

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Prof. Dr. Jörg Heeren

## **Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für die Aufrechterhaltung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Miriam Baguhl  
aus Hamburg

Hamburg 2017

---

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31.05.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Samuel Huber**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Metabolische Syndrom .....	1
1.2 Das braune Fettgewebe.....	1
1.2.1 Die Morphologie und Physiologie des braunen Fettgewebes .....	2
1.2.2 Das <i>browning</i> von weißem Fettgewebe.....	3
1.2.3 Die Aktivierung des braunen Fettgewebes als Therapieoption für die Behandlung des metabolischen Syndroms .....	5
1.3 Das intestinale Mikrobiom.....	7
1.3.1 Die Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für den murinen und humanen Metabolismus.....	8
1.4 Der Gallensäurestoffwechsel .....	10
1.4.1 Das bakterielle Enzym <i>bile salt hydrolase</i> : Interaktionen zwischen Gallensäuren und dem intestinalen Mikrobiom.....	12
<b>2 Fragestellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1 Material.....	16
3.1.1 Chemikalien .....	16
3.1.2 Lösungen und Puffer .....	17
3.1.3 Kits und Reagenzien .....	18
3.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	18
3.1.5 Arbeitsgeräte.....	19
3.1.6 <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -Sonden.....	19
3.1.7 Software.....	20
3.2 Methoden .....	21
3.2.1 Versuchstiere, Diät und Interventionen.....	21
3.2.1.1 Versuchstiere.....	21
3.2.1.1.1 Blut- und Organentnahme .....	21
3.2.1.2 Diät.....	21

3.2.1.3	Interventionen.....	21
3.2.1.3.1	Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	21
3.2.1.3.2	Eradikation des intestinalen Mikrobioms.....	22
3.2.1.3.3	Fäzes-Transplantation.....	22
3.2.2	Plasma-Analytik.....	22
3.2.2.1	Bestimmung von Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Plasma.....	22
3.2.2.2	Bestimmung des Lipoproteinprofils mittels <i>fast-protein liquid chromatography</i> im Plasma.....	23
3.2.3	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>real-time</i> PCR.....	23
3.2.3.1	RNA-Isolation aus Gewebe.....	23
3.2.3.2	Umschreibung von RNA zu cDNA.....	24
3.2.3.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	24
3.2.4	Quantifizierung des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rDNA Sequenzierung in Fäzes.....	25
3.2.5	HPLC-ESI-QqQ-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von Gallensäurespezies in Fäzes.....	25
3.2.6	BSH-Aktivitäts-Assay.....	26
3.2.7	Kombination aus oralem Glukosetoleranz-Test und in vivo Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden.....	28
3.2.7.1	Oraler Glukosetoleranz-Test.....	28
3.2.7.2	<i>In vivo</i> Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden.....	28
3.2.8	Statistik.....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
4.1	Analyse thermogener Gene nach 7-tägiger Kälteadaptation in C57BL/6J-Mäusen mit intaktem intestinalem Mikrobiom.....	29
4.2	Auswirkungen der Eradikation des intestinalen Mikrobioms auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes.....	30
4.2.1	Analyse des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme.....	30
4.2.2	Messung des Gewichts der unterschiedlichen Fettgewebedepots.....	32
4.2.3	Analyse des intestinalen Mikrobioms.....	33

4.2.4	Messung und Quantifizierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms <i>bile salt hydrolase</i> .....	34
4.2.5	Analyse der fäkalen Ausscheidung von Gallensäuren.....	35
4.2.6	Analyse der Genexpression thermogener Gene im braunen Fettgewebe und in beigen Adipozyten.....	38
4.2.6.1	Analyse proinflammatorischer Gene in beigen und weißen Adipozyten 40	
4.3	Auswirkungen der Transplantation von Fäzes aus C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte .....	41
4.3.1	Analyse des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme .....	41
4.3.2	Bestimmung der Lipidkonzentration und des Lipoproteinprofils im Plasma ....	42
4.3.3	Analyse der Gallensäurekomposition in Fäzes .....	44
4.3.4	Analyse der Genexpression thermogener Gene im braunen Fettgewebe und in beigen Adipozyten.....	46
4.3.5	Bestimmung der Glukosetoleranz mittels oralem Glukosetoleranz-Test und Quantifizierung der Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden .....	47
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
5.1	Bedeutung der Eradikation des intestinalen Mikrobioms für die thermogene Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes.....	50
5.2	Intestinaler Mikrobiom-Transfer als möglicher Übertragungsweg der thermogenen Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes.....	55
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>12</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>80</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>14</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>82</b>
<b>15</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>83</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Metabolische Syndrom

Die Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit nimmt weltweit stetig zu. Eine aktuelle Studie, die die Veränderungen des *body-mass index* (BMI) von 1945 bis 2014 in 200 Ländern erfasste, zeigte, dass mittlerweile weltweit bereits mehr übergewichtige, als untergewichtige Menschen leben. Demnach lebten im Jahr 2014 rund 266 Millionen übergewichtige Männer und etwa 375 Millionen übergewichtige Frauen weltweit (Collaboration 2016). Dieser dramatische Anstieg geht ebenfalls mit einem Anstieg der Prävalenz des sogenannten Metabolischen Syndroms einher (Eckel et al. 2005). Das Metabolische Syndrom ist dabei im Wesentlichen gekennzeichnet durch das parallele Auftreten der folgenden vier Faktoren: gestörte Glukosetoleranz, als Folge einer Insulinresistenz, abdominelle Fettleibigkeit, arterieller Hypertonus sowie Dyslipidämie (Eckel et al. 2005). Damit stellen das Metabolische Syndrom und die mit dem Metabolischem Syndrom verbundenen Faktoren ebenfalls Risikofaktoren für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise Myokardinfarkt und Schlaganfall dar (Grundy et al. 2004, Han und Lean 2016, Isomaa et al. 2001, Lakka et al. 2002). Daher wird das metabolische Syndrom auch als sogenanntes „tödliches Quartett“ (Kaplan 1989) bezeichnet. Somit wird deutlich, weshalb dringend neue Behandlungsstrategien im Kampf gegen Übergewicht und dem daraus resultierenden Metabolischen Syndrom benötigt werden.

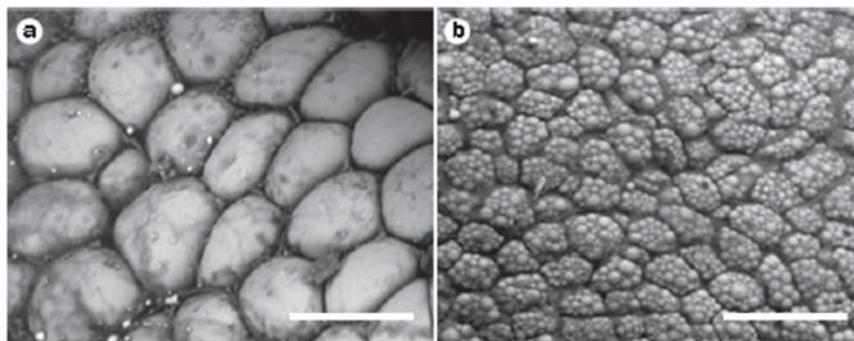
## 1.2 Das braune Fettgewebe

Braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*; BAT) dient der zitterfreien Thermogenese in Säugetieren (Cannon und Nedergaard 2004) und fungiert damit, im Gegensatz zum weißen Fettgewebe, nicht einzig als Depot zur Speicherung von Energie, sondern nutzt die in Form von Lipiden gespeicherte Energie direkt zur Produktion von Wärme. Dieser Prozess, welcher der Aufrechterhaltung der Körpertemperatur während eines anhaltenden Kältereizes dient, wird als zitterfreie Thermogenese bezeichnet. Dabei sind braune Adipozyten, im Gegensatz zu weißen Adipozyten, durch eine hohe Dichte von Mitochondrien gekennzeichnet (Bartelt und Heeren 2014). Die in den Mitochondrien enthaltenen Cytochrome und das wiederum in ihnen gebundene Eisen sorgen dabei für den typischen braunen Phänotyp des braunen Fettgewebes (Lüllmann-Rauch 2009). An der inneren Mitochondrienmembran der braunen Adipozyten ist das *uncoupling protein 1* (UCP1) lokalisiert. UCP1, welches laut Bouillaud et al. (2016) erstmals im Jahre 1976 beschrieben wurde (Ricquier und Kader 1976), ist das entscheidende Protein der zitterfreien Thermogenese. Es entkoppelt den Elektronentransport der Atmungskette von der Adenosintriphosphat (ATP) Produktion, indem es den durch den Elektronentransport aufgebauten Protonengradienten aufhebt (Betz und Enerbäck 2011). Die dadurch frei werdende Energie wird

dann in Form von Wärme über den Blutkreislauf an den gesamten Organismus abgegeben (Bartelt und Heeren 2014).

### 1.2.1 Die Morphologie und Physiologie des braunen Fettgewebes

Die zelluläre Morphologie des braunen im Vergleich zum weißen Fettgewebe ist in Abbildung 1-1 dargestellt. Weißes Fettgewebe besteht aus univakuolären Adipozyten, welche einen großen Lipidtropfen beinhalten, der den kompletten Adipozyten ausfüllt und dabei den Zellkern gänzlich an den Rand der Zellmembran verdrängt, was in der typischen Siegelringform des weißen Adipozyten resultiert (Lüllmann-Rauch 2009). Braunes Fettgewebe hingegen besteht aus plurivakuolären braunen Adipozyten, die zahlreiche kleine Lipidtropfen beinhalten.



**Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie von weißen und braunen Adipozyten**

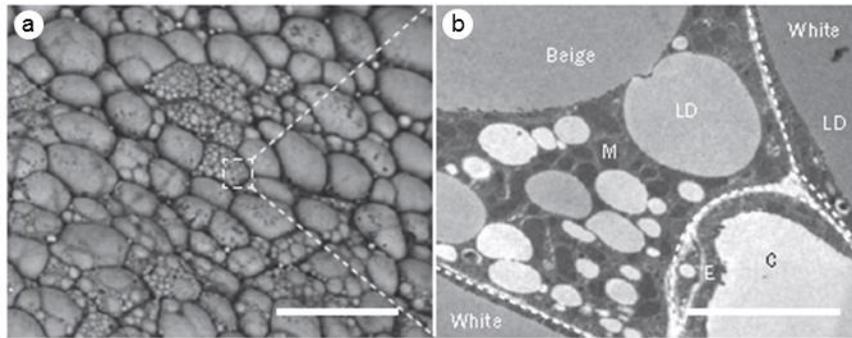
(a) Weiße Adipozyten sind univakuolär und bestehen somit aus großen unilobulären Lipidtropfen. (b) Braune Adipozyten werden charakterisiert durch ihr plurivakuoläres Erscheinen und zahlreiche multilobuläre Lipidtropfen. Weißer Balken = 50 µm. Abbildung wurde adaptiert nach Bartelt und Heeren (2014).

Zudem ist das braune Fettgewebe besonders gut vaskularisiert, was zum einen auf den hohen Sauerstoffverbrauch zurückzuführen ist und zum anderen die Abgabe der vom BAT produzierten Wärme an den Organismus ermöglicht (Bartelt und Heeren 2012, Betz und Enerbäck 2011). Das braune Fettgewebe ist zusätzlich durch zahlreiche noradrenerge Fasern innerviert, welche für die Aktivierung des braunen Fettgewebes essentiell sind. Die Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgt über  $G_s$ -Protein gekoppelte  $\beta^3$ -adrenerge Rezeptoren, welche auf den braunen Adipozyten lokalisiert sind (Cannon und Nedergaard 2004). Kommt es zu einem Kältereiz, beispielsweise in Neugeborenen im Zuge der Geburt, führt dieser Reiz zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zur Freisetzung von Noradrenalin, das wiederum an die  $\beta^3$ -adrenergen Rezeptoren des braunen Fettgewebes bindet und diese aktiviert. Dies resultiert in einer Aktivierung der Adenylatzyklase und führt somit zu einer vermehrten Umwandlung von ATP in cAMP. Die erhöhte Konzentration von cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA). PKA phosphoryliert im Folgenden unter anderem die Hormonsensitive Lipase (HSL), die daraufhin die Lipolyse der in den Lipidtropfen des braunen Fettgewebes gespeicherten Triglyzeride aktiviert (Egan et al. 1992, Holm et al. 1988, Stralfors und

Belfrage 1983). Die auf diese Weise frei werdenden Fettsäuren dienen dann einerseits in Form von Acetyl-CoA als Substrat für die zitterfreie Thermogenese und führen andererseits direkt zu einer Aktivierung von UCP1 (Cannon und Nedergaard 2004). PKA führt ebenfalls zur Aktivierung von *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK). MAPK phosphoryliert den *activating transcription factor 2* (ATF-2), welcher daraufhin an das *cAMP-responsive element* (CRE) bindet und somit die Transkription von *Ucp1* und *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (*Pgc1α*) aktiviert (Cao et al. 2004). *PGC1α* reguliert die Biogenese der Mitochondrien und führt wiederum zu einer Induktion der Expression von *Ucp1* (Bartelt und Heeren 2014, Cao et al. 2004, Puigserver et al. 1998). Der UCP1 Promoter verfügt zudem über eine Bindungsstelle für den Thyroid-Hormon Rezeptor (Cassard-Doulcier et al. 1994). Im braunen Fettgewebe konnte ebenfalls die Expression von *type 2 iodothyronine deiodinase* (*Dio2*) nachgewiesen werden (Bianco und Silva 1987, de Jesus et al. 2001, Leonard et al. 1983, Silva und Larsen 1983). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von inaktivem Thyroxin ( $T_4$ ) in seine aktive Form Triiod-L-thyronin ( $T_3$ ), was in einer Aktivierung von Thyroid-Hormon Rezeptoren und in einer erhöhten Expression von *Ucp1* im braunen Fettgewebe resultiert (Bartelt und Heeren 2014). Die Aktivierung von DIO2 erfolgt dabei über die Phosphorylierung von *cAMP-response element binding protein* (CREB) durch die MAPK und wird damit ebenfalls über die  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptoren des braunen Fettgewebes reguliert (Martinez-deMena und Obregon 2005). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes führt außerdem zu einer erhöhten Expression des Enzyms *elongation of very long chain fatty acids 3*, kurz *Elovl3* (Tvrdik et al. 1997). ELOVL3 verlängert gesättigte und ungesättigte Fettsäuren ab einer Länge von 24 C-Atomen (Oh et al. 1997). Dabei scheint ELOVL3 vor allem für die Lipidakkumulation in der frühen Phase der Differenzierung des braunen Fettgewebes nach Kälteaktivierung von Bedeutung zu sein (Westerberg et al. 2006). Fettsäuren mit einer maximalen Länge von 16 C-Atomen werden hingegen durch die *fatty acid synthase* (FASN) verlängert (Zadravec et al. 2010).

### **1.2.2 Das *browning* von weißem Fettgewebe**

Nach Aktivierung des braunen Fettgewebes lässt sich die typische Morphologie von braunen Adipozyten teilweise ebenfalls in weißen Fettgewebedepots nachweisen (siehe Abbildung 1-2). In diesem Zusammenhang wird von beigen Adipozyten und vom sogenannten *browning* gesprochen (Nedergaard und Cannon 2014). Dabei sind beige Adipozyten nicht nur morphologisch dem braunen Fettgewebe sehr ähnlich, sondern weisen ebenfalls funktionelle Gemeinsamkeiten auf, denn sie exprimieren das eigentlich für braune Adipozyten spezifische Transmembranprotein UCP1. Der Prozess des *brownings* konnte, laut Nedergaard und Cannon (2014), erstmals 1984 von Young et al. in BALB/c-Mäusen nach Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes beobachtet werden (Young et al. 1984).



**Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie des beigeen Fettgewebes**

(a) Die Morphologie des beigeen Fettgewebes ist durch das vereinzelte Auftreten von Adipozyten des plurivakuolären Typs gekennzeichnet. (b) Detailaufnahme eines beigeen Adipozyten mit angrenzenden weißen Adipozyten. Sichtbar sind kleine multilokuläre Lipidtropfen (LD) sowie zahlreiche Mitochondrien (M). Weiße Balken: (a) = 50 µm; (b) = 5 µm. Die Abbildung wurde adaptiert nach Bartelt und Heeren (2014).

Außerdem ließ sich laut Cannon und Nedergaard (2014) in verschiedenen Studien nachweisen, dass die Aktivierung des beigeen Fettgewebes, ebenso wie die des klassischen braunen Fettgewebes, über noradrenerge Nervenfasern des sympathischen Nervensystems vermittelt wird (Cousin et al. 1992, Ghorbani et al. 1997, Ghorbani und Himms-Hagen 1997). Dies ist insofern bemerkenswert, als das gezeigt werden konnte, dass sich braune und weiße Adipozyten aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln. So stammen die klassischen braunen Adipozyten von Vorläuferzellen ab, die die Transkriptionsfaktoren *myogenic factor 3* (MyoD), Myogenin und *myogenic factor 5* (Myf5) exprimieren, welche eigentlich klassische Muskelzelltranskriptionsfaktoren darstellen (Timmons et al. 2007). Weiße Adipozyten und somit ebenfalls beige Adipozyten stammen dagegen von Myf5 negativen Vorläuferzellen ab (Seale et al. 2008). Dabei konnten Seale et al. (2008) zeigen, dass *PR domain containing 16* (PRDM16) der entscheidende Faktor ist, der determiniert, ob sich aus Vorläuferzellen braune Adipozyten oder Muskelzellen entwickeln. Zusätzlich konnten Seale et al. (2011) zeigen, dass PRDM16 ebenfalls in subkutanen weißen bzw. beigeen Adipozyten exprimiert wird und dort als entscheidender Mediator der zitterfreien Thermogenese fungiert. Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob beige Adipozyten via Transdifferenzierung aus weißen Adipozyten entstehen, ob sie aus spezifischen Vorläuferzellen entstehen, oder beide Prozesse nebeneinander vorliegen (Harms und Seale 2013). Dabei beschreiben Harms und Seale (2013) verschiedene Studien, die zeigen, dass sich kleine multivakuoläre beige Adipozyten direkt aus univakuolären weißen Adipozyten entwickeln können (Himms-Hagen et al. 2000, Vitali et al. 2012). Eine Studie von Wang et al. (2013) hingegen zeigt, dass sich beige Adipozyten nicht direkt durch Transformation aus weißen Adipozyten differenzieren, sondern sich aus entsprechenden Vorläuferzellen entwickeln. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Vorläufer von beigeen und weißen Adipozyten unterscheiden. Zudem konnten Wang et al. (2013) demonstrieren, dass ein bestimmtes, neu entdecktes Hormon namens Irisin, das *browning* von weißem Fettgewebe stimuliert. Dabei kommt es durch sportliche Aktivität zu einer

vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors *Pgc1 $\alpha$*  (Handschin und Spiegelman 2008). *Pgc1 $\alpha$*  wiederum stimuliert die Expression von *fibronectin type III domain-containing protein 5* (*Fndc5*), einem Vorläuferprotein, aus dem durch proteolytische Spaltung das Hormon Irisin entsteht, welches anschließend von der Muskelzelle aus in den Blutkreislauf sezerniert wird (Bostrom et al. 2012). Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch natriuretische Peptide, wie beispielweise das atriale natriuretische Peptid (ANP) die Differenzierung von beigen Adipozyten im weißen Fettgewebe aktivieren können (Bordicchia et al. 2012). Diese Erkenntnisse zeigen, dass sich das *browning* im weißen Fettgewebe nicht alleinig durch die Aktivierung  $\beta_3$ -adrenerger Rezeptoren induzieren lässt, was die Entwicklung weiterer pharmakologischer Wirkstoffe zur Aktivierung des *browning* von weißen Fettdepots im Menschen vorantreiben könnte.

### **1.2.3 Die Aktivierung des braunen Fettgewebes als Therapieoption für die Behandlung des metabolischen Syndroms**

In verschiedenen Versuchsstudien mit Mäusen und Ratten führt die Aktivierung des braunen Fettgewebes zu reduzierten Plasmatriglyzeridwerten (Bartelt et al. 2011), schützt vor der Entwicklung von Atherosklerose, durch eine Reduktion der Plasmacholesterinwerte (Berbee et al. 2015) und reguliert ebenfalls den Glukosestoffwechsel, durch eine Erhöhung der Insulinsensitivität (Cawthorne 1989, Stanford et al. 2013).

Jahrelang wurde allerdings davon ausgegangen, dass braunes Fettgewebe ausschließlich in kleinen Nagetieren, Winterschläfern und Säuglingen in signifikantem Ausmaß vorhanden ist. Nun konnten verschiedene Studien vor einigen Jahren, mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kombiniert mit einer Computertomographie (CT) und der Gabe von  $^{18}\text{F}$ -Flourdesoxyglukose, ebenfalls funktionelles braunes Fettgewebe in Erwachsenen Menschen nachweisen (Cypess et al. 2009, Nedergaard et al. 2007, Saito et al. 2009, van Marken Lichtenbelt et al. 2009, Virtanen et al. 2009). Dabei konnte laut Nedergaard et al. (2007) bereits in den 1990iger Jahren die symmetrische Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Flourdesoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) im Nacken- und Schulterbereich von Patienten, die mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG PET untersucht wurden, nachgewiesen werden. Allerdings gingen Wissenschaftler damals davon aus, dass es sich bei der Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG in diesen Bereichen, am ehesten um Artefakte durch Muskelaktivität handelte (Barrington und Maisey 1996, Engel et al. 1996). Durch die Kombination des  $^{18}\text{F}$ -FDG PET mit CT-Aufnahmen ließ sich darauf schließen, dass es sich bei dem Gewebe nicht um Muskel-, sondern Fettgewebe handelte (Nedergaard et al. 2007). Braunes Fettgewebe im Menschen ist hauptsächlich im Nacken und in Bereichen oberhalb der Klavikula lokalisiert (Nedergaard et al. 2007). Es konnte allerdings wie in dem Review von Nedergaard et al. (2007) beschrieben, zusätzlich braunes Fettgewebe in paravertebralen, mediastinalen sowie in Bereichen der Herzspitze nachgewiesen werden (Truong et al. 2004). In einer

Studie von Cypess et al. (2009), in der  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT Aufnahmen von insgesamt 1972 Patienten, die aus unterschiedlichen diagnostischen Gründen untersucht wurden, konnte in nur 76 von 1013 Frauen und 30 von 959 Männer braunes Fettgewebe nachgewiesen werden. Zudem war der Nachweis von braunem Fettgewebe invers mit dem Alter der Probanden, der zum Untersuchungszeitpunkt herrschenden Umgebungstemperatur und der Einnahme von  $\beta$ -Blockern sowie in älteren Probanden ebenfalls mit dem BMI, korreliert (Cypess et al. 2009). In einer Studie von van Marken Lichtenbelt et al. (2009), die speziell für die Detektion von braunem Fettgewebe konzipiert wurde, konnte in 23 von 24 gesunden Männern im Alter von 18 bis 30 Jahren nach milder Kältesexposition bei 16 °C braunes Fettgewebe nachgewiesen werden. Dabei war die Aktivität des BAT in den Probanden mit einem BMI < 25 signifikant höher, als in den übergewichtigen Probanden mit einem BMI > 25 (van Marken Lichtenbelt et al. 2009). In einer Studie aus dem Jahr 2011 wurden zusätzlich zum  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT auch Biopsien von supraklavikulärem sowie subkutanem Fettgewebe als Kontrolle der Studienteilnehmer histologisch und auf die Genexpression verschiedener Marker der Braunfettaktivierung untersucht (Lee et al. 2011). Dabei war mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT nur in drei von 17 Probanden braunes Fettgewebe nachweisbar. Die histologische Untersuchung dieser Proben ergab den Nachweis multilobulärer Lipidtropfen und die Genexpressionsanalysen ergaben eine signifikant erhöhte *Ucp1* Expression im jeweiligen Vergleich zu den Kontrollbiopsien des subkutanen Fettgewebes. Die Biopsien der Probanden mit einem negativem  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT ergaben histologisch ein Mischbild mit einzelnen Adipozyten, welche Depots von multilobulären Lipidtropfen enthielten. Dies entspricht eher der Morphologie des beigen Fettgewebes (siehe auch Abbildung 1-2). Immunhistochemisch ließ sich in 13 von 14 Probanden UCP1 in den entsprechenden Depots nachweisen. In allen 14 Probanden mit einem negativem  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT war die Genexpression von *Ucp1* in den Biopsien aus supraklavikulärem Fettgewebe höher als in den Kontrollbiopsien (Lee et al. 2011). Diese Ergebnisse passen ebenfalls zu einer Studie von Wu et al. (2012b), in der Biopsien des BAT aus erwachsenen Probanden anhand ihres Genexpressionsprofils untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das in den Probanden entdeckte BAT, sowohl immunhistochemisch, als auch auf Genexpressionsebene, eher dem murinen beigen Fettgewebe ähnelt, als dem klassischen braunen Fettgewebe (Wu et al. 2012a). Eine Studie mit Patienten, die an einem Phäochromozytom, einem Tumor des Nebennierenmarks, der große Mengen Katecholamine produziert, erkrankt waren, ergab, dass die Aktivität des BAT, quantifiziert mittels  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT, signifikant höher in Patienten mit erhöhten Metanephrin-Konzentrationen (Abbauprodukte der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin) im Plasma war (Wang et al. 2011). Zudem waren die erhöhte Aktivität des BAT bzw. die erhöhten Metanephrin-Konzentrationen im Plasma invers mit der abdominalen Fettmenge

korreliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des braunen Fettgewebes durch erhöhte Katecholamin-Konzentrationen im Menschen gesteigert werden kann. Virtanen et al. (2009) kalkulierten anhand der Aufnahme von Glukose und freien Fettsäuren in einem ihrer Probanden, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes innerhalb eines Jahres zu einem Verbrauch von 4,1 kg Fettgewebe führen würde. In der Studie von Cypess et al. (2009) konnte in einem Probanden rund 170 g braunes Fettgewebe nachgewiesen werden. Diese Menge entspricht einem täglichen Energieverbrauch von rund 200 kcal, was wiederum etwa 30 mg/dl Plasmatriglyzeriden entspricht (Bartelt et al. 2012).

Vor allem die pharmakologische Aktivierung des braunen Fettgewebes könnte als Therapieoption für die Behandlung des metabolischen Syndroms eine wichtige Bedeutung erlangen. Betz und Enerbäck (2011) beschreiben, dass in Versuchen mit Nagetieren vor allem  $\beta$ 3-adrenerge Rezeptoragonisten, wie beispielsweise CL316,243 zu einer Aktivierung des braunen Fettgewebes geführt haben (Himms-Hagen et al. 2000, Nagase et al. 1996). In einer aktuellen Studie von Cypess et al. (2015) konnte gezeigt werden, dass die Gabe des  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptoragonisten Mirabegron bei 12 gesunden, männlichen Probanden, bei denen vorab bereits der Nachweis von braunem Fettgewebe gelungen war, zu einer erhöhten Aktivität des BAT im  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT führte. Dabei kam es bei den Probanden im Durchschnitt zu einem zusätzlichen Energieverbrauch von rund 200 kcal pro Tag. Im Gegensatz dazu konnte eine Studie aus dem Jahr 2007 mit 56 männlichen und weiblichen, übergewichtigen Probanden ( $\text{BMI } 33.9 \pm 2.1 \text{ kg/m}^2$ ) keinen Effekt auf den Energiemetabolismus nach der Gabe des  $\beta$ 3-adrenergen Rezeptoragonisten TAK-677 nachweisen (Redman et al. 2007). Somit hat die Aktivierung des braunen Fettgewebes als Therapieoption für die Behandlung des metabolischen Syndroms durchaus Potenzial, allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um letztlich ein abgeschlossenes Therapiekonzept zu entwickeln.

