

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas H. Guse
Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem. Jörg Heeren

**Die Bedeutung intraoperativer Hypothermie für die Expression
adipozytärer Gene in humanen Fettgewebsdepots**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Carolin Hanschke
aus Guben

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.06.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Axel Larena-Avellaneda

A Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	II
B	Abbildungsverzeichnis	IV
C	Tabellenverzeichnis.....	V
D	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung.....	1
1.1	Funktion, Morphologie und molekulare Merkmale verschiedener Fettgewebstypen.....	3
1.1.1	Weißes Fettgewebe.....	4
1.1.2	Thermogene Fettgewebe	4
1.2	Anatomische Lage distinkter humaner Fettgewebsdepots	8
1.3	Regulierung der Differenzierung und Aktivierung thermogener Adipozyten.....	10
1.4	Relevanz des BAT im Metabolismus	14
1.4.1	Erhöhung des Energieumsatzes durch BAT-Aktivierung	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Gewinnung humaner Fettgewebsproben.....	19
2.1.1	Ablauf der Operation.....	20
2.1.2	Beschreibung der Gewebegewinnung.....	21
2.1.3	Ablauf der Anästhesie und perioperative Medikation.....	23
2.1.4	Datenerhebung	26
2.2	Molekularbiologische Analyse humaner Fettgewebsproben	26
2.2.1	Kits, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.2.2	RNA-Extraktion und Quantifizierung	27
2.2.3	Synthese von cDNA	27
2.2.4	Quantitative real-time PCR	28
2.3	Statistik.....	29
2.3.1	Beschreibende Statistik.....	29

2.3.2	Inferenzstatistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Charakterisierung der Untersuchungsgruppe	30
3.1.1	Physiologische Merkmale	30
3.1.2	Klinische Charakterisierung	32
3.2	Expressionsanalyse adipozytärer Gene in humanen Fettgewebsdepots	36
3.2.1	Expressionsanalyse adipozytärer Gene unter Normothermie	36
3.2.2	Verhalten der Genexpression bei Einfluss von Hypothermie	39
3.2.3	Patientenspezifische Analyse für <i>UCP1</i> und <i>DIO2</i> in den Fettgewebsdepots	40
3.2.3.1	Epikardial	41
3.2.3.2	Perikardial	44
3.2.3.3	Retrosternal	46
3.2.3.4	Mediastinal	48
3.2.3.5	Subkutan	49
3.3	Korrelation der Genexpression	51
4	Diskussion	58
4.1	Faktoren im Kontext der Stichprobe	60
4.2	Faktoren im operativen und methodischen Kontext	65
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	67
5	Zusammenfassung	70
6	Summary	71
7	Anhang	72
8	Quellenverzeichnis	75
9	Danksagung	88
10	Lebenslauf	89
11	Eidesstattliche Versicherung	90

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aktivierung von Ucp1, Pgc-1 α und Dio2.....	12
Abbildung 2 Funktion des Prdm16.....	14
Abbildung 3 Fettdepots.....	23
Abbildung 4 Physiologische Merkmale der Untersuchungsgruppe	31
Abbildung 5 Expressionsanalyse adipozytärer Gene in den Fettgewebsdepots unter Normothermie.....	38
Abbildung 6 Verhalten der Genexpression unter Hypothermie in Relation zur Genexpression unter Normothermie.....	40
Abbildung 7 <i>UCP1/DIO2</i> - Expression unter Normothermie und Hypothermie in epikardialem Gewebe.....	43
Abbildung 8 <i>UCP1/DIO2</i> -Expression unter Normothermie und Hypothermie in perikardialem Gewebe.....	45
Abbildung 9 <i>UCP1/DIO2</i> -Expression unter Normothermie und Hypothermie in retrosternalem Gewebe.....	47
Abbildung 10 <i>UCP1/DIO2</i> - Expression unter Normothermie und Hypothermie in mediastinalem Gewebe.....	49
Abbildung 11 <i>UCP1/DIO2</i> -Expression unter Normothermie und Hypothermie in subkutanem Gewebe.....	50
Abbildung 12 <i>UCP1</i> -Expression in epikardialem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen	52
Abbildung 13 <i>DIO2</i> -Expression in epikardialem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen	54
Abbildung 14 <i>UCP1</i> -Expression in mediastinalem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen	55
Abbildung 15 <i>DIO2</i> -Expression in mediastinalem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen	56

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Charakterisierung weißer, brauner und beiger Adipozyten	7
Tabelle 2 Eingriffe und Indikationen pro Patient	20
Tabelle 3 Übersicht über zeitliche Eckpunkte im Verlauf der Operation, die Dauer der Hypothermie und die bei Gewebeabgabe gemessenen Temperaturen für jeden Patienten	22
Tabelle 4 Medikamente während Narkose und Operation.....	24
Tabelle 5 Zusammensetzung und Funktion der kardioplegischen Lösung nach Buckberg	25
Tabelle 6 Protokolle für die Synthese der cDNA	28
Tabelle 7 cDNA-Syntheseprotokoll für den Thermocycler	28
Tabelle 8 Auflistung der untersuchten Gene.....	29
Tabelle 9 Übersicht über die physiologischen Merkmale.....	31
Tabelle 10 Häufigkeiten unterschiedlicher Diagnosen in der Stichprobe	32
Tabelle 11 Übersicht über die tägliche Medikation jedes Patienten.....	34
Tabelle 12 Übersicht über metabolische und hormonelle Parameter	35
Tabelle 13 Übersicht über die Anzahl der Proben pro Gewebe.....	36

D Abkürzungsverzeichnis

ACB Aortocoronarer Bypass

ACE *Angiotensin converting enzyme*

AKE Aortenklappenersatz

ANOVA *Analysis of variance* (Varianzanalyse)

AT₁-Antagonist Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonist

ATF-2 *Activating transcription factor 2*

ATP Adenosintriphosphat

ASS Acetylsalicylsäure

BAT *Brown adipose tissue* (Braunes Fettgewebe)

BMI *Body mass index* (Körperlänge in Metern/(Körpergewicht in Kilogramm)²)

cAMP cyclisches Adenosinmonophosphat

CD 36 *Cluster of differentiation 36*

Cd 137 =Tnfrsf9 *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9*

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

C/EBP β *CCAAT/enhancer-binding protein β*

CREB *cAMP-response element-binding protein*

Ct *Cycle threshold*

DIO2 *Iodothyronine deiodinase type II*

FABP4 *Fatty acid binding protein 4*

¹⁸F-FDG-PET/CT ¹⁸F-Fluoro-Desoxyglukose-PET/CT

HbA1c ist der Anteil glykierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin

HDL *High density lipoprotein*

HLM Herz-Lungen-Maschine

k.A. keine Angabe

KHK Koronare Herzkrankheit

LDL *Low density lipoprotein*

MAPK Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MKE Mitralklappenersatz

mRNA messenger Ribonukleinsäure

Myf-5 *myogenic factor 5*

n.v. nicht vorhanden

PET/CT Positronenemissionstomographie/Computertomographie

PGC1 α *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α*

Ppar α/γ Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren α/γ

PPI Protonenpumpeninhibitor

PRDM16 *PR domain zinc finger protein 16*

R² Bestimmtheitsmaß

RAS Renin-Angiotensin-System

RNA Ribonukleinsäure

SEM *Standard error of the mean* (Standardfehler des Mittelwerts)

TAF1 *Template-activating factor 1*

Tbx1 T-box 1

TG Triglyceride

THR $\alpha1/\beta$ *Thyroid hormone receptor $\alpha1/\beta$*

Tmem26 *Transmembrane protein 26*

TRL Triglyzeridreiche Lipoproteine

TSH Thyroidea-stimulierendes Hormon

UCP1 *Uncoupling protein 1*

VEGF *Vascular endothelial growth factor*

VHF Vorhofflimmern

VLDL *Very low density lipoprotein*

WAT *White adipose tissue* (Weißes Fettgewebe)

Zic 1 *Zinc finger protein of the cerebellum 1*

36B4 *Acidic ribosomal phosphoprotein PO*

1 Einleitung

Übergewicht und Adipositas entwickeln sich zunehmend zu einem globalen Problem für die Gesundheit der Bevölkerung. Weltweit hat sich die Prävalenz der Adipositas seit 1980 mehr als verdoppelt (World Health Organization, 2017). Die Zunahme der Morbidität und Mortalität im Zusammenhang mit Adipositas führt sowohl zu einer Beeinträchtigung der individuellen Lebensqualität, als auch zu einem Anstieg der medizinischen Kosten. Sich positiv auf die Prävalenz der Adipositas auswirkende Maßnahmen können folglich die direkten und indirekten Auswirkungen dieser Erkrankung reduzieren.

