

Transendothelialer Lipoproteintransport durch CD36 und Caveolin-1 im braunen Fettgewebe

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im
Fachbereich Chemie, Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kristina Gottschling

aus Hamburg

Hamburg 2015

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2012 bis September 2015 im Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Prof. Dr. Dr. Christian Betzel betreute diese Arbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Datum der Disputation: 16. Oktober 2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung des Stoffwechsels zur Regulation der Körpertemperatur	1
1.2	Einfluss der adaptiven Thermogenese auf den Energiehaushalt	1
1.2.1	Morphologie und Physiologie des braunen Fettgewebes	2
1.2.2	Regulation der adaptiven Thermogenese	4
1.2.3	Relevanz des braunen Fettgewebes beim Menschen.....	8
1.2.4	Braunes Fettgewebe als therapeutisches Target für metabolische Erkrankungen	9
1.3	Bedeutung der Lipide für den systemischen Energiestoffwechsel	10
1.3.1	Funktion und Bedeutung der triglyzeridreichen Lipoproteine	10
1.3.2	Exogener und endogener Transport der triglyzeridreichen Lipoproteine	12
1.4	Postprandiale Lipoprotein-Prozessierung	15
1.4.1	intravaskuläre Lipolyse	15
1.4.2	Aufnahme von Triglyzeriden in metabolisch-aktive Organe	17
1.4.3	Funktion von CD36 und Caveolin-1 für die postprandiale Lipidaufnahme	19
1.4.4	Rolle des braunen Fettgewebes im postprandialen Lipidstoffwechsel.....	20
2	FRAGESTELLUNG	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Materialien	23
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	24
3.1.3	Verwendete Kits	25
3.1.4	Verwendete Antikörper	25
3.1.4.1	Primärantikörper	25
3.1.4.2	Sekundärantikörper	26
3.1.5	Verwendete TaqMan® Sonden für <i>real-time</i> PCR	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Mausmodelle.....	27
3.2.1.1	Genotypisierung	27
3.2.2	Präparation und Markierung triglyzeridreicher Lipoproteine	29

3.2.2.1	Herstellung radioaktiv- oder fluoreszenz-markierter rekombinanter TRL	29
3.2.2.2	¹²⁵ I-Markierung von murinen TRL	29
3.2.2.3	DiD-Markierung von humanen TRL	29
3.2.2.4	Cy5-Markierung von murinen TRL	30
3.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen	30
3.2.3.1	Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten-Schnitten	30
3.2.3.2	Immunfluoreszenz-Färbung von Vibratom-Schnitten	31
3.2.4	Isolation von Endothelzellen, Gewebsmakrophagen und braunen Fettzellen aus braunem Fettgewebe	31
3.2.5	Endothel Permeabilitätsassay	32
3.2.6	RNA-Extraktion und quantitative <i>real-time</i> PCR	32
3.2.7	<i>In vivo</i> Biotinylierung	32
3.2.7.1	Western Blot	33
3.2.8	<i>Turnover</i> Studien und Organverteilung von radioaktiv-markierten TRL	34
3.2.9	Statistik	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Aufnahme von postprandialen TRL in das braunes Fettgewebe von Wild-Typ, Caveolin-1- und CD36-defizienten Mäusen	35
4.2	Charakterisierung des molekularen Equipments der verschiedenen Zelltypen des braunen Fettgewebes für die Lipoproteinaufnahme	37
4.2.1	Separation von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Fettzellen	38
4.2.2	Expressionsanalyse metabolisch relevanter Gene in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Fettzellen	40
4.3	Zelltyp-spezifische Aufnahme von TRL in braunes Fettgewebe	43
4.3.1	Rekombinante TRL	43
4.3.2	Native TRL	45
4.4	Untersuchung der TRL Aufnahme in das braune Fettgewebe transgener Mäuse 46	
4.4.1	Bedeutung von CD36	46
4.4.2	Bedeutung von Caveolin-1	50
4.4.2.1	Untersuchung der endothelialen Permeabilität in Wild-Typ und Caveolin-1- defizienten Mäusen	52
4.5	Untersuchung der intrazellulären Prozessierung von TRL im Endothel	54
5	DISKUSSION	57

5.1	Die Rolle der Parenchymzellen und Immunzellen für die TRL Aufnahme in das braune Fettgewebe.....	57
5.2	Bedeutung von CD36 und Caveolin-1 für die TRL Aufnahme im braunen Fettgewebe.....	63
5.3	Die intrazelluläre Lipoprotein-Prozessierung in Endothelzellen des aktivierten braunen Fettgewebes	67
6	ZUSAMMENFASSUNG	70
6.1	Summary	71
7	LITERATURVERZEICHNIS	73
8	DANKSAGUNG	89
9	ANHANG.....	90
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	90
9.2	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS.....	92
	Eidesstattliche Versicherung.....	96

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Stoffwechsels zur Regulation der Körpertemperatur

Homiotherme Lebewesen, zu denen Säugetiere und Vögel gehören, sind auf eine konstante Körpertemperatur angewiesen, damit der Energiestoffwechsel stets in einem optimalen Temperaturbereich arbeiten kann. Der Organismus ist in der Lage, die Körpertemperatur innerhalb enger Grenzen durch eigene Wärmeproduktion aufrecht zu erhalten - unabhängig von der Außentemperatur und dem Nahrungsangebot. Ein Großteil der Wärme wird durch die basale Stoffwechselrate, die zu der Aufrechterhaltung der Körperfunktionen nötig ist, produziert. Die meisten Stoffwechselprozesse sind exotherme chemische Reaktionen, bei denen die nicht für die jeweilige Reaktion genutzte überschüssige Energie in Form von Wärme freigesetzt wird. Im menschlichen Körper sind die Leber und der Skelettmuskel die Hauptwärmelieferanten und machen je ca. 26% der basalen Stoffwechselrate aus. Das menschliche Gehirn hat noch einen Anteil von 18%, gefolgt von dem Herz mit 9% (Schmidt et al., 2010). Durch körperliche Aktivität kann der Energieumsatz und damit auch die Wärmeproduktion weiter gesteigert werden. Eine weitere Strategie zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur ist das Muskelzittern. Dabei handelt es sich um eine unwillkürliche Muskelbewegung, die bei einem plötzlichen Temperaturabfall vom Hypothalamus ausgelöst wird. Durch das Kältezittern wird der Stoffwechsel im Skelettmuskel gesteigert, was zur Bildung von zusätzlicher Wärme führt. Dieser Vorgang ist allerdings sehr energieaufwendig und daher eher unökonomisch für den Organismus. Außerdem führt längeres Muskelzittern zu Muskelschäden und Erschöpfung. Eine weitaus energieeffizientere Form der Wärmeproduktion ist die adaptive bzw. zitterfreie Thermogenese. Das Hauptorgan der adaptiven Thermogenese ist das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*: BAT), welches nur in Säugetieren vorkommt (Cannon und Nedergaard, 2004). Neuere Studien haben hingegen auch gezeigt, dass neben dem braunen Fettgewebe der Muskel zur Wärmeproduktion mittels adaptiver Thermogenese beitragen könnte (Bal et al., 2012).

1.2 Einfluss der adaptiven Thermogenese auf den Energiehaushalt

Im Laufe der Evolution mussten sich Säugetiere immer wieder auf zwei wesentliche Umweltfaktoren einstellen. Zum einen waren das kalte Temperaturen, z.B. zu Zeiten des Winterschlafs oder der Kältestress bei Neugeborenen. Zum anderen war das ein

limitierter Zugang zu Nahrungsmitteln. Die Ausbildung von weißem Fettgewebe (*white adipose tissue*: WAT) sowie braunem Fettgewebe verschaffte den Säugetieren wahrscheinlich einen evolutionären Vorteil gegenüber anderen Spezies. Weißes Fettgewebe ist in der Lage, große Mengen an überschüssiger Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern und diese bei Nahrungsknappheit durch Lipolyse wieder in den Energiekreislauf zu entlassen (Zechner et al., 2012). Braunes Fettgewebe hingegen verbraucht Energie, um den Körper mittels adaptiver Thermogenese vor langanhaltender Kälte zu schützen. Dabei benutzt das braune Fettgewebe zum größten Teil Lipide als Substrat, was evolutionär gesehen in Zeiten proteinarmer Nahrung energieeffizient erscheint. In den folgenden Abschnitten wird die Physiologie und Regulation des braunen Fettgewebes sowie die Relevanz im menschlichen Organismus erläutert.

1.2.1 Morphologie und Physiologie des braunen Fettgewebes

Säugetiere besitzen zwei verschiedene Formen von Fettgewebe: das weiße Fettgewebe und das braune Fettgewebe, welche sich in Morphologie und Funktion unterscheiden (Abbildung 1.1). Die Hauptaufgabe des weißen Fettgewebes besteht zum größten Teil darin, überschüssige Energie in Form von Triglyzeriden in unilokulären Lipidtropfen zu speichern. Weiße Adipozyten besitzen relativ wenige Mitochondrien und einen peripher gelegenen Kern. Braune Adipozyten hingegen zeichnen sich durch kleine multilokuläre Lipidtropfen, einem zentralen Kern und einer hohen Anzahl von Mitochondrien aus. Die Hauptaufgabe vom braunen Fettgewebe besteht darin, Wärme mittels adaptiver Thermogenese zu produzieren, um den Körper bei länger anhaltender Kälte vor Unterkühlung zu schützen. Dieser Prozess wird durch das *Uncoupling Protein-1* (UCP1) ermöglicht, welches exklusiv in der inneren Mitochondrienmembran von braunen Adipozyten lokalisiert ist. UCP1 entkoppelt dabei die protonenmotorische Kraft der Atmungskette, die durch den mitochondrialen Abbau von freien Fettsäuren entsteht, von der ATP-Produktion. Die in dem Gradienten gespeicherte Energie wird stattdessen in Wärme umgewandelt (Cannon und Nedergaard, 2004). Lange wurde postuliert, dass weiße und braune Adipozyten aus den gleichen Präadipozyten hervorgehen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass weiße und braune Adipozyten nicht die gleiche Vorläuferzelle teilen (Moulin et al., 2001). Klassische braune Adipozyten differenzieren aus Myf5⁺- und Pax7⁺-positiven Vorläuferzellen, was ursprünglich mit Zellen myogenen Ursprungs assoziiert wurde (Lepper und Fan, 2010; Seale et al., 2008). Braune Adipozyten entstehen somit aus

den gleichen Vorläuferzellen wie die Skelettmuskelzellen (Timmons et al., 2007). Während der Differenzierung beeinflussen insbesondere spezifische Transkriptionsfaktoren wie *PR domain containing 16* (PRDM16) sowie hormonelle Faktoren wie *bone morphogenic protein 7* (BMP7) dabei die Entwicklung zu Gunsten der braunen Adipozyten (Seale et al., 2008; Seale et al., 2007; Tseng et al., 2008).

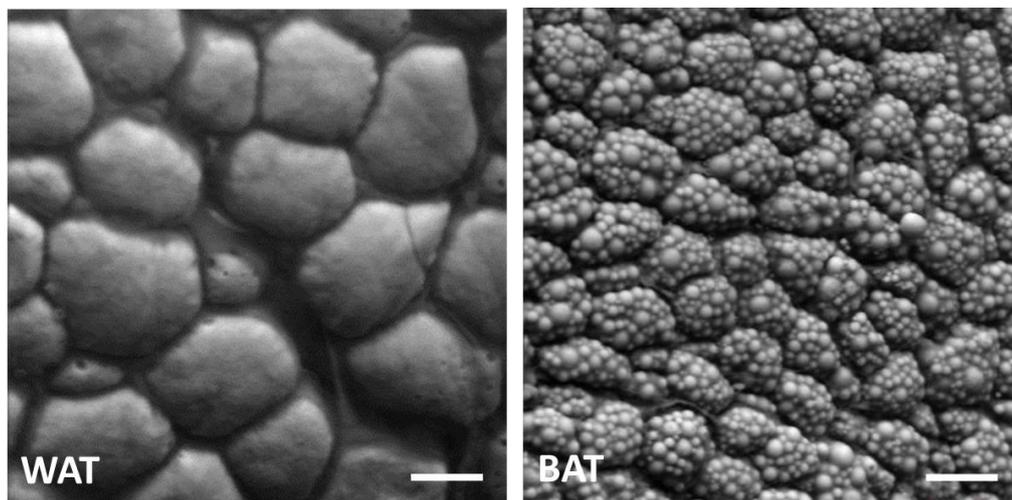


Abbildung 1.1: Morphologie vom weißen und braunen Fettgewebe

Die Adipozyten des weißen Fettgewebes (WAT) sind durch große, unilokuläre Fetttropfen charakterisiert. Im Gegensatz dazu besitzen die Adipozyten des braunen Fettgewebes (BAT) kleinere, multilokuläre Fetttropfen (environmental scanning electron microscopy, ESEM-Bilder adaptiert nach Bartelt und Heeren (2014) und zur Verfügung gestellt von Julia Thomas-Morr, Balken: 25 μ m).

Bei Nagetieren ist das braune Fettgewebe hauptsächlich in der interskapulären Region lokalisiert. Allerdings können nach längerer Kälteexposition braune Adipozyten bzw. UCP1-positive Zellen auch in Depots des weißen Fettgewebes, vorwiegend in inguinalen Bereichen, gefunden werden (Cinti, 2005). Diese Adipozyten werden beige (*inducible brown*, *brown-in-white*, oder *brite*) Adipozyten genannt. Das vermehrte Vorkommen dieser beigen Adipozyten im weißen Fettgewebe wird im Allgemeinen auch als *browning* bezeichnet (Klingenspor et al., 2012). Die Frage, ob braune und beige Adipozyten den gleichen Ursprung und die gleiche Funktion haben, wurde lange kontrovers diskutiert. Obwohl beige Adipozyten eine Reihe von BAT-spezifischen Genen (z.B. UCP1) exprimieren, differenzieren beige Adipozyten im Gegensatz zu braunen Adipozyten aus Myf5-negativen Vorläuferzellen und sollten als gesonderter Zelltyp angesehen werden (Petrovic et al., 2010; Seale et al., 2008). Allerdings unterscheiden sich die Vorläuferzellen der beigen Adipozyten auch von denen der klassischen weißen Adipozyten. Beige Adipozyten differenzieren im weißen

Fettgewebe aus bi-potenten Vorläuferzellen, die je nach Stimulus entweder in beige oder weißen Fettzellen differenzieren können (Lee et al., 2012; Wang et al., 2013; Wu et al., 2012). Beige Adipozyten haben hingegen auch ein Transdifferenzierungspotential (Barbatelli et al., 2010; Himms-Hagen et al., 2000). Bei einem fehlenden Stimulus können beige Adipozyten den Phänotyp weißer Adipozyten annehmen. Der Prozess der Transdifferenzierung ist bi-direktional (Rosenwald et al., 2013). Darüber hinaus scheint das Thermogenesepotential und die Stoffwechsellistung zwischen braunen und beige Adipozyten vergleichbar zu sein (Cohen et al., 2014; Shabalina et al., 2013).

1.2.2 Regulation der adaptiven Thermogenese

Braunes Fettgewebe ist stark vaskularisiert und mit sympathoadrenergen Nervenfasern innerviert. Neben den braunen Adipozyten und Präadipozyten ist das braune Fettgewebe auch noch aus Makrophagen und zahlreichen Endothelzellen aufgebaut. Für die Wärmeentwicklung sind jedoch hauptsächlich die braunen Adipozyten verantwortlich. Bei Kälteexposition werden afferente Signale von peripheren Kälterezeptoren (z.B. in der Haut) in speziellen Regionen des Hypothalamus integriert. Sobald die Thermoneutralität eines Körpers unterschritten wird, senden diese Regionen im Hypothalamus Signale zu sympathischen Nervenenden im braunen Fettgewebe (Tupone et al., 2014). Dabei stimulieren Katecholamine, insbesondere der Neurotransmitter Noradrenalin, die adaptive Thermogenese und UCP1 Expression in braunen Adipozyten primär über β_3 -adrenerge Rezeptoren (β_3 -AR) und die nachfolgende Aktivierung des Adenylatzyklase - Proteinkinase A -Wegs. Die Aktivierung der G-Protein-regulierten Adenylatzyklase (AC) erhöht die intrazelluläre Konzentration des zyklischen AMP (cAMP), was wiederum die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) erhöht. Die PKA phosphoryliert *cAMP response element-binding protein* (CREB) und aktiviert den *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)-Weg speziell über p38-MAPK und den Transkriptionsfaktor *Activating transcription factor 2* (ATF2), wodurch die Genexpression von Schlüsselmolekülen der adaptiven Thermogenese sowie der mitochondrialen Biogenese und Aktivität initiiert werden (Cao et al., 2004; Thonberg et al., 2002). Neben der UCP1 Expression werden u.a. die Expression von *PPAR- γ coactivator1- α* (PGC1 α) und *type 2 iodothyronine deiodinase* (DIO2) über die PKA Signalkaskade induziert (Martinez-deMena und Obregon, 2005; Puigserver et al., 1998). Des Weiteren stimuliert die aktivierte PKA den akuten Abbau von zellulären Triglyzeriden aus den Lipidtropfen in den einzelnen Adipozyten durch

die Phosphorylierung von Lipasen oder deren Koaktivator Proteinen. Die Lipolyse von Triglyceriden ist ein dreistufiger Prozess. Die *adipose triglyceride lipase* (ATGL) katalysiert den ersten Schritt der Lipolyse und hydrolysiert Triglyceride zu Diacylglyceriden (Zimmermann et al., 2004). Allerdings wird die Hydrolyse Aktivität der ATGL nur indirekt über PKA stimuliert. PKA phosphoryliert vielmehr das Strukturprotein der Lipidtröpfchen Perilipin, wodurch der ATGL Koaktivator *comparative gene identification-58* (CGI-58) dissoziiert und an ATGL binden kann (Lass et al., 2006; Miyoshi et al., 2007). Zusätzlich macht die PKA-abhängige Phosphorylierung von Perilipin die Lipidtröpfchen für die hormonsensitive Lipase (HSL) zugänglich, welche hauptsächlich für die Hydrolyse von Diacylglyceriden zu Monoacylglyceriden verantwortlich ist (Bezaire et al., 2009). Außerdem wird die HSL Aktivität auch direkt über PKA-abhängige Phosphorylierung reguliert (Stralfors und Belfrage, 1983). Monoacylglyceride werden abschließend durch die Monoacylglycerid Lipase (MAGL) hydrolysiert, was im Fettgewebe aber eine untergeordnete Rolle spielt. Hier sind ATGL und HSL für mehr als 90% der Hydrolyse von Lipidtröpfchen-assoziierten Triglyceriden verantwortlich (Schweiger et al., 2006). Neben den neutralen Lipasen können Triglyceride, aber vor allem Cholesterinester, auch durch *lysosomal acid lipase* (LAL) hydrolysiert werden. LAL ist im lysosomalen Kompartiment der Zelle lokalisiert und nur bei entsprechend saurem pH-Wert aktiv. Daher wird angenommen, dass LAL in erster Linie Lipoprotein-assoziierte Lipide nach deren Rezeptor-vermittelten Endozytose und der anschließenden Fusion mit Lysosomen hydrolysiert. Obwohl LAL-Defizienz im Menschen zur Ausprägung der schweren, früh einsetzenden Wolman-Erkrankung oder bei bestehender LAL-Restaktivität zur Cholesterinester Speicherkrankheit führt, wurde die Relevanz der LAL für den systemischen Lipid- und Lipoprotein-Stoffwechsel lange nicht berücksichtigt (Reiner et al., 2014). Allerdings konnte im Mausmodell eine kritische Rolle der LAL für den zellulären Lipidstoffwechsel, den Lipoprotein-Stoffwechsel und der Fettmobilisierung gezeigt werden. Mäuse mit einer LAL-Defizienz entwickeln hohe Plasmakonzentrationen von freien Fettsäuren, eine massive Fettleber mit Triglycerid- und Cholesterinester-Einlagerungen und erhöhte Plasmainsulinspiegel. Des Weiteren führt LAL-Defizienz zur Entwicklung eines Phänotyps im braunen Fettgewebe. Zunächst ähnelt das braune Fettgewebe eher dem weißen Fettgewebe, bevor das interskapuläre Depot altersbedingt gänzlich verschwindet (Du et al., 2001). Die durch die ATGL/HSL- und ggf. LAL-vermittelte Hydrolyse der Triglyceride freigesetzten Fettsäuren können dann in den Mitochondrien entweder als Substrat für die β -Oxidation oder für die allosterische Aktivierung von UCP1 genutzt werden

(Cannon und Nedergaard, 2004). Darüber hinaus sind freie Fettsäuren Liganden für nukleäre Rezeptoren der *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) Familie. Im braunen Fettgewebe sind insbesondere PPAR α und PPAR γ an der Regulation der adaptiven Thermogenese beteiligt. PPARs regulieren die UCP1 Expression zum einen direkt über die Bindung an *PPAR response element* (PPRE) in UCP1 *enhancer* Regionen (Barbera et al., 2001; Sears et al., 1996). Zum anderen induziert PPAR α die Expression von PGC1 α (Hondares et al., 2011b). Die Regulation der Thermogenese und die Bedeutung des Lipidstoffwechsels für die Funktion der braunen Adipozyten ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

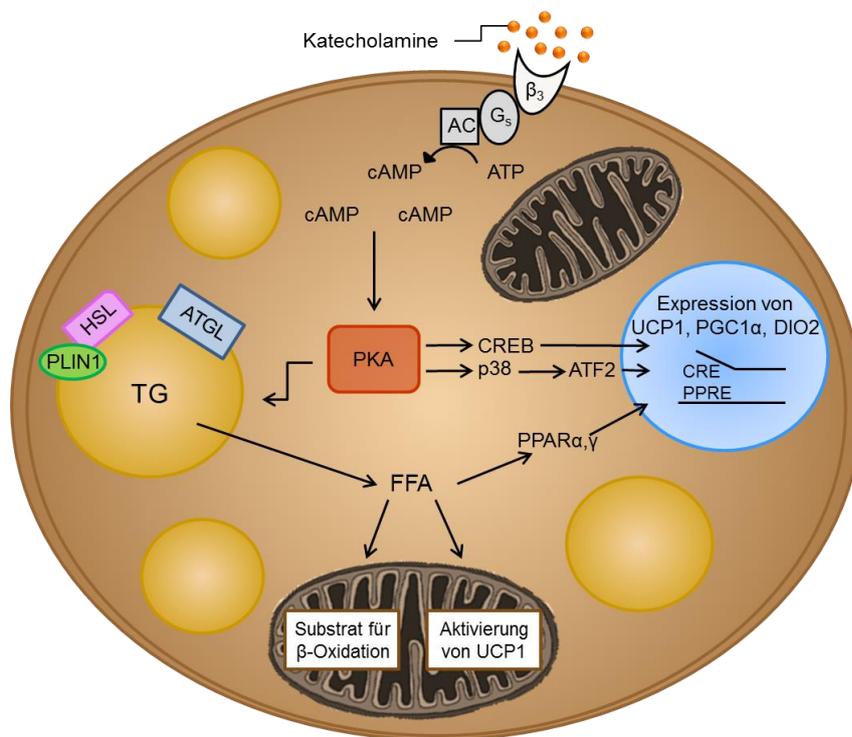


Abbildung 1.2: Schematisch Darstellung der Aktivierungskaskade in braunen Adipozyten
Bei Kälteexposition projizieren spezielle Regionen im Hypothalamus Signale zu sympathischen Nervenenden im braunen Fettgewebe, worauf β_3 -Adrenozeptoren über Katecholamine stimulieren werden. Die Adenylatzyklase (AC) wandelt ATP in cAMP um, welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Die Transkription von u.a. UCP1, PGC-1 α und DIO2 wird über den CREB/CRE oder p38/Atf2 Weg induziert. Die Phosphorylierung von Perilipin (PLIN1) sowie die Aktivierung der hormonsensitiven Lipase (HSL) und der adipose triglyceride lipase (ATGL) fördern die Lipolyse der Triglyceride (TG). Die freigesetzten Fettsäuren (FFS) liefern das Substrat für die β -Oxidation und aktivieren UCP1 allosterisch. Außerdem sind FFS-Liganden für PPAR α und PPAR γ , welche über die Bindung an PPRE die Transkription von UCP1 und PGC-1 α aktivieren. CRE, cAMP response element; CREB, CRE-binding protein; PPRE, PPAR response elements. Die Abbildung wurde nach Betz und Enerback (2011) adaptiert.

Durch längere Kälteexposition, aber auch durch die pharmakologische Aktivierung der β_3 -AR, wird das braune Fettgewebe aktiviert und *browning* im weißen Fettgewebe induziert (Himms-Hagen et al., 1994). Neuere Studien postulieren zum Beispiel auch, dass durch Kälte alternativ aktivierte Makrophagen im braunen Fettgewebe zur Sekretion von Katecholaminen stimuliert werden (Nguyen et al., 2011).

Mittlerweile sind weitere Faktoren bekannt, die das braune Fettgewebe oder das *browning* durch autokrine, parakrine oder endokrine Faktoren unabhängig von β_3 -AR regulieren. Einer dieser Faktoren ist *fibroblast growth factor 21* (FGF21), welcher von der Leber aber auch vom braunen Fettgewebe sezerniert wird und an den *FGF receptor 1* (FGFR1) bindet (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011a). Dabei ist β Klotho ein essentieller Kofaktor für FGFR1-abhängige Signalwege, die durch FGF21 aktiviert werden (Kurosu et al., 2007). Weitere Faktoren, wie das vom Herzgewebe sezernierte natriuretische Peptid, das von braunen Adipozyten exprimierte *bone morphogenetic protein 8b* und das von der Schilddrüse sezernierte Hormon Thyroxin (T_4) modulieren die Aktivität des braunen Fettgewebes und der beige Adipozyten (Bordicchia et al., 2012; Silva, 2006; Whittle et al., 2012). T_4 wird im braunen Adipozyten durch das oben genannte DIO2 in seine aktive Form Trijodthyronin (T_3) umgewandelt (de Jesus et al., 2001). Des Weiteren fördert der Neurotransmitter Orexin die Funktion des braunen Fettgewebes zentral über den Sympathikus. Allerdings kann Orexin auch direkt im braunen Fettgewebe über die Bindung an den Orexinrezeptor 1 wirken, wobei die zelluläre Quelle unbekannt ist (Sellayah et al., 2011).

Durch die gesteigerte Thermogenese erhöht sich der Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen um ein Vielfaches, was zu einer gesteigerten Aufnahme aus dem Blutkreislauf führt. Allerdings werden nicht nur der Bedarf und die Aufnahme von freien Fettsäuren in den braunen Adipozyten gesteigert, sondern auch die Aufnahme und die Verstoffwechslung von Glukose. Im Fettgewebe wird die Glukoseaufnahme überwiegend durch den insulinabhängigen Glukosetransporter 4 (GLUT4) vermittelt (James et al., 1994). Glukoseaufnahme führt zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP), welcher die Fettsäuresynthese und die Glykolyse reguliert (Iizuka et al., 2004). Im Fettgewebe wird der systemische Glukosestoffwechsel insbesondere durch die Isoform ChREBP β reguliert (Herman et al., 2012).

1.2.3 Relevanz des braunen Fettgewebes beim Menschen

Bei menschlichen Föten und Neugeborenen ist das braune Fettgewebe in axillaren, zervikalen, perirenal und periadrenalen Regionen zu finden (Cannon und Nedergaard, 2004). Lange wurde angenommen, dass sich das braune Fettgewebe kurz nach der Geburt zurückbildet und keine wesentliche Relevanz bei Erwachsenen hat. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass bei Erwachsenen metabolisch aktives braunes Fettgewebe in zervikalen, supraklavikulären, axillaren und paravertebralen Regionen zu finden ist, was für eine physiologische Relevanz des braunen Fettgewebes bei Erwachsenen spricht (Hany et al., 2002; Nedergaard et al., 2007). Das braune Fettgewebe wurde mit der bildgebenden Methode der Positron Emission Tomographie (PET), die Bereiche mit höherer metabolischer Aktivität abbildet und diagnostisch zur Darstellung von Tumor-Metastasen verwendet wird, detektiert. Die als braunes Fettgewebe identifizierten Regionen exprimieren UCP1, sind durch Kälteexposition induzierbar und korrelieren invers mit dem BMI/Übergewicht und dem Alter (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). Die gesamte Masse des braunen Fettgewebes bei Erwachsenen ist allerdings nicht größer als 60 g bis 100 g, was nur ein Bruchteil im Vergleich zu der Masse des weißen Fettgewebes ist (Lee et al., 2013). Mit dem Hintergrund, dass das braune Fettgewebe etwa 10% Glukose und 90% Lipide als Energiequelle nutzt, haben Virtanen et al. (2009) berechnet, dass eine Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einer 7%igen Steigerung der basalen Stoffwechselrate führt. Das würde einem Gewichtsverlust von ca. 4,1 kg pro Jahr entsprechen. Die Kapazität der Stoffwechselleistung und die positiven Auswirkungen des braunen Fettgewebes beim Menschen werden intensiv studiert und diskutiert. Wie bereits erwähnt, erhöht die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch β_3 -adrenerge Stimulation in einem hohen Umfang die Aufnahme von Fettsäuren, aber auch von Glukose. So trägt das braune Fettgewebe maßgeblich zur Glukose-Homöostase, aber auch zur Regulation der Insulinsensitivität bei (Orava et al., 2011; Peirce und Vidal-Puig, 2013). Eine weitere kontrovers diskutierte Frage ist, ob UCP1-positive Zellen im Menschen einem braunen oder eher einem beigen Phänotypen entsprechen. Genexpressionsanalysen von Biopsien aus unterschiedlichen Fettgewebsdepots zeigen, dass die Mehrzahl der UCP1-positiven Adipozyten überwiegend eine beige Adipozyten Signatur aufweisen (Sharp et al., 2012). Untersuchungen des Fettgewebes von Säuglingen aus der interskapulären Region zeigen, dass die Adipozyten aus diesem Bereich den klassischen braunen Adipozyten gleichen (Lidell et al., 2013).

Untersuchungen des interskapulären Fettgewebes von Erwachsenen weisen hingegen auf eine höhere Heterogenität in diesem Fettdepot hin. Im subkutanen Bereich sind überwiegend weiße Adipozyten zu finden. Je tiefer der Bereich liegt, von der die Biopsie entnommen wurde, desto höher ist die Expression von UCP1 und Genen, die spezifisch für beige, bzw. braune Adipozyten sind (Cypess et al., 2013).

1.2.4 Braunes Fettgewebe als therapeutisches Target für metabolische Erkrankungen

Im Tiermodell führt die Aktivierung des braunen Fettgewebes zur Reduktion des Körpergewichts, zur Erhöhung der Insulinsensitivität und zur Aktivierung des katabolen Fettstoffwechsels. Angesichts dieser positiven Auswirkungen stellt das braune Fettgewebe auch beim Menschen ein attraktives therapeutisches Ziel zur Behandlung von Übergewicht und Stoffwechselerkrankungen dar (Bartelt und Heeren, 2014; Cannon und Nedergaard, 2004). Der therapeutische Ansatz könnte darin bestehen, braune und beige Fettgewebe zu expandieren und die Thermogenese pharmakologisch zu aktivieren. Sympathomimetika, wie z.B. Ephedrin, können das braune Fettgewebe über das sympathische Nervensystem aktivieren, wodurch der Sauerstoffverbrauch und die Thermogenese gesteigert werden und Gewichtsverlust induziert wird (Baba et al., 2007; Dulloo et al., 1991). Die unspezifische Stimulation des Sympathikus durch Sympathomimetika kann jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Tachykardie, Hypertonie und Herzrhythmusstörungen auslösen. Diese Nebenwirkungen sind insbesondere bei übergewichtigen Patienten unerwünscht, da diese oftmals bereits an Herz-Kreislaufkrankungen leiden. Eine selektivere Aktivierung des braunen Fettgewebes könnte durch den Einsatz von spezifischen Agonisten des β_3 -AR erreicht werden, was im Tiermodell bislang eine vielversprechende Strategie darstellt (Ghorbani und Himms-Hagen, 1997; Himms-Hagen et al., 1994; Umekawa et al., 1997). Beim Menschen führte die orale Gabe des β_3 -AR Agonisten L796568 zur akuten Erhöhung des Energieverbrauchs und Lipolyse bei übergewichtigen Männern (van Baak et al., 2002). Allerdings erreichte eine längere Administration weder eine Induktion der Thermogenese noch eine Reduktion des Körperfetts (Larsen et al., 2002). Ein weiterer β_3 -AR Agonist, CL316,243, konnte nach längerer Gabe zwar die Insulinempfindlichkeit und die Fettoxidation von jungen schlanken Männer erhöhen. Der Energieverbrauch und das Körpergewicht blieben jedoch unverändert (Weyer et al., 1998). In jüngsten Studien konnte nun aber erstmalig gezeigt werden, dass der β_3 -AR Agonist Mirabegron die Thermogenese des braunen

Fettgewebes stimuliert (Cypess et al., 2015). Die orale Gabe von Mirabegron, welches zur Behandlung einer hyperaktiven Blase eingesetzt wird, stimulierte die Aktivität von braunen und beigen Adipozyten in verschiedenen Depots, aktivierte die akute Glukoseaufnahme in das braune Fettgewebe und die Lipolyse im weißen Fettgewebe. Die pharmakologische Aktivierung des braunen Fettgewebes scheint somit eine vielversprechende Strategie zur Behandlung von Übergewicht und den Begleiterkrankungen zu sein.