### 1.3 Das intestinale Mikrobiom

Das intestinale Mikrobiom ist als die Gesamtheit der Gene aller in unserem Darm lebender Mikroorganismen definiert. Der menschliche Darm ist insgesamt von rund  $10^{14}$  Mikroorganismen kolonisiert (Imajo et al. 2014), hauptsächlich Bakterien, aber auch Viren, Protozoen, Pilze und Archaeen (Sommer und Bäckhed 2013). Laut Sommer und Bäckhed (2013) wird der Gastrointestinaltrakt insgesamt von rund 500-1000 verschiedenen Spezies besiedelt. Diese Spezies lassen sich nur ca. 7 verschiedenen Phyla zuordnen, wobei die meisten Bakterienspezies sich den Phyla der *Firmicutes* und *Bacteroidetes* zuordnen lassen, gefolgt von *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* und *Cyanobacteria* (Human Microbiome Project 2012, Qin et al. 2010). Das intestinale Mikrobiom enthält insgesamt rund 150-mal mehr Gene, als das gesamte menschliche Genom

(Qin et al. 2010). Dies macht deutlich, welche ein großes Potenzial für Interaktionen mit dem Wirt im intestinalen Mikrobiom steckt.

Die Kolonisation des menschlichen Körpers beginnt während der Geburt, wobei die Komposition des Mikrobioms im Laufe des Lebens großen Schwankungen ausgesetzt ist (Sommer und Bäckhed 2013). Zudem beschreiben Sommer und Bäckhed (2013) in ihrem Review die vielfältigen Eigenschaften des Darmmikrobioms wie folgt: das intestinale Mikrobiom ermöglicht die Resorption von ansonsten unverdaulichen Kohlenhydraten, produziert für den Menschen essenzielle Vitamine (bspw. Menachinon bzw. Vitamin K2 (Dairi 2012)), beeinflusst die Integrität des intestinalen Epithels, moduliert das Immunsystem und schützt vor opportunistisch-pathogenen Erregern (Smith et al. 2007). Auf die einzelnen Funktionen und metabolischen Interaktionen des intestinalen Mikrobioms wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

### **1.3.1 Die Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für den murinen und humanen Metabolismus**

Wichtigstes Substrat der Bakterien des intestinalen Mikrobioms sind die für den Menschen unverdaulichen Kohlenhydrate, die beispielsweise in Form von Ballaststoffen über die Nahrung aufgenommen werden (Woting und Blaut 2016). Diese werden vom intestinalen Mikrobiom in Monosaccharide und sogenannte *short-chain fatty acids* (SCFA) umgewandelt, wozu Acetat, Butyrat, Propionat etc. zählen. SCFA können anschließend vom Menschen resorbiert und weiter verstoffwechselt werden und somit als Energiequelle für den Wirt zur Verfügung stehen (Woting und Blaut 2016). Dabei konnte eine Studie von Turnbaugh et al. (2008) zeigen, dass übergewichtige, mit einer *western type diet* (WTD) gefütterte Mäuse (*Diet-induced obesity*, DIO), ein intestinales Mikrobiom exprimieren, dessen Metagenom mehr Gene für die Prozessierung einfacher Zucker enthielt. Dies führte zu einem signifikanten Anstieg von SCFA, wie bspw. Acetat und Butyrat, im Caecum dieser Mäuse. Die Transplantation der caecalen Mikrobiota aus den DIO-Mäusen führte zu einer signifikant erhöhten Körperfettmasse in den Empfängermäusen, im Vergleich zu Empfängermäusen, die caecale Mikrobiota aus normalgewichtigen Mäusen erhielten (Turnbaugh et al. 2008). Woting und Blaut (2016) beschreiben im Gegensatz dazu humane Studien, die zeigen, dass Diäten, die reich an Ballaststoffen sind, zwar zu einer erhöhten Konzentration von SCFA in den Fäzes der Probanden führen, aber gleichzeitig mit einem geringeren Körpergewicht und einer geringeren Inzidenz für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind (de Munter et al. 2007, InterAct 2015, Slavin 2005). Eine Studie in übergewichtigen Mäusen konnte zeigen, dass die Supplementation von Butyrat über die Diät zu einer erhöhten Insulinsensitivität sowie einer Aktivierung der zitterfreien Thermogenese führt, welche am ehesten über den Transkriptionsfaktor PGC1 $\alpha$  vermittelt wurde (Gao et al. 2009). Interessant in diesem Zusammenhang ist die

Tatsache, dass SCFA nicht nur als Energiequelle dienen, sondern über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR41 und GPR43 ebenfalls als Signalmoleküle fungieren (Brown et al. 2003, Kimura et al. 2013). Kimura et al. (2013) konnten in einer Studie mit *Gpr43 knockout* Mäusen zeigen, dass *Gpr43* <sup>-/-</sup> Mäuse, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT-Mäusen), signifikant mehr Gewicht zunahmten und eine deutlich reduzierte Glukosetoleranz bzw. erhöhte Insulinresistenz aufwiesen. Eine humane Studie von Schwartz et al. (2010) konnte dagegen zudem einen Zusammenhang zwischen der Produktion von SCFA durch intestinale Mikrobiota und Übergewicht belegen. Demnach war die Konzentration von SCFA in den Fäzesproben von übergewichtigen Probanden im Durchschnitt um etwa 20% erhöht, wobei die Konzentration von Propionat sogar um 40%, im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe gesteigert war. Somit ist die Rolle von SCFA als indirekter Modulator für die Auswirkungen des intestinalen Mikrobioms auf den Metabolismus bislang nicht abschließend geklärt, sodass in Zukunft weitere Studien zu diesem Thema notwendig sind.

Das Übergewicht und somit ebenfalls die Entwicklung des Metabolischen Syndroms in einem Zusammenhang mit dem intestinalen Mikrobiom stehen, zeigen zahlreiche humane und murine Studien, die die Komposition des intestinalen Mikrobioms in schlanken und fettleibigen Mäusen sowie Menschen untersuchten. So konnten Turnbaugh et al. (2009) in einer Studie mit über- und normalgewichtigen Zwillingen zeigen, dass Übergewicht zu einer Reduktion des Anteils an *Bacteroidetes* sowie zu einer insgesamt geringen Diversität des intestinalen Mikrobioms führte. Diese Ergebnisse reflektieren die Resultate einer Studie von Ley et al. (2006), die ebenfalls eine signifikante Reduktion von *Bacteroidetes* sowie einen begleitenden Anstieg von *Firmicutes* in übergewichtigen Probanden beschreiben. Durch diätetische Interventionen und den damit einhergehenden Gewichtsverlust ließ sich dieser Trend in den Probanden umkehren, sodass es im Laufe der Diät zu einem Anstieg von Bakterien des Phylums *Bacteroidetes* und einer Reduktion von Bakterien des Phylums *Firmicutes* kam. Eine weitere murine Studie von Turnbaugh et al. (2006) konnte zeigen, dass der Caecum-Inhalt von übergewichtigen Mäusen ein erhöhtes Verhältnis von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* aufwies. Zudem wurde gezeigt, dass das Mikrobiom von übergewichtigen Mäusen in der Lage war, mehr Energie aus der Diät zu resorbieren und dem Wirt zur Verfügung zu stellen. Der übergewichtige Phänotyp der Tiere war mittels Fäzes-Transplantation auf *germ-free* Mäuse übertragbar. Eine Studie von Ridaura et al. (2013), in der Fäzes von Zwillingspaaren gesammelt wurde, bei denen ein Zwilling normal- und der andere übergewichtig war, und anschließend in *germ-free* Mäuse transplantierte wurde, bestätigte die Möglichkeit einen adipösen Phänotyp einzig über die Transplantation von Fäzes auf andere Mäuse zu übertragen. Insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit Fäzes-Transplantationen als Therapieoption für die Behandlung von

Übergewicht und dem metabolischen Syndrom einzusetzen, ist es entscheidend zu erforschen, ob unser intestinales Mikrobiom hauptsächlich durch exogene Faktoren, wie beispielsweise die Diät beeinflusst wird, oder doch durch endogene, genetische Faktoren determiniert wird. Eine aktuelle Studie von Carmody et al. (2015), zeigt, dass die Diät einen größeren Einfluss auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms hat, als der Genotyp des einzelnen Individuums, jedenfalls in Mäusen. Turnbaugh et al. (2009) konnten den größeren Einfluss exogener Faktoren auf die Komposition des intestinalen Mikrobioms in ihren Studien mit ein- und zweieiigen Zwillingen bestätigen. So konnten keine größeren Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zwischen ein- und zweieiigen Zwillingen detektiert werden, auch wenn sich durchaus familiäre Übereinstimmungen nachweisen ließen, waren die individuellen Schwankungen groß. Eine weitere humane Studie, die zeigt, wie schnell diätetische Maßnahmen das intestinale Mikrobiom verändern, stammt von Lawrence et al. (2014). Hier wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen Diäten auf die Diversität des intestinalen Mikrobioms in insgesamt elf Probanden untersucht. Alle elf Probanden bekamen jeweils für fünf aufeinander folgende Tage eine Diät, die ausschließlich auf pflanzlichen Produkten basierte, und im Anschluss eine rein auf tierischen Produkten basierende Diät. Bereits nach nur einem Tag waren Unterschiede in der Komposition des intestinalen Mikrobioms messbar. Dabei kam es bei den Probanden vor allem nach dem Konsum der tierischen Diät zu signifikanten Veränderungen, beispielsweise zu einem Anstieg von Mikroorganismen, die tolerant gegenüber Gallensäuren waren (siehe auch Abschnitt 1.4.1) und zu einer Reduktion von Bakterienspezies, die sich dem Phylum *Firmicutes* zuordnen lassen. Diese Ergebnisse zeigen, wie schnell sich das intestinale Mikrobiom durch diätetische Maßnahmen verändern lässt.

Im Fokus dieser Arbeit stehen die Interaktionen zwischen dem intestinalen Mikrobiom und der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes. Eine Studie von Mestdagh et al. (2012) in *germ-free* und konventionellen Mäusen zeigte, dass in Mäusen ohne intestinales Mikrobiom die Lipolyse im BAT und in der Leber erhöht war, wohingegen es zu einer Reduktion der Lipogenese in diesen Tieren kam. Somit scheint das intestinale Mikrobiom die thermogene Aktivität des BAT zu beeinflussen und auch unabhängig von diesem Effekt eine Möglichkeit zu bieten, neue Therapieoptionen für die Behandlung des metabolischen Syndroms zu entwickeln.

#### **1.4 Der Gallensäurestoffwechsel**

Die Biosynthese der Gallensäuren (BAs) erfolgt hauptsächlich in der Leber. Als Substrat für die Gallensäurebiosynthese dient Cholesterin. Die Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren ist ein entscheidender Umwandlungsprozess im Katabolismus von Cholesterin, da täglich etwa 500 mg Cholesterin in der Leber zu Gallensäuren umgewandelt

werden (Russell 2003, Thomas et al. 2008). Das Enzym Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des klassischen Gallensäurebiosyntheseweges, wohingegen das Enzym Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) den ersten Schritt im sogenannten alternativen Gallensäurebiosyntheseweg katalysiert (Thomas et al. 2008). Dabei entstehen in der Leber zunächst ausschließlich primäre Gallensäuren. Im Menschen sind Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA) die wichtigsten Vertreter der primären Gallensäuren (Thomas et al. 2008), wohingegen in Mäusen hauptsächlich CA und  $\beta$ -Muricholsäure ( $\beta$ MCA) synthetisiert werden (Russell 2003). Nahezu alle von der Leber produzierten Gallensäuren werden vor ihrer Exkretion an Taurin (über 95% der BAs in Mäusen) bzw. Glycin (Im Verhältnis von 1 zu 3 im Menschen) konjugiert (Dawson und Karpen 2015, Thomas et al. 2008). Dabei kommt es durch die Konjugation der BAs zu einer Erhöhung der Amphiphilie und Löslichkeit (Russell 2003). Mithilfe des Transporters *bile salt export pump* (BSEP) werden die Gallensäuren anschließend aktiv in die Gallengänge abgegeben und zur Gallenblase transportiert (Dawson et al. 2009, Stieger et al. 2007). Über die Gallenblase erfolgt dann, nach Nahrungsaufnahme und Freisetzung von Cholezystokinin aus den endokrinen Zellen des Duodenums bzw. Jejunums, die Kontraktion der Gallenblase und somit die Freisetzung der Gallenflüssigkeit in das Duodenum (Hofmann 2009). Im Dünndarm erfüllen die Gallensäuren dann ihre Aufgabe, indem sie durch ihre amphiphilen Eigenschaften die Aufnahme von Lipiden sowie fettlöslichen Vitaminen (Vitamin A, K, E und D) ermöglichen (de Aguiar Vallim et al. 2013). Zusätzlich werden Gallensäuren entlang des Gastrointestinaltrakts durch das intestinale Mikrobiom dekonjugiert (siehe Abschnitt 1.4.1) und anschließend in sekundäre Gallensäuren umgewandelt (Ridlon et al. 2006). Die weiterhin verbleibenden konjugierten Gallensäuren werden anschließend im Bereich des distalen Ileums aktiv über den *apical sodium dependent transporter* (ASBT) rückresorbiert, wohingegen die unkonjugierten Gallensäuren passiv rückresorbiert werden (Hofmann 2009). Anschließend werden die Gallensäuren über die Portalvene zurück zur Leber transportiert und können dort erneut konjugiert und abermals mit der Galle freigesetzt werden. Dieser „Recyclingprozess“ wird auch als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet (Hofmann 2009). Es handelt sich dabei um ein äußerst effektives System, da unter physiologischen Bedingungen nicht mehr als 5% der Gallensäuren mit den Fäzes ausgeschieden werden (Dawson et al. 2009, de Aguiar Vallim et al. 2013). Die Regulation der Gallensäurebiosynthese erfolgt über einen Feedback-Mechanismus. Wie in einem Review von Russell (2003) beschrieben, führt die Bindung von Gallensäuren an den Farnesoid-X Rezeptor (FXR) zur Aktivierung der Transkription des *small heterodimer partner* (SHP), welcher dann an den *liver receptor homologue-1* (LRH-1) bindet, was zur Inhibierung des Rezeptors führt, dessen Aktivierung normalerweise in einer erhöhten Transkription des Enzyms CYP7A1 resultiert

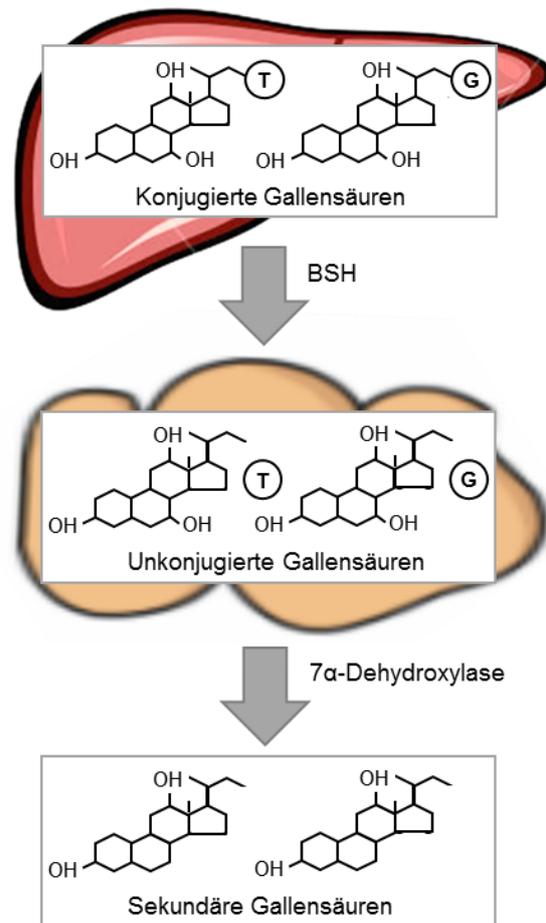
(Goodwin et al. 2000, Lu et al. 2000, Nitta et al. 1999). Einzelne, mögliche Interaktionswege zwischen Gallensäuren, dem intestinalen Mikrobiom und dem Wirtsmetabolismus werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

### 1.4.1 Das bakterielle Enzym *bile salt hydrolase*: Interaktionen zwischen Gallensäuren und dem intestinalen Mikrobiom

Das bakterielle Enzym *bile salt hydrolase* (BSH) vermittelt einen Teil der Interaktionen zwischen Gallensäuren, dem intestinalen Mikrobiom sowie dem Wirtsmetabolismus. Dabei ermöglicht die BSH die enzymatische Hydrolyse der N-Acyl Bindung, die die Gallensäuren mit den Aminosäuren Taurin

bzw. Glycin konjugieren (Ridlon et al. 2006). Die BSH katalysiert den ersten Schritt der Modifikation von Gallensäuren durch das intestinale Mikrobiom (Joyce et al. 2014a, Joyce et al. 2014b).

Nach der Dekonjugation der Gallensäuren, kommt es im nächsten Schritt durch die 7 $\alpha$ -Dehydroxylase zur Abspaltung einer Hydroxylgruppe am C7-Atom, welches zur Bildung von sekundären Gallensäuren führt (Begley et al. 2005, Joyce et al. 2014b). Die Bakterien scheinen von der Dekonjugation und Generierung sekundärer Gallensäuren zu profitieren, da sie einerseits das freigesetzte Taurin bzw. Glycin als Substrat nutzen können (Ridlon et al. 2006) und andererseits aus Fermentationsprozessen entstandene Elektronen auf die Gallensäuren übertragen können (Philipp 2011). Eine andere Theorie, welche ebenfalls in einem Review von Dawson und Karpen (2014) beschrieben wird, besagt, dass die Dekonjugation und somit die Expression der BSH, die Bakterien vor der toxischen Wirkung der Gallensäuren schützt und ihnen damit einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Spezies, die nicht über eine BSH-Aktivität verfügen, verleiht (Begley et al. 2005, Hofmann und Eckmann 2006, Jones et al. 2008, Ridlon et al. 2006). Es gibt aber auch Studien, die die-



**Abbildung 1-3: Modifikation von Gallensäuren durch das intestinale Mikrobiom**

Gallensäuren werden nach ihrer Synthese in der Leber zunächst an Taurin bzw. Glycin konjugiert. Im Dünndarm kommt es dann durch das bakterielle Enzym, die *bile salt hydrolase* (BSH) zur Dekonjugation der Gallensäuren. Im Anschluss werden die Gallensäuren im Kolon durch die 7 $\alpha$ -Dehydroxylase dehydroxyliert, um sekundäre Gallensäuren zu generieren. T = Taurin; G = Glycin. Abbildung in Anlehnung an Joyce et al. (2014b).

Es gibt aber auch Studien, die die-

ser Hypothese widersprechen (Moser und Savage 2001), sodass bislang nicht abschließend erforscht ist, welche Vorteile die Aktivität der BSH den intestinalen Bakterien tatsächlich verleiht.

Die Dekonjugation der Gallensäuren führt zu einer verminderten Amphiphilie und somit zu einer erhöhten Hydrophobizität, was die passive Resorption der unkonjugierten Gallensäuren entlang des intestinalen Trakts ermöglicht (Hofmann 2009, Ridlon et al. 2006). Für den menschlichen Organismus scheint die Akkumulation sekundärer Gallensäuren negative Konsequenzen zu haben. So beschreiben Ridlon et al. (2006) in ihrem Review verschiedene Studien die zeigen, dass vor allem erhöhte Konzentrationen der sekundären Gallensäure Desoxycholsäure (DCA) in Blut, Galle und Fäzes mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Kolonkarzinomen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Gallensteinen assoziiert sind (Hill 1990, Low-Beer und Nutter 1978, McGarr et al. 2005).

Die Aktivität des BSH-Enzyms scheint ebenfalls einen Einfluss auf den Metabolismus des Wirts auszuüben. Joyce et al. (2014a) konnten in einer Studie zeigen, dass eine erhöhte intestinale Expression der *bile salt hydrolase* in Mäusen mit einem intakten intestinalen Mikrobiom zu einer verminderten Gewichtszunahme, geringen Plasmacholesterinwerten und einer geringeren Akkumulation von Triglyzeriden in der Leber führte. Dabei resultierte die vermehrte Expression der BSH vor allem in einer Reduktion der Plasmakonzentration von Tauro- $\beta$ -muricholsäure (T $\beta$ MCA). T $\beta$ MCA ist ein FXR-Antagonist (Sayin et al. 2013) und führt somit physiologischerweise zu einer erhöhten Gallensäurebiosynthese in der Leber. Eine Studie, die diesen Ergebnissen widerspricht stammt von Li und Jiang et al. (2013). Sie behandelten Mäuse mit Tempol, einem Antioxidans, welches das Wachstum von Bakterien der Gattung *Lactobacillus* hemmt. Da diese Gattung ebenfalls über eine BSH-Aktivität verfügt, führte die Hemmung von *Lactobacillus* zu einer Akkumulation von T $\beta$ MCA im intestinalen Trakt der für diese Studie verwendeten Mäuse. Die hohen Konzentrationen des FXR-Antagonisten T $\beta$ MCA wiederum bewirkten eine potente Hemmung der FXR-Signalkaskade. Die Tempolgabe führte in Wildtyp-Mäusen zu einer reduzierten Gewichtszunahme unter einer *high-fat diet* (HFD). Zudem konnte die Gabe von Tempol die Insulinsensitivität und damit einhergehend die Glukosetoleranz der WT-Mäuse signifikant erhöhen. Diese Studien, zeigen, dass die Aktivität des BSH-Enzyms ein wesentlicher Mediator der Interaktionen zwischen Gallensäuren, dem intestinalen Mikrobiom und dem Wirtsmetabolismus darstellt und, dass die Manipulation der bakteriellen BSH-Aktivität eine vielversprechende Behandlungsstrategie im Kampf gegen Übergewicht und das Metabolische Syndrom darstellen könnte.

## 2 Fragestellung

Das allgegenwärtige hochkalorische Nahrungsangebot, gepaart mit einem ausgeprägten Mangel an Bewegung, führen dazu, dass mittlerweile weltweit mehr als eine halbe Milliarde Menschen als übergewichtig gelten (Collaboration 2016). Dieser dramatische Trend führt zu einem parallelen Anstieg der Inzidenz des sogenannten Metabolischen Syndroms (Eckel et al. 2005) und den damit verbundenen metabolischen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskulären Erkrankungen (Han und Lean 2016). Aus diesem Grund werden dringend neue Behandlungsstrategien im Kampf gegen Übergewicht und das Metabolische Syndrom benötigt. Im Fokus dieser Suche steht seit kurzem auch das braune Fettgewebe, da es, im Gegensatz zum weißen Fettgewebe, Energie in Form von Lipiden und Glukose verbrennt, um Wärme zu erzeugen und somit den Energieumsatz steigern kann. Dieser Prozess wird als zitterfreie oder auch adaptive Thermogenese bezeichnet (Cannon und Nedergaard 2004). Zusätzlich steht seit einigen Jahren ebenfalls das intestinale Mikrobiom im Fokus, da verschiedene humane und murine Studien gezeigt haben, dass Übergewicht mit Veränderungen in der Diversität und Komposition des intestinalen Mikrobioms einhergeht und, dass die Transplantation von Fäzes aus übergewichtigen Mäusen in den entsprechenden Empfängern zu einer Gewichtszunahme führt. Dies deutet daraufhin, dass das intestinale Mikrobiom die Neigung zu Übergewicht beeinflussen könnte. Die Kausalität dieser Beobachtungen ist allerdings bisher nicht bewiesen, sodass weitere Studien zu dieser Thematik benötigt werden (siehe auch Abschnitt 1.3.1).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes untersucht werden. Dafür wurde das intestinale Mikrobiom in C57BL/6J-Mäusen mittels Antibiotikabehandlung, über einen Zeitraum von 7 Tagen, eradiziert. Die Aktivierung des BAT erfolgte über eine 7-tägige Kälteexposition. Die Messung der thermogenen Aktivität des BAT erfolgte einerseits direkt, über die Quantifizierung der Expression thermogener und funktioneller Gene im BAT und WAT und andererseits indirekt über die Messung von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme. Zusätzlich wurden das intestinale Mikrobiom charakterisiert sowie die Gallensäurekomposition und die BSH-Aktivität in den Fäzes bestimmt. Dies diente vorrangig dazu den Erfolg der Antibiotikabehandlung zu überprüfen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte dann überprüft werden ob die positiven Effekte der zitterfreien Thermogenese mittels Fäzes-Transplantation auf C57BL/6J-Mäusen übertragbar sind. Dafür wurden Fäzes von C57BL/6J-Mäusen gesammelt, die zur Aktivierung des BAT 7 Tage kälteexponiert waren und in Tiere transplantiert, welche nahe der Thermoneutralität gehalten und mit Antibiotika behandelt wurden. Durch Messung der Expression thermogener Gene sowie der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts, der Plasmalipid-

konzentrationen und der Durchführung eines oralen Glukosetoleranztests in Kombination mit der Quantifizierung der Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose bzw. Lipiden, sollte der Erfolg der Fäzes-Transplantation bestimmt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Im Folgenden sind die verwendeten Chemikalien tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
[ <sup>14</sup> C] Triolein	Perkin-Elmer, USA
[ <sup>3</sup> H] 2-Deoxy-D-glukose	Perkin-Elmer, USA
Acetonitril	Biosolve, Niederlande
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun
Chloroform	Emsure® Merck, Deutschland
Chloroform, Rotisolv, HPLC-Grade	Carl Roth, Deutschland
d3-Methionin	Sigma-Aldrich
d4-Glycochenodeoxycholsäure (d4-GCDA)	Steraloids, UK
Ethanol 70%	Verdünnt aus Ethanol 96%
Ethanol 96%	Emsure® Merck, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich, Deutschland
H <sub>2</sub> O, LC-MS Ultra CHROMASOLV	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Deutschland
Methanol, Rotisolv, Ultra LC-MS-Grade	Carl Roth, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Taurin	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Taurocholicacid</i> (TCA)	Acros Organics
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Deutschland
d6- 25-OH-Cholesterin	Avanti polar lipids, USA
d7-Cholesterin	Avanti polar lipids, USA
Bacitracin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Neomycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ampicillin	Genaxxon Bioscience
Metronidazol	FLUKA, Sigma-Aldrich

### 3.1.2 Lösungen und Puffer

Im Folgenden sind die verwendeten Lösungen und Puffer tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-2: Verwendete Lösungen und Puffer**

Lösung/Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
EDTA 0,5 M	Gibco/BRL, Deutschland
Eluent A	- Ameisensäure 0,1% - Ammoniumacetat 5 mM in H <sub>2</sub> O
Eluent A (HILIC-Säule)	- Ameisensäure 0,1% - Ammoniumacetat 20 mM in H <sub>2</sub> O
Eluent B	- Ameisensäure 0,1% - Ammoniumacetat 5 mM in Methanol
Eluent B (HILIC-Säule)	- Wasser 10% - Ammoniumacetat 20 mM in Acetonitril
Folch Lösung	Choroform/Methanol 2:1
FPLC-Puffer	- Tris 100 mM - NaCl 1,5 M - EDTA 100 mM in H <sub>2</sub> O dest.
Heparin	Braun, Deutschland
Interner Standard 1 (IS1)	- d4-GCDCA 100 µM - d6- 25-OH-Cholesterin 100 µM - d7-Cholesterin 1000 µM in Folch-Lösung
Interner Standard 2 (IS2)	d3-Methionin 1 mM in Acetonitril/H <sub>2</sub> O 1:1
Ketamin 10%	WDT
Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Deutschland
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Gibco/BRL, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Rompun) 2%	Bayer, Deutschland

### 3.1.3 Kits und Reagenzien

Im Folgenden sind die verwendeten Kits und Reagenzien tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-3: Verwendete Kits und Reagenzien**

Produkt	Hersteller
Triglyzeridbestimmungskit (GPO-PAP <sup>®</sup> )	Roche, Deutschland
Cholesterinbestimmungskit (CHOD-PAP <sup>®</sup> )	Roche, Deutschland
<i>TaqMan<sup>®</sup> Universal Master MIX II</i>	Applied Biosystems, USA
<i>NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit</i>	Machery-Nagel
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems, USA
<i>peqGOLD TriFast<sup>™</sup></i>	PEQLAB, Deutschland
Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 500	Zinsser Analytic, Deutschland
Solvable <sup>™</sup>	Perkin Elmer, USA
Precipath <sup>®</sup>	Roche, Deutschland

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-4: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bördelkappen	CS-Chomatographie Service GmbH, Deutschland
Glasvials 11,6x32 mm, braun	Machery-Nagel
HILIC-Säule Kinetex (2.6 µm, 150 mm x 2.1 mm)	Phenomenex, Deutschland
HPLC-Säule, Accucore <sup>™</sup> Polar Premium	Thermo Fisher Scientific, USA
Kanülen 20G	Braun, Deutschland
Membranfilter Chromafil <sup>®</sup> Xtra PTFE-20/3	Machery-Nagel
Mikrotiterplatten	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen <i>Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips</i>	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt, Deutschland
Spritzen Omnifix <sup>®</sup>	Braun, Deutschland
Stabpipetten	Sarstedt, Deutschland
Stahlkugeln 4mm	Qiagen, Deutschland
Superose <sup>™</sup> 6 10/300 GL Säule	GE Healthcare, UK
Zellsieb 100 µm BD Falcon	Falcon <sup>®</sup> , USA
Zellspachtel	Techno Plastic Products, Schweiz
β-Szintillationsröhrchen	GE Healthcare, UK
Petrischalen	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt, Deutschland
Accu Check Aviva Teststreifen	Roche, Deutschland

### 3.1.5 Arbeitsgeräte

Im Folgenden sind die verwendeten Arbeitsgeräte tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-5: Verwendete Arbeitsgeräte**

Arbeitsgerät	Hersteller
<i>ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems, USA
Accu Check Aviva Messgerät	Roche, Deutschland
FPLC-System	GE-Healthcare, Deutschland
HPLC, Agilent Technologies 1200 Series	Agilent Technologies, Deutschland
<i>NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer</i>	PEQLAB, Deutschland
Photometer Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific, USA
Pipettierroboter	Tecan, Schweiz
<i>Thermocycler</i>	Biometra, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland
<i>Tissue-Lyser</i>	Qiagen, Deutschland
β-Szintillationscounter	Perkin-Elmer, USA
Massenspektrometer, ESI-QqQ, API2000	AB SCIEX, Deutschland
Massenspektrometer, ESI-QqQ, API4000	AB SCIEX, Deutschland

### 3.1.6 *TaqMan*®-Sonden

Im Folgenden sind die verwendeten *TaqMan*®-Sonden tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-6: Verwendete *TaqMan*®-Sonden**

Genname	<i>Assay-on-Demand</i> <sup>TM</sup>
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1
<i>Cdo1</i>	Mm00473573_m1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1
<i>Dio2</i>	Mm00515664_m1
<i>Elovl3</i>	Mm00468164_m1
<i>Elovl5</i>	Mm00506717_m1
<i>Emr1</i>	Mm00802530_m1
<i>Fasn</i>	Mm00662319_m1
<i>Il1β</i>	Mm00434228_m1
<i>Il6</i>	Mm00446190_m1
<i>Pgc1α</i>	Mm00447183_m1
<i>Tbp</i>	Mm00446973_m1
<i>Tnf</i>	Mm00443258_m1
<i>Ucp1</i>	Mm00494069_m1

### 3.1.7 Software

Im Folgenden ist die verwendete Software tabellarisch aufgeführt.