Gemessen am *Body-Mass-Index* (BMI), welcher laut der *World Health Organization* (WHO) der Klassifikation der Adipositas dient, waren im Jahre 2014 weltweit 39 Prozent der erwachsenen Bevölkerung über 18 Jahren übergewichtig ($25 < \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$) und 13 Prozent adipös ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) (World Health Organization, 2000, World Health Organization, 2017). Dabei sind Frauen häufiger betroffen als Männer (World Health Organization, 2017). Im Jahre 2014 waren zudem 41 Millionen Kinder unter acht Jahren übergewichtig oder adipös (World Health Organization, 2017). Weltweit sterben mehr Menschen durch Übergewicht als durch Unterernährung (World Health Organization, 2017). Der Anteil der Kosten für das Gesundheitssystem beläuft sich in vielen Ländern auf zwei bis sechs Prozent (World Health Organization, 2007). Während Adipositas und Übergewicht lange Zeit vorrangig ein Problem der Länder mit hohem Einkommen darstellten, sind inzwischen die meisten Länder mit mittlerem Einkommen und zunehmend auch solche mit niedrigem Einkommen betroffen (Finucane et al., 2011). Adipositas und Übergewicht zählen weltweit zu den Hauptursachen des Verlustes gesunder Lebensjahre der Bevölkerung (Ezzati et al., 2006). In Ländern mit hohem Einkommen sind sie dritthäufigste Ursache für den Verlust gesunder Lebensjahre (Ezzati et al., 2006). In Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen rangieren Adipositas und Übergewicht auf Platz zehn (Ezzati et al., 2006).

Die sozioökonomischen Folgen der Adipositas sind das Resultat der pathophysiologischen und psychosozialen Auswirkungen auf den Organismus. Die Bedeutung der Adipositas und des Übergewichtes für die physische Gesundheit besteht insbesondere in den assoziierten Folgeerkrankungen. Regelmäßig sind sie von einem gestörten Glukose-, Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel begleitet, was die Entstehung metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigt (Van Gaal et al., 2006, Despres and Lemieux, 2006). Übergewicht und Adipositas sind Resultat eines konstanten Ungleichgewichtes des Energiehaushaltes. Wenn die Energieaufnahme den Energieverbrauch anhaltend übersteigt, entsteht ein Zustand ständiger positiver Energiebilanz. Die überschüssige Energie wird in Form von Triglyzeriden in Adipozyten im weißen Fettgewebe eingelagert. Auf die Hypertrophie der Adipozyten folgt bei anhaltendem Energieüberschuss die Stimulation der Adipogenese und letztlich die Entwicklung der Adipositas (Krotkiewski et al., 1983). Eine

Akkumulation der überschüssigen Lipide ist zusätzlich auch an ektopen Lokalisationen, wie Pankreas, Nieren, Leber, Herz und Skelettmuskel zu beobachten (Wende and Abel, 2010). Die Überschreitung der Lagerkapazität dieser Gewebe resultiert in der Entstehung toxischer Lipidarten, einhergehend mit einem gestörten zellulären Metabolismus und chronischer *low-grade* Entzündung (Yang and Barouch, 2007). Dies sind Prozesse, welche an der Entstehung einer Insulinresistenz, die prädisponierend für den Diabetes mellitus Typ 2 ist, und der nicht-alkoholischen Steatohepatitis mitwirken (Hotamisligil and Erbay, 2008, Torres et al., 2012). Neben den Zellen nehmen auch die Blutgefäße Schaden. So ist bekannt, dass ein erhöhter Spiegel von *Low Density Lipoproteins* (LDL) sowie auch die Akkumulation von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen (TRL) die Entwicklung und Progression der Atherosklerose fördern (Ridker, 2014, Nordestgaard and Varbo, 2014). Weiterhin ist ein erhöhter BMI nachweislich mit malignen Tumorerkrankungen assoziiert (Flier, 2004, World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research., 2007).

Bedeutsam im psychosozialen Kontext sind in erster Linie die besonders in den westlichen Nationen weit verbreitete negative Stigmatisierung und Diskriminierung adipöser Personen (Hilbert et al., 2008, Sikorski et al., 2011). Dies hat Folgen für die psychische Gesundheit, denn Stigmatisierungserfahrungen und Selbststigmatisierung führen zu einer erhöhten Vulnerabilität für depressive Störungen, zum Verlust von Selbstvertrauen und zu einem negativen Körperbild (Friedman et al., 2005). Neben der Prävention der Entstehung der Adipositas besteht ein dringender Bedarf für die Entwicklung therapeutischer Ansätze zur Behandlung der Adipositas, um körperliche und psychische Folgeerkrankungen zu minimieren.

Bei der Suche nach therapeutischen Maßnahmen kommt der Steigerung des Energieverbrauches eine besondere Bedeutung zu (Hall et al., 2011). Die gezielte Steigerung dessen ist einer der vielversprechendsten Mechanismen, um metabolische Erkrankungen zu therapieren (Bartelt and Heeren, 2012). Aufgrund der Fähigkeit, den Energieverbrauch des Organismus zu erhöhen, rückte braunes und später auch beiges Fettgewebe in den Fokus der Forschung. Diese sogenannten thermogenen Fettgewebe sind in der Lage, chemische Energie in Wärmeenergie umzuwandeln und freizusetzen. In Studien an verschiedenen genetisch manipulierten murinen Modellen konnte eine erhöhte Aktivität brauner und beiger Adipozyten vor Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen schützen (Cederberg et al., 2001, Seale et al., 2011, Kopecky et al., 1995). Eine genetische Ablation des braunen Fettgewebes bei Mäusen mündet in der Entwicklung einer Adipositas (Lowell et al., 1993). Passend dazu kann durch die transgene Expression des *Uncoupling Protein 1* (UCP1) die Entstehung einer solchen verhindert werden (Kopecky et al., 1995). Während die Existenz braunen Fettgewebes bei Nagetieren und Neugeborenen lange bekannt war, führte die Entdeckung thermogenen Fettgewebes beim adulten Menschen zu einer erneuten, verstärkten Auseinandersetzung mit diesem Thema. Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass die Aktivie-

nung thermogener Fettgewebe auch beim Menschen als vielversprechender Ansatz in der Bekämpfung der Adipositas, des Diabetes Mellitus Typ 2 und weiterer metabolischer und Adipositas-assoziiierter Erkrankungen infrage kommt (Cypess et al., 2009, Virtanen et al., 2009, Lichtenbelt et al., 2009, Saito et al., 2009b, Nedergaard et al., 2007).

