

Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Chemie,
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Clara John (geb. Weigelt)

aus Cuxhaven

Hamburg, 2015

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2012 bis August 2015 extern im Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Prof. Dr. Markus Fischer betreute diese Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Heeren

Disputation: 05. Februar 2016

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Teil A	Einleitung und Fragestellung.....	1
1	Braunes Fettgewebe.....	1
1.1	Zentrale Aktivierung der zitterfreien Thermogenese.....	1
1.2	Beige Adipocyten	3
1.3	Aktivierung der zitterfreien Thermogenese in braunen und beigen Adipocyten durch periphere, physiologische Signale	4
1.4	Die Aktivierung von braunem Fettgewebe als therapeutisch relevantes <i>Target</i> zur Prävention und Behandlung von metabolischen Erkrankungen	5
2	Vaskulärer Lipoproteinstoffwechsel.....	8
2.1	Exogener Lipidstoffwechsel	9
2.2	Endogener Lipidstoffwechsel	10
2.3	HDL-Stoffwechsel.....	11
3	Cholesterinstoffwechsel.....	14
3.1	Cholesterinbiosynthese	14
3.2	Elimination von Cholesterin	15
3.2.1	Gallensäuren	16
3.2.1.1	Synthese.....	16
3.2.1.2	Die enterohepatische Zirkulation.....	18
3.2.1.3	Regulation der Gallensäuresynthese und des –transports.....	21
3.2.1.4	Gallensäuren als Modulatoren des Stoffwechsels	23
4	Folge einer Störung des Lipidstoffwechsels - Atherosklerose	24
5	Fragestellung	25
Teil B	Material und Methoden	27
1	Mausmodelle, Diäten und Interventionen.....	27
1.1	Mausmodelle und Tierhaltung.....	27
1.2	Diäten	28
1.3	Aktivierung des braunen Fettgewebes	28
1.3.1	Kälteexposition.....	28
1.3.2	Pharmakologische Aktivierung	28

1.4	Pharmakologische Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR).....	29
2	Plasma-Analyse.....	29
2.1	Gewinnung von Plasma	29
2.2	Cholesterin- und Triglyzeridbestimmung im Plasma	29
2.3	Lipoproteinprofiling.....	30
3	Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in Lebergewebe.....	30
4	Genexpressionsanalyse	31
5	GC-FID-Methode zur quantitativen Bestimmung von Fettsäuremethylestern	32
5.1	Extraktion und Derivatisierung	32
5.2	Gaschromatographische Analyse.....	32
5.3	Auswertung	32
6	UPLC-ESI-QqTOF-Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Hauptlipidklassen	33
6.1	Extraktion.....	33
6.1.1	Isolierte Fraktionen von Lipoproteinen.....	33
6.1.2	Gewebe.....	33
6.2	UPLC-MS Analyse	34
6.3	Auswertung	37
7	HPLC-ESI-QqQ-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten.....	37
7.1	Extraktion.....	37
7.2	HPLC-MS Analyse	38
7.3	Auswertung	39
8	D ₂ O-Fluxomics	39
9	<i>In vivo</i> HDL-Turnover-Assay.....	40
10	<i>In vivo</i> reverser Cholesterintransport-Assay.....	41
11	Kombination aus oralem Glukose-Toleranz-Test und <i>in vivo</i> Glukose-Organaufnahme	42
12	Humane Plasma-Proben.....	42
13	Statistik	42

Teil C Ergebnisse.....	43
1 Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf die intravaskuläre Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen	43
1.1 Bestimmung der TRL- und HDL-Lipidkomposition in hypertriglyzeridämischen <i>Apoa5^{-/-}</i> -Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	44
1.1.1 Analyse der Plasmalipidkonzentration und Lipoproteinprofile	44
1.1.2 Lipidomanalyse isolierter Lipoproteine.....	45
1.2 Identifizierung von Lysophosphatidylcholinen als Indikatoren für die Aktivierung von braunem Fettgewebe	47
1.3 Untersuchung der peripheren und hepatischen <i>de novo</i> Lipogenese sowie deren Einfluss auf die Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL nach Aktivierung des braunen bzw. beigen Fettgewebes	49
1.3.1 Lipidom-Analyse in Geweben und isolierten Lipoproteinen von C57BL/6J-Mäusen.....	49
1.3.2 Visualisierung der <i>de novo</i> Lipogenese in Geweben und isolierten Lipoproteinen über einen Fluxomics-Ansatz.....	51
1.3.3 Genexpressionsanalyse von an der <i>de novo</i> Lipogenese beteiligten Genen ..	53
1.4 Bedeutung der Lipoproteinlipase brauner und beiger Adipocyten für Veränderungen in der Lipidkomposition zirkulierender HDL nach Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	54
1.4.1 Analyse der Plasmalipidkonzentration und Lipoproteinprofile in Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz	54
1.4.2 Lipidomanalyse isolierter Lipoproteine in Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz.....	55
1.5 Auswirkungen der Aktivierung von braunem und beigen Fettgewebe auf den HDL-Cholesterin Umsatz sowie den reversen Cholesterintransport	56
2 Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel.....	60
2.1 Analyse des postprandialen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	60
2.1.1 Bestimmung des Nahrungsumsatzes, der Plasmalipidkonzentration sowie der Lipoproteinprofile	60

2.1.2	Expressionsanalyse von Genen des hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels	63
2.1.3	Gallensäureanalytik in der Leber	64
2.2	Auswirkungen der pharmakologischen Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	65
2.3	Quantifizierung der fäkalen Elimination von Gallensäuren in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	68
2.4	Analyse des Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels in Western Typ Diät- gefütterten <i>ApoE</i> ^{-/-} , <i>Ldlr</i> ^{-/-} sowie <i>Ldlr</i> ^{-/-} <i>Lrp1</i> ^{cre+} - Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	70
2.4.1	Untersuchung der Plasmalipidkonzentration sowie der Lipoproteinprofile... 70	
2.4.2	Gallensäureanalytik im Fäzes	71
Teil D	Diskussion	73
1	Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf die intravaskuläre Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen und dessen Einfluss auf einen HDL-vermittelten reversen Cholesterintransport.....	74
1.1	Einfluss von aktiviertem braunem und beigem Fettgewebe auf die periphere und hepatische <i>de novo</i> Lipogenese und daraus resultierende Alterationen der Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL	74
1.2	Einfluss der Lipoproteinlipase brauner und beiger Adipocyten auf eine Veränderung der Lipidkomposition zirkulierender HDL nach Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	78
1.3	Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf einen HDL-vermittelten reversen Cholesterin-Transport	78
2	Einfluss der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel.....	80
2.1	Diätabhängige Beeinflussung des hepatischen Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsels nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	80
2.2	Einfluss einer Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte	82

2.3 Einfluss der Prozessierung postprandialer Lipoproteine auf die fäkale Elimination von Gallensäuren nach Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	83
3 Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel.....	86
Teil E Zusammenfassung	88
Teil F Summary	90
Teil G Literatur.....	92
Teil H Tabellenverzeichnis.....	105
Teil I Abbildungsverzeichnis.....	106
Teil J Anhang.....	108
1 Material.....	108
1.1 Chemikalienverzeichnis inklusive verwendeter Gefahrstoffe nach GHS.....	108
1.2 Verzeichnis über die verwendeten Kits und Reagenzien.....	113
1.3 Verzeichnis über die verwendeten Lösungen und Puffer	114
1.4 Verbrauchsmaterialienverzeichnis.....	116
1.5 Arbeitsgeräteverzeichnis.....	117
1.6 Softwareverzeichnis.....	118
2 Ergänzungen zum Teil C – Ergebnisse.....	119
3 Wissenschaftliche Publikationen, Vorträge und Poster, die aus der Promotion hervorgegangen sind	125
3.1 Publikationen	125
3.2 Vorträge	126
3.2.1 Eingeladene Vorträge	126
3.2.2 Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen.....	126
3.3 Poster auf internationalen Kongressen	126
4 Danksagung	127
5 Lebenslauf	128
6 Eidesstaatliche Erklärung	129

Abkürzungsverzeichnis

¹²⁵ I-TC	¹²⁵ I-Tyramin Cellubiose
22-OH-Chol	22-S-Hydroxycholesterin
24-OH-Chol	24-S-Hydroxycholesterin
25-OH-Chol	25-Hydroxycholesterin
27-OH-Chol	27-Hydroxycholesterin
³ H-CEt	³ H-Cholesterinether
7-OH-Chol	7-Hydroxycholesterin
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
ABCG5	<i>ATP-binding cassette transporter G5</i>
ABCG8	<i>ATP-binding cassette transporter G8</i>
ABHD5	<i>α/β-hydrolase domain-containing protein 5</i>
Acaca	Acetyl-CoA Carboxylase 1
AdPla	<i>Adipocyte phospholipase</i>
aLKO	Mäuse mit adipocytenspezifischen Lpl-Knockout
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-Kinase
ANGPTL3	<i>Angiopoietin-like proteins 3</i>
ANGPTL4	<i>Angiopoietin-like proteins 4</i>
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
Apo	Apolipoprotein
ARH	<i>Autosomal recessive hypercholesterolemia</i>
ATF-2	<i>Activating transcription factor 2</i>
ATGL	Adipozyten-Triglycerid Lipase
BA	<i>Bile acid</i>
Baat	<i>BA-CoA:amino acid N-acyltransferase</i>
BAIBA	<i>β-aminoisobutyric acid</i>
BAT	<i>Brown adipose tissue</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
Billi	Billirubin
BMI	<i>Body mass index</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BNP	<i>Ventricular natriuretic peptide</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>
BSH	<i>Bile salt hydrolases</i>
C	Kapillare
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding-protein</i>
CA	Cholsäure (<i>cholic acid</i>)
ca.	<i>Circa</i>
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CBA	<i>Conjugated bile acids</i>
Cd36	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CDCA	Chenodeoxycholsäure (<i>chenodeoxycholic acid</i>)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	Cholesterylester
Cer	Ceramid
CETP	Cholesterylester-Transfer-Protein
CGI-58	<i>Comparative gene identification 58</i>
CHREBP	<i>Carbohydrate-responsive-element-binding proteins</i>
CID	<i>Collisional induced dissociation fragmentation</i>
Cidea	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector</i>
CL	CL316,243
CM	Chylomikron

CoA	CoenzymA
CR	CM-remnant
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CURL	<i>Compartment of uncoupling receptor and ligand</i>
Cyp27a1	<i>Sterol-27-hydroxylase</i>
Cyp7a1	<i>Cholesterol-7α-hydroxylase</i>
Cyp7b1	<i>Oxysterol-7α-hydroxylase</i>
Cyp8b1	<i>Sterol-12-α hydroxylase</i>
d.h.	Das heißt
DCA	Deoxycholsäure (<i>deoxycholic acid</i>)
DG	Diacylglyzerid
<i>Dhcr24</i>	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>
D2	<i>Type 2 iodothyronine deiodinase</i>
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNL	<i>de novo</i> Lipogenese
DOC	Desoxycorticosteron
E	Endothelzelle
E3L	ApoE3 Leiden Mäuse
<i>E3L.CETP</i>	E3L Mäuse, die das humane CETP überexprimieren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Endotheliale Lipase
Elovl	Elongase
epiWAT	Epididymales weißes Fettgewebe
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
et al.	<i>Et alii</i>
F	Flussrate
FA	<i>Fatty acid</i>
FAS	Fettsäuresynthase
FC	Freies Cholesterin
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDB	<i>Familial ligand-defective apoB-100</i>
FDG-PET-CT	18-Fluordeoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Computer-Tomographie
FFA	<i>Free fatty acid</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR4	<i>FGF receptor 4</i>
FH	<i>Familial hypercholesterolemia</i>
FID	<i>Flame ionization detector</i>
FolchBHT	Mit BHT angereicherte Folch-Lösung
FPLC	<i>Fast-performance liquid chromatography</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GBPAR1	<i>G protein-coupled bile acid receptor 1</i>
GC	Gaschromatographie
GCA	Glycocholsäure (<i>glycocholic acid</i>)
GCDCA	Glycochenodeoxycholsäure (<i>glycochenodeoxycholic acid</i>)
GDCA	Glycodeoxycholsäure (<i>glycodeoxycholic acid</i>)
GLCA	Glycolithocholsäure (<i>glycolithocholic acid</i>)
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GSH	Glutathion
GUDCA	Glycoursodeoxycholsäure (<i>glycoursodeoxycholic acid</i>)
HDCA	Hyodeoxycholsäure (<i>hyodeoxycholic acid</i>)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HL	Hepatische Lipase
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

HNF4 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i>
HSL	Hormon-sensitive Lipase
I-BABP	<i>Ileal bile acid binding protein</i>
iBAT	<i>Ileal bile acid transporter</i>
ingWAT	Inguinales weißes Fettgewebe
IPA	Isopropanol
IS_FA17:0	Interner Standard bestehend aus Heptadecansäure
IS1	Interner Standard 1
IS2	Interner Standard 2
isol.	Isoliert
kcal	Kilokalorien
kg	Kilogramm
l	Liter
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LCFA	<i>Long-chain fatty acid</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LDLR-LRP1 KO	<i>Ldlr</i> ^{-/-} -Mäusen mit zusätzlichem leberspezifischen <i>Lrp1</i> -Knockout
LPL	<i>Lipoprotein lipase</i>
LRH-1	<i>Liver receptor homologue-1</i>
LRP1	<i>LDLR-related protein 1</i>
LXR	<i>Liver X receptor</i>
LXRE	<i>LXR response element</i>
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
M	Mitochondrium
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDR1A	<i>Multidrug export pump 1A</i>
MeOH	Methanol
MeOHBHT	Methanol mit BHT angereichert
METRNL	<i>Meteorin-like</i>
mg	Milligramm
MJ	Mega Joule
mind.	Mindestens
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MRP2	<i>Multidrug resistance protein 2</i>
MRP3	<i>Multidrug resistance protein 3</i>
MS	Massenspektrometer
MTTP	<i>Microsomal TG-transfer protein</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
NAFLD	<i>Non alcoholic fatty liver disease</i>
NE	Norepinephrin
NPC	Nieman-Pick TypC Protein
NPC1L1	<i>NPC1-like protein-1</i>
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OA	Organische Anionen
OATP	<i>Organic anion transporter</i>
OC	Organische Kationen
oGTT	Oraler Glukose-Toleranz-Test
OST α/β	<i>Organic solute transporter α/β</i>
PA	Phosphatidsäure
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PGC1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α</i>

PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipid
PLIN-1	Perilipin
PLTP	Phospholipidtransferprotein
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRDM16	<i>PR domain zinc finger protein 16</i>
PS	Phosphatidylserin
PX	FXR-Agonist PX21228
Q	Quadrupol
qPCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
QqQ	Tripelquadrupol
RCT	Reverser Cholesterin Transport
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
<i>Scd1</i>	Stearyl-CoA Desaturase 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
SM	Sphingomyelin
SMC	<i>Smooth muscle cell</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SR	Scavenger Rezeptoren
SRE	<i>Sterol regulatory elements</i>
SREBP	<i>Sterol regulatory binding proteins</i>
T3	Triiodothyronin
T4	Tetraiodothyronin
Tbp	TATA-binding protein
TCA	Taurocholsäure (<i>taurocholic acid</i>)
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure (<i>taurochenodeoxycholic acid</i>)
TDCA	Taurodeoxycholsäure (<i>taurodeoxycholic acid</i>)
TG	Triacylglycerid
TGR5	<i>G-protein coupled bile acid receptor 5</i>
THDCA	Taurohyodeoxycholsäure (<i>taurohyodeoxycholic acid</i>)
THDOC	Tetrahydrodesoxycorticosterone
TICE	<i>Transintestinal cholesterol excretion pathway</i>
TLCA	Taurolithocholsäure (<i>tauroolithocholic acid</i>)
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRL	<i>Triglyceride rich lipoprotein</i>
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure (<i>tauroursodeoxycholic acid</i>)
T- α -MCA	Tauro- α -muricholsäure (<i>tauro-α-muricholic acid</i>)
T- β -MCA	Tauro- β -muricholsäure (<i>tauro-β-muricholic acid</i>)
UBA	<i>Unconjugated bile acids</i>
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UDCA	Ursodeoxycholsäure
UHR	<i>Ultra high resolution</i>
UPLC	<i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>
VHDL	<i>Very high density lipoprotein</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
W	Watt
WAT	<i>White adipose tissue</i>
WT	<i>Wildtype</i>
WTD	Western Typ-Diät
z. B.	Zum Beispiel
α -MCA	α -Muricholsäure (<i>α-muricholic acid</i>)
β -MCA	β -Muricholsäure (<i>β-muricholic acid</i>)
ω -MCA	ω -Muricholsäure (<i>ω-muricholic acid</i>)

Teil A Einleitung und Fragestellung

1 Braunes Fettgewebe

Die Existenz von braunem Fettgewebe (BAT) ist charakteristisch für Säugetiere (Cannon und Nedergaard 2004). Zu den Hauptfunktionen von braunem Fettgewebe gehört es, die Körpertemperatur isothermaler Säugetiere über die sogenannte zitterfreie Thermogenese konstant zu halten, indem gespeicherte chemische Energie dissimiliert und in Form von Wärme freigesetzt wird. Aufgrund dieser Tatsache ist das Vorkommen von BAT in überwinternden Säugetieren oder in Neugeborenen besonders hoch, um den auftretenden Kältestress auszugleichen (Gesta, Tseng et al. 2007). Im Vergleich zu weißen Adipocytten, können braune Adipocytten neben der Energiespeicherung gleichzeitig Energie zur Wärmeproduktion verbrennen und zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an multilokulären *lipid droplets* (Abbildung A - 1) und Mitochondrien aus, welche für die braune Farbe verantwortlich sind (Enerback 2009). Letztere besitzen das für das BAT charakteristische Protein *uncoupling protein 1* (UCP1), welches in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und den Prozess der zitterfreien Thermogenese ermöglicht (Ricquier und Kader 1976; Aquila, Link et al. 1985; Enerback, Jacobsson et al. 1997; Golozoubova, Cannon et al. 2006). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass auch manche Vögel ein zum braunen Fettgewebe ähnliches Organ aufweisen, das exprimierte *uncoupling protein* (UCP) jedoch dem UCP2 und UCP3 ähnelt. Daher ist fragwürdig, ob neben Säugetieren auch Vögel in der Lage sind zitterfreie Thermogenese zu betreiben (Saarela, Keith et al. 1991; Cannon und Nedergaard 2004).

1.1 Zentrale Aktivierung der zitterfreien Thermogenese

Das wahrscheinlich wichtigste Signal, welches die Aktivierung von UCP1 und somit die Induktion der zitterfreien Thermogenese induziert, ist die Kälte (d.h. Temperaturen unterhalb der Thermoneutralität). Die Stimulation von peripheren und zentralen Thermorezeptoren, jedoch auch der Anstieg an peripheren Hormonen wie Insulin oder Leptin (Heeren und Munzberg 2013), resultiert letztendlich in einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, welches für die Reizweiterleitung zu den braunen Adipocytten zuständig ist. In Folge der Freisetzung von Catecholaminen, wie beispielweise Norepinephrin (NE), welche primär an die β_3 -Adrenorezeptoren an braunen Adipocytten bindet, erfolgt die über G_s -Proteine vermittelte Signaltransduktion. Durch die Aktivierung der Adenylatcyklase und der sukzessiven Bildung von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Letztere induziert die Phosphorylierung verschiedener mit den *lipid droplets* assoziierten Proteinen, wie CGI-58 (*comparative gene identification 58*; identisch zu *α/β -hydrolase domain-containing protein 5*, ABHD5) oder des Perilipin

(PLIN-1) (Lass, Zimmermann et al. 2006; Sahu-Osen, Montero-Moran et al. 2015). Dieses resultiert in der Lipolyse von in den *lipid droplets* gespeicherten Triglyceriden (TG) durch die ebenfalls phosphorylierte Hormon-sensitive Lipase (HSL) und die Adipozyten-Triglycerid Lipase (ATGL) und führt somit zur Freisetzung von Fettsäuren (Holm, Osterlund et al. 2000; Holm 2003; Ahmadian, Abbott et al. 2011; Zimmermann et al., Science 2004). Die freigesetzten Fettsäuren dienen im Folgenden als Substrat zur Energiegewinnung. Gleichzeitig induzieren sie jedoch eine Steigerung der Aktivität und der Expression von *Ucp1*. UCP1 ermöglicht schließlich eine Entkopplung der Atmungskette, welches mit einer gesteigerten Energiefreisetzung in Form von Wärme an Stelle der Bildung von ATP einhergeht (Prusiner, Cannon et al. 1968; Fedorenko, Lishko et al. 2012). Mäuse, die eine adipocyten-spezifische Ablation von ATGL aufweisen, zeigen aufgrund der mangelhaften lipolytischen Freisetzung von Fettsäuren Störungen in der Thermogenese und eine niedrigere Expression an *Ucp1* (Fedorenko, Lishko et al. 2012).

Neben der PKA-induzierten Phosphorylierung der oben genannten Proteine erfolgt auch die Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Cao, Daniel et al. 2004). Die daraus resultierende *cAMP-response element binding protein* (CREB)-vermittelte Induktion von *type 2 iodothyronine deiodinase* (D2 kodiert durch *Dio2*) katalysiert die Bildung von aktivem Triiodothyronin (T3) aus inaktivem Tetraiodotyronin (T4). Als Konsequenz daraus erfolgt eine Initiation der Transkription von *Ucp1* sowie eine Aktivierung der Thyroidhormonrezeptoren (Martinez-deMena und Obregon 2005). Darüber hinaus erfolgt eine MAPK-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 (*activating transcription factor 2*) und eine damit verbundene erhöhte Expression an *Ucp1* sowie *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*Ppargc1a*, Protein: PGC1 α) (Cao, Daniel et al. 2004).

PGC1 α übernimmt dabei eine wichtige Funktion als regulatorisches Protein in der Expression von *Ucp1* und somit in der Thermogenese und gilt als Hauptregulator für die mitochondriale Biogenese (Puigserver, Wu et al. 1998; Bartelt und Heeren 2014). Die Induktion der Transkription von *Ucp1* erfolgt nach der Bindung von Komplexen aus *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) α oder γ und dem *retinoid X receptor* (RXR) an das PPAR-*response element* (Puigserver, Wu et al. 1998; Hondares, Mora et al. 2006; Hondares, Rosell et al. 2011). Als weiteres für die Entwicklung brauner Adipocyten essentielles regulatorisches Protein ist das *PR domain zinc finger protein 16* (PRDM16) aufzuführen (Seale, Kajimura et al. 2007; Kajimura, Seale et al. 2010). Die Interaktion von PRDM16 und PPAR γ sowie *CCAAT/enhancer-binding-protein* (C/EBP) stimuliert im Folgenden die Expression der BAT-selektiven Gene *Ucp1*, *Dio2*, *Cidea* (*cell death-inducing DNA fragmentation factor-alpha-like effector*) und *Elovl3* (Elongase 3) (Zhou, Toh et al. 2003; Westerberg, Mannson et al. 2006; Seale, Bjork et al. 2008; Kajimura, Seale et al. 2009).

Auch durch Behandlung von Mäusen mit synthetischen β_3 -Adrenorezeptor-Agonisten, wie beispielsweise CL316,243 (CL), konnte eine Aktivierung der Thermogenese induziert werden (Himms-Hagen, Cui et al. 1994).

1.2 Beige Adipocyten

Zu einer vielversprechenden Entdeckung gehörte, dass auch in weißen Fettgewebs- (engl.: *white adipose tissue* = WAT) Depots UCP1-positive, sogenannte beige Adipocyten, nachweisbar sind. Genauso wie braune Adipocyten sind beige Adipocyten reich an Mitochondrien und weisen eine multilokuläre Struktur auf (Abbildung A - 1) (Bartelt und Heeren 2014). Seit 1984 ist bekannt, dass ein Kälte-Reiz nicht nur die Aktivierung von braunem Fettgewebe stimuliert, sondern auch zum sogenannten *browning* von weißen Adipocyten führt (Young, Arch et al. 1984). Nedergaard und Cannon (2014) definieren den Prozess des *brownings* als “any significantly increased UCP1 expression at the mRNA level occurring in what are normally considered as white adipose tissue depots”. Weiterhin ist bekannt, dass auch durch pharmakologische Aktivierung des β_3 -Adrenorezeptor mit CL eine Aktivierung des *browning*-Prozesses erfolgt (Ghorbani, Claus et al. 1997; Ghorbani und Himms-Hagen 1997; Bartelt, Weigelt et al. 2013). Dass aktivierte beige Adipocyten in der Lage sind einen essentiellen Anteil an zitterfreier Thermogenese zu leisten, konnte in einer Mausstudie von Schulz, Huang et al. (2013) nachgewiesen werden: hierbei zeigte sich, dass ein selektiver Verlust an BAT zu einem kompensatorischen Anstieg an beige Adipocyten führte, welche im Folgenden die Körpertemperatur aufrecht erhielten und eine Diät-induzierte Adipositas minimierten.

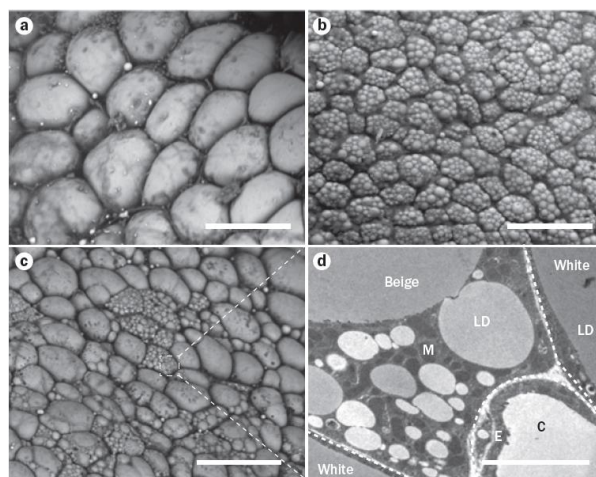


Abbildung A - 1: Zelluläre und subzelluläre Struktur von weißen Adipocyten, braunen Adipocyten und beige Adipocyten der Maus

Während die Struktur weißer Adipocyten (a) durch einen großen, unilokulären Lipidtröpfchen bestimmt ist, weisen braune Adipocyten (b) multilokuläre Lipidtröpfchen auf. (c) Das *browning* von weißen Adipocyten führt zur Ansammlung von Gruppen aus multilokulären beige Adipocyten, welche von weißen Adipocyten umgeben sind. (d) Beige Adipocyten weisen im Vergleich zu weißen Adipocyten einen hohen Gehalt an Mitochondrien (M) auf. LD = *lipid droplet*; C = Kapillare, E = Endothelzelle; elektronenmikroskopische Aufnahmen, entnommen aus (Bartelt und Heeren 2014)

Die Konversion von weißen, energiespeichernden Adipocyten in potentiell energieverbrauchende, beige Adipocyten stellt somit einen möglichen Ansatz zur Therapie von Übergewicht und damit assoziierten Erkrankungen dar (Teil A, 1.4). Dies führte in den letzten 15 Jahren zu einem großen Interesse in diesem Forschungsfeld und einer Vielzahl von Studien. Dabei wurden zum einen verschiedene therapeutische Ansätze z.B. durch Gabe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe entwickelt sowie zum anderen genetische Tiermodelle beschrieben, die die potentielle therapeutische Bedeutung und den Prozess des *browning* untersucht haben (Bonet, Oliver et al. 2013; Nedergaard und Cannon 2014).

Interessanterweise zeigten Experimente mit multipotenten Stammzellen, dass braune und beige Adipocyten nicht aus den gleichen Vorläuferzellen hervorgehen. Im Jahr 2007 konnten Timmons et al. nachweisen, dass braune Adipocyten während ihrer Ontogenese das für Myocyten-spezifische Gen *myogenic factor 5 (Myf5)* exprimieren und somit in ihrer Abstammung nicht mit den *Myf5*⁻ weißen Adipocyten mesodermalen Ursprungs verwandt sind (Timmons, Wennmalm et al. 2007; Seale, Bjork et al. 2008). Der Ursprung von beige Adipocyten ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt, wobei auch eine Coexistenz unterschiedlicher Prozesse diskutiert wird (Rosenwald, Perdikari et al. 2013): Einerseits wurde gezeigt, dass beige Adipocyten nicht die gleiche Abstammung der weißen und braunen Adipocyten haben, sondern mit endothelialen und perivaskulären Zellen verwandt sind (Petrovic, Walden et al. 2010; Lee, Petkova et al. 2012; Tran, Gealekman et al. 2012). Andererseits wurde ein als „Transdifferenzierung“ bezeichneter Prozess beschrieben, bei dem reversibel, in Folge eines β -adrenergen Stimulus, beige Adipocyten aus maturen, weißen Adipocyten gebildet werden (Himms-Hagen, Melnyk et al. 2000; Barbatelli, Murano et al. 2010; Rosenwald, Perdikari et al. 2013). Damit im Einklang konnten verschiedene, für das jeweilige Gewebe oder den Adipocyten-Typ spezifische Marker beschrieben werden (Bartelt und Heeren 2014).

1.3 Aktivierung der zitterfreien Thermogenese in braunen und beige Adipocyten durch periphere, physiologische Signale

Abgesehen von der durch Catecholamine vermittelten β_3 -adrenergen Aktivierung des BAT, wurde in diversen Studien eine Aktivierung des BAT sowie Induktion des *brownings* durch periphere Signale, wie zirkulierende Hormone aber auch Metabolite beschrieben, auf die im Folgenden kurz eingegangen werden soll.

Bereits 1995 wurden verschiedene Retinoide im Zusammenhang mit der Aktivierung von braunem Fettgewebe beschrieben (Alvarez, Deandres et al. 1995; Kiefer, Vernochet et al. 2012).

Im Jahr 2006 konnte gezeigt werden, dass Gallensäuren neben ihrer Funktion bei der Absorption von Nahrungslipiden ebenfalls in der Lage sind, die zitterfreie Thermogenese zu

induzieren. Durch die Bindung der Gallensäuren an den *G protein-coupled bile acid receptor 1* (GBPAR1 oder auch TGR5) resultiert die cAMP-vermittelte Induktion von D2 und die Bildung des Thyroidhormons T3, welches im Folgenden zu einer Stimulation der Transkription von *Ucp1* führt (Teil A, 1.1) (Watanabe, Houten et al. 2006).

Sowohl Thyroidhormone als auch Catecholamine stimulieren die Produktion des *bone morphogenetic protein* (BMP) 8b. Dieses wirkt entweder direkt über den BMP-Rezeptor oder zentral durch Stimulation des sympathischen Nervensystem und induziert dadurch die Aktivierung des BAT (Whittle, Carobbio et al. 2012). Auch BMP7 wird eine Funktion in der Aktivierung der Thermogenese zugeschrieben (Tseng, Kokkotou et al. 2008).

Weiterhin wird in einer Publikation von Bostrom, Wu et al. (2012) die Bildung eines Myokins, *Irisin*, beschrieben, welches in Folge physischer Aktivität vom Muskel sezerniert wird und den *browning*-Prozess im WAT von Mäusen induziert. Bislang ist jedoch der zugrundeliegende Mechanismus nicht bekannt. In diesem Kontext wurden kürzlich in der Arbeitsgruppe um B.M. Spiegelman zwei weitere Myokine beschrieben, *β -aminoisobutyric acid* (BAIBA) (Roberts, Bostrom et al. 2014) und *meteorin-like* (METRNL) (Rao, Long et al. 2014), welche auch zu einer Induktion der Thermogenese in beigen Adipocyten beitragen sollen.

Darüber hinaus ist bekannt, dass sowohl das in der Leber gebildete Hormon *fibroblast growth factors* (FGF) 21 (Fisher, Kleiner et al. 2012) als auch die vom Herz sezernierten Hormone *atrial natriuretic peptide* (ANP) und *ventricular natriuretic peptide* (BNP) (Bordicchia, Liu et al. 2012) zu einer Stimulation des *browning*-Prozesses führen und/oder auch die Thermogenese im BAT direkt aktivieren.

1.4 Die Aktivierung von braunem Fettgewebe als therapeutisch relevantes *Target* zur Prävention und Behandlung von metabolischen Erkrankungen

Durch die Fähigkeit Energie in Form von Triglyzeriden zu speichern und in Zeiten der Nahrungskarenz Fettsäuren zur Energiegewinnung in die Zirkulation freizusetzen, trägt das WAT maßgebend zur Energiehomöostase bei. Zudem übernimmt es eine wichtige Funktion als endokrines Organ, indem es beispielsweise TNF α (*tumor necrosis factor α*) oder Leptin sezerniert (Hotamisligil, Shargill et al. 1993; Zhang, Proenca et al. 1994). Eine häufige Ursache für die Störung des Gleichgewichtes aus Energiespeicherung und -freisetzung ist ein Überangebot an Nahrung und somit Energie. Dies führt zunächst zur Bildung von hypertrophen Adipocyten, gefolgt von einer Stimulation der Adipogenese, welches final in einer Adipositas-Erkrankung resultiert (Krotkiewski, Bjorntorp et al. 1983). Mit einer weltweiten Anzahl von 1,7 Milliarden Betroffenen, leiden derzeit mehr Menschen an Überernährung als an Unterernährung (Haslam und James 2005; Rosen und Spiegelman 2014). Dabei ist Adipositas mit der Entwicklung einer Vielzahl an Erkrankungen, wie beispielsweise der

Insulinresistenz sowie Typ-2-Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Atherosklerose, der nicht-alkoholischen Fettleber oder auch malignen Krebserkrankungen assoziiert (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2006; Park, Euhus et al. 2011).

Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität von BAT und der Möglichkeit des *brownings* von WAT-Depots, wird gegenwärtig diskutiert und evaluiert, ob die Aktivierung von braunen und beigen Adipocyten eine Option zur Behandlung von metabolischen Erkrankungen darstellt. So ist bekannt, dass eine maximale Aktivierung von braunem Fettgewebe in der Maus zu einer Energiefreisetzung von 500 W/kg führt (Klingenspor und Fromme 2012). Weiterhin konnten Lowell, Susulic et al. (1993) in UCP-DTA-Mäusen nachweisen, dass nach genetischer Ablation des BAT der verringerte Energieverbrauch eine Adipositas verursacht. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass eine fettgewebsspezifische Überexpression von UCP1 die Entwicklung von Adipositas unterbindet (Kopecky, Clarke et al. 1995), wohingegen UCP1-defiziente Mäuse, die unter nicht-aktivierenden, thermoneutralen Bedingungen gehalten werden, an Fettmasse zunehmen (Feldmann, Golozoubova et al. 2009). In diesem Zusammenhang konnte in einer Studie von Bartelt, Bruns et al. (2011) gezeigt werden, dass eine Aktivierung des BAT zu einer verbesserten oralen Glukose- und Triglyzerid-Toleranz führt. Damit im Einklang präsentierten Stanford, Middelbeek et al. (2013), dass mit der Transplantation von BAT in Hochfett-Diät-gefütterten Mäuse eine verbesserte Insulinsensitivität, eine Reduktion des Körpergewichtes und letztendlich eine vollständige Aufhebung von Insulinresistenzerscheinungen einhergeht. Eine Aktivierung von BAT resultiert weiterhin in einer Reduktion von cholesterinreichen *remnants*-Partikeln im Plasma, welches mit einer verminderten Bildung von atherosklerotischen Plaques verbunden ist (Berbee, Boon et al. 2015).

In einer 1972 erschienenen Publikation wurde bereits berichtet, dass das Vorkommen verschiedener BAT-Depots im Menschen abhängig vom Alter ist (Heaton). Bereits damals wurde über die Auswirkungen der Aktivierung vom BAT auf die systemische Energiehomöostase debattiert (Klingenspor, Herzig et al. 2012). Als ca. 30 Jahre später hypermetabolisches Fettgewebe in Erwachsenen im Rahmen von 18-Fluorodeoxyglukose Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Computer-Tomographie (FDG-PET-CT)-Messungen nachgewiesen wurde (Hany, Gharehpapagh et al. 2002; Christensen, Clark et al. 2006), welches kurz darauf unabhängig von verschiedenen Gruppen als BAT identifiziert wurde (Cypess, Lehman et al. 2009; Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhomerig et al. 2009; Virtanen, Lidell et al. 2009; Zingaretti, Crosta et al. 2009), steigerte dieses maßgeblich die Aussicht, dass eine Aktivierung von braunem Fettgewebe eine potentielle Therapiemöglichkeit zur Prävention und Behandlung von metabolischen Erkrankungen im Menschen darstellen könnte. Abgesehen von Glukose als Tracer, konnte auch mittels anderer Tracer das Vorhandensein von metabolisch aktivem BAT, welches in der Lage ist Fettsäuren zu oxidieren, bestätigt werden (Ouellet, Labbe et al. 2012). So ergaben

Schätzungen, dass aktiviertes braunes Fettgewebe bis zu 4 kg Körperfett pro Jahr verbrennen kann (Virtanen, Lidell et al. 2009). Derzeit wird angenommen, dass mind. 30 % der Erwachsenen über aktivierbares BAT verfügen (Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009).

Humane BAT-Depots wurden unter anderem in *cervicalen*, *mediastinalen*, *supraclavicularen* und *perirenal* Regionen des Körpers lokalisiert (Virtanen, Lidell et al. 2009). In Abhängigkeit von der Lokalisation des BAT-Depots zeigte sich, dass humanes BAT aus Adipocytten besteht, die einerseits den beigen sowie andererseits den klassischen braunen Adipocytten ähneln (Cypess, White et al. 2013).

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von braunem Fett in erwachsenen Menschen negativ mit dem BMI (*body mass index*) korreliert (Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhomerig et al. 2009), welches zu der Vermutung führte, dass nicht-abundantes braunes Fettgewebe mit der Entstehung von Adipositas assoziiert ist (Klingenspor, Herzig et al. 2012). Auch Untersuchungen zur oralen Glukose-Toleranz nach Aktivierung des BAT zeigten einen ähnlichen Trend: In Abhängigkeit des BMIs konnte nach Aktivierung des BAT ein 4-15 Mal schnellerer Abfall der Konzentration an Glukose im Blut nachgewiesen werden (van Marken Lichtenbelt, Vanhomerig et al. 2009).

In einer 2015 erschienenen Studie konnte zum ersten Mal durch pharmakologische Aktivierung des β_3 -adrenergen Rezeptors mittels Mirabegron eine Aktivierung des humanen BAT über FDG-PET-CT nachgewiesen werden, welches zu einer Steigerung des Energieverbrauchs von 203 ± 40 kcal/Tag führte (Cypess, Weiner et al.).

Wie die hier vorgestellten Studien in Maus und Mensch zeigen, hat die Aktivierung des BAT durchaus Potential zur Therapie von metabolischen Erkrankungen. Inwieweit eine ausreichende Aktivierung des BAT bzw. eine Induktion des *browning*-Prozesses im Menschen erfolgen kann bzw. zielführend ist, ist jedoch noch nicht geklärt. Ebenfalls ist derzeit noch nicht erforscht, warum BAT-Masse bzw. -Aktivität während des Alterns zurückgeht und ob diese Beobachtung kausal mit dem metabolischen Altern in Zusammenhang steht.

2 Vaskulärer Lipoproteinstoffwechsel

Lipide sind im Organismus von zentraler Bedeutung: Sie dienen zum Aufbau von Zellmembranen, der Energieversorgung und –speicher und als Signalmoleküle. Daher ist zum Erhalt einer systemischen Lipidhomöostase ein funktionierender Lipoproteinstoffwechsel essentiell. So werden beispielsweise die sehr hydrophoben TG entweder über die Nahrung aufgenommen oder in der Leber synthetisiert und anschließend zu den peripheren Organen transportiert, um deren Energieversorgung sicherzustellen.

Bedingt durch ihren hydrophoben Charakter erfolgt der vaskuläre Transport von Lipiden und lipophilen Vitaminen zu ihren Zielorganen in Form von Lipoproteinpartikeln. Wie der Name bereits suggeriert, handelt es sich hierbei um Micellen, die aus Lipiden und Proteinen, den Apolipoproteinen (Apo), zusammengesetzt sind. Dabei setzt sich die Hülle dieser Micellen aus einem Monolayer von amphiphilen Lipiden, wozu vor allem Phospholipide (PL), jedoch auch Sphingomyeline (SM) und freies Cholesterin (FC) zählen, und einem Kern aus hydrophoben Cholesterylestern (CE) und TG zusammen. Der Transport von freien Fettsäuren hingegen erfolgt größtenteils an Albumin gebunden.

Apolipoproteine werden in strukturgebende, wie beispielsweise dem ApoB-48, und funktionelle wie dem ApoE eingeteilt. Letztere fungieren beispielsweise als Liganden für Rezeptoren und bestimmen so die Geschwindigkeit des Lipoproteinpartikelumsatzes.

Lipoproteinpartikel werden anhand der im Folgenden dargelegten Kriterien in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Tabelle A - 1). Zu den triglyzeridreichen Lipoproteinpartikeln (*triglyceride rich lipoproteins* = TRL) gehören die Chylomikronen (CM) und die *very low density lipoproteins* (VLDL). Die *low density lipoproteins* (LDL) und *high density lipoproteins* (HDL) zählen zu den cholesterinreichen Lipoproteinen. Weiterhin kann eine Klassifizierung anhand der Dichte sowie des Durchmessers erfolgen. Zudem unterscheiden sich die Lipoproteine in ihrer Zusammensetzung an strukturgebenden und funktionellen Apolipoproteine.

Tabelle A - 1: Klassifizierung von Lipoproteinpartikel

Angaben zum Durchmesser, der Dichte, den Apolipoproteinen sowie der Lipidzusammensetzung der jeweiligen Lipoproteinpartikel (FC = freies Cholesterin)

Lipoproteinpartikel	Ø (nm)	Dichte (kg/l)	Strukturgebendes Apo	Funktionelles Apo	Apo (%)	PL (%)	FC (%)	CE (%)	TG (%)
CM	<10 ⁴	< 1,000	B48	AIV, AV, CI-III, E	~2	~5	~1	~2	~90
VLDL	50	< 1,005	B100	AV, CI-IV, E	~10	~16	~7	~13	~54
LDL	21	< 1,063	B100		~23	~21	~11	~41	~4
HDL	8-12	< 1,125	AI	All, AIV, AV, CIV, E,	~42	~35	~5	~13	~5

Weiterhin können die Lipoproteinpartikel in Subfraktionen aufgetrennt werden (z.B. HDL₂ und HDL₃). Auf diese Klassen sowie auf die Lipoproteinpartikel *intermediate density Lipoproteins* (IDL), Lp(a), *very high density lipoprotein* (VHDL), LpX, LpY und LpZ wird im weiteren Verlauf der Arbeit nicht ausführlicher eingegangen.

Der Lipoproteinstoffwechsel lässt sich in den exogenen (Teil A, 2.1) und in den endogenen (Teil A, 2.2) aufteilen, die beide über den HDL-Stoffwechsel (Teil A, 2.3) verknüpft sind.

2.1 Exogener Lipidstoffwechsel

Nach erfolgter Nahrungsaufnahme werden im Rahmen des exogenen Lipidstoffwechsels die intestinal von Lipasen prozessierten Spaltprodukte von Triglyzeriden aber auch anderer Lipide in die Dünndarmepithelzellen resorbiert. Durch die Emulgatoreigenschaften von ins Duodenallumen sezernierter Gallensäuren und die daraus resultierende Bildung von Micellen wird die Spaltung der Lipide durch die Pankreaslipasen ermöglicht (Hofmann und Borgstroem 1964). Die Aufnahme von Sterolen erfolgt über *Niemann-Pick-like protein-1* (NPC1L1) (Altmann, Davis et al. 2004). In den Mukosazellen des Dünndarms findet anschließend eine Sortierung der resorbierten Sterole statt, wobei die Phytosterole und auch ein Anteil des Cholesterins über *ATP-binding cassette transporter G5* und *G8* (ABCG5 und ABCG8) wiederum in das Darmlumen abgegeben werden (Berge, Tian et al. 2000). Resorbiertes Cholesterin, wie auch der Großteil der anderen lipophilen Spaltprodukte, werden intrazellulär zu CE, TG und PL verestert und zusammen mit ApoB-48, ApoA-I und ApoA-IV durch Mitwirken des *microsomal TG-transfer protein* (MTTP) zu CM assembliert. In die Lymphe abgegeben, gelangen diese über den *Ductus thoracicus* in den Blutkreislauf. Es folgt die Aufnahme von ApoCII aus den HDL, welches als einer der Cofaktoren für die endothelständige *lipoprotein lipase* (LPL) dient (LaRosa, Levy et al. 1970; Kinnunen, Jackson et al. 1977). Weiterhin wird die Aktivität der LPL durch *angiopoietin-like proteins 3* und *4* (ANGPTL3 und ANGPTL4) (Nilsson, Anderson et al. 2012) sowie über das ApoAV (Schaap, Rensen et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005) moduliert. Nach der Lipolyse der TGs durch die LPL werden die entstehenden freien Fettsäuren und Monoacylglyzeride über Transmembranrezeptoren wie dem *cluster of differentiation 36* (Cd36) von den peripheren Geweben (u.a. WAT, Muskel) aufgenommen und anschließend in Form von TG in den *lipid droplets* der Adipocyten gespeichert oder zur Energiegewinnung in den Mitochondrien herangezogen. Im Verlauf der Lipolyse kommt es zum weiteren Austausch von Lipiden und Apolipoproteinen zwischen HDL und CMs: So geben CMs ApoAI, ApoIV, ApoC und Phospholipide in Form von *surface remnants* an HDL ab und nehmen im Gegenzug ApoE aus der HDL-Fraktion auf. Die prozessierten, nun lipidarmen und cholesterinreichen sogenannten *Chylomikronen-Remnants* (CR) werden LPL- (Beisiegel, Weber et al. 1991; Heeren, Niemeier et al. 2002) und ApoE-vermittelt über den LDL-Rezeptor (LDLR) (Brown,

Kovanen et al. 1981; Brown und Goldstein 1986) oder das *LDLR-related protein 1* (LRP1) (Beisiegel, Weber et al. 1989; Rohlmann, Gotthardt et al. 1998) in die Leber aufgenommen. Daneben konnte in einer Studie von Bartelt, Bruns et al. (2011) gezeigt werden, dass aktivierte BAT in der Lage ist CM über einen Cd36- und LPL- abhängigen Vorgang als Partikel aufzunehmen.

2.2 Endogener Lipidstoffwechsel

Im Zustand der Nahrungskarenz werden über den endogenen Weg periphere Gewebe mit Cholesterin und Triglyzeriden als Substrate zur Energiegewinnung versorgt. Die Synthese von triglyzeridreichen VLDL erfolgt in der Leber, wobei ApoB100 das stukturgebende Apolipoprotein darstellt (Young 1990). Die Synthese von VLDL erfolgt in zwei Schritten: Noch an die Membran des ER assoziiert, kommt es zur kotranslationalen Lipidierung mit TGs und CEs des ApoB100 katalysiert durch das MTTP (Hussain, Kancha et al. 1996; Wang, McLeod et al. 1996). Im zweiten Schritt erfolgt am Übergang zwischen glatten und rauhen ER die Beladung mit weiteren Lipiden, bevor im Golgi-Apparat der ApoB100-Anteil posttranslational modifiziert wird und *de novo* synthetisierte PLs addiert werden. Nach der Sezernierung der VLDL in das Blut nehmen die VLDL weitere ApoE- sowie ApoC-Moleküle aus HDL auf, wobei ApoCs die vorzeitige Aufnahme der VLDL in die Leber inhibieren (Sehayek und Eisenberg 1991). Das Phospholipidtransferprotein (PLTP) vermittelt den Austausch von Phospholipiden gegen freies Cholesterin mit den HDL. Genauso wie bei den CM, erfolgt an den peripheren Geweben die Aufnahme der TGs, katalysiert durch die LPL (Teil A, 2.1). Im weiteren Verlauf wird freies Cholesterin über die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und ApoC in die HDL-Fraktion zurück transferiert. Die nun ApoC- und triglyzeridarmen VLDL-Remnants werden entweder ApoE-vermittelt über den LDLR oder LRP1 in die Leber aufgenommen oder nach Prozessierung durch das Cholesterylester-Transfer-Protein (CETP) über IDL in cholesterinreiche LDL überführt. Durch eine Konformationsveränderung des ApoB100 und der geringen Menge an ApoE binden LDL bevorzugt über ApoB100 an den LDLR (Teil A, 3.1). Weiterhin können LDL über den *scavenger pathway* aufgenommen werden. Dieser wird insbesondere dann beansprucht, wenn die Konzentration an LDL-Cholesterin im Plasma über 200 mg/dl steigt oder die LDL durch oxidative Veränderungen modifiziert werden (z.B. oxidierte LDL, acetylierte LDL). Die Aufnahme kann über unterschiedliche Mechanismen erfolgen, wie beispielsweise der adsorptiven Endocytose oder über *Scavenger* Rezeptoren (SR). Letztere sind unter anderem für die Aufnahme modifizierter LDL in Makrophagen verantwortlich (Goldstein, Ho et al. 1979). Hier ist hervorzuheben, dass SRs, nicht wie der LDLR, der *feedback*-Regulation durch hohe intrazelluläre Konzentrationen an Cholesterin unterliegen (Teil A, 3.1). In der Arterienwand kann diese nicht regulierte Lipidaufnahme eine pathophysiologisch relevante

Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen bewirken. Das Auftreten dieser Schaumzellen ist der initiale Schritt bei der Pathogenese der Atherosklerose.