**Tabelle 3-7: Verwendete Software**

Software	Hersteller
Microsoft Word 2010	Microsoft, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft, USA
Graph Pad Prism 7	Graph Pad Software, USA
Analyst 1.6.1	Applied Biosystems, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere, Diät und Interventionen

#### 3.2.1.1 Versuchstiere

Alle für diese Arbeit notwendigen Tierexperimente wurden mit Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Stadt Hamburg durchgeführt. Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) des Inzuchtstammes C57BL/6J im Alter von 12-14 Wochen verwendet. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen und bei einem 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus gehalten.

##### 3.2.1.1.1 Blut- und Organentnahme

Die Entnahme von Blut und Organen erfolgte jeweils nach 4-stündigem Fasten. Hierzu wurden die Mäuse mit Ketamin (10 mg/ml) und Rompun (Xylazinhydrochlorid, 2%) in 0,9% NaCl narkotisiert. Anschließend erfolgte die Herzblutentnahme zur Plasmagewinnung. Dazu wurde mittels mit 0,5 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 0,5 M) benetzten Kanülen das Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und unverzüglich auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Tiere über den linken Ventrikel mit kaltem *phosphate buffered saline* (PBS), welches mit Heparin in einer Konzentration von 10 U/ml angereichert war, perfundiert. Im Anschluss erfolgte die unverzügliche Organentnahme. Die einzelnen Organe wurden, bis zur weiteren Verwendung, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

##### 3.2.1.2 Diät

Für die Fütterung der Tiere wurde eine sogenannte *western type diet*, (WTD) mit einem Gesamtfettgehalt von 21%, einem Zuckergehalt von 33%, sowie einem Cholesteringehalt von 0,2% verwendet (ssniff® EF R/M acc. TD88137 mod.). Diese Diät erhielten die Tiere, je nach Experiment, über einen Zeitraum von 11-17 Tagen. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser.

##### 3.2.1.3 Interventionen

###### 3.2.1.3.1 Aktivierung des braunen Fettgewebes

Das braune Fettgewebe wurde in allen Experimenten durch Kälteexposition aktiviert. Hierzu wurden die Tiere für 7 Tage bei 6 °C in Einzelkäfigen gehalten. Die entsprechende Kontrollgruppe wurde bei 28 °C, ebenfalls in Einzelkäfigen, gehalten.

### **3.2.1.3.2 Eradikation des intestinalen Mikrobioms**

Zur Eradikation des intestinalen Mikrobioms erhielten die Tiere für 7 Tage einen Cocktail aus Bacitracin (1 g/l), Neomycin (1 g/l) und Streptomycin (1 g/l) über das Trinkwasser, wie bereits in der Literatur beschrieben (Jiang et al. 2015). Die Antibiotikallösung wurde alle 2 Tage frisch angesetzt und das Trinkwasser dementsprechend gewechselt. Zur Reduktion der Tierversuchszahlen wurden die Versuche zur Eradikation des intestinalen Mikrobioms in Zusammenarbeit mit der naturwissenschaftlichen Doktorandin Anna Worthmann durchgeführt. Die Auswertung der Studie erfolgte dabei unabhängig voneinander und mit einem unterschiedlichen Fokus. Frau Worthmanns Fokus lag auf dem Leber- und Gallensäurestoffwechsel, während der Fokus dieser Arbeit auf den Auswirkungen der Eradikation des intestinalen Mikrobioms für die thermogene Aktivität des beige und braunen Fettgewebes lag.

### **3.2.1.3.3 Fäzes-Transplantation**

Für die Fäzes-Transplantation wurden die mit WTD-gefütterten Empfänger-Mäuse zunächst in autoklavierte Käfige mit speziellen Filterdeckeln umgesetzt. Anschließend erhielten sie über 7 Tage eine Mischung aus 3 verschiedenen Antibiotika (Ampicillin (1 g/l), Neomycin (1 g/l) und Metronidazol (1 g/l)) über das Trinkwasser, um die residente Darmflora zu eradizieren. Die ebenfalls mit WTD-gefütterten Donor-Mäuse wurden entweder für 7 Tage bei 6 °C gehalten, um das braune Fettgewebe zu aktivieren, oder als entsprechende Kontrollen bei 27 °C gehalten.

Die Transplantation von Fäzes erfolgte dann nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung jeweils alle 2 Tage über einen Zeitraum von 7 Tagen. Hierzu wurde der *Caecum*-Inhalt von 2-3 Mäusen in 10-15 ml PBS suspendiert und durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert. Von dieser Lösung wurden dann jeweils 300 µl pro Maus mittels oraler Gavage verabreicht.

## **3.2.2 Plasma-Analytik**

Die Entnahme von Herzblut zur Plasma-Analytik wurde wie unter Abschnitt 2.2.1.1.1 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurde das so gewonnene Blut für 10 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **3.2.2.1 Bestimmung von Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Plasma**

Zur enzymatischen Bestimmung von Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Plasma wurde ein kommerzielles Kit (CHOD-PAP<sup>®</sup>, GPO-PAP<sup>®</sup>) der Firma Roche verwendet. Als Lipidstandard wurde Precipath<sup>®</sup> der gleichen Firma verwendet. In einer Mikrotiterplatte wurde zunächst 100 µl Lipidstandard und 100 µl der zuvor mit PBS verdünnten Plasmaproben (die Verdünnung erfolgte je nach den erwarteten Triglyzerid- und Cholesterinwerten) pi-

pettiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl Cholesterin- bzw. Triglyzeridreagenz und eine Inkubation von 10 min bei 37 °C.

Dabei wurden für die Cholesterinbestimmung die Cholesterinester mittels der im Cholesterinreagenz erhaltenen Cholesterinesterasen zu freiem Cholesterin hydrolysiert und anschließend durch Cholesterinoxidasen zu Cholesteron und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das Wasserstoffperoxid reagierte dann mit Aminophenazon und Phenol unter Bildung eines roten Farbstoffs, dessen Extinktion sich photometrisch bei 540 nm bestimmen ließ. Das Verfahren für die Triglyzeridmessung beruhte auf einem ähnlichen Prinzip. Zunächst erfolgte die Hydrolyse der Triglyzeride zu Glycerin und freien Fettsäuren, im Anschluss die Bildung von Wasserstoffperoxid durch Oxidation des Reaktionsprodukts und im letzten Schritt dann erneut die Bildung des roten Farbstoffs sowie die Messung im Photometer bei 540 nm. Die Auswertung erfolgte im Anschluss anhand einer Standardreihe für Triglyzeride bzw. Cholesterin (Precipath®) mittels linearer Regression.

### **3.2.2.2 Bestimmung des Lipoproteinprofils mittels *fast-protein liquid chromatography* im Plasma**

Das Lipoproteinprofil im Plasma wurde mittels *fast-protein liquid chromatography* (FPLC) bestimmt. Es wurde, je nach Experiment, das Plasma der unterschiedlichen Tiere einer Gruppe miteinander vereint und ein Gruppenpool gebildet. Es erfolgte das Einspritzen der gemischten Plasmen in den 500 µL-Injektions-Loop. Die Proben wurden anschließend über eine Superose™ 6 10/300 GL Säule, bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in insgesamt 40 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 0,5 ml getrennt. Die resultierenden Fraktionen wurden mittels einer *96-deep-well plate* aufgefangen. Es erfolgte eine Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationsbestimmung wie unter Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben. In der Auswertung entsprechen Fraktion 4-6 den TRL bzw. TRL Remnants, Fraktion 17-20 den HDL und Fraktion 14-16 den LDL.

### **3.2.3 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real-time* PCR**

#### **3.2.3.1 RNA-Isolation aus Gewebe**

Für die Ribonukleinsäure (RNA) -Isolation wurde die *single-step* Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) verwendet. Hierzu wurden die ca. reiskorngroßen (die Größe richtete sich nach der erwarteten RNA-Konzentration), gefrorenen Gewebeproben mit jeweils 1 ml *TriFast*™ und einer autoklavierten Stahlkugel versetzt. Im Anschluss im *Tissue-Lyser* 2-mal 3 min bei 20 s<sup>-1</sup> lysiert. Das entstandene *TriFast*™-Lysat wurde im Folgenden 5:1 mit Chloroform versetzt, kräftig homogenisiert und anschließend für 15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, sodass sich 3 Phasen bildeten. In der oberen, wässrigen Phase, befand sich die RNA, in der mittleren Phase die DNA und in der unteren, organischen Phase, die Proteine. Zur Präzipitation der RNA wurde die

wässrige Phase vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen und in einem Mischungsverhältnis von 1:1 in ein neues Reaktionsgefäß, indem sich bereits eine 70%ige Ethanol-Lösung befand, überführt. Darauf folgte die Isolation und Aufreinigung der RNA mithilfe des *NucleoSpin® RNA II Kit* von Machery-Nagel. Dazu wurde die RNA zunächst auf eine Silica-Membran-Säule pipettiert und für 2 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert, um die Bindung der RNA an die Silica-Membran zu ermöglichen. Zum Entsalzen der Membran wurden 350 µl *Membrane desalting buffer* (MDB) auf die Membran gegeben und erneut bei 13.000 rpm und RT für 2°min zentrifugiert. Es folgte die Verdauung der übrigen DNA mittels DNase für 15-30°min bei RT. Zum Stoppen der Reaktion wurde die DNase mit 200 µl RA2 Puffer inaktiviert und einmal mit 600 µl sowie ein zweites Mal mit 250 µl RA3 Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde erneut für 2 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Mittels Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurden dann verbliebene Pufferreste entfernt. Zuletzt wurde die Silica-Membran-Säule in ein Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser und Zentrifugation eluiert.

### 3.2.3.2 Umschreibung von RNA zu cDNA

Die RNA für die Umschreibung zu komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde wie unter Abschnitt 2.2.4.1 isoliert. Die Konzentration der RNA wurde dann mittels *NanoDrop® Spectrophotometer* bei 260/280 nm bestimmt.

Es wurden jeweils 400 ng RNA eingesetzt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mithilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems. Die 400 ng RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 10 µl Master-Mix hinzugefügt. Der Master-Mix wurde vorab nach Herstellerangaben zusammen pipettiert und enthielt den *Reverse Transcription Buffer*, *Random Primers*, *dNTPs Mix*, *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* und einen *RNase Inhibitor*. Im *Thermocycler* erfolgte dann die Umschreibung nach folgendem Programm:

<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
10 min	25 °C
120 min	37 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

Die so erhaltene cDNA wurde abschließend 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt.

### 3.2.3.3 Quantitative *real-time* PCR

Die von Heid et al. (1996) auf der Basis von Holland et al. (1991) und Lee et. al (1993) entwickelte quantitative *real-time polymerase chain reaction* (PCR) erlaubt die parallele Vervielfältigung und Quantifizierung der cDNA. Dies wurde durch den Einsatz spezieller

*TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden ermöglicht. Diese besaßen am 5` Ende einen sogenannten Quencher, welcher das Signal des Reporter-Fluorophors am 3` unterdrückte. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisierten die *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden mit dem komplementären DNA-Strang. In der Elongationsphase sorgte die *Taq*-Polymerase durch ihre 5`- 3` Exonukleaseaktivität dafür, dass die *TaqMan*<sup>®</sup>-Sonden vom 5` Ende her abgebaut wurden. Hierdurch kam es zur Lösung des Quencher vom, in räumlicher Nähe befindlichem, Reporter-Fluorophor und die so abgegebene Fluoreszenz konnte mittels Detektor (*ABI Prism 7900HT Sequence Detection System*) gemessen werden. Dabei kam es während der PCR-Zyklen zur exponentiellen Zunahme der Amplifikation und somit auch zur exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors (Heid et al. 1996).

Zur Quantifizierung wurde der sogenannte *cycle threshold* ( $C_T$ )-Wert herangezogen. Er beschreibt den Zeitpunkt während der PCR-Zyklen, an dem das Fluoreszenzsignal des Reporter-Fluorophors zum ersten Mal über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. (Heid et al. 1996). Die abschließende Auswertung erfolgte mittels der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001). Zur Normierung der Ergebnisse diente die Messung des Referenzgens *TATA-box binding protein* (*Tbp*).

### **3.2.4 Quantifizierung des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rDNA**

#### **Sequenzierung in Fäzes**

Für die Analyse des intestinalen Mikrobioms wurde frische Fäzes der Mäuse eingesammelt und sofort auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die 16S rDNA Analysen sowie die weitere Auswertung der Daten erfolgte durch Malte Rühlemann im Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, unter der Leitung von Andre Franke.

### **3.2.5 HPLC-ESI-QqQ-MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von**

#### **Gallensäurespezies in Fäzes**

Die quantitative Messung von Gallensäuren im Fäzes erfolgte durch die HPLC (*high performance liquid chromatography*)– ESI (*electrospray ionization*)- QqQ (Tripel-Quadropol)- MS (Massenspektrometrie)- Methode von John und Werner et al. (2014). Die Fäzes wurden nach einem Zeitraum von 24 Stunden und vor Beginn der Organentnahme gesammelt. Für die Extraktion der Gallensäuren aus Fäzes wurde diese zunächst lyophilisiert. Es folgte die Einwaage von 50-100 mg des so aufgearbeiteten Probenmaterials. Anschließend wurden 1 ml Methanol sowie 10 µl des internen Standards IS1 (100 µM/l d4-GCDCA, 100 µM/l d6-25-OH-Cholesterin, 1000 µM/l d7-Cholesterin) hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend im Tissue-Lyser homogenisiert und im Anschluss für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Kanüle entnommen und durch einen Membranfilter (Chromafil<sup>®</sup> Xtra PTFE-20/3) in ein neues Reaktionsgefäß

überführt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden anschließend im Vakuum getrocknet und dann in jeweils 100 µl Eluent B (Methanol, 0,1% Ameisensäure und 5 mM Ammoniumacetat) resuspendiert und in Glasvials (11,6 x 32 mm, braun, Machery-Nagel) überführt. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mittels HPLC (Agilent Technologies 1200 Series). Diese war mit einem ESI-QqQ-Massenspektrometer (API4000 Q Trap) zur Detektion der unterschiedlichen Gallensäuren gekoppelt. Die Messung von Gallensäurespezies in den Fäzes wurde von Anna Worthmann durchgeführt und die Daten freundlicherweise von ihr zur Verfügung gestellt.

### 3.2.6 BSH-Aktivitäts-Assay

Für die quantitative Messung der BSH-Aktivität wurde, im Zuge dieser Arbeit, eine neue Methode, basierend auf bereits bekannten Verfahren (Joyce et al. 2014a, Li et al. 2013), entwickelt. Es wurde die Menge an freigesetztem Taurin im Caecum nach Zugabe einer definierten Menge an Taurocholsäure (TCA) direkt im Caecum mittels HPLC-MS gemessen. Zunächst wurde frischer Caecum-Inhalt eingewogen und anschließend 0,025 ml PBS pro mg versetzt und kräftig gemischt. Anschließend wurden 900 µl der Caecum PBS-Mischung abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von TCA-Stammlösung (1 mg/ml) und PBS nach folgendem Schema:

**Tabelle 3-8: Schema zur Zugabe von TCA-Stammlösung und PBS**

	1	2
Caecum-Inhalt (µl)	900	900
TCA (µl, 1 mg/ml)	0	30
PBS (µl)	50	20
Total (µl)	950	950

Wert 1 diente dabei zur Bestimmung der basalen Taurinkonzentrationen im Caecum-Inhalt. Zusätzlich wurde ein Leerwert, welcher kein Caecum-Inhalt enthielt, pipettiert. Nach kräftigem Mischen wurden die Proben für 10 min bei 37 °C im Thermomixer bei 400 rpm inkubiert, um die BSH zu aktivieren. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von jeweils 1 ml Acetonitril gestoppt und die Proben sofort auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig mittels Kanüle entnommen und durch einen speziellen Membranfilter (Chromafil® Xtra PTFE-20/3) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Von der filtrierten Lösung wurden dann 95 µl in ein Glasvial (11,6 x 32 mm, braun, Machery-Nagel) pipettiert und es erfolgte die Zugabe von 5 µl internem Standard IS 2 (d3-Methionin 1:10 verdünnt; 1 mmol/l in Acetonitril/H<sub>2</sub>O 1:1). Zusätzlich wurde eine externe Standardreihe nach folgendem Schema angefertigt:

**Tabelle 3-9: Externe Standardreihe Taurin**

Std.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ex-Std. (µl) Taurin (1mM)	2 1/100	6 1/100	10 1/100	2 1/10	6 1/10	10 1/10	2	6	10
IS2 (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Eluent B (µl)	93	89	85	93	89	85	93	89	85
Total (µl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Die Trennung der in den Proben enthaltenen Bestandteile erfolgte dann auf einer HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*)-Säule (Kinetex, 2.6 µm, 150 mm x 2.1 mm; Phenomenex). Die Laufmittelgradienten sind in folgender Tabelle dargestellt.

**Tabelle 3-10: Laufmittelgradienten der HPLC-Methode zur Messung der Taurinkonzentration**

Zeit (min)	Flussrate (µl/min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	200	5	95
1	200	5	95
11	200	40	60
15	200	40	60
17	200	5	95
30	200	5	95

Die Detektion der Analyten erfolgte mittels eines ESI-QqQ-Massenspektrometers (API2000, ABSCIEX). Es wurde der sogenannte *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus verwendet. Die entsprechenden MRM-Parameter der verschiedenen Analyten sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 3-11: MRM-Parameter des ESI-QqQ-Massenspektrometers**

ID	Q1	Q3	Zeit (msek)	DP (V)	FP (V)	EP (V)	CEP (V)	CE (V)	CXP (V)
TauQnt	126,019	108,1	150	51	300	8,5	10	17	4
TauQual1	126,019	109,1	50	51	300	8,5	10	19	4
TauQual2	126,019	65	50	51	300	8,5	10	47	8
d3MetQnt	153,157	107,1	150	16	370	10,5	12	15	6
d3MetQual1	153,157	136,2	50	16	370	10,5	12	15	6
d3MetQual2	153,157	64	50	16	370	10,5	12	31	8

Die Auswertung der Taurinkonzentration in den Fäzes erfolgte mithilfe von Analyst 1.6.1, mittels einer 9-Punkt Kalibrierreihe. Dabei enthielt sowohl jeder Punkt der Kalibrierkurve

als auch jede Probe den internen Standard IS 2 d3-Methionin in einer finalen Konzentration von 20 nM.

### **3.2.7 Kombination aus oralem Glukosetoleranz-Test und in vivo Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden**

#### **3.2.7.1 Oraler Glukosetoleranz-Test**

Zur Bestimmung der Glukosetoleranz wurde ein oraler Glukosetoleranz-Test (oGTT) durchgeführt. Dieser wurde kombiniert mit der Verabreichung von radioaktiv markierter Glukose und Lipiden. Nach einer 4-stündigen Fastenperiode erhielten die Tiere eine orale Gavage mit jeweils 300 µl einer Lösung aus Glukose (2 mg Glukose pro g Körpergewicht) und Lipiden in 0,9% Kochsalzlösung, welche mit  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose sowie  $^{14}\text{C}$ -Triolein angereichert war. Die Bestimmung der Blutglukosekonzentration erfolgte, mithilfe eines Accu Check Aviva Testgeräts und den dazugehörigen Teststreifen, vor der oralen Gavage (Nüchternwert) und 15, 30 sowie 60 min danach.

#### **3.2.7.2 In vivo Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden**

Zur Messung der in vivo Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und Fettsäuren erfolgte im Anschluss an den oGTT, also 60 min nach oraler Gavage der mit  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose und  $^{14}\text{C}$ -Triolein angereicherten Glukose- und Lipidlösung, die Organentnahme. Diese wurde, wie unter Abschnitt 3.2.1.1.1 beschrieben, durchgeführt. Das gewonnene Gewebe wurde anschließend mit der 10-fachen Menge (entspricht 0,1 ml pro 10 mg Gewebe) Solvable™ versetzt. Der Verdau der Gewebe erfolgte dann für 12 Stunden bei 60 °C und 300 rpm. Das lysierte Gewebe wurde im Anschluss in spezielle Szintillationsröhrchen überführt, im Verhältnis 1:5, v/v mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationscounter als *disintegrations per minute* (dpm) bestimmt.

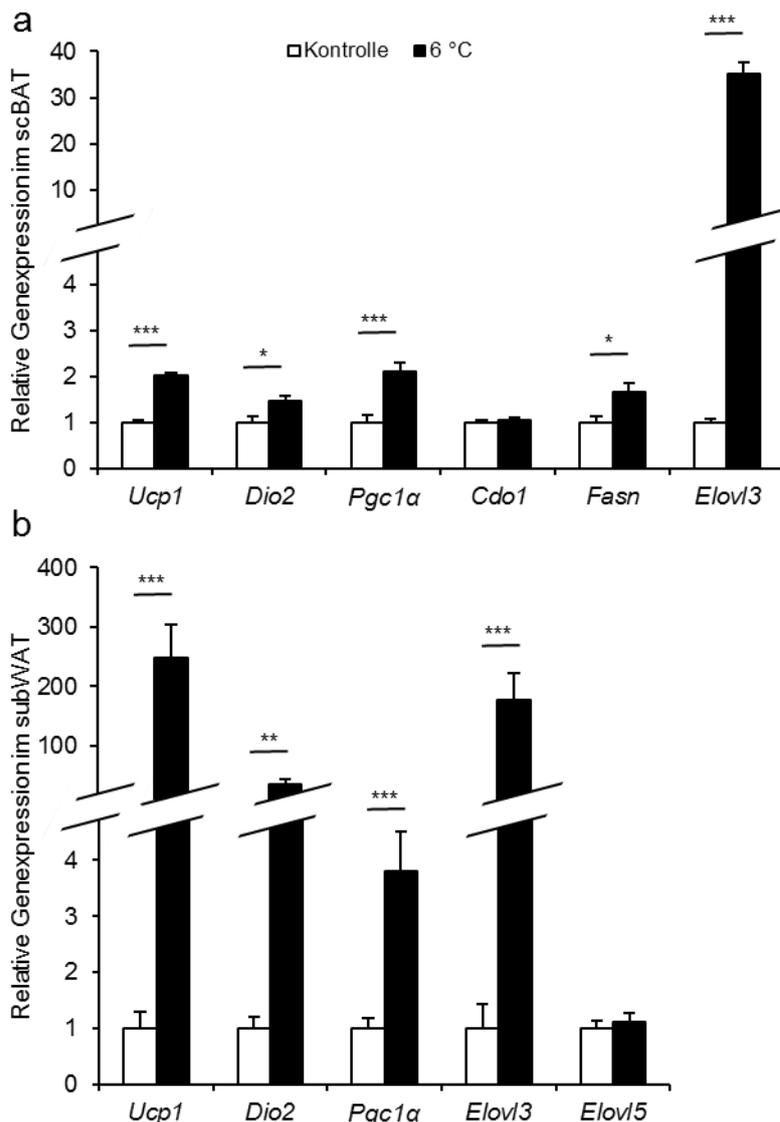
#### **3.2.8 Statistik**

Alle in dieser Arbeit demonstrierten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  *standard error off the mean* (SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde bei zwei Vergleichsgruppen mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten *Student's t-test* überprüft. Für mehr als zwei Vergleichsgruppen erfolgte die Überprüfung der statistischen Signifikanz mittels *two-way ANOVA* gefolgt von einem *Tukey's-Post-hoc-Test*. Bei einem  $p < 0,05$  wurde statistische Signifikanz angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse thermogener Gene nach 7-tägiger Kälteadaptation in C57BL/6J-Mäusen mit intaktem intestinale Mikrobiom

Zur Überprüfung des experimentellen Designs und zur Veranschaulichung wurde zunächst die Genexpression thermogener und funktioneller Gene im braunen und beigen



**Abbildung 4-1: Genexpressionsanalyse im scBAT und subWAT aus C57BL/6J-Mäusen mit intaktem Mikrobiom nach 7-tägiger Kälteadaptation** Analyse der Genexpression thermogener Gene im scBAT (a) und subWAT (b) von C57BL/6J-Mäusen mit intaktem Mikrobiom nach 7-tägiger Kälteadaptation bei 6 °C. Die Expression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR gemessen. Die Daten wurden auf *Tbp* normalisiert und als relative Expression im Verhältnis zur Kontrollgruppe (bei 28 °C gehaltene Tiere) dargestellt. (n = 8; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Fettgewebe von C57BL/6J-Mäusen mit intaktem intestinale Mikrobiom gemessen. Die Tiere erhielten eine WTD für insgesamt 12 Tage und wurden die letzten 7 Tage der Fütterung zur Aktivierung der Thermogenese bei 6 °C gehalten. Eine vergleichbare Kontrollgruppe wurde bei 28 °C gehalten. Dabei zeigte sich, wie zu erwarten, eine deutliche Induktion der für die Thermogenese wichtigen Gene. Im subkutanen braunen Fettgewebe (scBAT) kam es zu einer annähernden Verdopplung der Expression von *Ucp1*, *Dio2*, *Pgc1α* und *Fasn*. Zudem konnte eine nahezu 40-fache Induktion der Fettsäureelongase *Elovl3* nach-

gewiesen werden. Lediglich die Expression von *cysteine dioxygenase 1* (*Cdo1*) wurde nicht beeinflusst. *Cdo1* ist ein Enzym, welches eine wichtige Rolle im Cysteinestoffwechsel spielt und dabei den ersten Schritt in der Biosynthese von Taurin katalysiert

(Niewiadomski et al. 2016). Im subkutanen weißen Fettgewebe (subWAT) waren ebenfalls die für die Thermogenese wichtigen Gene *Ucp1*, *Dio2*, und *Pgc1 $\alpha$*  sowie das Gen der Fettsäureelongase 3 (*Elovl3*) reguliert. Lediglich die Expression der Fettsäureelongase 5 (*Elovl5*) blieb unbeeinflusst. Somit lässt sich nach 7-tägiger Kälteadaptation eine deutliche Induktion der Expression thermogener Gene im scBAT und subWAT nachweisen.