1.3 Bedeutung der Lipide für den systemischen Energiestoffwechsel

Lipide stellen die energiereichste Stoffgruppe dar, die dem Energiestoffwechsel zu der Versorgung des menschlichen Organismus zugeführt werden kann. Lipide in Form von Triglyzeriden sind der wichtigste Energiespeicher des Körpers und bilden den Hauptteil der aus der Nahrung gewonnen Lipide. Neben der Bedeutung als Energiespeicher und Energielieferant haben Lipide, wie z.B. Phospholipide und Cholesterin, eine wichtige Funktion als Strukturkomponente in Zellmembranen. Außerdem werden Lipide als Signalmoleküle, zum Aufbau von Hormonen oder fettlöslichen Vitaminen verwendet. Während einige Lipide von dem menschlichen Organismus selbst gebildet werden können, müssen andere durch die Nahrung aufgenommen werden und werden als essentielle Lipide bezeichnet. Allen Lipiden ist jedoch gemein, dass sie hydrophobe Eigenschaften besitzen und somit nicht eigenständig im Blut zirkulieren können. Während kürzere Fettsäuren im Blut an Albumin gebunden transportiert werden können, werden alle anderen Lipide in spezialisierten Mizellen, den Lipoproteinen, im systemischen Blutkreislauf transportiert. Pathophysiologische Veränderungen des Lipidstoffwechsels sind ein weltweites Problem, das mittlerweile epidemische Ausmaße erreicht hat (James et al., 2004). So führt z.B. der übermäßige Konsum besonders fetthaltiger und energiereicher Sukrose-haltiger Nahrung und das Fehlen ausgleichender körperlicher Bewegung zu der Ausprägung von Übergewicht und Fettleibigkeit. Die daraus resultierende Speicherung von überschüssigen Fetten im weißen Fettgewebe sowie erhöhte Lipidwerte im Blut sind Risikofaktoren für die Entwicklung von Typ-2-Diabetes und Herz-Kreislaufkrankungen (Van Gaal et al., 2006).

1.3.1 Funktion und Bedeutung der triglyzeridreichen Lipoproteine

Lipoproteine verteilen Lipide und hydrophobe Nährstoffe über die Blutbahn und versorgen so den Körper u.a. mit Energie, aber auch mit essentiellen Fettsäuren,

Zellmembrankomponenten, Signalmolekülen und fettlöslichen Vitaminen. Genetische und umweltbedingte Störungen im Lipoproteinstoffwechsel können zu folgenschweren Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, führen (Weber und Noels, 2011).

Alle Lipoproteine sind aus einem hydrophoben Kern mit Triglyzeriden und Cholesterinestern sowie einer amphiphatischen Hülle bestehend aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterin aufgebaut. Weiterhin sind strukturgebende als auch funktionalisierende Apolipoproteine in die Lipoproteinhülle eingebettet (Abbildung 1.3). Lipoproteine lassen sich grundsätzlich anhand ihrer Dichte, Größe und der Lipidzusammensetzung klassifizieren (Eisenberg und Levy, 1975). Generell wird zwischen triglyzeridreichen und cholesterinreichen Lipoproteinen unterschieden. Zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen gehören die Chylomikronen und die *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), welche überwiegend Triglyzeride und im Verhältnis wenig Cholesterin beinhalten. Zu den cholesterinreichen Lipoproteinen zählen die VLDL-Abbauprodukte *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL), *Low Density Lipoproteins* (LDL) und Lipoprotein(a) sowie die *High Density Lipoproteins* (HDL), welche hauptsächlich für den Transport von Cholesterin und weniger für den Transport von Triglyzeriden verantwortlich sind. Neben der charakteristischen Lipidzusammensetzung sind die unterschiedlichen Lipoproteinklassen auch mit verschiedenen strukturgebenden Apolipoproteinen ausgestattet. Apolipoprotein B48 (ApoB48) kennzeichnet die triglyzeridreichen Chylomikronen und deren Remnants während das Apolipoprotein B100 (ApoB100) auf VLDL bzw. LDL zu finden ist. Das Apolipoprotein A1 (ApoA1) stellt das strukturgebende Apolipoprotein der HDL dar. Darüber hinaus sind weitere austauschbare Apolipoproteine in der Lipoproteinhülle zu finden, welche je nach Lipoproteinklasse unterschiedliche Aufgaben und Funktionen erfüllen. Auf einige dieser funktionalisierenden Apolipoproteine wird später näher eingegangen.

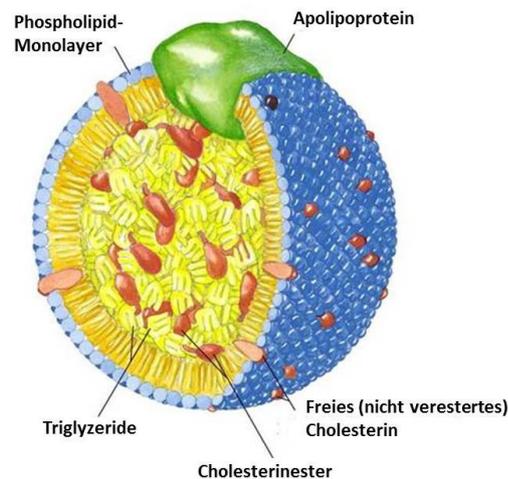


Abbildung 1.3: Genereller Aufbau eines Lipoproteins

Lipoproteine sind spezialisierte Mizellen, die aus einer amphipatischen Schicht, bestehend aus Phospholipiden, unveresterten Cholesterin und Apolipoproteinen, sowie einem hydrophoben Kern mit Triglyceriden und Cholesterinestern aufgebaut sind. Lipoprotein-Modell adaptiert nach <http://www.bioguo.org>.

1.3.2 Exogener und endogener Transport der triglyzeridreichen Lipoproteine

Prinzipiell lässt sich der Lipoproteinstoffwechsel in drei Bereiche gliedern, die allerdings in einem engen Zusammenhang stehen. Der exogene Transport beschreibt den Weg der intestinal aus der Nahrung absorbierten Lipide und wird auch als Chylomikronen-Stoffwechsel bezeichnet. Der endogene Transportweg beschreibt die Verteilung der hepatischen Lipide im Organismus mittels VLDL, bzw. LDL. Als reverse Cholesterintransport wird der Weg der HDL von nicht-hepatischen Zellen zur Leber bezeichnet. Der reverse Cholesterintransport wird in dieser Arbeit nicht weiter ausgeführt.

Die Hauptaufgabe der triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL) wie den Chylomikronen und VLDL besteht darin, Triglyzeride sowie hydrophobe Nährstoffe und Vitamine über den Blutkreislauf zu peripheren Organen im Körper zu transportieren (Williams, 2008). Um die mit der Nahrung aufgenommenen Fette in der Peripherie zu verteilen, werden Chylomikronen postprandial in Enterozyten gebildet und zunächst über das Lymphsystem in das Blut entlassen. Bei Nahrungskarenz hingegen werden in der Leber Triglyzeride synthetisiert, die in VLDL verpackt werden, um extrahepatische Gewebe mit endogenen Triglyzeriden zu versorgen. Nach der Sezernierung der endogenen und exogenen TRL in die Blutbahn werden die Triglyzeride der TRL durch die Endothel-ständige Lipoprotein Lipase (LPL) hydrolysiert (Merkel et al., 2002; Wang et al., 1992). Außerdem werden während der TRL-Prozessierung austauschbare

Apolipoproteine wie das Apolipoprotein E (ApoE) von HDL, Apolipoproteine der Klasse C und Apolipoprotein A-V (ApoA-V) auf TRL übertragen. Ein großer Teil der entstandenen TRL *remnants*, an denen zusätzlich zu den klassischen Apolipoproteinen nach der intravaskulären Hydrolyse LPL assoziiert bleibt (Heeren et al., 2002), wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Parenchymzellen der Leber, den Hepatozyten, aufgenommen. Im Dissé-Raum der Leber werden die TRL *remnants* hauptsächlich durch die Interaktion mit Lipoprotein-Rezeptoren der LDL Rezeptorfamilie endozytiert (Cooper, 1997). Der erste identifizierte Rezeptor, der die Aufnahme von TRL *remnants* in die Leber vermittelt, war der LDL-Rezeptor (LDLR) (Brown und Goldstein, 1986). Hier erfolgt die Aufnahme der TRL *remnants* über die Bindung von ApoE oder ApoB100 an den LDLR, der neben der Leber von fast allen Zellen des Organismus exprimiert wird (Jeon und Blacklow, 2005). Da ApoB100 das Strukturprotein der endogenen TRL *remnants* ist, stellt der LDLR einen wichtigen Rezeptor für die Endozytose von cholesterinreichen Lipoproteinen dar. Die Aufnahme von cholesterinreichen TRL in extrahepatisches Gewebe dient zur Versorgung der Zellen mit Cholesterin. Besonders wichtig ist jedoch die Endozytose der cholesterinreichen TRL in die Leber, da diese das einzige Organ ist, welches überschüssiges Cholesterin über die Galle in Form von Gallensäure ausscheiden kann (Dietschy et al., 1993). So kann die Akkumulation von proatherogenen Lipoproteinen, wie LDL verhindert werden. Erhöhte Konzentrationen dieser TRL *remnants* im Plasma sind Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose. Dabei ist die durch Atherosklerose verursachte koronare Herzkrankheit mittlerweile die häufigste Todesursache in den Industrienationen (Hof und von Eckardstein, 2009).

Ein weiterer Rezeptor der LDL Rezeptorfamilie ist LDLR-*related protein 1* (LRP1). Die Bindung der TRL *remnants* an LRP1 wird von ApoE und LPL vermittelt (Beisiegel et al., 1991; Beisiegel et al., 1989). Im Gegensatz zum LDLR wird LRP1 erst in der postprandialen Phase durch Insulinstimulation an die Zellmembran der Hepatozyten transportiert (Laatsch et al., 2009). Somit nimmt LRP1 eine große Rolle für die Aufnahme von exogenen TRL *remnants* ein. Der exogene und endogene Transport der TRL ist vereinfacht in Abbildung 1.4 dargestellt.

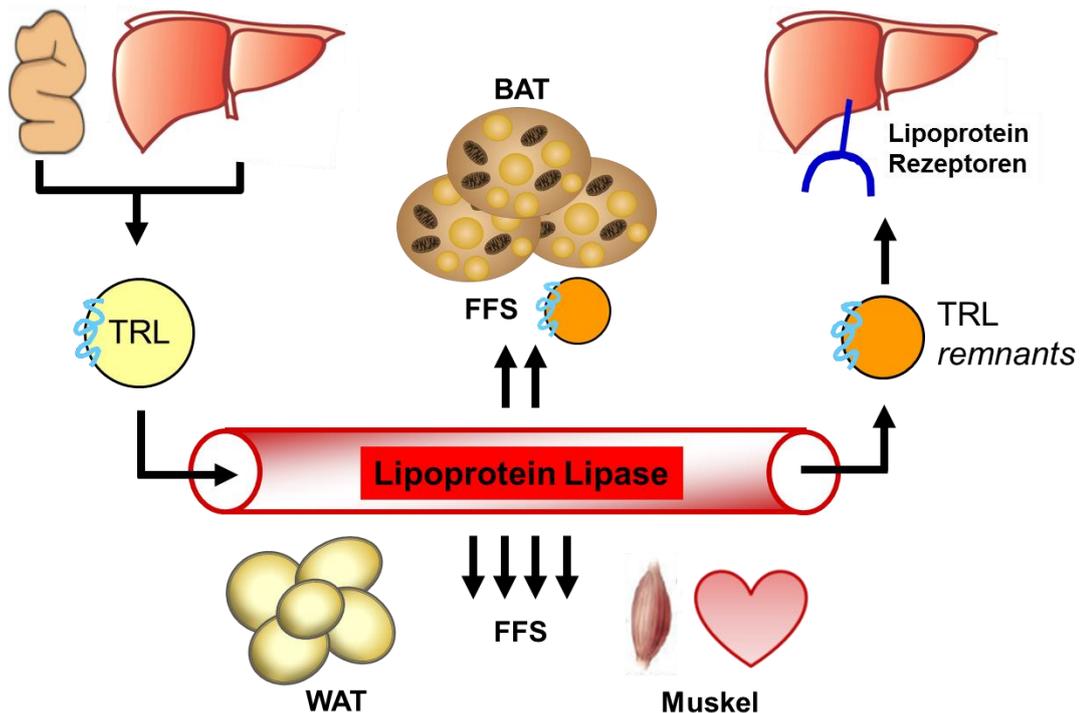


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des exogenen und endogenen Transports der triglyzeridreichen Lipoproteine

Triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL) transportieren Triglyzeride, Cholesterin sowie hydrophobe Nährstoffe zu peripheren Organen. TRL werden im Darm und in der Leber synthetisiert und anschließend in den Blutkreislauf entlassen, wo die Triglyzeride der TRL durch die membranständige Lipoprotein Lipase hydrolysiert werden. Die dabei entstandenen freien Fettsäuren (FFS) werden dann vom weißen Fettgewebe (WAT), der quergestreiften Muskulatur und dem Herzmuskel zur Energiespeicherung bzw. Energiegewinnung aufgenommen. Die kleineren und cholesterinreichen TRL-remnants werden abschließend von der Leber durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Fettsäuren und TRL-remnants werden außerdem als Energielieferant für die Wärmeproduktion in das braune Fettgewebe (BAT) aufgenommen.

Weitere Kandidaten für die Aufnahme von TRL remnants in die Leber sind im Dissé-Raum lokalisierte Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs). Insbesondere soll Syndecan-1 die Internalisierung der TRL remnants durch die Interaktion mit ApoE und ApoA-V vermitteln (Gonzales et al., 2013). Es wird postuliert, dass TRL remnants beladene HSPGs direkt, unabhängig von LDLR und LRP1, internalisiert werden können (MacArthur et al., 2007). Außerdem haben LDLR, LRP1 und HSPGs jeweils in Abhängigkeit von Größe und Apolipoprotein-Zusammensetzung unterschiedliche Affinitäten zu den Subtypen der TRL remnants und vermitteln die hepatische Aufnahme dieser verschiedenen Lipoproteine mit unterschiedlicher Effizienz (Foley et al., 2013).

1.4 Postprandiale Lipoprotein-Prozessierung

In der postprandialen Phase werden die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide intestinal resorbiert und verpackt in triglyzeridreiche Lipoproteinen, den Chylomikronen, im Organismus verteilt. Damit metabolisch-aktive Organe mit energiereichen Substanzen, wie den freien Fettsäuren, versorgt werden können, werden die Triglyzeride der Chylomikronen zunächst intravaskulär hydrolysiert. Metabolisch-aktive Organe, wie das Fettgewebe oder der Muskel, sind mit einem kontinuierlichen Endothel ausgestattet. Da die endotheliale Barriere für die meisten im Blut befindlichen Substanzen, wie z.B. den freien Fettsäuren, undurchlässig ist, erfolgt der Transport zwischen Blut und Gewebe über spezielle transzelluläre Transportmechanismen durch die Endothelzellen. Anschließend werden die Lipidkomponenten von den Parenchymzellen, wie den Adipozyten oder Myozyten, aufgenommen und entweder zur Energiespeicherung oder als Energielieferant verwendet. Neue Studien haben allerdings auch gezeigt, dass das braune Fettgewebe in der Lage ist, neben freien Fettsäuren auch ganze TRL Partikel zu internalisieren (Bartelt et al., 2011). Letzteres was bislang nur von Hepatozyten oder Makrophagen bekannt (Brown und Goldstein, 1983; Mead, 1963).

1.4.1 intravaskuläre Lipolyse

Das wichtigste Enzym für die Hydrolyse der Triglyzeride der TRL ist die Endothelständige LPL (Merkel et al., 2002). Für die LPL-vermittelte Hydrolyse der Triglyzeride der TRL, müssen die im Blut zirkulierenden TRL an der luminalen Oberfläche der Kapillaren stoppen. In den Kapillaren des Fettgewebes, des Herzens und der Skelettmuskulatur sind enzymatisch aktive LPL-Dimere an das Endothel gebunden. Da LPL nicht von Endothelzellen selbst, sondern von Adipozyten und Myozyten synthetisiert wird, muss das Enzym vom Interstitium in das Kapillarlumen transendothelial transportiert werden (Wang et al., 1992). Da LPL als auch einige Apolipoproteine der TRL (z.B. ApoB, ApoA-V, ApoE) positiv geladene Heparin-binde Domänen aufweisen, wurde lange angenommen, dass HSPGs für die LPL Transzytose sowie für die Bindung von TRL im Kapillarlumen verantwortlich sei (Cardin et al., 1984; Goldberg, 1996; Lookene et al., 2005; Olivecrona et al., 1977; Parthasarathy et al., 1994). Neuere Studien konnten nun jedoch zeigen, dass das *Glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI-anchored) HDL-binding protein 1* (GPIHBP1), welches ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird, die Transzytose der LPL vermittelt (Davies et al., 2010; Davies et al., 2012). GPIHBP1-

Defizienz führt zu der Ausbildung einer schweren Hyperlipoproteinämie Typ 1, da LPL nicht mehr in das Kapillarlumen transportiert werden kann, sondern stattdessen im Interstitium akkumuliert (Beigneux et al., 2007; Davies et al., 2010). Der Komplex aus GPIHBP1 und LPL bildet die Hauptplattform für die LPL-vermittelte TRL-Prozessierung. Die Bindung von LPL an HSPGs ist in diesem Zusammenhang ineffektiv und deshalb zu vernachlässigen (Goulbourne et al., 2014). Die *acidic domain* (Aminosäuren 24-48) von GPIHBP1 wurde hierbei als Bindedomäne für TRL und LPL identifiziert (Gin et al., 2008). GPIHBP1, LPL und TRL werden so durch elektrostatische Interaktionen in physikalische Nähe gebracht und begünstigen den lipolytischen Prozess.

Eine feine Regulation der LPL Aktivität ist essentiell, um die Energieversorgung metabolisch-aktiver Organe bei ständig wechselnden Umwelteinflüssen (z.B. Nahrungsangebot) sicherzustellen und gleichzeitig die Zellen vor der lipotoxischen Wirkung bei einem Überangebot von freien Fettsäuren zu schützen (Unger et al., 2010). In der postprandialen Phase z.B. ist die LPL-Aktivität im weißen Fettgewebe sehr hoch und gleichzeitig im Muskel reduziert. Bei Nahrungskarenz ist dies genau umgekehrt (Doolittle et al., 1990; Lithell et al., 1978). So bestimmt die lokale LPL-Aktivität maßgeblich, ob Fettsäuren im Fettgewebe gespeichert werden oder im Muskel zur Energiegewinnung mittels β -Oxidation benutzt werden. Die nahrungsabhängige Regulation der LPL-Aktivität kann unter anderem durch *Angiopoietin-like 3* (ANGPTL3) und *angiopoietin-like 4* (ANGPTL4), Proteine aus der *Angiopoietin-like family*, erklärt werden, welche eine inhibierende Wirkung auf die LPL-Aktivität haben (Kersten, 2005; Li, 2006). ANGPTL3 wird hauptsächlich von der Leber exprimiert und inhibiert als endokriner Regulator die LPL-Aktivität in der postprandialen Phase. ANGPTL4 hingegen wird von dem Fettgewebe, der Leber, dem Herz- und Skelettmuskel und dem Darm hauptsächlich während Nahrungskarenz exprimiert. ANGPTL4 fördert die Dissoziation der katalytisch aktiven LPL-Dimere in inaktive LPL-Monomere (Sukonina et al., 2006). GPIHBP1 übt dabei eine stabilisierende Wirkung auf die LPL-Dimere aus und kann einer Inhibition durch ANGPTL3 und 4 teilweise entgegenwirken (Lichtenstein und Kersten, 2010; Sonnenburg et al., 2009). Mehrere Apolipoproteine, die an TRL assoziiert sind, haben eine regulatorische Wirkung auf die LPL-Aktivität. ApoC-II ist für die LPL-Aktivität ein essentieller Co-Faktor (Bengtsson und Olivecrona, 1980; Olivecrona und Beisiegel, 1997). ApoA-V ist ein weiterer modulatorischer Faktor, der die LPL Aktivität erhöht und somit in der Lage ist, Triglyzeride im Plasma stark zu senken (Merkel et al., 2005; Nilsson et al., 2011). Im Gegensatz zu ApoC-II und ApoA-

V haben ApoC-I und ApoC-III eine inhibitorische Wirkung auf die LPL-Aktivität (Jong et al., 1999; Wang et al., 1985). Mutationen oder Polymorphismen in den Genen, die für LPL, GPIHBP1, ApoC-II und ApoA-V kodieren, sind im Menschen mit erhöhten Plasmalipidwerten oder sogar mit der Entwicklung von Hyperlipoproteinämie Typ 1 assoziiert (Beigneux, 2010; Lopez-Miranda et al., 2006; Teslovich et al., 2010; Wang et al., 2007).

Neben der LPL ist die endotheliale Lipase (EL) eine weitere Lipase, die an das Endothel der Kapillaren gebunden ist. Anders als die LPL, wird die EL von mikrovaskulären Endothelzellen gebildet und im Kapillarlumen an HSPGs gebunden (Jaye et al., 1999). Ein weiterer Unterschied zu der LPL besteht in der Substratspezifität und Lipase-Aktivität. Während LPL überwiegend Triglyzeride aus TRL hydrolysiert, ist die EL in erster Linie eine Phospholipase und spaltet HDL-Phospholipide (Strauss et al., 2003). EL Aktivität ist daher enger mit dem HDL-Stoffwechsel verknüpft.

1.4.2 Aufnahme von Triglyzeriden in metabolisch-aktive Organe

Die Blutgefäße der metabolisch-aktiven Organe sind mit einem kontinuierlichen Endothel ausgekleidet, welches eine Barriere zwischen den in der Blutbahn transportierten Nährstoffen und den darunter liegenden Gewebszellen bildet. Metabolisch-aktive Gewebe, wie Herz, Skelettmuskel und braunes Fettgewebe, nutzen Fettsäuren als Hauptquelle für die Energieproduktion. Für das weiße Fettgewebe stellen Fettsäuren das Hauptsubstrat für die Energiespeicherung dar. Die meisten Nahrungslipide bestehen aus langkettigen Fettsäuren (12-20 C-Atome), welche durch die intravaskuläre Hydrolyse der Lipoproteine entlassen werden (siehe Abschnitt 1.4.1). Allerdings ist das Transportsystem von langkettigen Fettsäuren bislang viel weniger verstanden, als z.B. die Aufnahmemechanismen der Glukose in periphere Organe. Ursprünglich wurde angenommen, dass Fettsäuren auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften via eines Flipflop Mechanismus passiv durch die Plasmamembran diffundieren können (Hamilton et al., 2002). Mittlerweise ist jedoch bekannt, dass langkettige Fettsäuren im Gegensatz zu kurzkettigeren Fettsäuren aktiv mittels Transportproteine über die vaskuläre Endothelbarriere transportiert werden (Glatz et al., 2010; Van der Vusse et al., 1998). Bislang werden drei Gruppen von Proteinen in Verbindung mit dem Transport von langkettigen Fettsäuren gebracht: die membranständigen *fatty acid transport proteins* (FATPs), der Scavenger-Rezeptor CD36 und die intrazellulären *fatty acid binding proteins* (FABPs). Die Familie der

FATPs besteht aus 6 Mitgliedern, die Gewebs- und Zelltyp-spezifisch exprimiert werden (Doege und Stahl, 2006). In Endothelzellen werden nur FATP3 und 4 exprimiert (Hagberg et al., 2010). FATP1 und FATP4 spielen eine Rolle für den Transport langkettiger Fettsäuren in die Parenchymzellen der metabolisch aktiven Organe und werden von Myozyten und weißen bzw. braunen Adipozyten exprimiert (Sandoval et al., 2008). CD36, oder auch *fatty acid translocase* (FAT) genannt, wird von Thrombozyten, Monozyten, Endothelzellen und den Parenchymzellen des weißen und braunen Fettgewebes, Herzmuskels und der Skelettmuskulatur exprimiert (Silverstein und Febbraio, 2009). Eine Vielzahl von Lipiden und lipidähnlichen Molekülen werden von CD36 erkannt und gebunden. In Bezug auf den Transport von langkettigen Fettsäuren ist der molekulare Mechanismus noch nicht gänzlich bekannt, jedoch ermöglicht oder zumindest erleichtert CD36 deren Aufnahme in die Zellen (Coburn et al., 2000). In diesem Zusammenhang wird auch die Rolle von Caveolin-1, das Strukturprotein der Caveolae, diskutiert. Diese speziellen Invaginationen der Plasmamembran sollen metabolische Plattformen bilden, in denen GPIHBP1 und CD36 lokalisiert sind und somit die intravaskuläre Hydrolyse und nachgeschaltete Aufnahme der Fettsäuren zentrieren (Ortegren et al., 2007; Williams, 2008; Williams und Fisher, 2011). Sobald Fettsäuren das Zytoplasma erreichen, werden diese von intrazellulären FABPs gebunden und transportiert. Die Familie der FABPs umfasst 13 Mitglieder, welche von einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden (Storch und McDermott, 2009). FABP3 (*heart-type*), FABP4 (*adipose-type*) und FABP5 (*epidermal-type*) werden auch von Endothelzellen exprimiert (Elmasri et al., 2009; Masouye et al., 1997). Die Fettsäuren können so in die Parenchymzellen entweder zur Energiespeicherung zu Lipidtropfen oder aber zur direkten Energiegewinnung mittels β -Oxidation zu den Mitochondrien transportiert werden. Die transendotheliale Aufnahme von postprandialen Lipiden in metabolisch-aktive Organe ist in Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

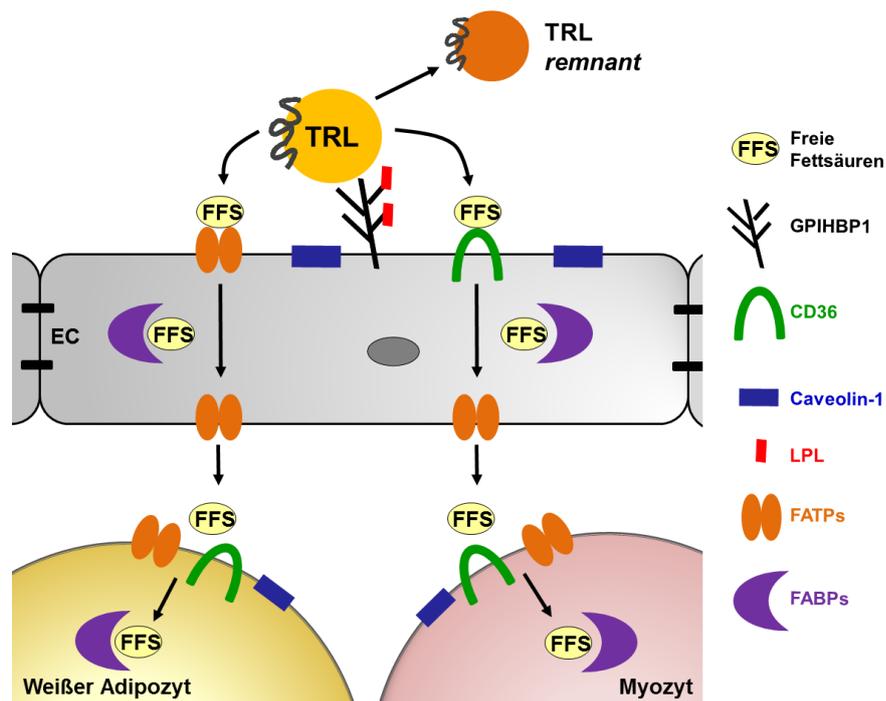


Abbildung 1.5: Transendotheliale Aufnahme von postprandialen Lipiden in metabolisch-aktive Organe

Postprandiale Lipide werden im Blut in triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) transportiert. Nachdem die TRL durch die Interaktion mit GPIHBP1, lokalisiert in Caveolae, an die luminalen Oberfläche der Kapillaren gebunden wurden, werden die Triglyzeride der TRL durch die Lipoprotein Lipase (LPL) hydrolysiert. Die freien Fettsäuren (FFS) werden dann durch membranständige fatty acid transport proteins (FATPs) oder CD36 in die Zellen aufgenommen. Intrazellulär werden Fettsäuren an fatty acid binding proteins (FABPs) gebunden transportiert. Die Abbildung ist adaptiert nach Hagberg et al. (2013). EC: Endothelzelle.

1.4.3 Funktion von CD36 und Caveolin-1 für die postprandiale Lipidaufnahme

CD36 und Caveolin-1 (Cav1) spielen eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel (Febbraio et al., 1999; Parton und Simons, 2007). CD36 ist ein Scavenger-Rezeptor der Klasse B und wurde als Fettsäuretransporter für langkettige Fettsäuren u.a. in Endothelzellen und Adipozyten identifiziert (Abumrad et al., 1993). Neben der Rolle als Fettsäuretransporter fungiert CD36 auch als Rezeptor für modifizierte Lipoproteine, wie oxidierte LDL, und zeigt eine hohe Affinität zu nativen Lipoproteinen wie HDL, LDL und VLDL (Calvo et al., 1998; Endemann et al., 1993). Cav1 hingegen wurde als strukturgebendes Protein der Caveolae identifiziert, welche in besonders hohem Maß an der Plasmamembran von Adipozyten und Endothelzellen vorkommen (Rothberg et al., 1992; Williams und Lisanti, 2004). Neben der Ausbildung spezialisierter *lipid rafts* ist Cav1 in der Lage, freie Fettsäuren zu binden und spielt eine Rolle bei dem Transport freier Fettsäuren in die Zelle (Meshulam et al., 2006; Trigatti et al., 1999). Das Fehlen von CD36 oder Cav1 führt *in vivo* zu einer beeinträchtigten Regulation des

Lipidstoffwechsels. So weisen CD36-defiziente Mäuse sowohl erhöhte Werte für Cholesterin, freie Fettsäuren, Triglyzeride als auch eine erniedrigte Aufnahme von freien Fettsäuren in Muskel und weißes Fettgewebe auf (Coburn et al., 2000; Febbraio et al., 1999). Darüber hinaus bewirkt CD36 die Aufnahme von postprandialen TRL und Fettsäuren in aktiviertes braunes Fettgewebe (Bartelt et al., 2011).

Cav1-defiziente Mäuse sind resistent gegenüber Diät-induzierter Adipositas, weisen eine postprandiale Hypertriglyzeridämie auf und entwickeln eine Atrophie des weißen Fettgewebes bzw. eine Hypertrophie des braunen Fettgewebes (Razani et al., 2002). Cav1-Defizient führt zu einer gestörten Lipolyse in weißen und braunen Adipozyten sowie zu einer reduzierten Kapazität intrazelluläre Lipidspeicher anzulegen (Cohen et al., 2004). Außerdem ist in Cav1-defizienten Mäusen die Regulation der Körpertemperatur durch adaptive Thermogenese bei Kälteexposition mit gleichzeitigem Fasten fehlerhaft (Cohen et al., 2005; Mattsson et al., 2010).

