. 10:	Genexpression von FGF21 in PVAT der ND/HFD-Kohorten	34
Abb. 11:	Genexpression von a) Adiponectin und b) Resistin in PVAT der ND/HFD-Kohorten	35
Abb. 12:	Genexpression von ET-1 in BAT, iWAT und gWAT der ND/HFD-Kohorten	36
Abb. 13:	Genexpression von eNOS in PVAT der ND/HFD-Kohorten	37
Abb. 14:	HE-Färbung sowie UCP-1 Antikörper-Färbung von thorakalem und abdominalem PVAT im Vergleich zu BAT (Kälteexposition/Kontrollgruppe)	38-39
Abb. 15:	Genexpression von UCP-1 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten	40
Abb. 16:	Genexpression von Cox2 in PVAT,BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten	41
Abb. 17:	Genexpression von a) PCG1a und b) FGF21 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten	42
Abb. 18:	Genexpression von a) Adiponectin und b) Resistin in PVAT,BAT, iWAT und gWAT der Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten	43

- Abb. 19: Genexpression von ET-1 in PVAT, BAT, iWAT und gWAT der 44
Kontrolle-/Kälteexpositions-Kohorten
- Abb. 20: Genexpression von eNOS in PVAT der 45
Kontrolle/Kälteexpositions-Kohorten
- Abb. 21: HE-Färbung von PVAT im Vergleich zu BAT jeweils bei 23°C 46
(Kontrolle) und 30°C (Thermoneutralität)
- Abb. 22: Genexpression von a) UCP-1, b) Cidea c) Cox2 in PVAT, BAT, 48
iWAT und gWAT für die Raumtemperatur-/Thermoneutralitäts-
Kohorten
- Abb. 23: a) HE Färbung und b) UCP-1-Antikörper Färbung von PVAT der 50-51
Aorta thoracalis, Aorta abdominalis, BAT, iWAT, gWAT von BL6,
129sv und BALB/c Mäusen
- Abb. 24: Genexpression von a) UCP-1 b) Cox2 und c) PGC1a in PVAT, 53
BAT, iWAT und gWAT von Mäusen der Linien C57/BL6j, 129/Sv
und BALB/c

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Substanzen zur RNA Isolation, cDNA Herstellung und qPCR	22
Tab. 2:	QPCR Primer (ABi)	23
Tab. 3	QPCR Primer (Mayer)	24
Tab. 4:	Verwendete Substanzen für die Histologie	26
Tab. 5:	Geräte/Laboraausstattung	27

8. Literaturverzeichnis

Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A et al.. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 2017; 377 (1): 13–27

Aldiss P, Davies G, Woods R, Budge H, Sacks HS, Symonds ME. 'Browning' the cardiac and peri-vascular adipose tissues to modulate cardiovascular risk. *Int J Cardiol.* 2017; 228: 265–274

Aldiss P, Symonds ME, Lewis JE, Boocock DJ, Miles AK, Bloor I, Ebling F, Budge H. Interscapular and Perivascular Brown Adipose Tissue Respond Differently to a Short-Term High-Fat Diet. *Nutrients* 2019; 11 (5):1065

Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N et al.. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovasc. Res.* 2009; 82 (1): 143–151

Angueira AR, Sakers AP, Holman CD, Cheng L, Arbocco MN, Shamsi F, Lynes MD, Shrestha R, Okada C, Batmanov K, Susztak K, Tseng YH, Liaw L, Seale P.. Defining the lineage of thermogenic perivascular adipose tissue. *Nat Metab.* 2021; 3 (4): 469-484

Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shirodaria C, Psarros C, Herdman L et al.. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall. The regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes* 2015; 64 (6): 2207–2219

Araujo HN, Valgas da Silva CP, Sponton AC, Clerici SP, Davel AP, Antunes E et al.. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life Sci.* 2015; 125: 79–87

Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL et al.. Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* 2006; 296 (1): 164–176

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR et al.. PPAR γ Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development. *Mol Cell.* 1999; 4 (4): 585–595