## **4.2 Auswirkungen der Eradikation des intestinalen Mikrobioms auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes**

Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms führen, welche zu einer effizienteren Nahrungsaufnahme führen sollen und auf diese Weise den erhöhten Energiebedarf während der zitterfreien Thermogenese decken sollen (Chevalier et al. 2015).

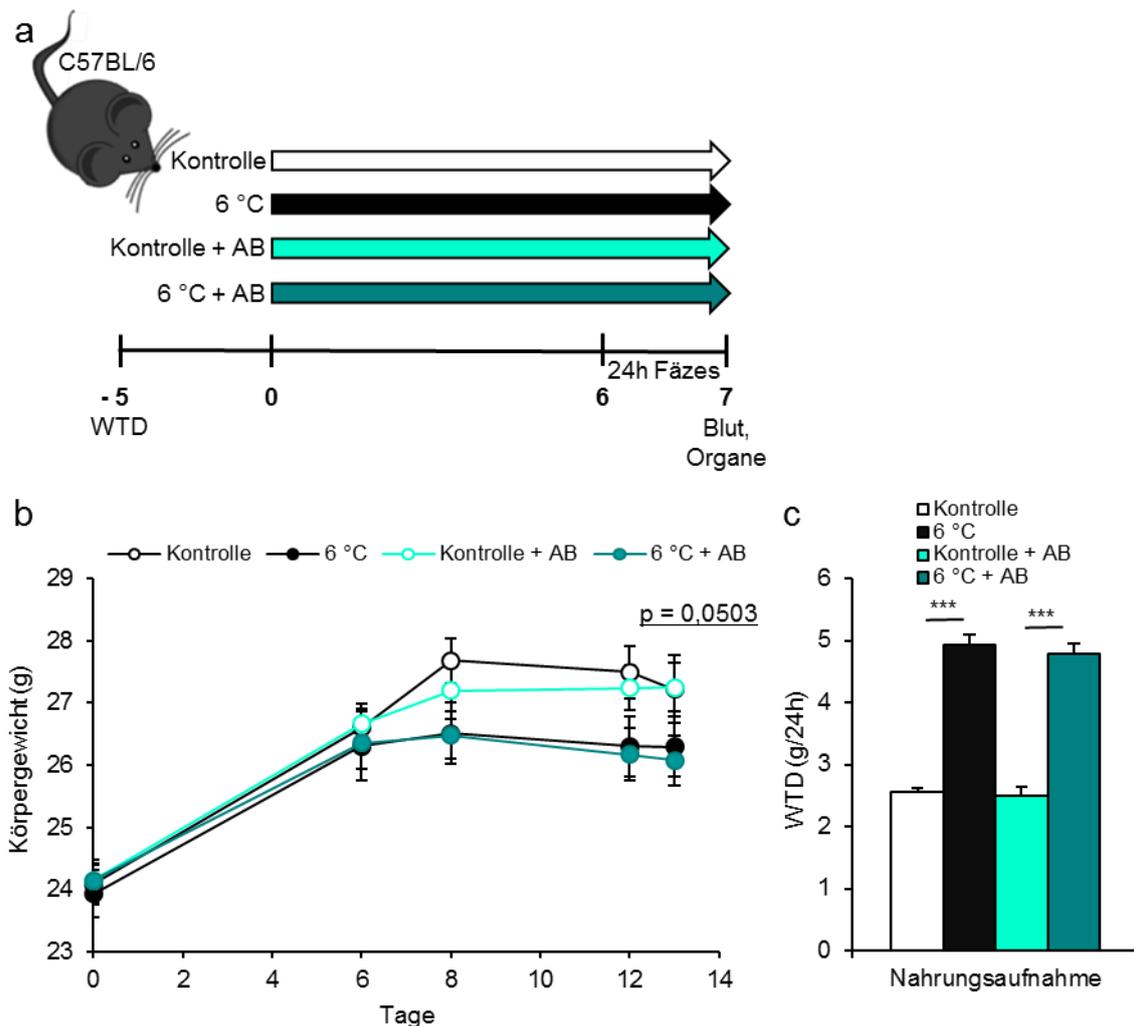
Im folgenden Abschnitt sollte erforscht werden, welche Konsequenzen die Eradikation des intestinalen Mikrobioms für die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes hat. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 7 Tagen mit einem Mix aus 3 verschiedenen Antibiotika (AB) behandelt (Bacitracin 1 g/l, Neomycin 1 g/l und Streptomycin 1 g/l im Trinkwasser). Dieses Gemisch ist in der Literatur als sogenannter BNS-Cocktail bekannt (Jiang et al. 2015). Der Vorteil dieser speziellen Kombination ist, dass diese Antibiotika intestinal nicht resorbiert werden können und somit im Darmlumen verbleiben, was einen Effekt auf den Körperstoffwechsel weitestgehend ausschließt.

Die Aktivierung des braunen Fettgewebes erfolgte durch 7-tägige Kälteexposition. Alle Mäuse erhielten eine WTD (Gesamtfettgehalt 21%, Zuckergehalt 33%, Cholesteringehalt 0,2%) über einen Zeitraum von insgesamt 13 Tagen. Die entsprechenden Interventionen begannen nach 6-tägiger Gewöhnung an das Futter. Als Kontrollgruppe fungierten Mäuse, welche bei 28 °C gehalten wurden und keine Antibiotika erhielten (siehe auch Abbildung 4-2 a).

### **4.2.1 Analyse des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme**

Abbildung 4-2 zeigt den Verlauf des Körpergewichts sowie die durchschnittliche tägliche Nahrungsaufnahme nach Beginn der jeweiligen Interventionen, während des 13-tägigen Versuchszeitraumes. Es zeigte sich, dass eine Aktivierung des BAT durch Kälte mit einer Verdopplung der Nahrungsaufnahme, von rund 2,5 g in der Gruppe unter Kontrollbedingungen (Haltung bei 28 °C) auf etwa 5 g in der Gruppe nach Aktivierung des BAT, einherging. Dieser Effekt wurde durch die Gabe von Antibiotika nicht beeinflusst (Abbildung 4-2 c). Zu Beginn zeigten alle Versuchsgruppen eine gleichmäßige Gewichtszunahme. Nach Beginn der jeweiligen Interventionen an Tag 6 kam es zu einer Stagnation der Gewichtszunahme in den Tieren, die bei 6 °C gehalten wurden. Im Vergleich dazu, nahmen die Kontrolltiere zunächst weiter zu, sodass sich das durchschnittliche Körpergewicht an Tag

13, mit einem p-Wert von 0,0503, nahezu signifikant unterschied. Die Kontrolltiere wogen zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt etwa 27 g. Mäuse nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes hingegen nur etwa 26 g (Abbildung 4-2 b).



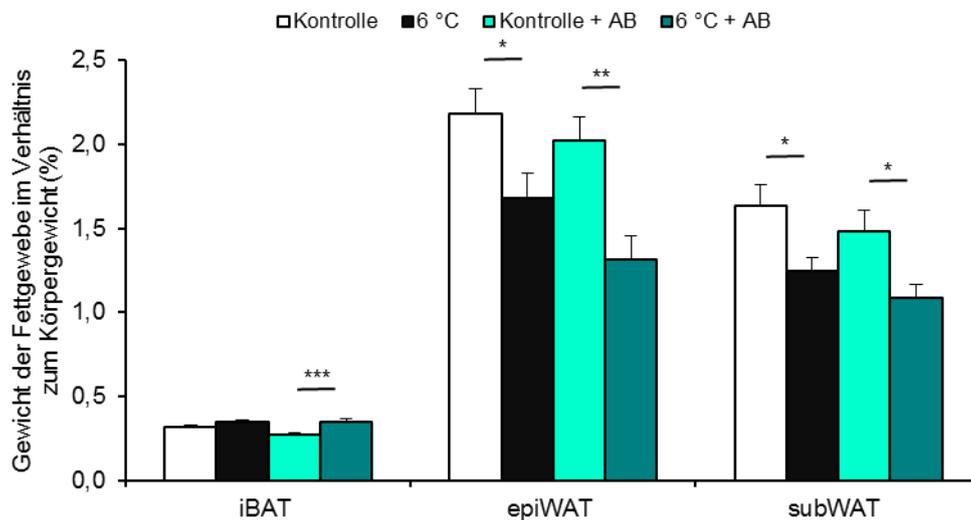
**Abbildung 4-2: Experimentelles Design sowie Nahrungsaufnahme und der Verlauf des Körpergewichts in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung und Kontrollen sowie entsprechenden Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung**

(a) Experimentelles Design (b) Verlauf des Körpergewichts in Kontrolltieren (28 °C), Tieren nach 7-tägiger Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C) sowie in Kontrollen und kälteadaptierten Tieren, welche zusätzlich für 7 Tage Antibiotika (AB) über das Trinkwasser erhielten (Bacitracin, Neomycin und Streptomycin). (c) Durchschnittliche tägliche Aufnahme von *western type diet* (WTD) nach Beginn der jeweiligen Interventionen. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser. (n = 10; \*\*\*p < 0,001). Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Anna Worthmann.

Die Gabe von Antibiotika hatte auf den Verlauf des Körpergewichts keinen Einfluss. Kontrolltiere, welche mit Antibiotika behandelt wurden (Kontrolle + AB), zeigten in etwa den gleichen Gewichtsverlauf, wie die Kontrollgruppe ohne Antibiotika. Ebenso gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den kälteadaptierten Mäusen mit (6 °C + AB) und ohne Antibiotika (Abbildung 4-2 b).

#### 4.2.2 Messung des Gewichts der unterschiedlichen Fettgewebedepots

Für die Messung des durchschnittlichen, prozentualen Gewichts der verschiedene Fettgewebe wurden das interskapuläre braune Fettgewebe (iBAT), epididymales weißes Fettgewebe (epiWAT) sowie das subWAT, wie bereits unter Abschnitt 3.2.1.1.1 beschrieben, entnommen und gewogen.



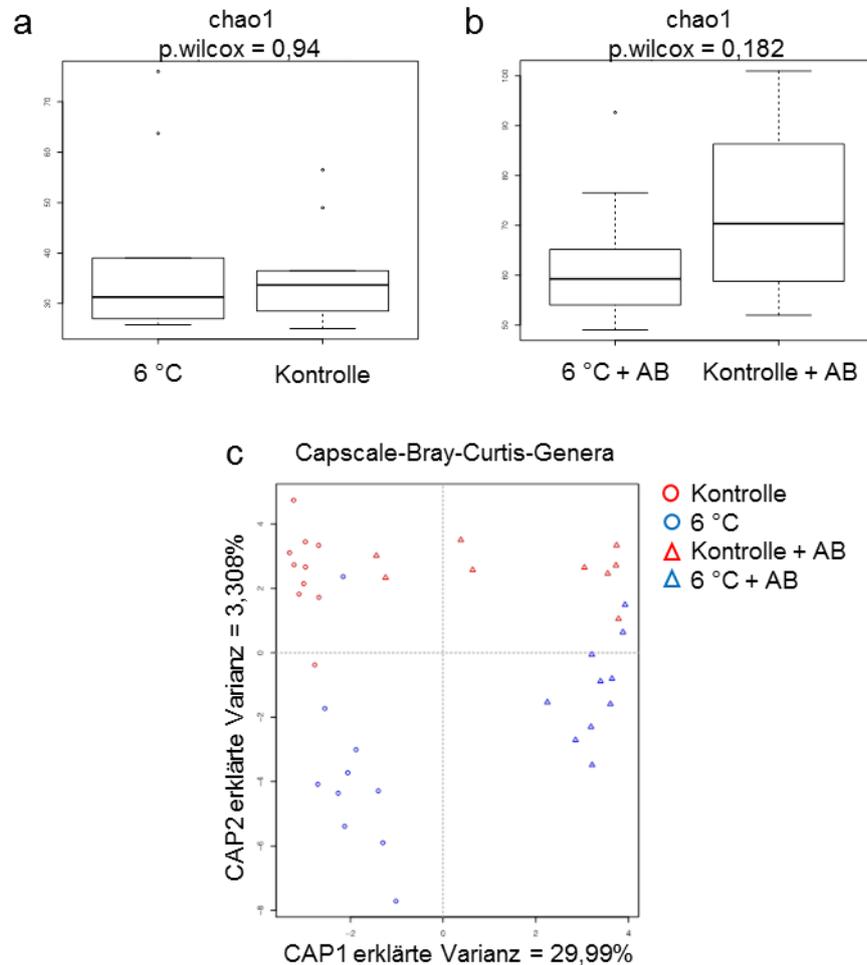
**Abbildung 4-3: Messung des prozentualen Gewichts der unterschiedlichen Fettgewebedepots aus C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte und Kontrollen sowie entsprechenden Tieren nach Antibiotikabehandlung**

Die Analyse des durchschnittlichen, prozentualen Gewichts der unterschiedlichen Fettgewebedepots (iBAT, epiWAT und subWAT) erfolgte in WT-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes (6 °C), Kontrolltieren (Kontrolle) sowie in WT-Mäusen nach Antibiotikagabe über das Trinkwasser für 7 Tage (Kontrolle + AB) und in Mäusen nach gleichzeitiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte und Antibiotikabehandlung (6 °C + AB). Das Gewicht der einzelnen Fettgewebe ist im prozentualen Verhältnis zum Körpergewicht dargestellt. (n = 10; \*p>0,05; \*\*p>0,01; \*\*\*p>0,001).

In den C57BL/6J-Mäusen lag der prozentuale Anteil des iBAT, nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte und zusätzlicher Gabe von Antibiotika (6 °C + AB), im Durchschnitt bei etwa 0,35% (Abbildung 4-3) und war damit signifikant höher, als in den entsprechenden Kontrollen nach alleiniger Antibiotikabehandlung mit rund 0,27% (Kontrolle + AB). Der prozentuale Anteil des epi- und subWAT war jeweils signifikant niedriger in den entsprechenden Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte, wobei dieser Effekt weitestgehend unabhängig von einer Behandlung mit Antibiotika war. Allerdings ließ sich durchaus ein Trend zwischen den jeweiligen Tieren mit und ohne Antibiotikagabe über das Trinkwasser ableiten. So war der prozentuale Anteil der weißen Fettgewebe in den Mäusen nach Antibiotikabehandlung tendenziell niedriger, als ohne die Gabe von Antibiotika.

### 4.2.3 Analyse des intestinalen Mikrobioms

Um zu überprüfen, ob die Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch die Gabe von Antibiotika erfolgreich war erfolgte die Charakterisierung des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rDNA Sequenzierung.



**Abbildung 4-4: Analyse des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rDNA Sequenzierung in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes und entsprechenden Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung**

(a)  $\alpha$ -Diversität des intestinalen Mikrobioms von Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte (6 °C) bzw. von Kontrollmäusen (Kontrolle). (b)  $\alpha$ -Diversität des intestinalen Mikrobioms in entsprechenden Mäusen nach einwöchiger Antibiotikabehandlung mit einem BNS-Cocktail über das Trinkwasser (6 °C + AB; Kontrolle + AB). (c) Capscale Bray-Curtis Analyse der Genera aus Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes (blauer Kreis), entsprechenden Kontrollen (Haltung bei 28 °C; roter Kreis) und Mäusen nach einwöchiger Gabe eines Antibiotika-Cocktails (rotes Dreieck = Kontrolle + AB; blaues Dreieck = 6 °C + AB). (n = 10). Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte durch Malte Rühlemann im Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

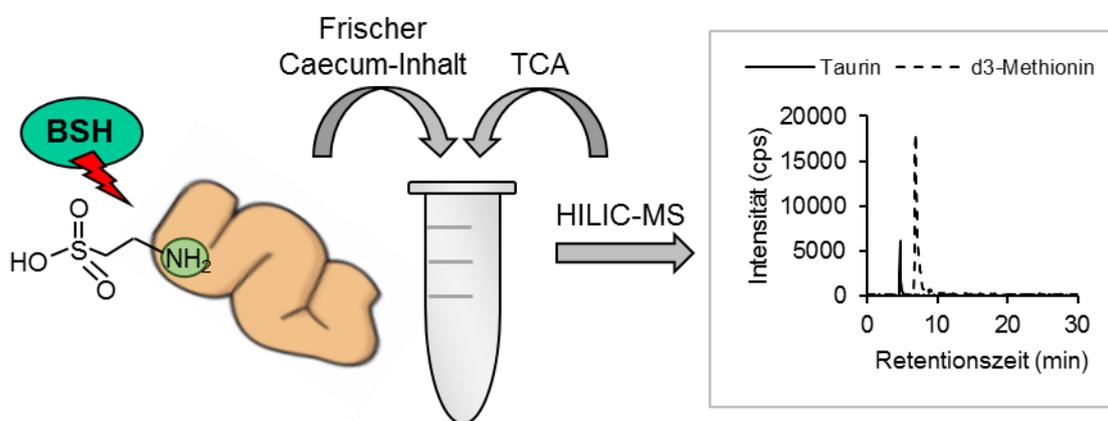
Die Auswertung der  $\alpha$ -Diversität ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen (Abbildung 4-4 a und b). Allerdings wurde ersichtlich, dass die  $\alpha$ -Diversität in Mäusen nach Antibiotikabehandlung (6 °C + AB; Kontrolle + AB), deutlich größer war, als in den entsprechenden Tieren ohne Antibiotikabehandlung (6 °C; Kontrolle).

Die Capscale Bray-Curtis Analyse der Genera aus den Fäzes der unterschiedlichen Versuchsgruppen zeigte deutliche Cluster zwischen den Mäusen, die für 7 Tage bei 6 °C ge-

halten wurden und den entsprechenden Kontrollen, welche bei 28 °C gehalten wurden (Abbildung 4-4 c). Noch deutlicher war die Trennung zwischen Tieren mit (6 °C + AB; Kontrolle + AB) und ohne Antibiotikabehandlung (6 °C; Kontrolle), dargestellt auf der CAP1 Skala. Der Einfluss der Umgebungstemperatur, welcher auf der CAP2 Skala dargestellt ist, war in den mit Antibiotika behandelten Mäusen deutlich geringer ausgeprägt, als zwischen den entsprechenden Tieren nach alleiniger Aktivierung des BAT durch Kälte und den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse zeigen somit eine signifikante Veränderung des intestinalen Mikrobioms, sowohl nach alleiniger Aktivierung des BAT durch Kälte, als auch durch die Gabe von Antibiotika.

#### 4.2.4 Messung und Quantifizierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms *bile salt hydrolase*

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Messung der Aktivität des bakteriellen Enzyms *bile salt hydrolase* (BSH) entwickelt. Es basiert auf bereits bekannten Methoden, unterscheidet sich von diesen aber darin, dass die Konzentration des freigesetzten Taurins aus Taurocholsäure (TCA) direkt im Caecum-Inhalt mittels HILIC-ESI-QqQ-MS bestimmt wurde. Abbildung 4-5 stellt das Verfahren graphisch dar und beinhaltet ebenfalls ein beispielhaftes Chromatogramm.

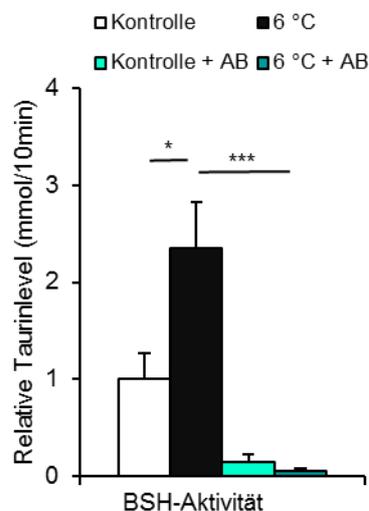


**Abbildung 4-5: Graphische Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms *bile salt hydrolase***

Graphische Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms *bile salt hydrolase*. Frischer Caecum-Inhalt wurde entnommen, mit einer definierten Menge TCA versetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung des freigesetzten Taurins erfolgte dann mittels HILIC-ES-QqQ-MS.

Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist Abschnitt 3.2.6 zu entnehmen. Anhand der Mikrobiomdaten ließ sich nicht eindeutig nachweisen, ob die Eradikation des intestinalen Mikrobioms erfolgreich war. Daher wurde auch die Aktivität des Enzyms BSH bestimmt, da dies ausschließlich von Bakterien im Darm exprimiert wird und der Wirt es somit nicht selbst produzieren kann. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 4-6 demonstriert. Es zeigte sich, dass die Aktivierung des BAT zu einer deutlichen Erhöhung der freigesetzten Taurinmenge, im Vergleich zu Kontrollmäusen, welche bei 28 °C gehalten wurden,

fürte. Die BSH-Aktivität war in diesen Tieren mehr als verdoppelt. Die Gabe von Antibiotika führte zu einer drastischen Reduktion des freigesetzten Taurins. Sowohl in den Mäusen welche für 7 Tage bei 6 °C gehalten wurden, um das BAT durch Kälteexposition zu aktivieren und zusätzlich Antibiotika erhielten (6 °C + AB), als auch in den entsprechenden Kontrollen die alleinig Antibiotika erhielten (Kontrolle + AB), konnte fast keine BSH-Aktivität, in Form von freigesetztem Taurin aus TCA, mehr nachgewiesen werden. Tendenziell war die Menge an freigesetztem Taurin in den Mäusen nach alleiniger Antibiotikabehandlung (Kontrolle + AB) höher, als in den Tieren, in denen zusätzlich das BAT durch Kälte aktiviert (6 °C + AB) wurde (Abbildung 4-6).



**Abbildung 4-6: Ergebnisse der Messung der Enzymaktivität der *bile salt hydrolase* in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes und vergleichbaren Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung**

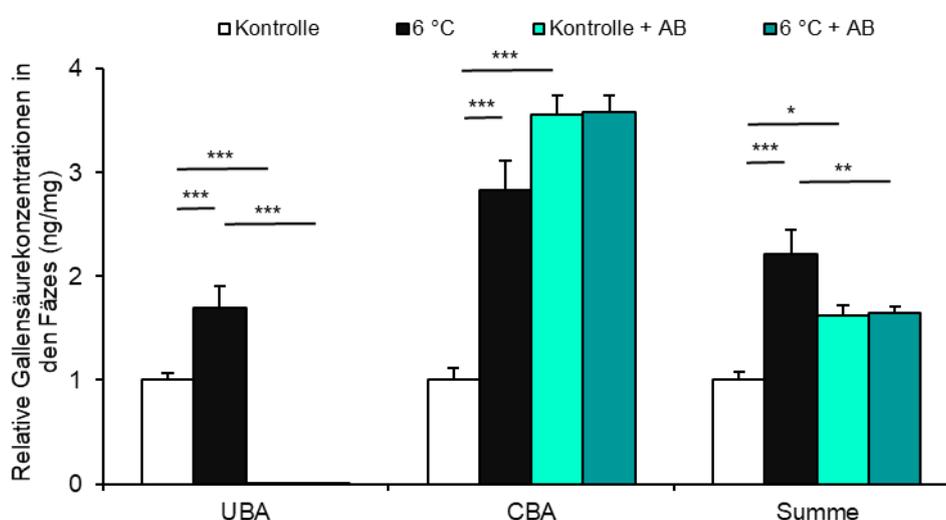
Analyse der Enzymaktivität der *bile salt hydrolase* in WT-Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte für 7 Tage (6 °C), Kontrollen (Haltung bei 28 °C) und vergleichbaren WT-Mäusen nach 7-tägiger Antibiotikagabe (Kontrolle + AB; 6 °C + AB). Es wurde die Menge an freigesetztem Taurin aus TCA bestimmt. Die Ergebnisse sind als relative Taurinlevel im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt (n = 4-7; \*p>0,05; \*\*\*p>0,001). Die Ergebnisse der BSH-Aktivität wurden vor kurzem veröffentlicht (Worthmann et al. 2017).

Diese Resultate zeigten, dass die Behandlung der Mäuse mit Antibiotika (Bacitracin, Neomycin und Streptomycin, jeweils 1 g/l über das Trinkwasser) zu einer drastischen Reduktion der intestinalen Bakterien führte, was den Schluss zuließ, dass die Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch den BNS-Cocktail im Wesentlichen erfolgreich war.

#### 4.2.5 Analyse der fäkalen Ausscheidung von Gallensäuren

Da das bakterielle Enzym *bile salt hydrolase* Gallensäuren dekonjugiert, wurde im folgenden Abschnitt untersucht, welche Folgen die Eradikation des intestinalen Mikrobioms und die damit einhergehende drastisch reduzierte BSH-Aktivität, auf die Gallensäurekonzentrationen in den Fäzes hat. Zudem konnten Vorarbeiten von Clara John zeigen, dass die Aktivierung des BAT durch Kälte zu einer erhöhten Gallensäuresynthese und Ausscheidung führt (John 2015). Daher sollte zudem untersucht werden, welchen Einfluss das intestinale Mikrobiom auf die Ausscheidung von Gallensäuren über die Fäzes hat.

Die Analyse der fäkalen Gallensäurezusammensetzung erfolgte mittels der HPLC-ESI-QqQ-Massenspektrometrie-Methode von John und Werner et. al (2014). Dafür wurde Fäzes nach einem Zeitraum von 24 Stunden, direkt vor Beginn der Fastenperiode, gesammelt (siehe Abschnitt 3.2.4). Die Auswertung zeigte, dass nach Behandlung der Mäuse mit Antibiotika (Bacitracin, Neomycin und Streptomycin, jeweils 1 g/l über das Trinkwasser), die Ausscheidung von unkonjugierten Gallensäuren (UBA) nahezu nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 4-7). Die Konzentration von konjugierten Gallensäuren (CBA) in Fäzes hingegen war in den mit Antibiotika behandelten Tieren, im Verhältnis zur Kontrollgruppe, auf etwa das 4-fache angestiegen und lag damit geringfügig über dem Anstieg nach alleiniger Aktivierung des BAT durch Kälte (ca. 3-fach). Dieser Effekt war unabhängig von den Haltungsbedingungen der Tiere (Abbildung 4-7).



**Abbildung 4-7: Relative Konzentration von unkonjugierten und konjugierten Gallensäuren in den Fäzes von C57BL/6J-Mäusen nach 7 tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes und Kontrolltieren sowie entsprechenden Mäusen nach Antibiotikabehandlung**

Relative Konzentration von unkonjugierten (UBA) und konjugierten (CBA) Gallensäuren sowie deren Summe im 24 h Fäzes von C57BL/6J -Mäusen nach 7 tägiger Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C), in Kontrollen (28 °C) und Tieren nach Aktivierung des BAT und Antibiotikabehandlung (6 °C + AB) sowie Kontrollen mit Antibiotikabehandlung (Kontrollen + AB). Die Messung erfolgte mittels HPLC-ESI-QqQ-MS. Die Konzentrationen sind im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (WTD) und Trinkwasser (n = 10; \*p>0,05; \*\*p>0,01; \*\*\*p>0,001). Die Messung und Auswertung der Daten erfolgte durch Anna Worthmann. Die Daten der Gallensäurekonzentrationen in den Fäzes wurden vor kurzem publiziert (Worthmann et al. 2017).