1.4.4 Rolle des braunen Fettgewebes im postprandialen Lipidstoffwechsel

Braunes Fettgewebe ist in der Lage, den Lipid- und Lipoprotein-Stoffwechsel maßgeblich zu beeinflussen. Eine Studie von Bartelt *et al.* (2011) konnte zeigen, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch akute Kälteexposition eine rapide Senkung postprandialer Blutfettwerte zur Folge hat, wobei ca. 50% der Nahrungslipide vom braunen Fettgewebe aufgenommen werden können. Durch kurzfristige Kälteexposition können pathophysiologische Zustände wie Hyperlipidemie und Adipositas im Mausmodell weitgehend normalisiert werden. Außerdem führt Kälteexposition zu einer vielfachen Erhöhung der spezifischen Aufnahme von hydrolysierbaren Triglyzeridkomponenten sowie von festen TRL-Bestandteilen in das braune Fettgewebe, während die TRL Aufnahme in die Leber verringert ist. Kälteexposition führt offenbar zur Verlagerung sowohl der TRL-Prozessierung als auch der Partikel-Aufnahme von der Leber hin zum braunen Fettgewebe. Dass das braune Fettgewebe in der Lage ist, neben freien Fettsäuren auch ganze TRL-Partikel zu internalisieren, unterscheidet diesen Weg grundlegend von der kanonischen Lipoprotein-Prozessierung in der Skelettmuskulatur oder dem weißen Fettgewebe.

Der molekulare Mechanismus ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden und nach Identifizierung der zugrunde liegenden Mechanismen muss das Lehrbuchwissen zum Lipoprotein-Stoffwechsel erweitert werden. Zu Beginn meiner Arbeit war bekannt, dass die lokale Aktivität der LPL essentiell für die TRL Aufnahme ist. Weiterhin scheint CD36 eine tragende Rolle in diesem Prozess zu spielen (Bartelt et al., 2011).

2 Fragestellung

Braunes Fettgewebe (BAT) ist in der Lage, den Lipoprotein-Stoffwechsel maßgeblich zu beeinflussen. Die natürliche Funktion von braunem Fettgewebe, Kalorien zu verbrennen, um den Körper vor Kälte zu schützen, könnte dabei therapeutisch genutzt werden, um der übermäßigen Ansammlung von Lipiden im weißen Fettgewebe und im vaskulären System entgegenzuwirken. Übergewicht und die damit verbundene überschüssige Ansammlung von Lipiden im Blut sind mittlerweile Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Typ-2-Diabetes und Herz-Kreislauferkrankungen. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes führt zu einer starken Senkung von Plasmatriglyzeriden und Generierung eines gesunden Lipoprotein-Profiles unter gesunden als auch pathophysiologischen Zuständen, wie z.B. Adipositas oder Hyperlipidemie. Die lipidsenkende Wirkung wird unter anderem durch die Fähigkeit des aktivierten braunen Fettgewebes erreicht, triglyzeridreiche Lipoproteine (TRL) als ganze Partikel zu internalisieren. Dieser Prozess ist von der lokalen Aktivität der Lipoprotein Lipase (LPL) und dem Fettsäure Transporter CD36 abhängig. Caveolin-1 (Cav1) könnte unter anderem auch an dem Prozess beteiligt sein. Der molekulare Mechanismus der Lipoprotein Aufnahme ist allerdings noch nicht verstanden.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der verschiedenen Zelltypen des braunen Fettgewebes untersucht sowie die Schlüsselmoleküle für die BAT-vermittelte Lipoprotein-Prozessierung identifiziert werden. Dafür sollte zunächst die Expression metabolisch relevanter Gene in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Fettzellen analysiert werden. Weiterhin sollte der Mechanismus der TRL-Internalisierung in das braune Fettgewebe unter der Verwendung von Fluoreszenz-markierten als auch radioaktiv-markierten TRL näher bestimmt werden. Insbesondere sollte die Bedeutung von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten in diesem Prozess ermittelt werden. Da noch zu klären bleibt, ob die Funktion der oben genannten Proteine nur in in allen genannten Zelltypen erforderlich ist, sollte die Zelltyp-spezifische Aufnahme der TRL in das braune Fettgewebe von CD36- und Cav1-defizienten Mäusen untersucht werden. Abschließend sollte die subzelluläre Lokalisation der TRL mittels indirekter Immunfluoreszenz Aufschluss über die intrazelluläre Prozessierung der TRL geben. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten ein detailliertes molekulares Verständnis der TRL-Internalisierung und Prozessierung im braunen Fettgewebe ermöglichen, aus denen

neue Strategien und Therapieansätze für die Behandlung von Übergewicht und seine Begleiterkrankungen entwickelt werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
pH-Meter	Mettler, Toledo, Schwerzenbach
Thermocycler	BioZym Scientific GmbH
Ultrazentrifuge	Beckmann Counter
Polyallomer-Röhrchen	Beckmann Counter
Spritzen	Braun
Kanülen	Braun
PD10-Säule	GE Healthcare
Perfusionspumpe	Gilson
Mictrotom HM 560	Thermo Fischer Scientific GmbH
Spritzen	Braun
Kanülen	Braun
PD10-Säule	GE Healthcare
Vibratom VT100E	Leica
Polyallomer-Röhrchen	Beckmann Counter
Beschichtete Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser
Glaswaren für Labor	Schott AG
Konfokales Mikroskop NIKON A1	Nikon Instruments
Operationsbesteck	Fine Science Tools
Zellsieb (100 µm, 40 µm)	BD Falcon
Zellseparationssäulen (<i>LS Columns</i>)	Miltenyi Biotec
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec
TissueLyser	Qiagen
γ-Counter	Perkin-Elmer
β-Counter	Perkin-Elmer
Nanodrop	Peqlab
7900HT Detektionssystem	Applied Biosystems
Rotationsmischer	NeoLab
Nitrocellulose-Membran	Whatman GmbH
Western Blot Apparatur	Bio-Rad
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare

Alle weiteren Laborartikel wurden von den Firmen Eppendorf und Sarstedt bezogen.

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

[Carboxyl- ¹⁴ C]-Triolein	Perkin-Elmer
[Cholesteryl-1,2-3H(N)]-Hexadecyl Ether	Perkin-Elmer
¹²⁵ Iod	Perkin-Elmer
Acepromazin	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
BSA Fraktion 5	Merck
Calziumchlorid	Merck
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD31 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Chloroform	Sigma-Aldrich
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
Dextran40	Sigma-Aldrich
DiD (DiIC18 (5) oil)	Molecular Probes®
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dispase II	GIBCO
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Scientific
dNTPs	Thermo Scientific
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Scientific
DreamTaq Green Buffer (10X)	Thermo Scientific
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Ethanol 96%	Merck
EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin	Thermo Scientific
GeneRuler DNA Ladder	Thermo Scientific
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck
Heparin	Braun
Isotone Natriumchloridlösung (0,9 %)	Braun
Kaliumbromid	Roth
Ketamin	Albrecht
Kollagenase D	Roche
Magnesiumchlorid	Thermo Scientific
Methanol	Merck
Methanol	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
NuPage MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Paraformaldehyd (20%)	Electron Microscopy Science
PBS, pH 7,4	GIBCO

PBS, pH 7,4 (10x)	Ambion®
Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads	Thermo Scientific
ProLong® Gold reagent	Molecular Probes®
Proteinase K	Invitrogen
Rompun	Bayer
RotiSafe	Roth
Salzsäure (37 %)	Roth
SDS, Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich
Solvable™	Perkin-Elmer
Sucrose	Merck
Szintillationsflüssigkeit	Perkin-Elmer
Tissue-Tek© OCT™ Compound	Sakura Finetek
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Roth
TRIzol® Reagenz	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich
Universal TaqMan MasterMix	Eurogentec

3.1.3 Verwendete Kits

Cy®5 Mono 5-pack	GE Healthcare
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey & Nagel
Pierce® Iodination Beads	Thermo Scientific
Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay Kit	Invitrogen

3.1.4 Verwendete Antikörper

3.1.4.1 Primärantikörper

Name	imm. Spezies	Anwendung	Referenz/Firma
α-Caveolin-1	Kaninchen, polyklonal	IF:1:1000 WB:1:25000	BD Biosciences (610059)
α-CD31	Ratte, monoklonal	IF:1:100	BD Biosciences (550274)
α-CD36	Kaninchen, polyklonal	IF:1:500 WB:1:5000	Zur Verfügung gestellt von Kathryn Moore (New York, USA)
α-GPIHBP1	Ratte, monoklonal	IF:1:500 WB:1:400	Zur Verfügung gestellt von Stephen Young (Los Angeles, USA)
α-LAMP2	Ratte, monoklonal	IF:1:100	Klon ABL-93
α-UCP1	Kaninchen, polyklonal	IF:1:5000	abcam (ab10983)

Tabelle 3.1: verwendete Primärantikörper (IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot)

3.1.4.2 Sekundäntikörper

Name	Anwendung	Referenz/Firma
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	IF:1:200	Dianova
Alexa Fluor® 488 donkey anti-rat IgG (H+L)	IF:1:250	Dianova
Esel anti-Kaninchen Cy3	IF:1:200	Dianova
Esel anti-Ratte Cy3	IF:1:250	Dianova
Esel anti-Ratte Cy5	IF:1:250	Dianova
Ziege anti-Kaninchen HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research
Ziege anti-Ratte HRP	WB 1:5000	Jackson Immuno Research

Tabelle 3.2: verwendete Sekundäntikörper (IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot)

3.1.5 Verwendete TaqMan® Sonden für *real-time* PCR

Gen	Assay on Demand
Adipoq	Mm00456425_m1
Angptl4	Mm00480431_m1
Arg1	Mm00475988_m1
Cav1	Mm00483057_m1
Cd36	Mm00432403_m1
Chrebpb	AIVI4CH
Dio2	Mm00515664_m1
Emr1	Mm00802530_m1
Fabp4	Mm00445880_m1
FGFR1	Mm00438930_m1
Glut4	Mm01245502_m1
Gpihbp1	Mm01205849_g1
Il6	Mm00446190_m1
Klb	Mm00473122_m1
Lipa	Mm00498820_m1
Lipg	Mm00495368_m1
Lpl	Mm00434764_m1
Pgc1α	Mm00447183_m1
tbp	Mm00446973_m1
Ucp1	Mm00494069_m1

Tabelle 3.3: Verwendete TaqMan® Sonden (Applied Biosystems)

3.2 Methoden

Alle Versuche wurden gemäß den Sicherheitsdatenblättern in Laboren der Sicherheitsstufe S1 und S2 durchgeführt.

3.2.1 Mausmodelle

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg, durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6J Mauslinien, welche defizient für CD36 (*Cd36*^{-/-}) bzw. Caveolin-1 (*Cav1*^{-/-}) sind, waren bereits im Labor etabliert. Für Wild-Typ (WT) Studien wurden C57BL/6J Mäuse von der Firma *Jackson Laboratory* erworben. Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur (22 °C) und einem 12 Std-Tag/Nacht-Zyklus gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (Standard Labor *chow* Diät) und Wasser. Für die Experimente wurden *Cd36*^{-/-} und *Cav1*^{-/-} sowie WT Tiere desselben Inzuchtstammes in einem Alter von 12-18 Wochen verwendet. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgte generell durch eine 24-stündige Kälteexposition inklusive einer abschließenden 4-stündigen Fastenperiode. Dafür wurden die Tiere bei 4 °C in Einzelkäfigen gehalten. Da CD36-defiziente Mäuse allerdings kältesensitiv sind, wurde die Kälteexposition bei allen Experimenten mit *Cd36*^{-/-} Mäusen auf 6 Std verkürzt.

3.2.1.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Dafür wurden die Biopsien zunächst in 700 µL STE-Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) mit 10 µL Proteinase K (10 mg/mL) lysiert. Anschließend erfolgte eine DNA-Fällung mit Ethanol. Um die Genotypen der *Cd36*^{-/-} und *Cav1*^{-/-} Mauslinien zu bestimmen, wurden jeweils PCR mit spezifischen Primern durchgeführt (die Primersequenzen können Tabelle 3.4 entnommen werden).

CD36	Cav1
Ex2s 3'189: 5'CATACATTGCTGTTTATGCATGA3'	M_cav1_296-S: 5'TTTACCGCTTGTTGTCTACGA3'
Ex3a 3'301: 5'AGCTCCAGCAATGAGCCAC3'	M_cav1_513_AS: 5'TATCTCTTTCTGCGTGCTGA3'
NeoS 3'1520: 5'TGGAAGGATTGGAGCTACGG3'	M_cav1_1328_S: 5'TATTCTGCCTTCCTGATGATAACTG3'
	NEO-1L-347_AS: 5'CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATG3'

Tabelle 3.4: spezifische Primersequenzen zur Genotypisierung von *Cd36*^{-/-}, *Cav1*^{-/-} und entsprechenden WT Mäusen

Für die CD36-PCR wurden 2 µL der DNA mit 16,5 µL H₂O, 2,5 µL PCR-Puffer GREEN (10x), 1 µL DMSO, 0,5 µL MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL dNTP (10 mM), je 0,7 µL des Ex2s

3'189 (10 μ M), 0,6 μ L des Ex3a 3'301 (10 μ M), 0,6 μ L des NeoS 3'1520 (10 μ M) Primers und 0,1 μ L der Taq-Polymerase (5 U/ μ L) versetzt. Da sich die Größen der WT und transgenen PCR-Produkte der Cav1-PCR zu stark unterscheiden, wurden zwei unterschiedliche PCR angesetzt. Für die Cav1WT-PCR wurden 2 μ L der DNA mit 14,97 μ L H₂O, 2,5 μ L PCR-Puffer GREEN (10x), 0,5 μ L DMSO, 2,5 μ L MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ L dNTP (10 mM), je 1 μ L des M_cav1_296-S (10 μ M), 1 μ L des M_cav1_513_AS (10 μ M) Primers und 0,03 μ L der Taq-Polymerase (5 U/ μ L) versetzt. Für die Cav1ko-PCR wurden 2 μ L der DNA mit 18,4 μ L H₂O, 2,5 μ L PCR-Puffer GREEN (10x), 0,5 μ L MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ L dNTP (10 mM), je 0,5 μ L des M_cav1_1328_S (10 μ M), 0,5 μ L des NEO-1L-347_AS (10 μ M) Primers und 0,1 μ L der Taq-Polymerase (5 U/ μ L) versetzt. Die Amplifikationsprogrammierungen des *Thermocyclers* können Tabelle 3.5 entnommen werden.

	CD36	Cav1WT	Cav1ko
Initialisierung	95 °C; 3 min	95 °C; 3 min	95 °C; 3 min
Denaturierung	94 °C; 30 sek	94 °C; 1 min	94 °C; 1 min
Annealing	60 °C; 30 sek	54 °C; 1 min	58 °C; 1 min
Extension	72 °C; 1 min	72 °C; 1 min	72 °C; 1,5 min
Zyklen	35	35	40
Finale Extension	72 °C; 5 min	72 °C; 10 min	72 °C; 10 min

Tabelle 3.5: Amplifikationsprogrammierung des Thermocyclers

Nach der Amplifikation ergaben sich für den jeweiligen Genotyp spezifisch große PCR-Produkte, die dann mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch den DNA-Farbstoff RotiSafe unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten (Abbildung 3.1).

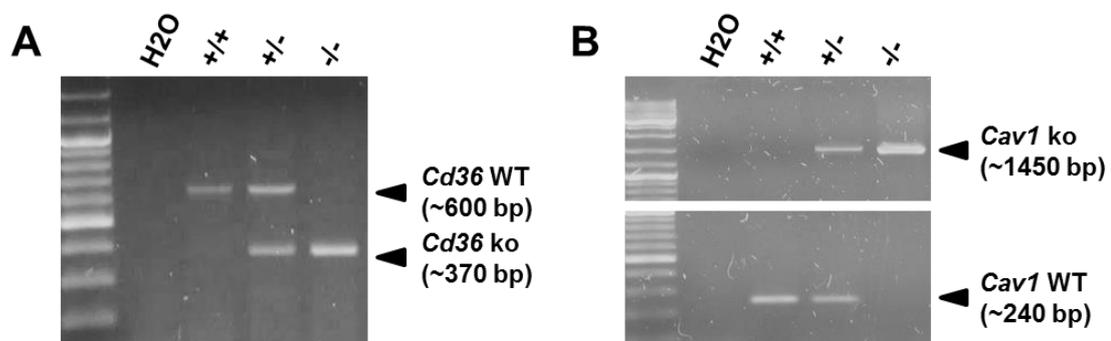


Abbildung 3.1: Genotypisierung von Cd36^{-/-} und Cav1^{-/-} Mäusen mittels PCR

Exemplarische Agarosegele mit PCR-Produkten der (A) CD36-PCR und (B) Cav1-PCR. Es sind jeweils Proben von homozygoten Wild-Typ (WT) Tieren (+/+), heterozygoten Tieren (+/-) und homozygoten knock out (ko) Tieren (-/-) abgebildet.

3.2.2 Präparation und Markierung triglyzeridreicher Lipoproteine

Verschiedene Markierungstechniken machen es möglich, den Weg der TRL durch den Körper und die anschließende Organverteilung *in vivo* zu verfolgen. Durch spezielle Markierungstechniken ist sogar eine Visualisierung der TRL auf zellulärer Ebene möglich. Im folgenden Abschnitt werden unterschiedliche Markierungstechniken erläutert.

3.2.2.1 Herstellung radioaktiv- oder fluoreszenz-markierter rekombinanter TRL

Die Herstellung rekombinanter TRL erfolgte nach der Methode von Bruns *et al.* (Bruns *et al.*, 2009). Für die Herstellung radioaktiv-markierter TRL wurden in dieser Arbeit pro Maus je 2 mg Lipidextrakt mit 18,5 kbq [Carboxyl-¹⁴C]-Triolein und 37 kbq [Cholesteryl-1,2-3H(N)]-Hexadecyl Ether inkubiert. Durch die Doppelmarkierung ist es möglich, gleichzeitig den Lipoprotein-Partikel und die hydrolysierten Triglyzeridkomponenten zu verfolgen. Für die Herstellung fluoreszenz-markierter rekombinanter TRL wurden pro Maus je 2 mg Lipidextrakt mit 8 µL fluoreszierenden Nanopartikeln (QuantumDots, QD; zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Weller, Institut für Physikalische Chemie, Universität Hamburg) inkubiert.

3.2.2.2 ¹²⁵I-Markierung von murinen TRL

Um die Apolipoproteine nativer TRL mit ¹²⁵I markieren zu können, mussten diese zunächst aus dem Plasma von Mäusen isoliert werden. Dazu wurden FVB Mäuse mit 200 µL/Maus Olivenöl gavagiert. Nach 1,5 Std wurde das Blut durch Herzpunktion entnommen und anschließend zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde mit KBr auf eine Dichte von 1,21 g/mL eingestellt und in Polyallomer-Röhrchen (geeignet für SW40 Rotor, Beckman) unter PBS geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (2 Std, 38000 rpm, 4 °C). Auf Grund der geringeren Dichte bildeten die TRL eine obere Phase, die dann vorsichtig mit einer umgebogenen Kanüle abgenommen werden konnte. Es erfolgte eine erneute Beschwerung der TRL mit KBr, Schichtung unter PBS und anschließender Ultrazentrifugation. Die gewonnenen TRL konnten dann für die ¹²⁵I-Markierung nach der Iodmonochlorid-Methode verwendet werden (Mc, 1958). Nicht gebundenes ¹²⁵I wurde mittels PD10-Säule nach Angaben des Herstellers entfernt.

3.2.2.3 DiD-Markierung von humanen TRL

Um DiD-markierte TRL herzustellen, wurden 1 mL einer Suspension humaner TRL (10 mg/mL) eines Patienten mit Hyperlipoproteinämie Typ 1 mit 250 µg/mL DiD-Lösung (in DMSO) und 5 mM EDTA versetzt. Die Suspension wurde dann über Nacht bei

37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mittels einer PD10-Säule nach Angaben des Herstellers entfernt.

3.2.2.4 Cy5-Markierung von murinen TRL

Murine TRL wurden, wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, isoliert. Die Cy5-Markierung der TRL erfolgte dann mit Hilfe des Cy®5 Mono 5-Pack Kits nach Angaben des Herstellers.

3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen

Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen wurden dazu genutzt, die Aufnahme von TRL in aktiviertes braunes Fettgewebe, sowie deren zelluläre Lokalisation zu visualisieren. Dazu wurden Mäuse mit 100 µL DiD-markierten TRL, 200 µL rekombinanten QD-TRL oder 200 µL Cy5-markierten TRL intravenös injiziert. Nach 30 min (DiD-TRL), bzw. 15 min (QD-TRL und Cy5-TRL) wurden die Tiere durch intra-peritoneale Injektionsnarkose (10 µL/g Körpergewicht), bestehend aus Ketamin (23 mg/mL) und Rompun (0,2%) in isotoner Natriumchlorid Lösung (0,9%) anästhesiert. Im Falle der Injektion von DiD-TRL folgte eine Perfusion über das Blutgefäßsystem für 2 min bei konstantem Perfusionsdruck (5 mL/min) mit 4% Paraformaldehyd und 5% Sucrose in eiskaltem PBS. Nach der Injektion von QD-TRL oder Cy5-TRL erfolgte zunächst eine Perfusion mit 10 U/mL Heparin/ PBS für 30 sek worauf dann eine Perfusion mit 4% Paraformaldehyd in eiskaltem PBS für 2 min folgte. Anschließend wurde das braune Fettgewebe entnommen und in 4% Paraformaldehyd/PBS nachfixiert. Die Weiterverarbeitung erfolgte dann entweder an einem Gefriermikrotom HM 560 zur Herstellung von Kryo-Schnitten oder an einem Vibratom VT100E zur Herstellung von Vibratom-Schnitten.

3.2.3.1 Immunfluoreszenz-Färbung von Kryoschnitten-Schnitten

Zur Herstellung von Kryo-Schnitten wurde das schockgefrorene Gewebe in Tissue-Tek® eingebettet, 8 µm Schnitte hergestellt, auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen und getrocknet. Die Kryo-Schnitte wurden dann 15 min mit eiskaltem Methanol (-20 °C) bei RT fixiert und über 1 Std mit 2% BSA in PBS blockiert. Die Inkubation mit einem Primärantikörper (verdünnt in 2% BSA/ PBS) erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Nachdem die Schnitte mit PBS gewaschen wurden, wurden die Schnitte mit einem Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper (verdünnt in PBS) und dem Kernfarbstoff DAPI (1:1000) für 1 Std in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und in ProLong® Gold reagent eingedeckt.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Vibratom-Schnitten

Die Immunfluoreszenz-Färbung von Vibratom-Schnitten erfolgte in Suspension. Dafür wurden zunächst 200 µm Gewebeschnitte hergestellt, die dann für 30 min in 5% Glycin in PBS inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung für 2 Std mit 3% BSA und 0,3% Triton X-100 in PBS. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte mit einem Primärantikörper (verdünnt in 1% BSA/ PBS) für 48 Std bei 4 °C inkubiert und erneut gewaschen. Die Inkubation mit einem Fluorophor-gekoppeltem Sekundärantikörper (verdünnt in 1% BSA/ PBS) erfolgte dann über 24 Std bei 4 °C. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte 5 min mit DAPI (1:1000 in PBS) inkubiert und anschließend ausgiebig gewaschen.

Für Kolokalisationsstudien wurden die Schnitte gleichzeitig mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und unter einem NIKON A1R konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren eingesetzten Konzentrationen sind *Tabelle 3.1* und *Tabelle 3.2* zu entnehmen.

3.2.4 Isolation von Endothelzellen, Gewebsmakrophagen und braunen Fettzellen aus braunem Fettgewebe

Für die Isolation von Endothelzellen, Gewebsmakrophagen und braunen Fettzellen aus braunem Fettgewebe wurden jeweils 4-6 Gewebe pro Gruppe vereinigt. Die Gewebe wurden mit einer Operationsschere vorsichtig zerkleinert und anschließend in PBS mit 10 mM CaCl₂, 2,4 U/mL Dispase II und 1,5 U/mL Kollagenase D für 45 min bei 37 °C verdaut. Unverdautes Gewebe wurde durch eine Passage durch ein Zellsieb (100 µm) von den vereinzelt Zellen abgetrennt, welches anschließend zentrifugiert (5 min, 600 x g, 4 °C) wurde. Das Pellet wurde dann in MACS Puffer (2 mM EDTA, 0,5% BSA, 2 mM Glukose in PBS) resuspendiert und erneut durch ein Zellsieb (40 µm) filtriert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 600 x g, 4 °C) wurde das Pellet in MACS Puffer resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden mittels magnetischer Beads und entsprechenden Zellseparationssäulen (*LS Columns*) im Magnetfeld erst Gewebsmakrophagen (durch Inkubation mit CD11b MicroBeads), dann Endothelzellen (durch Inkubation mit CD31 MicroBeads) und braune Adipozyten (als Durchfluss) nach Angaben des Herstellers separiert. Die Zellfraktionen wurden dann entweder in TRIzol® Reagenz zur RNA Isolation (siehe Abschnitt 3.2.6), in Szintillationsflüssigkeit zur Bestimmung der Radioaktivität (siehe Abschnitt 3.2.8) oder in PBS zur DNA Bestimmung gelöst. Die Quantifizierung der DNA wurde entsprechend der

Herstellieranweisungen mit einem Quant-iT™ dsDNA Broad-Range Assay durchgeführt.

3.2.5 Endothel Permeabilitätsassay

Für den Endothel Permeabilitätsassay wurde Albumin mit ^{125}I unter der Verwendung von Iodobeads® (Pierce) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. ^{125}I -Albumin (20µg mit 20 kbq) wurde über die Schwanzvene in gefastete warme und Kälte-exponierte Mäuse injiziert. 60 min nach der Injektion wurden die Mäuse anästhesiert. Anschließend folgte eine finale Blutentnahme durch Herzpunktion und eine umfangreiche Perfusion mit 10 U/mL Heparin/PBS und 1% BSA. Die Organe wurden entnommen, gewogen und in einem γ -Counter gemessen. Die Radioaktivität wurde dann als cpm/mg Organ, beziehungsweise µL Plasma berechnet.

3.2.6 RNA-Extraktion und quantitative *real-time* PCR

RNA aus Zellen oder Gewebe wurde mittels TRIzol® Reagenz und ggf. dem Einsatz eines TissueLyser nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) gefällt und mit dem NucleoSpin RNA II Kit isoliert. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 400 ng RNA in 20 µL Reaktionsvolumen mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit umgeschrieben. Die cDNA konnte dann zur Expressionsanalyse durch quantitative *real-time* PCR genutzt werden. Die Genexpression wurde in dieser Arbeit mit TaqMan® *Probe*-basierter Genexpressions Analyse und einem 7900HT Detektionssystem quantifiziert. Dafür wurden 5 µL cDNA (entspricht 100 ng) mit 15 µL Universal TaqMan MasterMix, 8,5 µL H₂O (DNase-frei) und 1,5 µL entsprechender TaqMan®-Sonde/Assay on Demand versetzt. Für alle Gene wurden spezifische TaqMan®- Sonden/Assay on Demand von Applied Biosystems verwendet (Tabelle 3.3). Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte durch Normalisierung zum Referenzgen *TATA-box binding protein* (Tbp) nach der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

3.2.7 *In vivo* Biotinylierung

Durch die Methode der *in vivo* Biotinylierung ist es möglich nur die Plasmamembranständigen Proteine zu isolieren, die vom Blutkreislauf zugänglich sind. In dieser Arbeit wurden mit dieser Methode die luminalen Plasmamembranproteine der Endothelzellen des braunen Fettgewebes isoliert. Dafür wurden Mäuse zunächst intra-peritoneal mit Acepromazin (3 mg/kg) injiziert, um die Blutgefäße zu erweitern. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Tiere tief anästhesiert und mit 10 mL 10%iger Dextran40-Lösung

(in PBS) perfundiert. Danach folgte eine Perfusion mit 37 °C warmen Biotinylierungsreagenz (1 mg/mL EZ-Link™ NHS-SS-Biotin in 10% Dextran40/PBS) für 10 min bei einem konstanten Perfusionsdruck (1,5 mL/min). Um nicht gebundenes Biotin zu entfernen, wurde zusätzlich noch mit 10 mL *Quenching* Lösung (50 mM Tris/HCl in 10% Dextran40/PBS; pH 7,4) perfundiert. Anschließend wurde das braune Fettgewebe entnommen und in Zellysis Puffer (50 mM Tris, 2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail; pH 8,0) mit Hilfe eines TissueLyser homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert wobei sich biotinylierte Proteine im Überstand sammelten. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry bestimmt (Lowry et al., 1951). Die biotinylierten Proteine wurden dann mit Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads nach Angaben des Herstellers auf einem Rotationsmischer inkubiert. Nach der Inkubation für 1,5 Std bei 4 °C, wurden die magnetischen Beads mehrere Male mit TBST (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20; pH 7,6), beziehungsweise PBS gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 100 µL *Reducing Sample Buffer*, bestehend aus Ladepuffer und Reduzierungsmittel (beides NuPAGE®), resuspendiert und erhitzt (5 min, 95 °C). Da das Biotin eine Disulfidbrücke (S-S) in der *Spacer* Region besitzt, konnte das Biotin durch die reduzierende Eigenschaft des Puffers entfernt werden. Die eluierten Plasmamembranproteine konnten dann weiter für Western Blot Analysen (3.2.7.1) verwendet werden.

3.2.7.1 Western Blot

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierbei wurde ein NuPAGE® MES Puffersystem verwendet. Nach der Methode von Laemmli (1970) werden die Proteine in einem 5%-igem Sammelgel fokussiert und anschließend in einem 10%-igem Trenngel aufgetrennt. 20 µL der in Abschnitt 3.2.7 gewonnenen Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder verwendet. Dann folgte die Gelelektrophorese bei 170 V für 1 Std. Die spezifische Detektion der Proteine erfolgte via Nass-Blot-Verfahren. Dafür wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Blotting erfolgte für 2 Std bei einer Stromstärke von 400 mA in einer mit Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% Methanol) gefüllten Western Blot Apparatur. Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5% Milchpulver (in TBST) blockiert und die transferierten Proteine durch eine indirekte Immunfärbung detektiert. Dafür wurde die Membran zunächst mit spezifischen Primärantikörpern (über Nacht, 4 °C) und anschließend mit entsprechenden Peroxidase-gekoppelten

Sekundärantikörpern (1 Std, RT) inkubiert. Alle Antikörper wurden standardmäßig in 5% Milchpulver (in TBST) verdünnt, wobei die jeweiligen Konzentrationen Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 entnommen werden können. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine nach der ECL-Methode. Dafür wurde die Chemilumineszenz nach verschiedenen Expositionszeiten mittels eines Fotofilms (Amersham) Hyperfilm ECL detektiert.

3.2.8 Turnover Studien und Organverteilung von radioaktiv-markierten TRL

Für *turnover* Studien wurden 200 μL ^3H - ^{14}C - radioaktiv-markierter rekTRL (Abschnitt 3.2.2.1) über die Schwanzvene in gefastete warme und Kälte-exponierte Mäuse injiziert. 15 min nach der Injektion wurden die Mäuse anästhesiert. Anschließend folgte eine finale Blutentnahme durch Herzpunktion und eine zweiminütige Perfusion mit 10 U/mL Heparin/PBS. Die Organe wurden entnommen und gewogen. Während das interskapuläre braune Fettgewebe für die MACS-basierte Zellseparation (siehe Abschnitt 3.2.4) verwendet wurde, wurden alle anderen Organe bei 60 °C in Solvable™ (0,1 mL/ 10 mg Organ) gelöst. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden 400 μL der Organsuspension und 10 μL Plasma mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem β -Counter gemessen. Die Radioaktivität wurde dann als dpm/mg Organ, beziehungsweise μL Plasma berechnet.

3.2.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Für Vergleiche von zwei Gruppen wurde die statistische Signifikanz mit Hilfe des *Student's* t-Test (zweiseitig, ungepaart) berechnet. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde die statistische Signifikanz mittels *two-way ANOVA (analysis of variance)* gefolgt von einem *Tukey's multiple comparisons test* ermittelt. Für statistische Berechnungen wurde die Programme Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 6.0 genutzt. $P < 0,05$ wurde als statistische Signifikanz definiert.

4 Ergebnisse

Aktiviertes braunes Fettgewebe ist in der Lage ganze Lipoprotein-Partikel aufzunehmen (Bartelt et al., 2011). Dieser Prozess ist von der lokalen Aktivität der Lipoprotein Lipase (LPL) und dem Fettsäure Transporter CD36 abhängig. Caveolin-1 (Cav1) könnte unter anderem auch an dem Prozess beteiligt sein. Der molekulare Mechanismus der Lipoprotein Aufnahme ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden. In dieser Arbeit wurde der Beitrag verschiedener Zelltypen (Endothelzellen, Makrophagen und braunen Fettzellen), sowie Schlüsselmolekülen für die BAT-vermittelte Lipoprotein-Internalisierung untersucht. Außerdem sollten Erkenntnisse über die intrazelluläre Lipoprotein-Prozessierung erlangt werden. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dargestellt.