1.1 Funktion, Morphologie und molekulare Merkmale verschiedener Fettgewebstypen

Im Laufe der Evolution mussten Säugetiere mit zwei wesentlichen, potentiell lebensbedrohlichen Bedingungen umgehen. Dies waren ein temporär begrenztes Nahrungsangebot und kalte Temperaturen. Das Fettgewebe ist ein Organ, welches beiden Ansprüchen gerecht wird (Cinti, 2001). Es ist an verschiedenen Stellen im menschlichen Körper zu finden. Hauptsächlich enthält es Adipozyten, die in retikuläre und kollagene Fasern eingebettet sind. Abhängig vom Fettgewebstyp weisen die Adipozyten Unterschiede in der Morphologie, Physiologie und Funktion auf. Es lassen sich weiße von braunen und beigen Adipozyten unterscheiden, welche ihrerseits die Farbgebung des Gewebes bestimmen. Die Bezeichnung der einzelnen Fettgewebe erfolgt analog: Weißes Fettgewebe (*white adipose tissue*-WAT), braunes Fettgewebe (*brown adipose tissue*-BAT) und beiges Fettgewebe (auch bekannt als induzierbare braune, *brown-in-white* oder *brite* Adipozyten). Aus murinen Studien ist bekannt, dass sich das Fettgewebe nicht dauerhaft in einem dieser Zustände befindet, sondern eine hohe Anpassungsfähigkeit an sich verändernde metabolische und thermische Bedingungen zeigt. So können braune Adipozyten einen Phänotyp annehmen, der dem des weißen Adipozyten gleicht (Shimizu et al., 2014). Ebenso können beige und weiße Adipozyten in den jeweils anderen transdifferenzieren (Rosenwald et al., 2013).

Anhand morphologischer Charakteristika lassen sich weiße von thermogenen Adipozyten unterscheiden (Tabelle 1). Während der weiße Adipozyt durch einen großen univakuolären Lipidtropfen gekennzeichnet ist, weisen thermogene Adipozyten multiple, kleine Lipidtropfen auf (Bartelt and Heeren, 2014). Makro- wie mikroskopisch erscheinen thermogene Adipozyten bräunlich, was durch die hohe Anzahl an Mitochondrien bedingt ist (Bartelt and Heeren, 2014).

Mit der Funktion der Fettgewebe eng verbunden ist der Fettstoffwechsel. Die überwiegend aus der Nahrung stammenden Triglyzeride (TG) sind von erheblicher Bedeutung in der Energiebereitstellung für den Organismus. Sie dienen konsumierenden Organen einerseits als Energielieferant und haben andererseits eine wichtige Funktion als effizienter Energiespeicher. Das Fettgewebe nimmt in diesem Zusammenhang abhängig vom Typ sowohl eine Funktion als Speicherorgan als auch als konsumierendes Organ ein.

Allen reifen Adipozyten gemein ist die Expression des Adipokins *Fatty acid binding protein 4* (FABP4), welches auch *adipocyte protein 2* (aP2) oder *adipocyte-specific FABP* (A-FABP) genannt wird. Es gehört einer großen Familie an, welche in verschiedenen Zellen und über verschiedene Spezies hinweg zu finden ist. In reifen Adipozyten macht es etwa sechs Prozent des gesamten zellulären Proteingehalts aus (Bernlohr et al., 1985). Aber auch in anderen Zellen, wie beispielsweise in Vorläuferzellen der stromavaskulären Fraktion sowie auch in Makrophagen und Endothelzellen ist es zu finden (Boord et al., 2004, Xu and Vanhoutte, 2012, Shan et al., 2013). Die vollständige Klärung seiner Funktion steht bislang noch aus. Bekannt ist jedoch, dass FABP4 für die intrazelluläre Koordinierung von Lipidsignalen von Bedeutung ist. Dieser Aufgabe wird es gerecht, indem es hydrophobe Liganden wie gesättigte und ungesättigte langkettige Fettsäuren und andere Lipide bindet und transportiert (Furuhashi and Hotamisligil, 2008).

FABP4 wirkt nicht nur intrazellulär, sondern auch systemisch durch seine Sekretion in den Blutkreislauf, wo es als Hormon einen Einfluss auf den Glukose- und Fettstoffwechsel hat (Xu et al., 2006, Cao et al., 2013). Immer deutlicher wird auch die Rolle des Moleküls als Vermittler in der Thermogenese brauner Adipozyten (Syamsunarno et al., 2014, Shu et al., 2017).

1.1.1 Weißes Fettgewebe

Weißes Fettgewebe dient primär der Speicherung der in den TG enthaltenen Energie. Dazu erfolgt die extrazelluläre lipolytische Spaltung der TG zu freien Fettsäuren und Glycerin. Während das Glycerin durch den Adipozyten nicht verwertet wird, werden die freien Fettsäuren mithilfe spezifischer Transportproteine oder durch Diffusion durch die Membran in den weißen Adipozyten aufgenommen (Löffler, 2014). Zur Lagerung in univakuolären Lipidtröpfchen erfolgt die intrazelluläre Veresterung der freien Fettsäuren zu TG. In Zeiten einer Nahrungsknappheit werden diese wieder hydrolysiert und wiederum als freie Fettsäuren in die Zirkulation abgegeben. In der Leber erfolgt die erneute Umwandlung zu TG und die Inkorporation in *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), welche sezerniert werden, um den Energiebedarf des Organismus zu decken (Zechner et al., 2012). Als endokrines Organ trägt das weiße Fettgewebe durch die Sekretion von Adipokinen, wie Leptin und Adiponektin, außerdem zur Kontrolle von Stoffwechselprozessen in der Lipid- und Glukosehomöostase bei (Rosen and Spiegelman, 2014).

1.1.2 Thermogene Fettgewebe

Im Zentrum der Erforschung vielversprechender Therapieansätze zur Bekämpfung der Adipositas und metabolischer Erkrankungen stehen thermogene Fettgewebe, zu welchen das BAT und

das beige Fettgewebe gehören. In einem Prozess, der zitterfreie Thermogenese genannt wird, ermöglichen thermogene Fettgewebe den Säugetieren, neben der Lipidspeicherung, die Wärmeproduktion durch die Verwertung freier Fettsäuren. Neben der Wärmebildung durch das Muskelzittern und die basale metabolische Aktivität ist die zitterfreie Thermogenese bei prolongierter Kälteexposition zum Erhalt der Körperkerntemperatur notwendig (Davis et al., 1960). Dies ist insbesondere für das Überleben kleiner Säugetiere in kalten Lebensräumen und für das Erwachen von Winterschläfern essentiell.

Schon 1551 findet braunes Fettgewebe Erwähnung in einer Arbeit des Arztes und Naturforschers Konrad Gessner, der es als „*neither fat, nor flesh*“ umschrieb (Gessner, 1551, Cannon and Nedergaard, 2008). Später erfolgte die Identifikation des BAT anhand histomorphologischer und histochemischer Merkmale beim Menschen in anatomischen Studien (Heaton, 1972, Huttunen et al., 1981). Die funktionelle Rolle des BAT im adulten Organismus wurde lange nicht vollständig geklärt, auch wenn sich bereits Hinweise in frühen Studien finden lassen. Das funktionelle Resultat beispielsweise wurde schon im Jahre 1961 beschrieben. Bei einer Studie an gesunden Männern konnte beobachtet werden, dass nach prolongierter Kälteexposition eine graduelle Abnahme des Muskelzitterns auftrat, während die Wärmeproduktion gleichbleibend erhöht war (Davis, 1961). Eine Verbindung zwischen Adipositas und der Funktionsstörung von BAT bei Nagern wurde 1979 herausgearbeitet (Himms-Hagen, 1979). Die Vermutung einer Assoziation von Kälteexposition und der Entstehung von BAT, wurde durch die Untersuchung finnischer Freiluftarbeiter im Vergleich zu Individuen, die überwiegend innerhalb von Räumen arbeiteten, bestätigt (Huttunen et al., 1981).

Anschließend in Vergessenheit geraten, wurde das BAT erst Jahrzehnte später durch die klinische Verwendung kombinierter Positronenemissionstomographie/Computertomographie-Untersuchungen (PET/CT) durch die Nuklearmedizin wiederentdeckt. Neben dem eigentlichen Ziel, metabolisch aktive Tumoren mittels radioaktiv markierter Glukose (^{18}F -Fluorodeoxyglukose- ^{18}F -FDG) zu diagnostizieren, wurde auch das metabolisch äußerst aktive BAT zufällig visualisiert. Mit dem Schwerpunkt der Kälteexposition durchgeführte retrospektive Studien und Experimente bestätigten in der Folge die Anwesenheit funktionell aktiven BATs beim adulten Menschen (Cypess et al., 2009, Saito et al., 2009b, Lichtenbelt et al., 2009, Virtanen et al., 2009).