2.3 HDL-Stoffwechsel

Wie aus Tabelle A - 1 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den cholesterinreichen HDL um die kleinste Klasse an Lipoproteinen mit der höchsten Dichte. Das strukturgebende Apolipoprotein der HDL ist das ApoAI. Im Lipoproteinstoffwechsel nehmen HDL vor allem die Aufgabe des Cholesterintransports wahr und gelten weiterhin als Bindeglied zwischen dem exogenen und dem endogenen Lipidstoffwechsel. Als reverser Cholesterin Transport (RCT) wird der durch HDL-vermittelte Cholesterin-Efflux aus peripheren Makrophagen bzw. Schaumzellen hin zur Leber beschrieben (Wang und Rader 2007; Rader und Tall 2012). Bedingt durch sein anti-atherogenes Potential, ist ein funktionierender RCT somit ein vielversprechender Ansatz zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen (Teil A, 4) (Zhang, Zanotti et al. 2003; Kane und Malloy 2012; Rader und Tall 2012; Rohatgi, Khera et al. 2014). Daneben werden HDL oder Komponenten des HDL anti-oxidative Effekte, anti-inflammatorische Effekte in Zellen und Organen sowie eine unterstützende Rolle der Erhaltung der Endothelzell-Funktion zugeschrieben (Calabresi, Gomaschi et al. 2003; Calabresi, Rossoni et al. 2003; Navab, Ananthramaiah et al. 2004; von Eckardstein, Hersberger et al. 2005).

Die Synthese von HDL ist ein mehrstufiger Prozess und kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen (Abbildung A - 2). Naszierende, diskoidale HDL werden einerseits in der Leber synthetisiert; sie enthalten ApoAI, ApoAII und ApoE. Da ApoAII nicht in der intestinalen Mucosa gebildet wird, bestehen naszierende HDL intestinalen Ursprungs aus ApoAI und ApoAIV. Andererseits können diskoidale HDL im Zuge der hydrolytischen Spaltung von CM als *surface remnants* freigesetzt werden (Eisenberg und Olivecrona 1979) (Teil A, 2.1). Weiterhin ist die Bildung sogenannter Prä- β -HDL beschrieben, die aus der Interconversion reifer α -HDL durch die Prozessierung seitens der PLTP, CETP, hepatischen Lipase (HL), endothelialen Lipase (EL) und *scavenger receptor-BI* (SR-BI) entstehen (Kunitake, Mendel et al. 1992; Kane und Malloy 2012). Die Entwicklung zu diskoidalen HDL verläuft durch die Interaktion von lipidfreien oder gering lipidierten ApoAI hepatischen Ursprungs mit *ATP-bindung cassette transporter A1* (ABCA1) ab, welcher den Efflux von freiem Cholesterin und PLs aus Makrophagen oder anderen Zellen katalysiert. Der ABCA1-Transporter ist für 90 % des Cholesterin-Effluxes verantwortlich (Wang und Rader 2007). Ein funktionierender ABCA1 ist für die Bildung maturer HDL essentiell: Patienten mit einer Mutation im Gen für ABCA1 sind von der sogenannten Tangier-Krankheit betroffen und weisen geringe Mengen an zirkulierenden HDL auf, welches mit einer drastischen Akkumulation von Cholesterin in peripheren Geweben einhergeht, sodass Betroffene im Zusammenhang mit erhöhten LDL-

Werten häufig an vaskulären Erkrankungen sterben (Bodzioch, Orso et al. 1999). Als intrazellulärer Transporter ist *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) für den Cholesterin-Efflux zum HDL verantwortlich (Kennedy, Barrera et al. 2005; Tarling und Edwards 2011). Sowohl ABCG1 als auch ABCA1 sind *liver X receptor* (LXR)-Zielgene und ihre Expression wird bei steigender intrazellulärer Konzentration an Cholesterin induziert (Teil A, 3.2.1.3) (Venkateswaran, Laffitte et al. 2000; Kennedy, Venkateswaran et al. 2001). Durch gleichzeitige Depletion von ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen erfolgt eine merkliche Störung des RCT, welches in einer stark beschleunigten Ausbildung von Atherosklerose resultiert (Yvan-Charvet, Ranalletta et al. 2007).

Das Enzym LCAT vermittelt die Umsetzung des Cholesterins zu CE, die sich im Folgenden im Kern der HDL anreichern. Durch die Volumenzunahme erfolgt die Entstehung sphärischer HDL. Der Transfer weiterer Phospholipide aus den VLDL auf die wachsenden HDL wird durch das PLTP vermittelt. In der folgenden Abbildung 2 ist der systemische HDL-Stoffwechsel zusammenfassend dargestellt.

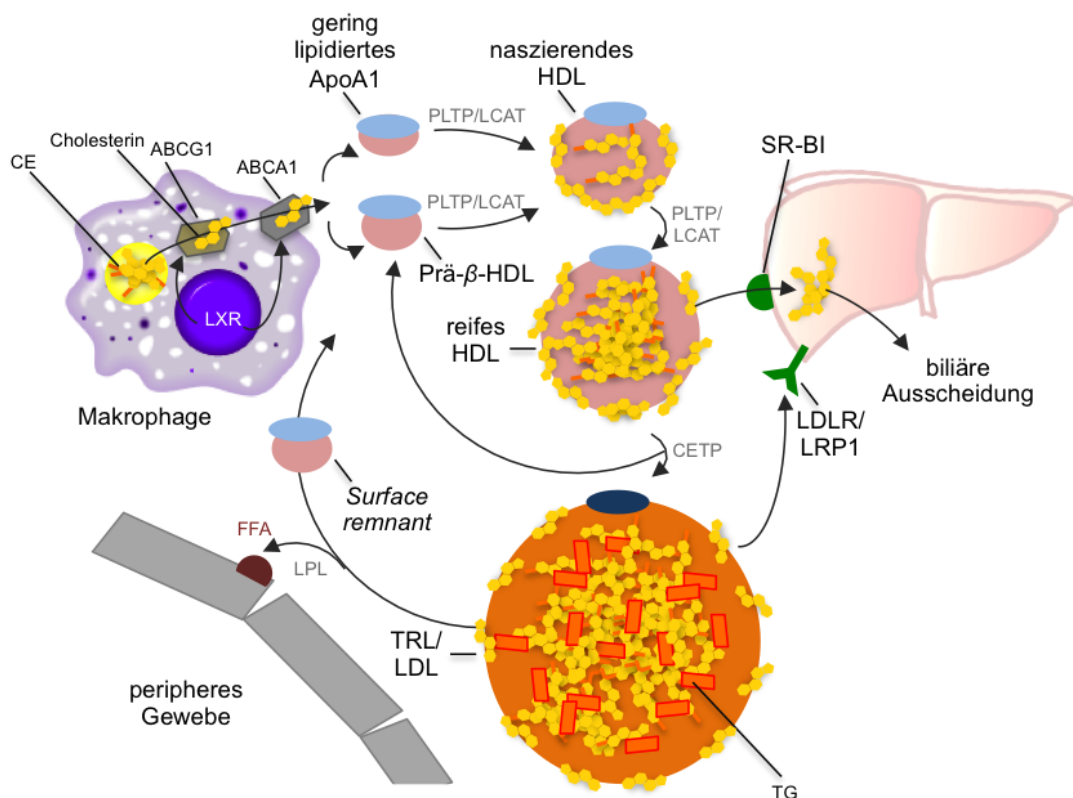


Abbildung A - 2: HDL-vermittelter reverser Cholesterintransport

Der Export von freiem Cholesterin aus den Makrophagen erfolgt über *ATP-binding cassette transporter A1* und *G1* (ABCA1/G1), welche beide Zielgene des Transkriptionsfaktors *liver X receptor* (LXR) sind. Die Lecithin-Cholesterin-Acytransferase (LCAT) katalysiert die Veresterung von freiem Cholesterin zu Cholesterinestern (CE). Letztere werden in den Kern von HDL-Vorläufer transferiert. Im Zuge der Entwicklung zu reifem HDL werden über das Phospholipidtransferprotein (PLTP) und LCAT weitere Phospholipide und Cholesterin auf die HDL übertragen. CE können entweder direkt über den *scavenger receptor BI* (SR-BI) von der Leber aufgenommen werden oder werden, katalysiert durch das *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), auf ApoB-enhaltene Lipoproteine exportiert. Letztere werden über den *low density lipoprotein-receptor* (LDLR) oder das *LDL related protein 1* (LRP1) in die Leber aufgenommen. Als Konsequenz der Abgabe von CE aus murenen HDL werden neue HDL-Vorläufer gebildet: einerseits Prä-β-HDL und andererseits *surface remnants*. (TG = Triglyzerid, FFA = free fatty acid, LPL = Lipoproteinlipase)

Der Katabolismus von HDL verläuft über verschiedene Mechanismen. Auf direktem Wege kann entweder ein Holopartikel-*uptake* der HDL erfolgen (Brundert, Heeren et al. 2011) oder es kommt zu einer von SR-BI vermittelten selektiven Aufnahme von Cholesterinester und anderen Lipiden in die Leber (Brundert, Ewert et al. 2005). Der indirekte Weg beinhaltet den durch das CETP katalysierte Transfer von CEs im Austausch mit TGs von ApoB-enthaltenen Lipoproteinen, welche im Folgenden über den LDLR- oder den LRP1-Weg abgebaut werden können (von Eckardstein, Hersberger et al. 2005). Letztere Alternative ist ausschließlich in Lebewesen möglich, welche CETP exprimieren, jedoch nicht in der Maus oder der Ratte. In der Leber wird das Cholesterin letztendlich über verschiedene Wege weiterverarbeitet (Teil A, 2.2 und 3.2).

3 Cholesterinstoffwechsel

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil tierischer Zellen: Es ist maßgebend am Aufbau von Membranstrukturen, Membranfluidität, intra- sowie extrazellulärem Transportmechanismen und neuronalem *Signalling* beteiligt (Maxfield und Tabas 2005; Allen, Halverson-Tamboli et al. 2007; Parton und Simons 2007). Weiterhin dient es als Edukt für die Synthese von Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren (Teil A, 3.2.1.1).

Dabei übernimmt die Leber eine wichtige Stellung im Erhalt der systemischen Cholesterinhomöostase, indem sie maßgeblich am Metabolismus von VLDL und HDL (Teil A, 2.2, 2.3), der Aufnahme von CR (Teil A, 2.1) sowie der Synthese von Cholesterin (Teil A, 3.1) und Gallensäuren (Teil A, 3.2.1.1) beteiligt ist. Durch die Regulation der (Re)-Absorption von diätetischem Cholesterin, übernimmt auch der Dünndarm eine bedeutsame Funktion (Teil A, 2.1).

Bei cholesterinreicher Ernährung (Aufnahme über die Diät > 300 mg) synthetisiert ein erwachsener Mensch ca. 900 mg Cholesterin am Tag (Teil A, 3.1), sodass in der Summe ca. 1200 mg an Sterolen pro Tag (Teil A, 3.2) ausgeschieden werden (Carey und Duane 1994). Ein Ungleichgewicht in der zellulären und systemischen Cholesterinhomöostase gehört zu den Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Teil A, 4).

3.1 Cholesterinbiosynthese

Cholesterin wird in fast allen tierischen Zellen aus Acetyl-CoA im ER synthetisiert und ist das Endprodukt des Mevalonat-Stoffwechselweges, welcher sich nach der Synthese des Intermediates Lanosterol einerseits in den Kandutsch-Russell-Pathway (Kandutsch und Russell 1960) und andererseits in den Bloch-Pathway (Bloch 1965) unterteilt.

Um die intrazelluläre Cholesterinhomöostase zu gewährleisten, unterliegt die Biosynthese von Cholesterin einer starken Regulation. Die exogene Versorgung der Zelle mit Cholesterin erfolgt über den LDLR-Zyklus (Brown und Goldstein 1986). Nach der Bindung eines Liganden an den LDLR reichert sich der Liganden-Rezeptor-Komplex in den *coated pits* an. Zur Endozytose werden diese als *coated vesicles* in die Zelle aufgenommen und es erfolgt die Bildung von Endosomen. Vermittelt durch CURL (*compartment of uncoupling receptor and ligand*) und durch die Absenkung des pH-Wertes verlässt der LDLR die Vesikel und wandert zurück zu Zellmembran. Der verbleibende Teil der endozytotischen Vesikel fusioniert mit Lysosomen, in denen die im LDL enthaltenen Cholesterinester, vermittelt durch die lysosomale saure Lipase, in Cholesterin und Fettsäure gespalten werden. Das freie Cholesterin wird durch Nieman-Pick TypC Proteine 1 und 2 (NPC1 und 2) aus den Lysosomen zum ER transportiert und dient im Folgenden zur Synthese anderer Verbindung. Darüber hinaus nimmt es eine wichtige Position in der Regulation der intrazellulären Cholesterinsynthese ein, wobei es die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) inhibiert,

welche die Reduktion von β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA zu Mevalonat katalysiert, sowie die Expression des LDLR reguliert. Sowohl die Regulation von HMGCR als auch des LDLR erfolgt auf transkriptioneller Ebene über die Aktivierung des *sterol regulatory elements* (SRE) (Smith, Osborne et al. 1990) durch das *sterol regulatory binding proteins 1* und *2* (SREBP1 und 2) (Yokoyama, Wang et al. 1993) (Goldstein und Brown 1990; Brown und Goldstein 1997). Durch Absenkung des Cholesteringehaltes in der Zelle, wird das an Cholesterin gebundene SCAP (SREBP *cleavage activating protein*) aktiviert und vermittelt die Proteolyse von SREBP im ER. Der aminoternale Teil der SREBPs gelangt in den Zellkern und induziert die Expression. Auch LXR, *farnesoid X receptor* (FXR) und RXR zählen zu den Transkriptionsfaktoren, die die Cholesterinhomöostase mitbestimmen (Calkin und Tontonoz 2012). Weiterhin kann die HMGCR auch durch reversible Phosphorylierung seitens der AMP-Kinase (AMPK) oder durch Akkumulation von Farnesol inhibiert werden (Meigs und Simoni 1997).

3.2 Elimination von Cholesterin

Cholesterin kann zellulär nicht vollständig katabolisiert werden. Daher erfolgt ein bedeutender Anteil der Ausscheidung von Cholesterin bei Säugetieren über die hepatobiliäre Route. Diese beinhaltet die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin in der Leber und die anschließende fäkale Ausscheidung.

Daneben steht die Elimination über einen nicht biliären, HDL-unabhängigen Stoffwechselweg – der sogenannte *transintestinal cholesterol excretion pathway* (TICE) – zur Diskussion (Van der Velde, Vrans et al. 2007; Brown, Bell et al. 2008; Temel und Brown 2010), der unter normalen physiologischen Bedingungen bis zu 30 % ausmachen kann (van der Veen, van Dijk et al. 2009). Im bislang nicht vollständig geklärten Mechanismus des TICE wird davon ausgegangen, dass Cholesterin in der Leber in ApoB-enhaltene Lipoproteinpartikel oder HDL inkorporiert und anschließend spezifisch zum Dünndarm transportiert wird. Nach der Aufnahme des Cholesterins über SR-BI, LDLR oder einen anderen Lipoproteinrezeptor in die Enterocyten erfolgt die Abgabe in das Darmlumen über ABCG5/8 oder einen bis jetzt nicht identifizierten Transporter (Temel und Brown 2010; Temel und Brown 2012).

Weiterhin wird ein geringer, in der Gallenflüssigkeit gelöster Anteil, von Cholesterin biliär ausgeschieden. Dabei wird das Cholesterin über ABCG5/8 in die Canaliculi transportiert (Abbildung A - 4).

Ein Fokus dieser Arbeit ist die hepatobiliäre Elimination von Cholesterin nach Aktivierung des BAT, weshalb im Folgenden detaillierter auf den Metabolismus von Gallensäuren eingegangen werden soll.

3.2.1 Gallensäuren

Gallensäuren sind amphipatische Steroide und das Hauptausscheidungsprodukt von Cholesterin. Zusammen mit Cholesterin, Phospholipiden und Bilirubin sind Gallensäuren die Hauptbestandteile der Gallenflüssigkeit (Thomas, Pellicciari et al. 2008). In der adulten, humanen Leber werden pro Tag ca. 500 mg Cholesterin zu Gallensäuren katabolisiert (Teil A, 3.2.1.1). Diese Produktionsrate macht 90 % des aktiv verstoffwechselten Cholesterins aus; die restlichen 10 % fallen auf die Synthese von Steroidhormonen und Cholecalciferol (Russell 2003).

Durch einen prandialen Stimulus, der vermittelt durch die Sekretion von Cholezystokinin zu einer Kontraktion der Gallenblase führt, wird die Gallenflüssigkeit in das Lumen des Duodenums entleert (Teil A, 3.2.1.2). Dort unterstützen Gallensäuren die Solubilisierung von Nahrungslipiden, Cholesterin und fettlöslichen Vitaminen, welche entsprechend aufgenommen und über Lipoproteine im Körper verteilt werden können (Teil A, 2). Postprandial führt dieses zu einem ca. dreifachen Anstieg der Gallensäurekonzentrationen im Dünndarm, der Leber und in der systemischen Zirkulation (van der Veen, van Dijk et al. 2009; Bonnefond und Froguel 2015; Locke, Kahali et al. 2015). Somit liegt nahe, dass Gallensäuren, neben den oben genannten Funktionen, auch als endokrin wirkende Botenstoffe fungieren, um beispielsweise peripheren Geweben das Signal über eine Nahrungsaufnahme und daraus resultierende Energiequelle zu vermitteln (Teil A, 3.2.1.4).

3.2.1.1 Synthese

Die Synthese von Gallensäuren (*bile acids* = BA) erfolgt ausschließlich in der Leber und wird durch insgesamt 17 Enzyme katalysiert. Dabei wird zwischen dem klassischen und dem alternativen Syntheseweg (Abbildung A - 3) unterschieden. Beide Wege beinhalten einen Initiationsschritt, die Modifikation des Steran-Gerüsts, Oxidationsreaktionen der Seitenkette und letztendlich die Konjugation mit einer Aminosäure von unkonjugierten Gallensäuren (*unconjugated bile acids* = UBA) zu konjugierten Gallensäuren (*conjugated bile acids* = CBA) (Russell 2003).

Cholesterol-7 α -hydroxylase (kodiert durch *Cyp7a1*), ein microsomales Cytochrom P450 Enzym, welches ausschließlich in der Leber exprimiert wird, ist das erste und gleichzeitig geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Syntheseweges. Es katalysiert die 7 α -Hydroxylierung am Cholesterin. Mäuse mit einer *Cyp7a1*-Defizienz haben aufgrund von Lebersversagen, Malabsorption von diätetischer Lipiden und Vitaminunterversorgungsercheinungen ein erhöhtes Risiko zur postnatalen Mortalität (Schwarz, Lund et al. 1998). Weiterhin ist der Gallensäurepool um 75 % reduziert (Schwarz, Russell et al. 1998).

Das erste Enzym des alternativen Gallensäuresyntheseweges ist die in den Mitochondrien lokalisierte *Sterol-27-hydroxylase* (kodiert durch *Cyp27a1*). Hierbei handelt es sich auch um

ein Cytochrom P450 Enzym, welches eine Hydroxylgruppe an Position 27 des Sterangerüsts von Cholesterin einfügt. Im Vergleich zur Cholesterol-7 α -hydroxylase erfolgt die Expression in verschiedenen Geweben. In diesem Zusammenhang wird die Beteiligung von *Cyp27a1* als Alternative zum HDL-medierte RCT beschrieben (Bjorkhem, Andersson et al. 1994; Reiss, Martin et al. 1994; Weingartner, Laufs et al. 2010). Im Rahmen des alternativen Gallensäuresyntheseweges erfolgt die für die Sterolringmodifikation unerlässliche Hydroxylierung an Position 7 des Sterangerüsts, vermittelt durch die im ER lokalisierte

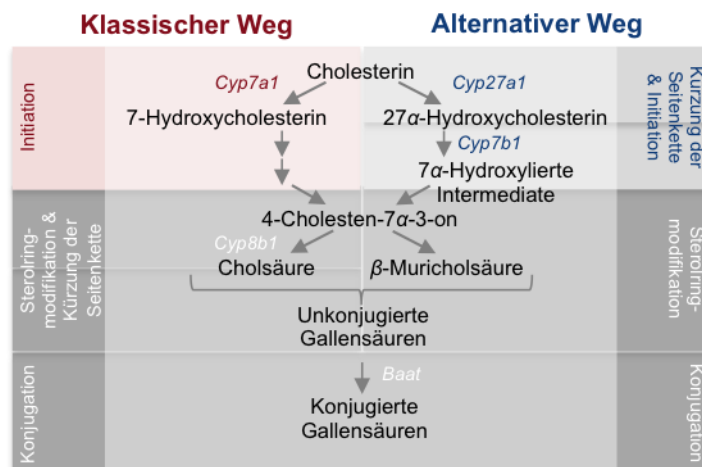


Abbildung A - 3: Gallensäuresynthese

Die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin erfolgt über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege: den klassischen (neutralen) Weg (in rot hinterlegt) oder den alternativen (sauren) Weg (in blau/hellgrau hinterlegt). Die vierphasige Synthese beinhaltet im ‚Initiations‘-Schritt die Hydroxylierung an Position 7 des Sterangerüsts, welches durch die Cholesterin-7 α -hydroxylase (kodiert durch *Cyp7a1*) oder die Oxysterol-7 α -hydroxylase (kodiert durch *Cyp7b1*) katalysiert wird. Hierbei ist die Cholesterin-7 α -hydroxylase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Weges. Die Sterol-27-hydroxylase (kodiert durch *Cyp27a1*) katalysiert die Hydroxylierung der Seitenkette, wodurch in folgenden Schritten die ‚Kürzung der Seitenkette‘ möglich wird. Die Hydroxylierung an Position 12 des Steran-Gerüsts (‚Modifikation‘) erfolgt durch die Sterol-12 α -hydroxylase (kodiert durch *Cyp8b1*), welches zur Bildung von einer der beiden unkonjugierten, primären Gallensäuren, der Cholsäure führt. Die zweite der beiden unkonjugierten, primären Gallensäuren ist im murinen System die β -Muricholsäure. Im letzten Schritt wird von dem Enzym BA-CoA:amino acid *N*-acyltransferase (kodiert durch *Baat*) die ‚Konjugation‘ von Taurin (Maus) oder Glycin (human) zu konjugierten Gallensäuren katalysiert. (vereinfachte Darstellung, modifiziert nach Thomas et al. (2008) und Russell (2003))

Hydroxylierung weiterer Positionen am Sterangerüst. Nach der Bildung von Cholesten-4 α -3-on können dabei zwei Wege eingeschlagen werden. Katalysiert durch *Sterol-12 α -hydroxylase* (kodiert durch *Cyp8b1*) wird eine Hydroxylgruppe an Position 12 des Sterangerüsts eingefügt, welches nach diversen Oxidationsschritten der Seitenkette zur Bildung der primären Gallensäure Cholsäure (CA) führt. Erfolgt dieser Schritt nicht, kommt es letztendlich zur Bildung der primären Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA). In der Maus und der Ratte wird aus CDCA insbesondere α - und dann β -Muricholsäure (β -MCA) gebildet (Botham und Boyd 1983).

Oxysterol-7 α -hydroxylase (kodiert durch *Cyp7b1*). Auch im Zusammenhang mit der *Cyp7b1*-Defizienz wurden schwere Leberschäden bereits im frühen Kindesalter beschrieben (Setchell, Schwarz et al. 1998; Dai, Mills et al. 2014).

Weiterhin kann der Initiationsschritt durch Hydroxylierung von Cholesterin an Position 24 und 25 des Sterangerüsts, gefolgt von einer Hydroxylierung an Position 7 des Sterangerüsts, vermittelt durch CYP7B1, erfolgen.

Im nächsten Schritt kommt es bei der Sterolringmodifikation zur

Durch die Anzahl und Orientierung der Hydroxylgruppen werden die physikochemischen und biologischen Eigenschaften der Gallensäuren bestimmt (Meier und Stieger 2002; Lefebvre, Cariou et al. 2009). Dabei sind MCAs hydrophiler als CA oder CDCA, wobei die Toxizität mit ansteigendem Grad an Hydrophilie abnehmen soll. Zudem gilt, dass hydrophilere BA den Gallensäureefflux anregen und zu einer Inhibierung der intestinalen Aufnahme an Cholesterin aus der Nahrung führen (Wang, Tazuma et al. 2003; Thomas, Pellicciari et al. 2008). Daneben haben vor allem hydrophobe BA eine Funktion als Liganden für Transkriptionsfaktoren (Teil A, 3.2.1.3) (Li-Hawkins, Gafvels et al. 2002; Meier und Stieger 2002; Sayin, Wahlstrom et al. 2013; Hu, Bonde et al. 2014). Daher ist insbesondere die Aktivität von CYP8B1 für die Zusammensetzung des Gallensäurepools verantwortlich (Pandak, Bohdan et al. 2001; Thomas, Pellicciari et al. 2008).

Bei der Konjugation von Gallensäuren, welche erneut den Grad an Hydrophilie erhöhen, werden in einem zweistufigen Prozess 98 % der freien Gallensäure mit einer Aminosäure verestert. Dabei wird durch die Konjugation der pH-Wert erniedrigt, sodass die Gallensäuren bei einem physiologischen pH-Wert als Salz vorliegen, wodurch die Wasserlöslichkeit erhöht wird und die BA impermeabel für Membranen macht (Russell 2003). Zunächst katalysiert die *bile acid CoenzymeA ligase* (kodiert durch *Bacs*) die Bildung eines Konjugats aus CoenzymA (CoA) und einer BA (He, Barnes et al. 2003). Im Weiteren erfolgt, vermittelt durch die peroxisomale *BA-CoA:amino acid N-acyltransferase* (kodiert durch *Baat*), die Substitution von CoA mit Glycin (beim Menschen) oder Taurin (bei der Maus). Daraus resultiert, dass die biochemischen Charakteristika von Gallensäuren zwischen Mensch und Maus nicht komplett vergleichbar sind. Allerdings wird beim Menschen unter diätischen Bedingungen einer Taurin- und Cholesterin-reichen Western Diät eine Verschiebung zu Taurin-konjugierten Gallensäuren beobachtet (Hardison 1978).

3.2.1.2 Die enterohepatische Zirkulation

Als enterohepatische Zirkulation (vgl. Abbildung A - 4) wird der Kreislauf der Gesamtheit aller Gallensäuren (3 – 4 g im erwachsenen Menschen) zwischen Leber, Gallenblase und Darm bezeichnet (Hofmann 2009). Dabei wird die Geschwindigkeit der Zirkulation maßgeblich durch die Frequenz der Nahrungsmittelzufuhr bestimmt (Kuipers, Bloks et al. 2014). Im Mittel erfolgen sechs bis zehn Zyklen am Tag (Meier und Stieger 2002). Durch die Existenz dieses „Recyclings“ von Gallensäuren, bei dem unter normalen physiologischen Bedingungen lediglich 5 % über fäkale Exkretion verloren gehen, kann sichergestellt werden, dass in der Gallenblase die Kristallisation von Cholesterin unterbunden wird und dass eine ausreichende Absorption von fettlöslichen Vitaminen und Lipiden aus dem Lumen des Darms erfolgt (Hofmann 2009; Kuipers, Bloks et al. 2014).

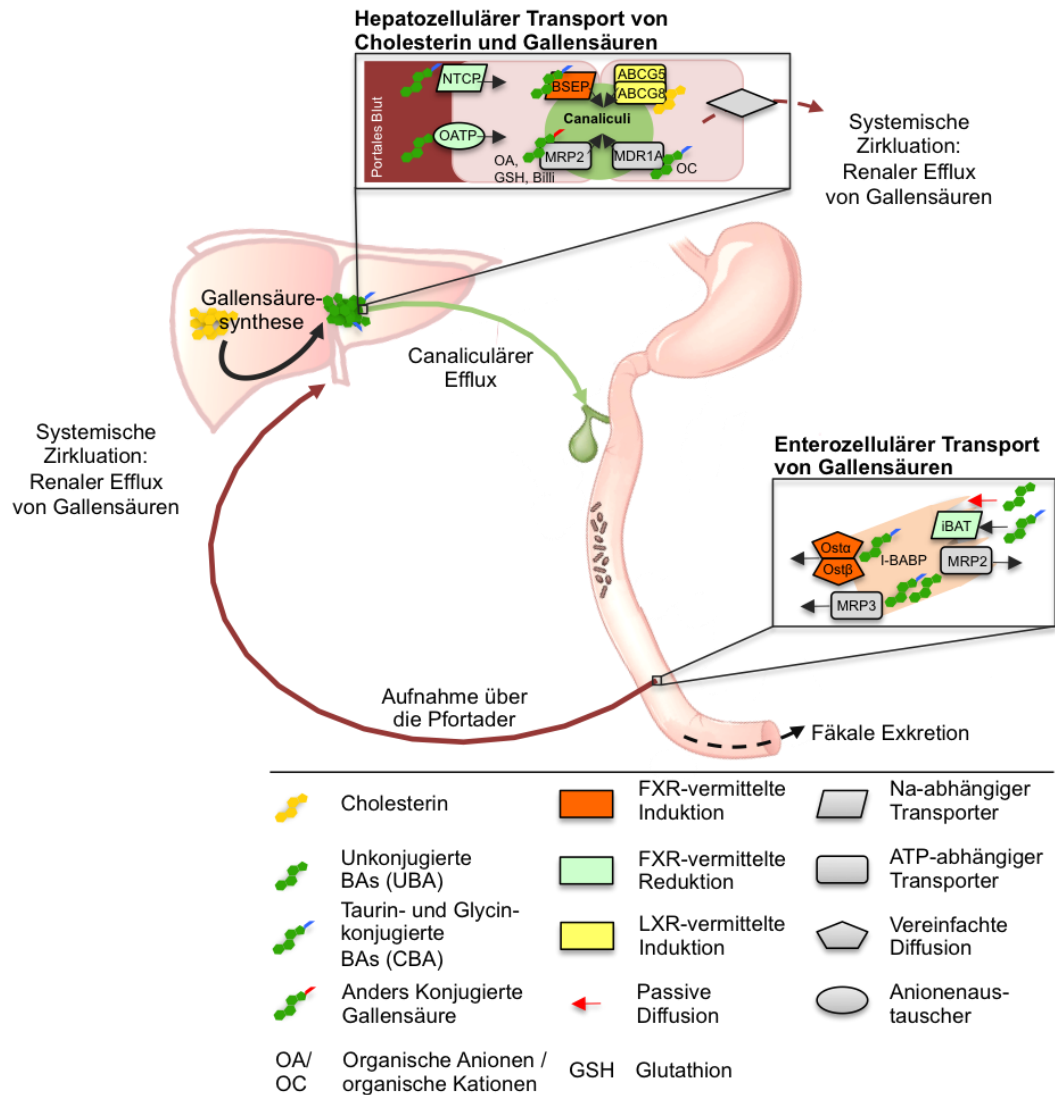


Abbildung A - 4: Enterohepatischer Kreislauf

Nach erfolgter Gallensäuresynthese oder -aufnahme in die Hepatocyten werden monovalente Taurin- und Glycin-konjugierte Gallensäuren (*conjugated bile acids* = CBA) über den Transporter *bile salt export pump* (BSEP) in die Canaliculi exportiert. Weiterhin werden Cholesterin über den heterodimeren Transporter *ATP-binding cassette G5/8* (ABCG5/8), organische Anionen (OA), reduziertes Glutathion (GSH), Billi (Billirubin), bivalent-konjugierte Gallensäuren über das *multidrug resistance protein 2* (MRP2) sowie CBA und organische Kationen (OC) über die *multidrug export pump 1A* (MDR1A) in die Canaliculi transportiert und letztendlich in der Gallenblase gespeichert. Im Zustand einer Cholestase erfolgt neben dem canaliculären Efflux ein basolateraler Transport über verschiedene Transporter. Dabei werden unter anderem Billi und CBA in die systemische Zirkulation abgegeben, um letztendlich renal ausgeschieden zu werden. Die in der Gallenblase gespeicherten Metabolite werden in Folge einer Mahlzeit in das Lumen des Duodenums entleert und unterstützen dort die Verdauung und Absorption von Lipiden. Im Dünndarm werden die vorwiegend als CBA vorliegenden Gallensäuren (*bile acids* = BA) von der intestinalen Mikrobiota prozessiert. Dies beinhaltet die Deconjugation von CBA zu unkonjugierten Gallensäuren (*unconjugated bile acids* = UBA) und im Weiteren Dehydroxylierungsreaktionen. UBA werden entlang des Dünndarms jedoch auch im Colon über passive Diffusion zurück in die Enterocyten aufgenommen. Die Aufnahme verbleibender CBA in die Ileocyten erfolgt im terminalen Ileum über den apicalen Natrium-abhängigen Transporter *ileal bile acid transporter* (IBAT). Intrazellulär erfolgt der Transport der CBA gebunden an das *ileal bile acid binding protein* (I-BABP), um die cytotoxischen Effekte der BA zu unterbinden. Ein geringer Anteil der so absorbierten BA wird apical über MRP2 erneut in das Darmlumen abgegeben, um letztendlich fäkal ausgeschieden zu werden. Der basolaterale Export der CBA in das Pfortaderblut wird über den heterodimeren Transporter *organic solute transporter α/β* (OST α/β) und das *multidrug resistance protein 3* (MRP3) vermittelt. Über das Pfortaderblut gelangen die BA zur Leber (enterohepatische Zirkulation), wo diese vorwiegend über das *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP), jedoch auch vermittelt durch den *organic anion transporter* (OATP) in die Hepatocyten aufgenommen werden. BA, deren Aufnahme nicht erfolgt, gelangen in die systemische Zirkulation und können letztendlich renal ausgeschieden oder wieder in die enterohepatische Zirkulation eingeschleust werden.

Die Regulation dieser Zirkulation resultiert aus der koordinierten Zusammenarbeit verschiedener Transporter in der Leber und im Dünndarm.

Obwohl der Gallensaft isoosmotisch zum Plasma ist, ist die Konzentration an Gallensalzen im Gallensaft 1000fach erhöht. Verantwortlich dafür ist der aktive Transport von Gallensalzen aus dem portalen Plasma in die Hepatocyten gegen den Konzentrationsgradienten (Meier und Stieger 2002). Im First-Pass-Effekt werden dabei je nach Eigenschaft der Gallensäure 75 % – 90 % in die Hepatocyten aufgenommen (Meier 1995).

Die Aufnahme von CBA erfolgt im Co-Transport mit Natrium über den basolateralen Transporter *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) (Cattori, Eckhardt et al. 1999; Hagenbuch und Dawson 2004). Die Aufnahme von UBA jedoch auch CBA und anderen amphiphilen Metaboliten kann weiterhin auch durch einer der *organic anion transporter* (OATP) erfolgen (Meier und Stieger 2002). Nach der basolateralen Aufnahme oder der Synthese (Teil B, 3.2.1.1) werden die BA innerhalb von Sekunden in die Canaliculi abgegeben. Der zelluläre Transport in den Hepatocyten erfolgt über Bindung der BA an cytosolische Proteine oder vesikulär (Crawford, Berken et al. 1988; Agellon und Torchia 2000). Monovalente Taurin- und Glycin-konjugierte Gallensäuren werden anschließend über den ATP-abhängigen Transporter *bile salt export pump* (BSEP) in die Canaliculi exportiert (Stieger, O'Neill et al. 1992). Weiterhin werden Cholesterin über den heterodimeren Transporter ABCG5/8, organische Anionen (OA), reduziertes Glutathion (GSH), Billi (Billirubin), bivalente konjugierte Gallensäuren über das *multidrug resistance protein 2* (MRP2) sowie CBA, Phospholipide und organischen Kationen (OC) über die *multidrug export pump 1A* (MDR1A) in die Canaliculi transportiert, sodass die Metabolite in der Gallenblase als gemischte Micellen gespeichert werden können und biliäre Epithelzellen vor den Detergenzeigenschaften der Gallensäuren geschützt sind. Unter pathophysiologischen, cholestatischen Bedingungen können CBA, UBA und Billi über basolaterale Transporter in die systemische Zirkulation abgegeben und letztendlich renal ausgeschieden werden. Eine Nahrungszufuhr führt, vermittelt durch Cholezystokinin, zur Kontraktion der Gallenblase, wodurch der Gallensaft in das Lumen des Duodenums abgegeben wird. Wie bereits beschrieben, unterstützen die Gallensalze die Absorption von Nahrungsbestandteilen. Weiterhin werden die Gallensäuren im Intestinaltrakt von anaeroben Bakterien prozessiert. In Rahmen von Dekonjugationsreaktionen katalysieren diverse mikrobielle *bile salt hydrolases* (BSH) die Hydrolyse der C24-N-Acylbindung. Die produzierten UBA durchlaufen im Folgenden Epimerisierungsreaktionen durch bakterielle Enzyme und werden zu sekundären Gallensäuren dehydroxyliert. So entsteht beispielsweise aus CA die Deoxycholsäure und aus β -MCA die ω -Muricholsäure (ω -MCA) (Ridlon, Kang et al. 2006; Dawson und Karpen 2014; Joyce, MacSharry et al. 2014). UBA werden entlang des Dünndarms jedoch auch im Colon über passive Diffusion zurück in die Enterocyten aufgenommen (Dietschy 1968). Die Aufnahme von CBA in die Ileocyten erfolgt im terminalen Ileum über den am Bürstensaum

lokalisierten apicalen Natrium-abhängigen Transporter *ileal bile acid transporter* (iBAT) (Wong, Oelkers et al. 1994). Intrazellulär werden CBA an das *ileal bile acid binding protein* (I-BABP) gebunden und hin zu den basolateralen Exportern, dem heterodimeren Transporter *organic solute transporter α/β* (OST α/β) (Wang, Seward et al. 2001; Seward, Koh et al. 2003) und dem *multidrug resistance protein 3* (MRP3) (Kruh und Belinsky 2003) transportiert, um über das Pfortaderblut erneut zur Leber zu gelangen. OST α/β weisen eine Substratspezifität für CBA auf, MRP3 transportiert gleichermaßen CBA und UBA. Ein geringer Anteil der absorbierten BA wird apical über MRP2 erneut in das Darmlumen abgegeben um letztendlich fäkal ausgeschieden zu werden.

3.2.1.3 Regulation der Gallensäuresynthese und des –transports

Um ein Ungleichgewicht im Gallensäurestoffwechsel zu vermeiden (Teil B, 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.4), werden die Gallensäuresynthese und die enterohepatische Zirkulation (Abbildung A - 4) durch die Substrat- bzw. Produktkonzentration in den Hepatocyten sowie Enterocyten strikt reguliert.

In Abhängigkeit von der zellulären Konzentration an Cholesterin, Desmosterol oder Oxysterolen (Janowski, Willy et al. 1996; Peet, D. et al. 1998; Yang, McDonald et al. 2006; Heverin, Meaney et al. 2007; Shafaati, Olin et al. 2011; Spann, Garmire et al. 2012), induziert der nukleäre Rezeptor LXR die Expression zum einen der für den biliären Cholesterin-Efflux und die intestinale Absorption verantwortlichen Transporter *Abcg5* und *Abcg8* (Abbildung A - 4) (van der Veen, van Dijk et al. 2009) und zum anderen von murinen *Cyp7a1* (Peet, D. et al. 1998), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Gallensäuren-Synthese. Im Menschen hingegen induziert LXR in Konjugation mit dem *liver receptor homologue-1* (LRH-1) die Expression von *Cyp7a1*. LXRs kommen in zwei Isoformen vor, dem LXR α (*Nr1h3*) und LXR β (*Nr1h2*), sie werden zu einem hohen Grad in der Leber exprimiert, jedoch auch in anderen metabolisch aktiven Geweben und gehören zu den Typ-2 Kernrezeptoren (Apfel, Benbrook et al. 1994). Sie bilden mit dem RXR ein obligates Heterodimer, welches am *LXR response element* (LXRE) des Zielgens bindet und dadurch dessen Expression inhibiert (Willy, Umesono et al. 1995). Nach der Bindung eines Liganden an LXR oder RXR erfolgt der Austausch von Co-Repressor gegen Co-Aktivator, welches letztendlich zur Transkription des Zielgens führt. Daneben wirken LXRs als transkriptionelle Aktivatoren für Gene, die am RCT (*Abca1*, *Abcg1* (Teil A, 2.3) (Repa, Turley et al. 2000; Venkateswaran, Laffitte et al. 2000; Kennedy, Venkateswaran et al. 2001)), am Lipoproteinmetabolismus (*Pltp*, *Cetp*, *Lpl*, *ApoCI*, *ApoCII*, *ApoE* (Teil A, 2) (Luo und Tall 2000; Zhang, Repa et al. 2001; Mak, Laffitte et al. 2002; Laffitte, Joseph et al. 2003)), am Triglyzerid- (*Srebp1c*, *Scd1*, *Fasn* (Repa, Liang et al. 2000; Schultz, Tu et al. 2000)) sowie am Glukosemetabolismus (*Glut4* (Dalen, Ulven et al. 2003)) beteiligt sind. Weiterhin ist

bekannt, dass durch die Aktivierung von LXRs die Expression inflammatorischer Gene in Makrophagen reduziert wird (Bensinger, Bradley et al. 2008; Cui, Qin et al. 2011; Spann, Garmire et al. 2012).

Der nukleäre Rezeptor FXR (*Nr1h4*) arbeitet komplementär zum LXR (Forman, Goode et al. 1995), um so zu hohe intrazelluläre Konzentrationen an potentiell cytoxischen Gallensäuren zu regulieren. Ähnlich zum LXR, bilden FXR und RXR ein Heterodimer und regulieren so, wie bereits zum LXR beschrieben, die Transkription von Zielgenen. Dabei ist FXR in den am enterohepatischen Kreislauf beteiligten Organen am höchsten exprimiert, ist jedoch auch im WAT, der Niere oder in Endothelzellen präsent. Ähnlich wie bei den Oxysterolen stimulieren verschiedene Gallensäuren FXR mit unterschiedlicher Effizienz (Kuipers, Bloks et al. 2014). So bindet mit absteigender Affinität Chenodesoxycholsäure (CDCA), Desoxycholsäure (DCA), Lithocholsäure (LCA) und Cholsäure (CA) an FXR (Makishima, Okamoto et al. 1999; Parks, Blanchard et al. 1999). Einige sehr hydrophile Gallensäuren, wie Tauro- β -muricholsäure (T- β -MCA) und die bei Cholestase therapeutisch-genutzte Ursodesoxycholsäure (UDCA), haben dagegen antagonistische Wirkung auf FXR (Lew, Zhao et al. 2004; Sayin, Wahlstrom et al. 2013). Im aktivierten Zustand (Makishima, Okamoto et al. 1999; Parks, Blanchard et al. 1999; Wang, Chen et al. 1999) inhibiert FXR in der Leber über die Induktion von SHP (*small heterodimer partner; NR0B2*) die *Cyp7a1*-Expression. Dabei bilden SHP und LRH-1 (*NR5A2*) ein Heterodimer, welches letztlich die Expression von *Cyp7a1* inhibiert (s.o.) (Goodwin, Jones et al. 2000; Lu, Makishima et al. 2000). Die Aktivierung von FXR im terminalen Ileum resultiert in einer gesteigerten Produktion von murinem *fibroblast growth factor 15* (FGF15) oder humanem FGF 19, welches über die enterohepatische Zirkulation zur Leber gelangt. Nach Interaktion mit dem *FGF receptor 4* (FGFR4) erfolgt vermutlich über SHP eine Reduktion der Expression von *Cyp7a1* (Inagaki, Choi et al. 2005). Ähnlich dazu führt die Aktivierung von FXR zu einer über SHP und HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*) vermittelten Inhibition der *Cyp8b1* Expression (Zhang und Chiang 2001). Weiterhin stimuliert FXR die Bildung von CBA durch eine gesteigerte Expression von *Bacs* und *Baat* sowie den biliären Gallensäuren-Export durch Induktion von *Bsep* (vgl Teil A, 3.2.1.1 und 3.2.1.2) (Pircher, Kitto et al. 2003; Calkin und Tontonoz 2012). Darüber hinaus inhibiert FXR die Absorption von Gallensäuren durch Regulation der Expression von am enterohepatischen Kreislauf beteiligten Transportern (Abbildung A - 4). So wird die Expression von *Slc10a2* (iBAT) (Chen, Ma et al. 2003), *Slc10a1* (NTCP) und *Slco1b1* (OATP) negativ reguliert, wohingegen eine Induktion von *Fabp6* (IBABP) (Grober, Zaghini et al. 1999) und *Slc51a/b* (OST α/β) (Landrier, Eloranta et al. 2006) erfolgen. Auch FXR wirken als transkriptionelle Modulatoren für Gene, die am Lipidmetabolismus (*ApoCII*, *Srebp1c*) oder am Glukosemetabolismus (z. B. durch *Glucose-6-phosphatase* (*G6pc*)) beteiligt sind (Kast, Nguyen et al. 2001; Watanabe, Houten et al. 2004; Ma, Saha et al. 2006; Y., Y. et al. 2006). Weiterhin korreliert ein hoher transhepati-

scher Gallensäurefluss, welcher in einer FXR-Aktivierung resultiert, positiv mit der Konzentration an LDL-Cholesterin, da Cholesterin nicht in Form von Gallensäuren verstoffwechselt wird (Leiss und von Bergmann 1982; Thomas, Pellicciari et al. 2008).

3.2.1.4 Gallensäuren als Modulatoren des Stoffwechsels

Neben den bereits unter Teil A, 3.2.1.3 genannten FXR-abhängigen Effekten von Gallensäuren auf den Energiestoffwechsel, sind Gallensäuren auch als Liganden des *pregnane X receptors* (PXR) (Staudinger, Goodwin et al. 2001) und Vitamin-D Rezeptors (Makishima, Lu et al. 2002) beschrieben. Beide Rezeptoren sind als Sensor für die hepatotoxische und carcinogene Lithocholsäure (LCA) beschrieben und induzieren den Abbau von LCA.

Weiterhin aktivieren Gallensäuren den TGR5. Die Wirkungen sind zelltypspezifisch und beinhalten unter anderem anti-inflammatorische Effekte, verbesserte Glukosetoleranz und erhöhte Insulinsensitivität (Katsuma, Hirasawa et al. 2005; Kuipers, Bloks et al. 2014). Watanabe, Houten et al. (2006) zeigten, dass die Aktivierung von TGR5 durch CA oder CDCA im BAT zu einem erhöhten Energieumsatz führt. Durch die gesteigerte Expression an *type 2 iodothyronine deiodinase (Dio2)* und dem daraus resultierenden erhöhten Umsatz von T4 zu T3 erfolgte die Induktion von verschiedenen am Katabolismus beteiligten Genen.

Ähnlich dazu konnten Fang, Suh et al. (2015) zeigen, dass eine intestinale Aktivierung von FXR mit dem Browning von weißem Fettgewebe assoziiert ist, wobei der Mechanismus hierzu nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Weiterhin ist bekannt, dass die Adipositaschirurgie (engl. *Bariatric surgery*) mit einer Reduktion des Körpergewichtes sowie einer Linderung von Typ-2 Diabetes Mellitus-Erkrankungen einhergeht. Auch führt der Eingriff zu erhöhten Plasmagallensäurespiegeln, welche durch die Aktivierung von FXR mit den vorteilhaften Effekten in Verbindung gebracht werden (Ryan, Tremaroli et al. 2014).

Im Zusammenhang damit konnte in einer Studie von Haeusler, Pratt-Hyatt et al. (2012) gezeigt werden, dass ein Mangel an 12 α -hydroxylierten Gallensäuren bedingt durch eine *Cyp8b1*-Defizienz mit der FXR-abhängigen Entwicklung eines diabetischen Phänotyps assoziiert ist.

Auch in der Therapie werden vorwiegend synthetische FXR-Liganden (z.B. die synthetische Gallensäure 6 α -Ethyl chenodeoxycholsäure) zur Behandlung von Diabetes, NAFLD (engl.: *non alcoholic fatty liver disease*) und primärer biliärer Zirrhose eingesetzt (Stanimirov, Stankov et al. 2012; Mudaliar, Henry et al. 2013).

4 Folge einer Störung des Lipidstoffwechsels - Atherosklerose

Atherosklerose, eine durch Lipidakkumulation und chronischer Entzündung der Arterienwand gekennzeichnete Erkrankung des vaskulären Systems, gehört zu den meist abundanten Stoffwechselerkrankungen in der westlichen Welt und ist kausal mit einer Störung im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel verknüpft (Maxfield und Tabas 2005). Initiiert durch die Akkumulation von cholesterinreichen Lipoproteinen und oxidierten LDL im Subendothelium oder der Intima und einer daraus resultierenden Adhäsion von Leukocyten an aktivierte Endothelzellen, erfolgt die Migration der Leukocyten in die Intima. Gefolgt von der Differenzierung zu Makrophagen, bilden sich aus letzteren nach Aufnahme von Lipiden Schaumzellen. Weiterhin erfolgt die Migration von glatten Muskelzellen (SMC) in die Intima. Durch Apoptose von SMC und Schaumzellen bilden sich fibrotische Plaques. In Folge einer physikalischen Zerstörung dieser Plaques erfolgt die Bildung eines Thrombus, welcher den Gefäßdurchmesser der Arterien verringert (Goldstein und Brown 1977; Maxfield und Tabas 2005; Libby, Ridker et al. 2011).

Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose gehören hohe LDL-Cholesterinwerte und niedrige HDL-Cholesterinkonzentrationen (Lusis 2000; Lewington, Whitlock et al. 2007; Ference, Yoo et al. 2012). Ursachen können einerseits genetischer Natur (*familial hypercholesterolemia* (FH), *familial ligand-defective apoB-100* (FDB), *sitosterolemia*, *autosomal recessive hypercholesterolemia* (ARH)) oder durch den *Lifestyle* begründet sein (Goldstein und Brown 2001; Maxfield und Tabas 2005).

Um den LDL-Cholesterinspiegel zu senken, werden als Therapie vor allem HMGCR-Inhibitoren (Statine) (Teil A, 3.1), NPC1L1-Inhibitoren (Eztimibe) (Teil A, 2.1) und Gallensäurebinder eingesetzt (Ma, Gil et al. 1986; Hawes, O'Neill K et al. 2007; Reasner 2008; Robinson, Wang et al. 2009).

Ein weiterer Therapie-Ansatz ist die Erhöhung der Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma. Dies erfolgt einerseits über die Gabe von Niacin oder durch die pharmakologische Inhibierung von CETP (Dalcetrapib). In zwei klinischen Studien (AIM-HIGH-Studie, dal-OUTCOMES-Studie) konnten jedoch keine eindeutigen Effekte der Linderung nachgewiesen werden (Schwartz, Olsson et al. 2009; Boden, Probstfield et al. 2011).

In einer murinen Studie in hyperlipidämischen *APOE*3-Leiden.CETP*-Mäusen (E3L.CETP) konnte von Berbee, Boon et al. (2015) gezeigt werden, dass die Aktivierung des BAT zu einer verstärkten hepatischen Aufnahme von CR führt und dadurch die Entwicklung von Atherosklerose minimiert. Dennoch ist in diesem Zusammenhang noch nicht bekannt, in welcher Weise die Leber das aufgenommene Cholesterin verstoffwechselt und ob ein HDL-vermittelter RCT ein potentieller Mechanismus für das geringere Auftreten von Atherosklerose nach Aktivierung des BAT darstellen könnte.

5 Fragestellung

Eine Adipositas-Erkrankung ist mit der Entwicklung einer Vielzahl von Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. der Insulinresistenz oder Atherosklerose assoziiert (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2006). Eine häufige Ursache für die Störung des Gleichgewichtes aus Energiespeicherung und -freisetzung ist ein Überangebot an Nahrung sowie gleichzeitiger Bewegungsmangel. Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität von BAT und der Möglichkeit des *browning* von WAT-Depots wird gegenwärtig untersucht, ob die Aktivierung von braunen und beigen Adipocytten eine Option zur Behandlung von metabolischen Erkrankungen darstellen könnte. Zu den grundlegenden Aufgaben des BAT gehört die zitterfreie Thermogenese (Cannon und Nedergaard 2004). Der in Folge einer Aktivierung des BAT einsetzende, stark gesteigerte Energieumsatz führt zu einem Anstieg des Katabolismus von Glukose und Triglyzeriden (Bartelt, Bruns et al. 2011; Stanford, Middelbeek et al. 2013). In murinen Studien konnte durch Erhöhung der BAT-Aktivität unter anderem eine Aufhebung der Insulinresistenz gezeigt werden (Stanford, Middelbeek et al. 2013). In einer kürzlich publizierten Studien mit hyperlipidämischen E3L.CETP konnten Berbee, Boon et al. (2015) demonstrieren, dass die BAT-Aktivierung durch verstärkte hepatische Aufnahme von CR die Entwicklung von Atherosklerose minimiert. Nicht bekannt in diesem Kontext ist jedoch, in welcher Weise die Leber das mit den Lipoproteinen aufgenommene Cholesterin metabolisiert und ob der HDL-vermittelte Transport am beschleunigten Lipidflux beteiligt ist und somit das geringere Auftreten von Atherosklerose nach Aktivierung des BAT mitbegründet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte daher untersucht werden, inwieweit die Aktivierung von braunen und beigen Adipocytten den HDL-Metabolismus beeinflusst. Dazu sollten zunächst in verschiedenen Mausmodellen mit genetisch modifiziertem Lipoproteinstoffwechsel die Plasmalipidkonzentration und die korrespondierenden Lipoproteinprofile bestimmt werden. Weiterhin sollte die Lipidkomposition isolierter TRL und HDL, jedoch auch der Gewebe, mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode analysiert werden, um Rückschlüsse auf eine eventuell veränderte Funktionalität der HDL zu erhalten. Um den HDL-Umsatz und den HDL-vermittelten Transport von Cholesterin aus peripheren Makrophagen über die Leber in den Fäzes zu verfolgen, sollte ein *in vivo* HDL-Turnover-Assay sowie ein *in vivo* RCT-Assay nach Aktivierung des BAT durchgeführt werden. Um die Frage zu beantworten, ob die Aktivierung des BAT trotz erhöhter Aufnahme von cholesterinreicher Nahrung mit einer erhöhten hepatobiliären Elimination von potentiell cytotoxischem Cholesterin assoziiert ist, sollten einerseits in Chow-gefütterten und andererseits in Mäusen, welche eine Cholesterin-enhaltene Western-Typ-Diät erhielten die Genexpression und der Gehalt an Gallensäuren in der Leber und im Fäzes mittels einer HPLC-ESI-QqQ-basierten Methode gemessen werden. Ergänzend sollte die hepatobiliäre Ausscheidung von Cholesterin und Gallensäuren in verschiedenen Mausmodellen mit genetisch modifiziertem Lipoproteinstoffwechsel nach BAT-Aktivierung untersucht werden. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Studien zum

Cholesterinstoffwechsel im Zusammenhang mit der Aktivität des BAT beschrieben, so dass in dieser Arbeit die grundlegenden Prinzipien des systemischen Cholesterinstoffwechsels nach Aktivierung des braunen Fettgewebes untersucht werden sollten.

Teil B Material und Methoden

Eine tabellarische Auflistung aller im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien (Tabelle J - 1), Kits und Reagenzien (Tabelle J - 2), Lösungen und Puffer (Tabelle J - 3), Verbrauchsmaterialien (Tabelle J - 4), Arbeitsgeräte (Tabelle J - 5) und Software (Tabelle J - 6) befindet sich im Anhang (Teil J, 1).

1 Mausmodelle, Diäten und Interventionen

1.1 Mausmodelle und Tierhaltung

Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Stadt Hamburg durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Studien mit männlichen Tieren im Alter von 12-14 Wochen durchgeführt. Die Tiere wurden unter einem 12 h-Tag/Nacht-Zyklus in Einzelkäfigen gehalten.

Die durchgeführten Studien erfolgten in folgenden Mauslinien:

- in C57BL/6J Wild-Typ-Mäusen,
- in FVB/N-Mäusen,
- in Mäusen mit einem adipocytenspezifischen Lpl-Knockout (aLKO) (*fabp4-Cre+ lpl*-geflochten Tieren generiert aus B6.129S4-Lpltm1Ijg/J und B6.Cg-Tg(Fabp4-cre)1Rev/J (Jackson Laboratory (<http://www.jax.org>)), (Bartelt, Weigelt et al. 2013),
- in *Scarb1*^{-/-}-Mäusen (Rigotti, Trigatti et al. 1997),
- in *Apoa5*^{-/-}-Mäusen (Pennacchio, Olivier et al. 2001),
- in E3L-Mäusen, die das humane CETP überexprimieren (*E3L.CETP*) (Westerterp, van der Hoogt et al. 2006),
- in *ApoE*^{-/-}-Mäusen (Piedrahita, Zhang et al. 1992)
- in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen (Ishibashi, Brown et al. 1993),
- in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen, die einen leberspezifischen *Lrp1*-Knockout tragen (LDLR-LRP1 KO) (Rohmann, Gotthardt et al. 1998),
- sowie in den entsprechenden „Littermate“-Kontrolltieren

Die verwendeten Mauslinien waren zu Beginn der Promotion bereits im Labor etabliert, sodass im Rahmen dieser Arbeit auf die Erstbeschreibung verwiesen wird.

Die Blut- sowie Organentnahme erfolgte nach vierstündigem Fasten der Tiere. Hierzu wurden die Mäuse mit einer lethalen Dosis (15 µL/g Maus Körpergewicht) aus Ketamin (10 mg/ml)/Xylazin (2 %) in 0,9% NaCl anästhesiert. Zur Plasmagewinnung wurde das Blut

transkardial mit Spritzen, die 5 µl 0,5 M EDTA enthielten, entnommen. Anschließend wurde mit 5 ml eiskaltem PBS (angereichert mit 10 U/ml Heparin) perfundiert. Die präparierten Organe wurden umgehend entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in TRIzol® konserviert und im Anschluss bei -80°C bis zum weiteren Prozessieren gelagert.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

1.2 Diäten

Für die Studien erhielten die Tiere entweder eine Standard- 'Chow'- Diät (Lasvendi, Rod16-R) oder eine Western Type-Diät (WTD, Gesamtfettgehalt: 21 %, Cholesteringehalt: 0,2 % , ssniff EF R/M acc. TD88137 mod.) über einen Zeitraum von 11 Tagen oder vier Wochen. Der Beginn anderer Interventionen (z. B. die Aktivierung des braunen Fettgewebes) erfolgte nach viertägiger Adaption an das Futter. Soweit nicht anders erwähnt, hatten die Tiere *ad libitum* Verfügbarkeit zu Wasser und Futter.

1.3 Aktivierung des braunen Fettgewebes

1.3.1 Kälteexposition

Um das braune Fettgewebe durch Kälte zu aktivieren, wurden die Mäuse bei 6 °C in Einzelkäfigen gehalten. Die Haltung einer respektiven Kontrollgruppe erfolgte bei 27 °C.

1.3.2 Pharmakologische Aktivierung

Die Aktivierung des braunen Fettgewebes über pharmakologische Agenzien erfolgte durch tägliche subkutane Injektion des β_3 -adrenergen Agonisten CL316,243 (CL, 0,2 mg/ml in 0,9 w/v % NaCl, 1 µg/g Körpergewicht) über einen Zeitraum von 7 Tagen (chronic CL). Eine jeweilige Kontrollgruppe (bezeichnet als 'Mock') erhielt ein entsprechendes Volumen an 0,9 w/v % NaCl. Um eine akute β_3 -adrenerge Stimulation zu induzieren, erhielten die Gruppen mit der Bezeichnung 'acute CL' oder 'chronic CL + acute CL' am Tag 8 eine einmalige (acute CL) beziehungsweise zusätzliche (chronic CL + acute CL) Injektion vier Stunden vor der Organentnahme.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

1.4 Pharmakologische Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR)

Zur Aktivierung des FXR wurden C57BL/6J-Tiere, die für eine Woche der Kälte exponiert waren und eine WTD erhielten, mit dem FXR-Agonisten PX21228 (PX, Stammlösung 40 mg/ml in DMSO) behandelt. Die Gabe erfolgte nach zweistündigem Fasten am Tag 6, 7 und 8 vor der Organentnahme durch Verabreichung von 100 µl einer oralen Gavage, die sich aus 5 µL der Stammlösung und 95 µl Olivenöl zusammensetzte. Mock-behandelte Tiere erhielten eine Gavage bestehend aus 5 µl DMSO und 95 µl Olivenöl.

Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien:

vergl. Tabellen J - 1 und J - 4

2 Plasma-Analyse

2.1 Gewinnung von Plasma

Für die Gewinnung des Plasmas aus Vollblut erfolgte die Blutentnahme wie unter Teil B, Punkt 1.1 beschrieben. Nach der Überführung des Blutes in ein 6 °C kaltes Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Nach der erfolgten Trennung in Plasma und zelluläre Bestandteile wurde ersteres in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt für weitere Analysen herangezogen oder bei -80 °C gelagert.

Verwendete Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:

vergl. Tabellen J - 4 bis J - 5

2.2 Cholesterin- und Triglyzeridbestimmung im Plasma

Die Bestimmung der Konzentration an Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma erfolgte enzymatisch mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren Kits (Cholesterol CHOD-PAP, Triglycerides GPO-PAP). Precipath diente als Referenz für die Konzentration an Cholesterin und Triglyzeriden. Zur Messung wurden je 100 µL der zuvor mit PBS verdünnten Plasmaprobe bzw. der Referenz mit 200 µL Reaktionslösung zur Cholesterin- oder Triglyzeridbestimmung in einer Mikrotiterplatte versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des entstandenen Reaktionsproduktes photometrisch bei 540 nm gemessen. Die Lipidkonzentration wurde über lineare Regression aus den verschiedenen Verdünnungen der Standardreihe berechnet.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

2.3 Lipoproteinprofiling

Die Messung der Cholesterin – und Triglyzeridkonzentration in unterschiedlichen Lipoproteinpartikeln erfolgte nach chromatographischer Auftrennung von je 200 µl Plasma über *fast-performance liquid chromatography* (FPLC) auf einer Superose™ 6 10/300 GL Säule bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden 40 Fraktionen à 0,5 ml gesammelt, in denen im Anschluss, wie unter Teil B, Punkt 2.2 beschrieben, die Konzentration an Cholesterin und Triglyzeriden bestimmt wurde. Zur weiteren Analyse wurden je 350 µl folgender FPLC-Fraktionen vereint und umgehend bei -80 °C gelagert:

TRL: Fraktionen 4-6

HDL: Fraktionen 17-20

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

3 Bestimmung des Gesamtlipidgehaltes in Lebergewebe

Circa 100 mg gefrorenes Lebergewebe wurden in Lysis-Puffer (10 µl/mg) mit Hilfe einer Kugelmühle homogenisiert. Die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes erfolgte aus einer Verdünnung (1/50 mit PBS), wie unter Teil B, Punkt 2.2 beschrieben.

Zur Analyse des Cholesteringehaltes wurden zunächst 50 µl des Leberextraktes mit 1 ml einer Lösung aus Chloroform/Methanol, 8/5, v/v versetzt und anschließend gut homogenisiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13000 g wurden 200 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 80 °C bis zur Trockene eingengt. Der verbleibende Lipidfilm wurde in 200 µl PBS resuspendiert und für 20 min bei 50 °C und 600 rpm homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden 50 µl des Homogenisats bzw. eines Standards (Precipath in unterschiedlichen Verdünnungen) mit 50 µl Reaktionsgemisch (AmplexRed: 1/67, Horseradish Peroxidase: 1/100, Cholesteroxidase: 1/100, Cholesterolesterase: 1/1000 in PBS) versetzt. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emission von 570 nm gemessen.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt in der jeweiligen Leber normiert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Lowry durchgeführt. Jeweils 10 µl der verdünnten Proben (1/25 mit PBS) und des Protein-Standards (BSA-Lösung in verschiedenen Verdünnungen) wurden mit jeweils 40 µl NaOH (0,1 M) und je 500 µl einer Lösung, bestehend aus Lowry A/Lowry B, 49/1, v/v in einer Mikrotiterplatte

versetzt, geschüttelt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von jeweils 50 µl Folin-Reagenz wurde erneut für 20-30 min im Dunkeln inkubiert und im Anschluss die Extinktion des entstandenen Colorants bei 750 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über lineare Regression berechnet.

4 Genexpressionsanalyse

Die Isolation sowie Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Lebergewebe, BAT, epiWAT oder ingWAT erfolgte aus der oberen Phase eines Chloroform-TRIZOL®-Gewebe-Homogenats unter Zuhilfenahme des NucleoSpin RNA II Kits.

Nach der Synthese von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) aus 1 µg RNA und 50 µl Reaktionslösung des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, wurde über das *TaqManAssay-on-Demand Primer Set* (Applied Biosystems) eine quantitative *real-time polymerase chain reaction* (qPCR) auf einem 7900HT Detektionssystem für folgende Gene durchgeführt:

<i>Abcb11</i> :	Mm00445168_m1	<i>Elovl3</i> :	Mm00468164_m1
<i>Abcg5</i> :	Mm00446249_m1	<i>Elovl5</i> :	Mm00506717_m1
<i>Abcg8</i> :	Mm00445970_m1	<i>Elovl6</i> :	Mm00851223_s1
<i>Acaca</i> :	Mm01304285_m1	<i>Fasn</i> :	Mm00662319_m1
<i>Baat</i> :	Mm00476075_m1	<i>Hmgcr</i> :	Mm01282499_m1
<i>Cyp27a1</i> :	Mm00470430_m1	<i>Mdr2</i> :	Mm00435630_m1
<i>Cyp7a1</i> :	Mm00484150_m1	<i>Nr0b2</i> :	Mm00442278_m1
<i>Cyp7b1</i> :	Mm00484157_m1	<i>Scd1</i> :	Mm00772290_m1
<i>Cyp8b1</i> :	Mm00501637_s1	<i>Slc10a1</i> :	Mm00441421_m1
<i>Dhcr24</i> :	Mm00519071_m1	<i>Slc1b2</i> :	Mm00451510_m1
<i>Elovl1</i> :	Mm00517077_m1		

Die Berechnung der Genexpression des jeweiligen, untersuchten Gens erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Luck, Tsai et al. 2015). Anschließend wurde die Kopienanzahl des jeweiligen, untersuchten Gens auf die des als *house keeper* fungierenden *TATA-box binding protein* (*Tbp*) *house keeper* normalisiert.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

5 GC-FID-Methode zur quantitativen Bestimmung von Fettsäuremethylestern

5.1 Extraktion und Derivatisierung

Gesamtlipidextrakte aus Lebergewebe, epiWAT, subWAT und BAT wurden gemäß der Methode von Folch (Folch, Lees et al. 1957) gewonnen. 50 mg Gewebe wurden mit 250 µl Butylhydroxytoluol (BHT, 0,1 M in Methanol) und 6 ml Chloroform/Methanol (2:1) versetzt und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach 30 minütiger Erhitzung der Proben auf 50 °C wurden diese zentrifugiert (1800 g, 15 min) und anschließend wurde der Überstand abgenommen.

Die Derivatisierung zu Fettsäuremethylestern erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lepage und Roy (1986). Dazu wurden 100 µL des jeweiligen Gewebeextraktes mit 2 ml Methanol/Toluol (4:1), 50 µl Heptadecansäure als interner Standard (IS_FA17:0) und 200 µl Acetylchlorid versetzt und für 1 Stunde bei 100 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 5 ml 6%-iger Na₂CO₃-Lösung neutralisiert und anschließend zentrifugiert (1800 g, 15 min). Circa 150 µl der oberen Phase wurden in ein Glasvial überführt.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:
vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

5.2 Gaschromatographische Analyse

Die gaschromatographische Trennung (Stationary phase: DB-225 30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm; Agilent) wurde an einem HP 5890 Gaschromatograph (GC) (Hewlett Packard) durchgeführt, der mit einem *flame ionization detector* (FID) ausgestattet war. Die Temperatur des Injektors betrug 260 °C, die des Detektors 300 °C. Das Temperaturprogramm der Messung startete mit 90 °C. Nach 1,5 min wurde die Temperatur 1,1 °C/min auf 220 °C erhöht und letztendlich 2,26 min konstant bei 220 °C gehalten. Zwischen den einzelnen Injektionen der Proben wurde die Säule für mind. 20 min bei 220 °C ausgeheizt.

Verwendete Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:
vergl. Tabellen J - 4 bis J - 5

5.3 Auswertung

Signalidentifikation und -quantifizierung erfolgte über externe Referenzsubstanzen (*Marine oil fatty acid methyl ester mix*, Restek) und den internen Standard.

6 UPLC-ESI-QqTOF-Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Hauptlipidklassen

6.1 Extraktion

6.1.1 Isolierte Fraktionen von Lipoproteinen

Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bligh and Dyer (Bligh und Dyer 1959) in 10 ml-Schraubdeckelglasröhren mit Teflon beschichteten Deckeln, die zuvor zweimalig mit Aceton gespült wurden.

320 µl der jeweiligen FPLC-Fraktionen (Teil B, 2.3) wurden mit 1000 µl BHT-haltigem Methanol, 50 µl einer 1/10-Verdünnung des internen Standards 1 (IS1) (Tabelle J - 3) und 700 µL Chloroform versetzt und für 30 sec auf einem Vortex-Schüttler homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 1100 µl Chloroform und 900 µl Wasser (MS-gradient-grade) und erneuter Homogenisation, wurden die Proben bei 6 °C für 15 min bei 3.000 g zentrifugiert.

Anschließend wurden 1600 µl der unteren organischen Phase in ein neues Schraubdeckelglasrohr überführt und die Lösung in einer Vakuum-Zentrifuge bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 80 µl Eluent B (Tabelle B - 3) resuspendiert und in ein Glasvial mit Teflon-beschichteter Bördekkappe überführt und bei -80 °C bis zur Messung gelagert.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:

vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

6.1.2 Gewebe

Die Extraktion von Gewebe erfolgte in Anlehnung an die Methode von Folch (Folch, Lees et al. 1957).

Mit Hilfe eines chirurgischen Skalpell wurde das zu untersuchende Gewebe (Teil B, 1.1) auf Trockeneis in kleine Stücke zerschnitten und genau (± 0.00005 g) in ein zuvor mit einer Metallkugel bestücktes 2,0 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingewogen. Extraktionsmittel sowie IS1 (Tabelle J - 3) wurde in den aus Tabelle B - 1 und Tabelle B - 2 zu entnehmenden Verhältnissen hinzugefügt. Zur Analytik der unpolaren Lipide wurde eine Folch-Lösung, welche mit BHT angereichert war (FolchBHT), als Extraktionsmittel herangezogen, zur Analytik der mäßig unpolaren Lipide Methanol, welches ebenfalls mit BHT angereichert war (MeOHBHT).

Tabelle B - 1: Angaben zur Extraktion von Gewebe mit FolchBHT

	FolchBHT/ mg Gewebe (μ L)	IS1/ mg Gewebe (μ L)	Minimale Einwaage an Gewebe (mg)	Maximale Einwaage an Gewebe (mg)
BAT	50	10	15	34
epiWAT	60	12	15	28
ingWAT	60	12	15	28
Liver	20	2	20	85

Tabelle B - 2: Angaben zur Extraktion von Gewebe mit MeOHBHT

	MeOHBHT/ mg Gewebe (μ L)	IS1/ mg Gewebe (μ L)	Minimale Einwaage an Gewebe (mg)	Maximale Einwaage an Gewebe (mg)
BAT	20	0,40	15	85
epiWAT	7	0,14	20	242
ingWAT	7	0,14	20	242
Liver	30	0,60	20	56

Es folgte ein Homogenisationsschritt im Tissue Lyser bei 20 s^{-1} für mind. 2 min. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13.000 g wurde der Überstand in ein Glasvial überführt. Vor der Messung wurden die Extrakte je nach zu erwartender Konzentration mit Eluent B (Tabelle B - 3) verdünnt.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:
vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

6.2 UPLC-MS Analyse

Die apparative Analytik erfolgte auf einer Dionex3000 UPLC (*ultra high-performance liquid chromatography*), welche mit einem ESI-UHR-QqTOF (*electro spray-ultra high resolution- quadrupole-quadrupole-time-of-flight*) maXis3G Massenspektrometer gekoppelt war. Die Daten wurden im *high-resolution, full scan*-Modus mit *collisional induced dissociation fragmentation* (CID) akquiriert.

Nachfolgend sind die Geräteparameter (Tabelle B - 3) sowie der Laufmittelgradient (Tabelle B - 4) der Methode zusammengefasst.

Tabelle B - 3: Geräteparameter der LC-Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Majorlipidklassen

Parameter der Pumpe	
Dauer:	25 min
Mobile Phase:	A: Wasser, 5 mM Ammoniumacetat B: MeOH/IPA, 4/6, v/v, 5 mM Ammoniumacetat
Gradient und Fließgeschwindigkeit:	s. Tabelle B - 4
Parameter des Autosamplers	
Injektionsvolumen:	5 µL
Temperatur des Autosamplers:	6 °C
Parameter des Säulenofens	
Säule:	Kinetex C18, Phenomenex (150 x 2.1 mm; 1.7 µm)
Temperatur des Säulenofens:	55 °C
Parameter des Massenspektrometers	
Modus:	Full scan
Massenbereich:	60 – 1000 m/z
Spectra rate:	3 x 3,5 Hz
Rolling average:	off
Ionisationsmodus:	je nach Zielsetzung: positiv oder negativ
Segmente:	3 <i>Segment 1: 24,65 min, divert valve to source, not marked as calibration segment</i> <i>Segment 2: 0,25 min, divert valve to waste, marked as calibration segment (for external calibration with ESI-L tuning mix running via syringe pump at 20 µL/h)</i> <i>Segment 3: 0,10 min, divert valve to source, not marked as calibration segment</i>
Ionenquelle:	Typ: ESI End plate offset: -500 V Capillary: -4500 V Nebulizer: 2,0 bar Dry gas: 8,0 ml/min Dry temperature: 190 °C
Kalibration (Vor jedem batch):	TOF calibration mode: Version 1.0 Reference list: ESI-L tuning mix Zooming: 1,0 %; 0,1 % MS/MS: off Rolling average: on Calibration mode: Enhanced quadratic
Transfer:	Funnel RF: 300 Vpp ISCID: off Multipole RF: 250 Vpp

Tabelle B - 3: Geräteparameter der LC-Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Majorlipidklassen

Quadrupole	Ion energy:	4,0 eV
	Low mass:	140 <i>m/z</i>
Collision Cell	Collision energy:	8 eV
	Collision RF:	1500 Vpp
Ion Cooler	Transfer time:	65 µs
	Ion cooler RF:	60 Vpp
	Pre puls storage:	10 µs
MS/MS	MS/MS (Auto):	on
	Precursor Ions:	5
	Threshold:	3000 cts
	Smart exclusion:	Active 5 x
	Active exclusion:	active, exclude after 3 spectra, release after 0,20 min
	Precursor ion list:	exclude (lockmass: 621,5000 – 623,0000 <i>m/z</i>)
	Fragmentation:	isol. mass: 100 <i>m/z</i> coll. energy 14,0 isol. mass: 500 <i>m/z</i> coll. energy 30,0 isol. mass: 1000 <i>m/z</i> coll. energy 35,0
Software		
Chromeleon®, 6.80		
Hystar 3.2		
MicrOTOF Control SR2		
DataAnalysis 4.0		
TargetAnalysis 1.3		

MeOH = Methanol
IPA = Isopropanol

Tabelle B - 4: Laufmittelgradient der LC-Methode zur semi-quantitativen Bestimmung der Majorlipidklassen

Zeit (min)	F (µL/min)	A (%)	B (%)
0	300	20	80
2	300	13	87
8	300	13	87
10	300	5	95
20	300	1	99
21	300	1	99
22	300	20	80
25	300	20	80

F = Flussrate
A = Anteil an Elutionsmittel A
B = Anteil an Elutionsmittel B

Verwendete Verbrauchsmaterialien sowie Geräte und Software:
vergl. Tabellen J - 4 bis J - 6

6.3 Auswertung

Die aquirierten UPLC-MS-Daten wurden mit der von Bruker bezogenen Software DataAnalysis 4.0 und TargetAnalysis 1.3 ausgewertet.

Die erhaltenen Spektren wurden einerseits extern mittels des ESI-L-Tuning-Mix (Zufuhr über Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 20 $\mu\text{l/h}$) und andererseits intern über die Lockmasse Hexakis(1H, 1H, 2H-perfluoroethoxy)phosphazene kalibriert.

Einzelne Lipidspezies in den Proben wurden über Referenzsubstanzen, MS/MS-Spektren und die Datenbank des Lipidmaps-Konsortium identifiziert.

Vorausgesetzt dass die Integrale der identifizierten Peaks innerhalb des Bereichs, der aus dem IS1 angefertigten Kalibriergeraden waren, wurde die endgültige Konzentration in den zu untersuchenden Proben anhand des zu den Proben zugesetzten IS1 ausgerechnet.

7 HPLC-ESI-QqQ-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten

7.1 Extraktion

Die Extraktion der Sterol-Derivate erfolgte über Flüssig-Flüssig-Extraktion. Dazu wurden 50-100 mg gefrorenes Gewebe oder lyophilisierter Fäzes genau (± 0.00005 g) eingewogen und mit 10 μL einer Lösung aus diversen internen Standards 2 (IS2) (100 μM d4-GCDCA, 100 μM d6- 25-OH-Cholesterin und 1000 μM d7-Cholesterin in Methanol/Chloroform, 1/2, v/v) sowie 1 ml Methanol versetzt und anschließend in einer Kugelmühle homogenisiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13.000 g wurde der Überstand über einen Membranfilter (Chromafil O- 20/3, PTFE, Pore \varnothing 0,2 μm , Filter 3 mm) aufgereinigt und unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 100 μl Eluent B (Tabelle B - 5) rekonstituiert.

Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte:
vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

7.2 HPLC-MS Analyse

Die apparative Analytik erfolgte auf einem Agilent 1200 Infinity Quaternary *liquid chromatography* (LC)-System, welches QqQ-MS (Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer) API 4000 Q trap gekoppelt war.

Nachfolgend sind die Geräteparameter (Tabelle B - 5) sowie der Laufmittelgradient (Tabelle B - 6) der Methode zusammengefasst. Die Massenübergänge sowie die jeweiligen, dazugehörigen eingestellten Potentiale sind der im Verlauf der Arbeit entstandenen Publikation zu entnehmen (John, Werner et al. 2014).

Um ausreichende Empfindlichkeit zu erzielen sowie gleichzeitig den jeweiligen Analyten die beanspruchte Anzahl an 10-20 Datenpunkten (Shungin, Winkler et al. 2015) einzuräumen, wurde die MRM-Methode in drei Perioden eingeteilt. Die Gesamtdauer der jeweiligen Periode betrug:

- Periode 1: 5 min
- Periode 2: 10 min
- Periode 3: 15 min

Tabelle B - 5: Geräteparameter der LC-QqQ-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten

Parameter der Pumpe		
Dauer:	66 min	
Mobile Phase:	A:	Wasser, 5 mM Ammoniumacetat, 0,1 % Ameisensäure
	B:	Methanol, 5 mM Ammoniumacetat, 0,1 % Ameisensäure
Gradient und Fließgeschwindigkeit:	vergl. Tabelle B - 6	
Parameter des Autosamplers		
Injektionsvolumen:	5 µL	
Temperatur des Autosamplers:	6 °C	
Parameter des Säulenofens		
Säule:	Accucore™ Polar Premium HPLC Column, Thermo Fisher Scientific (150 x 2,1 mm, 2,6 µm, Porengröße: 140 Å)	
Temperatur des Säulenofens:	20 °C	
Parameter des Massenspektrometers		
Ionenquelle:	Typ:	ESI
	Ionisierungsmodus:	positiv
	Ion Spray Voltage:	4500 V
	Curtain Gas:	30 psi
	Ion Source Heater:	550 °C
	Ion Source Gas 1:	40 psi
	Ion Source Gas 2:	50 psi
	Interface Heater:	on
Modus:	MRM (<i>multiple reaction monitoring</i>)	
Massenübergänge:	siehe (John, Werner et al. 2014)	

Tabelle B - 5: Geräteparameter der LC-QqQ-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten

Software
Analyst 1.6.1.

Tabelle B - 6: Laufmittelgradient der LC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten

Zeit (min)	F (µl/min)	A (%)	B (%)
0	300	40	60
2	300	40	60
20	300	0	100
50	300	0	100
53	300	40	60
66	300	40	60

F = Flussrate
A = Anteil an Elutionsmittel A
B = Anteil an Elutionsmittel B

Verwendete Verbrauchsmaterialien sowie Geräte und Software:

vergl. Tabellen J - 4 bis J - 6

7.3 Auswertung

Die Peak-Identifizierung erfolgte über den jeweiligen, spezifischen Massenübergang sowie durch den Vergleich der Retentionszeit mit der einer Standardverbindung.

Die Berechnung der Analyt-Konzentration in der zu untersuchenden Probe erfolgte anhand einer Neun-Punkt-Kalibrierkurve aus allen untersuchten Referenzsubstanzen (John, Werner et al. 2014). Jeder Punkt der Kalibriergerade enthielt zusätzlich die IS2 in folgenden Konzentrationen: 10 µM d4-GCDCA, 10 µM d6-25-OH-Cholesterin und 100 µM d7-Cholesterin. Zur Quantifizierung der Gallensäuren und Steroidhormone basierte die Berechnung auf d4-GCDCA, für 7-, 22-S-, 24-S-, 25- und 27-OH-Cholesterin auf d6-25-OH-Cholesterin, wohingegen für Cholesterin, Desmosterol, Stigmasterol und Sitosterol d7-Cholesterin als Korrektur diente.

8 D₂O-Fluxomics

Zur Abbildung der DNL in BAT aktivierten- und Kontrollmäusen wurde die Inkorporation von Deuterium in neu synthetisierte Triglyzeride über einen definierten Zeitraum bestimmt. Hierzu erhielten die Mäuse 100 Stunden vor Organentnahme eine einmalige intraperitoneale

Injektion an D₂O (20 mL/kg of body weight, 99% ²H). Für den verbleibenden Teil der Studie wurde das Trinkwasser mit 5% D₂O angereichert (Castro-Perez 2011). Die Blut- und Organentnahme wurde wie oben beschrieben (Teil B, 1.1) durchgeführt.

In den Organen und isolierten Lipoproteinpartikeln (Teil B, 2.3) wurde die oben erläuterte UPLC-ESI-QqTOF-Analyse zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Majorlipidklassen (Teil B, 6) durchgeführt. Die Inkorporation von Deuterium in *de novo* synthetisierte Moleküle wurde durch die Bildung der Quotienten aus den Massen M1 und M0 zu einer bestimmten Zeit berechnet. Weiterhin wurde der erhaltene Wert um das natürlich vorkommende Verhältnis von M1/M0 der jeweilig zu der bestimmten Retentionszeit eluierenden Masse korrigiert (Anhang, Abbildung J - 4).

Die Überprüfung auf eine vergleichbare Anreicherung von ²H im Plasma-Wasser erfolgte über eine Headspace-basierte GC-MS-Analytik (Castro-Perez, Previs et al. 2011).

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

9 *In vivo* HDL-Turnover-Assay

Im ersten Schritt wurden murine HDL-Partikel (d = 1,063 – 1,21 g/ml) über sequentielle Ultrazentrifugation (Havel, Eder et al. 1955) aus Plasma von vierstündig gefasteten C57BL/6J-Mäusen isoliert.

Anschließend erfolgte eine Doppelmarkierung der aufgereinigten HDL einerseits mit ¹²⁵I-Tyramin Cellulose (¹²⁵I-TC) im Apolipoproteinanteil und andererseits mit ³H-Cholesterinether (³H-CEt) im lipophilen Anteil des HDL-Partikels (Pittman und Taylor 1986; Brundert, Ewert et al. 2005). Dabei wurde das ³H-CEt aus Liposomen-Donor-Partikeln katalysiert durch humanes CETP (Morton und Zilvermit 1983) in ¹²⁵I-TC-HDL eingebracht. Die generierten ¹²⁵I-TC-³HCEt-HDL wurden gegen PBS (pH 7.4, 4°C), welches mit EDTA (1 mM) angereichert war dialysiert.

Zur Untersuchung des HDL-Turnovers *in vivo*, d.h. der Abnahme an radioaktivem HDL oder deren Bestandteile im Plasma und der damit verbundenen Anreicherung in den verschiedenen Geweben, wurden die entsprechenden Gruppen an Tieren vier Stunden vor der intravenösen Injektion mit ¹²⁵I-TC-³H-CEt-HDL (30 µg HDL protein per mouse) gefastet (Glass, Pittman et al. 1985). 10 und 30 min, sowie 1 und 2 Stunden nach der Injektion erfolgte eine Blutentnahme über Punktation der Schwanzvene. Die Organentnahme erfolgte nach 2 Stunden wie unter Teil B, 1.1 beschrieben.

Zur Quantifizierung der ¹²⁵I-Radioaktivität wurden Aliquote von Plasma und Geweben direkt am γ -Szintillationscounter gemessen. Für die Bestimmung der ³H-Radioaktivität erfolgte zunächst eine Lipidextraktion nach Dole (Dole 1956). Dazu wurden 50 µl Plasma oder max.

267 mg Gewebe genau eingewogen, mit 667 μ l PBS sowie 3333 μ l einer Lösung aus 78 % Isopropanol, 20 % Heptan und 2 % Schwefelsäure (0,5 M) versetzt und mit Hilfe eines Ultra-Turrax homogenisiert. Nach 10 minütiger Inkubation wurde 1 ml der oberen Phase des Lipidextraktes mit 5 ml Szintillationslösung versetzt und die Lösung am β -Szintillationscounter gemessen.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

10 *In vivo* reverser Cholesterintransport-Assay

Die Untersuchung des RCT *in vivo* erfolgte nach der von Dan Rader und Kollegen entwickelten Methode (Zhang, Zanotti et al. 2003).

Für die Präparation peritonealer Makrophagen wurden im ersten Schritt C57BL/6J-Mäusen 2 ml Thioglycolat-Medium intraperitoneal injiziert um die Rekrutierung von Makrophagen zu induzieren. Nach vier Tagen wurden die Makrophagen durch Waschen des Bauchraumes mit 5 ml 37 °C warmer DMEM-Lösung isoliert (Zhang, Goncalves et al. 2008).

Zur Aufreinigung der Makrophagen wurde die erhaltene DMEM-Waschlösung für 10 min bei 700 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um isolierte Erythrozyten zu entfernen wurde das erhaltene Pellet für 3 min mit Erythrozyten-Lysis-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut für 10 min bei 700 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die so isolierten und aufgereinigten Makrophagen wurden in T75-Zellkulturflaschen ausgesät (Dichte: $7,5 \times 10^6$ Zellen/Flasche). Die radioaktive Markierung der Makrophagen mit ^3H -Cholesterin erfolgte *ex vivo* durch 24-stündige Inkubation mit ^3H -Cholesterin (100 kBq pro Maus) und acetyliertem LDL (200 μ g/ml) in 12 ml DMEM (1 % FCS). Anschließend wurde der radioaktive Überstand abgenommen und die Makrophagen mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen.

Im letzten Schritt wurden ca. 1×10^6 der mit radioaktivem Cholesterin markierten Makrophagen intraperitoneal in Mäuse mit aktiviertem BAT sowie Kontrollmäuse injiziert. Die Injektion erfolgte mit Hilfe von 0,55 x 25 mm 24 G x 1" Gr. 17 Kanülen (Braun) um Scherkräfte zu vermeiden. Nach 48 h, in denen die Tiere in speziellen Käfigen gehalten wurden, die den Kontakt der Maus mit dem Fäzes unterbinden, erfolgte die Organ- und Blutentnahme (Teil B, 1.1). Die ^3H -Radioaktivität im Fäzes, den Organen und im Plasma wurde, wie unter Teil B, Punkt 9, erläutert nach Extraktion am β -Szintillationscounter gemessen.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

11 Kombination aus oralem Glukose-Toleranz-Test und *in vivo* Glukose-Organaufnahme

Die Durchführung des oralen Glukose-Toleranz-Tests (oGTT) erfolgte in WTD-gefütterten C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C) sowie in Kontrolltieren (27 °C) am Tag 7 nach Studienbeginn. Nach 4 stündigem Fasten erhielten die Tiere eine orale Glukose-Gavage (1mg Glukose/g Körpergewicht angereichert mit 0,62 kBq 2-Deoxy-D-¹⁴C-glukose/g Körpergewicht in 0,9 %iger Kochsalzlösung). Die Blutglukosekonzentration wurde 0 min, 15 min, 30 min und 60 min nach Gavage mit AccuCheck Aviva Sticks gemessen. 60 min nach Gavage erfolgte die Organentnahme (Teil B, 1.1).

Die Messung der Radioaktivität in Organen erfolgte nach der Lyse einer genau abgewogenen Menge Gewebe in Solvable-Lösung (0,1 ml/10 mg Organ) bei 60 °C für 12 Stunden. Anschließend wurde das Lysat mit Szintillationslösung (1/5, v/v) versetzt und die Lösung am β -Szintillationscounter gemessen.

Verwendete Chemikalien, Lösungen, Puffer, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien sowie Geräte: vergl. Tabellen J - 1 bis J - 5

12 Humane Plasma-Proben

Alle Proben wurden nach Unterschrift einer Einverständniserklärung der Patienten entnommen. Das Studien-Protokoll wurde durch den Prüfungsausschuss des *Maastricht University Medical Centre* zugelassen. Die untersuchten Blutproben stammten von zehn schlanken (BMI: 20,8 - 24,8 kg/m²) und 10 adipösen (BMI: 28,6 - 40,8 kg/m²) Probanden. Die Blutentnahme erfolgte nach Akklimatisierung der Probanden für 36 Stunden bei 22 °C (Kontrolle) und, zur Aktivierung des BAT, nach 48 Stunden bei 16 °C (kalt) (Wijers, Saris et al. 2010).

Die Messung der Lipidzusammensetzung in isolierten HDL (Durchführung s. Teil B, 2.3) erfolgte mittels der UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode (Teil B, 6).

Die durchgeführten Analysen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn van Marken Lichtenbelt.

13 Statistik

Die Überprüfung auf statistische Signifikanz wurde je nach Fragestellung und Experiment mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's T-Tests* oder einer *two-way ANOVA* mit *Tukey-Post-hoc-Test* durchgeführt. Bei $P < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

Teil C Ergebnisse

1 Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf die intravaskuläre Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen

Zu den grundlegenden Aufgaben des BAT gehört die zitterfreie Thermogenese, um den Organismus kleiner Säugetiere vor Hypothermie zu bewahren (Cannon und Nedergaard 2004). Der infolge einer Aktivierung des BAT einsetzende, stark gesteigerte Energieumsatz führt zu einem Anstieg des Katabolismus von Glukose und Triglyzeriden (Cannon und Nedergaard 2004; Bartelt, Bruns et al. 2011). In murinen Studien konnte durch Induktion der BAT-Aktivität unter anderem eine Aufhebung der peripheren Insulinresistenz sowie eine Reduktion von Atherosklerose gezeigt werden (Stanford, Middelbeek et al. 2013; Berbee, Boon et al. 2015). Weiterhin ist bekannt, dass durch Kälte aktiviertes BAT zu einem gesteigerten Umsatz von TRL führt (Bartelt, Bruns et al. 2011).

Zum Anfang des 21. Jahrhunderts wurde die Präsenz von aktivierbarem BAT auch im erwachsenen Menschen nachgewiesen (Cypess, Lehman et al. 2009; Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhommerig et al. 2009; Virtanen, Lidell et al. 2009; Nedergaard und Cannon 2010). Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität des BAT wird dessen Aktivierung derzeit als therapeutischer Ansatz zur Behandlung metabolischer Krankheiten auch im Menschen diskutiert und evaluiert (Nedergaard und Cannon 2010).

Zu einem der prominentesten Risikofaktoren für Atherosklerose im Menschen zählt eine Störung der Homöostase im vaskulären Lipidmetabolismus und insbesondere das Auftreten hoher LDL-Cholesterinwerte bei gleichzeitiger, niedriger Konzentration an HDL-Cholesterin (Lewington, Whitlock et al. 2007; Ference, Yoo et al. 2012). Der Lipidmetabolismus im Plasma beinhaltet dabei den Metabolismus von cholesterinreichen Lipoproteinen: Diese werden im Rahmen des endogenen sowie exogenen Lipidstoffwechsels (Teil A, 2) unter anderem durch die Aktion der LPL aus TRL gebildet. Bisläng ungeklärt in diesem Zusammenhang ist jedoch die Beeinflussung des HDL-Metabolismus nach Aktivierung des braunen Fettgewebes. Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten gilt der Fokus des folgenden Abschnittes der Untersuchung der intravaskulären Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen nach Aktivierung des BAT.

1.1 Bestimmung der TRL- und HDL-Lipidkomposition in hypertriglyzeridämischen *Apoa5*^{-/-}-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Störungen des Lipoproteinmetabolismus können unter anderem durch sozio-kulturelle Faktoren jedoch auch durch genetische Faktoren begründet sein. Ein Modell für eine genetische Störung des Lipoproteinstoffwechsels sind Mäuse mit einer *ApoA5*-Defizienz und einer daraus resultierenden Störung des Stoffwechsels von TRL und damit einhergehenden Akkumulation von Plasma-Triglyzeriden (Pennacchio, Olivier et al. 2001; Grosskopf, Baroukh et al. 2005).

Bereits bekannt in diesem Zusammenhang ist, dass eine kurzzeitige Aktivierung des BAT durch Kälte (4 h oder 24 h bei 6 °C) zu einer starken Linderung der Hypertriglyzeridämie in *Apoa5*^{-/-}-Mäusen führt (Bartelt, Bruns et al. 2011). Im Folgenden sollte zunächst untersucht werden, ob auch durch die Behandlung mit dem für den β_3 -adrenergen Rezeptor selektiven Agonisten vergleichbare Effekte erzielt werden. Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Lipidzusammensetzungen mit pathologischen Lipoproteinen in Verbindung gebracht werden und dass diverse spezifische Lipide zudem als Signalmoleküle bekannt sind, sollte weiterhin eine Analyse der Lipidkomposition der Lipoproteine erfolgen.

Die Aktivierung von braunem und beigem Fett von *Apoa5*^{-/-}-Mäusen (n = 4) erfolgte einerseits durch einwöchige Adaption an 6 °C und andererseits durch tägliche subkutane Injektion von CL über eine Woche. Als Kontrolle dienten bei 27 °C gehaltene Mäuse, welche eine tägliche Injektion physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) erhielten.

1.1.1 Analyse der Plasmalipidkonzentration und Lipoproteinprofile

Die Analyse der Konzentration an Plasmatriglyzeriden (Teil B, 2.2) zeigte, dass sowohl eine Aktivierung des BAT durch Kälte als auch durch CL zu einer ca. dreifachen Reduktion der Konzentration führte (Abbildung C - 1 a).

Wie bereits für die BAT-Aktivierung durch Kälte publiziert (Bartelt, Bruns et al. 2011), erfolgte, wie aus dem FPLC-Profil ersichtlich wird, auch durch die Gabe von CL eine Reduktion der Konzentration an TRL-Triglyzeriden (Abbildung C - 1 b).

Obwohl die Resultate zur Konzentration an Gesamtcholesterin im Plasma keine Änderungen zwischen den Gruppen präsentieren (Abbildung C - 1 c), ist nach Auftrennung der Lipoproteine eine signifikante Verschiebung von einer Reduktion des TRL-Cholesterin hin zu einem Anstieg an HDL-Cholesterin nach BAT-Aktivierung zu detektieren (Abbildung C - 1 d).

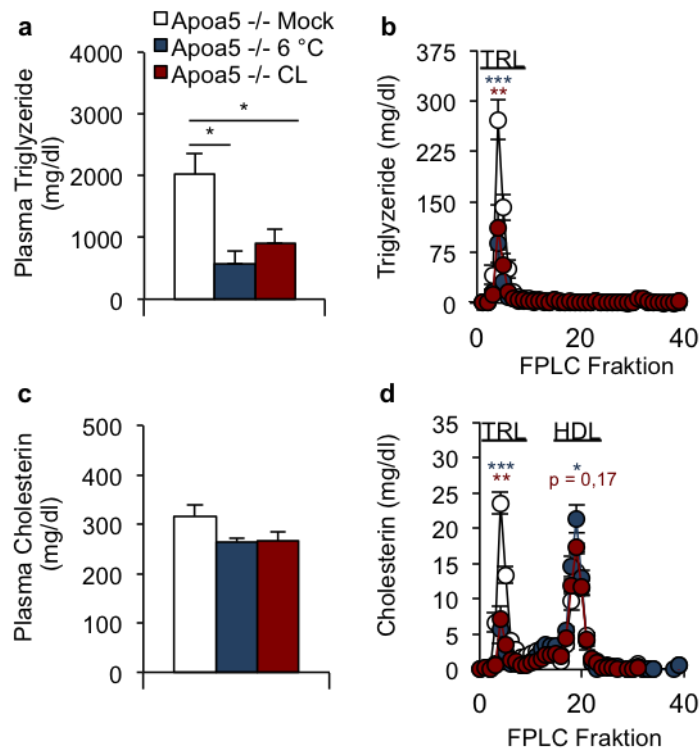


Abbildung C - 1: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von *ApoA5*^{-/-}-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL

(a) In Folge der Aktivierung des BAT führen sowohl einwöchige Adaption an die Kälte (6 °C) als auch eine CL316,243 (CL)-Behandlung zu signifikant niedrigeren Plasma Triglyzeridkonzentrationen im Vergleich zur Mock behandelten Gruppe. (b) Durch die Auftrennung der Lipoproteine über FPLC wird deutlich, dass die BAT-Aktivierung auch in den hyperlipämischen *ApoA5*^{-/-}-Mäusen in einer drastischen Reduktion von TRL resultiert. (c) Im Gegensatz dazu zeigen die Plasma Cholesterinwerte keine signifikanten Veränderungen. (d) Nach Messung der Cholesterinkonzentrationen in den aufgetrennten Lipoproteinpartikeln wird ersichtlich, dass dieses durch eine Verschiebung von TRL-Cholesterin hin zu erhöhten HDL-Cholesterinwerten nach Aktivierung des BAT begründet ist. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, n = 4; Futter: Chow; ****P* < 0,001; ***P* < 0,01; **P* < 0,05)

1.1.2 Lipidomanalyse isolierter Lipoproteine

Die semi-quantitative Bestimmung der Lipidklassen in durch FPLC isolierten TRL und HDL über eine UPLC-ESI-QqTOF-basierte Methode (Teil B, 6) von *ApoA5*^{-/-}-Mäusen spiegelte zunächst die für TRL und HDL typische Lipidklassenzusammensetzung in Mock behandelten Tieren wieder (Abbildung C - 2 a, b): Der Hauptanteil der Lipide fiel in den TRL auf die Lipidklasse der Triglyzeride (TG) mit 73 % gefolgt von den Phosphatidylcholinen (PC) mit ca. 22 %. In den HDL waren zu gleichen Anteilen mit ca. 45 % PC und Chloesterylester (CE) nachzuweisen. Nach Aktivierung des BAT über Kälte oder CL waren nur marginale Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung der Lipidklassen in den TRL (Abbildung C - 2 a) sowie den HDL (Abbildung C - 2 b) zu detektieren. So zeigte die Zusammensetzung der isolierten TRL einen leichten Anstieg am TG-Anteil, wobei sich der Anteil an PCs und CEs reduzierte. In den isolierten HDL waren nach Intervention keine Veränderungen in den Anteilen der Majorlipidklassen zu detektieren, jedoch führte die Aktivierung des BAT zu einer Reduktion an TGs und zu einem Anstieg im Sphingomyelin (SM)-Anteil.