4.1 Aufnahme von postprandialen TRL in das braunes Fettgewebe von Wild-Typ, Caveolin-1- und CD36-defizienten Mäusen

Um zunächst den Weg der Lipoproteine in das braune Fettgewebe zu verfolgen, wurde die Lipoprotein-Aufnahme mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert. Dafür wurden DiD-markierte TRL intravenös in C57BL/6J Wild-Typ Mäuse injiziert, die für 24 Std entweder bei 27 °C (warm) oder 4 °C (kalt) gehalten wurden (Abbildung 4.1). Um eine mögliche Kolo-kalisation mit Zellen des braunen Fettgewebes zu ermöglichen, wurden braune Adipozyten und Endothelzellen mit einem spezifischen Antikörper gegen UCP1, beziehungsweise CD31 inkubiert. Im braunen Fettgewebe von warmgehaltenen Mäusen konnte keine Aufnahme von DiD-TRL detektiert werden (Abbildung 4.1 A). Neben der Intensivierung der UCP1-Färbung, wurde auch die Aufnahme des DiD-Farbstoffes in UCP1-positive braune Adipozyten durch Kälteaktivierung massiv stimuliert (Abbildung 4.1 B). Eine Kolo-kalisation von DiD mit CD31-positiven Endothelzellen war hingegen nicht zu sehen. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Beobachtungen überein, mit denen gezeigt wurde, dass braunes Fettgewebe nach Aktivierung ganze Lipoprotein-Partikel internalisieren kann (Bartelt et al., 2011). Darüber hinaus haben Bartelt et al. (2011) gezeigt, dass CD36 für die Lipoprotein-Internalisierung in das braune Fettgewebe notwendig ist.

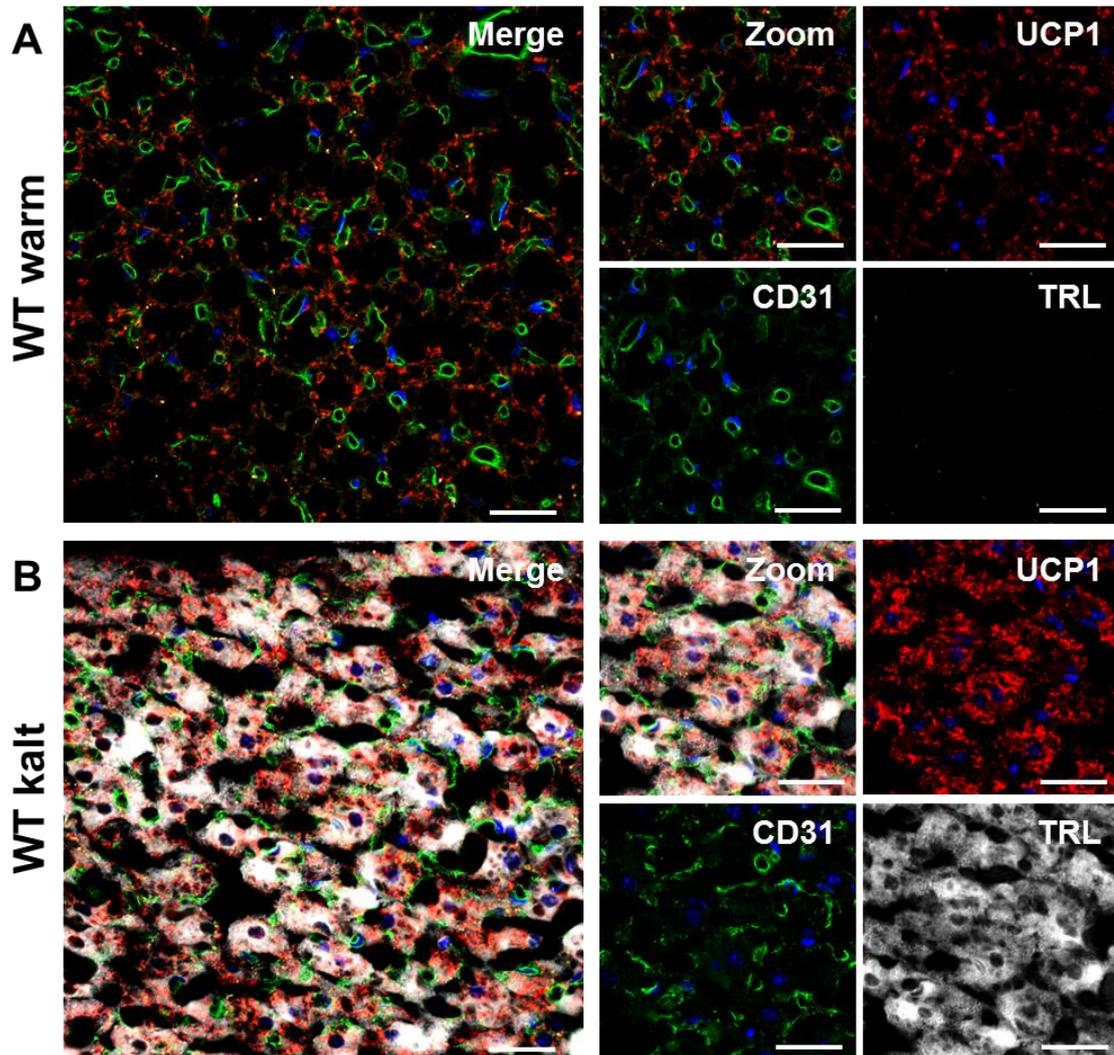


Abbildung 4.1: Erhöhte Aufnahme postprandialer TRL in Kälte-aktiviertes braunes Fettgewebe von Wild-Typ Mäusen *in vivo*

Gefastete Wild-Typ Mäuse wurden 24 Std bei (A) warmen (27 °C) und (B) kalten (4 °C) Temperaturen gehalten, bevor DiD-markierte TRL intravenös injiziert wurden. 30 min nach der Injektion wurde das braune Fettgewebe entnommen und Kryo-Schnitte (8 µm) angefertigt. UCP1 (rot), CD31 (grün) und TRL (weiß) wurden mittels *ex vivo* Immunfluoreszenz visualisiert. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Der Balken entspricht 25 µm.

Um zusätzlich den Einfluss von CD36, sowie eines weiteren möglichen Mitspielers Caveolin-1 (Cav1), auf die Lipoprotein-Aufnahme in das braune Fettgewebe zu untersuchen, wurden DiD-markierte TRL intravenös in Kälte-exponierte CD36 (*Cd36*^{-/-}) bzw. Caveolin-1 (*Cav1*^{-/-}) defiziente Mäuse injiziert (Abbildung 4.2). Im Vergleich zum Wild-Typ (Abbildung 4.1 B) war bei beiden Genotypen nach Kälteaktivierung keine erhöhte Aufnahme von DiD-TRL in UCP1-positive braune Adipozyten detektierbar. Auch konnte keine Akkumulation des DiD-Farbstoffes in CD31-positiven Endothelzellen beobachtet werden.

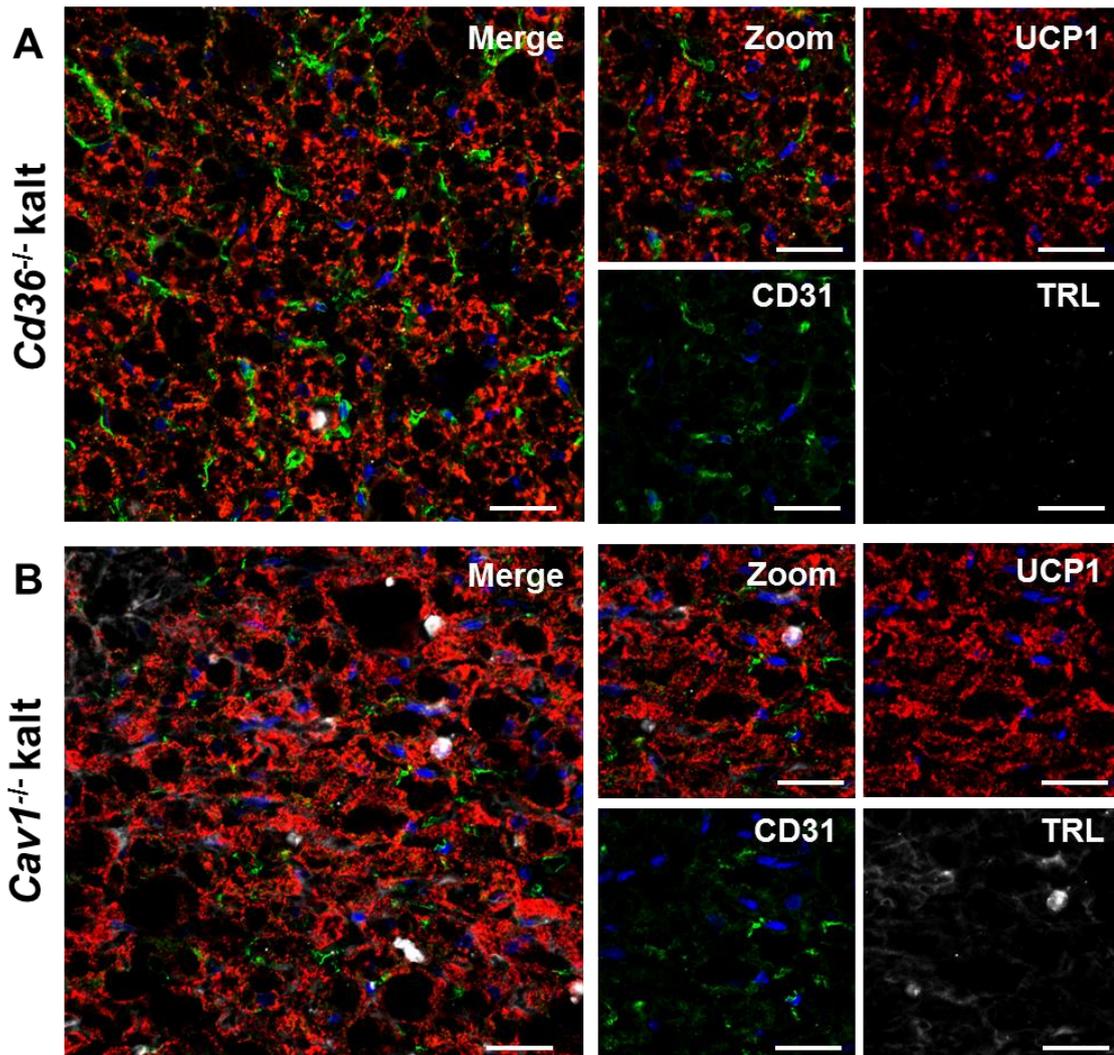


Abbildung 4.2: Visualisierung der Kälte-induzierten Aufnahme postprandialer TRL in das braune Fettgewebe von CD36- und Caveolin-1-defizienten Mäusen
 24 Std Kälte-exponierte (A) Cd36^{-/-} bzw. (B) Caveolin-1 (Cav1^{-/-}) Mäuse wurden 30 min vor Organentnahme mit DiD-markierten TRL intravenös injiziert. Braunes Fettgewebe wurde entnommen und Kryo-Schnitte (8 µm) angefertigt. UCP1 (rot), CD31 (grün) und TRL (weiß) wurden mittels ex vivo Immunfluoreszenz visualisiert. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Der Balken entspricht 25 µm.

4.2 Charakterisierung des molekularen Equipments der verschiedenen Zelltypen des braunen Fettgewebes für die Lipoproteinaufnahme

Kälte-Exposition aktiviert das braune Fettgewebe über Noradrenalin aus sympathischen Fasern. Eine Aktivierung führt in dem Gewebe zu einer massiven Steigerung des Energieumsatzes und damit auch zu einem erhöhten Bedarf an Energie. Um einen generellen Überblick über die transkriptionellen Veränderungen im braunen Fettgewebe nach Kälte-Exposition zu erlangen, wurde zunächst ein Genexpressionsmuster von metabolisch relevanten Genen erstellt. Dafür wurde das braune Fettgewebe aus warmen (27 °C) und kalten (4 °C) Wild-Typ Mäusen

entnommen, daraus die RNA isoliert und mittels quantitativer Taq Man® *real-time* PCR untersucht (Abbildung 4.3).

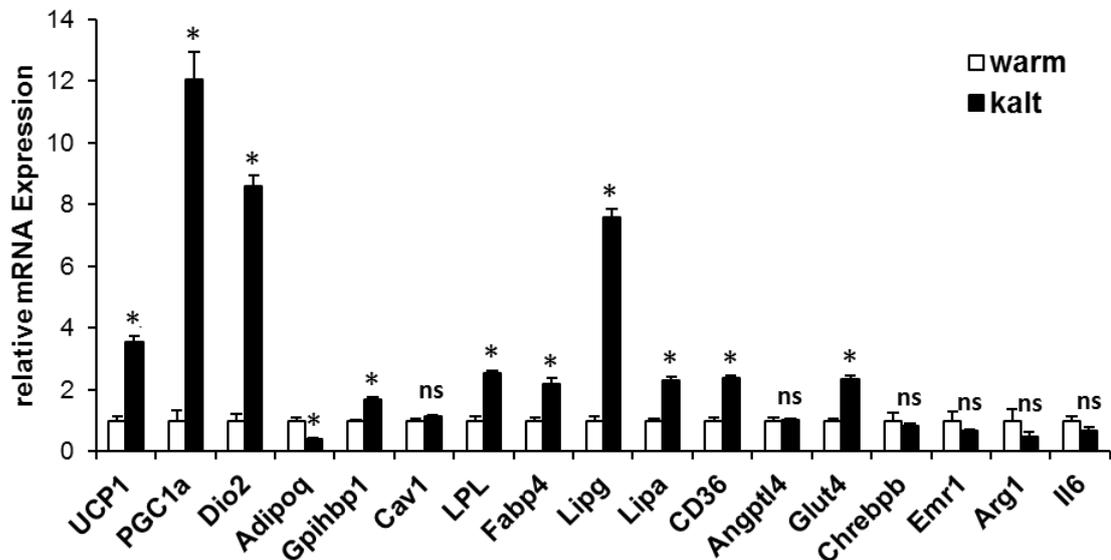


Abbildung 4.3: Genexpressionsmuster von metabolisch relevanten Genen im braunen Fettgewebe

Braunes Fettgewebe aus warmen (27 °C) und kalten (4 °C) Wild-Typ Mäusen wurde entnommen und daraus die RNA isoliert. Die Genexpression wurde mittels quantitativer Taq Man® Real-time PCR untersucht. Die Werte sind für jedes Gen auf die jeweilige warme Kontrollgruppe normalisiert ($n = 8$; Mittelwert \pm S.E.M.; * $P < 0,001$; ns: nicht signifikant).

Wie erwartet wurden Gene, die mit BAT-Aktivierung und Thermogenese assoziiert sind, reguliert. Die Expression von *Ucp1*, *Pgc1a* und *Dio2* war nach 24 Std Kälte-Exposition signifikant erhöht. Nach Kälte-Aktivierung des braunen Fettgewebes war auch die Genexpression von Proteinen, die in lipolytische Prozesse involviert sind (wie z.B. *Gpihbp1*, *Lpl*, *Fabp4*, *Lipg*, *Lipa* und *Cd36* signifikant erhöht. Des Weiteren waren nicht nur Gene reguliert, die den Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel beeinflussen, sondern auch Gene des Glukosestoffwechsels. Die Expression von *Glut4* jedoch nicht von *Chrebbp* wurde durch Kälte signifikant erhöht. Die Expression von *Cav1*, *Angptl4* und Entzündungsmarkern, wie *Emr1*, *Arg1* und *Il6* wurde im Gesamtorgan nicht beeinflusst.

4.2.1 Separation von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Fettzellen

Braunes Fettgewebe ist ein Organ, welches aus braunen Fettzellen, Endothelzellen und aus Immunzellen aufgebaut ist. Jedoch ist wenig über den jeweiligen Beitrag dieser verschiedenen Zelltypen zu der TRL-Prozessierung bekannt. Unter den in Abbildung 4.3 analysierten Genen im Gesamtorgan waren auch Gene, deren Expression nur mit einem bestimmten Zelltyp assoziiert sind. Um nun den Einfluss der

verschiedenen Zelltypen auf die TRL-Prozessierung separat zu untersuchen, wurde eine Methode etabliert, um Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braune Adipozyten (*Flow Through*, FT) aus warmen (27°C) oder Kälte-aktivierten (4°C) braunem Fettgewebe (*Input*) zu separieren (Abbildung 4.4 A). Die Anreicherung und Reinheit der Zellfraktionen wurde mittels *real-time* PCR von zellspezifischen Marker untersucht. Die Expression von *Emr1*, einem spezifischen Makrophagen Marker, war ausschließlich in der CD11B+ Fraktion nachweisbar (Abbildung 4.4 B). Die Expression des spezifischen Markers für Endothelzellen (*Gpihbp1*) war am stärksten in der CD31+ Fraktion detektierbar (Abbildung 4.4 C). Als Marker für Adipozyten wurde Adiponektin (*Adipoq*) gewählt. Die relative Expression war am höchsten in der *Flow Through* (FT) Fraktion (Abbildung 4.4 D). Wie zu erwarten, war die Expression von *Ucp1*, dem Marker für aktivierte braune Adipozyten, signifikant in der kalten FT Fraktion zu sehen (Abbildung 4.4 E). Die *Ucp1* Expression wurde in der CD11B+ als auch CD31+ Fraktion durch Kälte signifikant erhöht. Jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie in der kalten FT Fraktion.

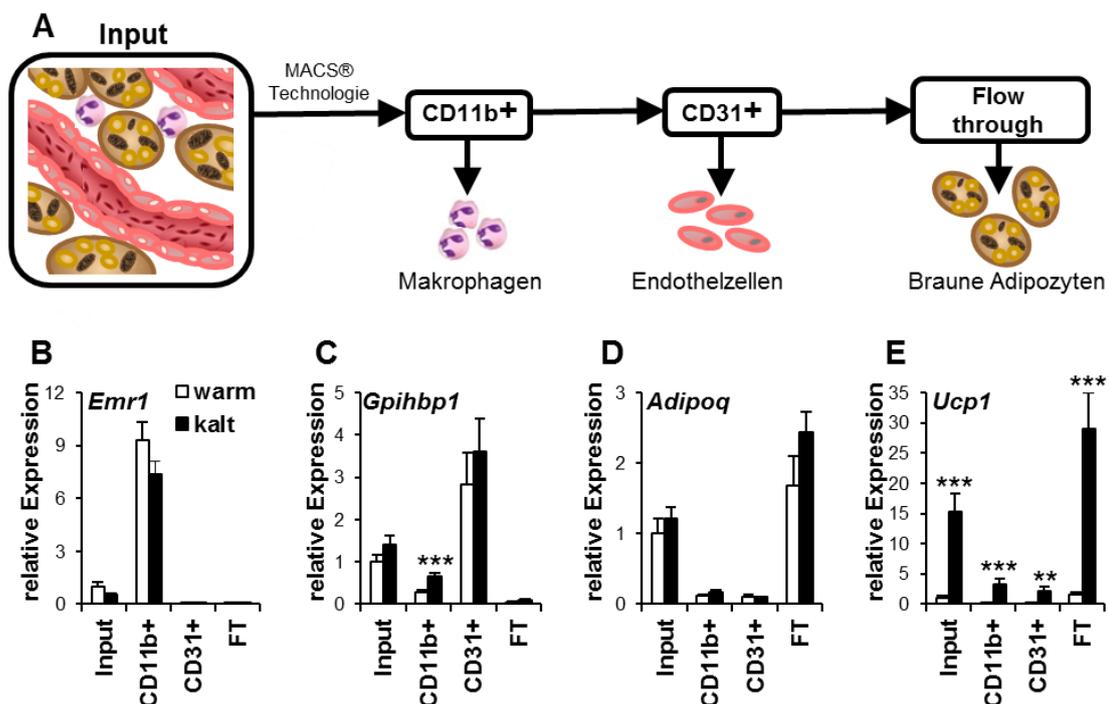


Abbildung 4.4: Isolation von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten aus braunem Fettgewebe

(A) Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braune Adipozyten (*Flow Through*, FT) aus warmen (27 °C) oder Kälte-aktivierten (4 °C) BAT wurden mittels MACS® Technologie separiert. (B-D) Anreicherung und Reinheit der Zellfraktionen wurde mittels *real-time* PCR der zellspezifischen Marker (B) *Emr1* (Makrophagen), (C) *Gpihbp1* (Endothelzellen), (D) *Adipoq* und (E) *Ucp1* (braune Adipozyten) verifiziert. Mittelwert \pm S.E.M; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

4.2.2 Expressionsanalyse metabolisch relevanter Gene in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Fettzellen

Die Expression von Genen der BAT-Aktivierung und Thermogenese sollte durch Kälte induziert werden. Außerdem ist die Expression dieser Gene stark mit braunen Adipozyten assoziiert. In Abbildung 4.5 ist die Expression von *Dio2*, *Pgc1α*, *Fgfr1* und *Klb* in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten dargestellt. Die Expression von *Dio2* und *Pgc1α* wurde durch Kälte-Exposition in braunen Adipozyten (FT Fraktion) stark induziert (Abbildung 4.5 A, B). Eine leichte Induktion der Expression dieser Gene war zusätzlich in den CD11B+ und CD31+ Fraktionen zu sehen. Die Expression von *Fgfr1*, der Rezeptor für den Wachstumsfaktor FGF21, wurde hingegen nicht durch Kälte induziert (Abbildung 4.5 C). Die *Fgfr1* Expression war in der warmen und kalten FT Fraktion etwa 2,3-fach erhöht im Vergleich zu der warmen *Input* Kontrolle. Im Gegensatz zu *Dio2* und *Pgc1α* wurde *Fgfr1* auch stark von Makrophagen (CD11b+ Fraktion) exprimiert. In Endothelzellen (CD31 Fraktion) konnte keine *Fgfr1* Expression nachgewiesen werden. Die Expression von Beta Klotho (*Klb*), einem Ko-Aktivator von FGFR1, wurde hingegen durch Kälte in braunen Adipozyten signifikant erhöht (Abbildung 4.5 E). Eine Expression von *Klb* in Makrophagen (CD11b+ Fraktion) und Endothelzellen (CD31+ Fraktion) konnte nicht beobachtet werden.

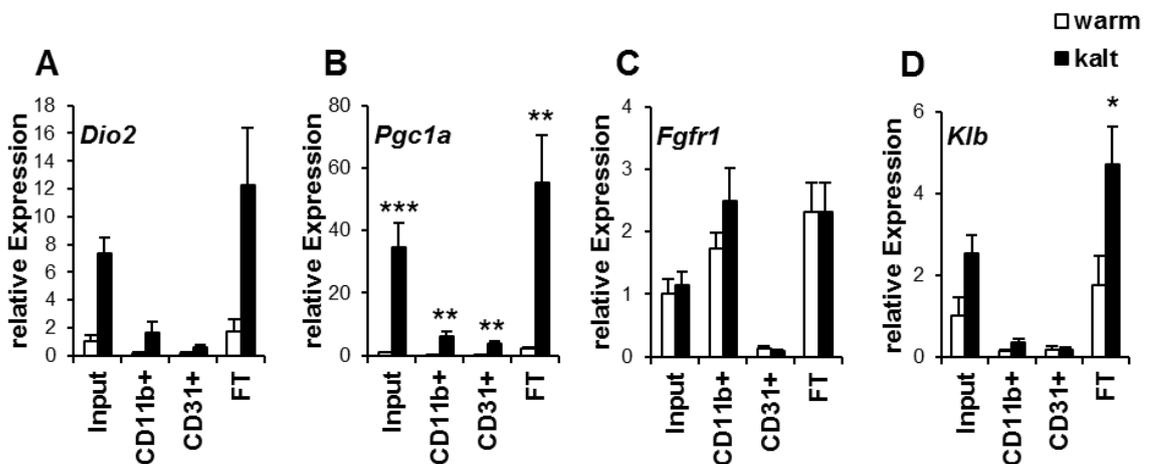


Abbildung 4.5: Genexpression von BAT-Aktivierungsmarkern in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten nach Kälte-Exposition

Die relative Genexpression von (A) *Dio2*, (B) *Pgc1α* (C) *Fgfr1* und (D) *Klb* wurden mittels real-time PCR in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) gemessen. Die jeweiligen Zelltypen wurden aus warmen (27 °C) oder Kälte-aktivierten (4 °C) BAT isoliert. Mittelwert ± S.E.M.; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Um einen detaillierteren Eindruck der Beiträge von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten zu der BAT-vermittelten Lipoprotein-Prozessierung zu erlangen,

wurde die Expression lipolytischer Gene nach Kälte-Exposition analysiert (Abbildung 4.6).

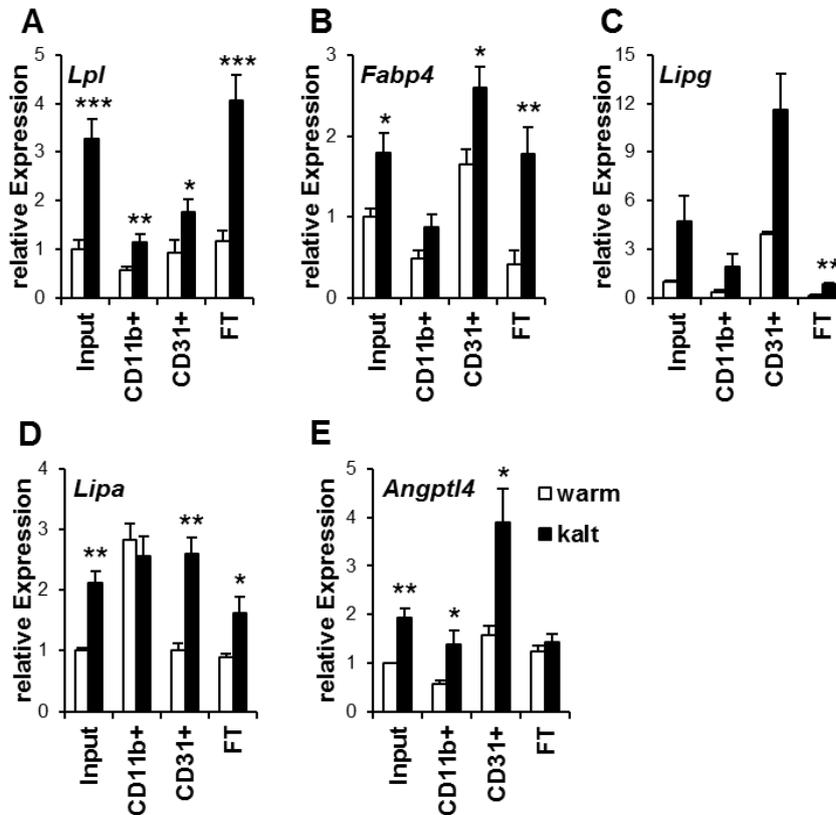


Abbildung 4.6: Expression lipolytischer Gene in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten nach Kälte-Exposition

Die relative Genexpression von (A) *Lpl*, (B) *Fabp4*, (C) *Lipg*, (D) *Lipa* und (E) *Angptl4* wurden mittels real-time PCR in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) gemessen. Die jeweiligen Zelltypen wurden aus warmen (27 °C) oder Kälte-aktivierten (4 °C) BAT isoliert. Mittelwert \pm S.E.M; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Die Expression von *Lpl* und *Fabp4* wurde durch Kälte-Aktivierung am stärksten in braunen Adipozyten induziert (Abbildung 4.6 A-B). Überraschenderweise, wiesen warme als auch kalte Endothelzellen eine deutliche *Lpl* Expression auf (Abbildung 4.6 A). Die Kälte-induzierte Expression von *Fabp4* war in der Fraktion der Endothelzellen nicht so stark ausgeprägt wie in der Fraktion der braunen Adipozyten. Jedoch war das allgemeine Expressionslevel in Endothelzellen höher (Abbildung 4.6 B). Die Expression der endothelialen Lipase (*Lipg*), der lysosomalen Lipase (*Lipa*) und *Angptl4* wurde durch Kälte-Exposition in erster Linie in Endothelzellen und nicht in braunen Adipozyten induziert (Abbildung 4.6 C-E). *Lipg* und *Angptl4* zeigten auch in der CD11B+ Fraktion eine signifikante Expressionserhöhung nach Kälte-Aktivierung auf (Abbildung 4.6 C, E). Die Expression von *Lipa* hingegen wurde in Makrophagen nicht durch Kälte reguliert. Allerdings war das Expressionslevel höher im Vergleich zu den

Endothelzellen und braunen Adipozyten (Abbildung 4.6 D). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von Proteinen, die an der Prozessierung und Aufnahme von TRL beteiligt sind, in Endothelzellen erhöht ist und dort durch Kälte induziert wird.

Aktiviertes braunes Fettgewebe deckt den erhöhten Bedarf an Energie nicht nur über die erhöhte Lipolyse und Aufnahme von Lipiden, sondern auch über eine erhöhte Aufnahme von Glukose ab. Inwiefern die verschiedenen Zellen des braunen Fettgewebes an dem Glukosestoffwechsel beteiligt sind, ist auch noch nicht ausreichend verstanden. Der Insulin-abhängige Glukosetransporter Typ 4 (*Glut4*) wird nach Kälte-Exposition verstärkt in braunen Adipozyten (FT Fraktion) exprimiert. Eine Expression von *Glut4* in der Endothelzellfraktion (CD31+) war hingegen kaum detektierbar (Abbildung 4.7 A). Damit einhergehend konnte die Expression eines Glukose-responsiven Transkriptionsfaktors *Chrebbp* auch nur geringfügig in Endothelzellen detektiert werden. *Chrebbp* wurde in braunen Adipozyten exprimiert, jedoch nicht Kälte-induziert (Abbildung 4.7 B).

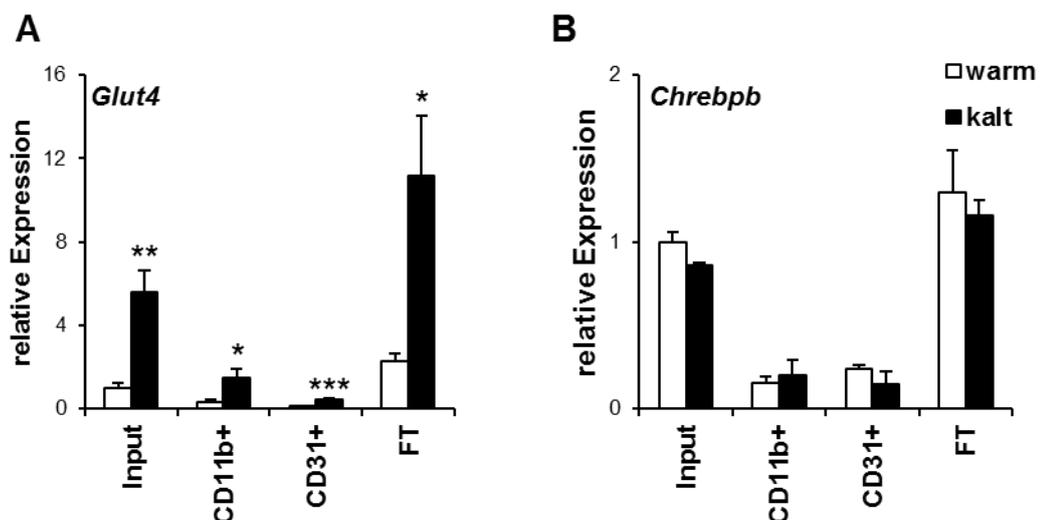


Abbildung 4.7: Expression von Glukosestoffwechsel-assoziierten Genen in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten nach Kälte-Aktivierung

Die relative Genexpression von (A) *Glut4* und (B) *Chrebbp* wurden mittels real-time PCR in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) gemessen. Die jeweiligen Zelltypen wurden aus warmen (27 °C) oder Kälte-aktivierten (4 °C) BAT isoliert. Mittelwert \pm S.E.M.; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Um die Auswirkung der Aktivierung des braunen Fettgewebes auf die Rolle von Makrophagen und entzündliche Prozesse zu untersuchen, wurde zum einen die Expression des pro-inflammatorischen Markers *Il6* und zum anderen die Expression des anti-inflammatorischen Markers *Arg1* in Makrophagen, Endothelzellen und

braunen Adipozyten gemessen (Abbildung 4.8). Die Expression des pro-inflammatorischen Markers *Il6* konnte zunächst in allen Zellfraktionen nachgewiesen werden. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte führte in Makrophagen, Endothelzellen und auch braunen Adipozyten zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *Il6* (Abbildung 4.8 A). Anders verhält es sich mit dem anti-inflammatorischen Marker *Arg1* (Abbildung 4.8 B). Die Expression von *Arg1* wurde durch die Kälte-induzierte Aktivierung des braunen Fettgewebes ausschließlich in Makrophagen stark erhöht.