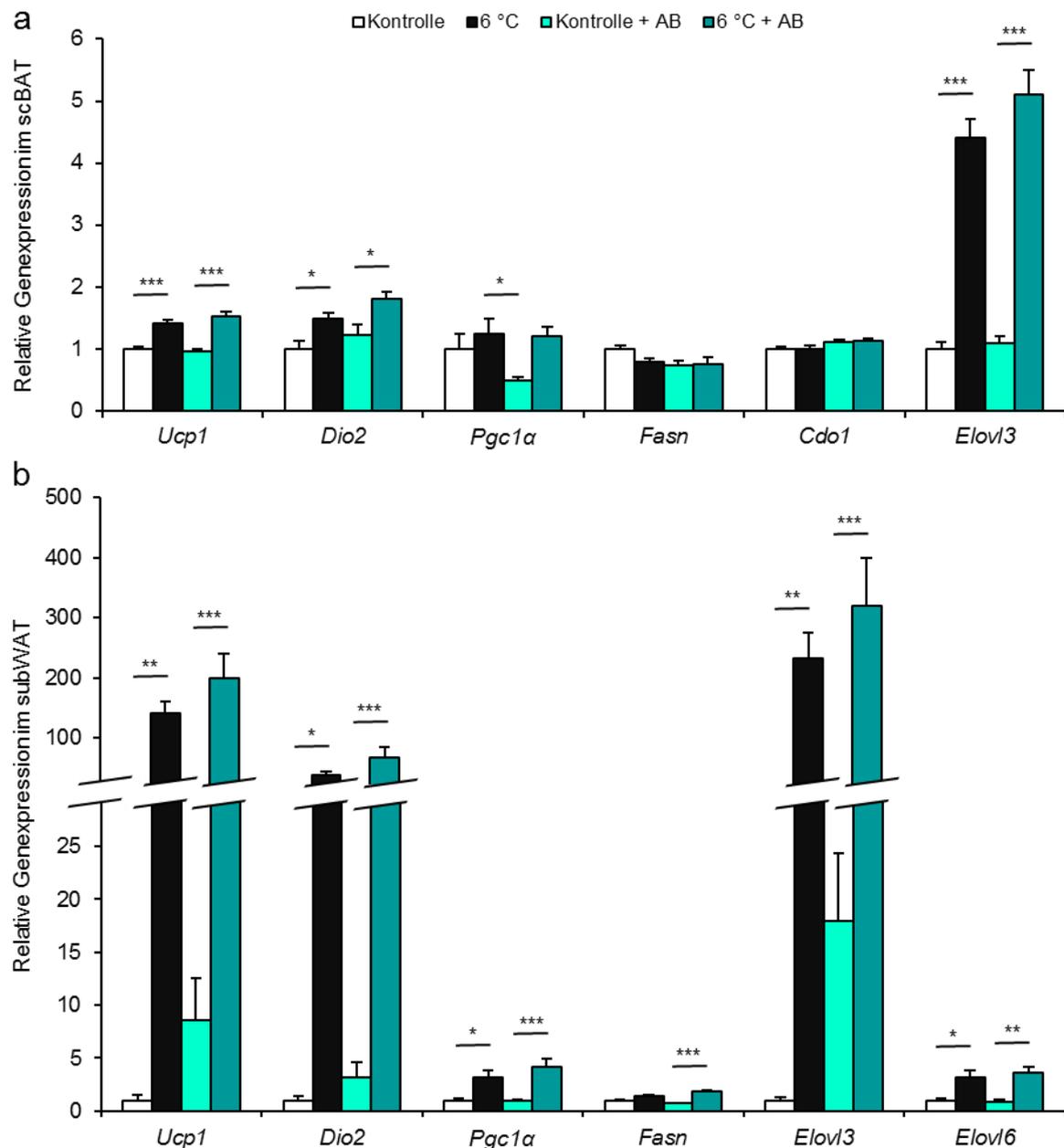
In der Summe der Gallensäuren ergaben sich nach Antibiotikabehandlung ebenfalls keine Unterschiede mehr zwischen den Haltungsbedingungen. Die Gabe von Antibiotika führte in der Summe (UBA + CBA) zu einem etwa 1,8-fachen Anstieg der Ausscheidung von Gallensäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe, aber zu einer signifikanten Reduktion im Vergleich zu der Gruppe nach alleiniger Aktivierung des BAT durch Kälte. Diese Ergebnisse bestätigten erneut, dass die Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch die Gabe von Antibiotika erfolgreich war, da die Dekonjugation und weitere Prozessierung der konjugierten Gallensäuren im Darm einzig durch die intestinalen Bakterien und deren Enzym die *bile salt hydrolase* ermöglicht wird. Die drastische Senkung der BSH-Aktivität (siehe

Abbildung 4-6), durch die Antibiotikabehandlung, erklärt daher, warum nach der Gabe von Antibiotika ausschließlich konjugierte Gallensäuren in den Fäzes nachweisbar waren. Zusätzlich passen die Ergebnisse zu den Resultaten der 16S rDNA Sequenzierung des intestinalen Mikrobioms (siehe Abbildung 4-4), da es nach Antibiotikabehandlung ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion des Einflusses durch die Umgebungstemperatur kam.

#### 4.2.6 Analyse der Genexpression thermogener Gene im braunen Fettgewebe und in beige Adipozyten

Die Messung der Genexpression thermogener Gene erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR im scBAT und subWAT aus Mäusen der unterschiedlichen Versuchsgruppen.

Wie zu erwarten, (Abbildung 4-1) war im scBAT eine Hochregulation der für die Thermogenese wichtigen Gene zu beobachten.



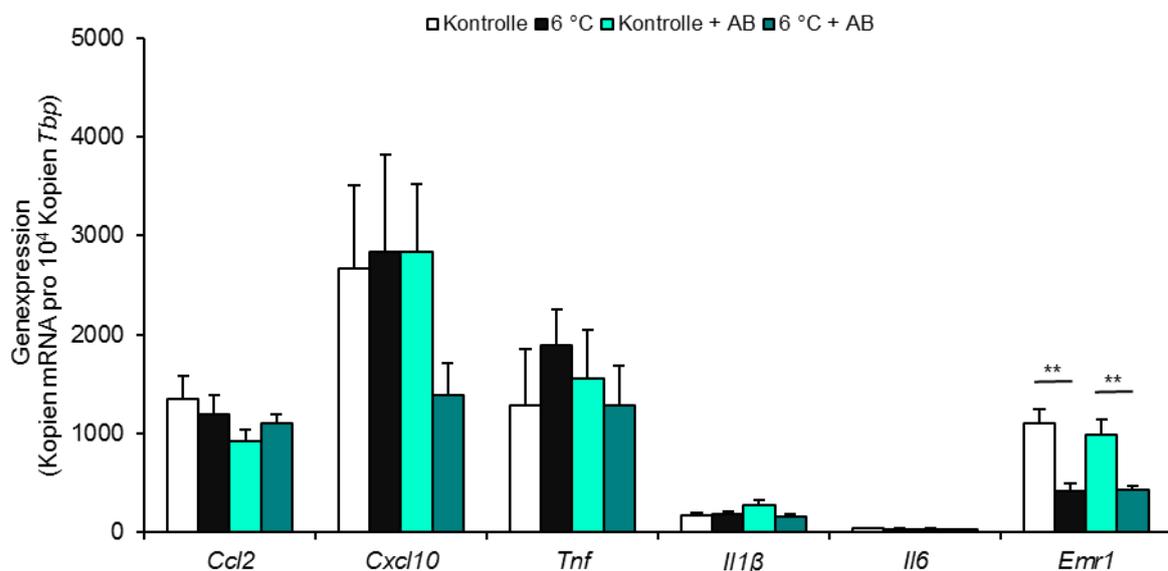
**Abbildung 4-8: Analyse der Genexpression im braunen Fettgewebe und in beige Adipozyten von C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes und in C57BL/6J Kontrollmäusen sowie entsprechenden Mäusen nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung**

Analyse der Expression thermogener Gene im scBAT (a) und subWAT (b) aus C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C) und in einer entsprechenden Kontrollgruppe welche bei 28 °C gehalten wurde sowie in Tieren nach Aktivierung des BAT und Antibiotikabehandlung (6 °C + AB) und Kontrollen mit Antibiotikabehandlung (Kontrollen + AB). Die Messung der Genexpression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR. Die Daten wurden auf den *housekeeper* *Tbp* normalisiert und als relative Expression im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt. (n = 8; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Die Expression von *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3* war, im Vergleich zu den Kontrollen, in den Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes signifikant erhöht. Im Fall der Fettsäureelongase 3 (*Elovl3*) kam es zu einem 5-fachen Anstieg der Expression, im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4-8 a). Die Expression von *Pgc1 $\alpha$* , *Fasn* und *Cdo1* wurde durch die Aktivierung des BAT nicht signifikant beeinflusst. Die Behandlung der Tiere mit Antibiotika hatte auf die Expression von *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3* keinen signifikanten Einfluss. Die Expression von *Pgc1 $\alpha$*  war in den Kontrolltieren mit Antibiotikabehandlung signifikant erniedrigt, im Kontrast zu den Antibiotika-behandelten Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte. Die Expression verschiedener thermogener Gene im subWAT war, wie bereits in Abbildung 4-1 b dargestellt, nach Aktivierung der zitterfreien Thermogenese, signifikant erhöht. Die Expression von *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3* stieg um das 150-200-fache in den Tieren nach BAT-Aktivierung, im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4-8 b). Die Expression von *Pgc1 $\alpha$*  und *Elovl6* war in den Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte, im Verhältnis zu den Kontrollen, ca. verdoppelt. Die Expression der Fettsäuresynthase (*Fasn*) war nur zwischen den Antibiotika-behandelten Gruppen signifikant unterschiedlich. Die Expression war in den Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes und Eradikation des intestinalen Mikrobioms, im Vergleich zu den Tieren nach alleiniger Antibiotikabehandlung, etwa verdoppelt. Die Expressionsmuster von *Ucp1*, *Dio2*, *Elovl3* und *Elovl6* unterschieden sich nicht signifikant zwischen Mäusen mit und ohne Antibiotikabehandlung. Allerdings gab es in der Expression von *Ucp1* und *Elovl3* einen Trend zu einer erhöhten Genexpression in den Antibiotika-behandelten Tieren, im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren ohne Antibiotikum.

#### 4.2.6.1 Analyse proinflammatorischer Gene in beigen und weißen Adipozyten

Das Metabolische Syndrom geht mit einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im weißen Fettgewebe einher. In diesem Zusammenhang wird auch von einer sogenannten *low-grade inflammation* gesprochen (Cooke et al. 2016, Petersen und Pedersen 2005). Um zu untersuchen, welchen Effekt zum einen die Aktivierung des braunen Fettgewebes und zum anderen die Eradikation des Mikrobioms durch Antibiotika auf die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie den murinen Makrophagenmarker *EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*; *Emr1* (Austyn und Gordon 1981) hat, wurden die entsprechenden Gene mittels quantitativer *real-time* PCR im subWAT gemessen. Es zeigte sich, dass sich lediglich die Genexpression des murinen Makrophagenmarkers *Emr1* signifikant zwischen Mäusen, die für eine Woche bei 6 °C gehalten wurden und denen, die bei 28 °C gehalten wurden unterschied (Abbildung 4-9).



**Abbildung 4-9: Genexpressionsanalyse proinflammatorischer Gene in beigen Adipozyten aus Wildtyp-Mäusen nach Aktivierung der zitterfreien Thermogenese durch Kälte und in Kontrollen sowie entsprechenden Mäusen nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung**

Analyse der Expression proinflammatorischer Gene im subWAT von C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des BAT durch Kälte (6 °C) und in entsprechenden Kontrollen, welche für eine Woche bei 28 °C gehalten wurde sowie in Tieren nach Aktivierung des BAT und Antibiotikabehandlung (6 °C + AB) und Kontrollen mit Antibiotikabehandlung (Kontrollen + AB). Die Messung der Genexpression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR. Die Daten wurden auf *Tbp* normalisiert. (n = 8; \*\*p < 0,01).

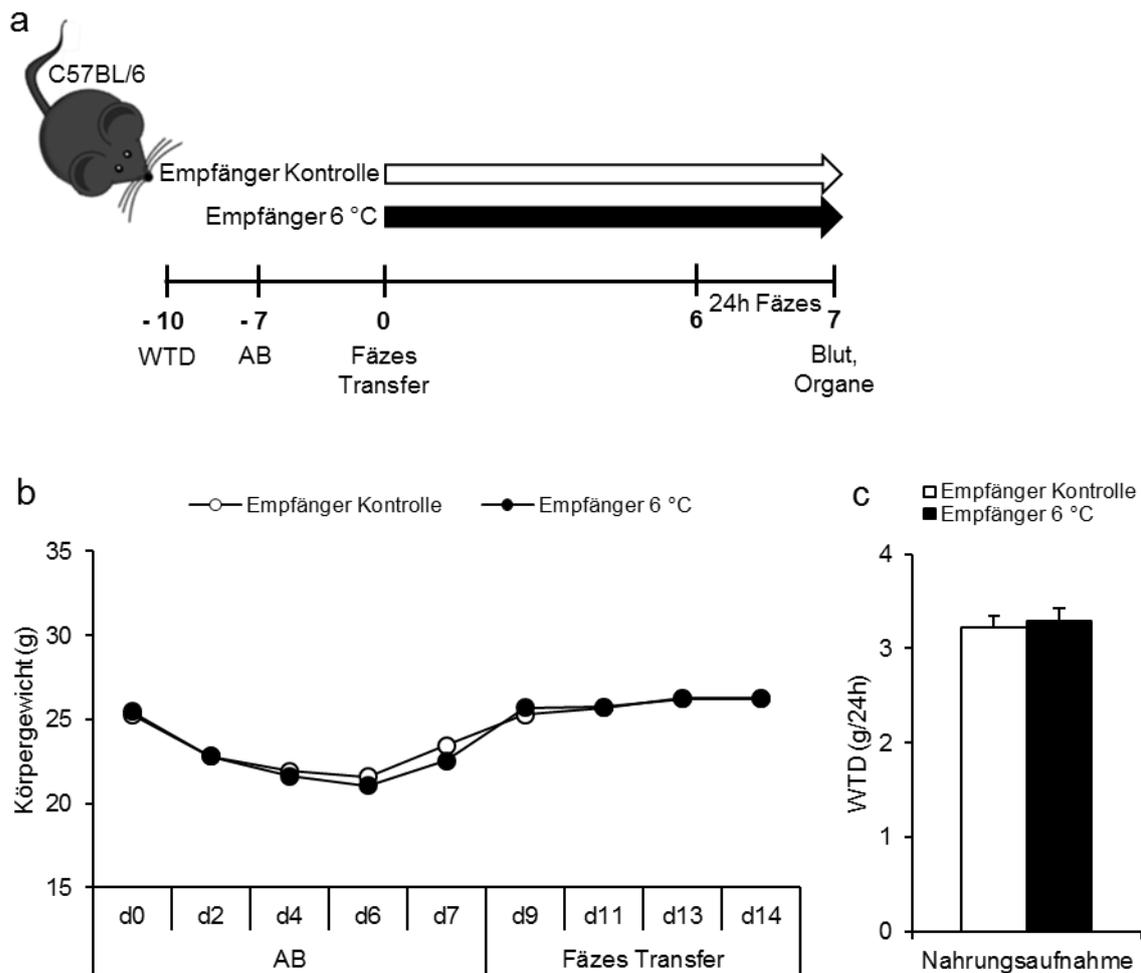
Dieser Effekt war unabhängig von der Behandlung der Tiere mit Antibiotika. Insgesamt war die Anzahl der mRNA Kopien pro 10<sup>4</sup> Kopien *Tbp* niedrig und die Schwankungsbreite sehr groß, sodass sich die Expression der restlichen gemessenen proinflammatorischen Gene nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen unterschied.

### **4.3 Auswirkungen der Transplantation von Fäzes aus C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte**

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte analysiert werden, welchen Effekt eine Transplantation von Fäzes, aus C57BL/6J WT-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte, auf den Metabolismus und die zitterfreie Thermogenese des BAT hat. Hierfür wurden die Mäuse zunächst mit einer Mischung aus drei verschiedenen Antibiotika (Ampicillin, Neomycin und Metronidazol), jeweils in einer Konzentration von 1 g/l, über das Trinkwasser behandelt, um die residente Darmflora der Mäuse zu eradizieren. Die Antibiotikagabe erfolgte dabei über einen Zeitraum von 7 Tagen, wobei die Antibiotiklösung alle zwei Tage neu angesetzt und dementsprechend ausgetauscht wurde. Im Anschluss folgte die Fäzes-Transplantation. Die jeweiligen Donor-Mäuse wurden dafür für 7 Tage bei 6 °C gehalten, um das braune Fettgewebe zu aktivieren, während die Haltung der Kontrolltiere bei 28 °C erfolgte. Der Fäzes-Transfer wurde im Anschluss alle zwei Tage über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen durchgeführt. Es wurde jeweils der *Caecum*-Inhalt von zwei bis drei Mäusen verwendet. Alle Mäuse, also sowohl Donor, als auch Empfänger erhielten eine WTD (Gesamtfettgehalt 21%, Zuckergehalt 33%, Cholesteringehalt 0,2%) über den gesamten Zeitraum des Versuchs und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser (siehe auch Abschnitt 3.2.1.3.3 bzw. Abbildung 4-10 a).

#### **4.3.1 Analyse des Körpergewichts und der Nahrungsaufnahme**

In Abbildung 4-10 sind das experimentelle Design sowie das durchschnittliche Körpergewicht und die tägliche, durchschnittliche Nahrungsaufnahme dargestellt. Dabei verloren beide Versuchsgruppen durch die Gabe der Antibiotika an Gewicht. Dieser Verlust wurde allerdings nach Transplantation der Fäzes wieder ausgeglichen, sodass es letztlich keinen Unterschied im durchschnittlichen Gewicht der Tiere nach Transfer der Fäzes aus Braunfett-aktivierten Tieren (Empfänger 6 °C) bzw. aus Kontrolltieren (Empfänger Kontrolle) gab. Die Nahrungsaufnahme lag in beiden Versuchsgruppen im Durchschnitt bei etwa 3 g pro Tag. Verglichen mit den Ergebnissen aus Abbildung 4-2 c entspricht dies eher der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme einer C57BL/6J-Maus, die nahe der Thermoneutralität gehalten wurde und nicht einer C57BL/6J-Maus, deren BAT durch eine 7-tägige Kälteexposition aktiviert wurde. Dies deutete darauf hin, dass sich die Effekte der Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte auf die Nahrungsaufnahme und die Gewichtszunahme, nicht durch Fäzes-Transplantation auf Mäuse ohne Kälteexposition übertragen ließen.



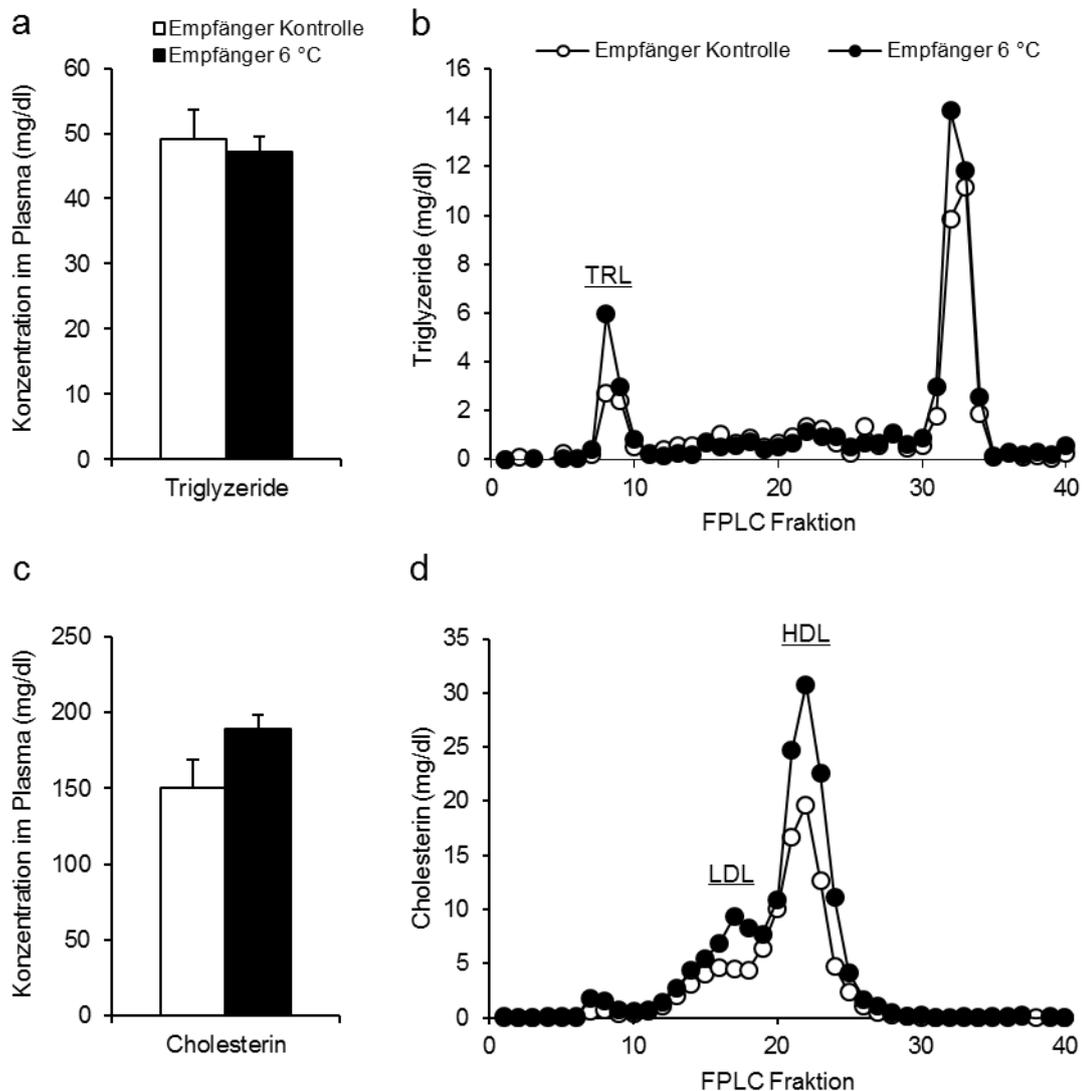
**Abbildung 4-10: Analyse der Nahrungsaufnahme und des Verlaufs des Körpergewichts in C57BL/6J-Mäusen nach Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes**

(a) Experimentelles Design (b) Verlauf des durchschnittlichen Körpergewichts von Tag 0 (d0), entspricht dem Beginn der Antibiotikabehandlung (Ampicillin, Neomycin und Metronidazol, jeweils 1 g/l über das Trinkwasser), bis Tag 14 (d14). (c) Durchschnittliche Aufnahme von WTD in 24 Stunden. Die Tiere erhielten alle 2 Tage eine Fäzes-Transplantation aus Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes (Empfänger 6 °C) bzw. aus entsprechenden Kontrolltieren (28 °C; Empfänger Kontrolle) über einen Zeitraum von 7 Tagen. (n = 12).

#### 4.3.2 Bestimmung der Lipidkonzentration und des Lipoproteinprofils im Plasma

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch eine vermehrte Aufnahme von freien Fettsäuren und ganzen Triglyzerid-reichen Lipoprotein (TRL)-Partikeln zu einer Senkung der Konzentration von TRL im Plasma führt (Bartelt et al. 2011). Um zu überprüfen, ob die Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte, zu einer Ausprägung des „braunen Phänotyps“ in den jeweiligen Empfängern führte, wurde die Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden sowie das Lipoproteinprofil im Plasma bestimmt. Die Plasmalipidkonzentrationen der Mäuse, welche die Fäzes aus Tieren nach Aktivierung des BAT durch Kälte bzw. aus Kontrolltieren erhalten hatten, unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 4-11 a und

c). Die Lipoproteinprofile im Plasma hingegen zeigten, dass die Mäuse, welche die Fäzes aus den Kontrolltieren erhalten hatten, sowohl niedrigere Plasmakonzentrationen an TRL, als auch an HDL und LDL Cholesterin aufwiesen (Abbildung 4-11 b und d).



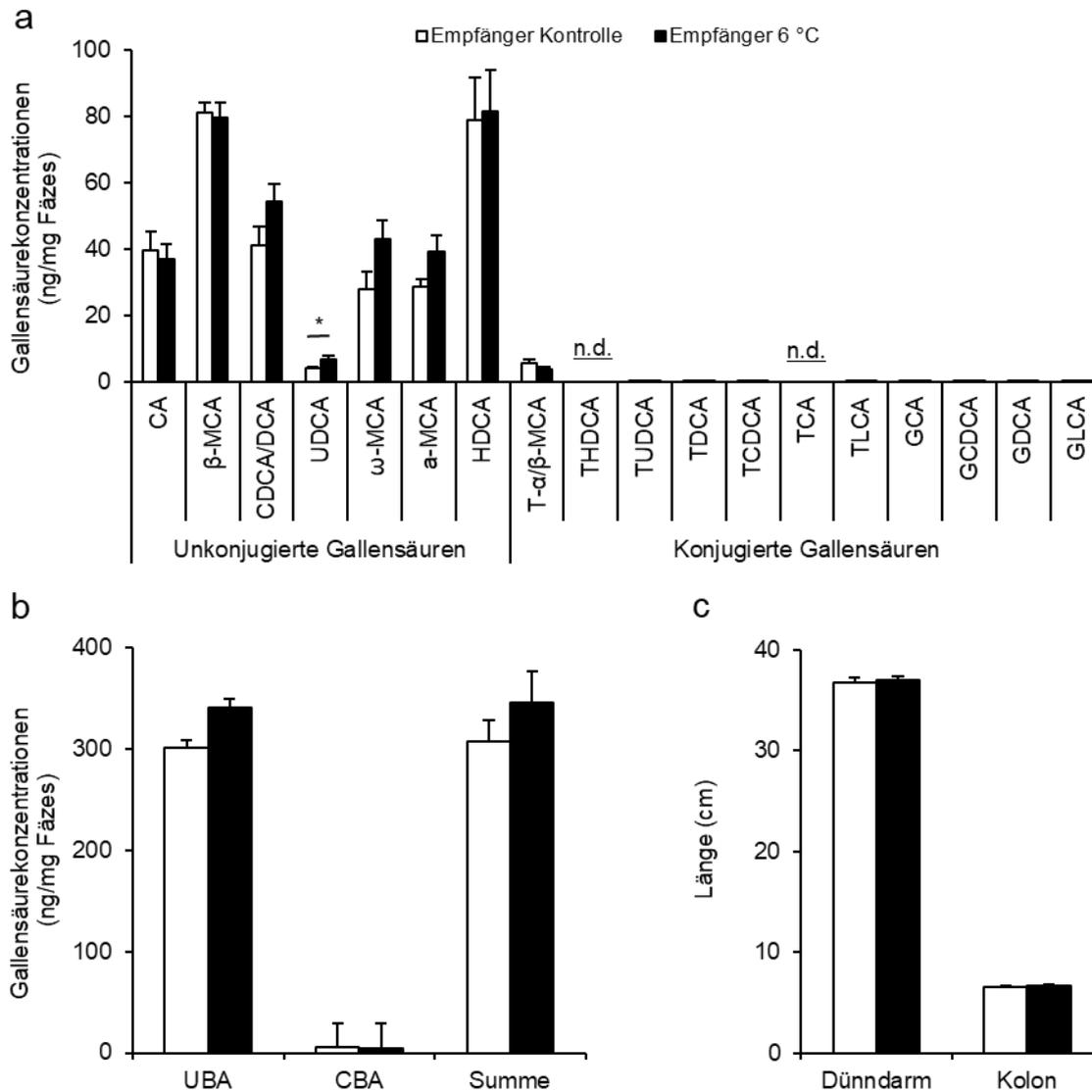
**Abbildung 4-11: Analyse der Lipidkonzentrationen und des Lipoproteinprofils in C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transfer aus Mäusen nach 7-tägiger Kälteadaptation**

Konzentration von Cholesterin (a) und Triglyzeriden (b) im Plasma von WT-Mäusen nach Fäzes-Transfer aus Mäusen nach 7-tägiger Kälteadaptation (Empfänger 6 °C) und aus entsprechenden Kontrollen (Empfänger Kontrolle). Lipoproteinprofile von Triglyzeriden (b) und Cholesterin (c) im Plasma von C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes Transplantation aus Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte (Empfänger 6 °C) und aus entsprechenden Kontrollen (Haltung bei 28 °C; Empfänger Kontrolle). Die Plasmaproben der einzelnen Mäuse der zwei Versuchsgruppen wurden gemischt. Die Bestimmung des Lipoproteinprofils im Plasma erfolgte mittels FPLC. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (WTD) und Wasser. (n = 6).