Barbera MJ, Schluter A, Pedraza N, Iglesias R, Villarroya F, Giralt M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell. *J Biol Chem.* 2001; 276 (2): 1486-1493

Barp CG, Bonaventura D, Assreuy J. NO, ROS, RAS, and PVAT: More Than a Soup of Letters. *Front Physiol.* 2021; 12: 640021

Britton KA, Fox CS. Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clin Lipidol.* 2011; 6 (1): 79–91

Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT et al.. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease. A review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (8): 1621–1630

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue. Function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84 (1): 277–359

Chang L, Villacorta L, Li R, Hamblin M, Xu W, Dou C et al.. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation* 2012; 126 (9): 1067–1078

Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson AI, Blomkalns AL, Idelman G et al.. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. Influence of high-fat feeding. *Circ Res.* 2009; 104 (4): 541–549

Chen Y, Pan R, Pfeifer A. Fat tissues, the brite and the dark sides. *Pflugers Arch.* 2016; 468 (11-12): 1803–1807

Chen Y, Pan R, Pfeifer A. Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacol Ther.* 2017; 170: 1–7

Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ et al.. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 2014; 156 (1-2): 304–316

Cousin B, Cinti S, Morrioni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, Casteilla L. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue. Molecular and morphological characterization. *Cell Sci.* 1992; 103 (Pt 4): 931–942

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009; 360 (15): 1509–1517

Czech, MP, Richardson DK, Smith CJ. Biochemical basis of fat cell insulin resistance in obese rodents and man. *Metabolism* 1977; 26 (9): 1057–1078

Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*. 2007; 27: 79–101

Fésüs G, Dubrovská G, Gorzelnik K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007; 75 (4): 719–727

Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, Wu J, Kharitonkov A, Flier JS, Maratos-Flier E, Spiegelman BM. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*. 2012; 26 (3): 271–281

Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301 (4): H1425–1437

Fromme T, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300 (1): R1–8

Gálvez B, Castro J, Herold D, Dubrovská G, Arribas S, González MC et al.. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26 (6): 1297–1302

Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, Las Heras AI de, Merino B, Arribas S et al.. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol*. 2008; 197 (1): 55–64

Guerre-Millo M.: Adipose tissue hormones. *Endocrinol Invest*. 2002; 25 (10): 855–861.

Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A et al.. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* 2014; 516 (7531): 395–399

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009; 6 (1): 27–35

- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech M P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9 (5): 367–377
- Harms M, Seale P. Brown and beige fat. Development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013; 19 (10): 1252–1263
- Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat.* 1972; 112 (Pt 1): 35–39
- Hillock-Watling C, Gotlieb AI. The pathobiology of perivascular adipose tissue (PVAT), the fourth layer of the blood vessel wall. *Cardiovasc Pathol.* 2022; 61: 107459
- Hildebrand S, Stümer J, Pfeifer A. PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. *Front Physiol* 2018; 9: 70
- Hondares E, Rosell M, Díaz-Delfín J, Olmosn Y, Monsalve M, Iglesias R et al.. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) induces PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat. Involvement of PRDM16. *J Biol Chem.* 2011; 286 (50): 43112–43122
- Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3: S53-S55
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444 (7121): 860–867
- Hudak CS, Sul HS. Pref-1, a gatekeeper of adipogenesis. *Front Endocrinol.* 2013; 4: 79
- Ji E, Lee S. Antibody-Based Therapeutics for Atherosclerosis and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(11): 5770
- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26 (3): 439–451
- Lauterbach MA, Wunderlich FT. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflugers Arch* 2017; 469 (3-4): 385-396
- Lee Y, Hirose H, Zhou YT, Esser V, McGarry JD, Unger RH. Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 1997; 46 (3): 408-413