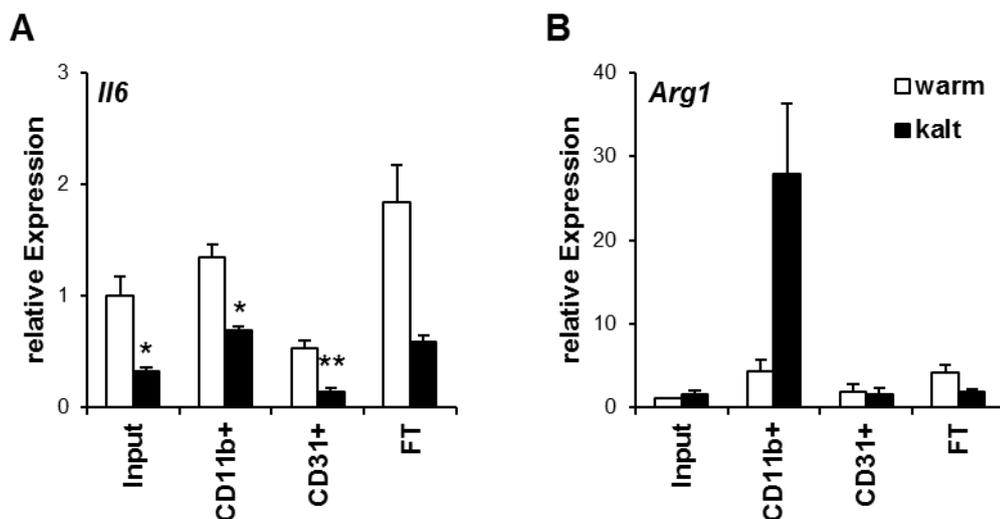


Abbildung 4.8: Expression von pro- und anti-inflammatorischen Genen in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten nach Kälte-Aktivierung

Die relative Genexpression von (A) *Il6* und (B) *Arg1* wurden mittels real-time PCR in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) gemessen. Die jeweiligen Zelltypen wurden aus warmen (27 °C) oder Kälte-aktivierten (4 °C) BAT isoliert. Mittelwert \pm S.E.M.; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.3 Zelltyp-spezifische Aufnahme von TRL in braunes Fettgewebe

Um den Mechanismus der TRL-Internalisierung in das braune Fettgewebe und die Rolle von Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten in diesem Prozess zu quantifizieren, wurden radioaktiv-markierte TRL in 24 Std Kälte-exponierte Wild-Typ Mäuse intravenös injiziert. 15 min nach der Injektion wurde das braune Fettgewebe entnommen. Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) mittels magnetischer Beads separiert (Abbildung 4.4 A). Anschließend wurde die Radioaktivität in den jeweiligen Zelltypen bestimmt.

4.3.1 Rekombinante TRL

Rekombinante Lipoproteine (rekTRL) wurden radioaktiv mit ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und ^{14}C -Triolein markiert. Mit dieser Doppelmarkierung kann gleichzeitig der

Lipoprotein Partikel (^3H) und die hydrolysierten Triglyzeridkomponenten (^{14}C) verfolgt werden (Abbildung 4.9).

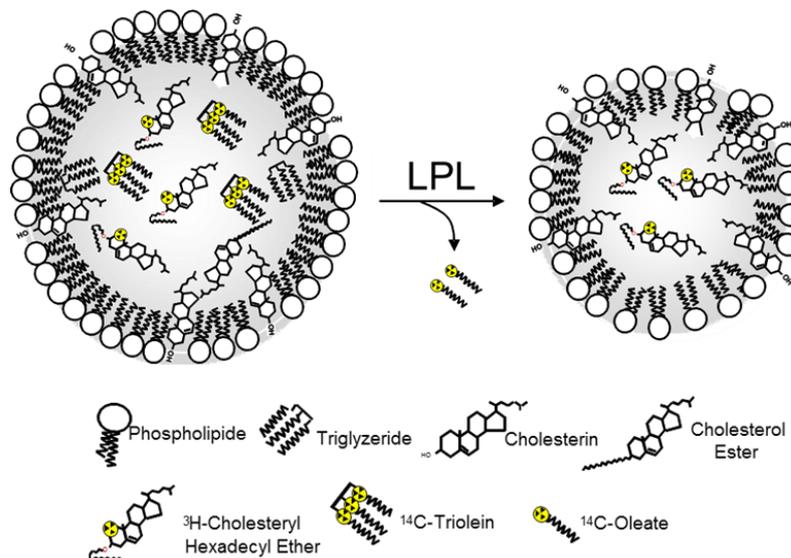


Abbildung 4.9: schematische Darstellung der radioaktiv-markierten rekombinanten Lipoproteine (rekTRL) vor und nach Hydrolyse

Rekombinante Lipoproteine (rekTRL) radioaktiv-markiert mit ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und ^{14}C -Triolein wurden genutzt um simultan den Lipoprotein Partikel (^3H) und die hydrolysierten Triglyzeridkomponenten (^{14}C) zu verfolgen (das Layout wurde adaptiert von Bruns et al, 2009).

15 min nach der Injektion der rekTRL konnte unter allen Zellfraktionen die höchste Menge ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität in Kälte-aktivierten Endothelzellen gemessen werden (Abbildung 4.10 A, B; CD31+ Fraktion). In beiden Fällen war die zellspezifische Aufnahme von ^3H - und ^{14}C signifikant erhöht im Vergleich zu warmen Endothelzellen. Makrophagen von Kälte-exponierten Mäusen wiesen auch eine signifikant erhöhte Aufnahme der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität auf (Abbildung 4.10 A, B; CD11b+ Fraktion). Jedoch nicht im gleichen Maße wie Endothelzellen. ^3H -Radioaktivität konnte weder in warmen noch in kalten braunen Adipozyten detektiert werden (Abbildung 4.10 A; FT Fraktion). Dahingegen konnte die Aufnahme von hydrolysierten Triglyzeridkomponenten (^{14}C) in braunen Adipozyten gemessen werden. Die zellspezifische Aufnahme von ^{14}C war nach Kälte-Exposition signifikant erhöht (Abbildung 4.10 B; FT Fraktion).

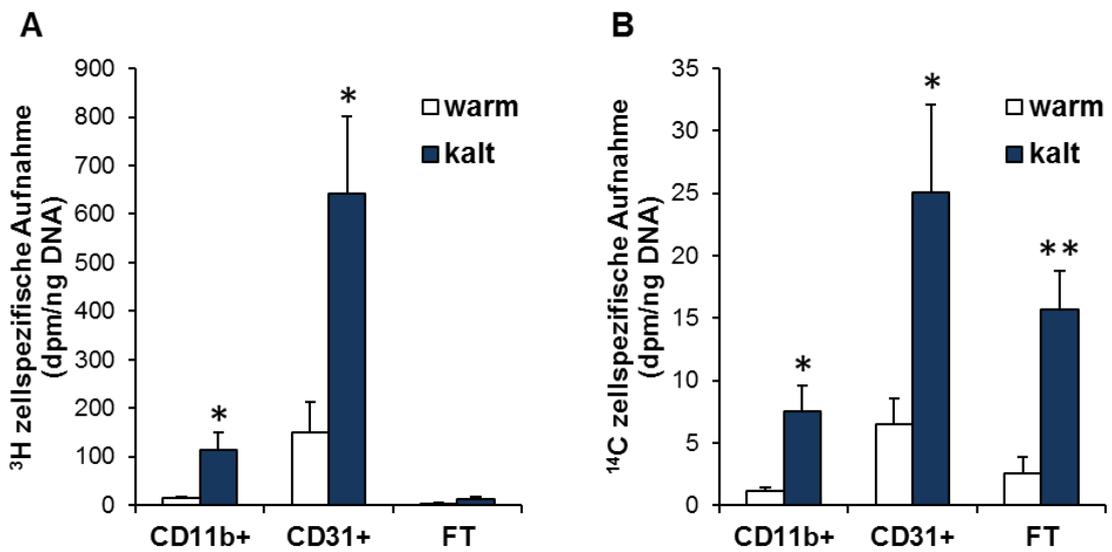


Abbildung 4.10: Zellspezifische Aufnahme von radioaktiv-markierten rekTRL in braunes Fettgewebe.

C57BL/6 Wild-Typ Mäuse wurden 24 Std bei warmen (27 °C) und kalten (4 °C) Temperaturen gehalten. ^3H - ^{14}C -rekTRL wurden intravenös injiziert. Nach 15 min wurde das braune Fettgewebe entnommen und für die Zellseparation mittels magnetischer Beads benutzt. Die zellspezifische Aufnahme von (A) ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und (B) ^{14}C -Triolein wurde in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) analysiert. Die Daten von fünf unabhängigen Experimenten wurden auf die jeweilige injizierte Tracer Dosis normalisiert und zusammengefasst. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Student's T-test).

4.3.2 Native TRL

Um zu testen, ob sich rekTRL *in vivo* genauso wie native TRL verhalten, wurden der Proteinanteil muriner TRL mit ^{125}I radioaktiv markiert. 15 min nach der Injektion der nativen ^{125}I -TRL konnte die höchste ^{125}I -Radioaktivität in Endothelzellen von Kälte-exponierten Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 4.11; CD31+ Fraktion). Kälte-aktivierte Makrophagen haben im Unterschied zu der Aufnahme von rekTRL keine nativen TRL aufgenommen (Abbildung 4.11; CD11b+ Fraktion). Eine leicht erhöhte zellspezifische Aufnahme der ^{125}I -Radioaktivität konnte in Kälte-aktivierten braunen Adipozyten gemessen werden (Abbildung 4.11; CD11b+ Fraktion).

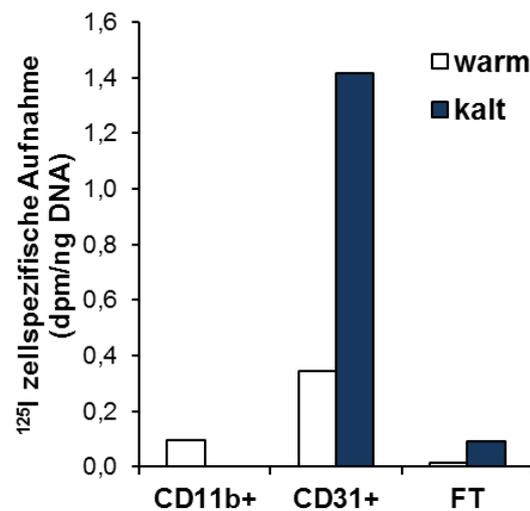


Abbildung 4.11: Zelltypspezifische Aufnahme von nativen TRL in braunes Fettgewebe
 C57BL/6 Wild-Typ Mäuse wurden 24 Std bei warmen (27 °C) und kalten (4 °C) Temperaturen gehalten. ^{125}I -markierte native TRL wurden intravenös injiziert. Nach 15 min wurde das braune Fettgewebe entnommen und für die Zellseparation mittels magnetischer Beads benutzt. Die zellspezifische Aufnahme von ^{125}I wurde in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) analysiert.

4.4 Untersuchung der TRL Aufnahme in das braune Fettgewebe transgener Mäuse

Bartelt et al. (2011) haben CD36 als wichtigen Mitspieler für die Lipoprotein Aufnahme in das braune Fettgewebe identifiziert. Auch Caveolin-1 (Cav1) ist für endozytische Prozesse wichtig. In Abschnitt 4.1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufnahme von DiD-TRL in das braune Fettgewebe von CD36- und Cav1-defiziente Mäuse (*Cd36*^{-/-}, bzw. *Cav1*^{-/-}) beeinträchtigt war. Um nun die Funktion und vor allem die Zelltypspezifische Rolle von CD36 und Cav1 bei der Aufnahme von TRL in das braune Fettgewebe zu untersuchen, wurde in Wild-Typ Mäusen zunächst die Zelltypspezifische Expression, sowie die Lokalisation an der luminalen Plasmamembran von Endothelzellen in Abhängigkeit von Kälte-Exposition mittels *real-time* PCR, bzw. *in vivo* Biotinylierung bestimmt. Des Weiteren wurden *Cd36*^{-/-} und *Cav1*^{-/-} Mäuse verwendet und die Aufnahme von rekTRL in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten verfolgt.

4.4.1 Bedeutung von CD36

Die Expression von *Cd36* konnte in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) nachgewiesen werden (Abbildung 4.12 A). Eine Kälte-induzierte signifikante Steigerung der *Cd36* Expression konnte hingegen

ausschließlich in Endothelzellen und Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 4.12 A; CD11b⁺ und CD31⁺ Fraktion). Darüber hinaus führte Kälte-Exposition zu einer verstärkten CD36 Lokalisation an der luminalen Plasma Membran von Endothelzellen (Abbildung 4.12 B). Die Lokalisation von GPIHBP1 wird durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes nicht beeinflusst, sodass GPIHBP1 hier als Ladekontrolle genutzt werden konnte.

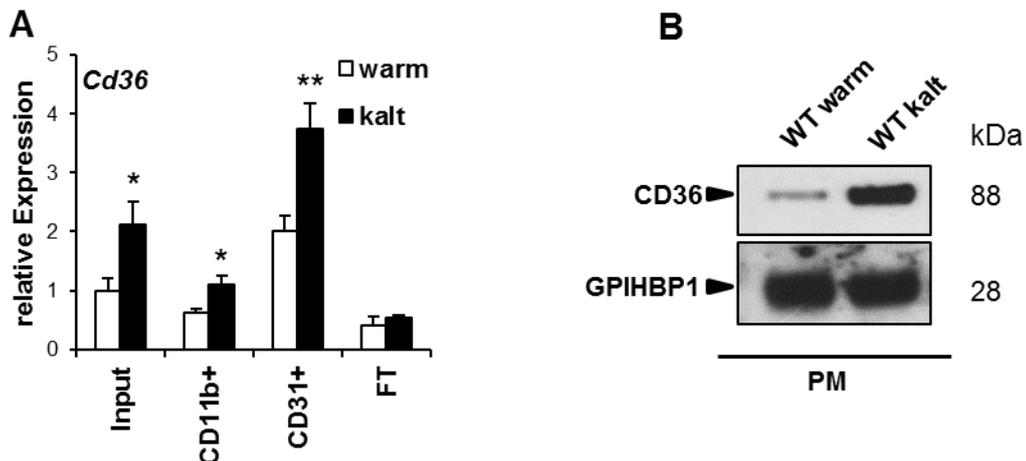


Abbildung 4.12: Expression und Lokalisation von CD36 in aktiviertem braunem Fettgewebe

Die Expression und Lokalisation von CD36 wurde in BAT von warmen (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierten (4 °C) C57BL/6 Wild-Typ (WT) Mäusen analysiert. (A) Die Expression von Cd36 wurde in Makrophagen (CD11b⁺), Endothelzellen (CD31⁺) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) mittels real-time PCR gemessen. (B) Die Lokalisation von CD36 an der luminalen Plasmamembran (PM) von Endothelzellen wurde durch *in vivo* Biotinylierung und anschließender Westernblot Analyse untersucht. Mittelwert ± S.E.M.; *P<0,05; **P<0,01.

Als nächstes wurden ³H-¹⁴C-*rekTRL* in *Cd36*^{-/-} und entsprechende Wild-Typ (*Cd36*^{+/+}) Mäuse injiziert. Anschließend wurden Makrophagen (CD11b⁺), Endothelzellen (CD31⁺) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) separiert und die Radioaktivität in den jeweiligen Zellfraktionen bestimmt. In Abbildung 4.13 ist deutlich zu sehen, dass *Cd36*^{-/-} Endothelzellen die Aufnahme von *rekTRL* nach Kälte-Exposition nicht erhöhten, im Vergleich zu *Cd36*^{+/+} Endothelzellen. Die spezifische Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein war vergleichbar mit der Aufnahme bei warmen Bedingungen (Abbildung 4.13; CD31⁺ Fraktion). Des Weiteren konnte in Kälte-aktivierten *Cd36*^{-/-} Makrophagen weniger ³H- und ¹⁴C-Radioaktivität im Vergleich zu *Cd36*^{+/+} Makrophagen gemessen werden (Abbildung 4.13; CD11b⁺ Fraktion) Im Vergleich zu *Cd36*^{+/+} braunen Adipozyten, konnte in der *Cd36*^{-/-} FT Fraktion weniger ¹⁴C-Radioaktivität detektiert werden (Abbildung 4.13 B; FT Fraktion).

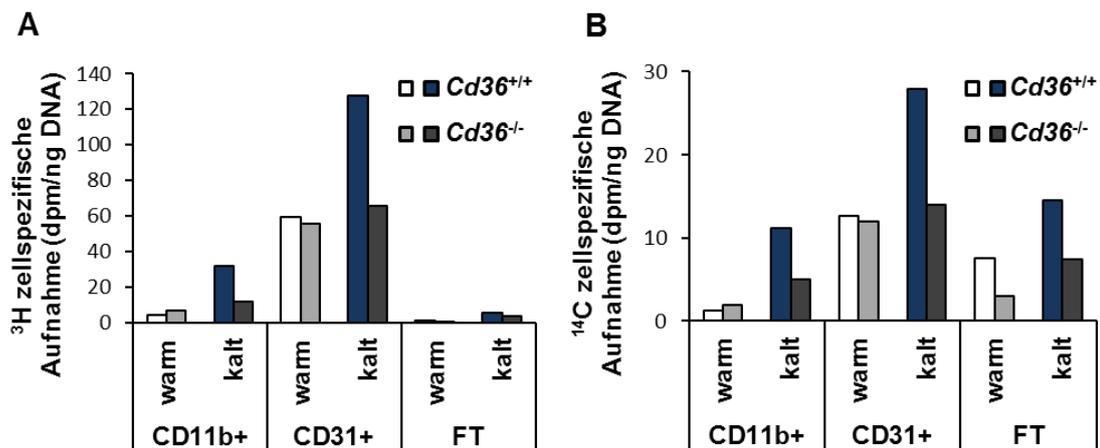


Abbildung 4.13: Zellspezifische Aufnahme von radioaktiv-markierten rekTRL in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten von CD36-defizienten und Wild-Typ Mäusen

³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein markierte rekTRL wurden in warme (27 °C) und 6 Std Kälte-exponierte (4 °C) Cd36^{-/-} und Wild-Typ (Cd36^{+/+}) Mäuse intravenös injiziert. 15 min nach der Injektion wurde das braune Fettgewebe entnommen und Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braune Adipozyten (Flow Through, FT) wurden mit magnetischen Beads isoliert. Anschließend wurde die zellspezifische Aufnahme von (A) ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und (B) ¹⁴C-Triolein in die jeweiligen Zelltypen bestimmt. Pro Gruppe wurden 6 BAT vereinigt.

Die insgesamt niedrigere Aufnahme von rekTRL in die Cd36^{-/-} Zellfraktionen (Abbildung 4.13), stimmte mit der Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in das Gesamtorgan überein (Abbildung 4.14 A, C). Cd36^{-/-} Mäuse zeigten eine signifikant niedrigere rekTRL Aufnahme in das braune Fettgewebe im Vergleich zu Cd36^{+/+} Mäusen. Während die Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in das braune Fettgewebe von Wild-Typ Mäusen stark erhöht war, wurden weniger rekTRL in die Leber aufgenommen. Die Aufnahme von ³H- und ¹⁴C-Radioaktivität in die Leber von Kälte-exponierten Cd36^{-/-} Mäusen war mit der Aufnahme im Wild-Typ vergleichbar. Da die Aufnahme der rekTRL in das braune Fettgewebe von Cd36^{-/-} Mäusen nach Kälte-Exposition nicht erhöht war, scheinen die rekTRL länger im Blut zu zirkulieren. Damit übereinstimmend konnte signifikant höhere ³H- und ¹⁴C-Radioaktivität im Plasma gemessen werden wenn CD36 fehlt (Abbildung 4.14 B, D). Die Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in andere metabolisch-aktive Organe, wie Herz und Muskel, unterschieden sich nicht zwischen den Genotypen. Interessanterweise wurden TRL-Partikel (³H) als auch Fettsäuren (¹⁴C) signifikant weniger von Cd36^{-/-} inguinal WAT aufgenommen.

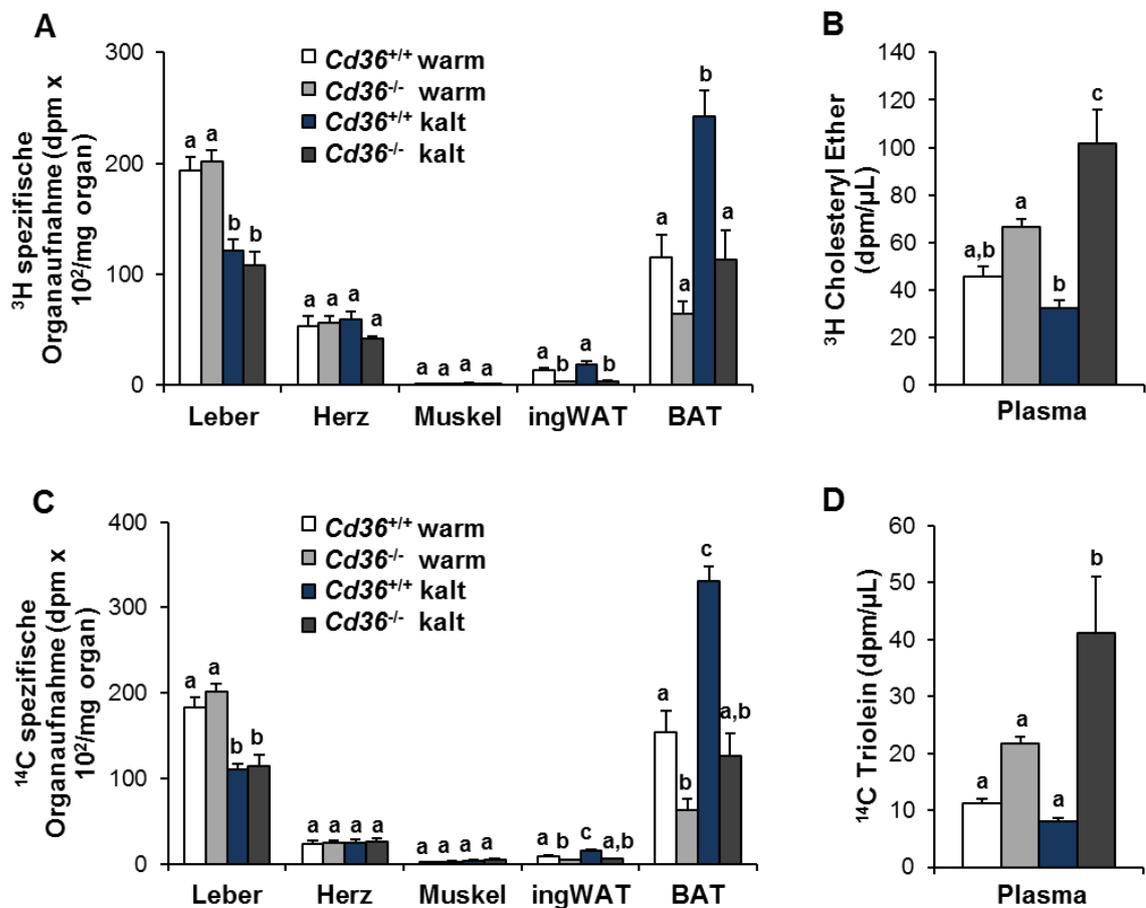


Abbildung 4.14: Aufnahme von radioaktiv-markierten rekTRL in CD36-defizienten und Wild-Typ Mäusen

^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und ^{14}C -Triolein markierte rekTRL wurden in warme (27°C) und 6 Std Kälte-exponierte (4°C) $Cd36^{-/-}$ und Wild-Typ ($Cd36^{+/+}$) Mäuse intravenös injiziert. 15 min nach der Injektion wurden (A) Organverteilung und (B) Plasma Konzentration der ^3H -Radioaktivität, sowie (C) Organverteilung und (D) Plasma Konzentration der ^{14}C -Radioaktivität gemessen ($n = 6$; Mittelwert \pm S.E.M). Die statistische Signifikanz wurde per two-way ANOVA ermittelt ($*P < 0.05$). Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (a,b,c) unterscheiden sich nicht signifikant. ingWAT, inguinales weißes Fettgewebe.

4.4.2 Bedeutung von Caveolin-1

Die Expression von *Cav1* konnte in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) nachgewiesen werden, wobei die stärkste Expression in Endothelzellen gemessen wurde (Abbildung 4.15). Die Expression von *Cav1* wurde in keiner Zellfraktion durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes reguliert.

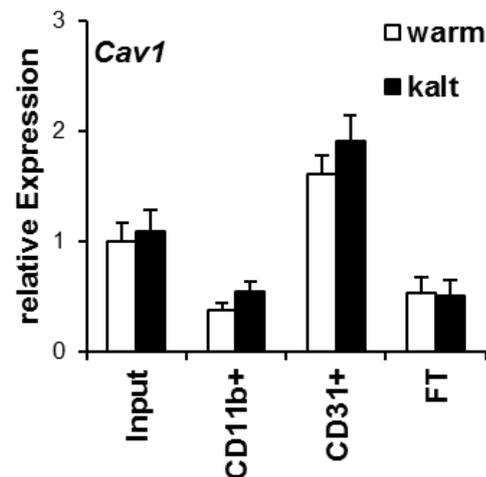


Abbildung 4.15: Expression von Caveolin-1 in aktiviertem braunem Fettgewebe

Die Expression von Caveolin-1 (*Cav1*) wurde in BAT von warmen (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierten (4 °C) C57BL/6 Wild-Typ (WT) Mäusen analysiert. Die Expression von *Cav1* wurde in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) mittels real-time PCR gemessen.

Nach der Injektion von ^3H - ^{14}C -rekTRL in *Cav1*^{-/-} und entsprechende Wild-Typ (*Cav1*^{+/+}) Mäuse, wurden Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) separiert. Anschließend wurde die Radioaktivität in den jeweiligen Zellfraktionen bestimmt. In Abbildung 4.16 ist zu sehen, dass die höchste Menge ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität in Kälte-aktivierten *Cav1*^{+/+} Endothelzellen gemessen werden konnte (Abbildung 4.16; CD31+ Fraktion). *Cav1*^{-/-} Endothelzellen nahmen nach Kälte-Exposition im Vergleich weniger rekTRL auf. Des Weiteren konnte in Kälte-aktivierten *Cav1*^{-/-} Makrophagen weniger ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität im Vergleich zu *Cav1*^{+/+} Makrophagen gemessen werden (Abbildung 4.16; CD11b+ Fraktion). Im Vergleich zu *Cav1*^{+/+} braunen Adipozyten, nahmen *Cav1*^{-/-} braune Adipozyten deutlich weniger ^{14}C -Radioaktivität auf (Abbildung 4.16 B; FT Fraktion).

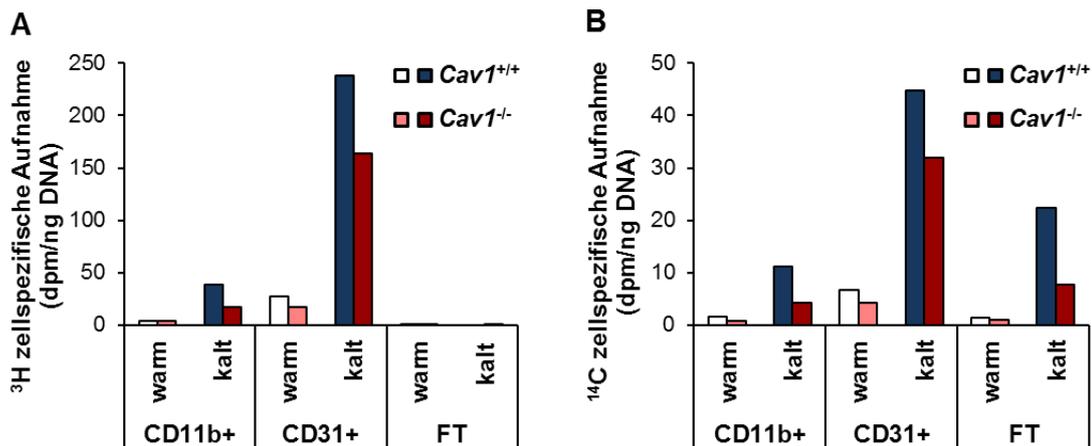


Abbildung 4.16: Zellspezifische Aufnahme von radioaktiv-markierten rekTRL in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten von Cav1-defizienten und Wild-Typ Mäusen

³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein markierte rekTRL wurden in warme (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierte (4 °C) Cav1^{-/-} und Wild-Typ (Cav1^{+/+}) Mäuse intravenös injiziert. 15 min nach der Injektion wurde das braune Fettgewebe entnommen und Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braune Adipozyten (Flow Through, FT) wurden mit magnetischen Beads isoliert. Anschließend wurde die zellspezifische Aufnahme von (A) ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und (B) ¹⁴C-Triolein in die jeweiligen Zelltypen bestimmt. Pro Gruppe wurden 6 BAT vereinigt.

Die auf zellulärer Ebene beobachtete geringere Aufnahme der rekTRL in Kälte-aktivierte Cav1^{-/-} Mäuse (Abbildung 4.16 A, B), stimmte nicht mit der Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in das Gesamtorgan überein. (Abbildung 4.17 A, C). Hier war die Aufnahme der rekTRL in das braune Fettgewebe von Cav1^{-/-} Mäusen vergleichbar mit der Aufnahme in das braune Fettgewebe von Cav1^{+/+} Mäusen. Beide Genotypen zeigten eine Kälte-induzierte Verschiebung der Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein von der Leber hin zum braunen Fettgewebe. Damit übereinstimmend konnte im Plasma ein signifikanter Unterschied nach Kältebehandlung gemessen werden. Nach der Aktivierung des braunen Fettgewebes konnte signifikant weniger ³H- und ¹⁴C-Radioaktivität im Plasma nachgewiesen werden (Abbildung 4.17 B, D). Das Fehlen von Cav1 hatte jedoch keinen Einfluss. Ohne die Aktivierung des braunen Fettgewebes zeigten Cav1^{-/-} Mäuse allerdings signifikant geringere Fettsäurewerte (¹⁴C) im Plasma im Vergleich zu Cav1^{+/+} Mäusen (Abbildung 4.17 D). Die Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in das Herz und in das inguinal WAT unterschied sich nicht zwischen den Genotypen. Zwar unterschied sich die Aufnahme der TRL-Partikel (³H) als auch Fettsäuren (¹⁴C) in den Muskel von Kälte-exponierten Cav1^{+/+} und Cav1^{-/-} Mäusen nicht

voneinander, jedoch war die Aufnahme beider Radioaktivitäten in warme *Cav1*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wild-Typ (*Cav1*^{+/+}) Tieren signifikant erhöht (Abbildung 4.17 A, C).