Ob dieser Unterschied jedoch signifikant war, ließ sich anhand der erhobenen Daten nicht feststellen, da für die Bestimmung des Lipoproteinprofils die Plasmaproben der einzelnen Tiere einer Versuchsgruppe vereint wurden und sich somit lediglich Tendenzen ableiten ließen. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass der Transfer von Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT nicht zu einer erwarteten Reduktion der Plasmalipidkonzentrationen, insbesondere der TRL-Fraktion, führte.

### 4.3.3 Analyse der Gallensäurekomposition in Fäzes

Die Messung der Gallensäurekomposition in den Fäzes erfolgte erneut mittels der HPLC-ESI-QqQ-MS-Methode von John und Werner et. al (2014). Die Fäzes wurde erneut nach einem Zeitraum von 24h gesammelt und anschließend bei -80 °C eingefroren.



**Abbildung 4-12: Messung der unterschiedlichen Gallensäurespezies in den Fäzes von C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus Mäusen deren braunes Fettgewebe für 7 Tage durch Kälte aktiviert wurde und Messung der Länge des Dünndarms und des Kolons in selbigen Mäusen**

(a) Konzentration der verschiedenen Gallensäurespezies in Fäzes von WT-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus WT-Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des BAT durch Kälte (Empfänger 6 °C) sowie aus Kontrollen, welche für eine Woche bei 28 °C gehalten wurden (Empfänger Kontrolle). (b) Konzentration an unkonjugierten (UBA) und konjugierten (CBA) und deren Summe in den Fäzes. (c) Länge von Dünndarm und Kolon in den zwei Versuchsgruppen. n.d. = nicht detektierbar. (n = 12; \*p<0,05). Die Messung und Auswertung der Daten zu den Gallensäurespezies in den Fäzes erfolgte durch Anna Worthmann.

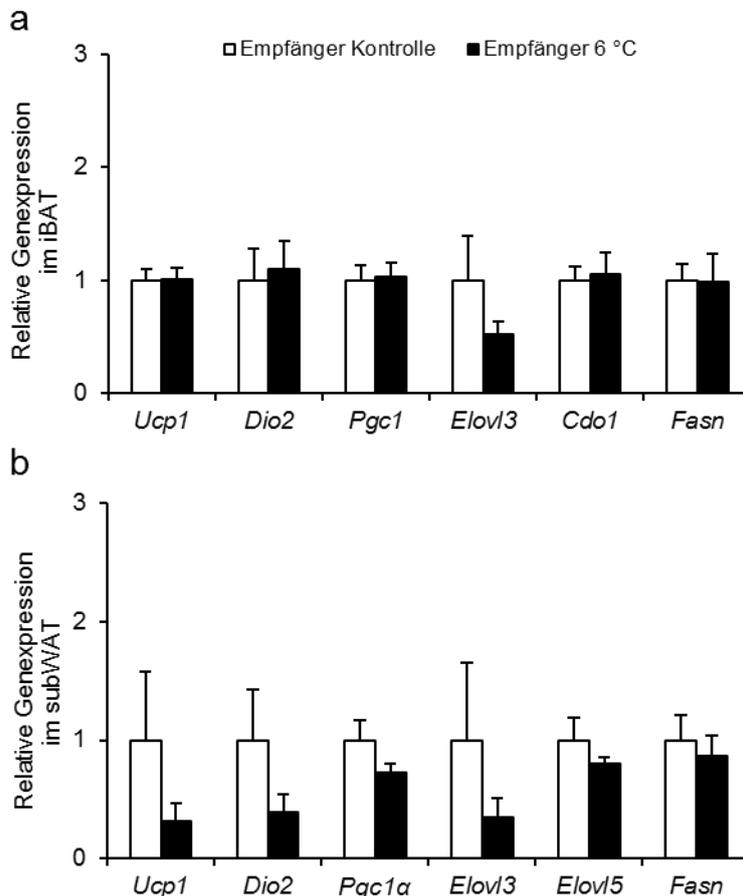
In den Fäzes beider Versuchsgruppen waren nahezu ausschließlich dekonjugierte Gallensäuren nachweisbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass im distalen Ileum effiziente Transporter zur Aufnahme von konjugierten Gallensäuren vorhanden sind (Hofmann

2009). Weiterhin waren ausschließlich Taurin-konjugierte Gallensäuren detektierbar. Mäuse produzieren, im Gegensatz zu Menschen, fast ausschließlich Taurin-konjugierte Gallensäuren (Dawson und Karpen 2015, Thomas et al. 2008). Dabei zeigten sich, bis auf bei der unkonjugierten Gallensäure Ursodesoxycholsäure (UDCA), keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen, die Fäzes aus Mäusen nach Kälteadaptation (Empfänger 6 °C) und denen, die Fäzes aus Kontrolltieren (Empfänger Kontrolle) erhalten hatten (Abbildung 4-12 a). Auch die Summe an unkonjugierten (UBA) und konjugierten (CBA) Gallensäuren sowie die Gesamtsumme der Gallensäureausscheidung unterschieden sich nicht signifikant zwischen den zwei Versuchsgruppen (Abbildung 4-11 b).

Chevalier et al.(2015) konnten zeigen, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einem signifikanten Längenwachstum des Dünndarms und der Mikrovilli führt und dass dieser Effekt ebenfalls durch Fäzes-Transplantation auf andere Mäuse übertragbar ist. Die Messung der Länge des Dünndarms bzw. Kolons in unserem Versuchsaufbau ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, welche Fäzes aus Tieren nach BAT Aktivierung (Empfänger 6 °C) und solchen, die Fäzes aus Kontrollen (Empfänger Kontrollen) empfangen hatten (Abbildung 4-12 c). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Transplantation von Fäzes aus Tieren nach Aktivierung des BAT durch Kälte, nicht zu einer Übertragung des Gallensäureprofils (siehe Abbildung 4-7) führte.

#### 4.3.4 Analyse der Genexpression thermogener Gene im braunen Fettgewebe und in beige Adipozyten

Die Analyse thermogener Gene erfolgte im iBAT und subWAT mittels quantitativer *real-time* PCR. Sie diente dazu, zu überprüfen, ob das Expressionsmuster der Braunfettaktivierung durch Kälteexposition (siehe Abbildung 4-1 a und b) und somit auch dessen Effekte mittels Fäzes-Transplantation auf Mäuse, welche bei 28 °C gehalten wurden, übertragbar waren. Dabei unterschied sich die Expression thermogener Gene wie beispielsweise *Ucp1*, *Dio2*, *Elovl3* und *Pgc1 $\alpha$*  im iBAT im Verhältnis zur Kontrollgruppe nicht zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 13 a). Auch im subWAT waren keine Unterschiede in der Expression thermogener Gene zwischen den Tieren, welche Fäzes aus Mäusen



**Abbildung 4-13: Genexpression thermogener Gene im iBAT und subWAT von Wildtyp-Mäusen nach Fäzes Transfer aus WT-Mäusen die zur Aktivierung des braunen Fettgewebes für 7 Tage bei 6 °C gehalten wurden**

(a) Analyse der Genexpression thermogener Gene im scBAT von WT-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus Mäusen dessen braunes Fettgewebe durch Kälte aktiviert wurde (Empfänger 6 °C) bzw. aus Kontrolltieren (Empfänger Kontrolle) (b) Analyse thermogener Gene im subWAT. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR. Die dargestellten Werte sind auf *Tbp* normalisiert und jeweils im Verhältnis zur Kontrollgruppe ausgewertet. (n = 6).

nach Aktivierung des braunen Fettgewebes (Empfänger 6 °C) erhalten hatten und solchen, die Fäzes aus Kontrolltieren (Empfänger Kontrolle) erhielten, sichtbar (Abbildung 13 b). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass sich das Expressionsmuster der Braunfettaktivierung durch Kälte nicht mittels Fäzes-Transplantation auf Mäuse, welche bei Raumtemperatur (28 °C) gehalten wurden, übertragen ließ.

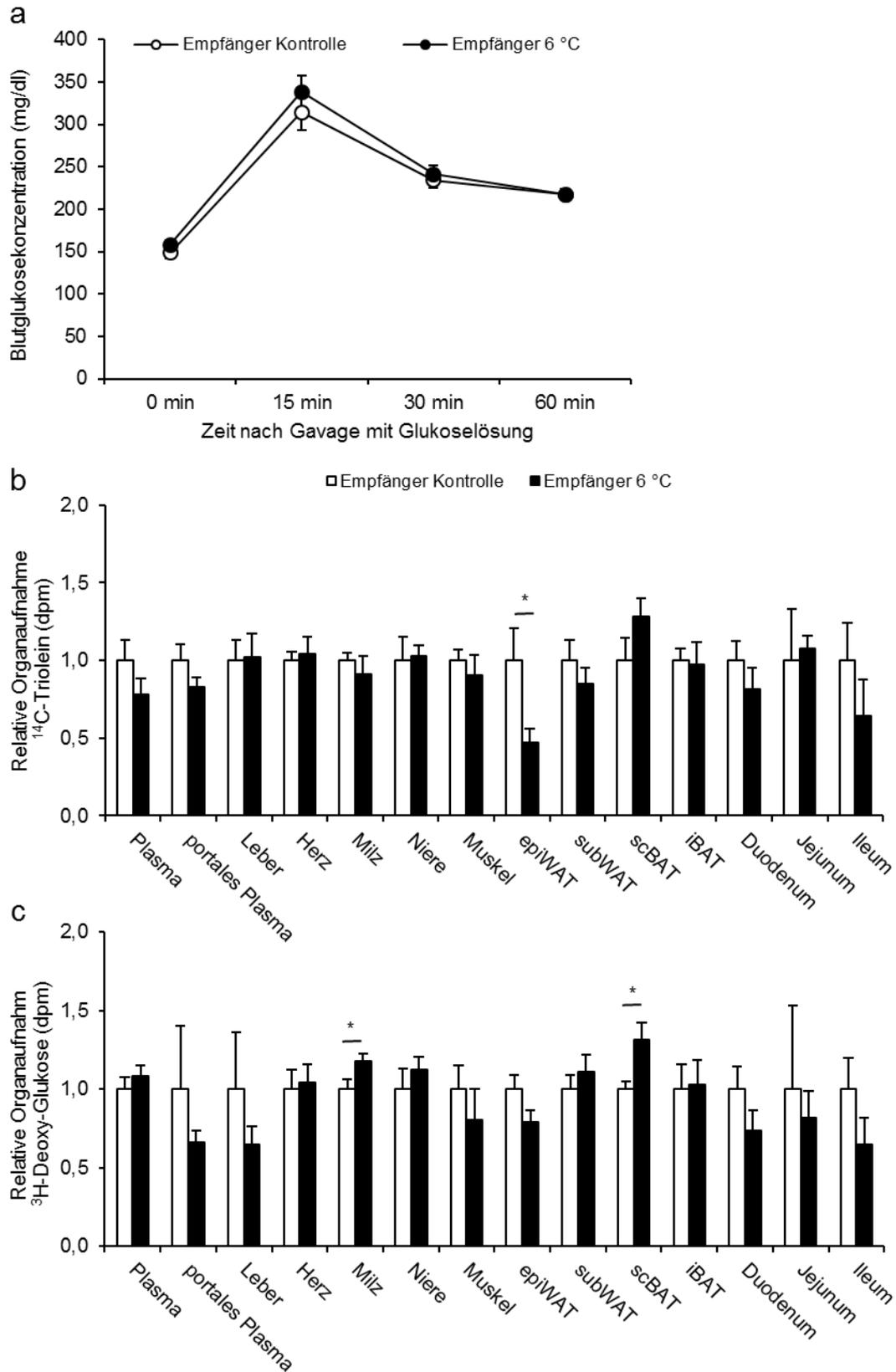
exposition (siehe Abbildung 4-1 a und b) und somit auch dessen Effekte mittels Fäzes-Transplantation auf Mäuse, welche bei 28 °C gehalten wurden, übertragbar waren. Dabei unterschied sich die Expression thermogener Gene wie beispielsweise *Ucp1*, *Dio2*, *Elovl3* und *Pgc1 $\alpha$*  im iBAT im Verhältnis zur Kontrollgruppe nicht zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 13 a). Auch im subWAT waren keine Unterschiede in der Expression thermogener Gene zwischen den Tieren, welche Fäzes aus Mäusen

#### **4.3.5 Bestimmung der Glukosetoleranz mittels oralem Glukosetoleranz-Test und Quantifizierung der Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden**

Bartelt et al. (2011) konnten, wie bereits in Abschnitt 4.3.2 erwähnt, zeigen, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes zu einer Reduktion von TRL im Plasma führt, was hauptsächlich auf den erhöhten Energieverbrauch und die damit einhergehende vermehrte Aufnahme von freien Fettsäuren durch das aktivierte BAT zurückzuführen ist. Ebenfalls bekannt ist, dass vom BAT nicht nur freie Fettsäuren für die Aufrechterhaltung der zitterfreien Thermogenese verstoffwechselt werden, sondern ebenfalls Glukose verstoffwechselt wird, was zu erniedrigten Blutglukosewerten und einer erhöhten Insulinsensitivität führt. (Stanford et al. 2013). Daher wurde ein oraler Glukosetoleranz-Test (oGTT), welcher mit der Verabreichung radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden kombiniert war, durchgeführt. Die Mäuse erhielten, nach einer 4-stündigen Fastenperiode, eine orale Gavage mit einer Glukoselösung, welche mit  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose sowie  $^{14}\text{C}$ -Triolein angereichert war. Die Messung der Glukosekonzentration im Plasma erfolgte nach 0, 15, 30 und 60 min. Anschließend wurden die Organe entnommen und aufgearbeitet (für weitere Details siehe Abschnitt 3.2.7).

Die Auswertung des oGTT ergab, dass beide Versuchsgruppen im Durchschnitt gleiche Ausgangskonzentration von ca. 150 mg Glukose pro dl Plasma aufwiesen. Auch der Verlauf der Blutglukosekonzentration über den Zeitraum von 60 min war in den Tieren, welche Fäzes aus Tieren nach Aktivierung des BAT durch Kälte erhielten (Empfänger 6 °C) und denen die Fäzes aus entsprechenden Kontrollen (Haltung bei 28 °C; Empfänger Kontrolle) erhielten, nahezu identisch (Abbildung 4-14 a).

Die relative Organaufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Triolein in dpm pro Organ zeigte, dass Empfänger-Mäuse, welche Fäzes aus Mäusen nach 7-tägiger Kälteadaptation erhalten hatten, im Verhältnis zur Organaufnahme in Empfängern, welche Fäzes aus Kontrollen erhalten hatten, signifikant weniger Lipide ins epididymale weiße Fettgewebe (epiWAT) aufnahmen (Abbildung 4-14 b). Es präsentierte sich ebenfalls eine Tendenz zu einer erhöhten Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Triolein durch das scBAT, in Mäusen welche Fäzes aus Tieren nach BAT-Aktivierung erhalten hatten. Dieser Trend war allerdings nicht signifikant. In der Organaufnahme von  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose gab es zwischen den beiden Versuchsgruppen signifikante Unterschiede in der Aufnahme des scBAT und der Milz (Abbildung 4-14 c). Es kam zu einer signifikant höheren Anreicherung von  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose im scBAT von Mäusen nach Transplantation von Fäzes aus Tieren, welche zur Aktivierung des BAT für 7 Tage bei 6 °C gehalten wurden, im Vergleich zu solchen Tieren, die Fäzes aus Kontrollmäusen (Haltung bei 28 °C) erhielten. Ein vergleichbarer Effekt ließ sich ebenfalls für die Aufnahme von Glukose in die Milz detektieren.



**Abbildung 4-14: Ergebnisse des oralen Glukosetoleranz-Test und der Organaufnahme von radioaktiv markierten Lipiden und radioaktiv markierter Glukose in C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus C57BL/6J-Mäusen die für eine Woche bei 6 °C gehalten wurden**

(a) oGTT nach vierstündigem Fasten in WT-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus Tieren nach 7-tägiger Aktivierung des BAT (Empfänger 6 °C) und entsprechenden Kontrolltieren (Empfänger Kontrolle). Organaufnahme von <sup>14</sup>C-Triolein (b) und <sup>3</sup>H-Deoxy-Glukose (c) als relative Aufnahme im Verhältnis zur Kontrollgruppe. (n = 6; \*p>0,05).

Zusätzlich zeigte das Ileum eine tendenziell geringere Anreicherung von radioaktiv markierter Glukose bzw. radioaktiv markierten Lipiden (Abbildung 4-14 b und c).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose und radioaktiv markierten Lipiden durch die Transplantation von Fäzes aus WT-Mäusen nach Aktivierung des BAT durch 7-tägige Kälteexposition bei 6 °C mindestens im epiWAT und scBAT signifikant beeinflusst wurde. Diese Veränderungen entsprachen tendenziell dem Muster, welches in Mäusen nach Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte zu erwarten gewesen wäre.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit sollten im Wesentlichen zwei Aspekte der Interaktionen zwischen dem intestinalen Mikrobiom und dem Wirtsmetabolismus, bzw. stellvertretend dafür dem braunen Fettgewebe, untersucht werden. Dafür wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Auswirkung der Eradikation des intestinalen Mikrobioms auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes analysiert, indem C57BL/6J-Mäuse mit einer Mischung aus insgesamt drei verschiedenen Antibiotika behandelt wurden. Im zweiten Teil sollte untersucht werden, ob sich die positiven metabolischen Effekte einer Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte, mittels Transplantation von Fäzes auf C57BL/6J-Mäuse, welche bei Raumtemperatur gehalten wurden, übertragen lassen. Dabei war zu Beginn dieser Arbeit noch wenig zu den Interaktionen zwischen dem braunen Fettgewebe und dem intestinalen Mikrobiom bekannt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Studienlage diskutiert werden.

### 5.1 Bedeutung der Eradikation des intestinalen Mikrobioms für die thermogene Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes

Zu Beginn dieser Arbeit wurden typische Genexpressionsmarker der Aktivierung des BAT durch Kälte in C57BL/6J-Mäusen mit intaktem Mikrobiom, welche für 7 Tage bei 6 °C gehalten wurden, bestimmt (Abbildung 4-1). Die Ergebnisse zeigten, dass es in den entsprechenden Tieren zu einer signifikanten Expression von Genen (*Ucp1*, *Pgc1 $\alpha$* , *Dio2*, *Elov13* etc.), welche klassischerweise die Aktivierung des BAT widerspiegeln (Bartelt und Heeren 2014, Cannon und Nedergaard 2004, Tvrdik et al. 1997, Westerberg et al. 2006), kam. Diese Daten dienen hauptsächlich als Grundlage für die Interpretation der folgenden Untersuchungen.

Die Eradikation des intestinalen Mikrobioms erfolgte durch die Gabe von Antibiotika (Bacitracin, Neomycin und Streptomycin, jeweils 1 g/l über das Trinkwasser) über einen Zeitraum von 7 Tagen und die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch 7-tägige Kälteexposition der Mäuse bei 6 °C (für weitere Details siehe Abschnitt 3.2.1.3.2). Die Analyse der Nahrungsaufnahme ergab, dass die Gabe von Antibiotika keinen Effekt auf die durch alleinige Aktivierung des BAT detektierten Unterschiede zwischen Mäusen nach 7-tägiger Kälteexposition und entsprechenden Kontrollmäusen, hatte (Abbildung 4-2 c). Auch der Verlauf des Körpergewichts wurde durch die Gabe von Antibiotika weder in der Kontrollgruppe, noch nach Aktivierung des BAT durch Kälte, beeinflusst (Abbildung 4-2 b). In einer murinen Studie von Bäckhed et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass *germ-free* Mäuse, im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren, 42% weniger Körperfettmasse aufwiesen und ebenfalls die Messung des Gewichts des epiWAT ergab signifikant reduzierte Körperfettwerte in den *germ-free* Mäusen. Dabei konnten Bäckhed et al. (2004)

allerdings keinen signifikanten Unterschied im Gesamtkörpergewicht feststellen. Die Daten dieser Arbeit zum prozentualen Gewicht der unterschiedlichen Fettgewebe (Abbildung 4-3) präsentierten einen ähnlichen Trend. So schien die Gabe von Antibiotika in einer tendenziellen Reduktion des prozentualen Gewichts des epiWAT und subWAT zu resultieren. Zu unterstreichen ist hier, dass eine Antibiotikabehandlung nicht, wie es in *germ-free* Mäusen der Fall ist, zu einer absoluten Keimfreiheit des Gastrointestinaltrakts führt. Im nächsten Schritt wurde daher überprüft, ob die Eradikation des intestinalen Mikrobioms mittels Antibiotika erfolgreich war. Dabei wurde zunächst das intestinale Mikrobiom der vier Versuchsgruppen mittels 16S rDNA Sequenzierung untersucht. Die Analyse der sogenannten  $\alpha$ -Diversität ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen. Allerdings war die  $\alpha$ -Diversität in den Tieren nach Antibiotikabehandlung tendenziell größer, als in Mäusen ohne 7-tägige Gabe des Antibiotikacocktails über das Trinkwasser (Abbildung 4-4 a und b). Eine mögliche Erklärung für diesen Trend wäre, dass aufgrund der geringeren Anzahl der einzelnen Vertreter einer Bakterienspezies nach Antibiotikabehandlung, die entstandenen Nischen durch andere Bakterienspezies gefüllt wurden, die durch die Gabe von Antibiotika über einen Selektionsvorteil verfügten. Dies resultierte in einer größeren Bakterienvielfalt, trotz insgesamt reduzierter Bakteriendichte. Dabei lassen die Mikrobiomdaten allein keine sicheren Rückschlüsse auf die genaue Bakteriendichte bzw. den Erfolg der Antibiotikabehandlung zu. Um diesen Erfolg beurteilen zu können ist ebenfalls die Betrachtung der Ergebnisse der BSH-Aktivität bzw. der Gallensäurekomposition in den Fäzes der Mäuse notwendig. Zusammenfassend ist diese Beobachtung somit lediglich als Hinweis auf den Erfolg der Eradikation der intestinalen Mikrobiota durch die Gabe von Antibiotika zu werten.

Die Capscale Bray-Curtis Analyse der Genera aus den Fäzes der unterschiedlichen Versuchsgruppen ergab eine deutliche Trennung zwischen Mäusen, die nahe der Thermoneutralität gehalten wurden und den entsprechenden Mäusen, die zur Aktivierung des braunen Fettgewebes bei 6 °C gehalten wurden (Abbildung 4-4 c). Dies bedeutet, dass sich das intestinale Mikrobiom von Mäusen nach Kälteaktivierung des BAT signifikant von entsprechenden Mäusen ohne Kälteexposition unterscheidet. Eine aktuelle Studie von Chevalier et al. (2015) kam zu vergleichbaren Resultaten. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die Aktivierung des BAT durch Kälte zu charakteristischen Veränderungen in der Komposition der intestinalen Mikrobiota führte. Auch in einer aktuellen Studie von Zietak et al. (2016) führte Kälteexposition in Mäusen zu signifikanten Änderungen der Komposition des intestinalen Mikrobioms. Die Ergebnisse der Analyse des intestinalen Mikrobioms alleinig, ließen, wie bereits erwähnt, keinen Rückschluss auf den Erfolg der Antibiotikagabe zu, sodass im Folgenden die Aktivität des bakteriellen Enzyms BSH bestimmt wurde. Zu diesem Zweck wurde im Zuge dieser Arbeit eine neue Methode zur direkten Quantifi-

zierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms BSH im Caecum entwickelt (Abbildung 4-5 und Abschnitt 3.2.6). Die BSH katalysiert die Dekonjugation von konjugierten Gallensäuren, welches den ersten Schritt der intestinalen Modifikation von Gallensäuren darstellt und somit die weitere Prozessierung der primären Gallensäuren zu sekundären Gallensäuren ermöglicht (Joyce et al. 2014a, Joyce et al. 2014b). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte führte zu einer Verdopplung der Aktivität der BSH (Abbildung 4-6). Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Antibiotika sowohl in den Tieren nach 7-tägiger Aktivierung des BAT durch Kälte, als auch in den entsprechenden Tieren bei Raumtemperatur (28 °C) zu einer drastischen Reduktion der BSH-Aktivität (Abbildung 4-6). Da es sich bei der BSH um ein ausschließlich von Bakterien und Archaeen exprimiertes Enzym handelt (Jones et al. 2008), stützen diese Ergebnisse die Annahme, dass die Eradikation der intestinalen Mikrobiota durch die Gabe von Antibiotika weitestgehend erfolgreich war.

Die BSH katalysiert die Dekonjugation von konjugierten Gallensäuren. Daher wurde im nächsten Schritt die Konzentration von konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren in den Fäzes der Mäuse gemessen. Dabei führte die Antibiotikabehandlung zu einer massiven Reduktion der Exkretion von unkonjugierten Gallensäuren und einem gleichzeitigen Anstieg der Exkretion von konjugierten Gallensäuren (Abbildung 4-7). Diese Resultate bestätigen somit die Ergebnisse der BSH-Aktivitätsmessung, da ohne, oder bei geringer Aktivität der BSH, die Dekonjugation von Gallensäuren nicht mehr möglich ist, sodass in den Fäzes beinahe ausschließlich unkonjugierte Gallensäuren nachweisbar waren.

Um die Bedeutung des intestinalen Mikrobioms für die Aufrechterhaltung der thermogenen Aktivität des BAT genauer zu quantifizieren, erfolgte die Messung thermogener und funktioneller Gene im scBAT und subWAT. Die Expression von *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3* im scBAT blieb durch die Eradikation des intestinalen Mikrobioms unbeeinflusst (Abbildung 4-8 a). Im subWAT blieb die Expression von *Elovl6*, *Pgc1 $\alpha$*  und *Fasn* nahezu durch die Antibiotikabehandlung unbeeinflusst (Abbildung 4-8 b). Die Expression der für die Braunfettaktivierung klassischen Gene *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3* hingegen wurde durch die Eradikation des intestinalen Mikrobioms beeinflusst. Tendenziell führte die Gabe von Antibiotika zu einer erhöhten Expression von *Ucp1*, *Dio2* und *Elovl3*, sowohl in Kontrolltieren nach Antibiotikabehandlung, als auch in Tieren nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte und Antibiotikabehandlung (Abbildung 4-8 b). Dabei handelte es sich allerdings lediglich um einen Trend, da die Ergebnisse nicht signifikant waren. Dieser Trend spiegelte jedoch im weitesten Sinne die Ergebnisse einer Publikation von Suarez-Zamorano et al. (2015) wider. Suarez-Zamorano et al. (2015) konnten zeigen, dass die Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch Antibiotika sowie der Einsatz von sogenannten *germ-free* Mäusen, zu einer erhöhten Expression thermogener Gene im weißen

Fettgewebe und somit zu einem *browning* in den entsprechenden Mäusen führte. Dabei verwendeten Suarez-Zamorano et al. (2015) einen Antibiotikacocktail, der insgesamt aus bis zu 9 verschiedenen Antibiotika bestand (Bacitracin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin, Vancomycin, Metronidazol, Ciprofloxacin, Gentamycin und Ceftazidim) und für 10, 40 und 60 Tage verabreicht wurde. Diese Unterschiede in der Dauer der Antibiotikabehandlung sowie in der Zusammensetzung des Antibiotikacocktails könnte erklären, weshalb die Ergebnisse bezüglich der Genexpression thermogener Gene im subWAT lediglich tendenziell den Ergebnissen von Suarez-Zamorano et al. (2015) entsprachen. Dabei ist zu bedenken, dass einige der von Suarez-Zamorano et al. (2015) verwendeten Antibiotika intestinal resorbierbar und somit ebenfalls systemisch wirksam sind, was zu Nebenwirkungen und Beeinflussungen der Untersuchungsergebnisse führen könnte. Somit wäre wohl der zusätzliche Einsatz von *germ-free* Mäusen für zukünftige Experimente, zum Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die thermogene Aktivität des BAT, am sinnvollsten. Derzeit ist dies aber aufgrund der fehlenden entsprechenden Einrichtungen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf noch nicht möglich. Mechanistisch führten Suarez-Zamorano et al. (2015) die Ergebnisse ihrer Studie auf eine vermehrte Infiltration eosinophiler Granulozyten sowie eine vermehrte Polarisation bzw. Expression von M2-Makrophagen und Typ-2-Zytokinen im weißen Fettgewebe der mit Antibiotika behandelten Mäuse zurück. Laut Suarez-Zamorano et al. (2015) war bereits bekannt, dass eosinophile Granulozyten und Typ-2-Zytokine über die Aktivierung von M2-Makrophagen zu einem erhöhten Browning im weißen Fettgewebe führen (Ganeshan und Chawla 2014, Lee et al. 2015, Martinez et al. 2009, Qiu et al. 2014).