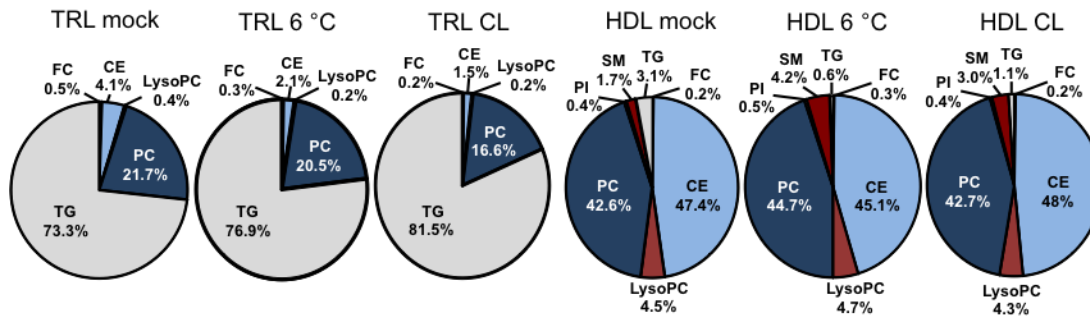


Abbildung C - 2: Lipidklassenverteilung in isolierten Lipoproteinpartikeln von *ApoA5*^{-/-}-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL

(a) In isolierten TRL sind in der Verteilung der Lipidklassen lediglich moderate Veränderungen im Vergleich zu den Mock behandelten Tieren nach einwöchiger Adaption an die Kälte (6 °C) oder Behandlung mit CL316,243 (CL) zu beobachten. (b) Dieses Resultat trifft auch für isolierte HDL zu. (TRL = triglyceride rich lipoprotein, HDL = high density lipoprotein, FC = freies Cholesterin, CE = Cholesterinester, LysoPC = Lyso-phosphatidylcholin, PC = Phosphatidylcholin, TG = Triglyzerid, n = 4; Futter: Chow; die Lipidklassenverteilung wurde mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode bestimmt)

Abgesehen dieser Resultate, konnte in den prozentualen Verteilungen der jeweiligen Lipidspezies innerhalb der einzelnen Lipidklassen gleichermaßen in TRL und HDL Veränderungen nachgewiesen werden (Abbildung C - 3). Dabei waren sowohl die durch Kälte-induzierten (Abbildung C - 3 a) als auch durch CL- induzierten (Abbildung C - 3 b) Änderungen der einzelnen Lipidspezies überwiegend vergleichbar.

Besonderem Interesse galten hierbei der veränderten Zusammensetzung der Triglyzerid-Fraktion der TRL: Hier deutete das Profil auf eine Umverteilung der TGs, von TGs verestert mit diätetischen Fettsäuren (z.B. C18:2 als Bestandteil von TG54:5) zu TGs, welche aus potentiell *de novo* synthetisierten Fettsäuren bestehen (z.B. C18:1 oder C16:1 als Bestandteil von TG52:3), hin. Auch in der Lipidklasse der PCs war der Trend hin zum Einbau von Fettsäuren mit Ursprung aus der *de novo* Lipogenese (DNL) nachweisbar (z.B. PC34:2 bestehend aus C16:1 und C18:1).

Daneben zeigte auch die durch BAT-Aktivierung veränderte prozentuale Zusammensetzung von TRL und HDL aus C57BL/6J-Mäusen zu den *ApoA5*^{-/-}-Tieren analoge Veränderungen (Anhang, Abbildung J - 1 und Teil C, Abbildung C - 5). Dies ist insbesondere unter dem Aspekt zu betonen, da in C57BL/6J-Mäusen die Konzentration an HDL-Cholesterin nach BAT-Aktivierung unverändert oder sogar reduziert ist (Abbildung C - 8 b und Abbildung C - 14 e, f).

Diese Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der HDL-Cholesterin Konzentration oder der Art der Aktivierung des BAT vergleichbare Veränderungen in der Lipidkomposition der Lipoproteine zu detektieren sind.

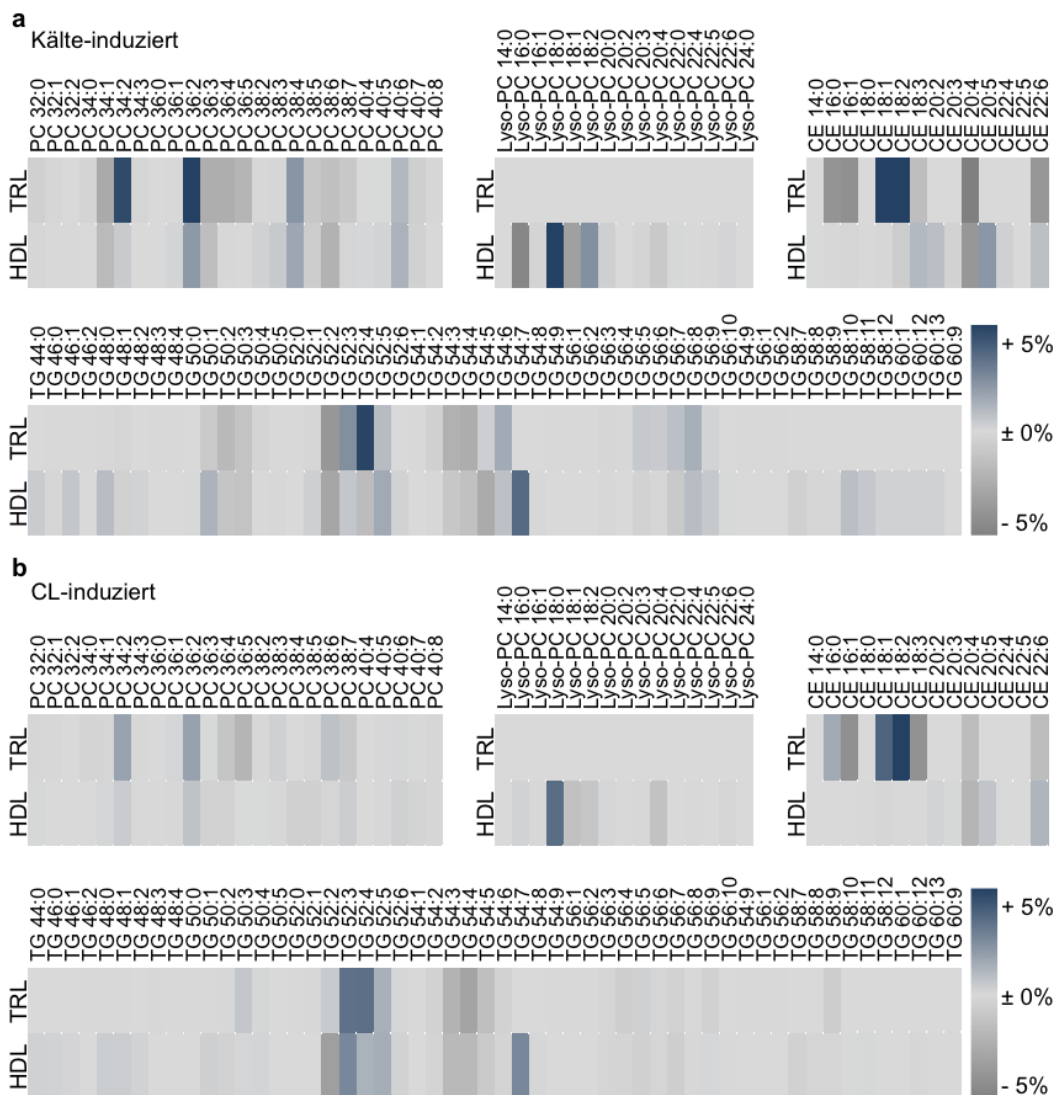


Abbildung C - 3: Lipidprofile in isolierten Lipoproteinpartikeln von *Apoa5^{-/-}*-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL

Sowohl in *Apoa5^{-/-}*-Tieren nach einwöchiger Adaption an 6 °C (a) als auch in CL316,243 (CL) behandelten *Apoa5^{-/-}*-Tieren (b) sind im Vergleich zu Mock behandelten *Apoa5^{-/-}*-Tieren deutliche Änderungen der einzelnen Lipidspezies in TRL und HDL zu detektieren. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, CE = Cholesterinester, LysoPC = Lysophosphatidylcholin, PC = Phosphatidylcholin, TG = Triglyzerid, (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); n = 4; Futter: Chow; die Bestimmung der Lipidprofile erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode; die Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

1.2 Identifizierung von Lysophosphatidylcholinen als Indikatoren für die Aktivierung von braunem Fettgewebe

Wie bereits in Teil C, Punkt 1.1.2 demonstriert wurde, sind zumindest in isolierten Lipoproteinen von *Apoa5^{-/-}*-Tieren als auch von C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des BAT durch Kälte oder CL die Veränderungen in der Zusammensetzung der jeweiligen Lipidklasse überwiegend vergleichbar.

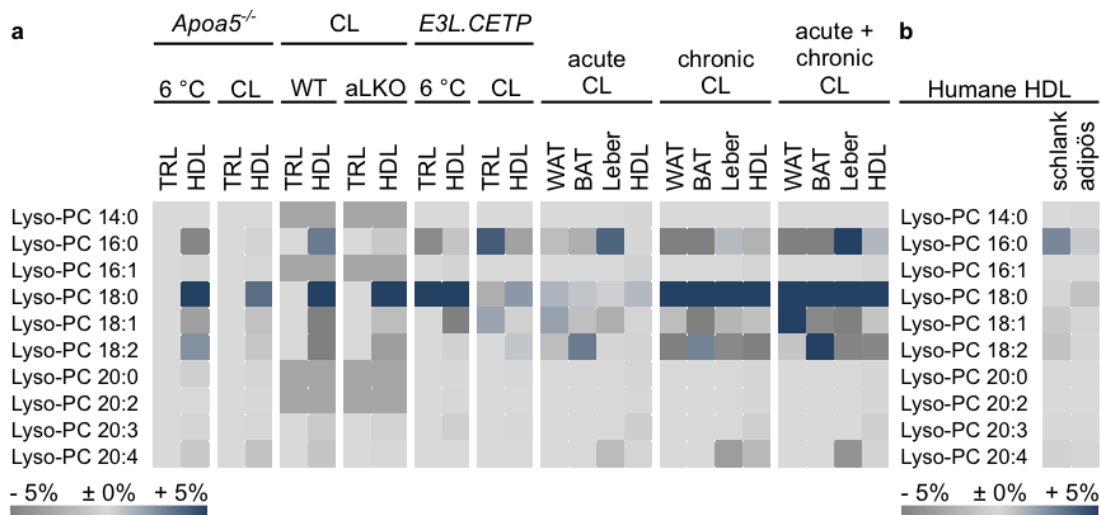


Abbildung C - 4: Lysophosphatidylcholinprofile in verschiedenen Mausmodellen sowie einer humanen Kohorte nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

(a) Sowohl in isolierten Lipoproteinpartikeln als auch in verschiedenen Gewebetypen sind in diversen Mausmodellen (*Apoa5*^{-/-}-Mäusen, Tieren mit adipocytenspezifischen Lipoproteinlipase Knockout: aLKO, ApoE3 Leiden CETP transgenen Tieren: *E3L.CETP* und C57BL/6J-Mäusen nach unterschiedlicher Dauer der CL-Behandlung: einmalige Injektion mit CL316,243 (CL) („acute CL“), einwöchige CL-Behandlung („chronic CL“) oder eine Kombination aus chronischer und akuter Applikation („chronic + acute CL“) und nach verschiedenen Arten der Aktivierung des braunen Fettgewebes das LysoPC18:0 in der prozentualen Verteilung im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. (b) Die Verteilung der LysoPCs in isolierten HDL ist ebenfalls in einer humanen Kohorte nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte beeinflusst. Hier sind vor allem Veränderungen im Profil von schlanken Probanden zu detektieren. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, WAT = *white adipose tissue*, BAT = *brown adipose tissue*, LysoPC = Lysophosphatidylcholin (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); *Apoa5*^{-/-} und aLKO: n = 4; *E3L.CETP*: n = 5; WT nach acute, chronic und chronic + acute CL: n = 6; humane Kohorte: n = 10; die Bestimmung der Lipidprofile erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode; die Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

Bei den in weiteren Lipidom-Studien im Rahmen der Doktorarbeit untersuchten Mausmodelle (*Apoa5*^{-/-}-Mäuse, Mäuse mit adipocytenspezifischen Lipoproteinlipase Knockout (aLKO), C57BL/6J-Mäuse und Mäuse mit einem humanisierten Lipoproteinprofil (ApoE3 Leiden CETP transgene Tieren; *E3L.CETP*) und nach verschiedenen Arten der Aktivierung des BAT (durch Kälte (6 °C) und nach unterschiedlicher Dauer der CL-Behandlung: einmalige Injektion mit CL316,243 (CL) („acute CL“), einwöchige CL-Behandlung („chronic CL“) oder eine Kombination aus chronischer und akuter Applikation („chronic + acute CL“)) war reproduzierbar das Lysophosphatidylcholin LysoPC18:0 in der prozentualen Verteilung im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Abbildung C - 4 a). Diese Umverteilung in der Zusammensetzung der Klasse der LysoPCs trat nicht nur bei isolierten Lipoproteinpartikeln auf, sondern auch in der Leber sowie im WAT und BAT.

Auch in einer humanen Kohorte (Teil B, 12) konnte in isoliertem HDL eine veränderte prozentuale Zusammensetzung in der Klasse der LysoPCs detektiert werden. Im Vergleich zu den Analysen in der Maus, trat das LysoPC16:0 mit einem höheren Anteil auf (Abbildung C - 4 b), wobei die Fettsäure C16:0 genauso wie C18:0 zu den gesättigten *long-chain fatty*

acids (LCFA) gehört. Diese Veränderung konnte jedoch nur in den Probanden mit einem BMI < 25 (schlank) nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse deuten auf konstante Veränderungen im Rahmen des Stoffwechsels der Klasse der Lyophosphatidylcholine nach Aktivierung des BAT hin.

1.3 Untersuchung der peripheren und hepatischen *de novo* Lipogenese sowie deren Einfluss auf die Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL nach Aktivierung des braunen bzw. beigen Fettgewebes

Die unter Teil C, 1.1.2 durch eine Aktivierung des BAT beschriebenen Abweichungen in der Zusammensetzung der Lipidspezies innerhalb der Lipidklassen deuten auf eine Anreicherung *de novo*-synthetisierter Fettsäuren in den einzelnen Lipidklassen hin.

Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist es, das für die DNL verantwortliche Organ zu identifizieren, denn eine Induktion der hepatischen DNL ist mit einem erhöhten Risiko in Verbindung gebracht worden, an Insulinresistenz oder NAFLD zu erkranken (Postic und Girard 2008; Eissing, Scherer et al. 2013), wohingegen eine Steigerung der DNL im WAT mit einem Rückgang der Adipositas assoziierten Insulinresistenz korreliert (Cao, Gerhold et al. 2008; Eissing, Scherer et al. 2013).

Im Rahmen dieses Abschnitts soll dargelegt werden, ob erstens Änderungen bzw. eine Induktion der DNL nach BAT-Aktivierung bestehen, zweitens welchen Einfluss potentielle Veränderungen der DNL für die Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL aufweisen und drittens welches das für die DNL verantwortliche Organ ist.

1.3.1 Lipidom-Analyse in Geweben und isolierten Lipoproteinen von C57BL/6J-Mäusen

Die UPLC-ESI-QqTOF-basierte Analyse der Triglyzeridspezies (Teil B, 6) erfolgte in epididymalem weißem Fettgewebe (WAT), braunem Fettgewebe (BAT), TRL und HDL. Zur Aktivierung des BAT erhielten C57BL/6J-Mäuse entweder eine einmalige CL-Injektion vier Stunden vor Organentnahme (,acute CL'), eine einwöchige CL-Behandlung (,chronic CL') oder die Kombination aus chronischer und akuter Applikation (,chronic + acute CL'). Dabei ist davon auszugehen, dass die ,acute CL'-Behandlung vornehmlich die Lipolyse initiiert und die ,chronic CL'-Behandlung zu einer Induktion des Brownings von weißem Fettgewebe führt.

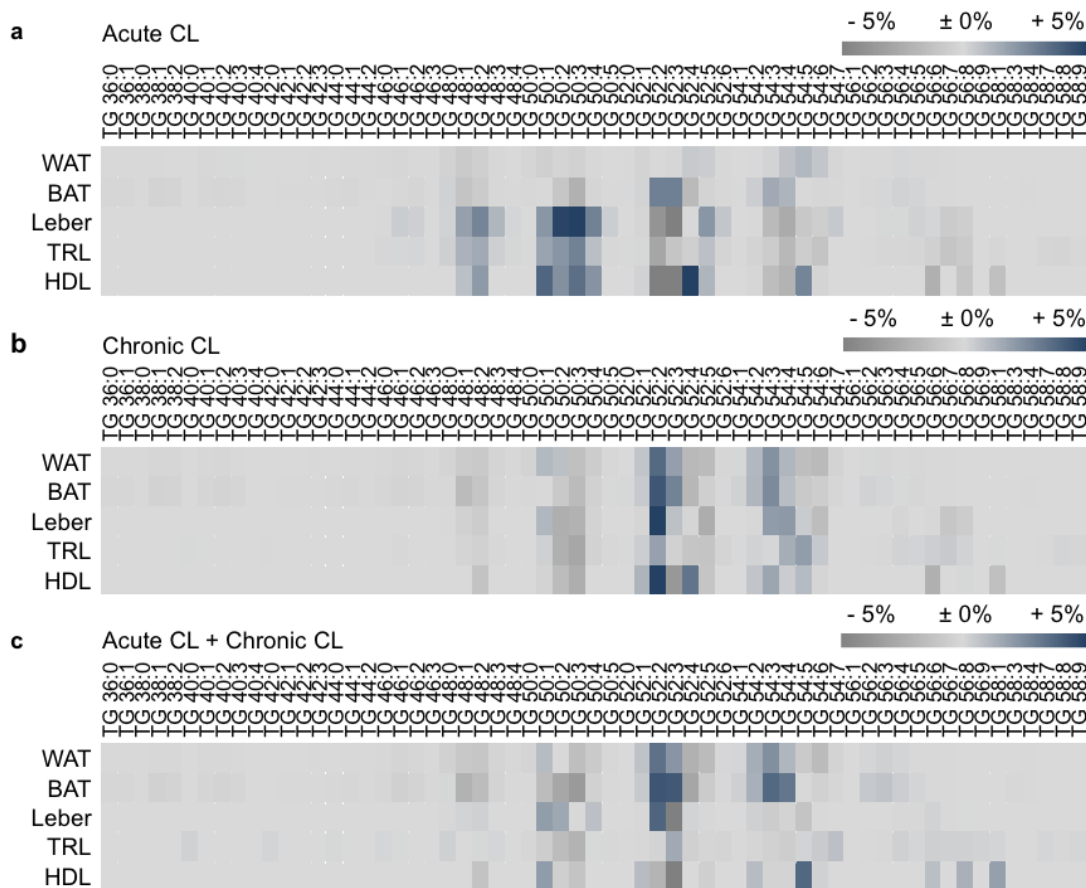


Abbildung C - 5: Triglyceridprofile in Geweben und isolierten Lipoproteinpartikeln von C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

Die Triglyceridlipidom-Analyse von epididymalem weißem Fettgewebe (WAT), braunem Fettgewebe (BAT), TRL und HDL nach (a) einer einmaligen Injektion mit CL 316,243 (CL) („acute CL“), (b) einwöchiger CL-Behandlung („chronic CL“) oder (c) der Kombination aus chronischer und akuter Applikation („chronic + acute CL“) in C57BL/6J-Mäusen weist auf eine Änderung der Triglyceridspezies in den verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der Dauer der BAT-Aktivierung hin. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, WAT = *white adipose tissue*, BAT = *brown adipose tissue*, TG = Triglycerid (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); n = 6; Futter: Chow; die Bestimmung der Lipidprofile erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode; die Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

Die akute Induktion der Lipolyse in den *Lipid Droplets* der Adipocyten (Abbildung C - 5 a) führte zu einer anteiligen Reduktion von TG48:1, TG48:2, TG50:2 und TG50:3 im WAT und noch deutlicher im BAT. Die Gemeinsamkeit dieser TGs ist, dass letztere hauptsächlich aus den Fettsäuren C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 bestehen. Gleichzeitig war jedoch ein Anstieg dieser Triglyceridspezies in der Leber, TRL sowie HDL zu detektieren, welches auf einen verstärkten Transport der durch Lipolyse freigesetzten Fettsäuren aus dem Fettgewebe hin zur Leber, TRL und HDL deutet. Dieses spiegeln auch die über GC-FID-bestimmten Fettsäure-Profile der Leber, des WAT und des BAT (Anhang, Abbildung J - 2) sowie die Ergebnisse zur Bestimmung der Gesamttriglyceridgehalte in den Geweben und im Plasma (Anhang, Abbildung J - 3) wider.

Nach einer chronischen CL-Behandlung (Abbildung C - 5 b) gehörten zu den am stärksten zunehmenden Lipidspezies in allen Organen sowie Lipoproteinen das TG52:2, TG52:3 und TG54:3. Alle diese TGs beinhalten zu einem hohen Prozentsatz die Fettsäure C18:1, welches auch aus den Fettsäureprofilen ersichtlich wird (Anhang, Abbildung J - 2). Im Gegensatz dazu waren TGs, wie beispielsweise das TG52:5 oder TG54:6, in denen das Glycerin zu einem großen Anteil mit essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren verestert ist (z.B. C18:2), reduziert (Anhang, Abbildung J - 2).

Die Kombination aus chronischer und akuter Behandlung mit CL (Abbildung C - 5 c) resultierte in einem Triglyzeridprofil, welches einer Mischung der Muster aus den zuvor beschriebenen Behandlungen entsprach.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine chronische Behandlung mit CL zu einer Verschiebung des Triglyzeridprofils in der Weise führt, dass ein prozentualer Anstieg von TGs, welche *de novo* synthetisierte Fettsäuren enthalten, auftritt. Zudem gleichen sich die Lipidprofile in allen Organen und Lipoproteinen. Durch eine akute, die Lipolyse induzierende CL-Behandlung wird deutlich, dass die durch Lipolyse freigesetzten Fettsäuren aus den weißen Fettgeweben sich letztendlich in der Leber, TRL und HDL anreichern.

1.3.2 Visualisierung der *de novo* Lipogenese in Geweben und isolierten Lipoproteinen über einen Fluxomics-Ansatz

Über einen UPLC-ESI-QqTOF-basierten Fluxomics-Ansatz (Teil B, 8) sollte einerseits die durch BAT-Aktivierung induzierte DNL verifiziert werden (Teil C, 1.1.2, 1.3.1) und andererseits das Organ mit eventuell erhöhter DNL-Rate identifiziert werden.

Im Rahmen der DNL werden aus nicht-Lipid-Edukten, wie beispielsweise Glucose, Fettsäuren *de novo* synthetisiert. Dabei stammen bei der Synthese von Palmitinsäure ($C_{16}H_{32}O_2$) sieben der Wasserstoffatome aus Wasser (Abbildung J - 4 a). Dieser Sachverhalt stellt die Basis der hier herangezogenen Analytik dar: Das BAT von C57BL/6J-Mäusen wurde über eine Woche entweder durch Kälte ($6^\circ C$) oder durch Behandlung mit CL aktiviert. Mock-behandelte Tiere erhielten über sieben Tage eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %). 100 Stunden vor Organentnahme erhielten die Tiere eine einmalige intraperitoneale Injektion an D_2O (20 mL/kg of body weight, 99% $2H$). Zudem wurde eine Mock-behandelte „Kontrollgruppe“ mitgeführt, die kein deuteriertes Wasser erhielt. Für den verbleibenden Teil der Studie wurde das Trinkwasser mit 5% D_2O angereichert. Das aus dem D_2O stammende Deuterium wird vorübergehend in neu synthetisierte Moleküle inkorporiert, welches anhand der Massenspektren durch Verschiebung des natürlichen Isotopenmusters („Kontrollgruppe“) sichtbar wird (detaillierte Informationen zur Auswertung können Abbildung J - 4 b und c entnommen werden).

Eine weitere Voraussetzung für die Auswertung ist, dass die Anreicherung von D₂O im Plasma vergleichbar ist. Dies wurde über eine GC-Headspace-Analyse ermittelt. Die Grundlage dieser analytischen Methode ist das Auftreten eines Wasserstoff- bzw. Deuteriumaustausches zwischen Plasma-Wasser und Aceton. Im Folgenden wurden die Isotopenverhältnisse des flüchtigeren Acetons über GC-MS ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine konstante Anreicherung von 3 % - 4,5 % in allen mit D₂O behandelten Gruppen erfolgte (Abbildung J - 4 d). Weiterhin konnte anhand der prozentualen Abweichung (cv < 15 %) verifiziert werden, dass eine reproduzierbare Inkorporation von Deuterium in den verschiedenen Triglyzeridspezies innerhalb der Tiere einer Gruppe stattfand (Abbildung J - 4 e).

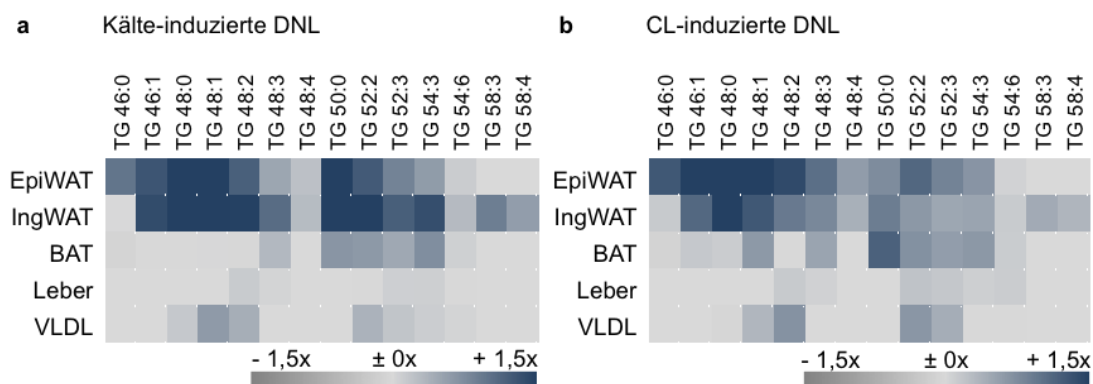


Abbildung C - 6: Fluxomics von metabolisch aktiven Geweben und VLDL in C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte (a) oder CL316,243 (CL) (b) erhielten C57BL/6J Mäuse 100 Stunden vor Organentnahme eine einmalige intraperitoneale Injektion an D₂O (20 mL/kg of body weight, 99% ²H). Für den verbleibenden Teil der Studie wurde das Trinkwasser mit 5% D₂O angereichert. Vor allem im epididymalen (epiWAT) und inguinalen (ingWAT) weißen Fettgewebe ist eine Inkorporation von Deuterium in *de novo* synthetisierte Triglyzeride zu detektieren, welches einen Anstieg der *de novo* Lipogenese (DNL) indiziert. (VLDL = *very low density lipoprotein*, ingWAT = *inguinal white adipose tissue*, epiWAT = *epididymal white adipose tissue*, BAT = *brown adipose tissue*, TG = Triglyzerid (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); n = 7; Futter: Chow; die Fluxomics Analyse erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode (Auswertung und ergänzende Informationen, siehe Abbildung J - 4); Daten sind als relative Induktion im Vergleich zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

Sowohl die Ergebnisse nach Aktivierung des BAT durch Kälte (Abbildung C - 6 a) als auch die nach Aktivierung des BAT durch CL (Abbildung C - 6 b) zeigten einen deutlichen Anstieg der DNL-Rate im epiWAT und ingWAT. Dieser Anstieg war vor allem in den TG-Spezies, die die Fettsäuren C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 und C18:1 (z.B. TG48:0, TG48:1, TG52:2) enthalten, zu detektieren. Auch im BAT waren moderate Anstiege in der Inkorporation von Deuterium nachzuweisen. Weiterhin wird aus den Abbildungen deutlich, dass in keinem der untersuchten Organe ein Anstieg der DNL im TG54:6 erfolgte. Dies ist dadurch begründet, dass das Glycerol des TG54:6 ausschließlich mit essentiellen, über die Diät zugeführten Fettsäuren (C18:2) verestert ist.

Auffällig ist, dass in der Leber kein Anstieg der DNL nach Aktivierung des BAT zu messen war. Nichtsdestotrotz konnte in isolierten VLDL ein im Vergleich zum WAT sehr abgeschwächtes, dennoch ähnliches Muster detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch Aktivierung des BAT induzierten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung von TRL ihren Ursprung im BAT und WAT haben sollten.

1.3.3 Genexpressionsanalyse von an der *de novo* Lipogenese beteiligten Genen

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse sollten anhand von Genexpressionsanalysen (Teil B, 4) bestätigt werden. Die Aktivierung des BAT erfolgte durch einwöchige subkutane Injektion von CL. Eine entsprechende Kontrollgruppe (Mock) erhielt das entsprechende Volumen an physiologischer Kochsalzlösung. Die Genexpression wurde mittels der TaqMan-Technologie in epiWAT, ingWAT, iBAT und Leber quantifiziert.

Als Marker für die DNL wurden die für die Synthese von Fettsäuren verantwortlichen Gene *Acaca* (Protein: Acetyl-CoA-Carboxylase) und *Fasn* (Protein: Fettsäure-Synthase), das für die Desaturierung verantwortliche Gen *Scd1* (Protein: Stearoyl-CoA Desaturase 1) und die für die Fettsäure-Elongation verantwortlichen Gene *Elovl1*, *Elovl3*, *Elovl5* und *Elovl6* (Protein: Elongase 1, 3, 5, und 6) gemessen.

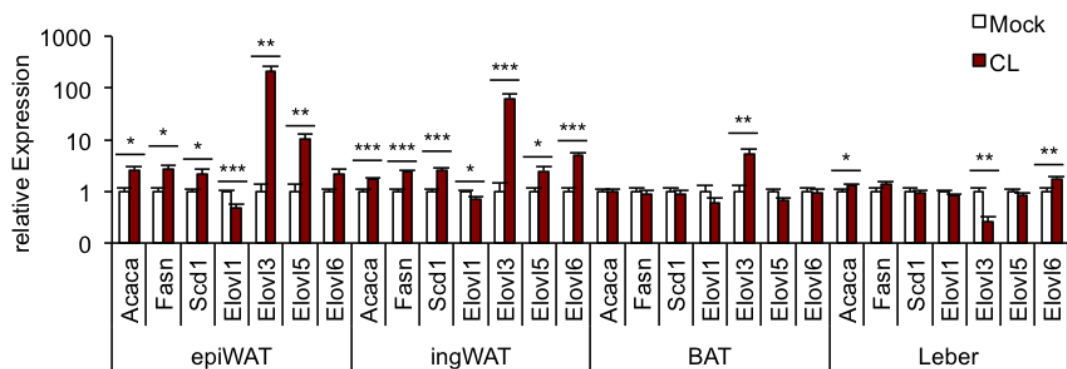


Abbildung C - 7: Expressionsprofile von an der *de novo* Lipogenese beteiligten Genen in C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

mRNA Expression in epididymalem weißen Fettgewebe (epiWAT), inguinalem weißen Fettgewebe (ingWAT), interscapularem braunen Fettgewebe (BAT) und Leber in C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes führt insbesondere in den weißen Fettgewebsdepots zu einer Induktion von Genen, die an der *de novo* Lipogenese (DNL) beteiligt sind, wohingegen in der Leber lediglich ein moderater Anstieg in der Expression von Acetyl-CoA Carboxylase 1 (*Acaca*) sowie der Fettsäure Elongase 6 (*Elovl6*), jedoch eine signifikante Reduktion der Fettsäure Elongase 3 (*Elovl3*) zu detektieren ist. (n = 10; Futter: Chow; die Messung der mRNA-Expression erfolgte mittels der TaqMan Technologie; Daten sind zunächst auf *Tbp* normalisiert und letztendlich als relative Expression im Vergleich zu Mock-behandelten Tieren dargestellt; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$)

Nach Behandlung mit CL waren im Vergleich zur Mock behandelten Gruppe (Abbildung C - 7), mit Ausnahme von *Elovl1*, alle entsprechenden DNL-Marker-Gene im epiWAT sowie im ingWAT induziert. Dagegen war im BAT lediglich eine Induktion von *Elovl3* nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war in der Leber die Expression von *Elovl 3* um mehr als die Hälfte reduziert und lediglich *Acaca* sowie *Elovl6* schwach erhöht.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass nach Aktivierung des BAT die DNL in den WAT-Depots stark induziert ist. Eines der Hauptprodukte der DNL ist, wie bereits beschrieben, Glukose. Im Zusammenhang damit konnte zudem nach einwöchiger Aktivierung des BAT eine verbesserte orale Glukosetoleranz nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass ein Großteil der Glukose von den verschiedenen BAT-Depots sowie vom subWAT aufgenommen wurde (Anhang, Abbildung J - 5).

1.4 Bedeutung der Lipoproteinlipase brauner und beiger Adipocyten für Veränderungen in der Lipidkomposition zirkulierender HDL nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Im Folgenden soll die Bedeutung der LPL aktivierter brauner und beiger Adipocyten für den Umbau zirkulierender HDL näher betrachtet werden. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Gen für LPL mit reduzierten Konzentrationen an Plasma-HDL-Cholesterin assoziiert sind (Teslovich, Musunuru et al. 2010; Asselbergs, Guo et al. 2012). In vorausgegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass die LPL von großer Bedeutung für den Metabolismus von TRL nach Aktivierung des BAT ist (Bartelt, Bruns et al. 2011).

Die Untersuchungen erfolgten in Wildtyp (WT)-Tieren und in Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz (aLKO) nach täglicher subkutaner Injektion von CL über einen Zeitraum von einer Woche sowie in entsprechenden Mock-behandelten Tieren (Injektion von 0,9 %iger NaCl-Lösung). Hierbei ist hinzuzufügen, dass die Aktivierung von braunem Fettgewebe sowie das Browning in aLKO-Mäusen nicht gestört ist (Bartelt, Weigelt et al. 2013).

1.4.1 Analyse der Plasmalipidkonzentration und Lipoproteinprofile in Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Aktivierung des BAT weder die Konzentration an Cholesterin im Plasma noch die Konzentration an HDL-Cholesterin im Falle einer Lipoproteinlipasedefizienz verändert war (vgl. Abbildung C - 8, a-c).

Wie bekannt, war die Konzentration an TG im Plasma nach Aktivierung des BAT auch in den CL-behandelten WT-Mäusen reduziert (Abbildung C - 8, d). In BAT-aktivierten aLKO-Mäusen war dieser Effekt nicht vorhanden. Im Gegensatz dazu war die Konzentration an TG im Plasma nicht nur unter Mock-Bedingungen bereits erhöht, sondern stieg nach CL-Behandlung signifikant an. Diese Ergebnisse werden durch die Lipoproteinprofile bestätigt: In den WT-Tieren (vgl. Abbildung C - 8, e) führte die CL-Behandlung zu einer Reduktion

der TRL; in den aLKO-Mäusen (vgl. Abbildung C - 8, f) war ein Anstieg der TRL nach Aktivierung des BAT zu messen.

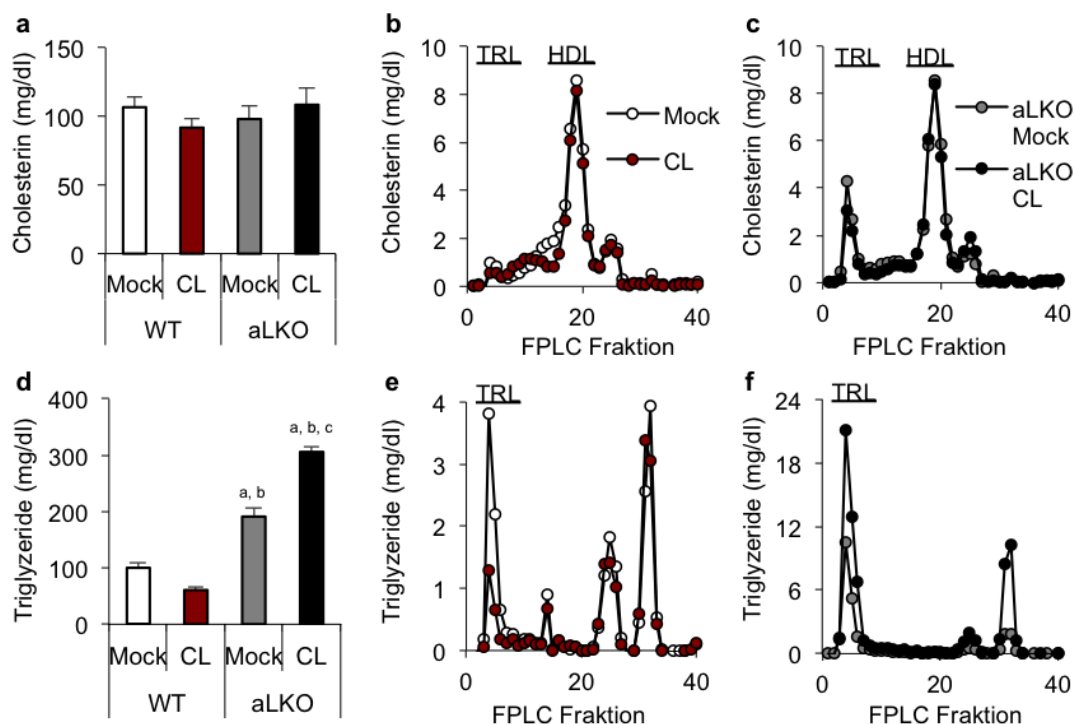


Abbildung C - 8: Plasma Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie korrespondierende Lipoproteinprofile von Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

Enzymatische Bestimmung der Plasmalipide und korrespondierende *fast performance liquid chromatography* (FPLC) Profile in Wildtyp (WT)-Tieren und Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz (aLKO) nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL). Sowohl die Konzentration an Gesamtcholesterin im Plasma (a) als auch die korrespondierenden FPLC-Profile für WT (b)- und aLKO (c)-Mäuse ist nach Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) in den verschiedenen Mausmodellen nicht verändert. Die Konzentration an Gesamttriglyzeriden im Plasma (d) sinkt nach BAT-Aktivierung in WT-Mäusen, wohingegen die der aLKO-Mäuse nicht nur unter Mock-Bedingungen bereits erhöht ist, sondern nach CL-Behandlung signifikant ansteigt. In den dazugehörigen FPLC-Profilen ist in den WT-Tieren (e) eine Reduktion der TRL nach BAT-Aktivierung zu messen. Das Lipoproteinprofil der aLKO-Mäuse (f) zeigt einen Anstieg an TRL. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, n = 4; Futter: Chow; a $P < 0,05$ vs. WT Mock; b $P < 0,05$ vs. WT CL; c $P < 0,05$ vs. WT aLKO Mock)

1.4.2 Lipidomanalyse isolierter Lipoproteine in Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz

Die Analyse der Lipidspezies über einen UPLC-ESI-QqTOF-basierten Ansatz (Teil B, 6) in isoliertem TRL und HDL (Abbildung C - 9) zeigte, dass die durch CL-Behandlung induzierten Veränderungen in der Zusammensetzung der Lipidspezies in den aLKO-Mäusen leicht abgeschwächt, jedoch vergleichbar zu denen in den WT war. Im Gegensatz dazu waren in der Lipidklasse der TG nur in WT-Tieren Veränderungen in der Lipidkomposition von HDL und TRL nach CL-Behandlung nachzuweisen. Dies ist dadurch zu erklären, dass LPL eine hohe Substratspezifität für TGs aufweist.

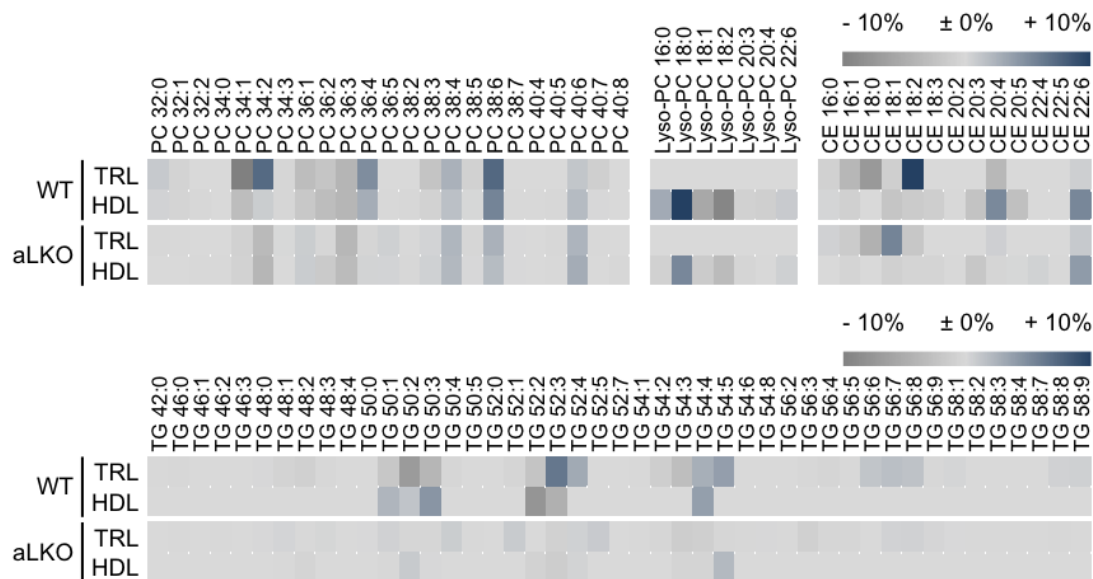


Abbildung C - 9: Lipidprofile in isolierten Lipoproteinpartikeln von Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

Lipidomanalyse isolierter TRL und HDL in Wildtyp (WT)-Tieren und Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz (aLKO) nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL). Die Lipidklassen der Phosphatidylcholine (PC), Lysophosphatidylcholine (LysoPCs) und Cholesterylester (CE) weisen im Vergleich von WT- Tieren zu aLKO-Tieren in TRL und HDL parallele Änderungen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes auf. Im Gegensatz dazu sind in der Lipidklasse der Triglyzeride (TG) lediglich in WT-Tieren Veränderungen in der Lipidkomposition nach CL-Behandlung zu detektieren. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, CE = Cholesterinester, LysoPC = Lysophosphatidylcholin, PC = Phosphatidylcholin, TG = Triglyzerid (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); n = 4; Futter: Chow; die Bestimmung der Lipidprofile erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode; Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

Die hier erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die lipolytische Prozessierung der TRL, katalysiert durch die LPL, eine Voraussetzung für eine Veränderung in der Zusammensetzung der HDL ist.

1.5 Auswirkungen der Aktivierung von braunem und beigem Fettgewebe auf den HDL-Cholesterin Umsatz sowie den reversen Cholesterintransport

Wie bereits unter (Teil A,2.3) beschrieben, ist der HDL-Metabolismus am RCT beteiligt. Die zuvor dargestellten Ergebnisse suggerieren, dass es in Folge einer Aktivierung des BAT zu einer veränderten Komposition der Lipidzusammensetzung von TRL und HDL kommt, die ihren Ursprung im BAT und WAT hat. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass eine lipolytische Prozessierung der TRL, katalysiert durch die LPL, eine Voraussetzung für die veränderte Zusammensetzung der HDL ist.

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, inwiefern die Aktivierung des BAT funktionelle Auswirkungen auf den HDL-Metabolismus sowie den RCT hat.

Um den Umsatz bzw. den Flux der HDL nach Aktivierung des braunen Fettgewebes zu quantifizieren, wurden murine HDL isoliert, *ex vivo* mit ^{125}I od im Proteinanteil und ^3H -Cholesterylether im Kern markiert und anschließend in Mock- oder CL-behandelte C57BL/6J-Mäuse intravenös injiziert (Teil B, 9). Anschließend wurden Plasmaproben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und analysiert; die Entnahme der Leberproben erfolgte nach zwei Stunden. Im Abfall der ^{125}I od-Radioaktivität (Abbildung C - 10 a) konnten keine Unterschiede zwischen CL- und Mock-behandelten Tieren gemessen werden.

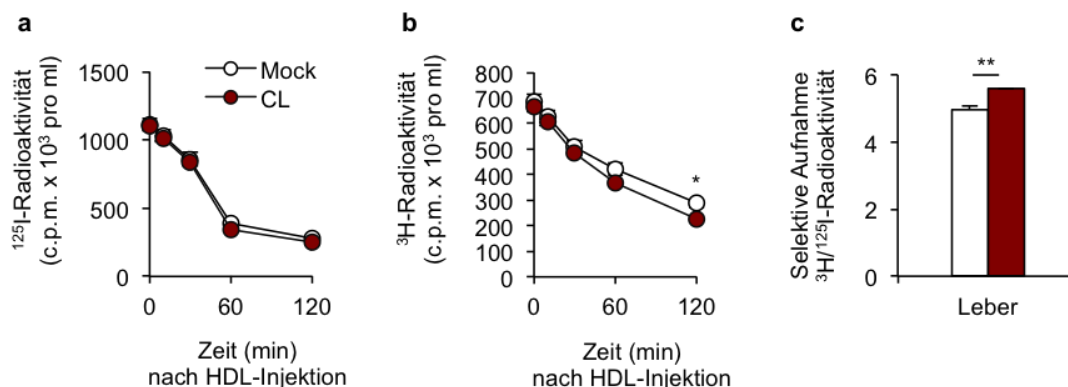


Abbildung C - 10: Analyse des HDL-Fluxes in C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Injektion von doppelt markiertem HDL (^{125}I od-Markierung im Proteinanteil und ^3H -Cholesterylether-Markierung) in C57BL/6J-Mäuse nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL) oder 0,9%iger NaCl-Lösung (Mock). Plasmaproben wurden zu angegebenen Zeitpunkten analysiert; die Entnahme der Leberprobe erfolgte nach zwei Stunden. (a) Die Messung der ^{125}I od-Radioaktivität im Plasma zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen. (b) Im Plasma von CL-behandelten Tieren erfolgt der Abfall der ^3H -Cholesterylether-Radioaktivität schneller. (c) Die selektive Aufnahme von ^3H -Cholesterin in die Leber ist nach Aktivierung des braunen Fettgewebes erhöht. (n = 5-7; Futter: Chow; **P < 0,01; *P < 0,05)

Im Vergleich dazu war nach 120 min signifikant weniger ^3H -Cholesterylether in den CL-behandelten Tieren nachweisbar (Abbildung C - 10 b), welches zu der erhöhten selektiven Aufnahme an ^3H -Cholesterylether in die Leber nach CL-Behandlung passt (Abbildung C - 10 c). Dies indiziert, dass die Aufnahme der Lipide im Kern der HDL (in diesem Fall mit ^3H -Cholesterylether als Marker) unabhängig von der Aufnahme des gesamten HDL-Partikels erfolgt.

Begründet durch diese Resultate sollte untersucht werden, ob der *scavenger-receptor BI* (SR-BI, kodiert durch *Scarb1*) für die beschleunigte Aufnahme des ^3H -Cholesterylether nach Aktivierung des BAT verantwortlich ist. SR-BI wird vor allem in der Leber exprimiert, gilt als „HDL-Rezeptor“ und ist für die selektive Aufnahme von vorzugsweise Cholesterin und anderen Lipiden aus HDL in die Leber verantwortlich (Teil A, 2.3). Zur Untersuchung wurden doppelt markierte HDL (s.o.) einerseits in Wildtyp (WT)-Mäuse und andererseits *Scarb1*^{-/-}-Mäuse nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL) intravenös injiziert.