Neben den klassischen braunen wurde in den letzten Jahren auch den beigen Adipozyten große Aufmerksamkeit zuteil. Als Zellinseln sind sie als Antwort auf einen Kältestimulus im weißen Fettgewebe zu finden, was auch als *Browning* von WAT bezeichnet wird (Vitali et al., 2012b, Bartelt and Heeren, 2014). Ausgehend von einem Zustand der Energiespeicherung haben beige Fettzellen die bemerkenswerte Eigenschaft, die Zellatmung und den Energieverbrauch durch eine starke Aktivierung der Genexpression in einem Umfang zu steigern, welcher dem der braunen Adipozyten

ähnelt. So zeigen aktivierte beige und braune Adipozyten in ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchungen eine ähnlich starke metabolische Aktivität (van der Lans et al., 2014). In einer murinen Studie konnte überdies eine vergleichbare thermogene Kapazität beiger und brauner Adipozyten festgestellt werden (Schulz et al., 2013). In Bezug auf die Zusammensetzung humaner Fettdepots unterstützt die derzeitige Studienlage die Annahme einer Koexistenz beider Zelltypen, da Marker beiger und brauner Adipozyten nachgewiesen werden konnten (Wu et al., 2012, Sharp et al., 2012, Lidell et al., 2013, Cypess et al., 2013, Jespersen et al., 2013). Von besonderem Interesse könnten beige Adipozyten für die Behandlung metabolischer Erkrankungen von Individuen sein, welche keine nennenswerten Mengen des BAT aufweisen (Inagaki et al., 2016).

Um der Aufgabe der Thermogenese gerecht zu werden, exprimieren thermogene Adipozyten das *Ucp1*. Dies ist von zentraler funktionaler Bedeutung (Cannon and Nedergaard, 2004). Jüngst veröffentlichte Studien liefern zudem Hinweise für eine vom *Ucp1* unabhängige Thermogenese (Kazak et al., 2015, Long et al., 2016). *Ucp1* gehört zur Familie der mitochondrialen Anionen-Transporter und übt seine Funktion in thermogenen Adipozyten als Fettsäure-aktivierter H^+ -Carrier aus (Fedorenko et al., 2012). An der inneren Mitochondrienmembran entkoppelt es den Elektronenfluss in der Atmungskette von der ATP-Produktion (Cannon and Nedergaard, 2004). Dieser Prozess führt zur Wärmeproduktion (Cannon and Nedergaard, 2004).

Klassische braune Adipozyten weisen im basalen und im stimulierten Zustand eine hohe *Ucp1*-Expressionsrate auf. In beigen Adipozyten ähnelt die basale *Ucp1*-Expressionsrate der des weißen Adipozyten, während die *Ucp1*-Expressionsrate im aktivierten Zustand mit der des braunen Adipozyten vergleichbar ist (Petrovic et al., 2010) (Tabelle 1). Generell unterscheidet sich der Anteil aktiven BATs am Körpergewicht zwischen Maus und Mensch. Während bei Mäusen das BAT mit 1 bis 5 Prozent zum Körpergewicht beiträgt, weisen adulte Menschen einen prozentualen Anteil von 0,05 bis 0,1 auf (Bartelt et al., 2012, Enerback, 2010). Die Funktion des UCP1 ist bei beiden Spezies jedoch qualitativ vergleichbar (Porter et al., 2016).

Braune und beige Adipozyten exprimieren eine Reihe gleicher Gene, welche für ihre thermogene Funktion wesentlich sind (*Ucp1*, *Pgc-1 α* , *Prdm16*) (Kajimura et al., 2015). Dennoch weist jeder Zelltyp eine spezifische Genexpression auf. So konnten Gene identifiziert werden, welche entweder in braunen (*Zic1*) oder beigen (*Cd137*, *Tmem26*, *Tbx1*) Adipozyten stärker exprimiert werden und somit als Marker fungieren können (de Jong et al., 2015).

Weitere Unterschiede verlangen die Abgrenzung beiger von braunen Adipozyten als eigenständigen Zelltyp. Ein fundamentaler Unterschied besteht in der Entstehung der Adipozyten (Tabelle 1). Bei der Genese beiger Adipozyten wird von einer Koexistenz unterschiedlicher Prozesse ausgegangen (Rosenwald and Wolfrum, 2014). Verschiedene Studien zeigen, dass beige Adipozyten ei-

nerseits *de novo* aus Vorläuferzellen, welche sich von den anderen Adipozytentypen unterscheiden, heranreifen können (Lee et al., 2012, Schulz et al., 2011, Wu et al., 2012). Andererseits existiert der reversible Mechanismus der Transdifferenzierung aus weißen Adipozyten (Himmshagen et al., 2000, Barbatelli et al., 2010, Rosenwald et al., 2013). Zudem wurde gezeigt, dass sie sich zusammen mit Kapillarnetzwerken als Antwort auf proangiogene Faktoren entwickeln (Min et al., 2016).

Braune Adipozyten können in der Abstammung weder den beigen noch den weißen Adipozyten zugeordnet werden, sondern teilen sich die Vorläuferzellen mit Skelettmuskelzellen. Beide stammen sie von einer *myogenic factor 5*-exprimierenden myogenen Zelllinie ab (Seale et al., 2008). Ferner zeigt sich eine unterschiedliche Regulierung der Entwicklung der Adipozytentypen an genetisch manipulierten Mausmodellen. Eine genetische Variabilität wirkte sich zwar auf die Entwicklung beiger Adipozyten, nicht aber auf die Entwicklung klassischer brauner Adipozyten aus (Xue et al., 2007).

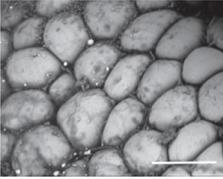
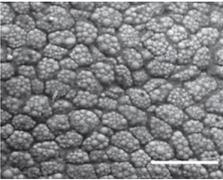
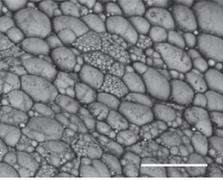
	Elektronenmikroskop. Aufnahme	Zellulärer Ursprung	Mitochondrien- gehalt	Basale UCP1- Expression	Stimulierte UCP1- Expression
Weiß		Adipogene Myf 5 ⁻ Zellen	niedrig	keine	keine
Braun		Myogene Myf 5 ⁺ Zellen	hoch	hoch	hoch
Beige		Myf 5 ⁻ Zellen	hoch	niedrig	hoch

Tabelle 1 | Charakterisierung weißer, brauner und beiger Adipozyten

Während weiße Adipozyten durch einen univakuolären Lipidtropfen gekennzeichnet sind, weisen braune Adipozyten eine multivakuoläre Struktur auf. Beige Adipozyten sind nach pharmakologischer Aktivierung der β_3 -adrenergen Rezeptoren als Inseln multivakuolärer Zellen im WAT zu finden, sog. *Browning*. Braune Adipozyten weisen schon im basalen Zustand hohe Ucp1-Expressionsraten auf. Maßstabballen: 50 μm . (adaptiert nach (Bartelt and Heeren, 2014).

Das braune Fettgewebe weist eine gute Kapillarisation auf und ist gut mit sympathischen Neuronen ausgestattet (Zingaretti et al., 2009). Der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), ein

wichtiges Signalmolekül der Vaskulo- und Angiogenese, ist in BAT im Vergleich zu WAT stärker exprimiert (Asano et al., 1999, Asano et al., 1997). Die gute Kapillarisation ist essentiell für die Funktion des braunen Fettgewebes, da es zum einen die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gewährleistet und zum anderen für den Abtransport und die Verteilung der produzierten Wärme sorgt. So weist das BAT eine mehr als doppelt so hohe Perfusion auf, wenn Menschen der Kälte ausgesetzt sind (Orava et al., 2011). Auch für die Entwicklung der braunen Adipozyten ist VEGF von Bedeutung (Bagchi et al., 2013). Während die Anwesenheit von VEGF zu einer erhöhten Proliferation brauner Adipozyten führt, mündet eine Blockierung von mit dem VEGF verbundenen Signalwegen in einer vermehrten Apoptose brauner Adipozyten (Bagchi et al., 2013).