In einer Studie von Caesar et al. (2015) konnte zudem gezeigt werden, dass Veränderungen des intestinalen Mikrobioms zu einer veränderten Entzündungssignalkaskade im weißen Fettgewebe führen. Die Veränderungen des intestinalen Mikrobioms waren dabei im Wesentlichen durch die Diät vermittelt. In Mäusen, welche eine Diät basierend auf tierischen, gesättigten Fetten erhielten, kam es zu einer erhöhten Aktivität von Toll-like Rezeptoren (TLR) und einer verminderten Insulinsensitivität, im Vergleich zu Tieren, welche eine Diät basierend auf Fischöl und somit ungesättigten Fettsäuren erhielten. Dabei kam es im weißen Fettgewebe der Tiere, welche eine Diät reich an gesättigten Fettsäuren erhielten, zu einer erhöhten Expression des Chemokins *CC-chemokine ligand 2 (Ccl2)*. Laut Caesar et al. (2015) konnten verschiedene Studien zeigen, dass Übergewicht zu einer durch Ccl2 vermittelten, vermehrten Akkumulation von Makrophagen im weißen Fettgewebe führt, was wiederum mit einer erhöhten Insulinresistenz assoziiert war (Kamei et al. 2006, Kanda et al. 2006, Weisberg et al. 2003). In dieser Arbeit wurde daher ebenfalls die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine im weißen bzw. beigen Fettgewebe der unterschiedlichen Versuchsgruppen bestimmt. Dabei sollte sowohl der Ein-

fluss des intestinalen Mikrobioms, als auch der Einfluss des durch Kälte aktivierten *browning*s auf die Expression der entsprechenden Zytokine untersucht werden. Die Expression der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine *Ccl2*, *chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10)*, *tumor necrosis factor (Tnf)*, Interleukin  $1\beta$  (*Il1\beta*) und Interleukin 6 (*Il6*) wurde weder durch die Gabe von Antibiotika, noch durch 7-tägige Aktivierung des BAT durch Kälte signifikant verändert (Abbildung 4-9). Dabei waren die Anzahl der mRNA Kopien pro  $10^4$  Kopien *Tbp* insgesamt eher niedrig, was darauf schließen lässt, dass es in den Mäusen nach Fütterung einer WTD für nur 13 Tage nicht zu einer entzündlichen Reaktion des weißen bzw. beigen Fettgewebes kam. Einzig die Expression des murinen Makrophagenmarkers *Emr1* (Austyn und Gordon 1981) wurde durch die Aktivierung des braunen Fettgewebes signifikant beeinflusst (Abbildung 4-9). So führte die Aktivierung des BAT, unabhängig von der Antibiotikabehandlung zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *Emr1*. Somit konnten diese Ergebnisse die von Caesar et al. (2015) erhaltenen Erkenntnisse bezüglich der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in beigen bzw. weißen Adipozyten nicht stützen. Dies mag aber vor allem darin begründet sein, dass in der Studie von Caesar et al. (2015) zum einen die Fütterungsperiode über insgesamt elf Wochen durchgeführt wurde und zusätzlich eine andere Diät verwendet wurde bzw. im Zuge dieser Arbeit beide Versuchsgruppen die gleiche Diät erhielten und daher eine adäquate Vergleichsgruppe fehlte. Dies könnte somit höchstwahrscheinlich für die Unterschiede und daher die signifikanten Veränderungen der Entzündungsmarker im weißen Fettgewebe in der Studie von Caesar et al. (Caesar et al. 2015) verantwortlich gewesen sein. Dennoch ließen sich, im Rahmen dieser Arbeit, bereits nach 13 Tagen Fütterung einer WTD signifikante Unterschiede in der Expression von *Emr1* durch die Aktivierung des BAT mittels Kälteexposition nachweisen. Dies verdeutlicht möglicherweise die entscheidende Rolle von Makrophagen in der frühen Phase der Entzündungsreaktion des weißen Fettgewebes.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit, dass das intestinale Mikrobiom für die Aufrechterhaltung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes durch Kälte nicht entscheidend ist. Allerdings ergaben die Ergebnisse der Messung der Genexpression unterschiedlicher Marker der Braunfettaktivierung einen deutlichen Trend, der wohlmöglich auf einen positiven Effekt der Eradikation des intestinalen Mikrobioms für die Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte hindeutet. Dabei sind weitere Studien zu diesem Thema nötig, welche vor allem die Effekte einer Antibiotikagabe über einen längeren Zeitraum auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes untersuchen sollten. Der kurze Versuchszeitraum wurde im Zuge dieser Arbeit dennoch bewusst gewählt, um vor allem die kurzfristigen Effekte zu beurteilen und zudem den Effekt des Körpergewichts auf die Ergebnisse so gering wie möglich zu halten.

## 5.2 Intestinaler Mikrobiom-Transfer als möglicher Übertragungsweg der thermogenen Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes durch die Transplantation von Fäzes auf andere Mäuse übertragen lässt. Dafür wurden C57BL/6J-Mäuse zunächst über einen Zeitraum von 7 Tagen mit insgesamt drei verschiedenen Antibiotika behandelt. Die Gabe von Ampicillin (1 g/l), Neomycin (1 g/l) und Metronidazol (1 g/l) erfolgte dabei *ad libitum* über das Trinkwasser. Anschließend folgte die Transplantation von Fäzes aus C57BL/6J-Mäusen nach Aktivierung des BAT über einen Zeitraum von 7 Tagen durch Kälte (6 °C) und aus entsprechenden Kontrolltieren, die bei 28 °C gehalten wurden (für weitere Details siehe Abschnitt 3.2.1.3.3). Zunächst erfolgte die Analyse des Körpergewichts sowie der Nahrungsaufnahme, wobei alle Tiere, also sowohl Donor, als auch Empfänger eine WTD erhielten (Abbildung 4-10). Dabei zeigte sowohl die Messung der Nahrungsaufnahme, als auch des Körpergewichts keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, welche Fäzes aus Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des BAT erhielten und den Tieren, die Fäzes aus entsprechenden Kontrollen erhielten. Im Vergleich dieser Ergebnisse mit den Resultaten der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts aus dem ersten Teil dieser Arbeit (Abbildung 4-2), wird deutlich, dass es im Falle einer erfolgreichen Übertragung der positiven metabolischen Effekte des durch Kälte aktivierten BAT zu einer deutlichen Zunahme in der Nahrungsaufnahme und einer zumindest tendenziellen Reduktion des Körpergewichts gekommen wäre. Als nächstes folgte die Bestimmung der Lipidkonzentrationen sowie des Lipoproteinprofils im Plasma. Die Lipidkonzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden im Plasma ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 4-11 a und c). Die Lipoproteinprofile hingegen zeigten Unterschiede zwischen Empfängern, welche Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT für 7 Tage durch Kälte erhielten und jenen, die Fäzes aus entsprechenden Kontrollen erhielten. So kam es in den Mäusen, welche Fäzes aus Kontrolltieren erhielten, zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen von TRL, HDL und LDL (Abbildung b und d). Bartelt et al. (2011) konnten jedoch zeigen, dass die Aktivierung des BAT zu einer Senkung der TRL-Konzentration im Plasma führt. Somit sprechen auch die Resultate der Lipidkonzentration und des Lipoproteinprofils im Plasma gegen eine erfolgreiche Übertragung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes durch Mikrobiom-Transfer.

Vorarbeiten von Clara John (2015) konnten zeigen, dass die Aktivierung des BAT durch Kälte zu einem Anstieg der Synthese von Gallensäuren in der Leber und ebenfalls zu einer erhöhten Ausscheidung der Gallensäuren über die Fäzes führte. Daher wurden, im Rahmen dieser Arbeit, ebenfalls die Konzentrationen der unterschiedlichen Gallensäurespezies in den Fäzes der Tiere nach Fäzes-Transfer untersucht. Die Messung erfolgte

mittels der HPLC-ESI-QqQ-MS-Methode von John und Werner et al. (2014). Die Ausscheidung von konjugierten Gallensäuren war in beiden Versuchsgruppen äußerst gering. Lediglich die konjugierte Gallensäure T $\alpha$ / $\beta$ -MCA war eindeutig nachweisbar (Abbildung 4-12 a). Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass Mäuse hauptsächlich Taurin-konjugierte und nahezu keine Glycin-konjugierten Gallensäuren synthetisieren (Dawson und Karpen 2015, Thomas et al. 2008). Zum anderen existieren für die Resorption von konjugierten Gallensäuren effektive aktive Transporter im Bereich des distalen Ileums, wie beispielsweise der ASBT, wohingegen unkonjugierte Gallensäuren hauptsächlich passiv entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts rückresorbiert werden (Hofmann 2009). Somit entspricht das in Abbildung 4-12 a und b dargestellte fäkale Gallensäureprofil am ehesten den physiologischen Bedingungen. Eine Übertragung der thermogenen Aktivität des BAT durch die Transplantation des intestinalen Mikrobioms hätte zu einer insgesamt deutlich erhöhten Ausscheidung und insbesondere zu einer massiven Steigerung der Exkretion von konjugierten Gallensäuren geführt (siehe zum Vergleich Abbildung 4-7). Zum einen könnte der Fäzes-Transfer nicht effizient gewesen sein, beispielsweise durch die geringe Transplantationsfrequenz, bzw. durch einen zu kurzen Transplantationszeitraum. Zum anderen könnten die Änderungen im Gallensäuremetabolismus nach Aktivierung des BAT durch Kälte unabhängig vom intestinalen Mikrobiom stattfinden. Dafür spricht die Tatsache, dass es nach Aktivierung des BAT durch Kälte auch zu einer erhöhten Aktivität der BSH kommt (Abbildung 4-6). Da es also trotz erhöhter BSH-Aktivität der intestinalen Mikrobiota zu einer massiven Ausscheidung von hauptsächlich konjugierten Gallensäuren kam, liegt nahe, dass dieser Effekt weitestgehend unabhängig vom intestinalen Mikrobiom war. Somit lässt sich anhand der Daten zur Gallensäurekomposition in den Fäzes nicht eindeutig beurteilen, ob der Fäzes-Transfer zu einer Übertragung der thermogenen Aktivität des BAT führte.

Zusätzlich wurde die durchschnittliche Länge des Dünndarms und Kolons der Empfänger-Mäuse nach Fäzes-Transplantation gemessen. So konnten beispielsweise Chevalier et al. (2015) zeigen, dass es nach Transplantation von Fäzes aus Donor-Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte, in entsprechende Empfänger-Mäuse, zu einer signifikanten Zunahme der Dünndarmlänge kam. Diesen Effekt führten sie auf eine Vergrößerung der Resorptionsfläche zur effektiveren Energieaufnahme, aufgrund eines erhöhten Energiebedarfs nach Aktivierung des BAT, zurück. Die Ergebnisse der Messung der Dünndarm- und Kolonlänge ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Empfängern, die Fäzes aus Mäusen nach BAT-Aktivierung erhalten hatten und solchen, die Fäzes aus vergleichbaren Kontrollen erhalten hatten (Abbildung 4-12 c). Dabei verwendeten Chevalier et al. (2015) zur Fäzes-Transplantation zum einen Donor-Mäuse, die über einen deutlich längeren Zeitraum von insgesamt 30 Tagen Exposition zur Kälte hatten und zum anderen er-

folgte die Transplantation in *germ-free* Mäuse ohne vorherige Gabe von Antibiotika. Zusätzlich zur oralen Gavage nutzten Chevalier et al. (2016) die Methode des sogenannten *co-housing*, die die Tatsache ausnutzt, dass Mäuse Autokoprophen sind und somit sowohl ihren eigenen, als auch die Fäzes ihrer Artgenossen fressen (Ridaura et al. 2013). Dieses Verfahren ist dabei im Vergleich zur oralen Gavage von *Caecum*-Inhalt sicherlich deutlich schonender für die Tiere. Chevalier et al. (2015) nahmen an, dass die beobachteten Effekte eher Langzeiteffekte der Aktivierung des BAT durch Kälte darstellen und hauptsächlich nach anhaltender Kältestimulation den Energiebedarf decken sollen, um einen übermäßigen Gewichtsverlust zu verhindern. Dabei zeigten sich in der Studie von Chevalier et al. (2015) die ersten signifikanten Unterschiede bereits nach 9-tägiger Kälteexposition. Für diese Arbeit wurden die Tiere allerdings lediglich über einen Zeitraum von insgesamt 7 Tagen bei 6 °C gehalten. Zusätzlich erfolgte die Transplantation der Fäzes in konventionelle C57BL/6J-Mäuse nach Gabe eines Antibiotikacocktails über einen Zeitraum von 7 Tagen. Dies würde erklären, warum keine signifikanten Unterschiede in der Dünndarm- und Kolonlänge nachweisbar waren.

Es folgte die Messung thermogener und funktioneller Gene im braunen und beigen Fettgewebe von Empfänger-Mäusen. Dies diente dem eindeutigen Nachweis einer möglichen Übertragung der thermogenen Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes durch einen Fäzes-Transfer. Chevalier et al. (2015) konnten ebenfalls zeigen, dass Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT zu einer gesteigerten Kältetoleranz führte, welche von einer signifikant erhöhten *Ucp1* Expression hauptsächlich im weißen, aber auch im braunen Fettgewebe begleitet war. Somit führte der Fäzes-Transfer zu einem *browning* von weißem Fettgewebe in den Empfänger-Mäusen. In einer Studie von Zietak et al. (2016) kam es nach Transfer von Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der *Ucp1* Expression im BAT. Zusätzlich war ebenfalls die Expression von *Dio2* signifikant gesteigert. Allerdings konnten Zietak et al. (2016) keine signifikanten Unterschiede in der Expression von thermogenen und funktionellen Genen im weißen Fettgewebe nach Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte nachweisen. Das Expressionsmuster thermogener und funktioneller Gene der Braunfettaktivierung dieser Arbeit zeigte hingegen weder signifikante Unterschiede im weißen, noch im braunen Fettgewebe nach Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach 7-tägiger Kälteexposition (Abbildung 4-13 a und b). Dies zeigt, dass sich die thermogene Aktivität des durch Kälteexposition aktivierten BAT, mittels des für diese Arbeit gewählten experimentellen Designs nicht über einen Fäzes-Transfer übertragen ließ. Dabei setzten Zietak et al. (2016), ebenso wie Chevalier et al. (2015) für ihre Versuche *germ-free* Mäuse als Empfänger ein. Für diese Arbeit wurden, aufgrund fehlender, entsprechender Einrichtungen zur Haltung von *germ-free* Mäu-

sen, WT-Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J verwendet, welche zur Eradikation des residenten intestinalen Mikrobioms für 7 Tage mit Antibiotika behandelt wurden. Die Verwendung von Antibiotika führen zwar zu einer deutlichen Reduktion der residenten intestinalen Mikrobiota können aber nicht zu einer absoluten Keimfreiheit des Gastrointestinaltrakts führen, wie dies bei der Verwendung von *germ-free* Mäusen der Fall ist. Zusätzlich hat der Einsatz von Antibiotika auch potenzielle Nebenwirkungen. Abbildung 4-10 b zeigt, dass es durch die Antibiotikabehandlung der Mäuse zu einer Gewichtsabnahme kam, die erst nach Absetzen und mit Beginn der Fäzes-Transplantation reversibel war. Es ist somit davon auszugehen, dass die Antibiotikabehandlung zu einer Malassimilation bzw. Malabsorption geführt hat, die möglicherweise mit einer Schädigung des Darmepithels einherging. Dementsprechend könnte zum einen die Umstellung der Antibiotika, beispielsweise ein Ersatz durch den in der Literatur etablierten BNS-Cocktail (Jiang et al. 2015), und zum anderen die Verlängerung der Fäzes-Transplantation, zu signifikanten Ergebnissen im Sinne von Zietak et al. (2016) und Chevalier et al. (2015) führen.

Das braune Fettgewebe ist nicht nur in der Lage TRL bzw. freie Fettsäuren zu verstoffwechseln (Bartelt et al. 2011), sondern nutzt ebenfalls Glukose als Energiequelle, was zu einer erhöhten Insulinsensitivität, als Folge der erniedrigten postprandialen Blutglukosekonzentrationen, führt (Stanford et al. 2013). Daher wurde im Zuge dieser Arbeit ebenfalls ein oGTT mit den unterschiedlichen Empfänger-Mäusen durchgeführt (Abbildung 4-14 a). Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Empfängern, welche Fäzes aus Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des BAT durch Kälte und jenen, die Fäzes aus entsprechenden Kontrollen erhielten. Ein oGTT spiegelt jedoch lediglich die postprandialen Plasmakonzentrationen nach oraler Glukoseaufnahme wider, sodass dieser Test mit der Analyse der relativen Organaufnahme von radioaktiv markierter Glukose bzw. radioaktiv markierten Lipiden in die Gewebe der Tiere kombiniert wurde. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant höhere Aufnahme von  $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose in das scBAT von Empfänger-Mäusen, welche Fäzes aus Donor-Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte erhielten, im Verhältnis zu Empfängern, die Fäzes aus Kontrollen erhielten (Abbildung 4-14 c). Die relative Organaufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Triolein war im epiWAT von Empfängern, welche Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte erhielten, signifikant erniedrigt (Abbildung 4-14 b). Im scBAT kam es lediglich zu einer tendenziell erhöhten Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -Triolein in Empfängern von Fäzes aus Donor-Mäusen nach 7-tägiger BAT-Aktivierung durch Kälte (Abbildung 4-14 b). Die Ergebnisse der relativen Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose ( $^3\text{H}$ -2-Deoxy-D-glucose) und radioaktiv markierten Lipiden ( $^{14}\text{C}$ -Triolein) zeigten ebenfalls eine tendenziell niedrigere Anreicherung im Ileum der Empfänger von Fäzes aus Donor-Mäusen nach kältevermittelter BAT Aktivierung (Abbildung 4-14 b und c). Diese Ergebnisse weisen auf einen schnelleren systemi-

schen Metabolismus bzw. eine schnellere intestinale Assimilation und Absorption von Glukose und Lipiden in Empfängern, welche Fäzes aus Mäusen nach Kälteaktivierung des BAT erhielten, hin. Dies wiederum wäre am ehesten mit einer Aktivierung des BAT nach Fäzes-Transfer vereinbar, da durch Kälte aktiviertes BAT im Zuge der zitterfreien Thermogenese vermehrt Lipide, in Form von freien Fettsäuren (Bartelt et al. 2011), und Glukose (Cawthorne 1989, Stanford et al. 2013) verstoffwechselt und auf diese Weise den Energiebedarf des Organismus steigert. Sowohl Chevalier et al. (2015), als auch Zietak et al. (2016) führten im Rahmen ihrer Studien ebenfalls oGTTs nach Fäzes-Transplantation durch, kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen. In der Studie von Chevalier et al. (2015) kam es 15 Minuten nach oraler Gavage von Glukose zu einem signifikant höheren Anstieg der Glukosekonzentration im Plasma, von Tieren nach Transplantation von Fäzes aus Tieren nach Aktivierung des BAT durch Kälte. Dies erklärten die Autoren durch die größere intestinale Resorptionsfläche des Darms nach Langzeit-Aktivierung des BAT durch Kälte, die sich ebenfalls durch den Fäzes-Transfer transplantieren ließ. Dabei konnten die Autoren zeigen, dass die Transplantation von Fäzes, wie es nach Braunfettaktivierung zu erwarten wäre, zu einer erhöhten Insulinsensitivität in den Empfänger-Mäusen kam (Chevalier et al. 2015). Zusätzlich untersuchten Chevalier et al. (2015) die periphere Organaufnahme von radiomarkierter Glukose. Dabei kam es nach Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte zu einer signifikant höheren Aufnahme von Glukose in das inguinale, subkutane WAT der Empfänger. Zietak et al. (2016) hingegen führten alleinig einen oGTT durch. Dieser ergab signifikant niedrigere Glukosekonzentrationen im Plasma der Empfänger, welche Fäzes aus Mäusen nach Aktivierung des BAT durch Kälte, rund 60 und 90 Minuten nach oraler Glukosegavage erhalten hatten. Es kam somit zu keiner initial erhöhten Plasmakonzentration von Glukose nach oraler Gavage, wie es in der Studie von Chevalier et al. (2015) der Fall war. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien lassen sich am ehesten durch die unterschiedlichen Temperaturen zur Aktivierung des braunen Fettgewebes erklären. Chevalier et al. (2015) hielten ihre Donor-Mäuse für bis zu 30 Tage bei 6 °C, wohingegen Zietak et al. (2016) ihre entsprechenden Donor-Mäuse für 6 Wochen bei nur 12 °C hielten. Zusammenfassend ließ sich, durch das für die Fäzes-Transplantation gewählte Studiendesign, nicht eindeutig nachweisen, dass ein intestinaler Mikrobiom-Transfer als möglicher Übertragungsweg der thermogenen Aktivität des braunen und beigen Fettgewebes fungiert. Somit lassen sich auch die von Zietak et al. (2016) und Chevalier et al. (2015) gefundenen Ergebnisse zum Mikrobiom-Transfer, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht waren, nicht stützen. Dennoch dienen die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und Erkenntnisse als Grundlage für weitere Projekte, die die vielfältigen Interaktionen zwischen dem intestinalen Mikrobiom und dem braunen Fettgewebe unter-

suchen sollen. Unter anderem wäre, wie bereits erwähnt, eine Wiederholung der Experimente unter der Verwendung von *germ-free* Mäusen denkbar und damit verbunden ebenfalls die Anwendung des *co-housing* als schonendere Möglichkeit für den Prozess der Fäzes-Transplantation. Ebenfalls denkbar wäre es, die Auswirkungen einer Aktivierung des BAT mittels des  $\beta$ 3-adrenerge Rezeptoragonisten CL316,243 auf das intestinale Mikrobiom zu untersuchen und gegebenenfalls eine Fäzes-Transplantation dieses Mikrobioms durchzuführen. Dies würde die vielfältigen und weitestgehend BAT-unabhängigen Effekte der Kälteexposition aus den Ergebnissen ausschließen und somit eine noch genauere Zuordnung der Ergebnisse zu der Aktivierung des braunen Fettgewebes erlauben.

## 6 Zusammenfassung

Über die letzten Jahrzehnte wird ein anhaltender Anstieg von Übergewicht und Fettleibigkeit in der Bevölkerung beobachtet. Dies führt zwangsläufig auch zu einem drastischen Anstieg der Prävalenz von mit Fettleibigkeit assoziierten metabolischen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ 2, arterieller Hypertonie und Dyslipidämie. Diese Erkrankungen werden, wenn sie gemeinsam mit einer abdominellen Fettleibigkeit auftreten unter dem Begriff Metabolisches Syndrom zusammengefasst. Ursächlich für diese Entwicklung ist dabei neben genetischen Faktoren im Wesentlichen das allgegenwärtige, hochkalorische Nahrungsangebot gepaart mit einem ausgeprägten Bewegungsmangel, was letztlich in einer positiven Kalorienbilanz und einer ektopen Speicherung der überflüssigen Energie in Form von Fett resultiert. Dies macht deutlich, dass zukünftig neue Strategien im Kampf gegen Übergewicht und dem damit assoziierten Metabolischen Syndrom benötigt werden. Das braune Fettgewebe steht aktuell besonders im Fokus dieser Suche nach neuen Behandlungsstrategien. Braunes Fettgewebe ist in der Lage Energie in Form von Lipiden direkt zur Produktion von Wärme zu nutzen und dadurch den Energieverbrauch des Organismus zu steigern; ein Prozess der als zitterfreie Thermogenese bezeichnet wird. Zahlreiche Studien konnten zudem zeigen, dass das intestinale Mikrobiom in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Übergewicht und dem metabolischen Syndrom eine wichtige Rolle spielen könnte.

In dieser Arbeit sollten daher im Tierversuch mit C57BL/6J-Mäusen mögliche Interaktionen zwischen dem braunen Fettgewebe und dem intestinalen Mikrobiom untersucht werden. Im ersten Teil ging es um die Auswirkungen der Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch Antibiotika auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes. Die Analyse des intestinalen Mikrobioms, der Gallensäuren und der BSH-Aktivität in den Fäzes zeigten, dass die Aktivierung des braunen Fettgewebes zu Veränderungen im intestinalen Mikrobiom führte und dass die Eradikation des intestinalen Mikrobioms durch Antibiotika erfolgreich war. Die Ergebnisse zur BSH-Aktivität konnten vor kurzem publiziert werden (Worthmann et al. 2017). Mittels Messung des Körpergewichts, der Nahrungsaufnahme und der Genexpression konnten keine signifikanten Effekte auf die thermogene Aktivität des braunen Fettgewebes nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil sollte die Möglichkeit einer Übertragung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes durch Fäzes-Transplantation untersucht werden. Es gelang dabei, trotz erfolgreicher Ergebnisse anderer Studien, kein eindeutiger Nachweis, dass die Übertragung der thermogenen Aktivität des braunen Fettgewebes bzw. der daraus resultierenden positiven Effekte auf den Metabolismus, mittels Transfer des intestinalen Mikrobioms erfolgreich war. Dennoch dienen die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse als

Grundlage für weitere Studien, die sich mit den vielfältigen Interaktionen zwischen dem braunem Fettgewebe und dem intestinalen Mikrobiom beschäftigen.

## **7 Summary**

Over the last decades the prevalence of obesity and its comorbidities such as type 2 diabetes, hypertension and dyslipidemia has been rising. Next to genetic factors, the surplus of high-caloric food and our sedentary lifestyle fuel this alarming development. To counteract this global health burden new therapeutic strategies are required. A promising target is the brown adipose tissue as it is capable of combusting high amounts of energy in order to generate heat. An additionally attractive target is the gut microbiome as several studies have shown its impact on the development of obesity and insulin resistance.

Aim of this study was to investigate the interactions of brown adipose tissue and the gut microbiome. The first part of this work focused on the influence of the eradication of the intestinal microbiome using antibiotics on the thermogenic activity of the brown adipose tissue. The analysis of the intestinal microbiome, the bile acids and the BSH-activity in feces, indicated that the activation of brown adipose tissue led to changes in the intestinal microbiome and that the eradication of the intestinal microbiota using antibiotics was successful. The results of the BSH-activity have recently been published (Worthmann et al. 2017). In contrast by measurement of bodyweight, food intake and gene expression there were no implications on the thermogenic activity of the brown adipose tissue.

Aim of the second part was to investigate the possibility to transfer the thermogenic activity of the brown adipose tissue via feces transplantation. Despite positive results from other studies, upon transplantation no alterations were observed concerning bodyweight, glucose and lipid handling. Nevertheless, the gained insights serve as basis for further studies regarding the complex interactions between the brown adipose tissue and the intestinal microbiome.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind die für diese Arbeit verwendeten Abkürzungen und Akronyme aufgeführt.