Erneut sind in dem Abfall der ^{125}I -Radioaktivität im Plasma keine Unterschiede detektierbar (Abbildung C - 11 a), jedoch erfolgte in den *Scarb1*^{-/-}-Mäusen eine Akkumulati-

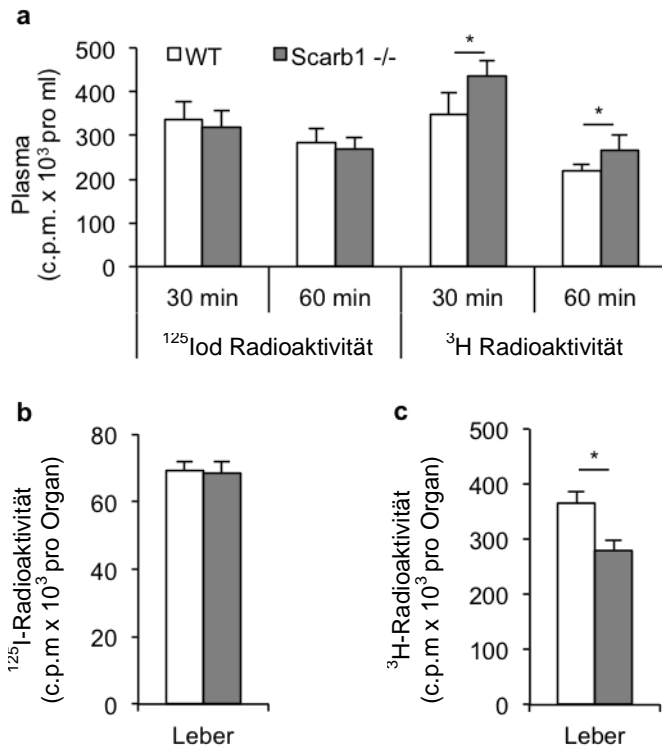


Abbildung C - 11: Analyse des HDL-Fluxes in Wildtyp-Mäusen und *Scarb1*^{-/-}-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes Injektion von doppelt markiertem HDL (^{125}I -Markierung im Proteinanteil und ^3H -Cholesterin-Markierung) in Wildtyp (WT)-Mäuse oder *Scarb1*^{-/-}-Mäuse nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL). Plasmaproben wurden zu angegebenen Zeitpunkten analysiert; die Entnahme der Leberprobe erfolgte nach zwei Stunden. (a) Die Messung der ^{125}I -Radioaktivität im Plasma weist keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Die ^3H -Cholesterin-Radioaktivität im Plasma von *Scarb1*^{-/-}-Mäusen weist zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöhte Werte auf. (b) Die hepatische Aufnahme von ^{125}I -Radioaktivität ist zwischen den Genotypen vergleichbar, wohingegen die von ^3H -Cholesterin-Radioaktivität (c) in *Scarb1*^{-/-}-Mäusen reduziert ist. (n = 3-4; Futter: Chow; *P < 0,05)

on der ^3H -Radioaktivität im Plasma. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen war die Aufnahme der ^{125}I -Radioaktivität in die Leber (vgl. Abbildung C - 11 b) unverändert, wohingegen die Aufnahme der ^3H -Radioaktivität in die Leber nach 120 min in den *Scarb1*^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert war.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Aktivierung des BAT auf den durch HDL-vermittelten RCT untersucht. Dies erfolgte in Anlehnung an die von der Arbeitsgruppe um Dan Rader publizierten

Methode (Zhang, Zanotti et al. 2003). Im Rahmen dieser Methode wird der durch HDL-vermittelte Cholesterintransport aus Makrophagen hin zum Fäzes gemessen (Teil B, 10). Dazu wurden zunächst peritoneale Makrophagen aus C57BL/6J-Mäusen *ex vivo* mit ^3H -Cholesterin sowie LDL beladen. Die so markierten Makrophagen wurden über peritoneale Injektion in zuvor Kälte-adaptierte (6° C), CL- oder Mock-behandelte C57BL/6J-Mäuse (Behandlungsdauer je eine Woche, Injektion täglich) injiziert. 48 Stunden nach der Makrophagen-Injektion erfolgte die Organentnahme und die anschließende Messung der Radioaktivität im Plasma und in der Leber. Für die Analyse der Fäzes wurde nach Injektion über die ersten 24 Stunden und die darauffolgenden 24 Stunden (48 h) der Fäzes quantitativ gesammelt und gemessen. Sowohl im Plasma als auch in der Leber ist die ^3H -Radioaktivität nach BAT-Aktivierung hochsignifikant erniedrigt (Abbildung C - 12 a).

In Verbindung mit diesen Ergebnissen waren bereits 24 Stunden nach Makrophagen-Injektion die Werte ^3H -Radioaktivität im Fäzes der Kälte-adaptierten Tiere erhöht. Nach zwei Tagen konnten sowohl für die Kälte-adaptierten als auch für die CL-behandelten Tiere eine signifikant induzierte fäkale ^3H -Exkretion im Vergleich zur Mock-behandelten Gruppe nachgewiesen werden.

Abschließend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung des BAT funktionelle Auswirkungen auf den HDL-

Metabolismus sowie den RCT hat. So konnte nach BAT-Aktivierung eine gesteigerte, SR-BI-abhängige, hepatische Aufnahme von Kernlipiden aus HDL detektiert werden. Weiterhin zeigte sich, dass der RCT aus Makrophagen zum Fäzes induziert war.

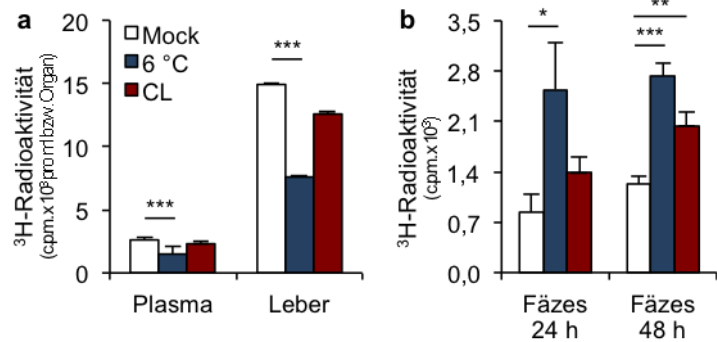


Abbildung C - 12: In vivo Analyse des reversen Makrophagen-zu-Fäzes Cholesterintransportes in C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Analyse des *in vivo* reversen Cholesterintransportes nach Markierung von peritonealen Makrophagen *ex vivo* mit ^3H -Cholesterin und anschließender peritonealer Injektion in Kälte-adaptierte (6°C), CL316,243 (CL)- oder Mock-behandelte-C57BL/6J-Mäuse (Behandlung je einwöchig, Injektion täglich). Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Plasma und der Leber 48 Stunden nach Makrophagen-Injektion. Für die Analyse des Fäzes wurde nach Injektion über die ersten 24 Stunden und die darauffolgenden 24 Stunden (48 h) der Fäzes quantitativ gesammelt und gemessen. (a) Im Plasma und in der Leber sind nach Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) durch Kälte signifikant erniedrigte Werte der ^3H -Radioaktivität zu detektieren. (b) Im 24 Stunden-Fäzes ist die Ausscheidung von ^3H -Radioaktivität nach Kälte-induzierter BAT-Aktivierung gesteigert. Nach 48 Stunden weisen sowohl Kälte als auch CL-behandelte Tiere einen Anstieg in der ^3H -Radioaktivität im Fäzes auf. (n = 7-8; Futter: Western Type Diät (0,2 % Cholesterin); ***P < 0,001; **P < 0,01; *P < 0,05)

2 Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel

Der durch Aktivierung des BAT gesteigerte Energieverbrauch führt unter anderem zu einem gesteigerten Appetit sowie einer erhöhten Aufnahme an Nahrung, um Energiedefiziente zu vermeiden. Im Rahmen der zitterfreien Thermogenese können Glukose sowie Fettsäuren als Edukte zur Energiegewinnung eingesetzt und somit direkt katabolisiert werden, wohingegen andere Nahrungsbestandteile, wie Cholesterin, nicht direkt verstoffwechselt werden können. Wie bereits unter Teil A, 3.2 ausführlich beschrieben, erfolgt ein bedeutender Anteil des Katabolismus und der Ausscheidung von Cholesterin bei Säugetieren über die hepatobiliäre Route, welche die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin und die anschließende fäkale Ausscheidung beinhaltet.

Neben dem über HDL zur Leber transportiertem Cholesterin (Teil C, 2.3) stammen ca. 70 % des aus Lipoproteine von der Leber aufgenommenen Cholesterins aus Lipoproteinen, die am exogenen und endogenen Lipoproteinstoffwechsel beteiligt sind.

Nicht geklärt in diesem Zusammenhang ist, inwieweit die Aktivierung von braunem Fettgewebe zur Modulation des hepatischen Gallensäurestoffwechsels führt. Im nächsten Abschnitt folgen die Ergebnisse zur Untersuchung über die Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel.

2.1 Analyse des postprandialen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Da in Abhängigkeit von der Diät unterschiedlich viel Cholesterin über die Nahrung aufgenommen werden kann (Maxfield und Tabas 2005), erfolgten weitere Studien in C57BL/6J-Tieren, die einerseits eine Standard-Chow-Diät (Chow; 4,3 Fett; 13,1 MJ/kg) und andererseits eine Cholesterin-enthaltene Western Typ-Diät (WTD; 0,2 % Cholesterin, 21 % Fett; 22 MJ/kg) erhielten. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgte über eine Woche bei 6°C. Eine respektive Kontrollgruppe wurde bei 27 °C gehalten.

2.1.1 Bestimmung des Nahrungsumsatzes, der Plasmalipidkonzentration sowie der Lipoproteinprofile

Wie in Teil C, 2.1 beschrieben, unterscheiden sich die WTD- und die Chow-Diät in ihrer Zusammensetzung der Nährwerte und somit auch in ihrem Energiegehalt. Deshalb sollte zunächst der Nahrungsumsatz unter Kontrollbedingungen sowie nach Aktivierung des braunen Fettgewebes gemessen werden.

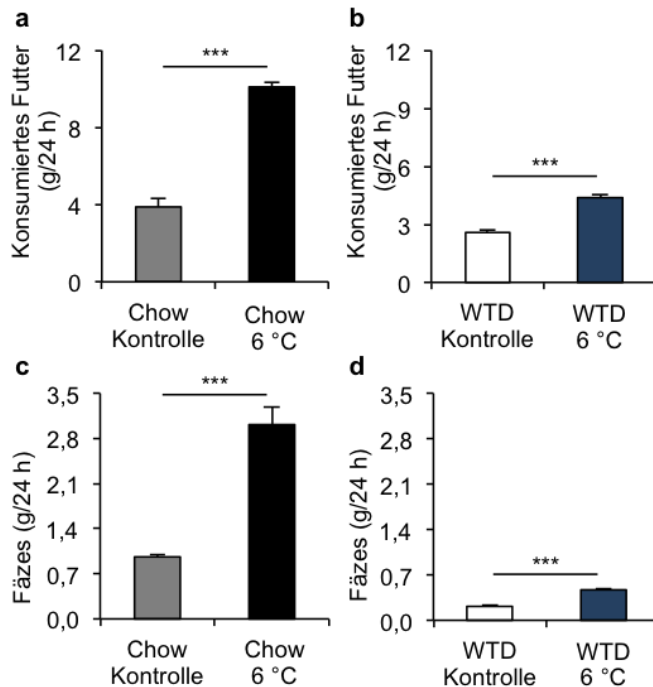


Abbildung C - 13: Tägliche Futteraufnahme und Menge an Fäzes in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6°C

C57BL/6J-Mäuse erhielten eine Chow- oder Western Typ- Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6°C für eine Woche gehalten. Sowohl Chow- (a, c) als auch WTD- (b, d) gefütterte Tiere weisen einen signifikanten Anstieg in der Futteraufnahme sowie in der Exkretion von Fäzes nach einwöchiger Adaption an 6°C auf. (n = 6; ***P < 0,001)

Dieser wurde jeweils am Tag 7 nach Beginn der Aktivierung des BAT über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Die Chow gefütterten Tiere (Abbildung C - 13 a) nahmen unter Kontrollbedingungen im Mittel 4 g an Futter zu sich, wohingegen die WTD gefütterten Tiere (Abbildung C - 13 b) lediglich 3 g an Futter aufnahmen. In Folge der Aktivierung des BAT erfolgte eine knappe Verdreifachung der Nahrungsaufnahme bei Chow-gefütterten Tieren. Bei Tieren, die eine WTD erhielten, verdoppelte sich die Nahrungsaufnahme.

Analog zu dem Anstieg in der Nahrungsaufnahme in BAT-aktivierten Tieren erfolgte auch eine knappe Verdreifachung in der Fäzes-Menge in Chow gefütterten Tieren (Abbildung C - 13 c) sowie eine Verdoppelung bei den Tieren, die eine WTD (Abbildung C - 13 d) erhielten. Zu ergänzen ist weiterhin, dass die Chow gefütterten Tiere im Verhältnis von Nahrungsaufnahme zur Menge an Fäzes mehr Fäzes als die WTD-gefütterten Tiere abgaben, was durch den höheren Ballaststoffgehalt der Chow-Diät begründet ist.

In Folge einer Aktivierung des BAT ist sowohl in Chow- als auch in WTD-gefütterten Tieren eine Zunahme in der Nahrungszufuhr festzustellen. Dieses führt somit auch höchstwahrscheinlich zu einer erhöhten Cholesterinaufnahme nach Aktivierung des BAT in WTD-gefütterten Tieren.

Die Konzentration an Triglyzeriden im Plasma (Abbildung C - 14 a) lag unabhängig vom Futter bei ca. 60 mg/dl in den Kontrolltieren. Nach Aktivierung des braunen Fettgewebes war in den Chow-gefütterten Tieren ein Trend hin zu niedrigeren Plasmatriglyzeridkonzentrationen zu detektieren. Dies spiegelte sich auch in dem korrespondierenden FPLC-Profil (Abbildung C - 14 b) wider. In den WTD- gefütterten Tieren führte die Aktivierung des BAT hingegen zu einer hochsignifikanter Reduktion in der Konzentration an Plasma-

Triglyzeriden, welches durch die Reduktion an TRL im Plasma (Abbildung C - 14 b) begründet war. Die Konzentrationen an Glycerin waren von der Fütterung sowie von der Aktivierung des BAT unabhängig.

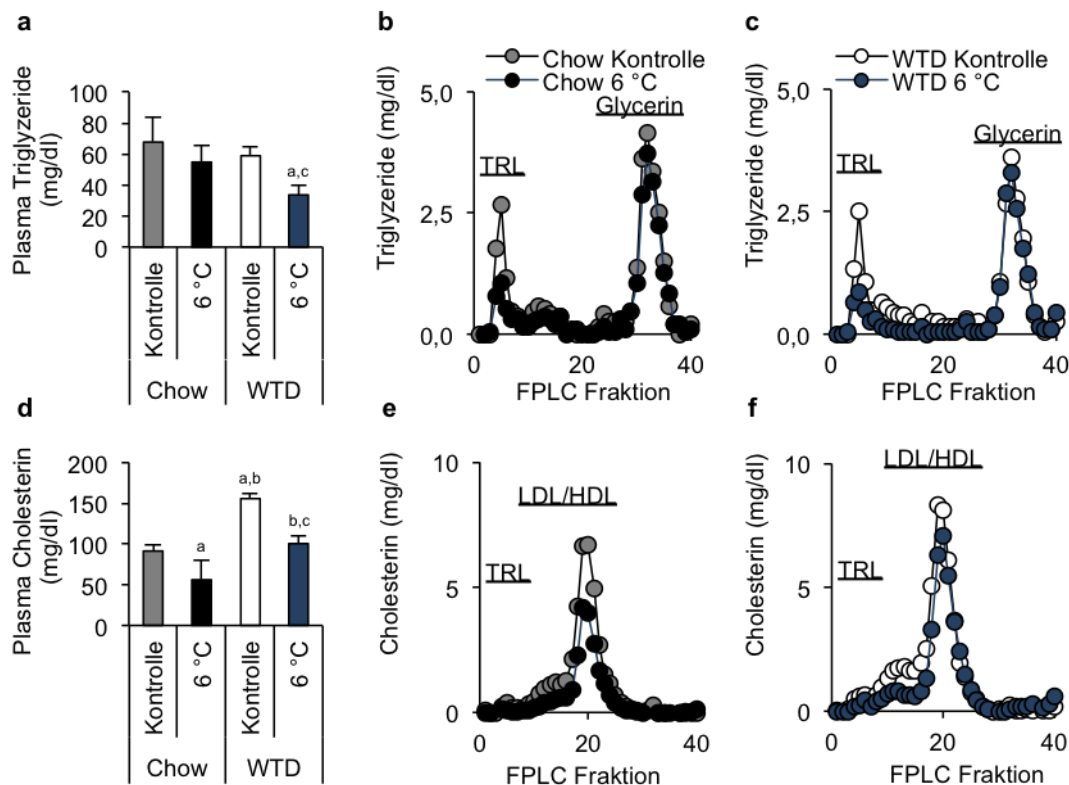


Abbildung C - 14: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

C57BL6J-Tiere erhielten eine Chow- oder Western Typ- Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. Die Konzentration an Cholesterin und Triglyzeriden erfolgte enzymatisch in Plasma oder nach Auftrennung der Lipoproteine über *fast liquid performance chromatography* (FPLC). (a) In WTD- gefütterten Tieren induziert eine Adaption an 6 °C eine Reduktion der Konzentration an Triglyzeriden im Plasma, wohingegen in Chow- gefütterten Tieren nur ein Trend zu detektieren ist. (b, c) Die dazugehörigen Lipoproteinprofile zeigen eine Reduktion in TRL-Triglyzeriden. (d) Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte führt zu einer signifikanten Reduktion in der Konzentration an Cholesterin im Plasma. Parallel dazu ist in den Lipoproteinprofilen in Chow- (e) und WTD (f) gefütterten- Tieren eine Reduktion an LDL- und HDL-Cholesterin detektierbar. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*, n = 6; a $P < 0,05$ vs. Chow Kontrolle; b $P < 0,05$ vs. Chow 6 °C; c $P < 0,05$ vs. WTD Kontrolle)

Im Vergleich der Chow- und WTD- gefütterten Kontrolltiere zeigte sich, dass die Konzentration an Plasmacholesterin von der Fütterung abhängig ist (Abbildung C - 14 d). So führte die WTD- Fütterung zu einem 60 %-igen Anstieg von ca. 100 mg/dl, in den Chow- gefütterten Tieren auf ca. 160 mg/dl Cholesterin. Die Aktivierung des BAT resultierte in beiden Gruppen zu einer signifikanten Reduktion in der Konzentration an Cholesterin. Nach Auftrennung der Lipoproteine wurde deutlich, dass dieser Effekt in den Chow-gefütterten Tieren (Abbildung C - 14 e) durch eine Reduktion an LDL- sowie HDL-Cholesterin im Plasma begründet war. In den Tieren, die eine WTD erhielten (Abbildung C - 14 f), war vornehmlich eine Reduktion an LDL-Cholesterin nachweisbar.

Trotz erhöhter Nahrungsaufnahme war vor allem in WTD- jedoch auch in Chow- gefütterten Tieren nach Aktivierung des BAT eine Reduktion an Plasma-Cholesterin zu beobachten. Dies suggeriert, dass die Ausscheidung von Cholesterin über die hepatobiliäre Route erhöht ist.

2.1.2 Expressionsanalyse von Genen des hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels

Um zu untersuchen, ob eine Aktivierung des BAT die Ausscheidung von Cholesterin über die hepatobiliäre Route induziert wird, wurde die Expression diverser Gene des Gallensäuremetabolismus gemessen, die maßgeblich an der Regulation der Gallensäure-Homöostase beteiligt sind (Teil B, 4).

Nach Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) über Kälte war in Chow- gefütterten Mäusen (Abbildung C - 15 a) keine Veränderung in der Expression der in der Cholesterinsynthese anzutreffenden Gene 24-Dehydrocholesterin Reduktase (kodiert durch *Dhcr24*) sowie 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (kodiert durch *Hmgcr*) zu detektieren, jedoch war die Expression des für die Gallensäuresynthese geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms *cytochrome p4507A1* (kodiert durch *Cyp7a1*) signifikant erhöht. Weiterhin zeigte die Expression des Transkriptionsfaktors *small heterodimer binding partner* (SHP, kodiert durch *Nr0b2*) und des basolateralen Gallensäuretransporters *sodium-dependent sodium-taurocholate cotransport polypeptide* (NTCP, kodiert durch *Slc10a1*) erniedrigte Werte.

Auch in WTD- gefütterten Tieren (Abbildung C - 15 b) war die Expression an *Nr0b2* und *Slc10a1* reduziert, wohingegen die Expression des für den biliären Cholesterinefflux zuständigen Transporters *ATP-binding cassette sub-family G member 8* (kodiert durch *Abcg8*) erhöht war. Die Expression von *ATP-binding cassette sub-family G member 5* (kodiert durch *Abcg5*) war unverändert. Zudem zeigte sich ein Trend hin zur erniedrigten Expression an *Dhcr24* sowie *Hmgcr*. Im Gegensatz zu den Chow- gefütterten Tieren führte die BAT-Aktivierung in WTD-gefütterten Tieren zu einer Induktion des an der alternativen Gallensäuresynthese beteiligten Gens *25-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase* (kodiert durch *Cyp7b1*). Ergänzend war nach WTD-Fütterung die RNA-Menge des an der Gallensäuresynthese beteiligten Enzyms *sterol 27-hydroxylase* (kodiert durch *Cyp27a1*) erhöht.

Die für den apicalen Gallensäuren- und Phospholipidtransport verantwortlichen Transporter *bile salt export pump* (BSEP kodiert durch *Abcb11*) und *multidrug resistance protein 2* (kodiert durch *Mdr2*) zeigten in beiden Diäten nach Aktivierung des BAT keine Veränderungen.

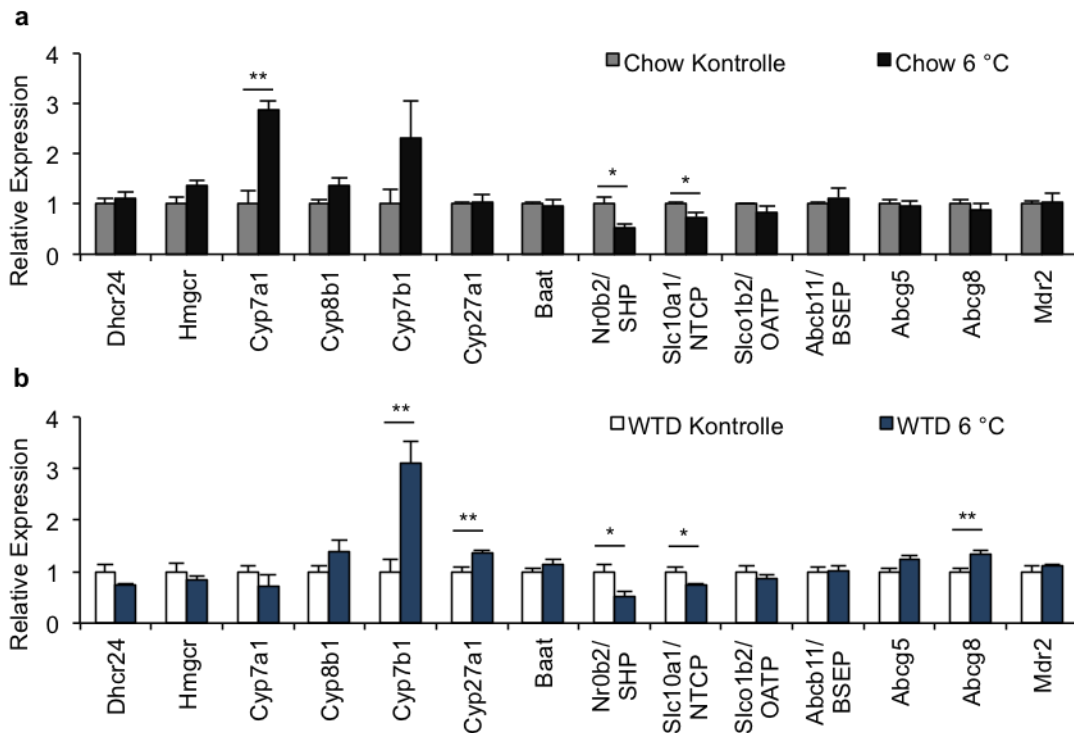


Abbildung C - 15: Expressionsprofile von am Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel bzw. -transport beteiligten Genen in der Leber von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

C57BL6J-Tiere erhielten eine Chow- oder Western Typ- Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. (a,b) Nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes bei 6 °C sind abhängig von der Diät unterschiedliche, signifikante Veränderungen der mRNA-Menge in der Leber zu detektieren. (n = 6; die Messung der mRNA-Expression erfolgte mittels der TaqMan Technologie; Daten sind zunächst auf *Tbp* normalisiert und letztendlich als relative Expression im Vergleich den jeweiligen Kontrollen dargestellt; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$)

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach BAT-Aktivierung die Expression unterschiedlicher an der Gallensäuresynthese beteiligten Gene, einerseits die des klassischen Syntheseweges und andererseits die des alternativen Syntheseweges, in Abhängigkeit von der Diät induziert sind. Unabhängig von der Diät ist die Expression des in der Gallensäuresynthese beteiligten Transkriptionsfaktors SHP sowie der basolaterale Transporter NTCP reduziert.

2.1.3 Gallensäureanalytik in der Leber

Um zu überprüfen, ob die induzierte Expression der an der Gallensäuresynthese beteiligten Gene ebenso in einer Erhöhung des Gallensäuregehaltes in der Leber resultiert, wurde eine quantitative LC-MS/MS-basierte Analyse der Gallensäurekonzentration in der Leber vorgenommen (Teil B, 7) (John, Werner et al. 2014).

Die in Abbildung C - 16 a dargestellte Heatmap zeigt, dass im Vergleich der Gruppen Chow Kontrolle und WTD Kontrolle vereinzelt ein Trend hin zu erhöhten Konzentrationen an spezifischen Gallensäurespezies nachzuweisen war. Dieser war vor allem in der Gruppe der konjugierten Gallensäurespezies (*conjugated bile acid*, CBA, vgl. hierzu auch Abbildung C

- 16 b), wie z.B. THDCA (*taurohydrodeoxycholic acid*) oder TCA (*taurocholic acid*) zu beobachten. Wie weiterhin aus Abbildung C - 16 b hervorgeht, setzt sich die Summe aller Gallensäurespezies zu einem Hauptbestandteil aus CBA und zu einem Nebenbestandteil aus unkonjugierten Gallensäurespezies (*unconjugated bile acid*, UBA) zusammen.

Die Aktivierung des BAT führte in Chow- gefütterten Tieren zu einem moderaten Anstieg an Gallensäurespezies aus der Gruppe der UBA, wie z.B. *cholic acid* (CA) oder *deoxycholic acid* (DCA) und *chenodeoxycholic acid* (CDCA), welcher jedoch in der Summe (Abbildung C - 16 b) nicht signifikant war. Im Vergleich dazu war in BAT-aktivierten, WTD-gefütterten Mäusen der Anstieg an UBA signifikant. Hier zeigte sich eine deutliche Induktion von β -*muricholic acid* (β -MCA) sowie DCA/CDCA, jedoch waren auch Gallensäuren aus der Gruppe der CBA deutlich erhöht (z.B. *tauro- α -muricholic acid*, T- α -MCA und *tauro- β -muricholic acid*, T- β -MCA). Im Zusammenhang mit der erhöhten Konzentration an Gallensäuren in der Leber von WTD-gefütterten Tieren, war auch der Cholesteringehalt in der Leber nach Aktivierung des BAT erniedrigt (Anhang, Abbildung J - 6).

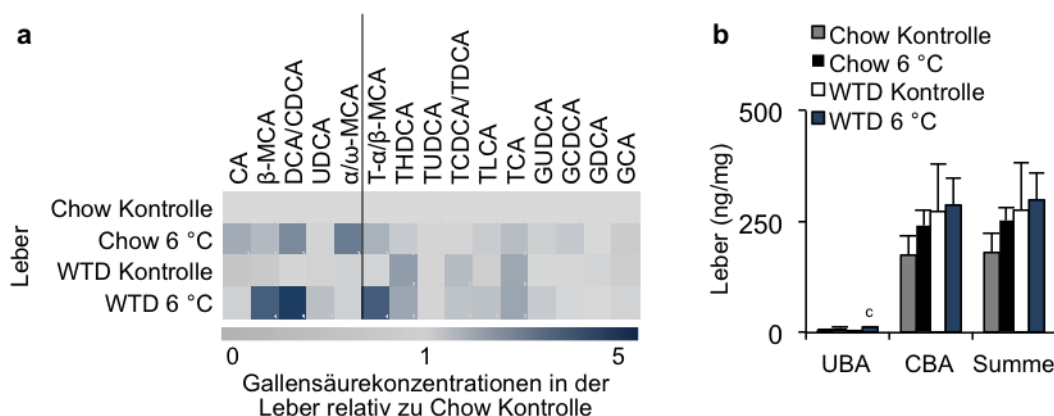


Abbildung C - 16: Gallensäureprofile in der Leber von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

C57BL6J-Tiere erhielten eine Chow- oder Western- Typ Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. (a, b) In Abhängigkeit von der Diät bzw. nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes bei 6 °C sind vor allem nach WTD-Fütterung signifikante Veränderungen der Gallensäuregehalte in der Leber zu detektieren. (CA = *cholic acid*, β -MCA = β -*muricholic acid*, DCA = *deoxycholic acid*, CDCA = *chenodeoxycholic acid*, α/ω -MCA = α/ω -*muricholic acid*, T- α/β -MCA = *tauro- α/β -muricholic acid*, THDCA = *taurohydrodeoxycholic acid*, TUDCA = *tauroursodeoxycholic acid*, TCDCA/TDCA = *taurochenodeoxycholic acid/taurodeoxycholic acid*, TLCA = *tauroolithocholic acid*, TCA = *taurocholic acid*, GUDCA = *glycoursodeoxycholic acid*, GCDCA = *glycochenodeoxycholic acid*, GDCA = *glycodeoxycholic acid*, GCA = *glycocholic acid*, UBA = unkonjugierte Gallensäuren, CBA = konjugierte Gallensäuren; n = 6; die Messung der Gallensäuren erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS; Daten unter (a) sind relativ zu Chow gefütterten Kontrolltieren dargestellt; c P < 0,05 vs. WTD Kontrolle)

2.2 Auswirkungen der pharmakologischen Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Wie bereits unter Teil B, 3.2.1.1 genau beschrieben, unterliegt die Gallensäuresynthese einer starken Regulation. Im Falle zu hoher endogener Gallensäurekonzentrationen wird unter anderem der Transkriptionsfaktor FXR aktiviert. Daraus resultiert die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors SHP in den Hepatocyten, wodurch über einen *feedback*-Mechanismus die Expression von *Cyp7a1* reduziert wird, welches somit in einer Reduktion in der Synthese von Gallensäuren resultiert. In den unter Teil C, 2.1.2 dargestellten Ergebnissen zur Genexpression in der Leber war in den Chow-gefütterten Tieren eine Reduktion der RNA-Menge an *Nr0b2* (SHP) zu detektieren, welches in Chow- gefütterten Tieren zu einem konsekutiven Anstieg in der Expression von *Cyp7a1* führte.

Obwohl auch in den WTD- gefütterten Tieren eine Reduktion an *Nr0b2* (SHP) zu messen war und eine damit einhergehende Erhöhung in der Konzentration an Gallensäuren in der Leber (Teil C, 2.1.3), erfolgte keine Beeinflussung der Expression von *Cyp7a1*, jedoch von *Cyp7b1*. Über eine FXR-SHP-regulierte Expression von *Cyp7b1* und somit Regulierung der alternativen Gallensäuresynthese sind bislang keine Studien publiziert.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchung einer FXR-abhängigen Regulation des alternativen Gallensäuresyntheseweges nach einwöchiger Aktivierung des BAT dargestellt. Die Analyse hierzu erfolgte ausschließlich in WTD- gefütterten Tieren, da in diesem Fall keine Regulation von *Cyp7a1* nachzuweisen war. Die Aktivierung des FXR erfolgte durch orale Gavage des FXR-Agonisten Phenex21228 (PX) (0,2 mg in Olivenöl gelöst) einmal pro Tag an drei Tagen vor der Organentnahme. Mock-behandelte Tiere erhielten Olivenöl.

Die zugrundeliegende Hypothese war, dass im Falle einer FXR-SHP-abhängigen Regulation von *Cyp7b1* die nach Aktivierung des BAT induzierte Gallensäuresynthese vermindert sein sollte.

Abbildung C - 17 a-c zeigt die Konzentration an Gallensäure in der Leber. Nach Aktivierung des BAT durch Kälte und ohne pharmakologische Intervention (, WTD Kontrolle' vs. WTD 6 °C') waren die bereits in Teil C, 2.1.3 vorgestellten Ergebnisse nachzuweisen. Es ergaben sich lediglich kleine Abweichungen, die durch die orale Gavage mit Olivenöl bedingt sein könnten. Die Ergebnisse der Analyse von FXR-regulierten Genen sowie *Cyp7b1* (Abbildung C - 17 d) zeigten ebenfalls die bereits vorgestellten Veränderungen (Abbildung C - 15 a, b).

Im Vergleich der Kontrolltiere mit und ohne FXR-Aktivierung durch PX (, WTD Kontrolle' vs. , WTD Kontrolle PX') waren keinerlei Änderungen in der Konzentration der UBA zu detektieren. Jedoch zeigte sich ein Trend hin zur Reduktion der Konzentration an TCA und T- α/β -MCA, welcher in einer ca. 50 %igen Reduktion in der Konzentration an CBA resultierte. Dieser Trend war auch im Vergleich der Mäuse nach Aktivierung des BAT mit und ohne FXR-Aktivierung durch PX (, WTD 6 °C' vs., WTD 6 °C PX') zu beobachten, wengleich die Effekte nicht entsprechend ausgeprägt waren. So zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an CBA zwischen den Gruppen.

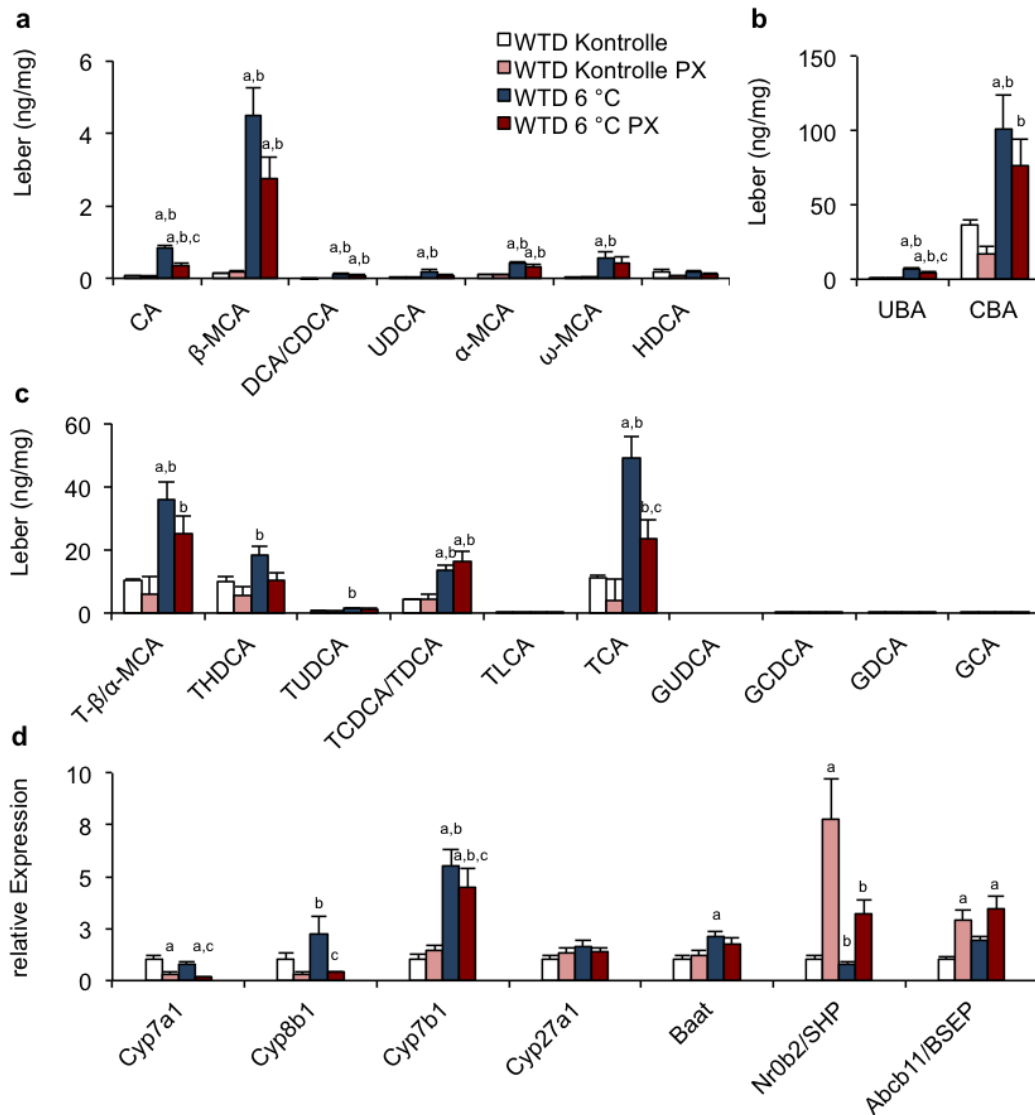


Abbildung C - 17: Gallensäure und Genexpressionsprofile in der Leber von Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren, in C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C sowie zusätzlicher pharmakologischer Aktivierung des Transkriptionsfaktors FXR

C57BL/6J-Tiere erhielten eine Western Typ Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. Die Aktivierung des *Farnesoid-X-Rezeptors* (FXR) erfolgte durch orale Gavage des FXR-Agonisten Phenex21228 (PX) (0,2 mg in Olivenöl gelöst) einmal pro Tag an drei Tagen vor der Organentnahme. Mock-behandelte Tiere erhielten Olivenöl. Konzentrationen an *unconjugated bile acids* (UBA, a), *conjugated bile acids* (CBA, c) und deren Summe (b) in der Leber von Kontrolltieren, Kälte-adaptierten Mäusen oder Tieren mit zusätzlicher PX-Behandlung. (d) mRNA-Expression von Genen, die am Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel beteiligt sind. (CA = *cholic acid*, β-MCA = *β-muricholic acid*, DCA = *deoxycholic acid*, CDCA = *chenodeoxycholic acid*, α-MCA = *α-muricholic acid*, ω-MCA = *ω-muricholic acid*, HDCA = *hyodeoxycholic acid*, T-α/β-MCA = *tauro-α/β-muricholic acid*, THDCA = *taurohyodeoxycholic acid*, TUDCA = *tauroursodeoxycholic acid*, TCDCa/TDCA = *taurochenodeoxycholic acid/taurodeoxycholic acid*, TLCA = *tauroolithocholic acid*, TCA = *taurocholic acid*, GUDCA = *glycoursodeoxycholic acid*, GCDCA = *glycochenodeoxycholic acid*, GDCA = *glycodeoxycholic acid*, GCA = *glycocholic acid*, UBA = unkonjugierte Gallensäuren, CBA = konjugierte Gallensäuren; n = 6; die Messung der Gallensäuren erfolgte mittels LC-MS/MS; die Messung der mRNA-Expression erfolgte mittels der TaqMan Technologie, Daten sind zunächst auf *Tbp* normalisiert und letztendlich als relative Expression im Vergleich zu WTD Kontrolle dargestellt; a $P < 0,05$ vs. WTD Kontrolle; b $P < 0,05$ vs. WTD Kontrolle PX; c $P < 0,05$ vs. 6 °C)

Die Regulation auf Genexpressionsebene (Abbildung C - 17 d) nach Aktivierung von FXR war dagegen deutlicher. Sowohl im Vergleich der Kontrolltiere untereinander als auch im Vergleich der Tiere nach Aktivierung des BAT war eine deutliche Reduktion der FXR-

Zielgene *Cyp7a1* und *Cyp8b1* zu detektieren. Im Gegensatz dazu war die Expression von *Acb11* und *Nr0b2* deutlich erhöht. Im Falle der Expression von *Nr0b2* ist jedoch auffällig, dass der Kältereiz in PX-behandelten Tieren (, WTD 6 °C PX') zu einer reduzierten Induktion im Vergleich zu den Kontrolltieren (, WTD Kontrolle PX') führte.

Weiterhin wird aus den Expressionsdaten ersichtlich, dass die Behandlung mit dem FXR-Agonisten keinerlei Auswirkungen auf die Expression von *Cyp7b1* hat.

Diese Daten zeigen, dass die Regulation des alternativen Gallensäuresyntheseweges (Teil A, 3.2.1.1,3.2.1.3) über *Cyp7b1* unabhängig vom Transkriptionsfaktor FXR ist. Weiterhin wird aus den Ergebnissen ersichtlich, dass eine PX-Behandlung nach Aktivierung des BAT, trotz verminderter Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1*, die Konzentration an Gallensäuren in der Leber nicht signifikant beeinflusst.

2.3 Quantifizierung der fäkalen Elimination von Gallensäuren in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Im nächsten Schritt sollte aufgeklärt werden, ob die durch Aktivierung des BAT induzierten hepatischen Veränderungen in der Gallensäuresynthese ebenfalls zu einer erhöhten fäkalen Elimination an Gallensäuren führt.

Wie aus den Ergebnissen von Teil C, 2.1 hervorgeht, wiesen Chow- im Vergleich zu WTD-gefütterten Tieren eine unterschiedliche Regulation in der Genexpression nach Aktivierung des BAT auf. Weiterhin spiegelte sich dieses auch in der Konzentration an Gallensäuren in der Leber wider. Aufgrund dieser Tatsachen erfolgte die Untersuchung wie in Teil C, 2.1 in C57BL/6J-Mäusen, die eine Chow- oder WTD- Diät erhielten. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgte über eine Woche bei 6 °C. Eine respektive Kontrollgruppe wurde bei 27 °C gehalten. Für die LC-MS/MS-basierte Analyse (Teil B, 7) wurde in einem Zeitraum über 24 Stunden vor der Organentnahme der Fäzes gesammelt und zur Analyse herangezogen.

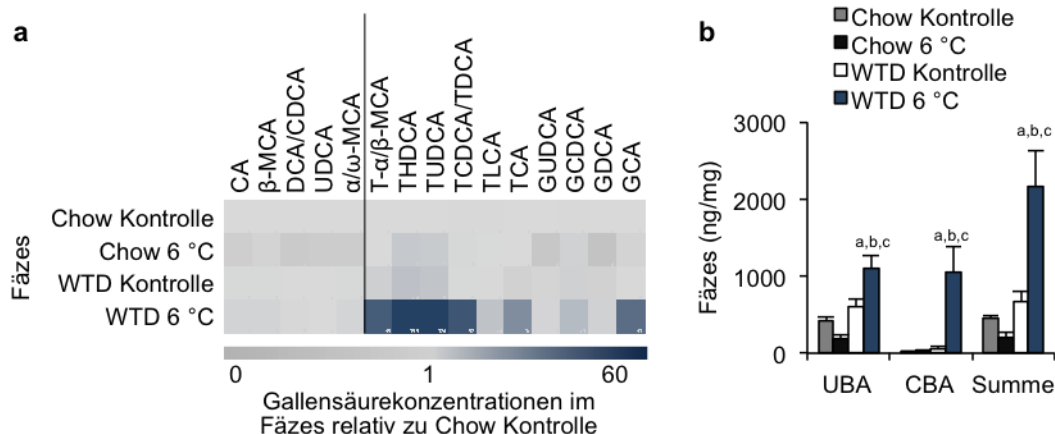


Abbildung C - 18: Gallensäureprofile Fäzes von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

C57BL/6J-Tiere erhielten eine Chow- oder Western Typ- Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. 24 Stunden Der 24 h-Fäzes wurde im Zeitraum vor der Organentnahme gesammelt und zur Analyse herangezogen. (a, b) Im Gegensatz zu Chow gefütterten Tieren ist nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes bei 6 °C in WTD-gefütterten Tieren ein signifikanter Anstieg der Gallensäuregehalte im Fäzes zu detektieren. (CA = *cholic acid*, β -MCA = *β -muricholic acid*, DCA = *deoxycholic acid*, CDCA = *chenodeoxycholic acid*, α/ω -MCA = *α/ω -muricholic acid*, T- α/β -MCA = *tauro- α/β -muricholic acid*, THDCA = *taurohyodeoxycholic acid*, TUDCA = *tauroursodeoxycholic acid*, TCDCa/TDCa = *taurochenodeoxycholic acid /taurodeoxycholic acid*, TLCA = *tauroolithocholic acid*, TCA = *taurocholic acid*, GUDCA = *glycoursodeoxycholic acid*, GCDCA = *glycochenodeoxycholic acid*, GDCA = *glycodeoxycholic acid*, GCA = *glycocholic acid*, UBA = unkonjugierte Gallensäuren, CBA = konjugierte Gallensäuren; n = 6; die Messung der Gallensäuren erfolgte mittels LC-MS/MS; Daten unter (a) sind relativ zu Chow gefütterten Kontrolltieren dargestellt; a $P < 0,05$ vs. Chow Kontrolle; b $P < 0,05$ vs. Chow 6 °C; c $P < 0,05$ vs. WTD Kontrolle)

Wie die in Abbildung C - 18 a gezeigte Heatmap darlegt, sind im Vergleich der Gruppen ‚Chow Kontrolle‘ und ‚WTD Kontrolle‘ nur äußerst schwache Unterschiede im Gallensäureprofil zu detektieren. Dies zeigt sich auch bei Vergleich der Konzentrationen an UBA, CBA und der Summe aller Gallensäuren (Abbildung C - 18 b). Wie weiterhin aus Abbildung C - 16 b hervorgeht, machen die UBA, anders als in der Leber (Abbildung C - 16 b), einen Hauptanteil der Summe aller Gallensäurespezies aus.

Eine Aktivierung des BAT in Chow- gefütterten Tieren führte in der Zusammensetzung der Gallensäurespezies im Fäzes zu lediglich minimalen Veränderungen (Abbildung C - 18 a). Wie die Darstellung der absoluten Konzentrationen im Fäzes (Abbildung C - 16 b) zeigen, war die Konzentration an UBA nach Aktivierung des BAT erniedrigt, wohingegen in der Ausscheidung der CBA keine Änderungen zu detektieren waren.

In WTD- gefütterten, BAT- aktivierten Tieren waren teils drastische Veränderungen in der Zusammensetzung der Gallensäurespezies im Vergleich zu den Kontrolltieren zu detektieren. Diese traten vor allem in der Klasse der CBA auf (vgl. hierzu auch Abbildung C - 16 b). So waren beispielsweise die Konzentrationen an T- β/α -MCA, THDCA, TUDCA und TCDCa/TDCa bis zu 60fach erhöht. Letztendlich führten diese Veränderungen zu einem ca. dreifachen Anstieg in der Gesamtkonzentrationen an Gallensäuren im Fäzes nach Aktivierung des BAT in WTD- gefütterten Tieren (Abbildung C - 16 b).

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung des BAT in einer diätabhängigen Veränderung in der Exkretion an Gallensäure resultiert.

2.4 Analyse des Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels in Western Typ Diät-gefütterten *ApoE*^{-/-}, *Ldlr*^{-/-} sowie *Ldlr*^{-/-} *Lrp1*^{cre+}- Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Wie die Ergebnisse aus Teil C, 2.3 zeigen, führt die Aktivierung des BAT ausschließlich in WTD- gefütterten Tieren zu einer Induktion der fäkalen Exkretion an Gallensäuren.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der fäkalen Ausscheidung von Gallensäuren nach Aktivierung des BAT von der hepatischen Aufnahme postprandial prozessierter Lipoproteine abhängig ist (Teil A, 2.1, 2.2). Dazu wurden WTD-gefütterte *ApoE*^{-/-}, *Ldlr*^{-/-} sowie *Ldlr*^{-/-} *Lrp1*^{cre+} und entsprechende *Littermates* (WT) für eine Woche bei 6 °C oder 27 °C gehalten.

2.4.1 Untersuchung der Plasmalipidkonzentration sowie der Lipoproteinprofile

Die nach Aktivierung des BAT in WTD-gefütterten C57BL/6J-Mäusen gemessene Reduktion in der Konzentration an Cholesterin in Plasma (Abbildung C - 14 d), war sowohl in *ApoE*^{-/-} (Abbildung C - 19 a), *Ldlr*^{-/-} (Abbildung C - 19 b) als auch in *Ldlr*^{-/-} *Lrp1*^{cre+} (Abbildung C - 19 c) Mäusen nicht zu beobachten. Vielmehr zeigte sich, dass insbesondere die *Ldlr*^{-/-}-Mäuse nach Aktivierung des BAT eine signifikant höhere Konzentration an Cholesterin im Plasma aufwiesen. Dieser Effekt war in *ApoE*^{-/-} und *Ldlr*^{-/-} *Lrp1*^{cre+} Tieren nicht nachweisbar, jedoch war auffällig, dass die Kontrolltiere aus diesen Gruppen basal höhere Konzentrationen an Cholesterin als *Ldlr*^{-/-}-Mäuse hatten.