Die Bedeutung der sympathischen Innervation für die Funktion des BAT zeigt sich an klassischen Denervierungsstudien (Rothwell and Stock, 1984, Takahashi et al., 1992). Die chirurgische Denervierung des BAT resultiert in der Reduktion seiner Funktion (Rothwell and Stock, 1984, Takahashi et al., 1992). In WAT korreliert die Dichte der sympathischen Innervation mit der Neigung *Browning* zu zeigen (Murano et al., 2009).

Ein zunehmend wachsendes Interesse wird dem BAT als sekretorischem Organ zuteil. Die sezernierten regulatorischen Moleküle, sogenannte Batokine, tragen zu den metabolischen Auswirkungen der BAT-Aktivierung bei und unterstützen Prozesse, welche für die Rekrutierung des BAT bei thermogener Stimulation wichtig sind (Villarroya et al., 2017). So fördern auto- und parakrin wirkende Moleküle, wie beispielsweise *nerve growth factor*, *fibroblastic growth factor 21* und *vascular endothelial growth factor-A*, das Wachstum, die Vaskularisierung, die Innervation und die Durchblutung des BAT (Villarroya et al., 2017).

Endokrin wirkende Moleküle, wie beispielsweise *insulin-like growth factor 1* und *interleukin-6* wurden als wichtige Mediatoren der antidiabetischen Konsequenzen der BAT-Aktivierung identifiziert (Gunawardana and Piston, 2012, Stanford et al., 2013).

1.2 Anatomische Lage distinkter humaner Fettgewebsdepots

Hinlänglich bekannt sind die Lokalisationen weißen Fettgewebes. Es ist an verschiedenen Stellen im menschlichen Körper vorhanden. Dabei gilt das oberflächliche, subkutane Fettgewebe als typisch weißes Fettgewebe. Denn dort sind, anders als in anderen Fettdepots, unter physiologischen Bedingungen auch nach Kälteexposition kaum thermogene Adipozyten nachweisbar (van der Lans et al., 2013).

Die Erforschung der anatomischen Lage thermogener Fettgewebe reicht zurück bis in die 70er Jahre. Die früher durch histologische Untersuchungen von Biopsien bei Säuglingen und Autopsien

gewonnenen Erkenntnisse werden durch moderne radiologische und molekularbiologische Methoden laufend erweitert. Die umfangreichen Forschungsergebnisse aus murinen Studien können nur teilweise auf den Menschen übertragen werden, da die zwei Spezies bezüglich der anatomischen Lage thermogener Fettgewebe Unterschiede aufweisen.

Die anatomische Lage thermogener Fettgewebe im adulten Menschen entspricht, von einem Unterschied abgesehen, im Wesentlichen der Lage im menschlichen Säugling. Ebenso wie Mäuse weisen Säuglinge ein ausgeprägtes interskapuläres thermogenes Fettpolster auf, welches im adulten Organismus nicht mehr zu finden ist (Heaton, 1972, Lidell et al., 2013, Astrup et al., 1984). Die Hauptdepots im adulten Menschen liegen zervikal und supraklavikulär und setzen sich nach lateral und kaudal fort (Cypess et al., 2009, Virtanen et al., 2009, Jespersen et al., 2013). Thermogene Adipozyten befinden sich an der Ventralseite des Halses, und zwar prävertebral auf dem *Musculus longus colli* und entlang der *Vagina carotica*, wobei eine zunehmende Expression thermogener Marker verzeichnet wird, umso profunder das Gewebe liegt (Cypess et al., 2013). Doch auch oberflächlich ist thermogenes Fettgewebe superfizial und lateral des *Musculus sternocleidomastoideus* lokalisierbar (Cypess et al., 2009). ¹⁸F-FDG-PET/CT-Aufnahmen zeigen bei einigen Probanden zudem kleinere Depots medial des Schultergelenks zwischen den *Musculi subscapularis* und *pectoralis* und dorsal des *Plexus brachialis*, außerdem entlang der thorakalen und abdominalen Wirbelsäule, paraaortal und perirenal (Cypess et al., 2009). Die molekularbiologische Analyse von Biopsien aus dem Thorax bestätigen die Anwesenheit thermogener Adipozyten im epikardialen Fettgewebe und im Fettkörper des vorderen Mediastinums (Sacks et al., 2009, Cheung et al., 2013). Weiterhin wurde in einer postmortem-Studie humanes thermogenes Fettgewebe mittels Magnet-Resonanz-Tomographie identifiziert und biopsiert. Die Auswertung der Genexpressionsprofile der entnommenen Gewebe zeigt zusätzlich zu den bereits genannten Lokalisationen weitere Depots. Insbesondere beige Marker sind im Fettgewebe des hinteren Mediastinums, intraabdominal im Mesenterium, sowie retroperitoneal detektierbar (Sharp et al., 2012). Ein subkutanes inguinales Depot, welches bei Mäusen *Browning* aufweist, ist beim Menschen bisher nicht identifiziert worden (Seale et al., 2011).

Unter ausgeprägt pathologischen Zuständen treten thermogene Adipozyten in weiteren Lokalisationen auf. Dass *Browning* in subkutanem Fettgewebe in Perioden schwersten und anhaltenden adrenergen Stresses möglich ist, zeigt eine Studie, die Opfer schwerer Verbrennungen untersuchte (Sidossis et al., 2015). Beobachtet wird zudem eine Zunahme thermogener Fettgewebe bei Patienten, welche ein Phäochromozytom haben. Dieser Katecholamin-sezernierende Tumor des Nebennierenmarks induziert *Browning* in perirenal und omentalen Fettdepots (Vergnes et al., 2016, Frontini et al., 2013). Interessanterweise zeigen solche Patienten mit hohen Plasmaspiegeln des Katecholamin-Abbauproduktes Metanephrin neben der erhöhten BAT-Aktivität zusätzlich

auch einen niedrigeren BMI, einen geringeren Hüftumfang und weniger viszerale Adipositas (Wang et al., 2011).

1.3 Regulierung der Differenzierung und Aktivierung thermogener Adipozyten

Die Regulierung der Differenzierung und Aktivierung thermogener Adipozyten wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Hormone gesteuert. Diese werden lokal vom Fettgewebe selbst oder anderen metabolisch aktiven Organen, wie Gehirn, Muskel, Herz und Leber, auf physiologische Reize hin sezerniert (Heeren and Munzberg, 2013). Über intrazelluläre Signalkaskaden werden diese physiologischen Aktivatoren auf die transkriptionelle Ebene im Nukleus des thermogenen Adipozyten übersetzt. Dort sind unter anderem nukleäre Rezeptoren, wie beispielsweise *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), sowie ihre zugehörigen transkriptionellen Co-Aktivatoren wie *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 α* (Pgc-1 α) und *PR domain zinc finger protein 16* (Prdm16) entscheidend. Ihre Aktivierung ermöglicht die Entwicklung thermogener Adipozyten und fördert eine vermehrte Ucp1-Expression, welche das thermogene Fettgewebe in der Summe zur Ausübung seiner Funktion befähigt. Die experimentelle Auseinandersetzung mit dem Thema der Regulation thermogener Fettgewebe geschah bisher schwerpunktmäßig für murine braune Adipozyten. Doch könnte die Entwicklung und Aktivierung beim Menschen und in beige Adipozyten ähnlichen Mechanismen unterliegen.