<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F-Fluordesoxyglukose
AB	Antibiotika
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATF-2	<i>Activating transcription factors 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAs	<i>Bile acids</i> ; Gallensäuren
BAT	<i>Brown adipose tissue</i> ; braunes Fettgewebe
BMI	<i>Body mass index</i>
BSH	<i>Bile salt hydrolase</i>
cAMP	cyclisches Adenosintriphosphat
CBA	<i>Conjugated bile acid</i> ; konjugierte Gallensäuren
CBA	<i>Conjugated bile acids</i> ; konjugierte Gallensäuren
Ccl2	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
Cdo1	<i>Cysteine dioxygenase 1</i>
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CT	Computertomographie
Cxcl10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CYP27A1	Sterol 27-hydroxylase
CYP7A1	Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase
DIO	<i>Diet-induced obesity</i>
Dio2	<i>Type 2 iodothyronine deiodinase</i>
dpm	<i>disintegrations per minute</i>
Elovl3	<i>Elongation of very long chain fatty acids 3</i> ; <i>Fettsäureelongase 3</i>
Elovl5	<i>Elongation of very long chain fatty acids 5</i> ; <i>Fettsäureelongase 5</i>
Emr1	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
epiWAT	<i>Epididymal white adipose tissue</i> ; epididymales weißes Fettgewebe
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
et al.	<i>et alii</i>
Fasn	<i>Fatty acid synthase</i> ; Fettsäuresynthase
Fndc5	<i>Fibronectin type III domain-containing protein 5</i>

FPLC	<i>Fast-protein liquid chromatography</i>
GPR41	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 41
GPR43	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 43
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HSL	Hormonsensitive Lipase
iBAT	<i>Interscapular brown adipose tissue</i> ; interskapuläres braunes Fettgewebe
Il1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
Il6	Interleukin 6
IS1	Interner Standard 1
IS2	Interner Standard 2
kcal	Kilokalorien
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
MS	Massenspektrometrie
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>Myogenic factor 3</i>
oGTT	Oraler Glukosetoleranz-Test
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pgc1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PKA	Proteinkinase A
PRDM16	<i>PR domain containing 16</i>
QqQ	Tripel-Quadropol
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
scBAT	<i>Subcutaneous brown adipose tissue</i> ; subkutan braunes Fettgewebe
SCFA	<i>Short-chain fatty acids</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
subWAT	<i>Subcutaneous white adipose tissue</i> ; subkutan weißes Fettgewebe
Tbp	<i>TATA-box binding protein</i>
TCA	<i>Taurocholiacid</i> ; Taurocholsäure
Tnf	<i>Tumor necrosis factor</i>

TRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
T $\beta$ MCA	Tauro- $\beta$ -muricholsäure
UBA	<i>Unconjugated bile acids</i> ; unkonjugierte Gallensäuren
Ucp1	<i>Uncoupling protein-1</i>
UDCA	<i>Ursodesoxycholic acid</i> ; Ursodesoxycholsäure
WAT	<i>White adipose tissue</i> , weißes Fettgewebe
WT	Wildtyp
WTD	<i>Western type-diet</i>
$\beta$ MCA	<i><math>\beta</math>-muricholic acid</i> ; $\beta$ -Muricholsäure

## 9 Literaturverzeichnis

- Austyn, J. M. und Gordon, S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11(10), 805-815.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F. und Gordon, J. I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15718-15723.
- Barrington, S. F. und Maisey, M. N. (1996) Skeletal muscle uptake of fluorine-18-FDG: effect of oral diazepam. *J Nucl Med*, 37(7), 1127-1129.
- Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmuller, A., Gordts, P. L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M. und Heeren, J. (2011) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, 17(2), 200-205.
- Bartelt, A. und Heeren, J. (2012) The holy grail of metabolic disease: brown adipose tissue. *Curr Opin Lipidol*, 23(3), 190-195.
- Bartelt, A. und Heeren, J. (2014) Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10(1), 24-36.
- Bartelt, A., Merkel, M. und Heeren, J. (2012) A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *J Mol Med (Berl)*, 90(8), 887-893.
- Begley, M., Gahan, C. G. und Hill, C. (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*, 29(4), 625-651.
- Berbee, J. F., Boon, M. R., Khedoe, P. P., Bartelt, A., Schlein, C., Worthmann, A., Kooijman, S., Hoeke, G., Mol, I. M., John, C., Jung, C., Vazirpanah, N., Brouwers, L. P., Gordts, P. L., Esko, J. D., Hiemstra, P. S., Havekes, L. M., Scheja, L., Heeren, J. und Rensen, P. C. (2015) Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun*, 6, 6356.
- Betz, M. J. und Enerbäck, S. (2011) Therapeutic prospects of metabolically active brown adipose tissue in humans. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 86.
- Bianco, A. C. und Silva, J. E. (1987) Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest*, 79(1), 295-300.
- Bordicchia, M., Liu, D., Amri, E. Z., Ailhaud, G., Dessi-Fulgheri, P., Zhang, C., Takahashi, N., Sarzani, R. und Collins, S. (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*, 122(3), 1022-1036.
- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Bostrom, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Hojlund, K., Gygi, S. P. und Spiegelman, B. M. (2012) A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463-468.

- Bouillaud, F., Alves-Guerra, M. C. und Ricquier, D. (2016) UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 10.1016/j.bbamcr.2016.04.013.
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, S. M., Wise, A. und Dowell, S. J. (2003) The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*, 278(13), 11312-11319.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D. und Bäckhed, F. (2015) Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab*, 22(4), 658-668.
- Cannon, B. und Nedergaard, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84(1), 277-359.
- Cao, W., Daniel, K. W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A. V., Bai, X., Floering, L. M., Spiegelman, B. M. und Collins, S. (2004) p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*, 24(7), 3057-3067.
- Carmody, R. N., Gerber, G. K., Luevano, J. M., Jr., Gatti, D. M., Somes, L., Svenson, K. L. und Turnbaugh, P. J. (2015) Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 17(1), 72-84.
- Cassard-Doulcier, A. M., Larose, M., Matamala, J. C., Champigny, O., Bouillaud, F. und Ricquier, D. (1994) In vitro interactions between nuclear proteins and uncoupling protein gene promoter reveal several putative transactivating factors including Ets1, retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and a CACCC box-binding protein. *J Biol Chem*, 269(39), 24335-24342.
- Cawthorne, M. A. (1989) Does brown adipose tissue have a role to play in glucose homeostasis? *Proc Nutr Soc*, 48(2), 207-214.
- Chevalier, C., Stojanovic, O., Colin, D. J., Suarez-Zamorano, N., Tarallo, V., Veyrat-Durebex, C., Rigo, D., Fabbiano, S., Stevanovic, A., Hagemann, S., Montet, X., Seimbille, Y., Zamboni, N., Hapfelmeier, S. und Trajkovski, M. (2015) Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell*, 163(6), 1360-1374.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- Collaboration, N. C. D. R. F. (2016) Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, 387(10026), 1377-1396.
- Cooke, A. A., Connaughton, R. M., Lyons, C. L., McMorrow, A. M. und Roche, H. M. (2016) Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol*, 785, 207-214.

- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L. und Casteilla, L. (1992) Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*, 103 ( Pt 4), 931-942.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M. und Kahn, C. R. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360(15), 1509-1517.
- Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A. und Kolodny, G. M. (2015) Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab*, 21(1), 33-38.
- Dairi, T. (2012) Menaquinone biosyntheses in microorganisms. *Methods Enzymol*, 515, 107-122.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. und Turnbaugh, P. J. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563.
- Dawson, P. A. und Karpen, S. J. (2015) Intestinal transport and metabolism of bile acids. *J Lipid Res*, 56(6), 1085-1099.
- Dawson, P. A., Lan, T. und Rao, A. (2009) Bile acid transporters. *J Lipid Res*, 50(12), 2340-2357.
- de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J. und Edwards, P. A. (2013) Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab*, 17(5), 657-669.
- de Jesus, L. A., Carvalho, S. D., Ribeiro, M. O., Schneider, M., Kim, S. W., Harney, J. W., Larsen, P. R. und Bianco, A. C. (2001) The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*, 108(9), 1379-1385.
- de Munter, J. S., Hu, F. B., Spiegelman, D., Franz, M. und van Dam, R. M. (2007) Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. *PLoS Med*, 4(8), e261.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M. und Zimmet, P. Z. (2005) The metabolic syndrome. *Lancet*, 365(9468), 1415-1428.
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Moos, M. C., Jr. und Londos, C. (1992) Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(18), 8537-8541.
- Engel, H., Steinert, H., Buck, A., Berthold, T., Huch Boni, R. A. und von Schulthess, G. K. (1996) Whole-body PET: physiological and artifactual fluorodeoxyglucose accumulations. *J Nucl Med*, 37(3), 441-446.
- Ganeshan, K. und Chawla, A. (2014) Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 32, 609-634.

- Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R. E., Martin, R. J., Lefevre, M., Cefalu, W. T. und Ye, J. (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58(7), 1509-1517.
- Ghorbani, M., Claus, T. H. und Himms-Hagen, J. (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. und Himms-Hagen, J. (1997) Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21(6), 465-475.
- Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M. und Kliewer, S. A. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*, 6(3), 517-526.
- Grundey, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Jr., Cleeman, J. I., Kahn, R. A., American Heart, A., National Heart, L., Blood, I. und American Diabetes, A. (2004) Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(2), e19-24.
- Han, T. S. und Lean, M. E. (2016) A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis*, 5, 2048004016633371.
- Handschin, C. und Spiegelman, B. M. (2008) The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454(7203), 463-469.
- Harms, M. und Seale, P. (2013) Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*, 19(10), 1252-1263.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. und Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6(10), 986-994.
- Hill, M. J. (1990) Bile flow and colon cancer. *Mutat Res*, 238(3), 313-320.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G. und Cinti, S. (2000) Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *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. und Eckmann, L. (2006) How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(12), 4333-4334.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. und Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7276-7280.
- Holm, C., Kirchgessner, T. G., Svenson, K. L., Fredrikson, G., Nilsson, S., Miller, C. G., Shively, J. E., Heinzmann, C., Sparkes, R. S., Mohandas, T. und et al. (1988)

- Hormone-sensitive lipase: sequence, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science*, 241(4872), 1503-1506.
- Human Microbiome Project, C. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Imajo, K., Yoneda, M., Ogawa, Y., Wada, K. und Nakajima, A. (2014) Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Immunopathol*, 36(1), 115-132.
- InterAct, C. (2015) Dietary fibre and incidence of type 2 diabetes in eight European countries: the EPIC-InterAct Study and a meta-analysis of prospective studies. *Diabetologia*, 58(7), 1394-1408.
- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsen, B., Lahti, K., Nissen, M., Taskinen, M. R. und Groop, L. (2001) Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24(4), 683-689.
- Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R. G., Krausz, K. W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z. Z., Takahashi, S., Tanaka, N., Desai, D., Amin, S. G., Albert, I., Patterson, A. D. und Gonzalez, F. J. (2015) Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 125(1), 386-402.
- John, C. (2015) Bedeutung der Aktivierung von braunem Fettgewebe auf den systemischen Cholesterinstoffwechsel. Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Hamburg.
- John, C., Werner, P., Worthmann, A., Wegner, K., Todter, K., Scheja, L., Rohn, S., Heeren, J. und Fischer, M. (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.
- Jones, B. V., Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. und Marchesi, J. R. (2008) Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36), 13580-13585.
- Joyce, S. A., MacSharry, J., Casey, P. G., Kinsella, M., Murphy, E. F., Shanahan, F., Hill, C. und Gahan, C. G. (2014a) 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.
- Joyce, S. A., Shanahan, F., Hill, C. und Gahan, C. G. (2014b) Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes*, 5(5), 669-674.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R. und Kadowaki, T. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*, 281(36), 26602-26614.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K. und Kasuga, M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*, 116(6), 1494-1505.

- Kaplan, N. M. (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, 149(7), 1514-1520.
- Karpen, P. A. D. a. S. J. (2014) Intestinal Transport and Metabolism of Bile Acids *Journal of Lipid Research*.
- Kimura, I., Ozawa, K., Inoue, D., Imamura, T., Kimura, K., Maeda, T., Terasawa, K., Kashihara, D., Hirano, K., Tani, T., Takahashi, T., Miyauchi, S., Shioi, G., Inoue, H. und Tsujimoto, G. (2013) The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*, 4, 1829.
- Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J. und Salonen, J. T. (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*, 288(21), 2709-2716.
- Lee, L. G., Connell, C. R. und Bloch, W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, 21(16), 3761-3766.
- Lee, M. W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., Yun, K., Locksley, R. M. und Chawla, A. (2015) Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*, 160(1-2), 74-87.
- Lee, P., Zhao, J. T., Swarbrick, M. M., Gracie, G., Bova, R., Greenfield, J. R., Freund, J. und Ho, K. K. (2011) High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(8), 2450-2455.
- Leonard, J. L., Mellen, S. A. und Larsen, P. R. (1983) Thyroxine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue. *Endocrinology*, 112(3), 1153-1155.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. und Gordon, J. I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
- Li, F., Jiang, C., Krausz, K. W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K. M., Mitchell, J. B., Patterson, A. D. und Gonzalez, F. J. (2013) Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun*, 4, 2384.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Low-Beer, T. S. und Nutter, S. (1978) Colonic bacterial activity, biliary cholesterol saturation, and pathogenesis of gallstones. *Lancet*, 2(8099), 1063-1065.
- Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J. und Mangelsdorf, D. J. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*, 6(3), 507-515.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009) Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Martinez-deMena, R. und Obregon, M. J. (2005) Insulin increases the adrenergic stimulation of 5' deiodinase activity and mRNA expression in rat brown adipocytes; role of MAPK and PI3K. *J Mol Endocrinol*, 34(1), 139-151.

- Martinez, F. O., Helming, L. und Gordon, S. (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 27, 451-483.
- McGarr, S. E., Ridlon, J. M. und Hylemon, P. B. (2005) Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J Clin Gastroenterol*, 39(2), 98-109.
- Mestdagh, R., Dumas, M. E., Rezzi, S., Kochhar, S., Holmes, E., Claus, S. P. und Nicholson, J. K. (2012) Gut microbiota modulate the metabolism of brown adipose tissue in mice. *J Proteome Res*, 11(2), 620-630.
- Moser, S. A. und Savage, D. C. (2001) Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 67(8), 3476-3480.
- Nagase, I., Yoshida, T., Kumamoto, K., Umekawa, T., Sakane, N., Nikami, H., Kawada, T. und Saito, M. (1996) Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic beta 3-adrenergic agonist. *J Clin Invest*, 97(12), 2898-2904.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T. und Cannon, B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E444-452.
- Nedergaard, J. und Cannon, B. (2014) The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*, 20(3), 396-407.
- Niewiadomski, J., Zhou, J. Q., Roman, H. B., Liu, X., Hirschberger, L. L., Locasale, J. W. und Stipanuk, M. H. (2016) Effects of a block in cysteine catabolism on energy balance and fat metabolism in mice. *Ann N Y Acad Sci*, 1363(1), 99-115.
- Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A. Y. und Shan, B. (1999) CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12), 6660-6665.
- Oh, C. S., Toke, D. A., Mandala, S. und Martin, C. E. (1997) ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem*, 272(28), 17376-17384.
- Petersen, A. M. und Pedersen, B. K. (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 98(4), 1154-1162.
- Philipp, B. (2011) Bacterial degradation of bile salts. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(4), 903-915.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. und Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829-839.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J. M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li,

- Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Meta, H. I. T. C., Bork, P., Ehrlich, S. D. und Wang, J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59-65.
- Qiu, Y., Nguyen, K. D., Odegaard, J. I., Cui, X., Tian, X., Locksley, R. M., Palmiter, R. D. und Chawla, A. (2014) Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*, *157*(6), 1292-1308.
- Redman, L. M., de Jonge, L., Fang, X., Gamlin, B., Recker, D., Greenway, F. L., Smith, S. R. und Ravussin, E. (2007) Lack of an effect of a novel beta3-adrenoceptor agonist, TAK-677, on energy metabolism in obese individuals: a double-blind, placebo-controlled randomized study. *J Clin Endocrinol Metab*, *92*(2), 527-531.
- Ricquier, D. und Kader, J. C. (1976) Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun*, *73*(3), 577-583.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C. F., Funai, K., Hayashi, D. K., Lyle, B. J., Martini, M. C., Ursell, L. K., Clemente, J. C., Van Treuren, W., Walters, W. A., Knight, R., Newgard, C. B., Heath, A. C. und Gordon, J. I. (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, *341*(6150), 1241214.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J. und Hylemon, P. B. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*, *47*(2), 241-259.
- Russell, D. W. (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, *72*, 137-174.
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y. und Tsujisaki, M. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, *58*(7), 1526-1531.
- Sayin, S. I., Wahlstrom, A., Felin, J., Jantti, S., Marschall, H. U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyotylainen, T., Oresic, M. und Bäckhed, F. (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.
- Schwartz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. und Hardt, P. D. (2010) Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*, *18*(1), 190-195.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R. und Spiegelman, B. M. (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, *454*(7207), 961-967.
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S. und Spiegelman, B. M. (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*, *121*(1), 96-105.

- Silva, J. E. und Larsen, P. R. (1983) Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, 305(5936), 712-713.
- Slavin, J. L. (2005) Dietary fiber and body weight. *Nutrition*, 21(3), 411-418.
- Smith, K., McCoy, K. D. und Macpherson, A. J. (2007) Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*, 19(2), 59-69.
- Sommer, F. und Bäckhed, F. (2013) The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 11(4), 227-238.
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y. H. und Goodyear, L. J. (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*, 123(1), 215-223.
- Stieger, B., Meier, Y. und Meier, P. J. (2007) The bile salt export pump. *Pflugers Arch*, 453(5), 611-620.
- Stralfors, P. und Belfrage, P. (1983) Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 258(24), 15146-15152.
- Suarez-Zamorano, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanovic, O., Colin, D. J., Stevanovic, A., Veyrat-Durebex, C., Tarallo, V., Rigo, D., Germain, S., Ilievska, M., Montet, X., Seimbille, Y., Hapfelmeier, S. und Trajkovski, M. (2015) Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nat Med*, 21(12), 1497-1501.
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J. und Schoonjans, K. (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7(8), 678-693.
- Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K., Nedergaard, J. und Cannon, B. (2007) Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(11), 4401-4406.
- Truong, M. T., Erasmus, J. J., Munden, R. F., Marom, E. M., Sabloff, B. S., Gladish, G. W., Podoloff, D. A. und Macapinlac, H. A. (2004) Focal FDG uptake in mediastinal brown fat mimicking malignancy: a potential pitfall resolved on PET/CT. *AJR Am J Roentgenol*, 183(4), 1127-1132.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L. und Gordon, J. I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3(4), 213-223.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R. und Gordon, J. I. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. und Gordon, J. I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031.

- Tvrdik, P., Asadi, A., Kozak, L. P., Nedergaard, J., Cannon, B. und Jacobsson, A. (1997) Cig30, a mouse member of a novel membrane protein gene family, is involved in the recruitment of brown adipose tissue. *J Biol Chem*, 272(50), 31738-31746.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhomerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P. und Teule, G. J. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, 360(15), 1500-1508.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerbäck, S. und Nuutila, P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, 360(15), 1518-1525.
- Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M. C., Frontini, A., Ricquier, D. und Cinti, S. (2012) The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*, 53(4), 619-629.
- Wang, Q., Zhang, M., Ning, G., Gu, W., Su, T., Xu, M., Li, B. und Wang, W. (2011) Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PLoS One*, 6(6), e21006.
- Wang, Q. A., Tao, C., Gupta, R. K. und Scherer, P. E. (2013) Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*, 19(10), 1338-1344.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. und Ferrante, A. W., Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808.
- Westerberg, R., Mansson, J. E., Golozoubova, V., Shabalina, I. G., Backlund, E. C., Tvrdik, P., Retterstol, K., Capecchi, M. R. und Jacobsson, A. (2006) ELOVL3 is an important component for early onset of lipid recruitment in brown adipose tissue. *J Biol Chem*, 281(8), 4958-4968.
- Worthmann, A., John, C., Ruhlemann, M. C., Baguhl, M., Heinsen, F. A., Schaltenberg, N., Heine, M., Schlein, C., Evangelakos, I., Mineo, C., Fischer, M., Dandri, M., Kremoser, C., Scheja, L., Franke, A., Shaul, P. W. und Heeren, J. (2017) Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nat Med*, 23(7), 839-849.
- Woting, A. und Blaut, M. (2016) The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*, 8(4).
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. und Spiegelman, B. M. (2012a) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., S., E., Schrauwen, P. und Spiegelman, B. M. (2012b) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376.

- Young, P., Arch, J. R. und Ashwell, M. (1984) Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*, 167(1), 10-14.
- Zdravec, D., Brolinson, A., Fisher, R. M., Carneheim, C., Csikasz, R. I., Bertrand-Michel, J., Boren, J., Guillou, H., Rudling, M. und Jacobsson, A. (2010) Ablation of the very-long-chain fatty acid elongase ELOVL3 in mice leads to constrained lipid storage and resistance to diet-induced obesity. *FASEB J*, 24(11), 4366-4377.
- Zietak, M., Kovatcheva-Datchary, P., Markiewicz, L. H., Stahlman, M., Kozak, L. P. und Bäckhed, F. (2016) Altered Microbiota Contributes to Reduced Diet-Induced Obesity upon Cold Exposure. *Cell Metab*, 23(6), 1216-1223.

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie von weißen und braunen Adipozyten .....	2
Abbildung 1-2: Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie des beigen Fettgewebes .....	4
Abbildung 1-3: Modifikation von Gallensäuren durch das intestinale Mikrobiom.....	12
Abbildung 4-1: Genexpressionsanalyse im scBAT und subWAT aus C57BL/6J-Mäusen mit intaktem Mikrobiom nach 7-tägiger Kälteadaption .....	29
Abbildung 4-2: Experimentelles Design sowie Nahrungsaufnahme und der Verlauf des Körpergewichts in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung und Kontrollen sowie entsprechenden Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung.....	31
Abbildung 4-3: Messung des prozentualen Gewichts der unterschiedlichen Fettgewebedepots aus C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes durch Kälte und Kontrollen sowie entsprechenden Tieren nach Antibiotikabehandlung .....	32
Abbildung 4-4: Analyse des intestinalen Mikrobioms mittels 16S rDNA Sequenzierung in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes und entsprechenden Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung.....	33
Abbildung 4-5: Graphische Darstellung der Methode zur Quantifizierung der Aktivität des bakteriellen Enzyms <i>bile salt hydrolase</i> .....	34
Abbildung 4-6: Ergebnisse der Messung der Enzymaktivität der <i>bile salt hydrolase</i> in C57BL/6J-Mäusen nach 7-tägiger Kälteaktivierung des braunen Fettgewebes und vergleichbaren Tieren nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung.....	35
Abbildung 4-7: Relative Konzentration von unkonjugierten und konjugierten Gallensäuren in den Fäzes von C57BL/6J-Mäusen nach 7 tägiger Aktivierung des braunen Fettgewebes und Kontrolltieren sowie entsprechenden Mäusen nach Antibiotikabehandlung .....	36
Abbildung 4-8: Analyse der Genexpression im braunen Fettgewebe und in beigen Adipozyten von C57BL/6J-Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes und in C57BL/6J Kontrollmäusen sowie entsprechenden Mäusen nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung.....	38
Abbildung 4-9: Genexpressionsanalyse proinflammatorischer Gene in beigen Adipozyten aus Wildtyp- Mäusen nach Aktivierung der zitterfreien Thermogenese	

durch Kälte und in Kontrollen sowie entsprechenden Mäusen nach 7-tägiger Antibiotikabehandlung .....	40
Abbildung 4-10: Analyse der Nahrungsaufnahme und des Verlaufs des Körpergewichts in C57BL/6J- Mäusen nach Transplantation von Fäzes aus Mäusen nach einwöchiger Aktivierung des braunen Fettgewebes.....	42
Abbildung 4-11: Analyse der Lipidkonzentrationen und des Lipoproteinprofils in C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transfer aus Mäusen nach 7-tägiger Kälteadaptation .....	43
Abbildung 4-12: Messung der unterschiedlichen Gallensäurespezies in den Fäzes von C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus Mäusen deren braunes Fettgewebe für 7 Tage durch Kälte aktiviert wurde und Messung der Länge des Dünndarms und des Kolons in selbigen Mäusen .....	44
Abbildung 4-13: Genexpression thermogener Gene im iBAT und subWAT von Wildtyp-Mäusen nach Fäzes Transfer aus WT-Mäusen die zur Aktivierung des braunen Fettgewebes für 7 Tage bei 6 °C gehalten wurden .....	46
Abbildung 4-14: Ergebnisse des oralen Glukosetoleranz-Test und der Organaufnahme von radioaktiv markierten Lipiden und radioaktiv markierter Glukose in C57BL/6J-Mäusen nach Fäzes-Transplantation aus C57BL/6J-Mäusen die für eine Woche bei 6 °C gehalten wurden.....	48

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Verwendete Chemikalien .....	16
Tabelle 3-2: Verwendete Lösungen und Puffer .....	17
Tabelle 3-3: Verwendete Kits und Reagenzien .....	18
Tabelle 3-4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 3-5: Verwendete Arbeitsgeräte .....	19
Tabelle 3-6: Verwendete TaqMan®-Sonden .....	19
Tabelle 3-7: Verwendete Software .....	20
Tabelle 3-8: Schema zur Zugabe von TCA-Stammlösung und PBS.....	26
Tabelle 3-9: Externe Standardreihe Taurin .....	27
Tabelle 3-10: Laufmittelgradienten der HPLC-Methode zur Messung der Taurinkonzentration .....	27
Tabelle 3-11: MRM-Parameter des ESI-QqQ-Massenspektrometers.....	27

## 12 Publikationen

Unter anderem im Rahmen dieser Arbeit ist die folgende Publikation entstanden:

**Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis**

Worthmann, A. \*, John, C. \*, Rühlemann, M. C., Baguhl, M., Heinsen, F. A., Schaltenberg, N., Heine, M., Schlein, C., Evangelakos, I., Mineo, C., Fischer, M., Dandri, M., Kremoser, C., Scheja, L., Franke, A., Shaul, P. W. und Heeren, J. (2017) Nat Med, 23(7), 839-849.

\* geteilte Erstautorenschaft

## 13 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben und mir dabei stets mit Rat und Tat zur Seite standen, ganz herzlich bedanken.

Zunächst danke ich Herrn Prof. **Jörg Heeren** für die Bereitstellung meines Themas und für die Unterstützung und Beratung während der gesamten Zeit. Sowohl ihm, als auch Dr. **Ludger Scheja** danke ich für die unzähligen Diskussionen und Denkanstöße.

Vielen Dank auch an **Birgit, Evi** und **Sandra** für die Einführung in die unterschiedlichsten Labortechniken und dafür, dass ich von euch so unendlich viel lernen durfte.

Zudem danke ich **Alex, Markus, Sarina, Christian, Krissi, Luci, Kirstin, Brigitte, Imke, Steffen, Nils** und **Nicola** für die herausragende Arbeitsatmosphäre und dafür, dass ich ein Teil dieser Arbeitsgruppe sein durfte. **Alex**, dir noch einmal einen gesonderten Dank dafür, dass du mich in die hohe Kunst des Western Blots eingeführt hast. Ebenfalls bedanke ich mich bei **Dieter, Christine, Klaus, Walter, Meike** und allen anderen die während der letzten 3 Jahre gekommen und gegangen sind, für die schöne Zeit.

Beim **Graduiertenkolleg Entzündung und Regeneration** des Sonderforschungsbereichs 841 bedanke ich mich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung und die lehrreichen Veranstaltungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an **Clara** und **Anna** für die wundervolle Betreuung und Zusammenarbeit. Ich werde die Zeit mit euch, aber auch mit allen anderen nie vergessen und sehr vermissen. Umso mehr freue ich mich darüber, dass wir zu mehr, als nur Arbeitskollegen geworden sind.

Zu guter Letzt danke ich meinen **Eltern** und meinem **Partner** für die mentale Unterstützung.

## **14 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **15 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....