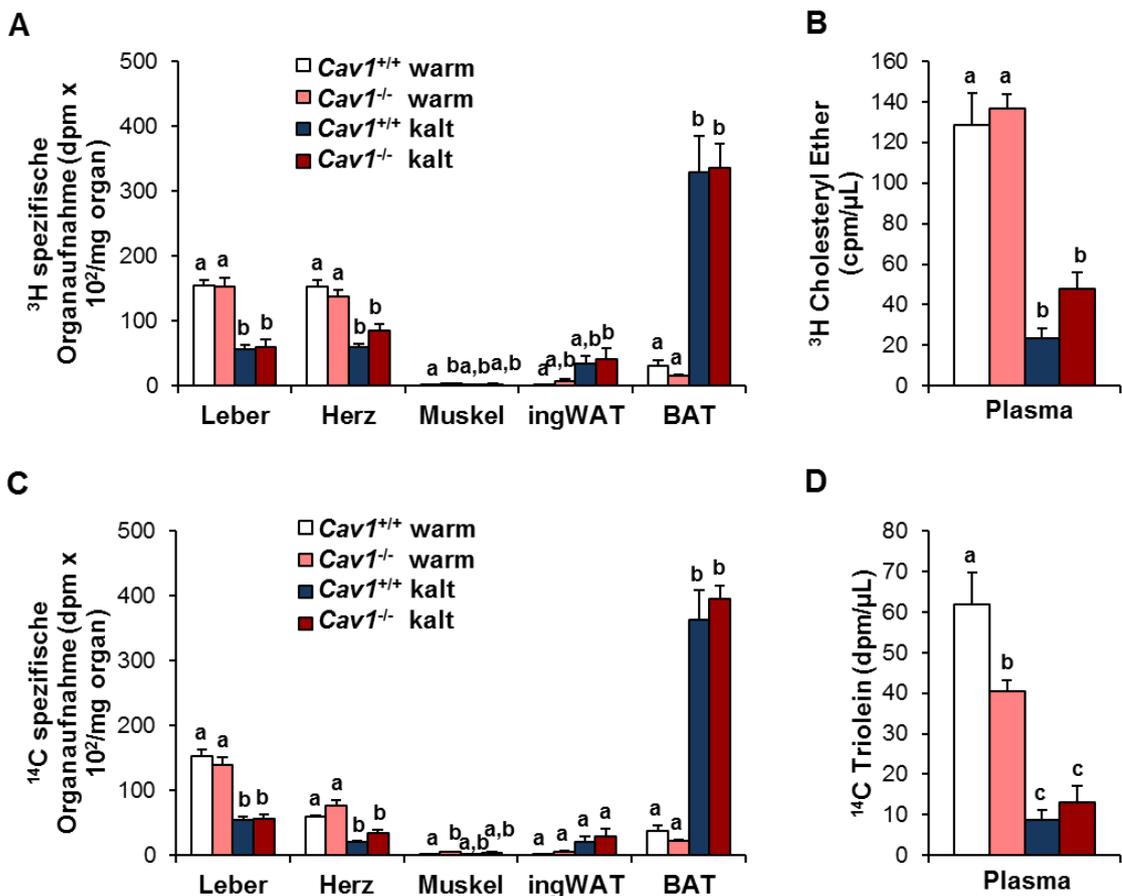


Abbildung 4.17 Aufnahme von radioaktiv-markierten rekTRL in Caveolin-1 defizienten und Wild-Typ Mäusen

³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein markierte rekTRL wurden in warme (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierte (4 °C) *Cav1*^{-/-} und Wild-Typ (*Cav1*^{+/+}) Mäuse intravenös injiziert. 15 min nach der Injektion wurden (A) Organverteilung und (B) Plasma Konzentration der ³H-Radioaktivität, sowie (C) Organverteilung und (D) Plasma Konzentration der ¹⁴C-Radioaktivität gemessen (n = 6; Mittelwert ± S.E.M). Die statistische Signifikanz wurde per two-way ANOVA ermittelt (*P<0.05). Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (a,b,c) unterscheiden sich nicht signifikant. ingWAT, inguinales weißes Fettgewebe.

4.4.2.1 Untersuchung der endothelialen Permeabilität in Wild-Typ und Caveolin-1-defizienten Mäusen

Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen der rekTRL Aufnahme auf zellulärer Ebene (Abbildung 4.16) und der Aufnahme von rekTRL in das braune Fettgewebe (Abbildung 4.17) von Caveolin-1 defizienten (*Cav1*^{-/-}) Mäusen, könnte ein Defekt in der Barriere Funktion des Endothels sein. Um die Integrität der Endothelbarriere bei Caveolin-1 Defizienz und Kälte-Exposition zu untersuchen, wurde ¹²⁵I-Albumin in warme (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierte (4 °C) *Cav1*^{-/-} und Wild-Typ

(*Cav1^{+/+}*) Mäuse injiziert. Anschließend wurde die Organverteilung sowie die Plasma Konzentration von ^{125}I gemessen. In Abbildung 4.18 ist zu sehen, dass Kälte-Exposition keinen Einfluss auf die endotheliale Barriere Funktion hat. Dahingegen führt Caveolin-1 Defizienz bei warmen als auch Kälte-exponierten Mäusen zu einer signifikant erhöhten Aufnahme von ^{125}I in metabolisch-aktive Organe, wie Muskel, subskapuläres braunes Fettgewebe (scBAT) und interskapuläres braunes Fettgewebe (iBAT). Eine signifikant erhöhte ^{125}I Aufnahme konnte auch in das inguinale weiße Fettgewebe von Kälte-exponierten *Cav1^{-/-}* Mäusen beobachtet werden. In der Leber und im Herzen führte weder Kälte-Exposition noch Caveolin-1 Defizienz zu einer erhöhten Aufnahme von ^{125}I (Abbildung 4.18 A). Die erhöhte Aufnahme von ^{125}I in die Organe von *Cav1^{-/-}* Mäusen spiegelte sich auch in der ^{125}I Plasmakonzentration wider. *Cav1^{-/-}* Mäuse wiesen unabhängig von der Kälte-Exposition eine signifikant geringere ^{125}I Plasmakonzentration als *Cav1^{+/+}* Mäuse auf (Abbildung 4.18 B).

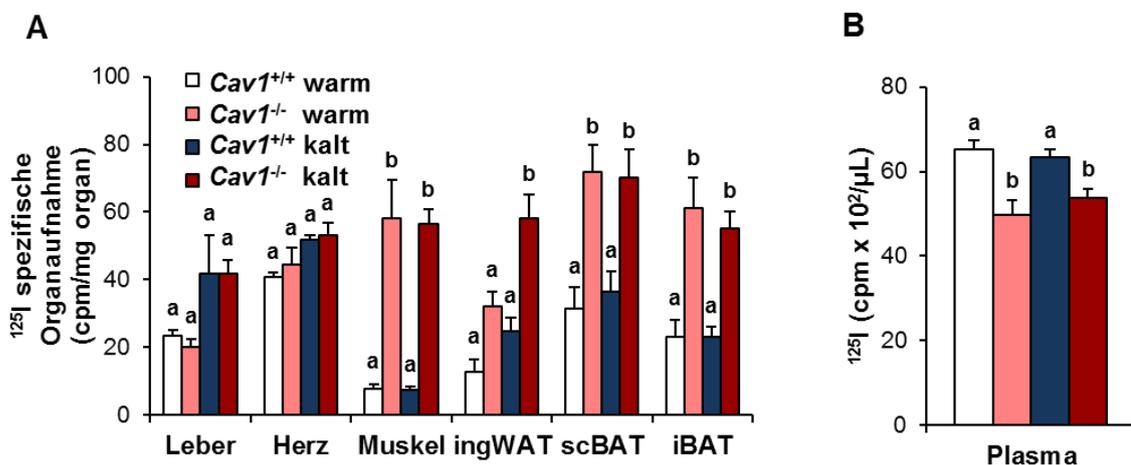


Abbildung 4.18: Einfluss von Caveolin-1-Defizienz und Kälte-Exposition auf die Permeabilität des Endothels

Die endotheliale Permeabilität wurde durch die Injektion von ^{125}I -Albumin in warme (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierte (4 °C) Caveolin-1 defiziente (*Cav1^{-/-}*) und Wild-Typ (*Cav1^{+/+}*) Mäuse untersucht. 1 Std nach Injektion wurde (A) Organverteilung und (B) Plasma Konzentration von ^{125}I wurde gemessen ($n = 5$; Mittelwert \pm S.E.M.). Die statistische Signifikanz wurde per two-way ANOVA ermittelt ($*P < 0.05$). Gruppen mit dem gleichen Buchstaben (a,b,c) unterscheiden sich nicht signifikant. ingWAT, inguiniales weißes Fettgewebe; scBAT, subskapuläres braunes Fettgewebe; iBAT, interskapuläres braunes Fettgewebe.

4.5 Untersuchung der intrazellulären Prozessierung von TRL im Endothel

Um die Kinetik der TRL Internalisierung und Prozessierung zu analysieren, wurden ^3H - ^{14}C -rekTRL intravenös in warme (27 °C) und Kälte-exponierte (4 °C) C57BL/6 Wild-Typ Mäuse injiziert. Nach 15 min, beziehungsweise 60 min wurde das braune Fettgewebe entnommen und Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) mittels magnetischer Beads separiert. Im Anschluss wurde die Radioaktivität in den jeweiligen Zellfraktionen bestimmt. 15 min nach der rekTRL Injektion konnte, wie bereits gezeigt, die höchste Menge der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität in aktivierten Endothelzellen detektiert werden (Abbildung 4.19 A, B; CD31+ Fraktion). Wie bereits gezeigt wurde, konnte keine zellspezifische Aufnahme von ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether in braune Adipozyten weder nach 15 min, noch nach 60 min beobachtet werden (Abbildung 4.19 A; FT Fraktion). Dahingegen konnte in braunen Adipozyten 15 min und 60 min nach Injektion eine in gleichem Maße erhöhte ^{14}C -Radioaktivität gemessen werden (Abbildung 4.19 B; FT Fraktion). Darüber hinaus nahm die Detektion von ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und ^{14}C -Triolein in aktivierten Endothelzellen nach 60 min deutlich ab.

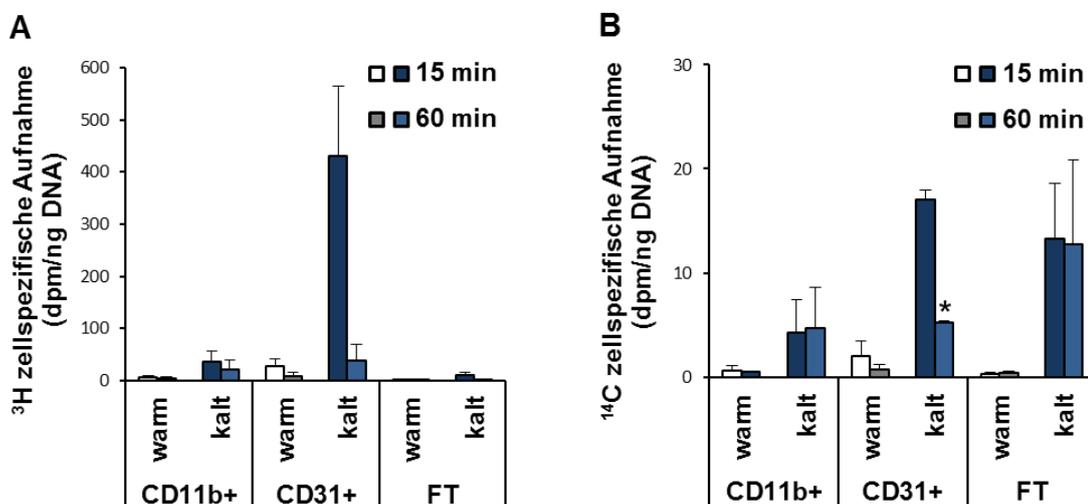


Abbildung 4.19: Zelltyp-spezifische Aufnahme Kinetik von radioaktiv-markierten rekTRL
 ^3H - ^{14}C -rekTRL wurden intravenös in warme (27 °C) und Kälte-exponierte (4 °C) C57BL/6 Wild-Typ Mäuse injiziert. Nach 15 min, beziehungsweise 60 min wurde das braune Fettgewebe entnommen und für die Zellseparation mittels magnetischer Beads benutzt. Die zellspezifische Aufnahme von (A) ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und (B) ^{14}C -Triolein wurde in Makrophagen (CD11b+), Endothelzellen (CD31+) und braunen Adipozyten (Flow Through, FT) analysiert. Die Daten von zwei unabhängigen Experimenten wurden auf die jeweilige injizierte Tracer Dosis normalisiert und zusammengefasst.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass intakte TRL-Partikel von Kälte-aktivierten Endothelzellen aufgenommen werden und intrazellulär prozessiert werden müssen, um die Triglyzeridkomponenten für die braunen Adipozyten bereitzustellen. Da Lysosomen das Hauptorganell für den Abbau von zellfremden und zelleigenen Makromolekülen darstellen, wäre eine lysosomale Prozessierung in den Endothelzellen der TRL denkbar. Um die mögliche lysosomale Prozessierung im Endothel zu untersuchen, wurde die Lokalisation von TRL in aktiviertem braunem Fettgewebe mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Dafür wurden Vibratom-Schnitte von Geweben aus 24 St Kälte-exponierten Wild-Typ Mäusen analysiert, denen zuvor Fluoreszenz-markierten TRL injiziert wurden. Um die potentielle Lokalisation der TRL in Endothelzellen und Lysosomen zu visualisieren, wurde das Endothel mit einem Antikörper gegen GPIHBP1, die Lysosomen mit einem spezifischen Antikörper gegen LAMP2, inkubiert. Für die Detektion von braunen Adipozyten wurden die Schnitte zusätzlich mit einem Antikörper gegen Perilipin inkubiert.

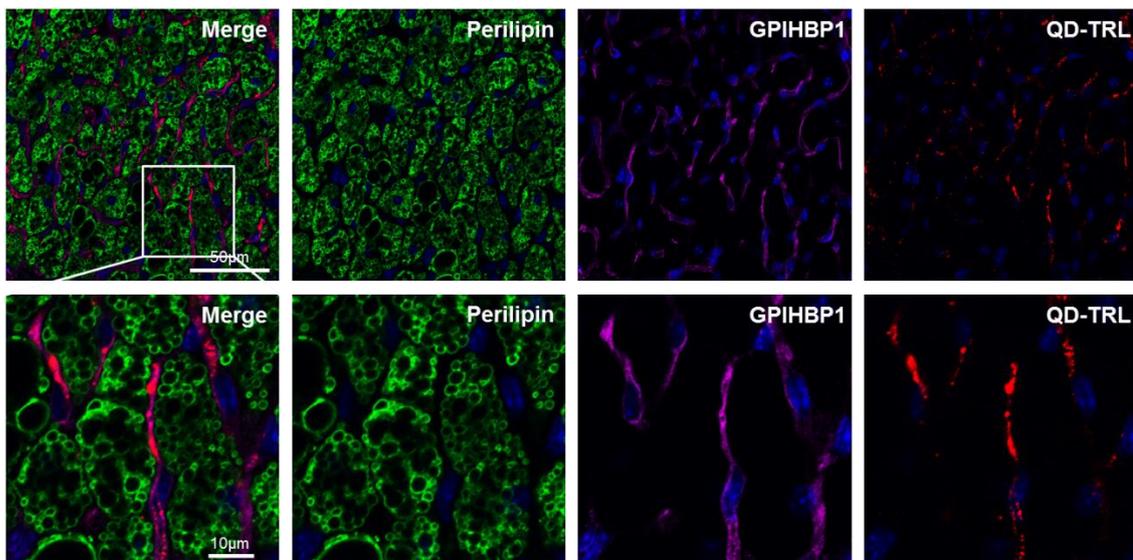


Abbildung 4.20: Visualisierung der Aufnahme von rekTRL in Endothelzellen nach BAT-Aktivierung

Wild-Typ Mäuse wurden 24 Std bei 4 °C gehalten und 15 min vor Organentnahme mit Fluoreszenz-markierten rekTRL (QD-TRL) intravenös injiziert. Braunes Fettgewebe wurde entnommen und Vibratom-Schnitte (200 µm) angefertigt. Perilipin (grün), GPIHBP1 (violett) UND QD-TRL (rot) wurden mittels ex vivo Immunfluoreszenz visualisiert. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Bildausschnitte (weiße Kästen) sind vergrößert dargestellt.

Wie erwartet, führte Kälte-Exposition zu einer Aufnahme von QD-TRL (rot) in Endothelzellen (violett) (Abbildung 4.20). Des Weiteren konnte eine Koloration von QD-TRL mit dem Lysosomen Marker LAMP2 (violett) detektiert werden (Abbildung 4.21). Da das Expressionsmuster von GPIHBP1 und LAMP2 sich stark ähneln, ist

davon auszugehen, dass die detektierten Lysosomen in Endothelzellen lokalisiert sind. Eine Kolokalisation von QD-TRL mit braunen Adipozyten (grün) ist weder in Abbildung 4.20 noch in Abbildung 4.21 zu finden.

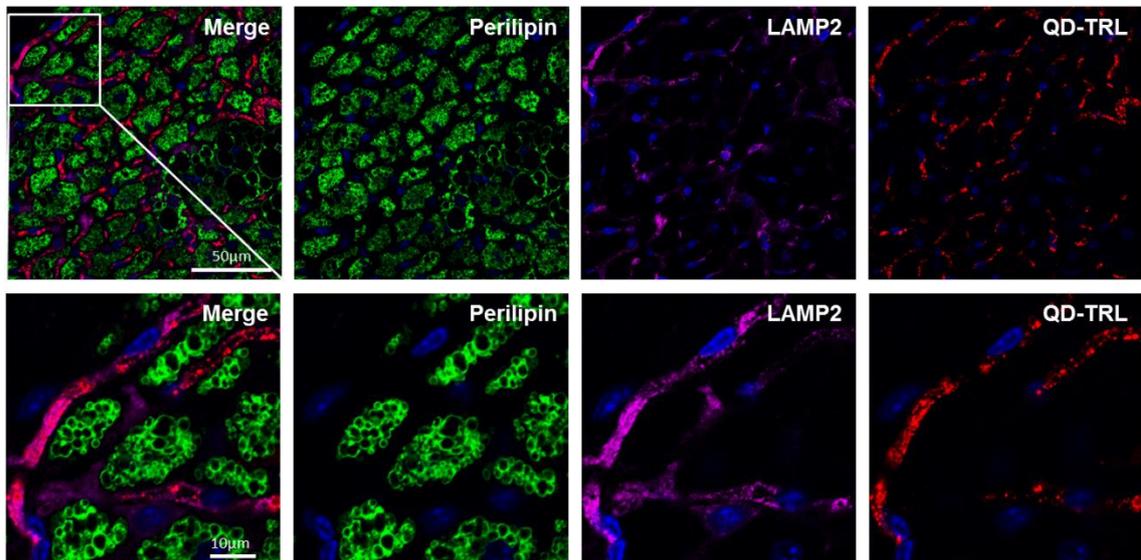


Abbildung 4.21: Visualisierung der Aufnahme von rekTRL in Lysosomen nach BAT-Aktivierung

Wild-Typ Mäuse wurden 24 Std bei 4 °C gehalten und 15 min vor Organentnahme mit Fluoreszenz-markierten rekTRL (QD-TRL) intravenös injiziert. Braunes Fettgewebe wurde entnommen und Vibratom-Schnitte (200 µm) angefertigt. Perilipin (grün), LAMP2 (violett) und QD-TRL (rot) wurden mittels ex vivo Immunfluoreszenz visualisiert. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Bildausschnitte (weiße Kästen) sind vergrößert dargestellt.

5 Diskussion

Übergewicht und die damit verbundenen Stoffwechselstörungen sind Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Typ-2-Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen, was weltweit mittlerweile epidemische Ausmaße erreicht hat (James et al., 2004). Die Wiederentdeckung des braunen Fettgewebes (BAT) bei Erwachsenen hat nun die Hoffnung erweckt, dass die natürliche Funktion des braunen Fettgewebes, massiv Kalorien zu verbrennen, um den Körper vor Kälte zu schützen, therapeutisch genutzt werden kann, um chronische Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes oder Atherosklerose zu behandeln. Anhand neuerer Studien wurde bereits eine zentrale Rolle für das braune Fettgewebe im postprandialen Lipidstoffwechsel beschrieben (Bartelt et al., 2011). Aktiviertes braunes Fettgewebe ist in der Lage, Plasmalipidtriglyceride zu kontrollieren und trägt dadurch zu der Generierung eines gesunden Stoffwechselprofils bei. Überraschenderweise werden auch ganze Lipoproteinpartikel von dem braunen Fettgewebe internalisiert. Dieser Prozess ist von der lokalen Aktivität der Lipoprotein Lipase (LPL) und dem Fettsäure Transporter CD36 abhängig. Caveolin-1 (Cav1) könnte unter anderem auch an dem Prozess beteiligt sein. Der molekulare Mechanismus der Lipoprotein Aufnahme ist allerdings noch nicht ausreichend verstanden. In dieser Arbeit sollten Erkenntnisse über den Beitrag von verschiedenen Zelltypen (Endothelzellen, Makrophagen und braunen Fettzellen) sowie Schlüsselmolekülen für die BAT-medierte Lipoprotein Internalisierung erlangt werden. Außerdem sollte die intrazelluläre Lipoprotein-Prozessierung untersucht werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, um ein detaillierteres molekulares Verständnis der Lipoprotein-Prozessierung innerhalb des braunen Fettgewebes zu bekommen.

5.1 Die Rolle der Parenchymzellen und Immunzellen für die TRL Aufnahme in das braune Fettgewebe

Braunes Fettgewebe nimmt eine zentrale Rolle im postprandialen Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel ein, insbesondere, wenn es durch einen Stimulus, wie z.B. Kälte, aktiviert wurde (Bartelt et al., 2011). Die molekularen Mechanismen der Lipoprotein-Prozessierung, vor allem von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL), ist allerdings noch nicht bekannt. Weiterhin bleibt auch noch zu klären, welche Rolle die verschiedenen Zellen des braunen Fettgewebes (Adipozyten, Endothelzellen und

Makrophagen) für die TRL-Internalisierung spielen und welche Schlüsselmoleküle in welchen Zellen involviert sind. Deshalb wurde zunächst die Aufnahme von TRL, welche nicht-kovalent mit einem amphiphilen Carbocyanin Farbstoff (DiD) markiert wurden, in das braune Fettgewebe mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Kryoschnitten visualisiert. Die Lokalisation der TRL wurde in warmen (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierten (4 °C) C57BL/6J Wildtyp-Mäusen untersucht (Abbildung 4.1). Während warme Bedingungen zu keiner DiD-TRL Aufnahme in das braune Fettgewebe führte (Abbildung 4.1 A), wurde die Aufnahme des DiD Farbstoffes in UCP1-positive braune Adipozyten schon durch eine 24-stündige Kälteexposition eindrucksvoll stimuliert (Abbildung 4.1 B). Eine Kolokalisation oder Akkumulation des DiD Farbstoffes in CD31-positive Endothelzellen konnte hingegen nicht beobachtet werden. Da das braune Fettgewebe im Gegensatz zu der Leber mit einem kontinuierlichen Endothel ausgestattet ist, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass das kontinuierliche Endothel des braunen Fettgewebes entweder vorübergehend permeabel wird oder aber die DiD-TRL, oder zumindest der Farbstoff, transendothelial transportiert werden. Hierbei scheint schon eine kurzzeitige Kälteexposition zu einer massiven Aktivierung des braunen Fettgewebes zu führen. Normalerweise wird akuter Kältestress zunächst mit der Stimulation von Muskelzittern zur Wärmebildung assoziiert. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes soll erst nach längerer Kälteexposition zum Tragen kommen, indem das Muskelzittern durch adaptive (zitterfreie) Thermogenese ersetzt wird (Jansky, 1973). In der Tat wurde im braunen Fettgewebe von C57BL/6J Wildtyp-Mäusen das Genexpressionsmuster von metabolisch relevanten Genen schon durch einen 24-stündigen Kältereiz verändert (Abbildung 4.3). Die Expression von Genen, die im braunen Fettgewebe unter anderem die Aktivität und Thermogenese regulieren wie z.B. *Ucp1*, *Pgc1 α* und *Dio2*, wurde durch Kälte induziert (Cannon und Nedergaard, 2004). Auch die Genexpression von Proteinen, welche lipolytische Prozesse oder den Lipidtransport beeinflussen, wie *Lpl*, *Gpihbp1*, *Fabp4*, die endotheliale Lipase (*Lipg*), die lysosomale Lipase (*Lipa*) und *Cd36* wurde durch Kälteexposition im braunen Fettgewebe hochreguliert (Bartelt et al., 2011; Carneheim et al., 1984; Davies et al., 2008; Syamsunarno et al., 2014). Dahingegen wurde die Expression von Adiponektin (*Adipoq*), welches die Thermogenese hemmt, herunter reguliert (Qiao et al., 2014). Unter den analysierten Genen im Gesamtorgan waren auch solche, deren Expression nur mit spezifischen Zelltypen assoziiert ist. So sollten *Lpl* oder *Adipoq* z.B. ausschließlich von Adipozyten exprimiert werden (Maeda et al., 1996; Mead et al., 2002). Die Expression von

Gpihbp1 und *Lipg* hingegen ist eng mit Endothelzellen verbunden (Jaye et al., 1999; Young et al., 2007). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass das braune Fettgewebe nicht nur aus braunen Adipozyten, sondern auch aus Endothelzellen aufgebaut ist. Außerdem beinhaltet das braune Fettgewebe noch Makrophagen. Allerdings ist bislang wenig über die Rolle dieser verschiedenen Zelltypen für die TRL-Prozessierung bekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode etabliert, um Parenchymzellen und Immunzellen des murinen braunen Fettgewebes getrennt voneinander zu untersuchen (Abbildung 4.4 A). Die Messung von zellspezifische Marker für Makrophagen (*Emr1*; Abbildung 4.4 B), Endothelzellen (*Gpihbp1*; Abbildung 4.4 C) und braune Fettzellen (*Adipoq* und *Ucp1*; Abbildung 4.4 D, E) verifizierte die Anreicherung und die Reinheit der jeweiligen Zellfraktion. Wie erwartet, wurde die Expression von Markern der BAT-Aktivität und der Thermogenese wie *Ucp1* (Abbildung 4.4 E), *Dio2* (Abbildung 4.5 A), *Pgc1 α* (Abbildung 4.5 B) und *Lpl* (Abbildung 4.6 A) durch Kälte-Exposition primär in braunen Adipozyten stark induziert. Allerdings konnte auch eine geringe aber signifikante Induktion von *Ucp1* und *Pgc1 α* in Endothelzellen gemessen werden. Das deutet darauf hin, dass in der Endothelzellpopulation tatsächlich Zellen residieren, die das Potential haben, in Adipozyten zu transdifferenzieren (Gupta et al., 2012; Tran et al., 2012). Ein weiterer Stimulus für die Aktivierung des braunen Fettgewebes ist der *Fibroblast growth factor 21* (FGF21), dessen Expression in braunen Adipozyten durch Kälte stimuliert wird (Chartoumpakis et al., 2011; Hondares et al., 2011a). Die Wirkung von FGF21 wird über die Bindung an den *FGF receptor 1* (FGFR1) vermittelt. Die Expression von *Fgfr1* wurde nicht durch Kälte induziert und konnte in Makrophagen und Adipozyten, aber nicht in Endothelzellen, detektiert werden (Abbildung 4.5 C). Allerdings wurde die Expression von β Klotho (*Klb*), der Kofaktor für den FGFR1, durch eine 24-stündige Kälteexposition ausschließlich in braunen Adipozyten signifikant erhöht (Abbildung 4.5 D). Eine Expression von *Klb* in Makrophagen und Endothelzellen konnte nicht beobachtet werden. Da β Klotho essentiell für die FGF21 Aktivität ist, scheint FGF21 in einer autokrinen und parakrinen Weise direkt auf braune Adipozyten wirken zu können (Kurosu et al., 2007). Neben den braunen Adipozyten ist die Leber das Hauptsynthese Organ für FGF21. Anhand von Studien im Mausmodell, aber auch im Menschen, wird postuliert, dass insbesondere das endokrine FGF21 für die Aktivierung des braunen Fettgewebes und Erhöhung des Energieumsatzes verantwortlich sei (Coskun et al., 2008; Hanssen et al., 2015; Lee et al., 2014). Da Endothelzellen weder den FGFR

noch β Klotho aufweisen, bleibt noch zu klären, wie das endokrine Hormon die endotheliale Barriere überwindet, um die braunen Adipozyten direkt zu stimulieren.

Interessanterweise wurde die Expression von lipolytischen Genen, wie *Lipg* (Abbildung 4.6 C), *Lipa* (Abbildung 4.6 D) und *Angptl4* (Abbildung 4.6 E) durch Kälte-Exposition in erster Linie in Endothelzellen und nicht in braunen Adipozyten induziert. Darüber hinaus konnte eine wesentliche Expression von *Fabp4* (Abbildung 4.6 B) und überraschenderweise auch von *Lpl* (Abbildung 4.6 A) in Endothelzellen nachgewiesen werden. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Proteine, welche die Lipid- und Lipoprotein-Prozessierung regulieren, hauptsächlich in Endothelzellen angereichert sind und durch Kälteexposition hochreguliert werden, was auf eine zentrale Rolle der Endothelzellen für die BAT-medierte TRL Internalisierung schließen lässt. Um die genaue Endothelzell-spezifische Bedeutung dieser lipolytischen Enzyme für die Funktion des braunen Fettgewebes zu untersuchen, sind zukünftig Studien mit Endothelzell-spezifischen Knockout-Mäusen notwendig.

Die Rolle von Makrophagen im braunen Fettgewebe ist ebenfalls noch nicht ausreichend verstanden. Im weißen Fettgewebe führt die Entwicklung von Adipositas hauptsächlich zu der Infiltration von pro-inflammatorischen Makrophagen vom Typ M1 (Weisberg et al., 2003). Diese Makrophagen sezernieren eine Reihe von pro-inflammatorischen Faktoren wie Interleukin-6 (Il6), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und *monocyte chemotactic protein-1* (MCP1), welche z.B. Insulinresistenz oder systemische Entzündungen induzieren (Fain et al., 2004; Xu et al., 2003). Dahingegen wurde kürzlich postuliert, dass im braunen Fettgewebe vorwiegend anti-inflammatorische Makrophagen vom Typ M2 zu finden sind und diese Gewebespezifischen Immunzellen für die adaptive Thermogenese eine wichtige Funktion innehaben (Nguyen et al., 2011). M2 Makrophagen zeichnen sich durch die Expression von Genen wie z.B. *mannose receptor C type 2* (Mrc2) oder Arginase 1 (Arg1) aus (Gordon, 2003). Um die Auswirkung der Aktivierung des braunen Fettgewebes auf die Rolle von Makrophagen und entzündliche Prozesse zu untersuchen und die Makrophagen zu charakterisieren, wurde die Expression des pro-inflammatorischen Markers Il6 und des anti-inflammatorischen Markers Arg1 in Makrophagen, Endothelzellen und braunen Adipozyten gemessen (Abbildung 4.8). Im Gegensatz zu der Messung im Gesamtorgan (Abbildung 4.3), konnte in den einzelnen Zellfraktionen eine Kälte-induzierte Regulation von Il6 und Arg1 beobachtet werden. Dieses Ergebnis macht weiter deutlich, dass es sinnvoll ist, die unterschiedlichen Zelltypen eines

Organs gesondert zu untersuchen. Kälteexposition führte in allen Zelltypen zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *Ilf6* (Abbildung 4.8 A). Die Expression von *Arg1* wurde durch Kälteexposition ausschließlich in Makrophagen stark induziert (Abbildung 4.8 B). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes scheint eine anti-inflammatorische Wirkung zu haben und die Polarisierung der Makrophagen zugunsten eines M2 Typs zu beeinflussen. Die Mechanismen der Aktivierung dieser Makrophagen durch Kälte ist bislang allerdings unverstanden, wobei eine andere Immunzellpopulation, die IL4-produzierenden Eosinophile, an der Aktivierung der M2-Makrophagen eine wichtige Rolle einnehmen (Qiu et al., 2014).