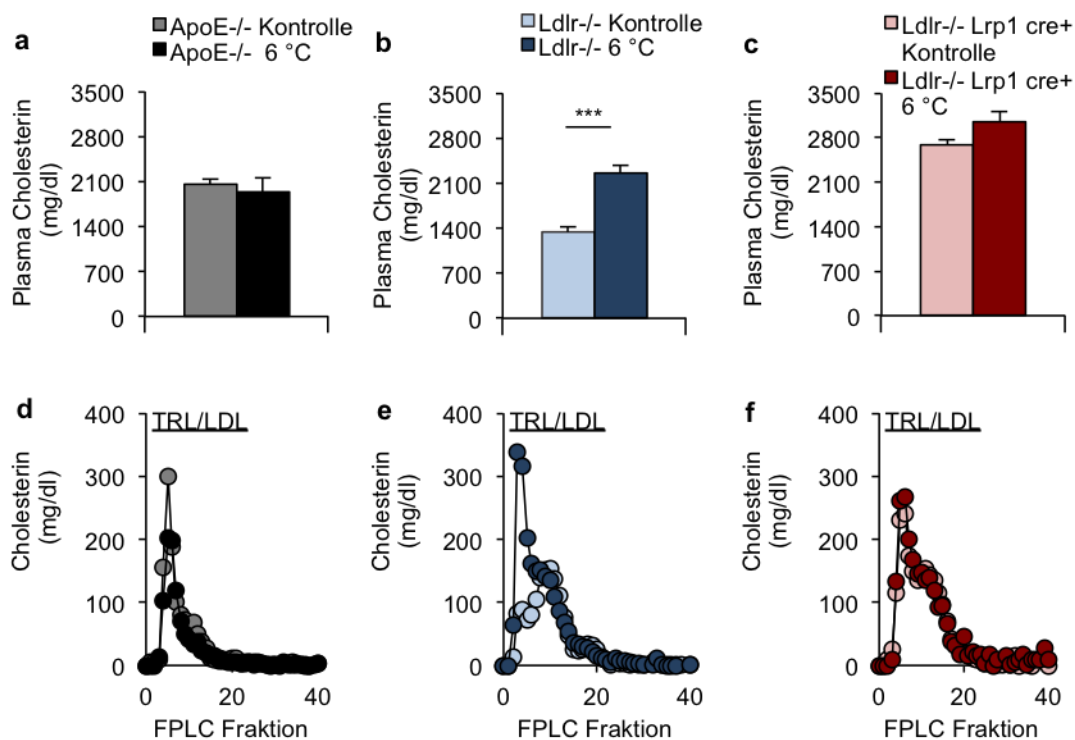


Abbildung C - 19: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von Western Typ Diät gefütterten $ApoE^{-/-}$, $Ldlr^{-/-}$ und $Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}$ -Tieren nach einwöchiger Adaption an 6 °C

Enzymatische Bestimmung der Plasmalipide und korrespondierende *fast performance liquid chromatography* (FPLC) Profile in $ApoE^{-/-}$, $Ldlr^{-/-}$ und $Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}$ - Tieren. Mäuse erhielten Western Typ Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. Nach Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) durch Kälte ist im Plasma von $ApoE^{-/-}$ -Tieren (a) die Konzentration von Cholesterin im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Im Gegensatz dazu erfolgt sowohl in $Ldlr^{-/-}$ (b)- als auch in $Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}$ (c)- Tieren ein Anstieg der Plasma Cholesterin-Level nach BAT Aktivierung. (d-e) Die korrespondierenden Lipoproteinprofile zeigen analog zu den Änderungen in der Konzentration an Plasma Cholesterin einen Anstieg in den TRL- Cholesterinwerten. (TRL = *triglyceride rich lipoprotein*, HDL = *high density lipoprotein*; n = 4-8; ***P < 0,001)

Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in den jeweiligen, korrespondierenden Lipoproteinprofilen (Abbildung C - 19 d-f) wider. Auch hier wiesen insbesondere $Ldlr^{-/-}$ -Mäuse nach Aktivierung des BAT eine Erhöhung in der Konzentration an TRL im Plasma auf.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die hepatische Aufnahme cholesterinreicher, postprandialer Lipoproteine für die Reduktion in der Konzentration an Plasmacholesterin und insbesondere an TRL-Cholesterin nach Aktivierung des BAT verantwortlich ist.

2.4.2 Gallensäureanalytik im Fäzes

Die Analyse der Gallensäurekonzentration im Fäzes über eine LC-MS/MS-basierte Methodik (Teil B, 7) ergab, dass sowohl $ApoE^{-/-}$, $Ldlr^{-/-}$ - als auch $Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}$ -Tiere niedrigere Konzentrationen an Gallensäurespezies aus der Gruppe der UBA (z.B. CA) und der CBA (z.B. TCDCA, TDCA, und T- α/β -MCA) im Vergleich zu den WT-Tieren nach Aktivierung des BAT aufwiesen (Abbildung C - 20 a, b).

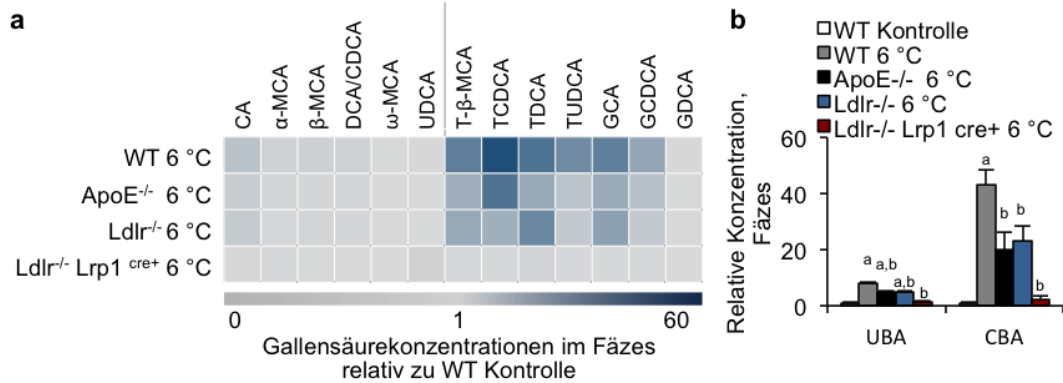


Abbildung C - 20: Gallensäureprofile Fäzes von Western Typ Diät gefütterten C57BL/6J-, ApoE^{-/-}, Ldlr^{-/-} and Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}-Tieren nach einwöchiger Adaption an 6 °C

C57BL/6J (WT)-, ApoE^{-/-}-, Ldlr^{-/-}- und Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}-Tiere erhielten eine Western Typ Diät (WTD, 0,2 % Cholesterin) *ad libitum* und wurden bei 27 °C (Kontrolle) oder 6 °C für eine Woche gehalten. 24 Stunden Fäzes wurde im Zeitraum vor der Organentnahme gesammelt und zur Analyse herangezogen. (a, b) Die durch Aktivierung des braunen Fettgewebes (BAT) initiierte Exkretion an Gallensäuren über den Fäzes, ist in ApoE^{-/-}-, Ldlr^{-/-}- und Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}-Tieren abgeschwächt. (CA = cholic acid, β -MCA = β -muricholic acid, DCA = deoxycholic acid, CDCA = chenodeoxycholic acid, α -MCA = α -muricholic acid, ω -MCA = ω -muricholic acid, UDCA = ursodeoxycholic acid, T- β -MCA = tauro- β -muricholic acid, THDCA = taurohyodeoxycholic acid, TUDCA = tauroursodeoxycholic acid, TCDCA/TDCa = taurochenodeoxycholic acid/taurodeoxycholic acid, TLCA = tauroolithocholic acid, TCA = taurocholic acid, GUDCA = glyoursodeoxycholic acid, GCDCA = glyochenodeoxycholic acid, GDCA = glycodeoxycholic acid, GCA = glyocholic acid, UBA = unkonjugierte Gallensäuren, CBA = konjugierte Gallensäuren; n = 4-8; die Messung der Gallensäuren erfolgte mittels LC-MS/MS; Daten unter (a) sind relativ zu C57BL/6J- Kontrolltieren dargestellt; a $P < 0,05$ vs. WT Kontrolle; b $P < 0,05$ vs. WT 6 °C)

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der durch Aktivierung des BAT induzierte Anstieg in der Exkretion an Gallensäuren in ApoE^{-/-}- und Ldlr^{-/-}- Mäusen um 50 % reduziert war. In BAT-aktivierten Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}-Tieren war die Konzentration an UBA und CBA sogar vergleichbar mit der im Fäzes von nicht-aktivierten WT-Kontroll-Tieren.

Teil D Diskussion

Derzeit leiden weltweit mehr Menschen an Überernährung als an Unterernährung (Haslam und James 2005; Rosen und Spiegelman 2014). Überernährung, welche häufig mit einer Adipositas-Erkrankung einhergeht (BMI > 30), begünstigt die Entwicklung einer Vielzahl an sekundären Erkrankungen, wie beispielsweise der Insulinresistenz sowie Typ-2-Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Atherosklerose, der nicht-alkoholischen Fettleber oder auch malignen Krebserkrankungen (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2006; Park, Euhus et al. 2011).

Die mit einer Adipositas-Erkrankung zusammenhängenden Beeinträchtigungen vaskulären Lipidstoffwechsels cholesterinreicher Lipoproteine können vor allem die Entstehung von Atherosklerose fördern (Teil A, 4). Als Hauptrisikofaktor dieser Erkrankung gilt insbesondere das Auftreten hoher LDL-Cholesterinwerte bei gleichzeitig, niedriger Konzentration an HDL-Cholesterin (Lewington, Whitlock et al. 2007; Ference, Yoo et al. 2012). Cholesterin kann zellulär nicht vollständig abgebaut werden. Auf Grund dessen erfolgt ein bedeutender Anteil der Ausscheidung von Cholesterin bei Säugetieren über die hepatobiliäre Route. Diese beinhaltet die Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin in der Leber und die anschließende fäkale Exkretion. Die Leber übernimmt hierbei eine wichtige Stellung im Erhalt der systemischen Cholesterinhomöostase, indem sie am Metabolismus von VLDL und HDL (Teil A, 2.2, 2.3), der Aufnahme von CR (Teil A, 2.1) sowie der Synthese von Cholesterin (Teil A, 3.1) und Gallensäuren (Teil A, 3.2.1.1) beteiligt ist.

In einer murinen Studie in hyperlipidämischen E3L.CETP konnte von Berbee, Boon et al. (2015) gezeigt werden, dass die Aktivierung des BAT in einer verstärkten hepatischen Aufnahme von CR resultiert, welches letztendlich die Entwicklung von Atherosklerose minimierte. Dennoch ist in diesem Zusammenhang noch nicht bekannt, in welcher Weise die Leber das aufgenommene Cholesterin verstoffwechselt und ob ein HDL-vermittelter RCT das geringere Auftreten von Atherosklerose nach Aktivierung des BAT miterklärt. Die beiden zuletzt angesprochenen Punkte gehörten zu den Hauptforschungsinhalten der vorliegenden Arbeit und sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

1 Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf die intravaskuläre Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen und dessen Einfluss auf einen HDL-vermittelten reversen Cholesterintransport

1.1 Einfluss von aktiviertem braunem und beigem Fettgewebe auf die periphere und hepatische *de novo* Lipogenese und daraus resultierende Alterationen der Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL

Als murines Modell mit einer genetischen Störung des Lipoproteinstoffwechsels, welche mit einer ausgeprägten Hypertriglyzeridämie assoziiert ist, wurden *ApoA5*-defiziente Mäuse zur Untersuchung herangezogen (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Die erhaltenen Resultate der Plasmatriglyzeridgehalte sowie die korrespondierenden Lipoproteinprofile zeigen, dass sowohl durch einwöchige Adaption an 6 °C als auch eine spezifische β_3 -adrenerge Stimulation über CL zu einer drastischen Reduktion in der Gesamtriglyzeridkonzentration im Plasma führt (Abbildung C - 1 a). Diese geht mit einer Reduktion an TRL-Triglyzeriden einher (Abbildung C - 1 b). Analoge Beobachtungen konnten bereits nach eintägiger Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C) gemacht werden (Bartelt, Bruns et al. 2011). Bisher nicht bekannt in diesem Zusammenhang war, dass trotz keiner Änderungen im Gehalt an Gesamtcholesterin im Plasma (Abbildung C - 1 c), eine signifikante Verschiebung von TRL-Cholesterin hin zu erhöhten HDL-Cholesterinspiegeln (Abbildung C - 1 d) zu messen waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die in Folge einer Aktivierung des BAT einsetzende verstärkte Lipolyse zu einer Reduktion an TRL führt und die entstehenden *surface remnants* für den Anstieg an HDL-Cholesterin verantwortlich sind (Teil A, 2.3) (Eisenberg und Olivecrona 1979). Dieser Sachverhalt erklärt auch, dass eine Aktivierung des BAT in C57BL/6J-Mäusen, welche sehr niedrige Konzentrationen an TRL aufweisen, zu keinem Anstieg an HDL-Cholesterin führt (Abbildung C - 8 b und Abbildung C - 14 e). In diesem Kontext konnte auch in erwachsenen Menschen gezeigt werden, dass eine wiederholte Cryostimulation zu einer Reduktion nach Plasma-TRL und einem Anstieg an HDL-Cholesterin führt (Lubkowska, Banfi et al. 2010). Auch konnte das Vorkommen von UCP1 in epicardialem Fettgewebe mit einer Erniedrigung an TRL sowie einer Erhöhung an HDL-Cholesterin in Verbindung gebracht werden (Chechi, Blanchard et al. 2013).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen erhöhten HDL-Cholesterin-Werten und der Lipidkomposition der Lipoproteinpartikel besteht. Obwohl die semiquantitative Lipidomanalyse isolierter TRL- und HDL-Partikel keine Rückschlüsse auf eine Veränderung der Lipidklassenverteilung in Folge einer Aktivierung des BAT ergab (Abbildung C - 2), zeigten sich sowohl nach Adaption an die Kälte als auch nach Behandlung mit CL vergleichbare Unterschiede in den prozentualen Verteilungen der Lipidspezies

innerhalb der einzelnen Lipidklassen (Abbildung C - 3 a und b). Anhand dieser Ergebnisse war eine Anreicherung von TGs und PCs, welche *de novo* synthetisierte Fettsäuren (z.B. C16:1 oder C18:1 als Bestandteil von TG52:3) enthalten, zu vermuten. Im Vergleich mit diesen Resultaten wiesen auch aus C57BL/6J-Mäusen isolierte TRL und HDL analoge Änderungen in der Komposition der Lipidspezies auf (Abbildung C - 5 und Abbildung J - 1), obwohl, wie bereits beschrieben, keine Abweichungen der HDL-Cholesterin-Konzentration zu messen waren (Abbildung C - 8 b und Abbildung C - 14 e). Dies zeigt, dass unabhängig von der Konzentration an HDL-Cholesterin oder der Art der Aktivierung des BAT vorwiegend parallele Veränderungen in der Lipidkomposition der Lipoproteine auftreten.

In Folge einer Aktivierung des BAT konnte weiterhin sowohl in isolierten Lipoproteinen als auch in verschiedenen Gewebetypen und in diversen Mausmodellen in der Lipidklasse der LysoPC ein reproduzierbarer Anstieg des LysoPC18:0 identifiziert werden. Auch die Aktivierung des BAT in einer humanen Kohorte führte in schlanken Probanden zu einer Anreicherung des LysoPC16:0 in isolierten HDL, wohingegen in adipösen Probanden keine Unterschiede nachzuweisen waren. Wie bereits beschrieben (Teil A, 1.4), korreliert das Vorhandensein von braunem Fett in erwachsenen Menschen negativ mit dem BMI (Saito, Okamatsu-Ogura et al. 2009; van Marken Lichtenbelt, Vanhommerig et al. 2009). Diese Ergebnisse suggerieren, dass verschiedene LysoPC speziesabhängig als Indikatoren für die Aktivierung des BAT dienen könnten. Diese Resultate sollten in weiterführenden Studien validiert werden. Weiterhin interessant in diesem Zusammenhang ist, welches das für die Bildung der spezifischen LysoPC verantwortliche Enzym ist und ob die Anreicherung der jeweiligen LysoPC funktionelle Auswirkungen auf den Metabolismus hat. Die Synthese von LysoPC ist von der Aktivität verschiedenen Phospholipasen abhängig: Die intravaskuläre Bildung von in Lipoproteinen enthaltenen LysoPC wird durch die HL (Ameis, Stahnke et al. 1990), die EL (Jaye, Lynch et al. 1999; McCoy, Sun et al. 2002) sowie LCAT (McLean, Fielding et al. 1986; Jonas 2000) vermittelt. Aktivitätsänderungen der HL, der EL sowie LCAT führen zu einem veränderten Phospholipidgehalt der HDL, welches sowohl den RCT als auch den HDL-Metabolismus beeinflussen soll (Teil D, 1.2) (Strauss, Zimmermann et al. 2002; Brown, Lagor et al. 2010). LCAT katalysiert zudem die Aufnahme von Cholesterin auf HDL aus extrahepatischen Geweben. Im Zuge einer Umesterungsreaktion erfolgt der Transfer einer freien Fettsäure aus einem PC auf das Cholesterin und die Bildung eines LysoPC sowie eines CE. Auch die Aktivität der LCAT wird in Verbindung mit der Entstehung von Atherosklerose und den anti-inflammatorischen Eigenschaften von HDL in Zusammenhang gebracht (Kunnen und Van Eck 2012; Petropoulou, Berbee et al. 2015). Die intrazelluläre Bildung von LysoPCs kann unter anderem durch die *adipocyte phospholipase A2* (AdPla) erfolgen (Duncan, Sarkadi-Nagy et al. 2008). So konnten Jaworski, Ahmadian et

al. (2009) zeigen, dass die AdPla an der parakinen und autokrinen Regulation der Lipolyse sowie an der Entstehung von Adipositas beteiligt ist.

Die Energiegewinnung in aktiviertem BAT erfolgt bevorzugt durch Oxidation von Fettsäuren im Vergleich zu Glukose (Van den Brandt und Trayhurn 1981; Vaillancourt, Haman et al. 2009). Jedoch ist auch bekannt, dass eine Aktivierung des BAT mit einer verbesserten oralen Glukosetoleranz (Bartelt, Bruns et al. 2011; Stanford, Middelbeek et al. 2013) und - wie in dieser Arbeit beschrieben - einer Induktion der *de novo* Synthese von Fettsäuren aus nicht-Lipid-Edukten einhergeht. In diesem Kontext ist anzuführen, dass bereits ältere sowie auch aktuelle Studien von einem Anstieg der DNL in den Fettgeweben nach Aktivierung des BAT durch CL oder Kälte berichtet haben (Trayhurn 1979; McCormack 1982; Mottillo, Balasubramanian et al. 2014). So konnte Trayham (1979) einen moderaten Anstieg der hepatischen DNL in Ratten nach dreimonatiger Adaption an 4 °C nachweisen. Gegenstand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien war die Aufklärung des gewebespezifischen Einflusses des DNL auf die Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL. Dazu erhielten Mäuse entweder eine einmalige, die Lipolyse-initiierende, , akute CL-Behandlung ‘, eine chronische CL-Behandlung über 7 Tage oder eine eine Kombination aus chronischer und akuter Behandlung mit CL. Die akute Behandlung mit CL zeigte, dass durch Lipolyse freigesetzte Fettsäuren, wie beispielsweise Palmitölsäure (C16:1n-7), aus dem BAT und WAT in der Leber, TRL und HDL akkumulierten (Abbildung C - 5 a und Abbildung J - 2). Dies spiegelten auch die Konzentrationen an Gesamttriglyzeriden in den Geweben wider: Auch hier war in der Leber ein signifikanter Anstieg in der Konzentration an Triglyzeriden zu messen. Im Jahr 2008 wurde Palmitölsäure als Lipokin beschrieben, einem aus dem Fettgewebe sezerniertem Lipidhormon, welches Insulinresistenz reduziert und das Fortschreiten einer hepatischen Steatose unterdrückt (Cao, Gerhold et al. 2008; Yang, Miyahara et al. 2011).

Eine chronische Behandlung mit CL führte zu einer Verschiebung des Triglyzeridprofils. So sind vermehrt Triglyzeride mit *de novo* synthetisierten Fettsäuren (z.B. Ölsäure C18:1n-9) und entsprechend verringert Triglyzeride mit essentiellen, diätetischen Fettsäuren (z.B. Linolsäure C18:2n-6) in allen Organen und Lipoproteinpartikeln nachzuweisen (Abbildung C - 5 b und Abbildung J - 2). Ein Anstieg in der Konzentration an Ölsäure, dagegen nicht Linolsäure, wurde in Verbindung mit einer Reduktion an Markern für Leberschädigung im Plasma sowie einer Senkung des systolischen Blutdrucks beschrieben (Poudyal, Kumar et al. 2013). Über einen Fluxomics-Ansatz wurde die Inkorporation von Deuterium in *de novo* synthetisierte Triglyzeride und somit der Anteil an DNL nach Aktivierung des BAT durch einwöchige Adaption an 6 °C oder Behandlung mit CL in verschiedenen Geweben sowie in isolierten TRL bestimmt. Beide Arten der Aktivierung des BAT führten zu einem deutlichen Anstieg der DNL vor allem in den WAT-Depots (ingWAT und epiWAT), zu geringerem Ausmaß im

BAT, jedoch nicht in der Leber (Abbildung C - 6). Dies spiegeln ebenfalls die Genexpressionsdaten wider (Abbildung C - 7). Auch hier waren verstärkt im WAT und weniger ausgeprägt im BAT eine Stimulation der Expression von Genen, welche an der DNL beteiligt sind, zu messen. Nach oraler Gavage von radioaktiv markierter Glukose, einem Edukt der DNL, wurde eine erhöhte Aufnahme in die Fettgewebsdepots jedoch nicht in die Leber nachgewiesen (Abbildung J - 5). Zudem waren interessanterweise auch in isolierten TRL Triglyzeride, welche der DNL entstammen, nachweisbar (Abbildung C - 6).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die durch Aktivierung des BAT induzierten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der TRL (Abbildung C - 5 a, b und Abbildung C - 6) und HDL (Abbildung C - 5 a, b) ihren Ursprung im BAT und WAT haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine einwöchige Aktivierung des BAT trotz erhöhter Nahrungsaufnahme (Abbildung C - 13) in einer Induktion der DNL in den weißen Fettgewebsdepots, jedoch nicht in der Leber führt.

Eine gewebespezifische Regulation der DNL, insbesondere eine Steigerung der DNL im WAT sowie eine Reduktion der DNL in der Leber, ist mit metabolischer Gesundheit im Menschen assoziiert (Eissing, Scherer et al. 2013). Dagegen wird eine Steigerung der hepatischen DNL mit Insulinresistenz sowie NAFLD in Verbindung gebracht (Postic und Girard 2008; Eissing, Scherer et al. 2013). Weiterhin zeigte eine kürzlich publizierte Arbeit, dass die DNL im WAT zur Regulation der Glukosehomöostase beiträgt (Marcelino, Veyrat-Durebex et al. 2013).

Darüber hinaus ist eine Induktion der DNL mit der Synthese biologisch aktiver Lipidspezies assoziiert. So wurde in einer Studie von Chakravarthy, Lodhi et al. (2009) ein endogener PPAR α -Ligand identifiziert (vgl. hierzu Teil A, 1.1), welcher in Abhängigkeit von der Aktivität der Fettsäuresynthase (FAS kodiert durch: *Fasn*) synthetisiert wird. Eine andere Studie berichtete von der Synthese eines weiteren PPAR α -Liganden, welcher nach DNL-induzierter Aktivierung von PPAR δ in der Leber synthetisiert wird und in peripheren Geweben die Lipidoxidation durch Aktivierung von PPAR α induziert (Liu, Brown et al. 2013).

Zu dem jetzigen Stand der Ergebnisse ist weiterhin zu klären, welche Signale die Aktivierung der Lipogenese im Umfeld einer katabolen Stoffwechselsituation stimulieren. So wurde beispielsweise in Myocyten gezeigt, dass eine Überexpression von PGC1 α gleichzeitig die Lipidoxidation jedoch auch die DNL stimuliert (Espinoza, Boros et al. 2010). Als weiterer Mechanismus ist die über GLUT4 (Glukosetransporter Typ 4) induzierte Expression des *carbohydrate-responsive-element-binding proteins* (CHREBP; auch bekannt als MLXIPL) denkbar. CHREBP ist als transkriptioneller Aktivator von verschiedenen Genen bekannt, die essentiell an der Synthese und Regulation der DNL beteiligt sind (Herman, Peroni et al. 2012).

1.2 Einfluss der Lipoproteinlipase brauner und beiger Adipocyten auf eine Veränderung der Lipidkomposition zirkulierender HDL nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuteten daraufhin, dass die in Folge einer Aktivierung des BAT einsetzende verstärkte lipolytische Aktivität der LPL zu einer Reduktion an TRL führt (Bartelt, Bruns et al. 2011) und die entstehenden *surface remnants* für den Anstieg an HDL-Cholesterin verantwortlich sind (Teil A, 2.3; Teil D, 1.1) (Eisenberg und Olivecrona 1979). In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass SNPs im Gen für LPL mit reduzierten Konzentrationen an Plasma-HDL-Cholesterin assoziiert ist (Teslovich, Musunuru et al. 2010; Asselbergs, Guo et al. 2012). Die Aktivierung des BAT in Mäusen mit adipocytenspezifischer LPL-Defizienz resultierte bemerkenswerterweise in einem Anstieg der Konzentration an Gesamttriglyzeriden im Plasma, welches mit einem Anstieg an TRL einherging (Abbildung C - 8 d und f). Dies ist durch die reduzierte Aufnahme an TRL durch das BAT oder beige Adipocyten bei gleichzeitig erhöhter Nahrungszufuhr zu erklären. Daneben ergab auch die Lipidomanalyse, dass die durch eine Aktivierung des BAT induzierten Veränderungen in der Lipidspezies-Zusammensetzung isolierter TRL und HDL abgeschwächt waren (Abbildung C - 9): So zeigte sich, dass in den Lipidklassen der PCs, LysoPCs und CEs im Vergleich zu den Kontrollen noch schwache Veränderungen nachweisbar waren, welche jedoch in der Klasse der TGs nur noch residual zu detektieren waren. Dies ist dadurch zu erklären, dass die LPL eine hohe Substratspezifität für TGs aufweist, wobei Phospholipid-metabolisierende Lipasen, wie die EL stets exprimiert werden (McCoy, Sun et al. 2002; Kratky, Zimmermann et al. 2005; Yasuda, Ishida et al. 2010; Bartelt, Weigelt et al. 2013). Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die lipolytische Prozessierung der TRL seitens der LPL maßgebend an der Zusammensetzung der TGs in zirkulierenden HDL beteiligt ist. In Verbindung mit vorausgegangenen Studien (Teslovich, Musunuru et al. 2010; Asselbergs, Guo et al. 2012) lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die in Abhängigkeit von der LPL veränderte HDL-Komposition, mit einer veränderten HDL-Funktionalität einhergeht. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression der EL zu einer veränderten Zusammensetzung der HDL führt, welches letztendlich in einer gesteigerten hepatischen Aufnahme von Cholesterylestern über SR-BI führt (Nijstad, Wiersma et al. 2009).

1.3 Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf einen HDL-vermittelten reversen Cholesterin-Transport

Wie im vorherigen Abschnitt dargelegt, ließ die nach BAT-Aktivierung in Abhängigkeit von der LPL beeinflusste Lipidzusammensetzung der HDL annehmen, dass dies in einer veränderten Funktionalität der HDL resultiert.

Wie bereits in Teil A, 2.3 aufgeführt, werden HDL multifunktionale Eigenschaften zugeschrieben (Calabresi, Gomaraschi et al. 2003; Calabresi, Rossoni et al. 2003; Navab, Ananthramaiah et al. 2004; von Eckardstein, Hersberger et al. 2005; Besler, Luscher et al. 2012). Nennenswert in diesem Zusammenhang ist der durch HDL-vermittelte RCT, welcher als therapeutisch relevanter Ansatz zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen gilt (Rader, Alexander et al. 2009; Fisher, Feig et al. 2012; Rosenson, Brewer et al. 2012).

Messungen des HDL-Umsatzes in C57BL/6J-Mäusen zeigten, dass die β_3 -adrenerge Stimulation zu einem beschleunigten Umsatz der Kernlipide von HDL im Plasma führte (Abbildung C - 10 a), wohingegen im Proteinanteil keine Änderungen zu messen waren (Abbildung C - 10 b). Als Konsequenz daraus war auch die selektive Aufnahme von ^3H -Cholesterylethern nach 120 min in der Leber erhöht (Abbildung C - 10 c). Dies deutet darauf hin, dass die Aufnahme der Lipide im Kern der HDL unabhängig von der Aufnahme des gesamten Partikels nach Aktivierung des BAT beschleunigt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die beschleunigte hepatische Aufnahme der Kernlipide in BAT-aktivierten Mäusen abhängig von SR-BI erfolgt (Abbildung C - 11) (Acton, Rigotti et al. 1996; Brundert, Ewert et al. 2005). Im Zusammenhang damit konnte anhand eines RCT-Assays gezeigt werden, dass in Folge einer Aktivierung des BAT ein beschleunigter Export von Cholesterin aus Makrophagen über die Leber in den Fäzes erfolgt (Abbildung C - 12).

Diese und vorherig diskutierte Resultate suggerieren, dass durch die Aktivierung des BAT eine veränderte Lipidkomposition sowie die lipolytische Prozessierung der TRL induziert wird (Teil D, 1.1, 1.2). Letzteres resultiert in einer verstärkten Bildung von *surface remnants* (Teil D, 1.1), aus welchen, bedingt durch ihre veränderte Zusammensetzung, reife HDL mit eventuell veränderter Funktionalität entstehen. Trotz der in C57BL/6J-Mäusen unveränderten Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma, konnte eine Induktion des HDL-Umsatzes und des RCT in BAT-aktivierten Mäusen nachgewiesen werden. Wie bereits in Teil A, 4 aufgeführt, ist ein derzeitiger Therapie-Ansatz zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen die Erhöhung der Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma. Dies erfolgt einerseits über die Gabe von Niacin oder durch die pharmakologische Inhibierung von CETP (Dalcetrapib). In zwei klinischen Studien (AIM-HIGH-Studie, dal-OUTCOMES-Studie) konnten jedoch keine eindeutigen Behandlungserfolge nachgewiesen werden (Schwartz, Olsson et al. 2009; Boden, Probstfield et al. 2011).

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die verhältnismäßig neue „*HDL-Flux-Hypothese*“ (Rader und Tall 2012): Diese besagt, dass nicht die Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma, sondern vielmehr die Erhöhung der Kapazität des HDL-vermittelten Cholesterol-Efflux und RCT als eine mögliche therapeutische Intervention zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen herangezogen werden sollte (Khera, Cuchel et al. 2011; Rohatgi, Khera et al. 2014).

Eine Option, die hier erhaltenen Ergebnisse weiter zu validieren und die Hypothese, dass in Folge der lipolytischen Prozessierung seitens der LPL die veränderte Funktionalität der HDL im direkten Zusammenhang mit einem erhöhten HDL-Umsatz und RCT steht, zu stützen, wäre die Durchführung des HDL-Turnover-Assays sowie des RCTs in Mäusen mit adipocytenspezifischer LPL-Defizienz. Da nicht nur die Zusammensetzung der Triglyzeride, sondern auch die der Phospholipide und LysoPCs in isolierten HDL stark verändert waren (Teil C, 1.1.2, 1.2), wäre es weiterhin von großem Interesse die Rolle der EL im Zusammenhang mit der Induktion des RCTs nach Aktivierung des BAT zu analysieren (Nijstad, Wiersma et al. 2009).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass durch die Aktivierung von braunen und beigen Adipocyten nicht nur durch beschleunigte Aufnahme von atherogenen CR in die Leber (Berbee, Boon et al. (2015) sondern auch durch die Stimulation des HDL-vermittelten RCT die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen reduziert bzw. verhindert wird.

2 Einfluss der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel

Wie im vorherigen Abschnitt diskutiert (Teil D, 1.3) und aus vorherigen Publikationen beschrieben ist (Berbee, Boon et al. 2015), induziert eine Aktivierung des beigen und braunen Fettgewebes eine gesteigerte Aufnahme von Plasmacholesterin in die Leber. Weiterhin ist bekannt, dass eine Aktivierung des BAT zu einem gesteigerten Energieverbrauch führt, welcher mit einer Zunahme des Appetits sowie einer erhöhten Aufnahme an Nahrung und somit auch Cholesterin einhergeht. Im Rahmen der zitterfreien Thermogenese können Glukose sowie Fettsäuren als Edukte zur Energiegewinnung eingesetzt und somit direkt katabolisiert werden, wohingegen andere Nahrungsbestandteile, wie Cholesterin, nicht direkt verstoffwechselt werden können. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die Analyse des hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels.

2.1 Diätabhängige Beeinflussung des hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Da in Abhängigkeit von der Diät unterschiedlich viel Cholesterin über die Nahrung aufgenommen wird (Abbildung C - 14) (Maxfield und Tabas 2005; Berger, Raman et al. 2015), erfolgten die Studien in C57BL/6J-Tieren, die einerseits eine Standard-Chow-Diät und andererseits eine Cholesterin-angereicherte WTD erhielten. Trotz der erhöhten Nahrungsaufnahme nach Aktivierung des BAT (Abbildung C - 13), war sowohl in Chow- als auch in WTD-gefütterten Mäusen die Konzentration an Cholesterin im Plasma im Vergleich zu den Kon-

trollen signifikant reduziert. Im Zuge dessen war in beiden Fütterungsgruppen die Konzentration an LDL-Cholesterin deutlich verringert, jedoch zeigten die Chow-gefütterten Tiere eine zusätzliche Reduktion an HDL-Cholesterin (Abbildung C - 14). Diese Resultate lassen vermuten, dass die Aktivierung des BAT zu einer gesteigerten hepatischen Aufnahme cholesterinreicher Lipoproteine, vermittelt durch den LDLR oder LRP1 erfolgt (Teil D, 2.3). Auf Genexpressionsebene konnte in beiden Fütterungsgruppen keine signifikante Regulation der hepatischen *de novo* Synthese von Cholesterin (Teil A, 3.1) festgestellt werden. Jedoch waren sowohl in den Chow- als auch in den WTD-gefütterten Tieren nach Aktivierung des BAT ein deutlicher Anstieg der Transkription von Genen, die an der Gallensäuresynthese beteiligt sind, zu messen (Abbildung C - 15). So zeigte sich, dass in Chow-gefütterten Tieren eine reduzierte Expression von *Nr0b2* (SHP) mit einer deutlichen Induktion des für den klassischen Gallensäuresyntheseweges geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms *Cyp7a1* (Teil A, 3.2.1.1 und 3.2.1.3) einherging (Abbildung C - 15 a). Dagegen waren in der Leber der WTD-gefütterten Tiere, trotz reduzierter Expression an *Nr0b2* (SHP), Gene des alternativen Gallensäuresyntheseweges, wie *Cyp7b1* und *Cyp27a1*, sowie der für den canaliculären Cholesterinefflux verantwortliche Transporter *Abcg8* signifikant induziert. Über die Messung der Gallensäurekonzentration in der Leber konnte festgestellt werden, dass sowohl in Chow-, als auch in WTD-gefütterten Mäusen der größte Anteil der Gallensäuren die CBA ausmachen (Abbildung C - 16 b). Im Vergleich zu UBA werden primär CBA über BSEP in die Canaliculi exportiert (Stieger, O'Neill et al. 1992). Weiterhin zeigte sich, dass eine Aktivierung des BAT in den Chow-gefütterten Tieren (Abbildung C - 16 b) in einem schwachen Anstieg der Konzentration einiger unkonjugierter Spezies, wie CA und β -MCA führte. Da die Induktion von CA und β -MCA vergleichbar war, ist in Chow gefütterten Tieren nicht von einer Veränderung in der Zusammensetzung des Gallensäurepools auszugehen (Pandak, Bohdan et al. 2001; Thomas, Pellicciari et al. 2008). Im Gegensatz dazu war in den WTD-gefütterten Tieren ein signifikanter Anstieg an UBA festzustellen, welches eine erhöhte Syntheserate an Gallensäuren vermuten lässt. In Verbindung damit zeigte sich, dass die Konzentration an Gesamtcholesterin in der Leber von WTD-gefütterten Tieren signifikant reduziert war (Abbildung J - 6). Weiterhin interessant war die Tatsache, dass besonders die im Vergleich zur CA hydrophilere β -MCA sowie deren Taurinkonjugat T- β -MCA nach Aktivierung des BAT in WTD-gefütterten Tieren erhöht waren. In Verbindung damit wurde beschrieben, dass hydrophilere BA den Gallensäureefflux anregen und zu einer Inhibierung der intestinalen Aufnahme an Cholesterin aus der Nahrung führen (Wang, Tazuma et al. 2003; Thomas, Pellicciari et al. 2008), welches ein kompensatorischer Effekt in Bezug auf die WTD-Fütterung sein könnte.

Diese auf Genexpressions- und Metabolitebene erhaltenen Resultate zeigen, dass erstens die hepatobiliäre Elimination von Cholesterin nach Aktivierung des BAT stimuliert ist, dass

jedoch zweitens der Weg der Gallensäuresynthese in Abhängigkeit von der Konzentration an Cholesterin in der Diät unterschiedlich ist.

2.2 Einfluss einer Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte

Aufgrund der cytotoxischen Eigenschaften von Gallensäuren, unterliegt deren Synthese einer starken Regulation (Teil B, 3.2.1.1) (Russell 2003). Dabei führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors LXR durch endogene Liganden, wie z. B. Cholesterin oder Hydroxysterolen, zu einer Induktion der Gallensäuresynthese, indem die Transkription von *Cyp7a1* initiiert wird (Peet, D. et al. 1998). Wie im vorherigen Abschnitt zusammengefasst, war jedoch lediglich in den Chow-gefütterten Mäusen nach Aktivierung des BAT eine Induktion der Genexpression von *Cyp7a1* zu messen. Als Gegenspieler des LXR gilt der Transkriptionsfaktor FXR: Dieser wird im Falle zu hoher intrazellulärer Gallensäurekonzentrationen aktiviert. Daraus resultiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SHP in den Hepatocyten, wodurch über einen *feedback*-Mechanismus die Expression von *Cyp7a1* reduziert wird (Goodwin, Jones et al. 2000), welches somit in einer Reduktion in der Synthese von Gallensäuren resultiert. In diesem Zusammenhang wurde auch beschrieben, dass Muricholate sowie UDCA als potente FXR-Antagonisten wirken, welche somit die Expression von *Nr0b2* (SHP) negativ und die von *Cyp7a1* positiv beeinflussen und in einer Erhöhung der Gallensäuresynthese resultieren (Sayin, Wahlstrom et al. 2013; Hu, Bonde et al. 2014). Die unter Teil C, 2.1.2 dargestellten Ergebnissen zur Genexpression in der Leber zeigen, dass in Chow- und WTD-gefütterten Tieren eine Reduktion der RNA-Menge an *Nr0b2* (SHP) zu detektieren war, welche jedoch nur in den Chow-gefütterten Tieren zu einem konsekutivem Anstieg in der Expression von *Cyp7a1* führte. Im Gegensatz dazu war in den Lebern der WTD-gefütterten Tiere die Expression des Gens *Cyp7b1* signifikant erhöht. Über eine FXR-SHP-regulierte Expression von *Cyp7b1* und somit Regulierung der alternativen Gallensäuresynthese sind bislang keine Studien publiziert.

Die Untersuchungen über eine eventuelle FXR-abhängige Regulation des alternativen Gallensäuresyntheseweges erfolgten ausschließlich in WTD- gefütterten Mäusen, da in diesem Fall keine Regulation von *Cyp7a1* nachzuweisen war. In weiteren Studien zur mechanistischen Klärung dieser Ergebnisse wurde durch orale Gabe eines spezifischen Agonisten FXR aktiviert. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass im Falle einer FXR-SHP-abhängigen Regulation von *Cyp7b1*, die nach Aktivierung des BAT induzierte Gallensäuresynthese vermindert sein würde. Die erzielten Daten zeigten deutlich, dass sowohl in Kontrollmäusen, die bei 22 °C gehalten wurden als auch in Tieren die bei 6 °C gehalten wurden, eine Reduktion der Expression der FXR-Zielgene *Cyp7a1* und *Cyp8b1* sowie eine Induktion von

Abcb11 (BSEP) (vgl. Teil A, 3.2.1.3 und Abbildung A - 4) zu messen war (Abbildung C - 17 d). Interessanterweise führte die Behandlung der Kontrolltiere mit dem FXR-Agonisten zwar zu einem signifikanten Anstieg in der Genexpression von *Nr0b2* (SHP), dieser war jedoch in den BAT-aktivierten Tieren nur noch als Trend nachweisbar, sodass dies spekulieren lässt, dass der Kältereiz der FXR-Aktivierung über einen bislang nicht identifizierten Mechanismus entgegenwirkt. Weiterhin war festzustellen, dass die Agonisierung von FXR keinerlei Effekte auf die Expression von *Cyp7b1* sowie *Cyp27a1* und somit auf die Gene, welche am alternativen Gallensäurestoffsyntheseweg beteiligt sind, hatte (Abbildung C - 17 d). Diese Resultate unterstützend, war anhand der Messung der Gallensäurekonzentration in der Leber ausschließlich eine signifikante Reduktion derjenigen Gallensäuren (CA und TCA) zu detektieren, welche *Cyp8b1*-vermittelt synthetisiert werden (Abbildung C - 17 a, c) (Pandak, Bohdan et al. 2001; Thomas, Pellicciari et al. 2008). Dies spiegelte sich auch in den Summen der UBA und CBA wider, wobei in dem Hauptanteil der in der Leber produzierten CBA keine Änderungen und somit keine FXR-abhängige Regulation nach BAT-Aktivierung nachzuweisen war.

Zusammenfassend führen diese Beobachtungen zu dem Schluss, dass die Regulation des alternativen Gallensäuresyntheseweges und somit die Induktion der Gallensäuresynthese in WTD-gefütterten Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes nicht unter Regulation des Transkriptionsfaktor FXR verläuft.

Über die Induktion der Expression von *Cyp7b1* sind keine detaillierten Informationen bekannt. Jedoch ist beschrieben, dass eine *Cyp7b1*-Defizienz in *ApoE*^{-/-}-Tieren bedingt durch die Akkumulation von 27-Hydroxycholesterin über die Aktivierung des Estrogenrezeptors α zur verstärkten Bildung von atherosklerotischen Plaques führt (Umetani, Ghosh et al. 2014). Daher vermuten die Autoren dieser Publikation, dass die Induktion von *Cyp7b1* zu einer Linderung von Atherosklerose führt. Für zukünftige Arbeiten wären daher die Untersuchung des Gallensäurestoffwechsels sowie die Analyse des Verlaufs kardiovaskulärer Erkrankungen in WTD-gefütterten *Cyp7b1*-defizienten Tieren nach Aktivierung des BAT von großem Interesse. Weiterhin sollte in kommenden Studien geklärt werden, welches Signal für die Induktion der Expression von *Cyp7b1* nach Aktivierung des BAT verantwortlich ist.

2.3 Einfluss der Prozessierung postprandialer Lipoproteine auf die fäkale Elimination von Gallensäuren nach Aktivierung des braunen Fettgewebes

Im nächsten Abschnitt wurde die Frage gestellt, ob die Induktion der hepatischen Gallensäuresynthese auch zu einer erhöhten Elimination von Cholesterin in Form von Gallensäuren führt. Zu diesem Zweck wurde der Gallensäuregehalt im Fäzes nach einwöchiger Aktivierung des BAT gemessen.

Obwohl die Konzentration der Gallensäuren in der Leber von Chow-gefütterten Tieren leicht erhöht (Abbildung C - 16) und die Genexpression des an der enterohepatischen Zirkulation beteiligten, basolateralen Transporters *Slc10a1* (NTCP) reduziert (Abbildung C - 15 a) war, konnte im Fäzes kein erhöhter Gehalt an Gallensäuren gemessen werden (Abbildung C - 18). Diese Resultate zeigen, dass die Aktivierung des BAT in Tieren, welche eine Cholesterin-freie Diät bekommen haben, nicht mit einer erhöhten Ausscheidung von Cholesterin in Form von Gallensäuren verbunden ist. Im Gegensatz dazu war in WTD-gefütterten Tieren nach Aktivierung des BAT nicht nur die Konzentration an UBA im Fäzes verdoppelt, sondern es zeigte sich auch ein ca. 50facher Anstieg in der Konzentration der CBA (Abbildung C - 18). Somit ist zunächst festzustellen, dass Mäuse, die bedingt durch eine Aktivierung des BAT eine erhöhte Cholesterinzufuhr aufweisen, dies mit einer stark gesteigerten Elimination von Cholesterin in Form von Gallensäuren kompensieren. Dabei ist auffällig, dass die Mäuse nach Aktivierung des BAT ca. doppelt so viel Nahrung konsumieren (Abbildung C - 13), wobei sie in der Summe ca. dreimal soviel Gallensäuren ausscheiden (Abbildung C - 18 b). Da jedoch auch die Konzentration an Plasmacholesterin, LDL-Cholesterin (Abbildung C - 14) und der Cholesteringehalt in der Leber (Abbildung J - 6) reduziert sind, scheint die Ausscheidung von Cholesterin im Verhältnis zur *de novo* Synthese und diätetischen Zufuhr erhöht zu sein. Weiterhin interessant in diesem Zusammenhang ist der drastische Anstieg in der Konzentration an CBA im Vergleich zu den UBA im Fäzes. CBA sind im Vergleich zu UBA hydrophiler (Kuipers, Bloks et al. 2014). Wie bereits erwähnt, regen hydrophilere BA den Gallensäureefflux an und tragen zu einer Inhibierung der intestinalen Aufnahme an Cholesterin aus der Nahrung bei (Wang, Tazuma et al. 2003; Thomas, Pellicciari et al. 2008). Nicht bekannt in diesem Zusammenhang ist bis jetzt, was die erhöhte Ausscheidung an CBA induziert. Denkbar wären zwei Mechanismen. Erstens: Die Aufnahme von CBA in die Ileocyten erfolgt im terminalen Ileum vermittelt durch den Gallensäuren-Transporter iBAT (Wong, Oelkers et al. 1994), wohingegen UBA entlang des Dünndarms jedoch auch im Colon über passive Diffusion zurück in die Enterocyten aufgenommen werden (Dietschy 1968). Eine denkbare Möglichkeit für die erhöhte Exkretion von Gallensäuren wäre nun, dass die Transportkapazität von iBAT durch die hohe Konzentration an CBA erschöpft ist und daher mehr CBA ausgeschieden werden. Zweitens: Unter normalen Bedingungen erfolgt im Intestinaltrakt die von anaeroben Bakterien initiierte Dekonjugation von CBA zu UBA (Ridlon, Kang et al. 2006; Dawson und Karpen 2014; Joyce, MacSharry et al. 2014). Daher wäre nun zu spekulieren, dass der erhöhte Flux bzw. die erhöhte Konzentration an Gallensäuren im Darm mit einer veränderten Zusammensetzung der Mikrobiota einhergeht (Hofmann und Eckmann 2006; Ridlon, Kang et al. 2015), wodurch es zu Störungen der Dekonjugation kommen könnte. In diesem Zusammenhang wäre eine Mikrobiomanalyse von großem Interesse, da ein verändertes Mikrobiom mit verschiedenen Krankheitsbildern

jedoch auch mit positiven Eigenschaften auf den Energiestoffwechsel assoziiert ist (Turnbaugh, Ley et al. 2006; Ridaura, Faith et al. 2013; Lukens, Gurung et al. 2014; Qin, Yang et al. 2014; Sharon, Garg et al. 2014).

Im letzten Schritt sollte untersucht werden, ob das Ausmaß der fäkalen Ausscheidung von Gallensäuren von der hepatischen Aufnahme postprandial prozessierter Lipoproteine abhängig ist. So zeigte sich, dass eine Aktivierung des BAT in WTD-gefütterten *ApoE*^{-/-}- und *Ldlr*^{-/-}*Lrp1*^{cre+}-Tieren, nicht mit einer Reduktion der Konzentration an Cholesterin im Plasma einherging und auch im korrespondierenden FPLC-Profil keine Veränderungen zu messen waren (Abbildung C - 19 a und d). In *Ldlr*^{-/-}-Tieren war bemerkenswerterweise die Konzentration an Gesamtcholesterin und die an TRL-Cholesterin im Plasma signifikant erhöht. Im Zusammenhang damit, ergab die Messung der Konzentration an Gallensäuren im Fäzes, dass der durch Aktivierung des BAT induzierte Anstieg in der Exkretion an Gallensäuren in *ApoE*^{-/-}- und *Ldlr*^{-/-}- Mäusen um 50 % reduziert war. In BAT-aktivierten *Ldlr*^{-/-} *Lrp1*^{cre+}-Tieren war die Konzentration an UBA und CBA sogar vergleichbar mit der im Fäzes von WT-Kontroll-Tieren (Abbildung C - 20 a, b). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die hepatische Aufnahme cholesterinreicher, postprandialer Lipoproteine für die Reduktion in der Konzentration an TRL-Cholesterin im Plasma und außerdem für die fäkale Elimination von Cholesterin in Form von Gallensäuren verantwortlich ist.

3 Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der Promotion erarbeiteten Ergebnisse, dass die Aktivierung des BAT durch Kälte oder β_3 -adrenerge Agonisten zu einer Beeinflussung des systemischen Cholesterinstoffwechsels führen, indem sowohl die Stimulation des HDL-vermittelten RCT initiiert als auch die Elimination von Cholesterin in Form von Gallensäuren in Folge einer cholesterinreichen Diät induziert wird (Abbildung D - 1).