- Li MW, Mian MOR, Barhoumi T, Rehman A, Mann K, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33 (10): 2306–2315
- Lian X, Gollasch M. A Clinical Perspective. Contribution of Dysfunctional Perivascular Adipose Tissue (PVAT) to Cardiovascular Risk. *Curr Hypertens Rep.* 2016; 18 (11): 82
- Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *Intern Med.* 2000; 247(3): S. 349-358.
- Livak KJ, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25 (4): 402–408.
- Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT. A review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep.* 2013; 33 (5): 711-719
- Lowell BB, Flier JS. Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu Rev Med.* 1997; 48: 307–316
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407 (6801): 233–241
- Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2007; 75 (4): 640–648
- Matsuda M, Shimomura, Sata M, Arita Y, Nishida M, Maeda N et al.. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem.* 2002; 277 (40): 37487–37491
- Mazzotta C, Basu S, Gower AC, Karki S, Farb MG, Sroczynski E, Zizza E, Sarhan A, Pande AN, Walsh K, Dobrilovic N, Gokce N. Perivascular Adipose Tissue Inflammation in Ischemic Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021; 41 (3): 1239-1250
- Meldrum DR., Morris MA., Gambone JC: Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertil Steril.* 2017; 107 (4): 833–839
- Mu W, Qian S, Song Y, Yang L, Song S, Yang Q, Liu H, Liu Y, Pan D, Tang Y, Tang QQ. BMP4-mediated browning of perivascular adipose tissue governs an anti-inflammatory program and prevents atherosclerosis. *Redox Biol.* 2021; 43: 101979
- Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines. A link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol.* 2014; 63 (4): 250–259

Nava E, Llorens S. The Local Regulation of Vascular Function: From an Inside-Outside to an Outside-Inside Model. *Front Physiol.* 2019; 10: 729

Nedergaard J, Cannon B. The browning of white adipose tissue. Some burning issues. *Cell Metab.* 2014; 20 (3): 396–407

Omar A, Chatterjee TK, Tang Y, Hui DY, Weintraub NL. Proinflammatory Phenotype of Perivascular Adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (8): 1631–1636

Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304 (7): R543-52

Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P. The uncoupling protein, thermogenin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30 (1): 7–11

Pan XX, Cao JM, Cai F, Ruan CC, Wu F, Gao PJ. Loss of miR-146b-3p Inhibits Perivascular Adipocyte Browning with Cold Exposure During Aging. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2018; 32 (5): 511-518

Pan XX, Ruan CC, Liu XY, Kong LR, Ma Y, Wu QH, Li HQ, Sun YJ, Chen AQ, Zhao Q, Wu F, Wang XJ, Wang JG, Zhu DL, Gao PJ. Perivascular adipose tissue-derived stromal cells contribute to vascular remodeling during aging. *Aging Cell.* 2019; 18 (4): e12969

Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. Potential roles of osteopontin and α V β 3 integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94 (17): 9308–9313

Park SY, Kim KH, Seo KW, Bae JU, Kim YH, Lee SJ, Lee WS, Kim CD. Resistin derived from diabetic perivascular adipose tissue up-regulates vascular expression of osteopontin via the AP-1 signalling pathway. *J Pathol.* 2014; 232 (1): 87–97

Pfannenbergs C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Häring HU, Claussen CD, Stefan N. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes* 2010; 59 (7): 1789-1793

Pfeifer A, Hoffmann LS. Brown, beige, and white. The new color code of fat and its pharmacological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015; 55: 207–227

Pilkington AC, Paz HA, Wankhade UD. Beige Adipose Tissue Identification and Marker Specificity-Overview. *Front Endocrinol.* 2021; 12: 599134

Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, Daugherty A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29 (10): 1458–1464

Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008; 451 (7181): 904–913

Reynés B, van Schothorst EM, García-Ruiz E, Keijer J, Palou A, Oliver P. Cold exposure down-regulates immune response pathways in ferret aortic perivascular adipose tissue. *Thromb Haemost.* 2017; 117 (5): 981–991

Reynés B, van Schothorst, EM, Keijer J, Ceresi E, Oliver P, Palou A. Cold Induced Depot-Specific Browning in Ferret Aortic Perivascular Adipose Tissue. *Front Physiol.* 2019; 10: 1171