Als Antwort auf physiologische und umweltbedingte Veränderungen wird die Thermogenese im Fettgewebe aktiviert. Der weitaus wichtigste physiologische Aktivator der Thermogenese ist die Kälte, im Sinne einer Temperaturabweichung unter die Spezies-spezifische Thermoneutralität. Eine prolongierte Kälteexposition induziert systemische hormonelle Veränderungen und eine Erhöhung des sympathetischen Tonus in den Fettgeweben. Dies führt zu einer erhöhten Menge an Ucp1, verstärkter mitochondrialer Biogenese sowie Hyperplasie und Hypertrophie des braunen Fettgewebes (Lowell and Spiegelman, 2000, Bukowiecki et al., 1982). Humane Studien bestätigten wiederholt, dass die zwei-bis dreistündige Exposition gesunder Probanden gegenüber Temperaturen von 15 °C bis 19 °C eine Erhöhung der ¹⁸F-FDG-Aufnahme ins BAT, begleitet von einer Erhöhung des Noradrenalin-Plasmaspiegels und einer Erhöhung des Energieverbrauchs, bewirkt (Yoneshiro et al., 2011, Orava et al., 2011, Muzik et al., 2013, Ouellet et al., 2012). Zudem erhöht sich im Winter die Menge aktiven BATs bei humanen Probanden im Vergleich zum Sommer (Saito et al., 2009b). Der stimulierende Effekt von Kälte kann auch durch die Aktivierung des β_3 -Rezeptors, wie beispielsweise durch CL316,243 nachgeahmt werden.

Die an sensorischen Neuronen gewonnenen Informationen über die thermischen Verhältnisse werden zentral durch den Hypothalamus integriert. Im anterioren Teil findet sich die preoptische Region, welche für die Thermoregulation des Organismus von großer Bedeutung ist. Letztendlich provoziert ein Kältereiz die Ausschüttung des primär bedeutsamen Transmitters Noradrenalin aus peripheren sympathischen Neuronen. Unabhängig davon wurde auch die Existenz eines Kälterezeptors bestätigt, welcher die Thermogenese unabhängig vom sympathischen Nervensystem in einer Zell-autonomen Weise stimuliert (Ye et al., 2013, Rossato et al., 2014, Ma et al., 2012).

Von Kältereizen abgesehen, kann die Aktivierung braunen Fettgewebes auch durch endokrine Faktoren erfolgen. So wurde gezeigt, dass Schilddrüsenhormone ebenso wie *bone morphogenetic proteins*, *fibroblast growth factors* und auch das vom Muskel sezernierte Protein Irisin *Browning* stimulieren können (Heeren and Munzberg, 2013, Bostrom et al., 2012). Studien zur Aktivierbarkeit von BAT in adipösen murinen Modellen mittels *Fibroblast Growth Factor 21* befinden sich derzeit in der präklinischen Phase (Schlein et al., 2016). Im Kontext der Energiehomöostase physiologisch von Bedeutung ist zudem die *diet-induced thermogenesis*, welche der Aufnahme einer fettreichen Mahlzeit folgt (Rothwell and Stock, 1979).

Das peripher ausgeschüttete Noradrenalin realisiert seine Wirkung durch die Bindung an β_3 -adrenerge Rezeptoren, welche primär in braunen Adipozyten zu finden sind (Cannon and Nedergaard, 2004). Lange Zeit als unerlässlich angesehen, zeigen Studien nun, dass der β_3 -Rezeptor für die Initiierung des thermogenen transkriptionellen Programmes zumindest in braunen Adipozyten verzichtbar ist (Mattsson et al., 2011, Susulic et al., 1995, de Jong et al., 2017). Von Bedeutung im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist zudem, dass β -adrenerge Rezeptoren pharmakologisch durch Antagonisten gehemmt werden können.

Findet die Bindung an den β_3 -Rezeptor jedoch statt, resultiert dies in der Initiierung einer intrazellulären Signalkaskade. G_s -Protein-vermittelt erfolgt die Aktivierung der Adenylatzyklase mit konsekutivem intrazellulärem Anstieg des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP) (Cannon and Nedergaard, 2004). cAMP ist ein entscheidender *second messenger* in der Funktion braunen Fettes, da er die Expression von Genen, wie *Ucp1*, *Pgc-1 α* und *Type II iodothyronine deiodinase (Dio2)* stimuliert. Diese nehmen Schlüsselrollen in der Thermogenese ein. Steigende intrazelluläre cAMP-Konzentrationen aktivieren die Proteinkinase A, welche ihrerseits mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert (Cao et al., 2004). Der MAPK-Signalweg führt in der Folge zur Phosphorylierung wichtiger Transkriptionsfaktoren. (Abbildung 1)

Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist das *cAMP-response element-binding protein* (CREB), welches die Expression der *Dio2* kontrolliert (Martinez-deMena and Obregon, 2005). Die Funktion dieses Enzyms liegt in der Deiodierung des vorrangig sezernierten Schilddrüsenhormons Thyroxin (T_4) zu dem wirksameren Trijodthyronin (T_3) im braunen Fettgewebe (Abbildung 1). Der nor-

adrenergen Stimulierung folgt eine erhöhte Expression von Dio2, was sich auf den lokalen T₃-Spiegel positiv im Sinne einer Erhöhung auswirkt (Silva and Larsen, 1983). Die folgende Stimulierung von Schilddrüsenhormonrezeptoren (*thyroid hormone receptor-THR*) im BAT steigert einerseits, vermittelt durch die Isoform THR α 1, die Sensitivität des Gewebes gegenüber Katecholaminen und ist andererseits, vermittelt über die Isoform THR β , von großer Bedeutung für die Ucp1-Expression (Ribeiro et al., 2001, Ribeiro et al., 2010). Die Bindung von T₃ an den Thyroid-Hormon-Rezeptor im *Ucp1*-Promotor resultiert in einer gesteigerten Ucp1-Expression (Ribeiro et al., 2010). Ein weiteres Ziel des T₃ ist der Promotor des Gens *Pgc-1 α* . Über ein *thyroid hormone response element* in der Gensequenz wirkt sich ein erhöhter T₃-Spiegel förderlich auf die Expression von *Pgc-1 α* aus (Wulf et al., 2008). Interessanterweise kann Dio2 mit dem Resultat des erhöhten Energieverbrauchs im BAT auch durch Gallensäuren aktiviert werden, was seine Relevanz in der Energiehomöostase des Organismus verdeutlicht (Watanabe et al., 2006, Worthmann et al., 2017). Zudem ist Dio2 auch im Gehirn zu finden, wo es über definierte Signalwege auch zentral Einfluss auf den Metabolismus nimmt (Coppola et al., 2007, Lopez et al., 2010). Bekannt sind diese Mechanismen durch murine Untersuchungen. Dass ein hoher Schilddrüsenhormonspiegel auch mit einer höheren Aktivität des humanen BATs einhergeht, zeigt eine Studie an hyperthyreoten Patienten (Lahesmaa et al., 2014).