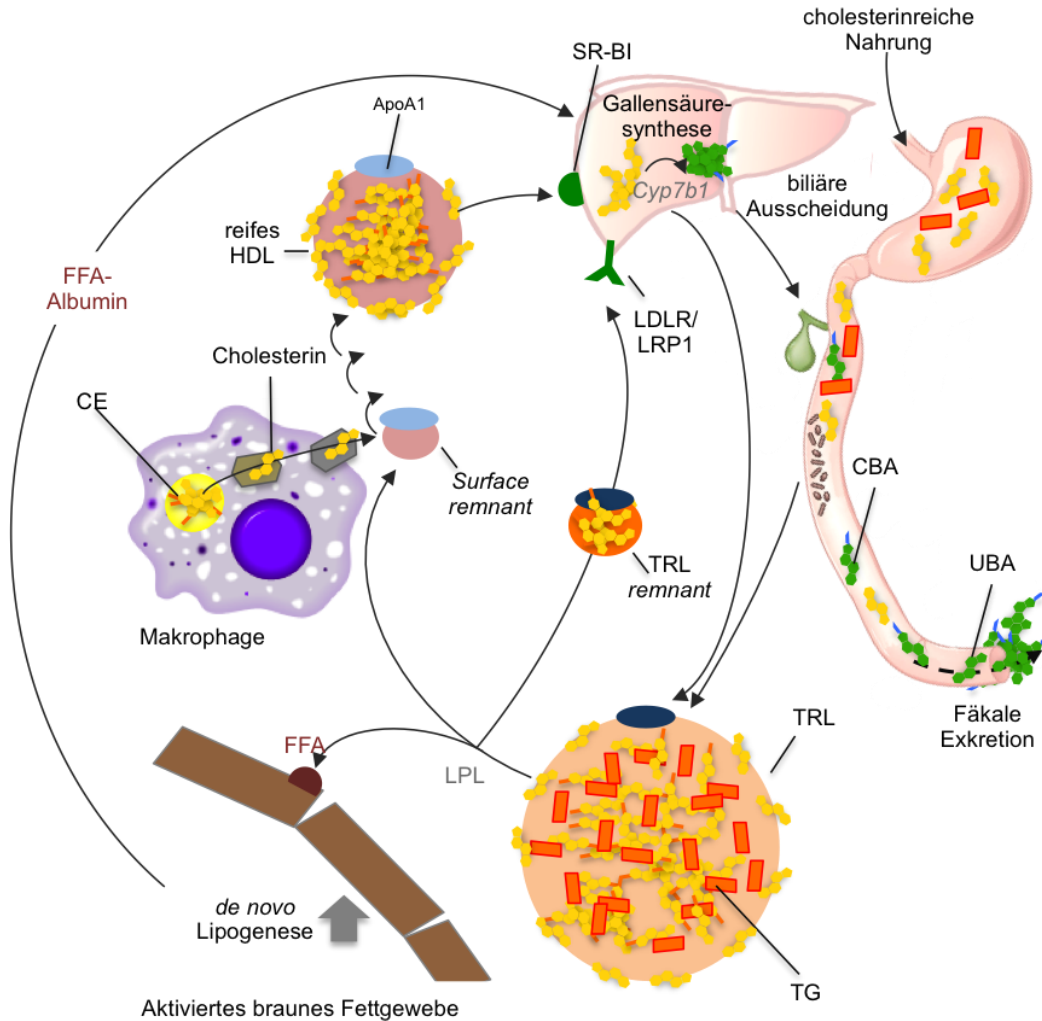


Abbildung D - 1: Einfluss des aktivierten braunen Fettgewebes auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel

Die Aktivierung des BAT führt in Folge eines erhöhten Energieumsatzes zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. In den Enterocyten gebildete Triglyzerid-reiche Lipoproteine (TRL) werden im Blutstrom zu Energie-speichernden bzw. -verbrauchenden, peripheren Geweben, wie z.B. dem BAT, transportiert. In Folge der erhöhten Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) erfolgt die Hydrolyse der Triglyzeride (TG) und entstehende freie Fettsäuren werden zur Energiegewinnung bzw. Speicherung in die Gewebe aufgenommen. Im Zuge der Lipolyse gebildete cholesterinreiche TRL remnants, werden dann - vermittelt durch den LDL-Rezeptor (LDLR) oder das *LDLR-related protein 1* (LRP1) - in die Leber aufgenommen. Die weiterhin im Rahmen der Prozessierung der TRL generierten *surface remnant*-Partikel tragen zum HDL-vermittelten reversen Cholesterin Transport bei. Die hepatische Aufnahme der in den reifen *high density lipoproteins* (HDL) enthaltenen Cholesterinester (CE) erfolgt dabei über den *scavenger receptor-BI* (SR-BI). In die Leber aufgenommenes Cholesterin wird vermittelt durch die *Oxysterol-7 α -hydroxylase* (Cyp7b1) über den alternativen Gallensäuresyntheseweg zu Gallensäuren metabolisiert und verstärkt ausgeschieden. Weiterhin induziert die Aktivierung des BAT die *de novo* Lipogenese in den Fettgeweben, welches die Lipidkomposition zirkulierender TRL und HDL beeinflusst und somit zu einer veränderten HDL-Funktionalität führen könnte. (FFA = free fatty acid; CBA = conjugated bile acid; UBA = unconjugated bile acid)

Die Aktivierung des BAT trägt somit zum Erhalt der systemischen Cholesterinhomöostase bei. In zukünftigen Studien wäre daher aufzuklären, ob die Aktivierung von braunen oder beige Adipocytten im Menschen als protektive Maßnahme zur Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen herangezogen werden kann.

Teil E Zusammenfassung

Mit einer weltweiten Anzahl von 1,7 Milliarden Betroffenen leiden derzeit mehr Menschen an Überernährung als an Unterernährung (Haslam und James 2005; Rosen und Spiegelman 2014). Als Konsequenz der Überernährung und der daraus resultierenden Adipositas-Erkrankung (BMI > 30) ist die Entwicklung einer Vielzahl an Folgeerkrankungen, wie beispielsweise Insulinresistenz oder Atherosklerose möglich (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2006). Eine Adipositas-Erkrankung geht häufig mit einer Störung der zellulären und systemischen Cholesterinhomöostase einher, welches laut *National Institute of Health, USA* zu einem der zehn Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zählt. Eines der Ursachen für Atherosklerose sind Beeinträchtigungen im vaskulären Stoffwechsel cholesterinreicher Lipoproteine und insbesondere das Auftreten hoher LDL-Cholesterinwerte bei gleichzeitig niedriger Konzentration an HDL-Cholesterin (Lewington, Whitlock et al. 2007; Ference, Yoo et al. 2012). Aufgrund der hohen metabolischen Aktivität des braunen Fettgewebes (BAT) und des *browning* verschiedener Depots des weißen Fettgewebes (WAT) wird gegenwärtig diskutiert und untersucht, ob die Aktivierung von braunen und beige Adipocyten eine Option zur Behandlung von metabolischen Erkrankungen darstellt. Zu den grundlegenden Aufgaben des BAT gehört die zitterfreie Thermogenese (Cannon und Nedergaard 2004). Dabei führt die Aktivierung des BAT zu einem gesteigerten Energieverbrauch, welcher mit einer Zunahme des Appetits sowie einer erhöhten Aufnahme an Nahrung und somit auch Cholesterin einhergeht. Im Rahmen der zitterfreien Thermogenese können Glukose sowie Fettsäuren als Edukte zur Energiegewinnung eingesetzt und somit direkt katabolisiert werden (Cannon und Nedergaard 2004; Bartelt, Bruns et al. 2011), wohingegen andere Nahrungsbestandteile, wie potentiell zytotoxisches Cholesterin, nicht direkt metabolisiert werden können. Die zugrundeliegende Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die Kälte-induzierte Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einer dynamischen Anpassung des vaskulären Lipoprotein- und des zellulären Sterolstoffwechsels führt, der die Organ-übergreifende Regulation des Cholesterinstoffwechsels sicherstellt. Entsprechend wurde die Bedeutung der BAT-Aktivierung auf die intravaskuläre Prozessierung von cholesterinreichen Lipoproteinen sowie die Auswirkungen der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den hepatischen Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel untersucht.

Mittels einer UPLC-ESI-UHR-QqQ-TOF-basierten Analyse der Lipidzusammensetzung isolierter TRL und HDL wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung des BAT unabhängig von der Konzentration an HDL-Cholesterin Veränderungen in der Lipidkomposition der Lipoproteine induziert, welche mit einer potentiell veränderten Funktionalität der TRL und vor allem HDL einhergehen könnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des BAT trotz erhöhter Nahrungsaufnahme zu einer Induktion der DNL in den weißen Fettgewebsdepots, jedoch nicht in der Leber führt, und dass die durch Aktivierung des BAT

induzierten Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der TRL und HDL ihren Ursprung im BAT und WAT haben. Die veränderte Lipidzusammensetzung isolierter HDL war jedoch in Mäusen mit einer adipocytenspezifischen Lipoproteinlipase-Defizienz nicht nachweisbar, sodass davon ausgegangen wird, dass die lipolytische Prozessierung der TRL seitens der LPL die Zusammensetzung der TG in zirkulierenden HDL bestimmt. Trotz der in C57BL/6J-Mäusen unveränderten Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma, konnte eine Induktion des HDL-Umsatzes und des reversen Cholesterintransportes in BAT-aktivierten Mäusen festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die von Rader und Tall (2012) vorgeschlagene „*HDL-Flux-Hypothese*“, welche besagt, dass nicht die Konzentration an HDL-Cholesterin im Plasma, sondern vielmehr die Erhöhung der Kapazität des HDL-vermittelten Cholesterol-Efflux in die Leber eine therapeutische Intervention zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen sein könnte (Khera, Cuchel et al. 2011; Rohatgi, Khera et al. 2014).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die hepatobiliäre Ausscheidung von Cholesterin in Form von Gallensäuren nach Aktivierung des BAT durch die Stimulierung des alternativen Gallensäuresyntheseweges stark induziert ist, ein Prozess, der nicht der Regulation durch den Transkriptionsfaktor FXR unterliegt. Dabei ist die hepatische Aufnahme cholesterinreicher Lipoproteine über den LDLR sowie LRP1 maßgeblich an der Reduktion der Konzentration an TRL-Cholesterin im Plasma und ebenso für die fäkale Elimination von Cholesterin in Form von Gallensäuren beteiligt.

Die Aktivierung des BAT trägt somit zum Erhalt der systemischen Cholesterinhomöostase bei. In zukünftigen Studien wäre daher zu untersuchen, ob die Aktivierung von braunen oder beige Adipocytin im Menschen als protektive Maßnahme zur Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen dient.

Teil F **Summary**

Worldwide 1.7 billion people are affected by supernutrition and its repercussion, outpacing the global burden caused by malnutrition (Haslam und James 2005; Rosen und Spiegelman 2014). Obesity (BMI > 30), a consequence of overnutrition, is associated with a diversity of secondary diseases including insulin resistance and atherosclerosis (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2006).

In many cases obesity is accompanied by a disturbance of the cellular and systemic cholesterol homeostasis. According to the *National Institute of Health, USA* this accounts for one of the ten major risk factors for cardiovascular diseases. One of the causes leading to atherosclerosis involves impairments in vascular metabolism of cholesterol rich lipoproteins, which is associated with high levels in LDL-cholesterol and low concentrations of HDL-cholesterol at the same time (Lewington, Whitlock et al. 2007; Ference, Yoo et al. 2012).

Due to the high metabolic activity of brown adipose tissue (BAT) and the possibility to induce the browning of different white adipose tissue (WAT) -depots, the activation of BAT is considered as a therapeutic target to treat or prevent metabolic diseases. One of the main functions of BAT is the non-shivering thermogenesis (Cannon und Nedergaard 2004), leading to an increase in energy expenditure which is paralleled by a robust stimulation of appetite and food intake including cholesterol. Whereas glucose and fatty acids serve as fuels for energy production and can be metabolized directly (Cannon und Nedergaard 2004; Bartelt, Bruns et al. 2011), an excess of cholesterol intake needs to be disposed by alternative routes to avoid the systemic accumulation of potentially cytotoxic cholesterol.

The underlying hypothesis of this thesis was that cold induced BAT-activation results in a dynamic adaption of vascular lipoprotein- as well as cellular sterol metabolism to maintain the general regulation of systemic cholesterol handling. Accordingly, the focus of this work was to delineate the effect of BAT-activation on intravascular handling of cholesterol rich lipoproteins as well as its impact on the hepatic metabolism of cholesterol and bile acids.

Lipid composition of isolated TRL and HDL was analyzed using an UPLC-ESI-UHR-QqQ-TOF-based method. It was found that regardless of HDL-cholesterol levels, activated BAT induced a remodeling of the lipid composition, which may subsequently alter the functionality of TRL and HDL. Although BAT-activation resulted in an increase of food intake, hepatic DNL was not induced. However a significant stimulation of DNL in adipose tissue depots was observed. Furthermore it was shown, that the altered lipid constitution of TRL and HDL had their origin in BAT and WAT. In mice with adipocyte specific deletion of LPL the BAT-induced remodeling of HDL was no longer detectable, suggesting that lipolytic processing of TRL by adipose tissue LPL is crucial for the altered composition of the TG-moiety of newly synthesized HDL. Even though HDL-cholesterol levels of C57BL/6J were not influenced by BAT-activation, an increased HDL-turnover as well as reverse cholesterol transport (RCT)

was observed. Those results support the ‘*HDL-Flux-Hypothesis*’ proposed by Rader und Tall (2012). The hypothesis suggests that therapeutic interventions to promote HDL-mediated cholesterol efflux to the liver will reduce cardiovascular risk, regardless of whether it affects plasma cholesterol levels (Khera, Cuchel et al. 2011; Rohatgi, Khera et al. 2014). Additionally it was shown that activated BAT induces the hepatobiliary disposal of cholesterol in form of bile acids due to the stimulation of the alternative bile acid synthesis pathway, a process, which is not controlled by the transcription factor FXR. In this context the reduction of total plasma cholesterol, TRL-cholesterol levels, as well as the fecal disposal of bile acids depends on hepatic clearance of cholesterol-rich lipoproteins via LDLR and LRP1. These findings lead to the assumption that the activation of BAT contributes to preserve systemic cholesterol homeostasis. Future studies should therefore address the question of whether the activation of brown and beige adipocytes in humans could serve as a therapeutic target to prevent cardiovascular diseases.

Teil G Literatur

- Acton, S., A. Rigotti, et al. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* **271**(5248): 518-520.
- Agellon, L. B. and E. C. Torchia (2000). "Intracellular transport of bile acids." *Biochim Biophys Acta* **1486**(1): 198-209.
- Allen, J. A., R. A. Halverson-Tamboli, et al. (2007). "Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling." *Nat Rev Neurosci* **8**(2): 128-140.
- Altmann, S. W., H. R. Davis, et al. (2004). "Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption." *Science* **303**(5661): 1201-1204.
- Alvarez, R., J. Deandres, et al. (1995). "A Novel Regulatory Pathway of Brown Fat Thermogenesis - Retinoic Acid Is a Transcriptional Activator of the Mitochondrial Uncoupling Protein Gene." *Journal of Biological Chemistry* **270**(10): 5666-5673.
- Ameis, D., G. Stahnke, et al. (1990). "Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene." *Journal of Biological Chemistry* **265**(12): 6552-6555.
- Apfel, R., D. Benbrook, et al. (1994). "A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily." *Mol Cell Biol* **14**(10): 7025-7035.
- Aquila, H., T. A. Link, et al. (1985). "The Uncoupling Protein from Brown Fat Mitochondria Is Related to the Mitochondrial Adp Atp Carrier - Analysis of Sequence Homologies and of Folding of the Protein in the Membrane." *Embo Journal* **4**(9): 2369-2376.
- Asselbergs, F. W., Y. Guo, et al. (2012). "Large-scale gene-centric meta-analysis across 32 studies identifies multiple lipid loci." *Am J Hum Genet* **91**(5): 823-838.
- Barbatelli, G., I. Murano, et al. (2010). "The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown fat transdifferentiation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E1244-E1253.
- Bartelt, A., O. T. Bruns, et al. (2011). "Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance." *Nature Medicine* **17**(2): 200-206.
- Bartelt, A. and J. Heeren (2014). "Adipose tissue browning and metabolic health." *Nat Rev Endocrinol* **10**(1): 24-36.
- Bartelt, A., C. Weigelt, et al. (2013). "Effects of adipocyte lipoprotein lipase on de novo lipogenesis and white adipose tissue browning." *Biochim Biophys Acta* **1831**(5): 934-942.
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1991). "Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8342-8346.
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1989). "The Ldl Receptor Related Protein, Lrp, Is an Apolipoprotein-E-Binding Protein." *Nature* **341**(6238): 162-164.
- Bensinger, S. J., M. N. Bradley, et al. (2008). "LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response." *Cell* **134**(1): 97-111.
- Berbee, J. F., M. R. Boon, et al. (2015). "Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development." *Nat Commun* **6**: 6356.
- Berge, K. E., H. Tian, et al. (2000). "Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters." *Science* **290**(5497): 1771-1775.
- Berger, S., G. Raman, et al. (2015). "Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis." *Am J Clin Nutr*.
- Besler, C., T. F. Luscher, et al. (2012). "Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease." *EMBO Mol Med* **4**(4): 251-268.
- Bjorkhem, I., O. Andersson, et al. (1994). "Atherosclerosis and Sterol 27-Hydroxylase - Evidence for a Role of This Enzyme in Elimination of Cholesterol from Human Macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8592-8596.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* **37**(8): 911-917.
- Bloch, K. (1965). "The biological synthesis of cholesterol." *Science* **150**(3692): 19-28.

- Boden, W. E., J. L. Probstfield, et al. (2011). "Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy." *N Engl J Med* **365**(24): 2255-2267.
- Bodzioch, M., E. Orso, et al. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." *Nat Genet* **22**(4): 347-351.
- Bonet, M. L., P. Oliver, et al. (2013). "Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue." *Biochim Biophys Acta* **1831**(5): 969-985.
- Bonnefond, A. and P. Froguel (2015). "Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know?" *Cell Metabolism* **21**(3): 357-368.
- Bordicchia, M., D. Liu, et al. (2012). "Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes." *J Clin Invest* **122**(3): 1022-1036.
- Bostrom, P., J. Wu, et al. (2012). "A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis." *Nature* **481**(7382): 463-468.
- Botham, K. M. and G. S. Boyd (1983). "The Metabolism of Chenodeoxycholic Acid to Beta-Muricholic Acid in Rat-Liver." *European Journal of Biochemistry* **134**(1): 191-196.
- Brown, J. M., T. A. Bell, 3rd, et al. (2008). "Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss." *Journal of Biological Chemistry* **283**(16): 10522-10534.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* **232**(4746): 34-47.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." *Cell* **89**(3): 331-340.
- Brown, M. S., P. T. Kovanen, et al. (1981). "Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors." *Science* **212**(4495): 628-635.
- Brown, R. J., W. R. Lagor, et al. (2010). "Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins." *Circulation Research* **107**(3): 357-364.
- Brundert, M., A. Ewert, et al. (2005). "Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(1): 143-148.
- Brundert, M., J. Heeren, et al. (2011). "Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells." *J Lipid Res* **52**(4): 745-758.
- Calabresi, L., M. Gomaschi, et al. (2003). "Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(10): 1724-1731.
- Calabresi, L., G. Rossoni, et al. (2003). "High-density lipoproteins protect isolated rat hearts from ischemia-reperfusion injury by reducing cardiac tumor necrosis factor-alpha content and enhancing prostaglandin release." *Circulation Research* **92**(3): 330-337.
- Calkin, A. C. and P. Tontonoz (2012). "Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(4): 213-224.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." *Physiol Rev* **84**(1): 277-359.
- Cao, H., K. Gerhold, et al. (2008). "Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism." *Cell* **134**(6): 933-944.
- Cao, W. H., K. W. Daniel, et al. (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**(7): 3057-3067.
- Carey, M. C. and W. C. Duane (1994). "Enterohepatic circulation." *Raven Press, New York*.
- Castro-Perez, J., S. F. Previs, et al. (2011). "In vivo D2O labeling to quantify static and dynamic changes in cholesterol and cholesterol esters by high resolution LC/MS." *J Lipid Res* **52**(1): 159-169.
- Castro-Perez, J. M. (2011). "Identifying static and Kinetic Lipid Phenotypes by High Resolution UPLC-MS: Unraveling Diet-Induced Changes in Lipid Homeostasis by Coupling Metabolomics to Fluxomics." *J. Proteome Res* **10**: 4281-4290.
- Cattori, V., U. Eckhardt, et al. (1999). "Molecular cloning and functional characterization of two alternatively spliced Ntcp isoforms from mouse liver." *Biochimica Et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **1445**(1): 154-159.

- Chakravarthy, M. V., I. J. Lodhi, et al. (2009). "Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver." *Cell* **138**(3): 476-488.
- Chechi, K., P. G. Blanchard, et al. (2013). "Brown fat like gene expression in the epicardial fat depot correlates with circulating HDL-cholesterol and triglycerides in patients with coronary artery disease." *Int J Cardiol* **167**(5): 2264-2270.
- Chen, F., L. Ma, et al. (2003). "Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter." *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 19909-19916.
- Christensen, C. R., P. B. Clark, et al. (2006). "Reversal of hypermetabolic brown adipose tissue in F-18 FDG PET imaging." *Clin Nucl Med* **31**(4): 193-196.
- Crawford, J. M., C. A. Berken, et al. (1988). "Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport." *J Lipid Res* **29**(2): 144-156.
- Cui, G., X. Qin, et al. (2011). "Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation." *J Clin Invest* **121**(2): 658-670.
- Cypess, A. M., S. Lehman, et al. (2009). "Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans." *N Engl J Med* **360**(15): 1509-1517.
- Cypess, A. M., L. S. Weiner, et al. (2015). "Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist." *Cell Metab* **21**(1): 33-38.
- Cypess, A. M., A. P. White, et al. (2013). "Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat." *Nat Med* **19**(5): 635-639.
- Dai, D., P. B. Mills, et al. (2014). "Liver disease in infancy caused by oxysterol 7 alpha-hydroxylase deficiency: successful treatment with chenodeoxycholic acid." *J Inherit Metab Dis* **37**(5): 851-861.
- Dalen, K. T., S. M. Ulven, et al. (2003). "Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha." *Journal of Biological Chemistry* **278**(48): 48283-48291.
- Dawson, P. A. and S. J. Karpen (2014). "Intestinal Transport and Metabolism of Bile Acids." *J Lipid Res*.
- Dietschy, J. M. (1968). "Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids." *J Lipid Res* **9**(3): 297-309.
- Dole, V. P. (1956). "A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose." *Journal of Clinical Investigation* **35**: 150-154.
- Duncan, R. E., E. Sarkadi-Nagy, et al. (2008). "Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA)." *Journal of Biological Chemistry* **283**(37): 25428-25436.
- Eisenberg, S. and T. Olivecrona (1979). "Very low density lipoprotein. Fate of phospholipids, cholesterol, and apolipoprotein C during lipolysis in vitro." *J Lipid Res* **20**(5): 614-623.
- Eissing, L., T. Scherer, et al. (2013). "De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-beta and metabolic health." *nature communications* **4**.
- Enerback, S. (2009). "The origins of brown adipose tissue." *N Engl J Med* **360**(19): 2021-2023.
- Enerback, S., A. Jacobsson, et al. (1997). "Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese." *nature* **387**: 90-94.
- Fang, S., J. M. Suh, et al. (2015). "Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance." *Nat Med* **21**(2): 159-165.
- Fedorenko, A., P. V. Lishko, et al. (2012). "Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria." *Cell* **151**(2): 400-413.
- Feldmann, H. M., V. Golozoubova, et al. (2009). "UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality." *Cell Metabolism* **9**(2): 203-209.
- Ference, B. A., W. Yoo, et al. (2012). "Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis." *J Am Coll Cardiol* **60**(25): 2631-2639.
- Fisher, E. A., J. E. Feig, et al. (2012). "High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(12): 2813-2820.
- Fisher, F. M., S. Kleiner, et al. (2012). "FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis." *Genes Dev* **26**(3): 271-281.

- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." The Journal of biological chemistry **226**(1): 497-509.
- Forman, B. M., E. Goode, et al. (1995). "Identification of a Nuclear Receptor That Is Activated by Farnesol Metabolites." Cell **81**(5): 687-693.
- Gesta, S., Y. H. Tseng, et al. (2007). "Developmental origin of fat: tracking obesity to its source." Cell **131**(2): 242-256.
- Ghorbani, M., T. H. Claus, et al. (1997). "Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist." Biochem Pharmacol **54**(1): 121-131.
- Ghorbani, M. and J. Himms-Hagen (1997). "Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats." Int J Obes Relat Metab Disord **21**(6): 465-475.
- Glass, C., R. C. Pittman, et al. (1985). "Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro." Journal of Biological Chemistry **260**(2): 744-750.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977). "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis." Annu Rev Biochem **46**: 897-930.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." Nature **343**(6257): 425-430.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (2001). "Molecular medicine. The cholesterol quartet." Science **292**(5520): 1310-1312.
- Goldstein, J. L., Y. K. Ho, et al. (1979). "Binding-Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low-Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(1): 333-337.
- Golozoubova, V., B. Cannon, et al. (2006). "UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis." American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism **291**(2): E350-E357.
- Goodwin, B., S. A. Jones, et al. (2000). "A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis." Mol Cell **6**(3): 517-526.
- Grober, J., I. Zaghini, et al. (1999). "Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer." Journal of Biological Chemistry **274**(42): 29749-29754.
- Grosskopf, I., N. Baroukh, et al. (2005). "Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **25**(12): 2573-2579.
- Haeusler, R. A., M. Pratt-Hyatt, et al. (2012). "Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia." Cell Metab **15**(1): 65-74.
- Hagenbuch, B. and P. Dawson (2004). "The sodium bile salt cotransport family SLC10." Pflugers Arch **447**(5): 566-570.
- Hany, T. F., E. Gharehpapagh, et al. (2002). "Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(10): 1393-1398.
- Hardison, W. G. (1978). "Hepatic taurine concentration and dietary taurine as regulators of bile acid conjugation with taurine." Gastroenterology **75**(1): 71-75.
- Haslam, D. W. and W. P. James (2005). "Obesity." Lancet **366**(9492): 1197-1209.
- Havel, R. J., H. A. Eder, et al. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." Journal of Clinical Investigation **34**(9): 1345-1353.
- Hawes, B. E., A. O'Neill K, et al. (2007). "In vivo responsiveness to ezetimibe correlates with niemann-pick C1 like-1 (NPC1L1) binding affinity: Comparison of multiple species NPC1L1 orthologs." Mol Pharmacol **71**(1): 19-29.

- He, D., S. Barnes, et al. (2003). "Rat liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase: expression, characterization, and peroxisomal localization." *J Lipid Res* **44**(12): 2242-2249.
- Heaton, J. M. (1972). "The distribution of brown adipose tissue in the human." *J Anat* **112**(Pt 1): 35-39.
- Heeren, J. and H. Munzberg (2013). "Novel aspects of brown adipose tissue biology." *Endocrinol Metab Clin North Am* **42**(1): 89-107.
- Heeren, J., A. Niemeier, et al. (2002). "Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo." *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **80**(9): 576-584.
- Herman, M. A., O. D. Peroni, et al. (2012). "A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism." *Nature* **484**(7394): 333-338.
- Heverin, M., S. Meaney, et al. (2007). "Studies on the cholesterol-free mouse - Strong activation of LXR-regulated hepatic genes when replacing cholesterol with desmosterol." *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **27**(10): 2191-2197.
- Himms-Hagen, J., J. Cui, et al. (1994). "Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats." *Am J Physiol* **266**(4 Pt 2): R1371-1382.
- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, et al. (2000). "Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* **279**(3): C670-681.
- Hofmann, A. F. (2009). "The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions." *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 2584-2598.
- Hofmann, A. F. and B. Borgstroem (1964). "The Intraluminal Phase of Fat Digestion in Man: The Lipid Content of the Micellar and Oil Phases of Intestinal Content Obtained during Fat Digestion and Absorption." *Journal of Clinical Investigation* **43**: 247-257.
- Hofmann, A. F. and L. Eckmann (2006). "How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12): 4333-4334.
- Hondares, E., O. Mora, et al. (2006). "Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation." *Endocrinology* **147**(6): 2829-2838.
- Hondares, E., M. Rosell, et al. (2011). "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." *Journal of Biological Chemistry* **286**(50): 43112-43122.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* **444**(14): 860-867.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, et al. (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." *Science* **259**(5091): 87-91.
- Hu, X., Y. Bonde, et al. (2014). "Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism." *J Intern Med* **275**(1): 27-38.
- Hussain, M. M., R. K. Kancha, et al. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors." *Biochim Biophys Acta* **1300**(3): 151-170.
- Inagaki, T., M. Choi, et al. (2005). "Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis." *Cell Metabolism* **2**(4): 217-225.
- Ishibashi, S., M. S. Brown, et al. (1993). "Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery." *Journal of Clinical Investigation* **92**(2): 883-893.
- Janowski, B. A., P. J. Willy, et al. (1996). "An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha." *Nature* **383**(6602): 728-731.
- Jaworski, K., M. Ahmadian, et al. (2009). "AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency." *Nat Med* **15**(2): 159-168.
- Jaye, M., K. J. Lynch, et al. (1999). "A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism." *Nat Genet* **21**(4): 424-428.
- John, C., P. Werner, et al. (2014). "A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids." *J Chromatogr A* **1371**: 184-195.

- Jonas, A. (2000). "Lecithin cholesterol acyltransferase." *Biochim Biophys Acta* **1529**(1-3): 245-256.
- Joyce, S. A., J. MacSharry, et al. (2014). "Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(20): 7421-7426.
- Kajimura, S., P. Seale, et al. (2009). "Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex." *Nature* **460**(7259): 1154-1158.
- Kajimura, S., P. Seale, et al. (2010). "Transcriptional control of brown fat development." *Cell Metab* **11**(4): 257-262.
- Kandutsch, A. A. and A. E. Russell (1960). "Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol." *Journal of Biological Chemistry* **235**: 2256-2261.
- Kane, J. P. and M. J. Malloy (2012). "Prebeta-1 HDL and coronary heart disease." *Current Opinion in Lipidology* **23**(4): 367-371.
- Kast, H. R., C. M. Nguyen, et al. (2001). "Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids." *Mol Endocrinol* **15**(10): 1720-1728.
- Katsuma, S., A. Hirasawa, et al. (2005). "Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(1): 386-390.
- Kennedy, M. A., G. C. Barrera, et al. (2005). "ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation." *Cell Metabolism* **1**(2): 121-131.
- Kennedy, M. A., A. Venkateswaran, et al. (2001). "Characterization of the human ABCG1 gene - Liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein." *Journal of Biological Chemistry* **276**(42): 39438-39447.
- Khera, A. V., M. Cuchel, et al. (2011). "Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis." *N Engl J Med* **364**(2): 127-135.
- Kiefer, F. W., C. Vernochet, et al. (2012). "Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue." *Nat Med* **18**(6): 918-925.
- Kinnunen, P. K., R. L. Jackson, et al. (1977). "Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 4848-4851.
- Klingenspor, M. and T. Fromme (2012). Brown adipose tissue. *Adipose Tissue Biology*. M. E. Symonds. New York, Springer. **1**: 39-79.
- Klingenspor, M., S. Herzig, et al. (2012). "Brown fat develops a brite future." *Obes Facts* **5**(6): 890-896.
- Kopecky, J., G. Clarke, et al. (1995). "Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity." *Journal of Clinical Investigation* **96**(6): 2914-2923.
- Kratky, D., R. Zimmermann, et al. (2005). "Endothelial lipase provides an alternative pathway for FFA uptake in lipoprotein lipase-deficient mouse adipose tissue." *Journal of Clinical Investigation* **115**(1): 161-167.
- Krotkiewski, M., P. Bjorntorp, et al. (1983). "Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution." *Journal of Clinical Investigation* **72**(3): 1150-1162.
- Kruh, G. D. and M. G. Belinsky (2003). "The MRP family of drug efflux pumps." *Oncogene* **22**(47): 7537-7552.
- Kuipers, F., V. W. Bloks, et al. (2014). "Beyond intestinal soap--bile acids in metabolic control." *Nat Rev Endocrinol* **10**(8): 488-498.
- Kuipers, F., V. W. Bloks, et al. (2014). "Beyond intestinal soap-bile acids in metabolic control." *Nat Rev Endocrinol*.
- Kunitake, S. T., C. M. Mendel, et al. (1992). "Interconversion between Apolipoprotein-a-I-Containing Lipoproteins of Pre-Beta and Alpha-Electrophoretic Mobilities." *Journal of Lipid Research* **33**(12): 1807-1816.

- Kunnen, S. and M. Van Eck (2012). "Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis?" J Lipid Res **53**(9): 1783-1799.
- Laffitte, B. A., S. B. Joseph, et al. (2003). "The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions." Molecular and Cellular Biology **23**(6): 2182-2191.
- Landrier, J. F., J. J. Eloranta, et al. (2006). "The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(3): G476-485.
- LaRosa, J. C., R. I. Levy, et al. (1970). "A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase." Biochem Biophys Res Commun **41**(1): 57-62.
- Lass, A., R. Zimmermann, et al. (2006). "Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome." Cell Metabolism **3**(5): 309-319.
- Lee, Y. H., A. P. Petkova, et al. (2012). "In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding." Cell Metab **15**(4): 480-491.
- Lefebvre, P., B. Cariou, et al. (2009). "Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation." Physiol Rev **89**(1): 147-191.
- Leiss, O. and K. von Bergmann (1982). "Different effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on serum lipoprotein concentrations in patients with radiolucent gallstones." Scand J Gastroenterol **17**(5): 587-592.
- Lepage, G. and C. C. Roy (1986). "Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction." Journal of Lipid Research **27**: 114-120.
- Lew, J. L., A. Zhao, et al. (2004). "The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion." J Biol Chem **279**(10): 8856-8861.
- Lewington, S., G. Whitlock, et al. (2007). "Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths." Lancet **370**(9602): 1829-1839.
- Li-Hawkins, J., M. Gafvels, et al. (2002). "Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice." Journal of Clinical Investigation **110**(8): 1191-1200.
- Libby, P., P. M. Ridker, et al. (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-325.
- Liu, S. H., J. D. Brown, et al. (2013). "A diurnal serum lipid integrates hepatic lipogenesis and peripheral fatty acid use." Nature **502**(7472): 550-+.
- Locke, A. E., B. Kahali, et al. (2015). "Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology." Nature **518**(7538): 197-206.
- Lowell, B. B., S. V. Susulic, et al. (1993). "Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue." Nature **366**(6457): 740-742.
- Lu, T. T., M. Makishima, et al. (2000). "Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors." Mol Cell **6**(3): 507-515.
- Lubkowska, A., G. Banfi, et al. (2010). "Changes in lipid profile in response to three different protocols of whole-body cryostimulation treatments." Cryobiology **61**(1): 22-26.
- Luck, H., S. Tsai, et al. (2015). "Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-inflammatory Agents." Cell Metab **21**(4): 527-542.
- Lukens, J. R., P. Gurung, et al. (2014). "Dietary modulation of the microbiome affects autoinflammatory disease." Nature.
- Luo, Y. and A. R. Tall (2000). "Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element." Journal of Clinical Investigation **105**(4): 513-520.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Ma, K., P. K. Saha, et al. (2006). "Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis." Journal of Clinical Investigation **116**(4): 1102-1109.
- Ma, P. T., G. Gil, et al. (1986). "Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(21): 8370-8374.
- Mak, P. A., B. A. Laffitte, et al. (2002). "Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta." Journal of Biological Chemistry **277**(35): 31900-31908.

- Makishima, M., T. T. Lu, et al. (2002). "Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor." *Science* **296**(5571): 1313-1316.
- Makishima, M., A. Y. Okamoto, et al. (1999). "Identification of a nuclear receptor for bile acids." *Science* **284**(5418): 1362-1365.
- Marcelino, H., C. Veyrat-Durebex, et al. (2013). "A role for adipose tissue de novo lipogenesis in glucose homeostasis during catch-up growth: a Randle cycle favoring fat storage." *Diabetes* **62**(2): 362-372.
- Martinez-deMena, R. and M. J. Obregon (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**(1): 139-151.
- Maxfield, F. R. and I. Tabas (2005). "Role of cholesterol and lipid organization in disease." *Nature* **438**(7068): 612-621.
- McCormack, J. G. (1982). "The regulation of fatty acid synthesis in brown adipose tissue by insulin." *Prog Lipid Res* **21**(3): 195-223.
- McCoy, M. G., G. S. Sun, et al. (2002). "Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase." *J Lipid Res* **43**(6): 921-929.
- McLean, J., C. Fielding, et al. (1986). "Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2335-2339.
- Meier, P. J. (1995). "Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **269**(6): G801-G812.
- Meier, P. J. and B. Stieger (2002). "Bile salt transporters." *Annu Rev Physiol* **64**: 635-661.
- Meigs, T. E. and R. D. Simoni (1997). "Farnesol as a regulator of HMG-CoA reductase degradation: Characterization and role of farnesyl pyrophosphatase." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **345**(1): 1-9.
- Merkel, M., B. Loeffler, et al. (2005). "Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase." *Journal of Biological Chemistry* **280**(22): 21553-21560.
- Morton, R. E. and D. B. Zilversmit (1983). "Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma." *Journal of Biological Chemistry* **258**(19): 11751-11757.
- Mottillo, E. P., P. Balasubramanian, et al. (2014). "Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation." *J Lipid Res* **55**(11): 2276-2286.
- Mudaliar, S., R. R. Henry, et al. (2013). "Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease." *Gastroenterology* **145**(3): 574-582 e571.
- Navab, M., G. M. Ananthramiah, et al. (2004). "The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL." *Journal of Lipid Research* **45**(6): 993-1007.
- Nedergaard, J. and B. Cannon (2010). "The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions." *Cell Metab* **11**(4): 268-272.
- Nedergaard, J. and B. Cannon (2014). "The Browning of White Adipose Tissue: Some Burning Issues." *Cell Metabolism*.
- Nijstad, N., H. Wiersma, et al. (2009). "Scavenger Receptor BI-mediated Selective Uptake Is Required for the Remodeling of High Density Lipoprotein by Endothelial Lipase." *Journal of Biological Chemistry* **284**(10): 6093-6100.
- Nilsson, S. K., F. Anderson, et al. (2012). "Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4." *Biochim Biophys Acta* **1821**(10): 1370-1378.
- Ouellet, V., S. M. Labbe, et al. (2012). "Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans." *Journal of Clinical Investigation* **122**(2): 545-552.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." *Science* **306**(5695): 457-461.
- Pandak, W. M., P. Bohdan, et al. (2001). "Expression of sterol 12alpha-hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo." *Gastroenterology* **120**(7): 1801-1809.

- Park, J., D. M. Euhus, et al. (2011). "Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression." Endocr Rev **32**(4): 550-570.
- Parks, D. J., S. G. Blanchard, et al. (1999). "Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor." Science **284**(5418): 1365-1368.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 185-194.
- Peet, D. J., T. S. D., et al. (1998). "Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRalpha." Cell **93**: 693-704.
- Pennacchio, L. A., M. Olivier, et al. (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." Science **294**(5540): 169-173.
- Petropoulou, P. I., J. F. Berbee, et al. (2015). "Lack of LCAT reduces the LPS-neutralizing capacity of HDL and enhances LPS-induced inflammation in mice." Biochim Biophys Acta.
- Petrovic, N., T. B. Walden, et al. (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." Journal of Biological Chemistry **285**(10): 7153-7164.
- Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, et al. (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4471-4475.
- Pircher, P. C., J. L. Kitto, et al. (2003). "Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation." Journal of Biological Chemistry **278**(30): 27703-27711.
- Pittman, R. C. and C. A. Taylor, Jr. (1986). "Methods for assessment of tissue sites of lipoprotein degradation." Methods Enzymol **129**: 612-628.
- Postic, C. and J. Girard (2008). "Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice." The Journal of clinical investigation **118**(3): 829-838.
- Poudyal, H., S. A. Kumar, et al. (2013). "Responses to oleic, linoleic and alpha-linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats." J Nutr Biochem.
- Prusiner, S. B., B. Cannon, et al. (1968). "Oxidative metabolism in cells isolated from brown adipose tissue. 1. Catecholamine and fatty acid stimulation of respiration." Eur J Biochem **6**(1): 15-22.
- Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." Cell **92**(6): 829-839.
- Qin, N., F. Yang, et al. (2014). "Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis." Nature **513**(7516): 59-64.
- Rader, D. J., E. T. Alexander, et al. (2009). "The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis." J Lipid Res **50** Suppl: S189-194.
- Rader, D. J. and A. R. Tall (2012). "Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis?" nature **18**(9): 1344-1345.
- Rao, R. R., J. Z. Long, et al. (2014). "Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis." Cell **157**(6): 1279-1291.
- Reasner, C. A. (2008). "Reducing cardiovascular complications of type 2 diabetes by targeting multiple risk factors." J Cardiovasc Pharmacol **52**(2): 136-144.
- Reiss, A. B., K. O. Martin, et al. (1994). "Sterol 27-hydroxylase: high level activity in vascular endothelium." Journal of Lipid Research **35**: 1026-1030.
- Repa, J. J., G. Liang, et al. (2000). "Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." Genes Dev **14**(22): 2819-2830.
- Repa, J. J., S. D. Turley, et al. (2000). "Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers." Science **289**(5484): 1524-1529.
- Ricquier, D. and J. C. Kader (1976). "Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study." Biochem Biophys Res Commun **73**: 577-583.
- Ridaura, V. K., J. J. Faith, et al. (2013). "Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice." Science **341**(6150): 1241-1244.

- Ridlon, J. M., D. J. Kang, et al. (2006). "Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria." *J Lipid Res* **47**(2): 241-259.
- Ridlon, J. M., D. J. Kang, et al. (2015). "Bile Acids and the Gut Microbiome." *Curr Opin Gastroenterol* **30**(3): 332-338.
- Rigotti, A., B. L. Trigatti, et al. (1997). "A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12610-12615.
- Roberts, L. D., P. Bostrom, et al. (2014). "beta-Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic beta-oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors." *Cell Metab* **19**(1): 96-108.
- Robinson, J. G., S. Wang, et al. (2009). "Meta-Analysis of the Relationship Between Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol Reduction and Coronary Heart Disease Risk." *Journal of the American College of Cardiology* **53**(4): 316-322.
- Rohatgi, A., A. Khera, et al. (2014). "HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events." *N Engl J Med*.
- Rohlmann, A., M. Gotthardt, et al. (1998). "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants." *Journal of Clinical Investigation* **101**(3): 689-695.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2014). "What We Talk About When We Talk About Fat." *Cell* **156**(1-2): 20-44.
- Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., et al. (2012). "Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport." *Circulation* **125**(15): 1905-1919.
- Rosenwald, M., A. Perdikari, et al. (2013). "Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes." *Nat Cell Biol* **15**(6): 659-667.
- Russell, D. W. (2003). "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis." *Annu Rev Biochem* **72**: 137-174.
- Ryan, K. K., V. Tremaroli, et al. (2014). "FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy." *Nature* **509**(7499): 183-+.
- Saarela, S., J. S. Keith, et al. (1991). "Is the "mammalian" brown fat-specific mitochondrial uncoupling protein present in adipose tissues of birds?" *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **100**(1): 45-49.
- Sahu-Osen, A., G. Montero-Moran, et al. (2015). "CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization." *Journal of Lipid Research* **56**(1): 109-121.
- Saito, M., Y. Okamatsu-Ogura, et al. (2009). "High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity." *Diabetes* **58**(7): 1526-1531.
- Sayin, S. I., A. Wahlstrom, et al. (2013). "Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist." *Cell Metab* **17**(2): 225-235.
- Schaap, F. G., P. C. N. Rensen, et al. (2004). "ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis." *Journal of Biological Chemistry* **279**(27): 27941-27947.
- Schultz, J. R., H. Tu, et al. (2000). "Role of LXRs in control of lipogenesis." *Genes & Development* **14**(22): 2831-2838.
- Schulz, T. J., P. Huang, et al. (2013). "Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat." *Nature* **495**(7441): 379-383.
- Schwartz, G. G., A. G. Olsson, et al. (2009). "Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome." *Am Heart J* **158**(6): 896-901 e893.
- Schwarz, M., E. G. Lund, et al. (1998). "Two 7 alpha-hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis." *Current Opinion in Lipidology* **9**(2): 113-118.
- Schwarz, M., D. W. Russell, et al. (1998). "Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7alpha-hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia." *Journal of Lipid Research* **39**: 1833-1843.

- Seale, P., B. Bjork, et al. (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." Nature **454**(7207): 961-967.
- Seale, P., S. Kajimura, et al. (2007). "Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16." Cell Metab **6**(1): 38-54.
- Sehayek, E. and S. Eisenberg (1991). "Mechanisms of Inhibition by Apolipoprotein C of Apolipoprotein-E-Dependent Cellular-Metabolism of Human Triglyceride-Rich Lipoproteins through the Low-Density-Lipoprotein Receptor Pathway." Journal of Biological Chemistry **266**(27): 18259-18267.
- Setchell, K. D., M. Schwarz, et al. (1998). "Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease." Journal of Clinical Investigation **102**(9): 1690-1703.
- Seward, D. J., A. S. Koh, et al. (2003). "Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OST α -OST β ." Journal of Biological Chemistry **278**(30): 27473-27482.
- Shafaati, M., M. Olin, et al. (2011). "Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo." Journal of Internal Medicine **270**(4): 377-387.
- Sharon, G., N. Garg, et al. (2014). "Specialized Metabolites from the Microbiome in Health and Disease." Cell Metabolism **20**: 719-730.
- Shungin, D., T. W. Winkler, et al. (2015). "New genetic loci link adipose and insulin biology to body fat distribution." Nature **518**(7538): 187-196.
- Smith, J. R., T. F. Osborne, et al. (1990). "Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene." Journal of Biological Chemistry **265**(4): 2306-2310.
- Spann, N. J., L. X. Garmire, et al. (2012). "Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses." Cell **151**(1): 138-152.
- Stanford, K. I., R. J. Middelbeek, et al. (2013). "Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity." Journal of Clinical Investigation **123**(1): 215-223.
- Stanimirov, B., K. Stankov, et al. (2012). "Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor." Acta Gastroenterol Belg **75**(4): 389-398.
- Staudinger, J. L., B. Goodwin, et al. (2001). "The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3369-3374.
- Stieger, B., B. O'Neill, et al. (1992). "ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles." Biochem J **284** (Pt 1): 67-74.
- Strauss, J. G., R. Zimmermann, et al. (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." Biochem J **368**(Pt 1): 69-79.
- Tarling, E. J. and P. A. Edwards (2011). "ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(49): 19719-19724.
- Temel, R. E. and J. M. Brown (2010). "A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport." World J Gastroenterol **16**(47): 5946-5952.
- Temel, R. E. and J. M. Brown (2012). "Biliary and Non-Biliary Contributions to Reverse Cholesterol Transport." Curr Opin Lipidol **23**(2): 85-90.
- Teslovich, T. M., K. Musunuru, et al. (2010). "Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids." Nature **466**(7307): 707-713.
- Thomas, C., R. Pellicciari, et al. (2008). "Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases." Nat Rev Drug Discov **7**(8): 678-693.
- Timmons, J. A., K. Wennmalm, et al. (2007). "Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(11): 4401-4406.
- Tran, K. V., O. Gealekman, et al. (2012). "The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells." Cell Metabolism **15**(2): 222-229.
- Trayhurn, P. (1979). "Fatty acid synthesis in vivo in brown adipose tissue, liver and white adipose tissue of the cold-acclimated rat." FEBS Lett **104**(1): 13-16.

- Tseng, Y. H., E. Kokkotou, et al. (2008). "New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure." *Nature* **454**(7207): 1000-1004.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." *Nature* **444**(7122): 1027-1031.
- Umetani, M., P. Ghosh, et al. (2014). "The Cholesterol Metabolite 27-Hydroxycholesterol Promotes Atherosclerosis via Proinflammatory Processes Mediated by Estrogen Receptor Alpha." *Cell Metab* **20**(1): 172-182.
- Vaillancourt, E., F. Haman, et al. (2009). "Fuel selection in Wistar rats exposed to cold: shivering thermogenesis diverts fatty acids from re-esterification to oxidation." *J Physiol* **587**(Pt 17): 4349-4359.
- Van den Brandt, P. A. and P. Trayhurn (1981). "Suppression of fatty acids synthesis in brown adipose tissue of mice fed diets rich in long chain fatty acids." *Biochim Biophys Acta* **665**(3): 602-607.
- van der Veen, J. N., T. H. van Dijk, et al. (2009). "Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol." *Journal of Biological Chemistry* **284**(29): 19211-19219.
- Van der Velde, A. E., C. L. J. Vrans, et al. (2007). "Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice." *Gastroenterology* **133**(3): 967-975.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., J. W. Vanhommerig, et al. (2009). "Cold-activated brown adipose tissue in healthy men." *N Engl J Med* **360**(15): 1500-1508.
- Venkateswaran, A., B. A. Laffitte, et al. (2000). "Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12097-12102.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, et al. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." *N Engl J Med* **360**(15): 1518-1525.
- von Eckardstein, A., M. Hersberger, et al. (2005). "Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**(2): 147-152.
- Wang, D. Q., S. Tazuma, et al. (2003). "Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**(3): G494-502.
- Wang, H., J. Chen, et al. (1999). "Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR." *Mol Cell* **3**(5): 543-553.
- Wang, S., R. S. McLeod, et al. (1996). "The microsomal triglyceride transfer protein facilitates assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins and decreases cotranslational degradation of apolipoprotein B in transfected COS-7 cells." *Journal of Biological Chemistry* **271**(24): 14124-14133.
- Wang, W., D. J. Seward, et al. (2001). "Expression cloning of two genes that together mediate organic solute and steroid transport in the liver of a marine vertebrate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9431-9436.
- Wang, X. and D. J. Rader (2007). "Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport." *Curr Opin Cardiol* **22**(4): 368-372.
- Watanabe, M., S. M. Houten, et al. (2006). "Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation." *Nature* **439**(7075): 484-489.
- Watanabe, M., S. M. Houten, et al. (2004). "Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c." *Journal of Clinical Investigation* **113**(10): 1408-1418.
- Weingartner, O., U. Laufs, et al. (2010). "An alternative pathway of reverse cholesterol transport: the oxysterol 27-hydroxycholesterol." *Atherosclerosis* **209**(1): 39-41.
- Westerberg, R., J.-E. Mannson, et al. (2006). "ELOVL 3 Is an Important Component for Early Onset of Lipid Recruitment in Brown Adipose Tissue." *The Journal of Biological Chemistry* **281**(8): 4958-4968.
- Westerterp, M., C. C. van der Hoogt, et al. (2006). "Cholesteryl ester transfer protein decreases high-density lipoprotein and severely aggravates atherosclerosis in APOE*3-Leiden mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(11): 2552-2559.
- Whittle, A. J., S. Carobbio, et al. (2012). "BMP8B Increases Brown Adipose Tissue Thermogenesis through Both Central and Peripheral Actions." *Cell* **149**(4): 871-885.