Nachdem die Zelltyp-spezifische Expressionsanalyse metabolisch relevanter Gene darauf hindeutet, dass die endotheliale Barriere und damit die Endothelzellen eine wichtige Rolle im Prozess der TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe spielen könnten, sollte der Mechanismus der TRL-Internalisierung in den verschiedenen Zellen näher bestimmt werden. Dafür wurde die Aufnahme von rekombinanten TRL (rekTRL), die mit radioaktiven ^3H -Cholesteryl Hexadecyl Ether und ^{14}C -Triolein markiert wurden, in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten von warmen (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierten (4 °C) C57BL/6J Wildtyp-Mäusen untersucht (Abbildung 4.10). Die Doppelmarkierung eignet sich hervorragend, um gleichzeitig den Lipoprotein Partikel (^3H) und die hydrolysierten Triglyzeridkomponenten (^{14}C) zu verfolgen (Abbildung 4.9). 15 min nach der rekTRL-Injektion wurde die höchste Menge an ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität in aktivierten Endothelzellen gefunden (Abbildung 4.10 A, B). Während ^3H -Radioaktivität nicht in braunen Adipozyten detektiert werden konnte (Abbildung 4.10 A), war eine signifikant erhöhte Aufnahme von ^{14}C -Radioaktivität, Marker für hydrolysierte Triglyzeridkomponenten, in aktivierten braunen Adipozyten zu sehen (Abbildung 4.10 B). Mechanistisch zeigt dies, dass gesamte rekTRL Partikel überwiegend von aktivierten Endothelzellen internalisiert werden und nur die Triglyzeridkomponenten weiter zu den braunen Adipozyten transportiert werden. Des Weiteren zeigten Kälte-aktivierte Makrophagen eine signifikant erhöhte Aufnahme von rekTRL. Laut früheren Studien sollten ganze TRL-Partikel allerdings auch in braunen Adipozyten detektiert werden (Bartelt et al., 2011). Um sicherzustellen, dass sich die rekTRL wie native TRL verhalten, wurde zusätzlich die Aufnahme radioaktiv-markierter muriner TRL in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten analysiert (Abbildung 4.11). Native TRL wurden auch hauptsächlich von aktivierten Endothelzellen aufgenommen. Im Gegensatz zu den rekTRL wurden native TRL nicht von kalten Makrophagen aufgenommen. Dafür war eine leicht erhöhte Aufnahme von

nativen TRL in braune Adipozyten detektierbar. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass eine vorübergehende Durchlässigkeit der Endothelbarriere die TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe erleichtern könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die während der TRL-Prozessierung entstandenen Produkte der Lipolyse, wie z.B. freie Fettsäuren, die Permeabilität der Endothelschicht erhöhen (Eiselein et al., 2007; Rutledge et al., 1997). In dieser Arbeit konnte anhand der Aufnahme von ^{125}I -Albumin in das braune Fettgewebe von C57BL/6J Wildtyp-Mäusen keine Abnahme der endothelialen Barrierefunktion nach Kälteexposition beobachtet werden (Abbildung 4.18). Eine 24-stündige Kälteexposition scheint demzufolge keinen Einfluss auf die Integrität des Endothels zu haben. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass TRL von Kälte-aktivierten Endothelzellen spezifisch aufgenommen und dort vermutlich in lysosomalen Kompartimenten intrazellulär prozessiert werden, damit die Lipidkomponenten effizient zu den braunen Adipozyten transportiert werden können (siehe Abschnitt 5.3). Das braune Fettgewebe ist stark mit sympathoadrenergen Nervenfasern innerviert. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes wird über β_3 -adrenerge Rezeptoren (β_3 -AR) primär in braunen Adipozyten vermittelt (Cannon und Nedergaard, 2004). Wie Endothelzellen durch einen Kältestimulus aktiviert werden, bleibt weiterhin fraglich. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass braune Adipozyten die Umgebungstemperatur sogar direkt messen und dadurch die Thermogenese aktiviert werden kann (Ye et al., 2013). Um zu klären, ob diese Eigenschaft auch auf Endothelzellen zutrifft, könnte z.B. die Expression von Kälterezeptoren, wie *transient receptor potential (TRP) melastatin 8* (TRPM8) oder TRPA1 in den mittels MACS® Technologie separierten Endothelzellen gemessen werden. Eine weitere Möglichkeit für eine direkte Aktivierung der Endothelzellen wäre die Bindung von Faktoren, die das braune Fettgewebe durch systemische und parakrine Mechanismen unabhängig von β_3 -AR regulieren, wie z.B. FGF21, natriuretisches Peptid, *bone morphogenetic protein 8b*, Schilddrüsenhormone oder Orexin (Harms und Seale, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der FGFR nicht von Endothelzellen exprimiert wird (Abbildung 4.5 C), was eine Bindung von FGF21 an Endothelzellen ausschließt. Ob die Rezeptoren der oben genannten Faktoren von Endothelzellen exprimiert und vielleicht durch Kälte induziert werden, muss noch untersucht werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass braune Adipozyten nach β_3 -adrenerger Stimulation einen Faktor sezernieren, der dann parakrin an Endothelzellen bindet und diese aktiviert. Ein möglicher Kandidat könnte *vascular endothelial growth factor B* (VEGF-B) sein. VEGF-B wird von Parenchymzellen synthetisiert und wirkt parakrin auf Endothelzellen. Dort

wird die Expression von Transportproteinen für langkettige Fettsäuren durch die Bindung von VEGF-B an den *VEGF receptor 1* induziert (Hagberg et al., 2010; Olofsson et al., 1998). Die Expression von VEGF-B wird in Parenchymzellen unter anderem durch PGC1 α reguliert (Bostrom et al., 2012). Die Parenchymzellen sind so in der Lage, die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in das Gewebe bereits an der Gefäßwand zu regulieren. Wenn die Nährstoffaufnahme, insbesondere langkettiger Fettsäuren, in die Gewebszellen am Endothel je nach Energiebedarf durch VEGF-B reguliert werden kann, wäre es auch denkbar, dass VEGF-B die Aufnahme von TRL in das braune Fettgewebe beeinflussen kann.

Bei einem erhöhten Energiebedarf, z.B. während der Kälte-induzierten Aktivierung des braunen Fettgewebes, werden nicht nur vermehrt freie Fettsäuren, sondern auch Glukose in das braune Fettgewebe aufgenommen. Der insulinabhängige Glukosetransporter 4 (GLUT4) vermittelt im Fettgewebe in erster Linie die Glukoseaufnahme (James et al., 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GLUT4 vor allem von braunen Adipozyten exprimiert wird und nicht von Endothelzellen oder Makrophagen (Abbildung 4.7 A). Da die Glukose nicht mittels GLUT4 die Endothelschicht passieren kann, könnte der insulinunabhängige Glukosetransporter 1 eventuell für den Glukosetransport verantwortlich sein. Die Expression von GLUT4 wurde in braunen Adipozyten durch Kälteexposition signifikant erhöht, was für eine erhöhte Glukoseaufnahme spricht. Eine erhöhte Glukoseaufnahme führt im Fettgewebe normalerweise zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *carbohydrate response element binding protein* β (ChREBP β) (Herman et al., 2012). Zwar war ChREBP β vorwiegend in braunen Adipozyten und nicht in Endothelzellen oder Makrophagen zu finden, allerdings wurde die Expression nicht durch eine 24-stündige Kälteexposition induziert (Abbildung 4.7 B). Das deutet darauf hin, dass die aufgenommene Glukose sofort zur Energiegewinnung verstoffwechselt wird und unter diesen Bedingungen nicht für die Lipogenese zur Energiespeicherung benutzt wird. Während Endothelzellen ein Hauptregulator des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels zu sein scheinen, deuten die Expressionsdaten darauf hin, dass sie in der Regulation des insulinabhängigen Glukosestoffwechsels nur eine untergeordnete Funktion einnehmen.

5.2 Bedeutung von CD36 und Caveolin-1 für die TRL Aufnahme im braunen Fettgewebe

Bartelt et al. (2011) haben gezeigt, dass CD36 die Aufnahme von TRL Partikeln in das braune Fettgewebe vermittelt. Obwohl es bekannt ist, dass CD36 von verschiedenen Zelltypen, die im Fettgewebe vorkommen, exprimiert wird – insbesondere von

Adipozyten (Abumrad et al., 1993), Makrophagen (Huh et al., 1996) und mikrovaskulären Endothelzellen (Swerlick et al., 1992) – ist wenig über den Beitrag der verschiedenen Subtypen zu der TRL-Prozessierung im braunen Fettgewebe bekannt. Caveolin-1 (Cav1) wird auch von vielen Zellen und Organen exprimiert, insbesondere von Endothelzellen und Adipozyten (Williams und Lisanti, 2004). Außerdem ist Cav1 als Strukturprotein der Caveolae für die Lokalisation und Funktion von CD36 an der Plasmamembran erforderlich (Ring et al., 2006). Die CD36-vermittelte Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in Adipozyten erfordert die Anwesenheit von Caveolae (Pohl et al., 2005). Darüber hinaus wird postuliert, dass Caveolae metabolische Plattformen bilden, in denen GPIHBP1 und CD36 lokalisiert sind (Ortegren et al., 2007; Williams, 2008; Williams und Fisher, 2011). Bartelt et al. (2011) haben die lokale Aktivität von LPL, eventuell gebunden an GPIHBP1, und CD36 als essentiell für die TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe identifiziert. Um zu untersuchen, ob eine CD36- bzw. Caveolae-vermittelte Internalisierung der TRL ein potentieller Mechanismus ist, wurde die Aufnahme von DiD-markierten TRL in Kälte-exponierten *Cd36^{-/-}* und *Cav1^{-/-}* Mäusen untersucht (Abbildung 4.2). Im Gegensatz zum Wild-Typ (Abbildung 4.1 B), konnte im braunen Fettgewebe von *Cd36^{-/-}* Mäusen (Abbildung 4.2 A) und *Cav1^{-/-}* Mäusen (Abbildung 4.2 B) weder eine Aufnahme der DiD-TRL in UCP1-positive braune Adipozyten noch eine Akkumulation des Lipoprotein-gebundenen Farbstoffes innerhalb von CD31-positiven Endothelzellen detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass durch das Fehlen von CD36 und Cav1 die TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe zu einem sehr frühen Stadium, nämlich schon an der Gefäßwand, blockiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass die endotheliale Barriere und damit die Endothelzellen des braunen Fettgewebes eine wichtige Rolle im Prozess der TRL-Internalisierung spielen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Cd36* hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert und dort durch Kälteexposition induziert wurde, jedoch nicht in braunen Adipozyten (Abbildung 4.12 A). Damit übereinstimmend konnten höhere Proteinmengen von CD36 an der luminalen Oberfläche von Kälte-aktivierten Endothelzellen gefunden werden im Vergleich zu warmen Endothelzellen (Abbildung 4.12 B). Zwar konnte die stärkste Expression von *Cav1* auch in Endothelzellen gemessen werden, aber eine Regulation durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 4.15). Da die Expression von *Cd36* Kälte-induziert ausschließlich in Endothelzellen hochreguliert wurde (Abbildung 4.12 A), höhere Proteinmengen von CD36 an der luminalen Oberfläche von Endothelzellen nach Kälteexposition gefunden werden

konnte (Abbildung 4.12 B) und die Aufnahme von DiD-TRL in das braune Fettgewebe von *Cd36*^{-/-} und *Cav1*^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt war (Abbildung 4.2), spielen CD36 und Cav1 im Endothel eine zentrale Rolle bei der TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe. Um den quantitativen Beitrag dieser Proteine zu bestimmen, wurde die Aufnahme von rekombinanten TRL (rekTRL), die mit radioaktiven ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein markiert wurden, in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten von warmen (27 °C) und 24 Std Kälte-exponierten (4 °C) *Cd36*^{-/-} und *Cav1*^{-/-} Mäusen untersucht. Tatsächlich konnten *Cd36*^{-/-} Endothelzellen die Aufnahme von rekTRL nach 24-stündiger Kälteexposition verglichen mit Wild-Typ Endothelzellen nicht erhöhen (Abbildung 4.13). Die Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein blieb auf dem gleichen Niveau wie unter warmen Bedingungen. Damit übereinstimmend zeigten *Cd36*^{-/-} Mäuse eine signifikant geringere Aufnahme von der ³H-Radioaktivität und ¹⁴C-Radioaktivität in das braune Fettgewebe im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen (Abbildung 4.14 A, C). Wie erwartet, wurde in Wild-Typ Mäusen durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes die TRL Aufnahme von der Leber hin zum braunen Fettgewebe verschoben. Dass in Kälte-exponierten *Cd36*^{-/-} Mäusen die TRL Aufnahme in die Leber gleich dem Wild-Typ, aber die Aufnahme der TRL in das braune Fettgewebe, nicht erhöht war, deutet darauf hin, dass die TRL länger im Blut zirkulieren, wenn CD36 fehlt. Dieses Ergebnis war im Einklang mit erhöhten Plasmawerten von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein in Kälte-exponierte *Cd36*^{-/-} Mäusen (Abbildung 4.14 B, D). Interessanterweise war die Aufnahme des TRL-Partikels (³H) und des Fettsäure Label (¹⁴C) in *Cd36*^{-/-} inguinales weißes Fettgewebe signifikant reduziert. Da klassische Laborbedingungen schon einen milden Kältereiz darstellen, tritt schon eine basale Rekrutierung und Aktivierung von beige Adipozyten innerhalb des inguinalen weißen Fettgewebes auf (Harms und Seale, 2013). Eine geringere Internalisierung von TRL in das inguinale weiße Fettgewebe von *Cd36*^{-/-} Mäusen lässt vermuten, dass CD36 auch eine Rolle bei der TRL-Prozessierung in beige Fettgewebe spielt.

Wenn auch nicht in demselben Umfang wie *Cd36*^{-/-} Endothelzellen, wiesen Kälte-aktivierte Endothelzellen von *Cav1*^{-/-} Mäuse auch eine geringere Aufnahme von rekTRL im Vergleich zu Wild-Typ Endothelzellen auf (Abbildung 4.16). Überraschenderweise konnte kein Unterschied bezüglich der Organaufnahme weder im braunen Fettgewebe noch im inguinalen weißen Fettgewebe (Abbildung 4.17 A, C) oder der Plasmawerte (Abbildung 4.17 B, D) von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein zwischen den Genotypen festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte durch eine erhöhte

Durchlässigkeit des mikrovaskulären Endothels erklärt werden. *Cav1*^{-/-} Mäuse zeigen eine höhere Aufnahme von ¹²⁵I-Albumin, was einen geeigneten Marker für Endothel-Durchlässigkeit darstellt, in Stoffwechsel-aktive Organe, wie Muskel, inguinales weißes Fettgewebe und verschiedene Depots des braunen Fettgewebes (Abbildung 4.18 A). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD36 im Endothel und weniger Cav1 ein entscheidender Modulator für die TRL-Prozessierung in braunem und möglicherweise auch beigem Fettgewebe ist. Dennoch bleibt aufzuklären, ob CD36 auf Endothelzellen als alleiniger Rezeptor der TRL-Endozytose fungiert oder lediglich für die TRL-Bindung essentiell ist. Bislang konnte gezeigt werden, dass CD36 ein Rezeptor nicht nur für oxidiertes LDL, sondern auch die native Lipoproteine, wie HDL, LDL und VLDL ist (Calvo et al., 1998; Endemann et al., 1993). Allerdings deuten neuere Befunde darauf hin, dass die Lipoprotein-Bindung an CD36 von der vorherigen Bindung freier Fettsäuren abhängig ist (Jay et al., 2015). In dieser aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung freier Fettsäuren eine Konformationsänderung im Rezeptor bewirkt, die zu einer erhöhten Affinität gegenüber Lipoproteinen führt, Darüber hinaus sollen CD36 und GPIHBP1 in Caveolae zentriert sein und so in räumliche Nähe gebracht werden (Ortegren et al., 2007; Williams, 2008; Williams und Fisher, 2011). GPIHBP1 transportiert LPL aus dem Interstitium des braunen Fettgewebes zu der luminalen Seite des Endothels und bildet eine wichtige Plattform für die LPL-vermittelte TRL-Prozessierung (Davies et al., 2012; Goulbourne et al., 2014; Young et al., 2007). Postprandiale TRL könnten also zunächst an den LPL-GPIHBP1 Komplex binden, an dem die LPL-vermittelte Lipolyse erfolgt. Die entstandenen freien Fettsäuren könnten dann an CD36 binden, was zu einer Konformationsänderung von CD36 führt und somit den Rezeptor für die TRL-Bindung zugänglich macht. Dies könnte auch die molekulare Verbindung sein, warum die TRL-Internalisierung in das braune Fettgewebe einerseits von der lokalen Aktivität der LPL und andererseits von der Anwesenheit von CD36 abhängig ist. Ob die TRL an CD36 gebunden autonom endozytiert werden oder zusammen mit dem LPL-GPIHBP1 Komplex transportiert werden, muss in weiteren Studien mit kombinierten, Zelltyp-spezifischen Knockout-Modellen untersucht werden. Allerdings wird der LPL-GPIHBP1 Komplex unabhängig von Cav1 transportiert (Davies et al., 2012). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Caveolae wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle für die BAT-vermittelte TRL Aufnahme einnimmt. Vielmehr scheint Cav1 einen essentiellen Beitrag zu der Integrität der endothelialen Barriere beizusteuern. Die Phosphorylierung am Tyrosin¹⁴ von Cav1 stört endotheliale

Adhäsions-Verbindungen und verringert somit die Barriere-Funktion des Endothels (Kronstein et al., 2012). Der molekulare Mechanismus, der zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führt, könnte demnach intrazellulär über Cav1 reguliert sein. Weiterhin kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderer, evtl. bislang unbekannter, Rezeptor an der endothelialen TRL-Aufnahme beteiligt ist. Die Beteiligung des LDL Rezeptors und LRP1 konnte zwar bislang ausgeschlossen werden (Bartelt et al., 2011), allerdings wurde der im Fett-, Herz- und Muskelgewebe hochexprimierte VLDL-Rezeptor (VLDLR) in diesem Zusammenhang bislang allerdings noch nicht untersucht. Der VLDLR nimmt eine wichtige Rolle im TRL Metabolismus ein, jedoch ist der vollständige Mechanismus noch nicht gänzlich verstanden (Nimpf und Schneider, 2000). Um zu untersuchen, ob der VLDLR an der Aufnahme von TRL in Endothelzellen beteiligt ist, könnte zunächst z.B. die Aufnahme von rekTRL in Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten von VLDLR^{-/-} Mäusen verfolgt werden.

5.3 Die intrazelluläre Lipoprotein-Prozessierung in Endothelzellen des aktivierten braunen Fettgewebes

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass TRL spezifisch von Kälte-aktivierten Endothelzellen aufgenommen werden und dort wahrscheinlich intrazellulär verarbeitet werden. So können Lipidkomponenten effizient bereitgestellt werden, um braunen Adipozyten mit Kraftstoffen für die Thermogenese zu versorgen. Um nun die Aufnahmekinetik unter der Einbeziehung der verschiedenen Zelltypen des braunen Fettgewebes zu untersuchen, wurden 24 Std Kälte-exponierte C57BL/6J Wildtyp-Mäuse intravenös mit rekTRL, welche radioaktiv mit ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether und ¹⁴C-Triolein markiert wurden, injiziert. Nach 15 min bzw. 60 min wurde das braune Fettgewebe gesammelt. Anschließend wurden Makrophagen, Endothelzellen und braune Adipozyten separiert und die Radioaktivität in den jeweiligen Zelltypen bestimmt (Abbildung 4.19). Wie bereits gezeigt, wurden die TRL 15 min nach der Injektion hauptsächlich von Kälte-aktivierten Endothelzellen aufgenommen und die Lipidkomponenten zu braunen Adipozyten transportiert. 60 min nach der Injektion der rekTRL verringerte sich die Detektion der ³H-Radioaktivität, was dem TRL-Partikel entspricht, in aktivierten Endothelzellen drastisch (Abbildung 4.19 A). Gleichzeitig konnte eine vermehrte Aufnahme von ³H-Cholesteryl Hexadecyl Ether in der Leber gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahme der ¹⁴C-Radioaktivität, das *Label* für die Lipidkomponenten, in braunen Adipozyten war nach 15 min und 60 min vergleichbar (Abbildung 4.19 B). Diese Daten bestätigen die Vermutung, dass die

endozytierten TRL intrazellulär prozessiert werden und so ein hoher Umsatz an freien Fettsäuren ermöglicht wird. Das ist einerseits unverzichtbar für die Aktivität der braunen Adipozyten und andererseits wichtig für die Versorgung der Endothelzellen. Ein denkbarer Grund für die Aufnahme ganzer TRL-Partikel in Endothelzellen könnte darin liegen, dass Kälteexposition, wie bereits gezeigt, zu einem extrem hohen Stoffwechselumsatz in Endothelzellen führt, was eine hohe Plasmamembranumbaurate zur Folge haben könnte. Die Plasmamembran ist ein elastischer *Bilayer*, dessen Fluidität z.B. durch *lipid rafts* reguliert werden kann. Endothelzellen müssten demnach neben den Lipolyse-Produkten der Triglyzeride energetisch effizient mit einer ausreichenden Menge von alternativen Lipiden wie Phospholipiden und Cholesterinestern versorgt werden. Ein Hinweis für diese Hypothese ist die Kälte-induzierte Genexpression der endothelialen Lipase (Abbildung 4.6 C) und lysosomalen saure Lipase (Abbildung 4.6 D) in Endothelzellen. Beide Lipasen weisen jeweils primär eine Phospholipase- und Cholesterinesterase-Aktivität auf (Choi et al., 2002). Aktiviertes braunes Fettgewebe kann die Fettsäuren von Lipoprotein-assoziierten Phospholipiden verwenden, wie es bereits in LPL-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Kratky et al., 2005). Außerdem haben *in vitro* Studien gezeigt, dass die endotheliale Lipase die Bindung und Partikelaufnahme von Lipoproteinen erleichtert (Strauss et al., 2002). Darüber hinaus scheinen die Kohlenstoffe der Fettsäuren in Endothelzellen essentiell für die *de novo* Nukleotidsynthese zur DNA-Replikation und somit unersetzlich für die DNA-Synthese und Zellproliferation zu sein.

Intrazellulär stellen die Lysosomen das Hauptorganell zum Abbau von zellfremden aber auch zelleigenen Makromolekülen dar. Der Verdau erfolgt mittels der in den Lysosomen enthaltenen Enzyme. Die Expression der lysosomalen Lipase wurde durch Kälte-Exposition am eindrucksvollsten in Endothelzellen induziert (Abbildung 4.6 D). Das lässt vermuten, dass die Prozessierung der TRL im lysosomalen Kompartiment der Endothelzellen stattfindet. Um die mögliche lysosomale Prozessierung im Endothel zu untersuchen, sollte die subzelluläre Lokalisation von TRL in aktiviertem braunem Fettgewebe mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt werden. Wie erwartet, konnte eine Kolokalisation der TRL mit GPIHBP1, das heißt mit dem Endothel, detektiert werden (Abbildung 4.20). Des Weiteren konnte eine Kolokalisation von der TRL mit dem Lysosomen Marker LAMP2 detektiert werden (Abbildung 4.21). Da das Expressionsmuster von GPIHBP1 und LAMP2 sich stark ähneln, ist davon auszugehen, dass die detektierten Lysosomen in Endothelzellen lokalisiert sind. Somit konnte eine terminale Lokalisation der TRL in endothelialen Lysosomen bewiesen

werden. Um diese Ergebnis zu verifizieren und die Rolle der lysosomalen Lipase im Endothel näher zu untersuchen, müssen die Aufnahme-Studien mit Fluoreszenz-markierten aber auch mit radioaktiv-markierten TRL in einem Mausmodell wiederholt werden, welches eine Endothel-spezifische Defizienz der lysosomalen Lipase aufweist.

In Abbildung 5.1 sind die, in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, graphisch dargestellt. Zusammenfassend ergibt sich ein neuer, alternativer molekularer Mechanismus des transendothelialen Lipoproteintransports, der durch die endotheliale Expression von CD36 und Caveolin-1 im braunen Fettgewebe vermittelt wird.

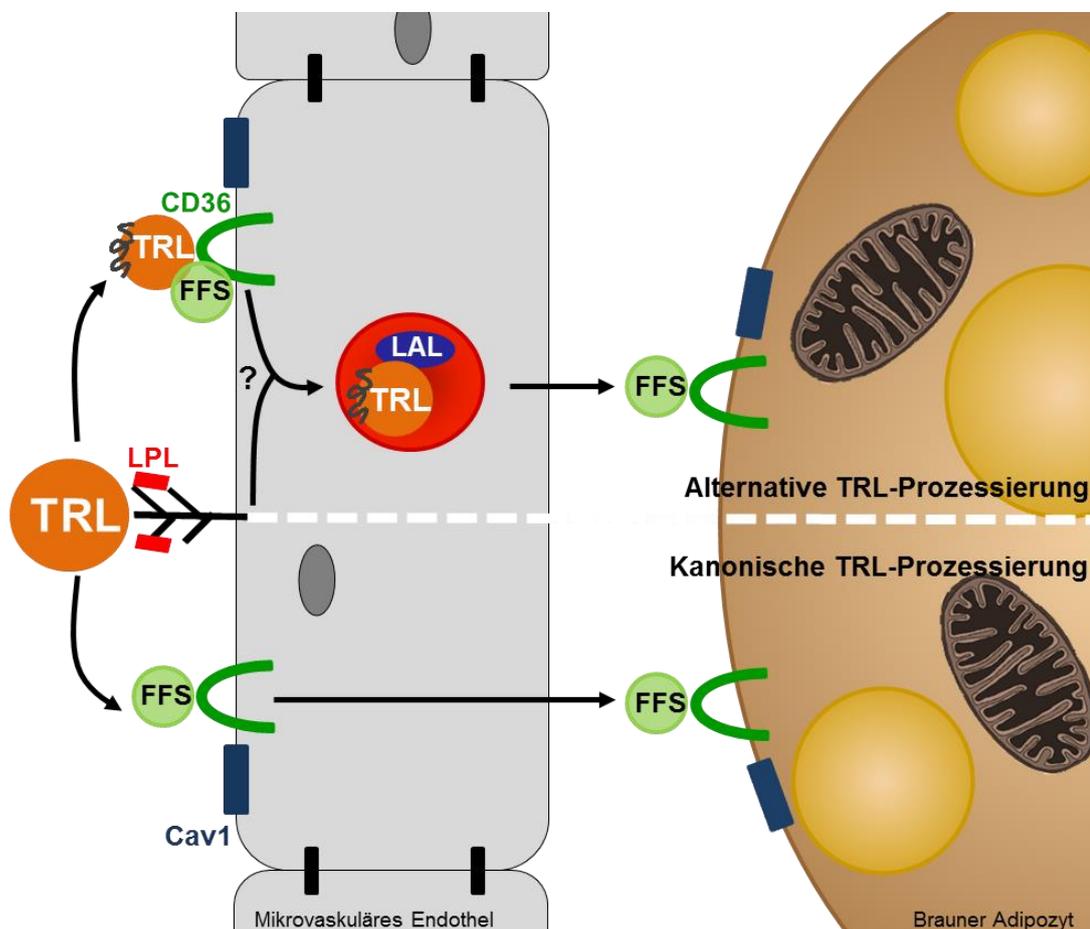


Abbildung 5.1: Molekulare Mechanismen der Lipoprotein Aufnahme in das braune Fettgewebe

Ein potentieller Mechanismus der Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) in das braune Fettgewebe ist eine CD36-vermittelte Internalisierung und anschließende lysosomale Prozessierung im Endothel. Die hydrolysierten freien Fettsäuren (FFS) können anschließend von braunen Adipozyten aufgenommen werden. Caveolin-1 scheint eine wichtige Rolle für die Integrität der endothelialen Barriere zu spielen. Detailliertere Erläuterungen zu den möglichen molekularen Mechanismen sind im Text zu finden. GPIHBP1: Glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI-anchored) HDL-binding protein 1; LAL: Lysosomal Acid Lipase; LPL: Lipoprotein Lipase.

6 Zusammenfassung

Braunes Fettgewebe (BAT) ist ein stoffwechselaktives Organ, welches in der Lage ist, den Abbau von Lipoproteinpartikel maßgeblich zu beeinflussen. Aktiviertes braunes Fettgewebe reguliert durch die Internalisierung von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) dabei die Konzentration der Triglyzeride im Blutplasma. Bislang konnte gezeigt werden, dass die TRL-Aufnahme stark von der lokalen Aktivität der Lipoprotein Lipase und dem Fettsäuretransporter CD36 abhängt. Es wird diskutiert, ob weitere Proteine wie Caveolin-1 (Cav1) bei diesem Prozess involviert sein könnten. Allerdings war der molekulare Mechanismus der TRL-Aufnahme in das braune Fettgewebe zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit noch nicht bekannt. In dieser Arbeit konnten Erkenntnisse über den Beitrag von verschiedenen Zelltypen (Endothelzellen, Makrophagen und braunen Fettzellen) sowie Schlüsselmolekülen für die BAT-vermittelte Lipoprotein-Internalisierung erlangt werden. Außerdem konnten Einblicke in die intrazelluläre Lipoprotein-Prozessierung gegeben werden.

Durch die Visualisierung der TRL-Aufnahme mit Fluoreszenz-markierten postprandialen Lipoproteinen konnte gezeigt werden, dass ganze TRL-Partikel nach kurzfristiger Kälteexposition von dem braunen Fettgewebe internalisiert wurden. Interessanterweise wurde die Expression von Proteinen, welche die Lipid- und Lipoprotein-Prozessierung regulieren, vorwiegend in Endothelzellen des aktivierten braunen Fettgewebes induziert. Kälteexposition induzierte u.a. die Expression von *Cd36* nur in Endothelzellen, während die Expression von *Cd36* in braunen Adipozyten nicht verändert wurde. Die Expression von *Cav1* hingegen war nicht verändert. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass ganze TRL-Partikel hauptsächlich von Kälte-aktivierten Endothelzellen internalisiert wurden, während die hydrolysierten Triglyzerid-Komponenten der TRL zu braunen Adipozyten transportiert wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess bei Mäusen mit CD36-Defizienz stark beeinträchtigt ist. Eine Defizienz für Cav1 hatte allerdings einen geringeren Einfluss auf die endotheliale TRL-Internalisierung. Des Weiteren konnte durch Kolokalisationsstudien der TRL mit dem lysosomalen Kompartiment gezeigt werden, dass TRL in Endothelzellen in die Lysosomen transportiert werden. Darüber hinaus hat die Aktivierung des braunen Fettgewebes eine anti-inflammatorische Wirkung und beeinflusst die Polarisation der Makrophagen zugunsten eines M2 Typs. Abschließend konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen im braunen Fettgewebe

eine Schlüsselrolle bei der Endozytose der TRL-Partikel spielen, wobei dieser Prozess maßgeblich durch CD36 vermittelt wird. Cav1 ist dabei ein wichtiger Faktor für die Integrität der endothelialen Barriere. Durch die effiziente intrazelluläre Prozessierung der TRL in den Lysosomen der Endothelzellen können die braunen Adipozyten ausreichend mit Kraftstoff für die Thermogenese versorgt werden.

6.1 Summary

Brown adipose tissue (BAT) is a powerful organ that influence lipoprotein metabolism decisively. Activated brown adipose tissue controls plasma triglyceride levels through mechanisms involving lipoprotein internalization into BAT. The master regulator of vascular TRL processing, lipoprotein lipase (LPL) was crucial for lipoprotein entry into BAT. In addition, the presence of the fatty acid transporter CD36 facilitated TRL particle internalization into BAT. Other proteins like caveolin-1 (Cav1) may also be implicated in this process. However, the molecular mechanisms underlying lipoprotein trafficking into BAT are unclear. Here, the contribution of endothelial cells, macrophages and brown adipocytes to BAT-mediated lipoprotein processing were elucidated, key molecules involved in the internalization were delineated and insights into the intracellular lipoprotein processing machinery were given. Tracking the entire route of lipoproteins with fluorescently labeled postprandial lipoproteins in mice could demonstrate that entire lipoprotein particles were internalized into brown adipose tissue. Interestingly, the expression of proteins known to regulate lipoprotein clearance was induced primarily in endothelial cells of cold-activated BAT. Cold exposure induced among others the expression of fatty acid transporter *Cd36* only in BAT endothelial cells, while expression of *Cd36* in brown adipocytes was not altered. Expression of *Cav1* was not altered. Mechanistically, whole TRL particles were predominantly taken up by activated BAT endothelial cells, while triglyceride-derived fatty acids were massively shuttled into brown adipocytes. This process was abolished in mice lacking CD36. However, the deficiency for Cav1 had minor influence on endothelial TRL uptake. Co-Localization of TRL with the lysosomal compartment indicates lysosomal processing for efficient lipid transfer to brown adipocytes. In addition, BAT activation has an anti-inflammatory effect and affects the polarization of macrophages in favour of the M2 phenotype. In conclusion, it was demonstrated that endothelial cells play a key role in TRL particle internalization into BAT in a CD36-dependent manner. Cav1 is an important factor for die integrity of the endothelial barrier. The efficient intracellular processing of TRL

within lysosomes of endothelial cells provides sufficient fuels for brown adipocyte thermogenesis.

7 Literaturverzeichnis

Abumrad, N.A., el-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., und Grimaldi, P.A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *The Journal of biological chemistry* 268, 17665-17668.

Baba, S., Tatsumi, M., Ishimori, T., Lilien, D.L., Engles, J.M., und Wahl, R.L. (2007). Effect of nicotine and ephedrine on the accumulation of ¹⁸F-FDG in brown adipose tissue. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 48, 981-986.

Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Bombardier, E., Goonasekera, S.A., Tupling, A.R., Molkentin, J.D., und Periasamy, M. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nature medicine* 18, 1575-1579.

Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., und Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298, E1244-1253.

Barbera, M.J., Schluter, A., Pedraza, N., Iglesias, R., Villarroya, F., und Giralt, M. (2001). 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. *The Journal of biological chemistry* 276, 1486-1493.

Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmuller, A., Gordts, P.L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., und Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature medicine* 17, 200-205.

Bartelt, A., und Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 24-36.

Beigneux, A.P. (2010). GPIHBP1 and the processing of triglyceride-rich lipoproteins. *Clinical lipidology* 5, 575-582.

Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Weinstein, M.M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R.L., Wong, J.S., Blaner, W.S., Ding, Z.M., Melford, K., Wongsiriroj, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R.O., Fong, L.G., Bensadoun, A., und Young, S.G. (2007). Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell metabolism* 5, 279-291.

Beisiegel, U., Weber, W., und Bengtsson-Olivecrona, G. (1991). Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related

- protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8342-8346.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., und Stanley, K.K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.
- Bengtsson, G., und Olivecrona, T. (1980). Lipoprotein lipase: some effects of activator proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 106, 549-555.
- Betz, M.J., und Enerback, S. (2011). Therapeutic prospects of metabolically active brown adipose tissue in humans. *Frontiers in endocrinology* 2, 86.
- Bezaire, V., Mairal, A., Ribet, C., Lefort, C., Grousse, A., Jocken, J., Laurencikiene, J., Anesia, R., Rodriguez, A.M., Ryden, M., Stenson, B.M., Dani, C., Ailhaud, G., Arner, P., und Langin, D. (2009). Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 18282-18291.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E.Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R., und Collins, S. (2012). Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *The Journal of clinical investigation* 122, 1022-1036.
- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Bostrom, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S.P., und Spiegelman, B.M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463-468.
- Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual review of biochemistry* 52, 223-261.
- Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Bruns, O.T., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Lauterwasser, J., Nikolic, M.S., Mollwitz, B., Merkel, M., Bigall, N.C., Sapra, S., Reimer, R., Hohenberg, H., Weller, H., Eychmuller, A., Adam, G., Beisiegel, U., und Heeren, J. (2009). Real-time magnetic resonance imaging and quantification of lipoprotein metabolism in vivo using nanocrystals. *Nature nanotechnology* 4, 193-201.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Suarez, Y., Lasuncion, M.A., und Vega, M.A. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *Journal of lipid research* 39, 777-788.
- Cannon, B., und Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological reviews* 84, 277-359.
- Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., und Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is

the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Molecular and cellular biology* 24, 3057-3067.

Cardin, A.D., Barnhart, R.L., Witt, K.R., and Jackson, R.L. (1984). Reactivity of heparin with the human plasma heparin-binding proteins thrombin, antithrombin III, and apolipoproteins E and B-100. *Thrombosis research* 34, 541-550.

Carneheim, C., Nedergaard, J., and Cannon, B. (1984). Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. *The American journal of physiology* 246, E327-333.

Chartoumpekis, D.V., Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., and Papavassiliou, A.G. (2011). Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* 17, 736-740.

Choi, S.Y., Hirata, K., Ishida, T., Quertermous, T., and Cooper, A.D. (2002). Endothelial lipase: a new lipase on the block. *Journal of lipid research* 43, 1763-1769.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162, 156-159.

Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 73, 9-15.

Coburn, C.T., Knapp, F.F., Jr., Febbraio, M., Beets, A.L., Silverstein, R.L., and Abumrad, N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *The Journal of biological chemistry* 275, 32523-32529.

Cohen, A.W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T.M., Wang, X.B., Iyengar, P., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261-1270.

Cohen, A.W., Schubert, W., Brasaemle, D.L., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2005). Caveolin-1 expression is essential for proper nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes* 54, 679-686.

Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., Wu, J., Gunawardana, S.C., Banks, A.S., Camporez, J.P., Jurczak, M.J., Kajimura, S., Piston, D.W., Mathis, D., Cinti, S., Shulman, G.I., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156, 304-316.

Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of lipid research* 38, 2173-2192.

Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149, 6018-6027.

- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., Kolodny, G.M., und Kahn, C.R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360, 1509-1517.
- Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., und Kolodny, G.M. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell metabolism* 21, 33-38.
- Cypess, A.M., White, A.P., Vernochet, C., Schulz, T.J., Xue, R., Sass, C.A., Huang, T.L., Roberts-Toler, C., Weiner, L.S., Sze, C., Chacko, A.T., Deschamps, L.N., Herder, L.M., Truchan, N., Glasgow, A.L., Holman, A.R., Gavrilu, A., Hasselgren, P.O., Mori, M.A., Molla, M., und Tseng, Y.H. (2013). Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nature medicine* 19, 635-639.
- Davies, B.S., Beigneux, A.P., Barnes, R.H., 2nd, Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M.M., Nobumori, C., Nyren, R., Goldberg, I., Olivecrona, G., Bensadoun, A., Young, S.G., und Fong, L.G. (2010). GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell metabolism* 12, 42-52.
- Davies, B.S., Goulbourne, C.N., Barnes, R.H., 2nd, Turlo, K.A., Gin, P., Vaughan, S., Vaux, D.J., Bensadoun, A., Beigneux, A.P., Fong, L.G., und Young, S.G. (2012). Assessing mechanisms of GPIHBP1 and lipoprotein lipase movement across endothelial cells. *Journal of lipid research* 53, 2690-2697.
- Davies, B.S., Waki, H., Beigneux, A.P., Farber, E., Weinstein, M.M., Wilpitz, D.C., Tai, L.J., Evans, R.M., Fong, L.G., Tontonoz, P., und Young, S.G. (2008). The expression of GPIHBP1, an endothelial cell binding site for lipoprotein lipase and chylomicrons, is induced by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Mol Endocrinol* 22, 2496-2504.
- de Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R., und Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 108, 1379-1385.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., und Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *Journal of lipid research* 34, 1637-1659.
- Doerge, H., und Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21, 259-268.
- Doolittle, M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., und Kirchgessner, T.G. (1990). The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *The Journal of biological chemistry* 265, 4570-4577.
- Du, H., Heur, M., Duanmu, M., Grabowski, G.A., Hui, D.Y., Witte, D.P., und Mishra, J. (2001). Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span. *Journal of lipid research* 42, 489-500.

- Dulloo, A.G., Seydoux, J., und Girardier, L. (1991). Peripheral mechanisms of thermogenesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. *International journal of obesity* 15, 317-326.
- Eiselein, L., Wilson, D.W., Lame, M.W., und Rutledge, J.C. (2007). Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292, H2745-2753.
- Eisenberg, S., und Levy, R.I. (1975). Lipoprotein metabolism. *Advances in lipid research* 13, 1-89.
- Elmasri, H., Karaaslan, C., Teper, Y., Ghelfi, E., Weng, M., Ince, T.A., Kozakewich, H., Bischoff, J., und Cataltepe, S. (2009). Fatty acid binding protein 4 is a target of VEGF and a regulator of cell proliferation in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3865-3873.
- Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., und Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry* 268, 11811-11816.
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., und Bahouth, S.W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.
- Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., und Silverstein, R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *The Journal of biological chemistry* 274, 19055-19062.
- Foley, E.M., Gordts, P.L., Stanford, K.I., Gonzales, J.C., Lawrence, R., Stoddard, N., und Esko, J.D. (2013). Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33, 2065-2074.
- Ghorbani, M., und Himms-Hagen, J. (1997). Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 21, 465-475.
- Gin, P., Yin, L., Davies, B.S., Weinstein, M.M., Ryan, R.O., Bensadoun, A., Fong, L.G., Young, S.G., und Beigneux, A.P. (2008). The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *The Journal of biological chemistry* 283, 29554-29562.
- Glatz, J.F., Luiken, J.J., und Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological reviews* 90, 367-417.
- Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of lipid research* 37, 693-707.

- Gonzales, J.C., Gordts, P.L., Foley, E.M., und Esko, J.D. (2013). Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *The Journal of clinical investigation* 123, 2742-2751.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology* 3, 23-35.
- Goulbourne, C.N., Gin, P., Tatar, A., Nobumori, C., Hoenger, A., Jiang, H., Grovenor, C.R., Adeyo, O., Esko, J.D., Goldberg, I.J., Reue, K., Tontonoz, P., Bensadoun, A., Beigneux, A.P., Young, S.G., und Fong, L.G. (2014). The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries. *Cell metabolism* 19, 849-860.
- Gupta, R.K., Mepani, R.J., Kleiner, S., Lo, J.C., Khandekar, M.J., Cohen, P., Frontini, A., Bhowmick, D.C., Ye, L., Cinti, S., und Spiegelman, B.M. (2012). Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell metabolism* 15, 230-239.
- Hagberg, C., Mehlem, A., Falkevall, A., Muhl, L., und Eriksson, U. (2013). Endothelial fatty acid transport: role of vascular endothelial growth factor B. *Physiology (Bethesda)* 28, 125-134.
- Hagberg, C.E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L.A., Samén, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., Klar, J., Genove, G., Pietras, K., Stone-Elander, S., Claesson-Welsh, L., Yla-Herttuala, S., Lindahl, P., und Eriksson, U. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature* 464, 917-921.
- Hamilton, J.A., Guo, W., und Kamp, F. (2002). Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Molecular and cellular biochemistry* 239, 17-23.
- Hanssen, M.J., Broeders, E., Samms, R.J., Vosselman, M.J., van der Lans, A.A., Cheng, C.C., Adams, A.C., van Marken Lichtenbelt, W.D., und Schrauwen, P. (2015). Serum FGF21 levels are associated with brown adipose tissue activity in humans. *Scientific reports* 5, 10275.
- Hany, T.F., Gharehpapagh, E., Kamel, E.M., Buck, A., Himms-Hagen, J., und von Schulthess, G.K. (2002). Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 29, 1393-1398.
- Harms, M., und Seale, P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature medicine* 19, 1252-1263.
- Heeren, J., Niemeier, A., Merkel, M., und Beisiegel, U. (2002). Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med (Berl)* 80, 576-584.
- Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J., Schon, M.R., Abumrad, N.A., Bluher, M., Klein, S., und Kahn, B.B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333-338.

- Himms-Hagen, J., Cui, J., Danforth, E., Jr., Taatjes, D.J., Lang, S.S., Waters, B.L., and Claus, T.H. (1994). Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *The American journal of physiology* 266, R1371-1382.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M.C., Ceresi, E., Barbatelli, G., und Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* 279, C670-681.
- Hof, D., und von Eckardstein, A. (2009). [Risk factors in atherosclerotic coronary heart disease]. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique* 66, 253-259.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F.J., Giralt, M., Mampel, T., und Villarroya, F. (2011a). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 286, 12983-12990.
- Hondares, E., Rosell, M., Diaz-Delfin, J., Olmos, Y., Monsalve, M., Iglesias, R., Villarroya, F., und Giralt, M. (2011b). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *The Journal of biological chemistry* 286, 43112-43122.
- Huh, H.Y., Pearce, S.F., Yesner, L.M., Schindler, J.L., und Silverstein, R.L. (1996). Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 87, 2020-2028.
- Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D., und Uyeda, K. (2004). Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7281-7286.
- James, D.E., Piper, R.C., und Slot, J.W. (1994). Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling. *Trends in cell biology* 4, 120-126.
- James, P.T., Rigby, N., und Leach, R. (2004). The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 11, 3-8.
- Jansky, L. (1973). Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 48, 85-132.
- Jay, A.G., Chen, A.N., Paz, M.A., Hung, J.P., und Hamilton, J.A. (2015). CD36 Binds Oxidized Low Density Lipoprotein (LDL) in a Mechanism Dependent upon Fatty Acid Binding. *The Journal of biological chemistry* 290, 4590-4603.
- Jaye, M., Lynch, K.J., Krawiec, J., Marchadier, D., Maugeais, C., Doan, K., South, V., Amin, D., Perrone, M., und Rader, D.J. (1999). A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nature genetics* 21, 424-428.
- Jeon, H., und Blacklow, S.C. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annual review of biochemistry* 74, 535-562.

- Jong, M.C., Hofker, M.H., und Havekes, L.M. (1999). Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 472-484.
- Kersten, S. (2005). Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochemical Society transactions* 33, 1059-1062.
- Klingenspor, M., Herzig, S., und Pfeifer, A. (2012). Brown fat develops a brite future. *Obesity facts* 5, 890-896.
- Kratky, D., Zimmermann, R., Wagner, E.M., Strauss, J.G., Jin, W., Kostner, G.M., Haemmerle, G., Rader, D.J., und Zechner, R. (2005). Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 115, 161-167.
- Kronstein, R., Seebach, J., Grossklaus, S., Minten, C., Engelhardt, B., Drab, M., Liebner, S., Arsenijevic, Y., Taha, A.A., Afanasieva, T., und Schnittler, H.J. (2012). Caveolin-1 opens endothelial cell junctions by targeting catenins. *Cardiovascular research* 93, 130-140.
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A.S., Goetz, R., Eliseenkova, A.V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K.P., Kliewer, S.A., und Kuro-o, M. (2007). Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *The Journal of biological chemistry* 282, 26687-26695.
- Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P.J., Grewal, T., Beisiegel, U., und Heeren, J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* 204, 105-111.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen, T.M., Toubro, S., van Baak, M.A., Gottesdiener, K.M., Larson, P., Saris, W.H., und Astrup, A. (2002). Effect of a 28-d treatment with L-796568, a novel beta(3)-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure and body composition in obese men. *The American journal of clinical nutrition* 76, 780-788.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J.G., Gorkiewicz, G., und Zechner, R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism* 3, 309-319.
- Lee, P., Linderman, J.D., Smith, S., Brychta, R.J., Wang, J., Idelson, C., Perron, R.M., Werner, C.D., Phan, G.Q., Kammula, U.S., Kebebew, E., Pacak, K., Chen, K.Y., und Celi, F.S. (2014). Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. *Cell metabolism* 19, 302-309.
- Lee, P., Swarbrick, M.M., und Ho, K.K. (2013). Brown adipose tissue in adult humans: a metabolic renaissance. *Endocrine reviews* 34, 413-438.

- Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., und Granneman, J.G. (2012). In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism* 15, 480-491.
- Lepper, C., und Fan, C.M. (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* 48, 424-436.
- Li, C. (2006). Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *Current opinion in lipidology* 17, 152-156.
- Lichtenstein, L., und Kersten, S. (2010). Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 415-420.
- Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., Virtanen, K.A., Beuschlein, F., Persson, A., Borga, M., und Enerback, S. (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nature medicine* 19, 631-634.
- Lithell, H., Boberg, J., Hellsing, K., Lundqvist, G., und Vessby, B. (1978). Lipoprotein-lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 30, 89-94.
- Livak, K.J., und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lookene, A., Beckstead, J.A., Nilsson, S., Olivecrona, G., und Ryan, R.O. (2005). Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *The Journal of biological chemistry* 280, 25383-25387.
- Lopez-Miranda, J., Perez-Martinez, P., Marin, C., Moreno, J.A., Gomez, P., und Perez-Jimenez, F. (2006). Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology* 17, 132-138.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.
- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., und Esko, J.D. (2007). Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *The Journal of clinical investigation* 117, 153-164.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., und Matsubara, K. (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and biophysical research communications* 221, 286-289.
- Martinez-deMena, R., und Obregon, M.J. (2005). Insulin increases the adrenergic stimulation of 5' deiodinase activity and mRNA expression in rat brown adipocytes; role of MAPK and PI3K. *Journal of molecular endocrinology* 34, 139-151.

- Masouye, I., Hagens, G., Van Kuppevelt, T.H., Madsen, P., Saurat, J.H., Veerkamp, J.H., Pepper, M.S., und Siegenthaler, G. (1997). Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circulation research* 81, 297-303.
- Mattsson, C.L., Csikasz, R.I., Shabalina, I.G., Nedergaard, J., und Cannon, B. (2010). Caveolin-1-ablated mice survive in cold by nonshivering thermogenesis despite desensitized adrenergic responsiveness. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 299, E374-383.
- Mc, F.A. (1958). Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182, 53.
- Mead, J.F. (1963). Lipid Metabolism. *Annual review of biochemistry* 32, 241-268.
- Mead, J.R., Irvine, S.A., und Ramji, D.P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* 80, 753-769.
- Merkel, M., Eckel, R.H., und Goldberg, I.J. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *Journal of lipid research* 43, 1997-2006.
- Merkel, M., Loeffler, B., Kluger, M., Fabig, N., Geppert, G., Pennacchio, L.A., Laatsch, A., und Heeren, J. (2005). Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 280, 21553-21560.
- Meshulam, T., Simard, J.R., Wharton, J., Hamilton, J.A., und Pilch, P.F. (2006). Role of caveolin-1 and cholesterol in transmembrane fatty acid movement. *Biochemistry* 45, 2882-2893.
- Miyoshi, H., Perfield, J.W., 2nd, Souza, S.C., Shen, W.J., Zhang, H.H., Stancheva, Z.S., Kraemer, F.B., Obin, M.S., und Greenberg, A.S. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 282, 996-1002.
- Moulin, K., Truel, N., Andre, M., Arnauld, E., Nibbelink, M., Cousin, B., Dani, C., Penicaud, L., und Casteilla, L. (2001). Emergence during development of the white-adipocyte cell phenotype is independent of the brown-adipocyte cell phenotype. *The Biochemical journal* 356, 659-664.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., und Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E444-452.
- Nguyen, K.D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., und Chawla, A. (2011). Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 480, 104-108.
- Nilsson, S.K., Heeren, J., Olivecrona, G., und Merkel, M. (2011). Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* 219, 15-21.

- Nimpf, J., und Schneider, W.J. (2000). From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochimica et biophysica acta* 1529, 287-298.
- Olivecrona, G., und Beisiegel, U. (1997). Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1545-1549.
- Olivecrona, T., Bengtsson, G., Marklund, S.E., Lindahl, U., und Hook, M. (1977). Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Federation proceedings* 36, 60-65.
- Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M.S., Mandriota, S.J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M.M., Shibuya, M., Alitalo, K., und Eriksson, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11709-11714.
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M.E., Oikonen, V., Nojonen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerback, S., und Virtanen, K.A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell metabolism* 14, 272-279.
- Ortegren, U., Aboulaich, N., Ost, A., und Stralfors, P. (2007). A new role for caveolae as metabolic platforms. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18, 344-349.
- Parthasarathy, N., Goldberg, I.J., Sivaram, P., Mulloy, B., Flory, D.M., und Wagner, W.D. (1994). Oligosaccharide sequences of endothelial cell surface heparan sulfate proteoglycan with affinity for lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* 269, 22391-22396.
- Parton, R.G., und Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 185-194.
- Peirce, V., und Vidal-Puig, A. (2013). Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 1, 353-360.
- Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., und Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 285, 7153-7164.
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, U., Eehalt, R., und Stremmel, W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Molecular biology of the cell* 16, 24-31.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., und Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

- Qiao, L., Yoo, H., Bosco, C., Lee, B., Feng, G.S., Schaack, J., Chi, N.W., und Shao, J. (2014). Adiponectin reduces thermogenesis by inhibiting brown adipose tissue activation in mice. *Diabetologia* 57, 1027-1036.
- Qiu, Y., Nguyen, K.D., Odegaard, J.I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R.M., Palmiter, R.D., und Chawla, A. (2014). Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell* 157, 1292-1308.
- Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., und Lisanti, M.P. (2002). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *The Journal of biological chemistry* 277, 8635-8647.
- Reiner, Z., Guardamagna, O., Nair, D., Soran, H., Hovingh, K., Bertolini, S., Jones, S., Coric, M., Calandra, S., Hamilton, J., Eagleton, T., und Ros, E. (2014). Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis* 235, 21-30.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., und Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1761, 416-423.
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., und Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology* 15, 659-667.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., und Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Rutledge, J.C., Woo, M.M., Rezai, A.A., Curtiss, L.K., und Goldberg, I.J. (1997). Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circulation research* 80, 819-828.
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., und Tsujisaki, M. (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526-1531.
- Sandoval, A., Fraisl, P., Arias-Barrau, E., Dirusso, C.C., Singer, D., Sealls, W., und Black, P.N. (2008). Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Archives of biochemistry and biophysics* 477, 363-371.
- Schmidt, R.F., Lang, F., und Heckmann, M. (2010). *Physiologie des Menschen. mit Pathophysiologie.* (Heidelberg: SpringerMedizin Verlag).
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., und Zimmermann, R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *The Journal of biological chemistry* 281, 40236-40241.

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M.A., Beier, D.R., und Spiegelman, B.M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., und Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* 6, 38-54.

Sears, I.B., MacGinnitie, M.A., Kovacs, L.G., und Graves, R.A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and cellular biology* 16, 3410-3419.

Sellayah, D., Bharaj, P., und Sikder, D. (2011). Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell metabolism* 14, 478-490.

Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M., Kalinovich, A.V., Cannon, B., und Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell reports* 5, 1196-1203.

Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., und Kajimura, S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PloS one* 7, e49452.

Silva, J.E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews* 86, 435-464.

Silverstein, R.L., und Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science signaling* 2, re3.

Sonnenburg, W.K., Yu, D., Lee, E.C., Xiong, W., Gololobov, G., Key, B., Gay, J., Wilganowski, N., Hu, Y., Zhao, S., Schneider, M., Ding, Z.M., Zambrowicz, B.P., Landes, G., Powell, D.R., und Desai, U. (2009). GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase and prevents its inhibition by angiopoietin-like 3 and angiopoietin-like 4. *Journal of lipid research* 50, 2421-2429.

Storch, J., und McDermott, L. (2009). Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S126-131.

Stralfors, P., und Belfrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 258, 15146-15152.

Strauss, J.G., Hayn, M., Zechner, R., Levak-Frank, S., und Frank, S. (2003). Fatty acids liberated from high-density lipoprotein phospholipids by endothelial-derived lipase are incorporated into lipids in HepG2 cells. *The Biochemical journal* 371, 981-988.

Strauss, J.G., Zimmermann, R., Hrzenjak, A., Zhou, Y., Kratky, D., Levak-Frank, S., Kostner, G.M., Zechner, R., und Frank, S. (2002). Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein (HDL) particles and the selective uptake of HDL-associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *The Biochemical journal* 368, 69-79.

- Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., und Olivecrona, G. (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17450-17455.
- Swerlick, R.A., Lee, K.H., Wick, T.M., und Lawley, T.J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol* 148, 78-83.
- Syamsunarno, M.R., Iso, T., Yamaguchi, A., Hanaoka, H., Putri, M., Obokata, M., Sunaga, H., Koitabashi, N., Matsui, H., Maeda, K., Endo, K., Tsushima, Y., Yokoyama, T., und Kurabayashi, M. (2014). Fatty acid binding protein 4 and 5 play a crucial role in thermogenesis under the conditions of fasting and cold stress. *PloS one* 9, e90825.
- Teslovich, T.M., Musunuru, K., Smith, A.V., Edmondson, A.C., Stylianou, I.M., Koseki, M., Pirruccello, J.P., Ripatti, S., und Chasman, D.I. (2010). Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 466, 707-713.
- Thonberg, H., Fredriksson, J.M., Nedergaard, J., und Cannon, B. (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via alpha1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *The Biochemical journal* 364, 73-79.
- Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J., und Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4401-4406.
- Tran, K.V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M.C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., Corvera, S., und Cinti, S. (2012). The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell metabolism* 15, 222-229.
- Trigatti, B.L., Anderson, R.G., und Gerber, G.E. (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochemical and biophysical research communications* 255, 34-39.
- Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., Ahrens, M.J., Dudley, A.T., Norris, A.W., Kulkarni, R.N., und Kahn, C.R. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000-1004.
- Tupone, D., Madden, C.J., und Morrison, S.F. (2014). Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Frontiers in neuroscience* 8, 14.
- Umekawa, T., Yoshida, T., Sakane, N., Saito, M., Kumamoto, K., und Kondo, M. (1997). Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: induction of uncoupling protein and activation of glucose transporter 4 in white fat. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 136, 429-437.

- Unger, R.H., Clark, G.O., Scherer, P.E., und Orci, L. (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 209-214.
- van Baak, M.A., Hul, G.B., Toubro, S., Astrup, A., Gottesdiener, K.M., DeSmet, M., und Saris, W.H. (2002). Acute effect of L-796568, a novel beta 3-adrenergic receptor agonist, on energy expenditure in obese men. *Clinical pharmacology and therapeutics* 71, 272-279.
- Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F., Van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S., und Bassingthwaighe, J.B. (1998). Transport of long-chain fatty acids across the muscular endothelium. *Advances in experimental medicine and biology* 441, 181-191.
- Van Gaal, L.F., Mertens, I.L., und De Block, C.E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875-880.
- van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommel, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., und Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine* 360, 1500-1508.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., und Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine* 360, 1518-1525.
- Wang, C.S., Hartsuck, J., und McConathy, W.J. (1992). Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1123, 1-17.
- Wang, C.S., McConathy, W.J., Kloer, H.U., und Alaupovic, P. (1985). Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *The Journal of clinical investigation* 75, 384-390.
- Wang, J., Cao, H., Ban, M.R., Kennedy, B.A., Zhu, S., Anand, S., Yusuf, S., Pollex, R.L., und Hegele, R.A. (2007). Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 2450-2455.
- Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., und Scherer, P.E. (2013). Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature medicine* 19, 1338-1344.
- Weber, C., und Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* 17, 1410-1422.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., und Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* 112, 1796-1808.
- Weyer, C., Tataranni, P.A., Snitker, S., Danforth, E., Jr., und Ravussin, E. (1998). Increase in insulin action and fat oxidation after treatment with CL 316,243, a highly selective beta3-adrenoceptor agonist in humans. *Diabetes* 47, 1555-1561.

- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., Dale, M., Virtue, S., Villarroya, F., Cannon, B., Rahmouni, K., Lopez, M., und Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* 149, 871-885.
- Williams, K.J. (2008). Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids. *The Journal of clinical investigation* 118, 3247-3259.
- Williams, K.J., und Fisher, E.A. (2011). Globular warming: how fat gets to the furnace. *Nature medicine* 17, 157-159.
- Williams, T.M., und Lisanti, M.P. (2004). The caveolin proteins. *Genome biology* 5, 214.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W.D., Hoeks, J., Enerback, S., Schrauwen, P., und Spiegelman, B.M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., und Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 112, 1821-1830.
- Ye, L., Wu, J., Cohen, P., Kazak, L., Khandekar, M.J., Jedrychowski, M.P., Zeng, X., Gygi, S.P., und Spiegelman, B.M. (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12480-12485.
- Young, S.G., Davies, B.S., Fong, L.G., Gin, P., Weinstein, M.M., Bensadoun, A., und Beigneux, A.P. (2007). GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Current opinion in lipidology* 18, 389-396.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A., und Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism* 15, 279-291.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., und Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.
- Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., und Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3113-3120.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. **Jörg Heeren** für die großartige Betreuung während meiner Arbeit und die interessante Themenstellung bedanken.

Herrn Prof. **Christian Betzel** danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit. Für die Hilfe bei meinem Bewerbungsschreiben möchte ich mich besonders bei Dr. **Alexander Bartelt** bedanken.

Natürlich möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie für die Unterstützung in guten als auch weniger guten Zeiten, aber vor allem für den Spaß, den ich während meiner Doktorarbeit hatte, bedanken. Vielen Dank **Walter, Sandra, Evi, Birgit, Klaus, Anette, Maike** und **Dieter** für die stete Hilfsbereitschaft und das ein oder andere nette Gespräch in der Küche. **Ludger** gilt mein besonderer Dank für die stete Diskussionsbereitschaft. Bei **Markus, Luci, Kirstin, Nils, Stefan, Alexander, Steffen, Clara, Anna, Brigitte, Miriam, Christian** und **Nicola** möchte ich mich ganz besonders für die großartige Arbeitsatmosphäre, unzählige tolle Gespräche und unvergessliche Nächte bedanken. Ohne euch wäre meine Zeit im Institut nur halb so schön gewesen! Bei **Christine** möchte ich mich für ihr Organisationstalent und ihr immer offenes Ohr bedanken. Und natürlich danke ich meiner **Familie** für die immerwährende Unterstützung. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden die gängigen chemischen Formeln und SI-Einheiten verwendet.

°C	Grad Celsius
AC	Adenylatzyklase
Adipoq	Adiponektin
ANGPTL	<i>Angiopoietin-like protein</i>
Apo	Apolipoprotein
Arg1	Arginase 1
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BMP7	<i>Bone morphogenic protein 7</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav1	Caveolin-1
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CGI-58	<i>Comparative gene identification-58</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid
DiD	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3' Tetramethylindodicarbocyanin
DIO2	<i>Type 2 iodothyronine deiodinase</i>
dpm	<i>disintegrations per minute</i>
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	endotheliale Lipase
Emr1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
et al.	et alii (lat.: und andere)

FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transporter protein</i>
FFS	Freie Fettsäuren
FGF21	<i>Fibroblast growth factor 21</i>
FGFR1	<i>FGF receptor 1</i>
Ggf.	gegebenenfalls
GLUT4	Glukosetransporter 4
GPIHBP1	<i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL-binding protein 1</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HSL	hormonsensitive Lipase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IF	Immunfluoreszenz
Il4	Interleukin 4
Il6	Interleukin 6
LAL	<i>Lysosomal acid lipase</i>
LAMP2	<i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
Lipa	<i>Lipase A, Lysosomal acid lipase</i>
Lipg	<i>Endothelial lipase</i>
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP1	<i>LDLR-related protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCP1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
min	Minute
Mrc2	<i>Mannose receptor C type 2</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
Pax7	<i>Paired box 7</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positron Emission Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PGC1 α	<i>PPAR-γ coactivator1-α</i>
PKA	Proteinkinase A
PLIN	Perilipin
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	<i>PPAR response element</i>

PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
Std	Stunde
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
tbp	<i>TATA-box binding protein</i>
Tg	transgen
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TRL	Triglyzeridreiches Lipoprotein
TRPM8	<i>Transient receptor potential (TRP) melastatin 8</i>
u.a.	unter anderem
UCP1	<i>Uncoupling protein-1</i>
VEGF-B	<i>Vascular endothelial growth factor B</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WB	Western Blot
WT	Wild-Typ
z.B.	Zum Beispiel
α	anti
β_3 -AR	β_3 -adrenerge Rezeptoren

9.2 Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS

Substanz	GHS-Hinweis	H-Sätze	P-Sätze
Acepromazin	GHS07 (Xi)	302-312-332	280
Chloroform	GHS06 (T) GHS08 (Xn)	351-361d-331-302- 372-319-315	302+P352-314
Dispase	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	315-319-334	305+351+338-337+313- 332+313-261-304+341- 285
EDTA	GHS07 (Xi)	319	305+351+338
Ethanol	GHS02 (F)	225	210
Kaliumbromid	GHS07 (Xi)	315-319-335	261-305+351+338
Ketamin	GHS07 (Xi)	302-315-319-335	261-305+351+338
Kollagenase	GHS07 (Xi) GHS08 (Xn)	315-319-334-335	261-305+351+338- 342+311
Methanol	GHS02 (F) GHS06 (T) GHS08 (Xn)	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
Paraformaldehyd	GHS05 (C) GHS06 (T)	228-302-332-351- 335-315-319-317	281-302+352- 305+351+338-308+313-

	GHS08 (Xn)		304+340
Proteinase K	GHS07 (Xi)	315-319-334-335	261-305+351+338-342+311
	GHS08 (Xn)		
Rompun	GHS06 (T)	301	301+310
Salzsäure	GHS05 (C)	314-335-290	234-260-305+351+338-303+361+353-304+340-309+311-501
	GHS07 (Xi)		
SDS	GHS02 (F)	228-302-332-315-318-335-413	210-261-373-280-305+351+338
	GHS05 (C)		
	GHS07 (Xi)		
Triton X-100	GHS05 (C)	302-318	262-280-305+351+338-313
	GHS07 (Xi)		
TRIzol	GHS05 (C)	314-341-373-412-302-312-332-335	301+312-304+340-310-301+330+331-303+361+353-305+351+338-308+313-273-280
	GHS07 (Xi)		
	GHS08 (Xn)		

Gefahrenhinweise (H-Sätze):

H-Sätze	
H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H304	Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H350	Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen

	Expositionsweg besteht).
H361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht)
H361 d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H370	Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H372	Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H373	Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise (P-Sätze):

P-Sätze	
P210	Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P234	Nur im Originalbehälter aufbewahren.
P260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P262	Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden
P285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P301	Bei Verschlucken:
P302	Bei Berührung mit der Haut:
P303	Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
P304	Bei Einatmen:
P305	Bei Kontakt mit den Augen:
P306	Bei Exposition oder falls betroffen:
P307	Bei Exposition oder Unwohlsein:
P308	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P309	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P310	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P311	Bei Verschlucken:
P312	Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P313	Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P320	Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
P330	Mund ausspülen.

P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P332	Bei Hautreizung:
P337	Bei anhaltender Augenreizung:
P338	Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen weiter ausspülen.
P340	Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P341	Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P342	Bei Symptomen der Atemwege:
P351	Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
P352	Mit viel Wasser und Seife waschen.
P353	Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
P361	Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
P373	KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften.

Gefahrensymbole	
F	leichtentzündlich
T	giftig
Xn	gesundheitsschädlich
Xi	reizend
C	ätzend

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Unterschrift

Datum