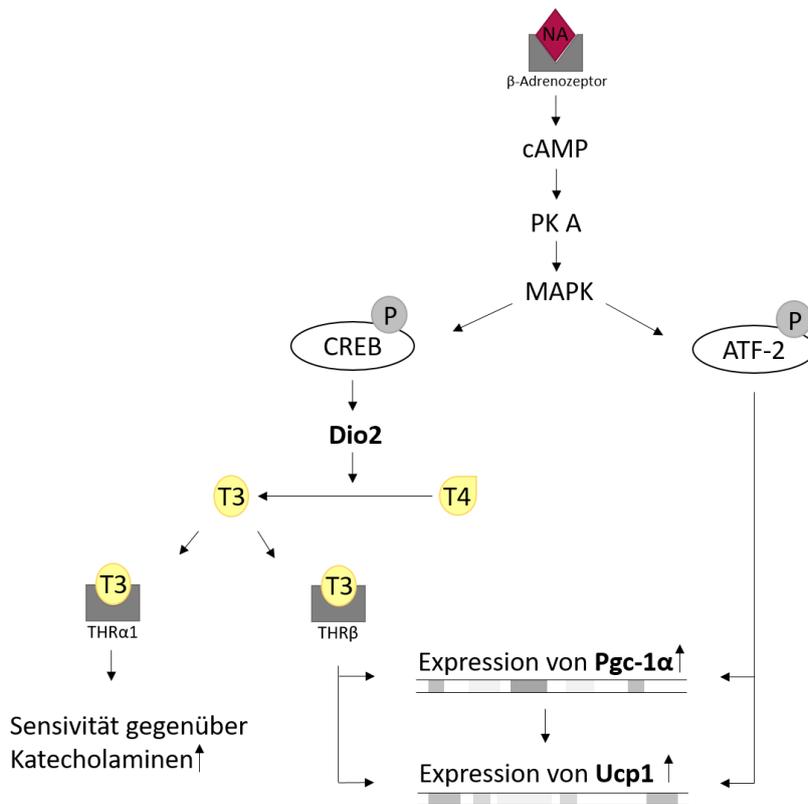


Abbildung 1 | Aktivierung von Ucp1, Pgc-1 α und Dio2

Die Aktivierung des β -Adrenozeptors resultiert in der Initiierung einer Signalkaskade, die in Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (CREB, ATF-2) mündet. In der Folge werden Gene (*Dio2*, *Ucp1*, *Pgc-1 α*) induziert, welche in der Thermogenese von Bedeutung sind. Abkürzungen: Noradrenalin (NA); cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP); Proteinkinase A (PK A); Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK); Phosphat (P); *cAMP-response element-binding protein* (CREB); *Activating transcription factor 2* (ATF-2); Trijodthyronin (T3); Thyroxin (T4); *Thyroid hormone receptor α 1/ β* (THR α 1/ β).

Neben CREB wird auch der Transkriptionsfaktor *Activating transcription factor 2* (ATF-2) durch die MAPK phosphoryliert (Abbildung 1). Dieser initiiert in der Folge wiederum die Transkription von *Ucp1* und *Pgc1 α* (Cao et al., 2004). Einst entdeckt als Kälte-induzierter Interaktionspartner von Ppar- γ in braunem Fett, gilt der transkriptionale Coaktivator Pgc-1 α heute in einer Vielzahl von Zelltypen als wichtigstes regulatorisches Protein der mitochondrialen Biogenese und des oxidativen Metabolismus (Puigserver et al., 1998, Lin et al., 2005). In braunen Adipozyten ist es von wesentlicher Bedeutung für die Ausübung der Funktion der adaptiven Thermogenese als Antwort auf Kälte und β -Agonisten (Leone et al., 2005, Uldry et al., 2006). Die ektopische Expression von Pgc-1 α resultiert nicht nur in murinen, sondern auch humanen, weißen Adipozyten in einer Induktion der Expression von *Ucp1* und weiterer thermogener Komponenten (Puigserver et al., 1998, Tiraby et al., 2003). Die Kommunikation mit dem Gen *Ucp1* wird durch die Bindung von Pgc-1 α an Komplexe aus PPAR- α oder PPAR- γ und Retinoid-X-Rezeptoren, welche wiederum an das *PPAR response element* des *Ucp1*-Promotors andocken, ermöglicht (Hondares et al., 2006, Hondares et al., 2011). Unerheblich ist Pgc-1 α für die Entwicklung braunen Fettgewebes, da sich dieses bei einem Fehlen des Proteins normal ausbildet (Lin et al., 2004).

Als Schlüsselprotein in der Entwicklung brauner Adipozyten von Bedeutung ist das *PR domain zinc finger protein 16* (Prdm16). Dieser transkriptionelle Cofaktor zeigt bei Mäusen in braunen Adipozyten, gegenüber viszeralen weißen Adipozyten, eine hohe Expressionsrate (Seale et al., 2007). Auch in humanem BAT ist *PRDM16* wesentlich reicher vorhanden als im subkutanen WAT (Virtanen et al., 2009, Lee et al., 2011). Prdm16 fungiert als entscheidender molekularer Schalter in der Reifung brauner Adipozyten aus den Myf5-positiven Vorläuferzellen (Seale et al., 2008). Eine ektopische Prdm16-Expression lässt aus Myoblasten sowie aus weißen Adipozytenvorläuferzellen thermogene, *Ucp1*-enthaltende Adipozyten entstehen (Seale et al., 2008). Während Gene, welche spezifisch für weiße Adipozyten sind, unterdrückt werden, wird die Expression von Genen wie *Ucp1*, *Pgc-1 α* , *Dio2* und vieler mitochondrialer Gene aktiviert (Seale et al., 2007, Seale et al., 2008, Kajimura et al., 2008, Kajimura et al., 2010). Dies hat eine entkoppelte Zellatmung und eine stimulierte mitochondriale Biogenese zur Folge. Eine Reduktion des zellulären Prdm16-Gehalts in braunen Präadipozyten führt umgekehrt zu einem Verlust charakteristischer Gene brauner Adipozyten und zu einer Erhöhung der Expression charakteristischer Gene weißer Adipozyten sowie von Myozyten (Seale et al., 2007, Seale et al., 2008). (Abbildung 2)

Ebenfalls von Bedeutung ist Prdm16 beim *Browning* des WAT. Es zeigt eine starke Expression insbesondere in murinem inguinalem WAT, einem für *Browning* sensiblen Fettgewebe (Seale et al., 2011). Zudem ist Prdm16 notwendig, damit eine Rekrutierung beiger Adipozyten, bei einer Stimulierung weißer Adipozyten durch β -adrenerge- oder Ppar- γ -Agonisten, stattfindet (Seale et al., 2011, Ohno et al., 2012). Die metabolischen Auswirkungen zeigen sich an transgenen murinen Organismen. Die Fähigkeit hohe Mengen Prdm16 zu exprimieren, geht bei fettreicher Ernährung

mit einem höheren Energieverbrauch, weniger starker Gewichtszunahme und verbesserter Glukosetoleranz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einher (Seale et al., 2011).

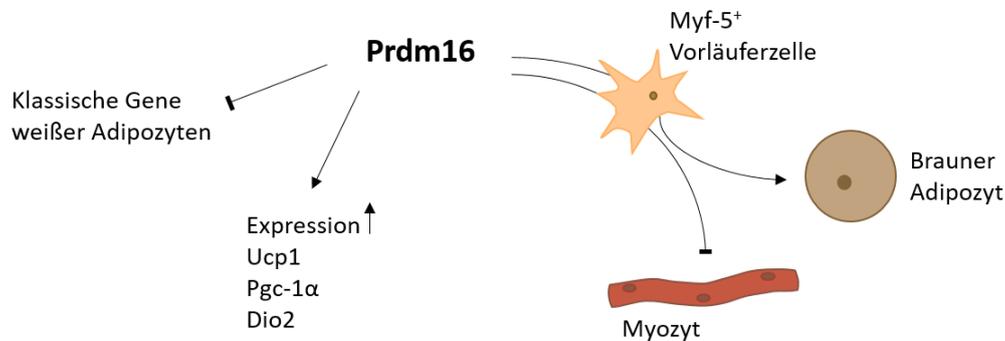


Abbildung 2 | Funktion des Prdm16

Prdm16 fördert die Expression klassischer Gene der Thermogenese und unterdrückt die Expression von Genen weißer Adipozyten. Es fungiert als entscheidender molekularer Schalter in der Reifung brauner Adipozyten aus Myf-5⁺ Vorläuferzellen.

Prdm16 vermittelt seine Funktion vorrangig durch die Modulierung der Aktivität anderer, für die Thermogenese wichtiger Transkriptionsfaktoren. Zu diesen gehören C/EBP β , Ppar- γ , Ppar- α und Pgc-1 α (Seale et al., 2008, Seale et al., 2007, Hondares et al., 2011, Kajimura et al., 2009). Ebenfalls wurden eine Reihe von Faktoren unterschiedlichster molekularer Struktur identifiziert, welche wiederum eine Modulierung der Expression oder Aktivierung von Prdm16 bewirken. Stimulierend wirkt unter anderem ein Zytokin, das knochenmorphogenetische Protein 7 (Tseng et al., 2008, Schulz et al., 2013). Stimulierend wirken auch Thiazolidinedione, welche pharmakologisch in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 von Bedeutung sind (Ohno et al., 2012). Suppressierend wirken neben anderen, die insbesondere im Muskel nachweisbare MicroRNA miR-133 und der transkriptionelle Cofaktor *Transducin-like enhancer protein 3* (Trajkovski et al., 2012, Liu et al., 2013, Villanueva et al., 2013).