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7 (12): 885–896

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS et al.. PPAR γ Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Mol Cell.* 1999; 4 (4): 611–617

Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013; 15 (6): 659–667

Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K., Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, Tsujisaki M. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009; 58 (7): 1526–1531

Sanchez-Gurmaches J, Guertin DA. Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun.* 2014; 5: 4099

Sasoh T, Kugo H, Kondo Y, Miyamoto K, Minami M, Higashihara M, Kawamoto H, Takeshita F, Moriyama T, Zaima N. Different effects of high-fat and high-sucrose diets on the physiology of perivascular adipose tissues of the thoracic and abdominal aorta. *Adipocyte* 2021; 10 (1): 412–423

Shabalina IG, Petrovic N, Jong Jasper MA de, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013; 5 (5): 1196–1203

Shimizu H, Takahashi M, Takeda SI, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y et al.. Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Transplantation* 2004; 77 (11): 1661–1667

Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S, Walsh K. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest.* 2014; 124 (5): 2099–2112

Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A.* 1991; 13 (2): 277-296

Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015; 209 (1): 13–22

Tran K-V, Fitzgibbons T, Min SY, DeSouza T, Corvera S. Distinct adipocyte progenitor cells are associated with regional phenotypes of perivascular aortic fat in mice. *Mol Metab.* 2018; 9: 199–206

Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60 (3): 329-339

Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 2008; 454 (7207): 1000–1004

Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J.* 2001; (2): 312-321

Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med.* 2009; 360 (15): 1500-1508

Victorio JA, Fontes MT, Rossoni LV, Davel AP. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Front Physiol.* 2016; 7: 295

- Villarroya F, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Villarroya J, Giralt M. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. *J Intern Med.* 2018; 284 (5): 492–504
- Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012; 53 (4): 619–629
- Voorde J de, Boydens C, Pauwels B, Decaluwe K. Perivascular Adipose Tissue, Inflammation and Vascular Dysfunction in Obesity. *Curr Vasc Pharmacol.* 12 (3): 403–411
- Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 2013; 19 (10): 1338–1344.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr.. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112(12): 1796–1808
- Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012; 150 (2): 366-376
- Xia N, Horke S, Habermeier A, Closs EI, Reifenberg G, Gericke A et al.. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36 (1): 78–85
- Xiong W, Zhao X, Garcia-Barrio MT, Zhang J, Lin J, Chen YE et al.. MitoNEET in Perivascular Adipose Tissue Blunts Atherosclerosis under Mild Cold Condition in Mice. *Front Physiol.* 2017; 8: 1032
- Xita N, Tsatsoulis A. Adiponectin in diabetes mellitus. *Curr Med Chem.* 2012; 19 (32): 5451–5458
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y et al.. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332 (6163): 411–415
- Zouhar P, Janovska P, Stanic S, Bardova K, Funda J, Haberlova B, Andersen B, Rossmeisl M, Cannon B, Kopecky J, Nedergaard J. A pyrexia effect of FGF21 independent of energy expenditure and UCP1. *Mol Metab.* 2021; 19, 53: 101324

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Alexander Pfeifer für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie sowie die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas. Vielen Dank für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die stetige Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit und für die vielen Ratschläge, Treffen und Ideen zu meiner Doktorarbeit.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Staffan Hildebrand für die Einarbeitung im Labor, die Unterstützung bei der Laborarbeit, die Hilfe beim Beheben von Problemen und der statistischen Auswertung.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei der gesamten AG Pfeifer und besonders bei den technischen Assistent*innen für die angenehme Zusammenarbeit, den ständigen Austausch und für die große Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich ganz besonders bei meinen Eltern Gabriele und Josef und meinem Bruder Florian bedanken, die mich jederzeit in meinem Studium und beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt und ermutigt haben. Für meine Sorgen und Zweifel hattet ihr jederzeit ein offenes Ohr. Danke für Alles!

Ich bedanke mich zudem bei der BONFOR/SciMed-Kommission für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und Ermöglichung eines Forschungssemesters um mich gänzlich der Laborarbeit zu widmen.