- Wijers, S. L., W. H. Saris, et al. (2010). "Cold-induced adaptive thermogenesis in lean and obese." *Obesity (Silver Spring)* **18**(6): 1092-1099.
- Willy, P. J., K. Umesono, et al. (1995). "Lxr, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway." *Genes & Development* **9**(9): 1033-1045.
- Wong, M. H., P. Oelkers, et al. (1994). "Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter." *Journal of Biological Chemistry* **269**(2): 1340-1347.
- Y., Z., L. F. Y., et al. (2006). "Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 1006-1011.
- Yang, C. D., J. G. McDonald, et al. (2006). "Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands." *Journal of Biological Chemistry* **281**(38): 27816-27826.
- Yang, Z. H., H. Miyahara, et al. (2011). "Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes." *Lipids Health Dis* **10**: 120.
- Yasuda, T., T. Ishida, et al. (2010). "Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis." *Circ J* **74**(11): 2263-2270.
- Yokoyama, C., X. D. Wang, et al. (1993). "Srebp-1, a Basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Protein That Controls Transcription of the Low-Density-Lipoprotein Receptor Gene." *Cell* **75**(1): 187-197.
- Young, P., J. R. Arch, et al. (1984). "Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse." *FEBS Lett* **167**(1): 10-14.
- Young, S. G. (1990). "Recent progress in understanding apolipoprotein B." *Circulation* **82**(5): 1574-1594.
- Yvan-Charvet, L., M. Ranalletta, et al. (2007). "Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice." *Journal of Clinical Investigation* **117**(12): 3900-3908.
- Zhang, M. and J. Y. L. Chiang (2001). "Transcriptional regulation of the human sterol 12 alpha-hydroxylase gene (CYP8B1) - Roles of hepatocyte nuclear factor 4 alpha in mediating bile acid repression." *Journal of Biological Chemistry* **276**(45): 41690-41699.
- Zhang, X., R. Goncalves, et al. (2008). "The isolation and characterization of murine macrophages." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**: Unit 14 11.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-432.
- Zhang, Y., J. J. Repa, et al. (2001). "Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta." *Journal of Biological Chemistry* **276**(46): 43018-43024.
- Zhang, Y., I. Zanotti, et al. (2003). "Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo." *Circulation* **108**(6): 661-663.
- Zhang, Y., I. Zanotti, et al. (2003). "Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo." *Circulation* **108**(6): 661-663.
- Zhou, Z. H., S. Y. Toh, et al. (2003). "Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity." *Nat Genet* **35**(1): 49-56.
- Zingaretti, M. C., F. Crosta, et al. (2009). "The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue." *FASEB journal* **23**(9): 3113-3120.

Teil H Tabellenverzeichnis

Tabelle A - 1: Klassifizierung von Lipoproteinpartikel	8
Tabelle B - 1: Angaben zur Extraktion von Gewebe mit FolchBHT	34
Tabelle B - 2: Angaben zur Extraktion von Gewebe mit MeOHBHT	34
Tabelle B - 3: Geräteparameter der LC-Methode zur semiquantitativen Bestimmung von Lipidspezies der Majorlipidklassen	35
Tabelle B - 4: Laufmittelgradient der LC-Methode zur semi-quantitativen Bestimmung der Majorlipidklassen.....	36
Tabelle B - 5: Geräteparameter der LC-QqQ-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten	38
Tabelle B - 6: Laufmittelgradient der LC-Methode zur quantitativen Bestimmung von Sterol-Derivaten.....	39
Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation	108
Tabelle J - 2: Verwendete Produkte und deren Spezifikation	113
Tabelle J - 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer.....	114
Tabelle J - 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Spezifikation	116
Tabelle J - 5: Verwendete Arbeitsgeräte.....	117
Tabelle J - 6: Verwendete Software	118

Teil I Abbildungsverzeichnis

Abbildung A - 1: Zelluläre und subzelluläre Struktur von weißen Adipocyten, braunen Adipocyten und beigen Adipocyten der Maus	3
Abbildung A - 2: HDL-medierter reverser Cholesterintransport	12
Abbildung A - 3: Gallensäuresynthese.....	17
Abbildung A - 4: Enterohepatischer Kreislauf.....	19
Abbildung C - 1: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von <i>Apoa5</i> ^{-/-} -Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL.....	45
Abbildung C - 2: Lipidklassenverteilung in isolierten Lipoproteinpartikeln von <i>Apoa5</i> ^{-/-} -Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL	46
Abbildung C - 3: Lipidprofile in isolierten Lipoproteinpartikeln von <i>Apoa5</i> ^{-/-} -Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte oder CL.....	47
Abbildung C - 4: Lysophosphatidylcholinprofile in verschiedenen Mausmodellen sowie einer humanen Kohorte nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	48
Abbildung C - 5: Triglyzeridprofile in Geweben und isolierten Lipoproteinpartikeln von C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL.....	50
Abbildung C - 6: Fluxomics von metabolisch aktiven Geweben und VLDL in C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	52
Abbildung C - 7: Expressionsprofile von an der <i>de novo</i> Lipogenese beteiligten Genen in C57BL/6J Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL.....	53
Abbildung C - 8: Plasma Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie korrespondierende Lipoproteinprofile von Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL	55
Abbildung C - 9: Lipidprofile in isolierten Lipoproteinpartikeln von Mäusen mit adipocytenspezifischer Lipoproteinlipasedefizienz nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL.....	56
Abbildung C - 10: Analyse des HDL-Fluxes in C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	57
Abbildung C - 11: Analyse des HDL-Fluxes in Wildtyp-Mäusen und <i>Scarb1</i> ^{-/-} -Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes	58
Abbildung C - 12: <i>In vivo</i> Analyse des reversen Makrophagen-zu-Fäzes Cholesterintransportes in C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes...	59
Abbildung C - 13: Tägliche Futteraufnahme und Menge an Fäzes in Chow- und Western Typ Diät- gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6°C	61

Abbildung C - 14: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	62
Abbildung C - 15: Expressionsprofile von am Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsel bzw. -transport beteiligten Genen in der Leber von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	64
Abbildung C - 16: Gallensäureprofile in der Leber von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	65
Abbildung C - 17: Gallensäure und Genexpressionsprofile in der Leber von Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren, in C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C sowie zusätzlicher pharmakologischer Aktivierung des Transkriptionsfaktors FXR	67
Abbildung C - 18: Gallensäureprofile Fäzes von Chow- und Western Typ- Diät gefütterten Kontrolltieren und in Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	69
Abbildung C - 19: Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen sowie Lipoproteinprofile im Plasma von Western Typ Diät gefütterten <i>ApoE^{-/-}</i> , <i>Ldlr^{-/-}</i> und <i>Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}</i> -Tieren nach einwöchiger Adaption an 6 °C	71
Abbildung C - 20: Gallensäureprofile Fäzes von Western Typ Diät gefütterten C57BL/6J-, <i>ApoE^{-/-}</i> , <i>Ldlr^{-/-}</i> and <i>Ldlr^{-/-} Lrp1^{cre+}</i> -Tieren nach einwöchiger Adaption an 6 °C	72
Abbildung D - 1: Einfluss des aktivierten braunen Fettgewebes auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel	86
Abbildung J - 1: Lipidprofile in isolierten HDL von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL	119
Abbildung J - 2: Fettsäureprofile in Geweben und isolierten Lipoproteinpartikeln von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL	120
Abbildung J - 3: Konzentration an Triglyzeriden in Geweben und Plasma von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL	121
Abbildung J - 4: Ergänzungen zur Durchführung der Auswertung und Validierung der Ergebnisse der Fluxomics-Studie	122
Abbildung J - 5: Kombination aus oralem Glukose-Toleranz-Test und <i>in vivo</i> Glukose-Organaufnahme in C57BL/6-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	123
Abbildung J - 6: Leberlipidgehalte in C57BL/6-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C	124

Teil J Anhang

1 Material

1.1 Chemikalienverzeichnis inklusive verwendeter Gefahrstoffe nach GHS

Im folgenden Verzeichnis sind die verwendeten Chemikalien tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS-Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
(Ethylenedinitrilo)tetraessigsäure EDTA	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin, LysoPC(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1-o-pentadecanoyl-3-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycerol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-di-O-tridecyl-sn-glycero-3-phosphocholin	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphat (Natriumsalz), PA(17:0/17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, PE(17:0/17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin, PC(15:0/15:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	-	-	-
1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (Natriumsalz), PS(14:0/14:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
1,3(d5)-dipentadecanoyl-glycerol, 1,3(d5)DG(15:0/15:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
¹²⁵ I-Tyramin Cellubiose	Perkin-Elmer, USA		na	na	na
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol Tris	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,9 %	-	-	-
2-Deoxy-D- ¹⁴ C-glukose	Perkin-Elmer, USA		na	na	na
2-Propanol, LC-MS-Grade	Carl Roth	≥ 99,5 %	GHS02, GHS07	H225-H319-H336	P210-P261-P305 + P351 + P338
22-S-Hydroxycholesterin, 22-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
24-S-Hydroxycholesterin, 24-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
25-Hydroxycholesterin, 25-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
27-Hydroxycholesterin, 27-OH-Chol	avanti polar lipids, Ala-	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS-Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
	baster, USA				
³ H-Cholesterin	Perkin-Elmer, USA	40-60Ci (1.48-2.22TBq)/mmol, 1mCi/mL			
³ H-Cholesterinether	Perkin-Elmer, USA	40-60Ci (1.48-2.22TBq)/mmol, 1mCi/mL	GHS02, GHS07, GHS08	H225-H225-H373-H304-H315-H336	
7-Hydroxycholesterol, 7-OH-Chol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
Acetylchlorid	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	GHS02, GHS05, GHS07	H225-H302-H314	P210-P280-P305 + P351 + P338-P310
Ameisensäure	Sigma-Aldrich, München	≥ 98 %	GHS0, GHS05	H226-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Ammoniumacetat, NH ₄ Ac	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,99 % trace metals basis	-	-	-
Bovine Serum Albumin, BSA	Serva, Heidelberg	≥ 99 %	-	-	-
Calciumchlorid, CaCl ₂	Merck, Darmstadt	≥ 99 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
Chenodeoxycholsäure, CDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Chloroform, Rotisol, HPLC-Grade	Carl Roth	≥ 99,9 %	GHS06, GHS08	H302-H315-H319-H331-H336-H351-H361d-H372	P261-P281-P305 + P351 + P338-P311
Cholest-5-en-3β-yl heptadecanoat CE(17:0)	avanti polar lipids	≥ 99 %	-	-	-
Cholesterin	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
Cholsäure, CA	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
CL316,243 Dinatriumsalz, CL	Tocris, Bristol, UK	> 96 %	-	-	-
d4-GCDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
d6- 25-OH-Cholesterin	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99,9 %	-	-	-
d7-Cholesterin	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99,9 %	-	-	-
Deoxycholsäure, DCA	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
Desmosterol	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-

Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS-Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Desoxycorticosteron, DOC	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck, Darmstadt	≥ 99 %	-	-	-
Essigsäure	Sigma-Aldrich, München	≥ 99,7 %	GHS02, GHS05	H226-H314	P280-P305 + P351 + P338-P310
Ethanol	Merck, Darmstadt	96%	GHS02	H225	P210
Glukose	Sigma-Aldrich, München	≥ 99,5 %	-	-	-
Glyceryltritridecanoat TG(13:0/13:0/13:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	-	-	-
Glycochenodeoxycholsäure, GCDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycocholsäure, GCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycodeoxycholsäure, GDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycolithocholsäure, GLCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Glycoursodeoxycholsäure, GUDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Heptadecansäure, FA(17:0)	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS07	H315-H319-H335	P261-P305+P351+P338
Heptan	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99 %	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225-H304-H315-H336-H410	P210-P261-P273-P301 + P310-P331-P501
Hexakis(1H, 1H, 2H-Perfluoroethoxy)phosphazen	Apollo Scientific Ltd., Bredbury, UK	na	na	na	na
Hexakis(1H, 1H, 2H-Perfluoroethoxy)phosphazen	Apollo Scientific Ltd, Bredbury, UK	≥ 90 %	GHS05	na	na
Hexan	Sigma-Aldrich®, München	≥ 95 %	GHS02, GHS07, GHS08, GHS09	H225-H304-H315-H336-H361f-H373-H411	P201-P210-P273-P301 + P310-P308 + P313-P331
Hyodeoxycholsäure, HDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Kaliumchlorid, KCl	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
Ketamin	Albrecht, Aulendorf	10 mg/ml	GHS07	H301-H315-H319-H335	261 P306+P351+P338
Kupfersulfat Pentahydrat, CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Sigma-Aldrich, München	≥ 98,0 %	GHS07, GHS09	H302-H315-H319-H410	P273-P305 + P351 + P338-P501

Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS-Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Marine Oil FAME Mix	Restek, Bad Homburg	na	na	na	na
Methanol, Rotisolv, Ultra LC-MS-Grade	Carl Roth	≥ 99,98 %	GHS02, GHS06, GHS08	H225-H301 + H311 + H331-H370	P210-P260-P280-P301 + P310-P311
N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosin, SM(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine, SM(17:0)	avanti polar lipids, Alabaster, USA	≥ 99 %	-	-	-
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, München	≥ 99,0 %	GHS07	H319	P305 + P351 + P338
Natriumchlorid, NaCl	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,5 %	-	-	-
Natriumkaliumtartrat, C ₄ H ₆ KNaO ₆	Sigma-Aldrich, München	≥ 99,0 %	-	-	-
Natronlauge, NaOH	Sigma-Aldrich, München	≥ 97 %	GHS05	H290-H314	P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Pregnanedion	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Pregnanolon	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Progesteron	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
PX21228, PX	Phenex, Ludwigshafen	Keine Angabe	-	-	-
Rompun	Bayer, Leverkusen	2 %	GHS06	H301	P301+P310
Schefelsäure	Sigma-Aldrich®, München	0,5 M	GHS05	H290-H314	P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Sodiumdodecylsulfat, SDS	Sigma-Aldrich, München	≥ 98,0 %	GHS02, GHS05, GHS07	H228-H302 + H332-H315-H318-H335-H412	P210-P261-P273-P280-P305 + P351 + P338
Stigmasterol	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
Tauro- α -muricholsäure, T- α -MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tauro- β -muricholsäure, T- β -MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurochenodeoxycholsäure, TCDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurocholsäure, TCA	Sigma-Aldrich, München	≥ 99,8 %	-	-	-

Tabelle J - 1: Verwendete Chemikalien und deren Spezifikation

Chemikalie	Hersteller	Reinheit (%)	GHS-Symbol	Hazard Statement H	Precaution Statement P
Taurodeoxycholsäure, TDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurohyodeoxycholsäure, THDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Taurolithocholsäure, TLCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tauroursodeoxycholsäure, TUDCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Tetrahydrodesoxycorticosterone, THDOC	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
Thioglycolat	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA		GHS05, GHS06	H331-H311-H301-H314	P280-P304 + 340-P302 + 352-P301 + 330 + 331-P309-P310-P305 + 351 + 338
Ursodeoxycholsäure, UDCA	Sigma-Aldrich, München	≥ 99 %	-	-	-
Wasser, LC-MS Ultra CHROMASOLV, tested for UHPLC-MS	Sigma-Aldrich®, München	≥ 99,98 %	-	-	-
α-Muricholsäure, α-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
β-Muricholsäure, β-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-
ω-Muricholsäure, ω-MCA	Steraloids, Newport, UK	≥ 99 %	-	-	-

na = nicht angegeben

1.2 Verzeichnis über die verwendeten Kits und Reagenzien

Im folgenden Verzeichnis sind die verwendeten Kits und Reagenzien tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 2: Verwendete Produkte und deren Spezifikation

Produkt	Hersteller
Cholesterin-Bestimmungs Kit, Cholesterol CHOD-PAP®	Roche Diagnostics®, Mannheim
DMEM	GIBCO/BRL, Eggenstein
Folin-Reagenz	Merck, Darmstadt
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems
Mastermix TaqMan	Eurogentec, Deutschland
NucleoSpin RNA II	Macherey & Nagel, Düren
Solvable™	Perkin Elmer, Waltham, USA
Szintillationslösung, Aquasafe 500 Plus	Zinsser Analytic, Frankfurt
Triglyzerid-Bestimmungs Kit, Triglycerides GPO-PAP®	Roche Diagnostics®, Mannheim
Universal PCR MasterMix	Applied Biosystems Inc., USA

1.3 Verzeichnis über die verwendeten Lösungen und Puffer

Im folgenden Verzeichnis sind die verwendeten Lösungen und Puffer tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
10 x PBS	- 400 g NaCl - 10 g KCl - 10 g KH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O ad 5 l H ₂ O dest., pH 6,9
CL-Lösung zur subkutanen Injektion	0,2 mg/ml in 0,9 w/v % NaCl
EDTA, 0,5 M	GIBCO/BRL, Eggenstein
ESI-L, Low Concentration Tuning Mix, 100 mL	Agilent Technologies, Waldbronn
FCS	GIBCO/BRL, Eggenstein
Folch-Lösung	Chloroform/Methanol, 2/1, v/v
FolchBHT	110 mg BHT in 200 ml Folch-Lösung
Folin's Reagenz	Merck, Darmstadt
FPLC-Puffer	- 100 mM Tris - 1,5 M NaCl - 100 mM EDTA in H ₂ O dest.
Heparin	Braun, Melsungen
HeptadecansäureIS –(IS_FA17:0)	Heptadecansäure 200 µg/ml in Methanol/Toluol, 4/1, v/v
Interner Standard 1 (IS1)	- 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (118.85 µg/ml) - cholest-5-en-3β-yl heptadecanoat (593.27 µg/ml) - Glyceryltridecanoat (118.85 µg/ml) - N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosin (118.85 µg/ml) - 1-heptadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin (118.85 µg/ml) - 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (118.85 µg/ml) - 1-o-pentadecanyl-3-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycerol (118.85 µg/ml) - 1,3-diheptadecanoyl glycerol (118.85 µg/ml) - 1,2-di-O-tridecyl-sn-glycero-3-phosphocholin (118.85 µg/ml) - N-heptadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholin (118.85 µg/ml) - 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin Natriumsaz (118.85 µg/ml) - 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate Natriumsalz (118.85 µg/ml) - Heptadecansäure (237.31 µg/ml) in Folch-Lösung
Interner Standard 2 (IS2)	- d4-GCDCA (100 µM) - d6- 25-OH-Cholesterin (100 µM) - d7-Cholesterin (1000 µM) in Folch-Lösung
Marine oil fatty acid methyl ester mix	Restek, USA
Ketamin, 100 mg/ml	Albrecht, Aulendorf

Tabelle J - 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
Lockmasse	1,082 mg Hexakis(1H, 1H, 2H-Perfluoroethoxy)phosphazene/ml in 2-Propanol
Lowry Lösung A	- 2% Na ₂ CO ₃ - 0,02% Natriumkaliumtartrat in 0,1 M NaOH
Lowry Lösung B	0,5% CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 5% SDS in H ₂ O dest.
Lysis-Puffer zur Bestimmung der Leberlipide	- 2 mM CaCl ₂ - 80 mM NaCl - 1% TritonX-100 - 50 mM Tris/HCl in H ₂ O dest., pH 8,0
MeOHBHT	110 mg BHT in 200 ml Methanol
Na ₂ CO ₃ -Lösung	6 %ig in Wasser
NaCl, 0,9 w/v %	Braun [®] , Melsungen
Narkoselösung	Ketamin (100 mg/ml)/Xylazine (2 %)/NaCl (0.9 %); 2.3/1.0/6.7, v/v/v; 15 µL/g bodyweight
PBS	GIBCO/BRL, Eggenstein
Precipath [®]	Roche Diagnostics [®] , Mannheim
Thioglycolat-Medium	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trizol [®]	Invitrogen by life technologies [®] , USA
Xylazin, 2 %	Bayer, Leverkusen

1.4 Verbrauchsmaterialienverzeichnis

Im folgenden Verzeichnis sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Spezifikation

Produkt	Hersteller
Bördelkappe, Teflon-beschichtet	CS-Chomatographie Service GmbH, Langerwehe
GC-Säule, DB-225	30 m 9 0.25 mm id., film thickness 0.25 μ m, Agilent Technologies, Waldbronn
Glasvials	32 x 11,6 mm, CS-Chomatographie Service GmbH, Langerwehe
HPLC-Säule, Accucore™ Polar Premium	150 x 2,1 mm, 2,6 μ m, Porengröße: 140 Å, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inlets für Glasvials	G30ls/6mm, CS-Chomatographie Service GmbH, Langerwehe
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Sardstedt, Nürnberg
Metallkugel	4 mm, Qiagen, Venlo, Niederlande
Mikrotiterplatten	Sardstedt, Nürnberg
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sardstedt, Nürnberg
Polyallomer-Röhrchen	Beckmann Counter GmbH, Krefeld
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß, 15 ml	BD Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäß, 2 ml, safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Braun, Melsungen
Stabpipetten	Sardstedt, Nürnberg
Superose™ 6 10/300 GL Säule	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann Counter GmbH, Krefeld
UPLC-Säule, Kinetex XB-C18	150 mm x 2.1 mm x 1.7 μ m, Phenomenex, Aschaffenburg
UPLC-Vorsäule	SecurityGuard ULTRA Holder für UPLC Säulen von 2,1 bis 4,6mm ID Phenomenex®, SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 für 2,1mm ID Säulen, Phenomenex, Aschaffenburg
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Nunc™, VWR, Darmstadt
Zellschaber	Sardstedt, Nürnberg
β -Counter-Szintillations-Röhrchen	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
γ -Counter-Szintillations-Röhrchen	Perkin Elmer, Waltham, USA

1.5 Arbeitsgeräteverzeichnis

Im folgenden Verzeichnis sind die verwendeten Arbeitsgeräte tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 5: Verwendete Arbeitsgeräte

Gerät	Hersteller
7900HT sequence detection system, ABI Prism	Applied Biosystems, Santa Clara, USA
ÄKTA, FPLC-System	GE Healthcare, München
Accu-Check Aviva Sticks	Roche Diagnostics, USA
Gaschromatograph, HP 5890	Hewlett Packard
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
HPLC, Agilent Technologies 1200 Series	(Degasser, Binary Pump, High Performance Autosampler SL, Thermostated Column Department SL), Agilent Technologies, Waldbronn
Kugelmühle	Tissue Lyser™, Qiagen manufactured by Retsch, Haan
Magnetrührer	KA, Labortechnik, Staufen i. Br.
Massenspektrometer, ESI-QqQ, API4000 Q Trap	Applied Biosystems, Darmstadt
Massenspektrometer, ESI-qToF, maXis® 3G	Serial Number: 10114, Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Microzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten Reader und Software	GE Healthcare, München
Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Operationsbesteck	Aesculap, Braun, Melsungen
Peristaltikpumpe	Gilson, Frankreich
pH-Meter	Mettler, Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Pipettierhilfe	AccuJet, Brand, Wertheim
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort mit Thermoblocks für 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge ausgestattet mit SW41 Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
UPLC, Ultimate 3000 System	(Ultimate 3000 RS Pump , Ultimate 3000 RS Autosampler, Ultimate 3000 RS Column Compartment), Dionex GmbH, Idstein
Vakuum Zentrifuge	Hetovac, Pump: Vacuubrand
Vortex-Schüttler Typ REAX DR	Heidolph, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge 6K15	Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz
β-Szintillationscounter	Perkin Elmer, Waltham, USA
γ-Counter	Perkin Elmer, Waltham, USA

1.6 Softwareverzeichnis

Im folgenden Verzeichnis ist die verwendete Software tabellarisch aufgeführt:

Tabelle J - 6: Verwendete Software

Software	Hersteller
MicrOTOF Control SR2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Microsoft Office Standard Edition 2011	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism Software	GraphPad Software, La Jolla, USA
Chromeleon [®] , 6.80	Dionex, Idstein
DataAnalysis 4.0	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Analyst 1.6.1.	Applied Biosystems, Darmstadt
Hystar 3.2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
TargetAnalysis 1.3	Bruker Daltonik GmbH, Bremen

2 Ergänzungen zum Teil C – Ergebnisse

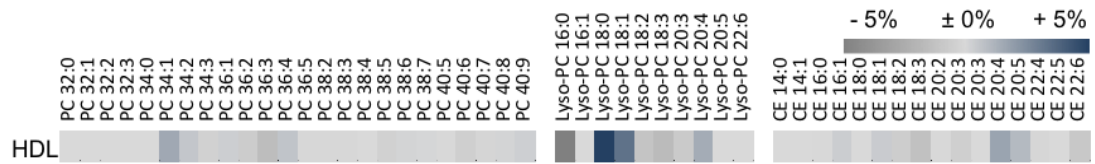


Abbildung J - 1: Lipidprofile in isolierten HDL von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

In C57BL/6J-Tieren sind nach einwöchiger Behandlung mit CL316,243 (CL) deutliche Änderungen der einzelnen Lipidspezies isolierten HDL zu detektieren, welche ähnlich zu den in BAT-aktivierten ApoA5^{-/-}-Tieren sind (Abbildung C - 1). (HDL = *high density lipoprotein*, CE = Cholesteinester, LysoPC = Lysophosphatidylcholin, PC = Phosphatidylcholin (Anmerkung zur Nomenklatur der Lipidspezies: Ziffer links des Doppelpunktes gibt die Summe der C-Atome aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an, Ziffer rechts des Doppelpunktes gibt die Summe der Doppelbindungen aller in dem jeweiligen Lipid enthaltenen Fettsäuren an); n = 5; Futter: Chow; die Bestimmung der Lipidprofile erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode; die Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

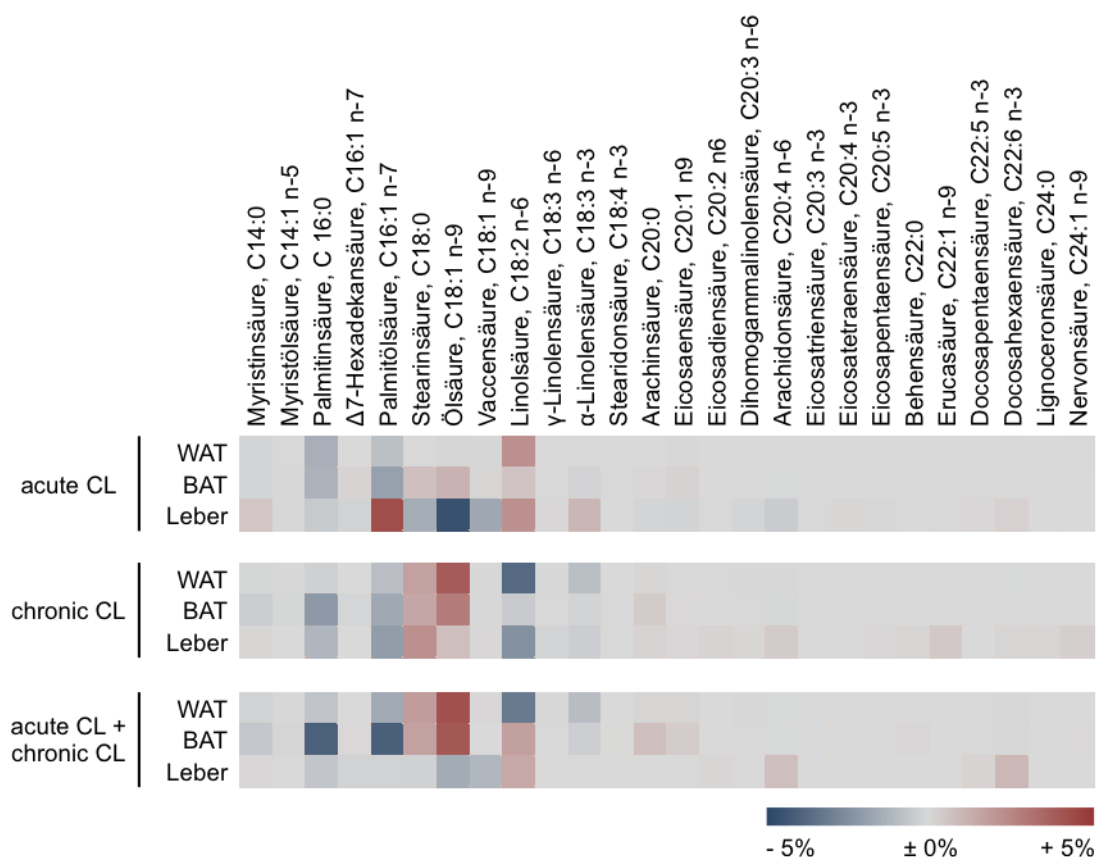


Abbildung J - 2: Fettsäureprofile in Geweben und isolierten Lipoproteinpartikeln von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

Die Fettsäure-Analyse von epididymalem weißem Fettgewebe (WAT), braunem Fettgewebe (BAT), TRL und HDL nach (a) einer einmaligen Injektion mit CL 316,243 (CL) („acute CL“), (b) einwöchiger CL-Behandlung („chronic CL“) oder (c) der Kombination aus chronischer und akuter Applikation („chronic + acute CL“) in C57BL/6J-Mäusen weist auf eine Änderung der Verteilung der Fettsäuren in den verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der Dauer der BAT-Aktivierung hin. (n = 6; Futter: Chow; die Bestimmung der Fettsäureprofile erfolgte mittels einer GC-FID-basierten Methode; Daten sind als Differenz zu Mock-behandelten Tieren dargestellt)

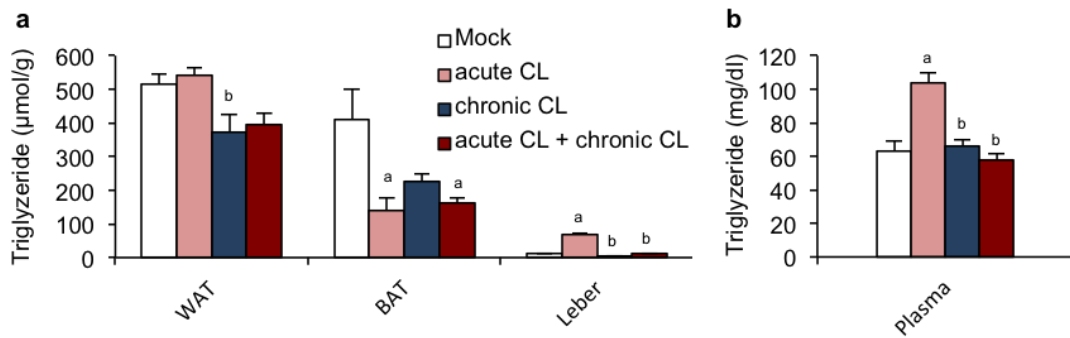


Abbildung J - 3: Konzentration an Triglyzeriden in Geweben und Plasma von C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch CL

Die Messung der Triglyzeride in (a) epididymalem weißen Fettgewebe (WAT), braunem Fettgewebe (BAT) und (b) Plasma erfolgte nach einer einmaligen Injektion mit CL 316,243 (CL) („acute CL“), (b) einwöchiger CL-Behandlung („chronic CL“) oder der Kombination aus chronischer und akuter Applikation („chronic + acute CL“) in C57BL/6J-Mäusen. (n = 6; Futter: Chow; die Bestimmung der Konzentration an Triglyzeriden in Geweben erfolgte mittels einer UPLC-ESI-QqTOF-basierten Methode, die im Plasma enzymatisch; a $P < 0,05$ vs. Mock; b $P < 0,05$ vs. acute CL)

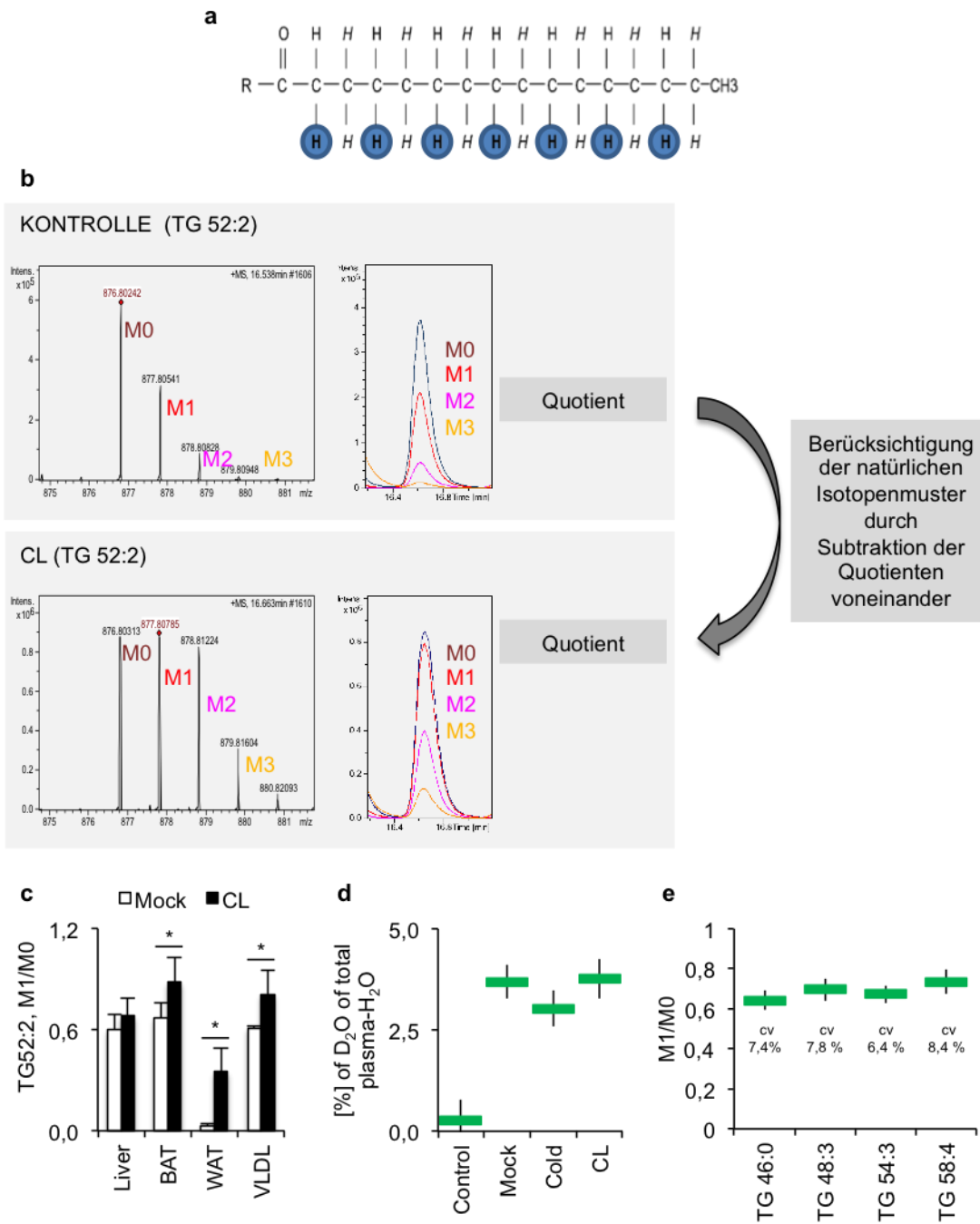


Abbildung J - 4: Ergänzungen zur Durchführung der Auswertung und Validierung der Ergebnisse der Fluxomics-Studie

(a) Inkorporation von Wasserstoff in Palmitinsäure. Bei der Synthese von Palmitinsäure entstammen sieben Wasserstoffatome direkt aus Wasser (blau hinterlegt), vierzehn aus NADPH (kursiv) und zehn aus Acetat. (b) Die Inkorporation von Deuterium in *de novo* synthetisierte Moleküle wird durch die Bildung der Quotienten aus den Massen M1 und M0 zu einer bestimmten Zeit berechnet. Zur Berücksichtigung der natürlichen Isotopenmuster wird weiterhin der erhaltene Wert um das natürlich vorkommenden Verhältnis von M1/M0 (Kontrolle) der jeweiligen zu der bestimmten Retentionszeit eluierenden Masse korrigiert. (c) Inkorporation von Deuterium in Mock oder CL-behandelten Tieren nach Berücksichtigung des natürlich vorkommenden Isotopenverhältnisses. Exemplarische Darstellung für das Triglycerid 52:2. (d) Die Headspace-basierte GC-MS-Analytik zeigt eine vergleichbare Anreicherung von Deuterium im Plasma Wasser von ca. 4 % nach Ende der Studie, wohingegen die unbehandelten Kontroll-Tiere keine Anreicherung ausweisen. (e) Wie anhand der prozentualen Abweichung ($cv < 15\%$) deutlich wird, zeigt sich eine reproduzierbare Anreicherung von Deuterium in den verschiedenen Triglyceridspezies innerhalb der Tiere einer Gruppe ($n = 7$). ($*P < 0,05$)

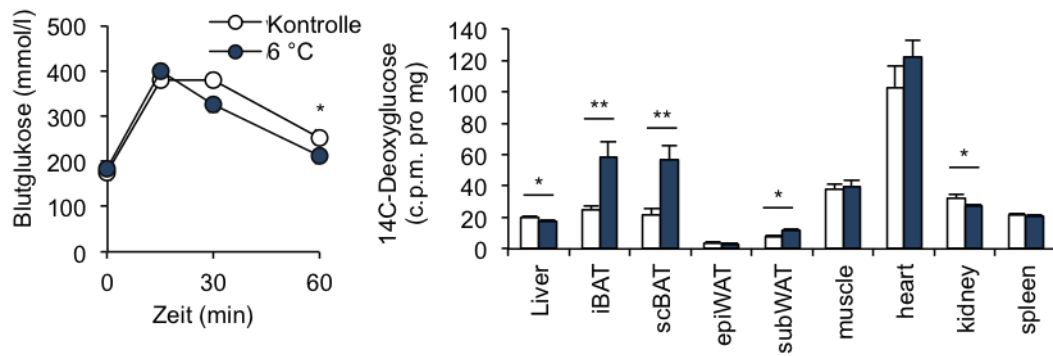


Abbildung J - 5: Kombination aus oralem Glukose-Toleranz-Test und *in vivo* Glukose-Organaufnahme in C57BL/6-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

Die Durchführung des oralen Glukose-Toleranz-Tests erfolgte in C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C und in Kontrolltieren (27 °C). Die Blutglukose wurde nach Gavage zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. (a) Nach Aktivierung des BAT ist ein signifikant schnellerer Abfall in der Konzentration der Blutglukose zu messen. (b) Gleichzeitig ist dies mit einer erhöhten Aufnahme an Glukose in die braunen und weißen Fettgewebe-Depots verbunden. (n = 8; Futter: WTD; die Durchführung erfolgte wie unter Teil B, 11 beschrieben, ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$)

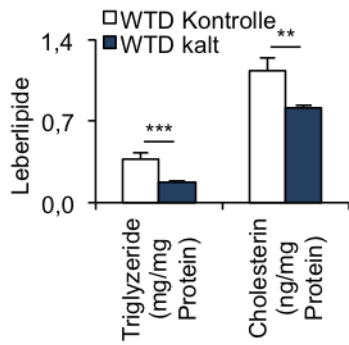


Abbildung J - 6: Leberlipidgehalte in C57BL/6-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C

Die Messung der Leberlipide erfolgte in C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Adaption an 6 °C und in Kontrolltieren (27 °C). Nach Aktivierung des BAT sind sowohl die Konzentrationen an Triglyzeriden als auch an Cholesterin in der Leber signifikant reduziert. (n = 8; Futter: WTD; die Durchführung erfolgte wie unter Teil B, 3 beschrieben, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$)

3 Wissenschaftliche Publikationen, Vorträge und Poster, die aus der Promotion hervorgegangen sind

3.1 Publikationen

1 A. Bartelt, C. Weigelt, M. L. Cherradi, A. Niemeier, K. Todter, J. Heeren, and L. Scheja, 'Effects of Adipocyte Lipoprotein Lipase on De Novo Lipogenesis and White Adipose Tissue Browning', *Biochim Biophys Acta*, 1831 (2013), 934-42.

2 C. Baumeier, D. Kaiser, J. Heeren, L. Scheja, C. John, C. Weise, M. Eravci, M. Lagerpusch, G. Schulze, H. G. Joost, R. W. Schwenk, and A. Schurmann, 'Caloric Restriction and Intermittent Fasting Alter Hepatic Lipid Droplet Proteome and Diacylglycerol Species and Prevent Diabetes in Nzo Mice', *Biochim Biophys Acta*, 1851 (2015), 566-76.

3 J. F. Berbee, M. R. Boon, P. P. Khedoe, A. Bartelt, C. Schlein, A. Worthmann, S. Kooijman, G. Hoeke, I. M. Mol, C. John, C. Jung, N. Vazirpanah, L. P. Brouwers, P. L. Gordts, J. D. Esko, P. S. Hiemstra, L. M. Havekes, L. Scheja, J. Heeren, and P. C. Rensen, 'Brown Fat Activation Reduces Hypercholesterolaemia and Protects from Atherosclerosis Development', *Nat Commun*, 6 (2015), 6356.

4 C. John*, P. Werner*, A. Worthmann, K. Wegner, K. Todter, L. Scheja, S. Rohn, J. Heeren, and M. Fischer, 'A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Simultaneous Determination of Hydroxy Sterols and Bile Acids', *J Chromatogr A*, 1371 (2014), 184-95.

Eingereichte Manuskripte:

E. Meiss*, P. Werner*, C. John*, L. Scheja, N. Herbach, J. Heeren, M. Fischer, , Metabolite targeting: Development of a Comprehensive Targeted Metabolomics Platform for the Assessment of Diabetes and its Complications' bei *Metabolomics*

M. Lubura, D. Hesse, M. Krämer, N. Hallahan, M. Schupp, C. Loeffelholz, J. Kriebel, N. Rudovich, A. Pfeiffer, C. John, L. Scheja, J. Heeren, C. Koliaki, M. Roden, A. Schürmann, , Diabetes prevalence in NZO females depends on estrogen action on liver fat content', bei *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*

A. Bartelt*, C. John*, J.F.P. Berbée*, A. Worthmann¹, M. L.Cherradi, C. Schlein, N. Schaltenberg, J. Schmidt, M.R. Boon, F. Rinninger, M. Heine, K. Toedter, S.K. Nilsson, M. Fischer, A. Niemeier, L. Scheja, P.C.N. Rensen*, J.Heeren*, , Brown and beige adipocyte activity controls metabolic flux through the HDL compartment', bei *nature communications*

* geteilte Erstautorenschaft

3.2 Vorträge

3.2.1 *Eingeladene Vorträge*

- *Brown Adipose Tissue Activation remodels the Lipidomic Landscape of Metabolically Active Tissues*
2013, Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Leipzig
- *Brown Adipose Tissue Activation Alters the Lipidomic Landscape*
2014, PRBC, Baton Rouge, USA

3.2.2 *Vorträge auf nationalen und internationalen Kongressen*

- *Brown Adipose Tissue Activation remodels the Lipidomic Landscape of Metabolically Active Tissues: A High-Resolution UPLC-MS Fluxomic Approach*
2013, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Berlin
- *Fluxomics: a tool to reveal alterations in lipid metabolism after brown adipose tissue activation*
2013, 3rd European Lipidomics Meeting, Pardubice, Tschechien
- *Brown Adipose Tissue Activation remodels the Lipidomic Landscape of Metabolically Active Tissues: A High-Resolution UPLC-MS Fluxomic Approach*
2013, European Lipoprotein Club, Tutzing
- *Impact of Adaptive Thermogenesis on Systemic Lipid and Cholesterol Handling*
2014, LIPID MAPS Annual Meeting, La Jolla, USA

3.3 *Poster auf internationalen Kongressen*

- *Impact of Adaptive Thermogenesis on Systemic Lipid and Cholesterol Handling*
2014, LIPID MAPS Annual Meeting, La Jolla, USA
- *Cold-activated Brown Adipose Tissue Regulates Systemic Cholesterol Metabolism*
2014, 4th European Lipidomics Meeting, Graz, Österreich
- *Brown Adipose Tissue Activation Regulates Bile Acid Metabolism and Shapes the Gut Microbiome*
2015, Keystone Symposia on Beige and Brown Fat: Basic Biology and Novel Therapeutics, Snowbird, USA

4 Danksagung

Zunächst möchte ich mich vor allem bei **Jörg Heeren** und auch **Ludger Scheja** sowie **Alexander Bartelt** für die gute Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das äußerst spannende Thema, viele konstruktive und gute Diskussionen sowie Ratschläge und eine großartige Betreuung bedanken.

Für die gute Kooperation und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanke ich mich herzlich bei **Markus Fischer, Maria Riedner, Philipp Werner, Katrin Wegner** und **Marina Creydt**. Besonders Philipp und Maria haben mir in vielen kniffligen Situationen am Massenspektrometer mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Ganz besonders bedanke ich mich bei **Anna Worthmann** und auch **Nicola Schaltenberg, Julia Schmidt, Miriam Baguhl** und **Lisa Cherradi** für eine einzigartige Zusammenarbeit, großartige und spannende Diskussionen und eine zweifelsfrei tolle Zeit.

Im „Kellerlabor“ gilt mein Dank **Meike Kröger** und **Klaus Tödter**. Bei euch habe ich mich immer „zu Hause“ gefühlt.

Für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und Ratschläge, tolle Unterstützung und gute Stimmung im Labor möchte ich mich bei **Sandra Ehret, Birgit Henkel, Eva-Marie Azizi** und **Walter Tauscher** ganz herzlich bedanken.

Bei **Brigitte Müller, Kirstin Albers, Krissi Gottschling, Nils Mangels, Markus Heine, Lucia Krott, Denise Bargheer, Christian Schlein** und **Alexander Fischer** möchte ich mich für die nicht nur bei der Arbeit erstklassige Atmosphäre bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der „guten Seele“ des Instituts, **Christine Runge**, bedanken. Weiterhin gilt mein Dank **Dieter Münch-Harrach**, der für jegliches technische Problem eine Lösung hat.

Freunde machen das Leben einfach lebenswerter. Daher sind an dieser Stelle einerseits meine „Uni-Mädels“ + Anhang: **Yvonne Peglow, Katja Schilling + Chris, Olga Kraus + Paul, Katrin Häusler + Martin** und andererseits meine guten, alten Uetersener Freunde: **Kristin Harms + Anton, Miriam + René Daschner** und **Wiebke Schuldt** unbedingt zu erwähnen. Ihr seid fabelhaft!

Mein besonderer Dank gilt meiner **lieben Familie**, die zu jeder Zeit für mich da ist, mich in meinem Tun und Handeln zweifelsfrei unterstützt und es immer wieder schafft mich auch in der größten Aufregung wieder „auf den Teppich zurück zu holen“. Speziell bei meinem **Mann Dennis** möchte ich mich für sein Verständnis und seine unerschöpfliche Geduld bedanken.

5 Lebenslauf

CLARA JOHN (GEB. WEIGELT)

*21. Dezember 1986

Behringstraße 44b

22763 Hamburg

c.john@uke.de

Bildung

- 01/2012 – **Promotion**
Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel
Mentor: Prof. Dr. Jörg Heeren, Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
- 10/2006 – 10/2011 **1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie**, Institut für Lebensmittelchemie, Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg (sehr gut)
- 08/2010 – 10/2011 **Diplomarbeit**
Entwicklung einer Metabolic-Profiling-Methode zur Prädiagnostik von Diabetes mellitus und diabetischer Nephropathie basierend auf HILIC-LC-ESI-MS/MS am Beispiel der GIPR^{dn}-Maus
Mentor: Prof. Dr. Markus Fischer, Institut für Lebensmittelchemie, Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg (1,0)

Auszeichnungen

- 01/2012 **Competence in Food Award 2011** der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, für die beste Diplomarbeit im Jahr 2011
- 01/2011 **Competence in Food Award 2010** der Universität Hamburg, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, für das beste Abschlusskolloquium im Jahr 2010

6 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Datum, Unterschrift