1.4 Relevanz des BAT im Metabolismus

Die Aktivierung des BAT durch Kälte resultiert in einer durch die PKA vermittelten Lipolyse, in welcher aus intrazellulär gespeicherten Triglyzeriden (TG) freie Fettsäuren freigesetzt werden (Cannon and Nedergaard, 2004). Diese liefern bei Mäusen bis zu 90 Prozent der Energie, die für die Wärmebildung in den braunen Adipozyten benötigt wird und stellen damit neben Glukose den

Hauptbrennstoff für die Thermogenese (Cannon and Nedergaard, 2004). In der β -Oxidation werden die freien Fettsäuren für die Bildung von Reduktionsäquivalenten benötigt, welche im Folgenden in der Atmungskette im Mitochondrium den Aufbau des Protonengradienten gewährleisten und letztendlich die Ucp1-abhängige Wärmeproduktion ermöglichen (Cannon and Nedergaard, 2004). Überdies bewirken freie Fettsäuren direkt die Aktivierung des Ucp1 (Fedorenko et al., 2012).

Fettsäuren werden über die Blutzirkulation überwiegend als an Proteine gebundene veresterte Triglyzeride von den Orten der Bildung und Aufnahme zu den konsumierenden Organen transportiert. Zum einen werden im Darm resorbierte, als Chylomikronen verpackte Nahrungsfette sezerniert und zum anderen *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) in der Leber in intraprandialen Phasen gebildet (Schlein and Heeren, 2016). Es folgt die intravaskuläre Hydrolyse dieser Triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL), primär durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) und die durch Fettsäuretransporter vermittelte Internalisation der entstandenen freien Fettsäuren in den Muskel oder das Fettgewebe. Neben Chylomikronen und VLDL sind im Lipidstoffwechsel *Low Density Lipoproteins* (LDL) und *High Density Lipoproteins* (HDL) von Bedeutung. Während LDL dem Cholesterintransport von der Leber in die Peripherie dienen, gewährleisten HDL den reversen Cholesterintransport von extrahepatischen Organen zur Leber und sorgen so für eine Beseitigung überschüssigen, proatherogenen Cholesterins aus dem Organismus. Die den metabolischen Ansprüchen gerecht werdende Verteilung wird über die Regulierung der Aktivität der LPL durch Apolipoproteine und *Angiopoietin-like proteins* gesteuert (Nilsson et al., 2011, Davies et al., 2012). Die zirkulierenden, noch Cholesterin-reichen TRL-Remnants werden letztendlich mittels Endozytose von der Leber aufgenommen und dort metabolisiert (Kersten, 2014).

Da die LPL-vermittelte Hydrolyse die Geschwindigkeit der Fettsäureaufnahme bestimmt, nimmt sie eine wichtige Rolle als Gatekeeper im Prozess der Energieverteilung an metabolisch aktive Gewebe ein (Greenwood, 1985). Eine murine Studie zeigt, dass bei einer Kälteaktivierung des BAT eben diese LPL-Aktivität stark stimuliert wird, um die ausreichende Fettsäureversorgung für die Thermogenese sicherzustellen (Bartelt et al., 2011). Eine Manipulation der LPL-Endothel-Bindung kann durch die Gabe von Heparin erfolgen. Heparin-Dosen, welche in etwa der Erhaltungsdosis einer Vollheparinisierung entsprechen, führen zu einer Dissoziation der LPL vom Endothel mit konsekutiv erhöhten intravasalen LPL-Konzentrationen (Chevreuil et al., 1993). Bei einer uneingeschränkten Funktion der LPL an Ort und Stelle, nimmt stimuliertes BAT Triglyzeride mithilfe des Fettsäuretransporters *cluster of differentiation 36* (CD36) in die Zelle auf und sorgt so für einen niedrigeren TG-Plasmaspiegel (Bartelt et al., 2011, Schlein et al., 2016). Zudem erfolgt LPL-abhängig die Internalisierung ganzer TRL-Partikel über das Endothel in die braune Fettzelle (Bartelt et al., 2011). Auch der Plasmacholesterinspiegel wird durch aktiviertes BAT gesenkt, indem die Aufnahme cholesterinreicher Remnants in die Leber beschleunigt wird (Berbee et al.,

2015). Mäuse mit humanisiertem Lipoproteinprofil sind durch eine Aktivierung des BAT vor einer Hypercholesterinämie und der Entwicklung einer Atherosklerose geschützt (Berbee et al., 2015). Erst kürzlich wurde durch Bartelt et al. gezeigt, dass auch der HDL-Metabolismus an die metabolische Aktivität thermogener Adipozyten gekoppelt ist. So wird sowohl der HDL-Umsatz, als auch der Rücktransport des Cholesterins aus der Peripherie zur Leber gesteigert, wenn Thermogenese betrieben wird (Bartelt et al., 2017). Überschüssiges Cholesterin wird folgend in Gallensäuren umgewandelt, welche ihrerseits aktivierend aufs BAT wirken (Worthmann et al., 2017). Anhand dieser Befunde wird das kardiovaskulär protektive Potential des BAT deutlich.

Ebenso schlägt sich der Verbrauch von Glukose durch aktivierte braune Adipozyten im Stoffwechsel nieder. Nach oraler Gabe zeigten adipöse Mäuse eine verstärkte Glukoseaufnahme in das aktivierte BAT, mit dem Resultat einer Normalisierung des Ergebnisses eines oralen Glukosetoleranztests zur Evaluierung einer Glukosetoleranzstörung (Bartelt et al., 2011). Dies wird auch durch eine Transplantation von braunem Fettgewebe erreicht. Bei Empfänger-Mäusen war nicht nur eine verbesserte Glukose-Toleranz zu beobachten, sondern auch die Beseitigung einer Diät-induzierten Insulinresistenz (Stanford et al., 2013).

Auch beim Menschen leisten Glukose und Fettsäuren einen wichtigen Beitrag zur Steigerung des oxidativen Metabolismus im kälteaktivierten thermogenen Fettgewebe (Ouellet et al., 2012). Im Allgemeinen kann durch eine Aktivierung des BAT mit dem β_3 -Agonisten Mirabegron der Grundumsatz des Organismus um rund 13 Prozent erhöht werden (Cypess et al., 2015). Ebenso weist kälteaktiviertes BAT eine Verdopplung der Perfusion auf, welche wiederum positiv mit dem Energieverbrauch des Organismus korreliert (Orava et al., 2011). Darüber hinaus resultiert eine chronische Kälteexposition (zwei Stunden täglich für sechs Wochen) in einer erhöhten BAT-Aktivität und einem signifikantem Verlust an Körperfettmasse (Yoneshiro et al., 2013a). Dabei zeigt sich die Reduktion umso größer, je höher die BAT-Aktivität des Probanden ist (Yoneshiro et al., 2013a). Insgesamt wird bei einem Vergleich BAT-positiver und BAT-negativer Probanden deutlich, dass diejenigen mit aktivem BAT eine stärkere Kälte-induzierte Thermogenese, einen verstärkten Energieverbrauch und eine verbesserte Glukosehomöostase aufweisen (Chondronikola et al., 2014, Yoneshiro et al., 2013a, Vijgen et al., 2011, Matsushita et al., 2014). Diese Beobachtungen sind unabhängig vom BMI, was Ergebnissen initialer humaner Studien widerspricht. Sie führten zur Annahme einer mit steigendem BMI abnehmenden BAT-Aktivität, wobei eine Korrelation teilweise nur altersassoziiert festgestellt wurde (Lichtenbelt et al., 2009, Saito et al., 2009a). So fanden verschiedene Arbeitsgruppen eine abnehmende BAT-Aktivität mit steigendem Alter und gleichzeitig höherem BMI. Bei jungen, schlanken Patienten ist die BAT-Aktivität im Allgemeinen stärker (Cypess et al., 2009, Saito et al., 2009a, Lichtenbelt et al., 2009). Auch in einer Untersuchung des Fettgewebes aus den tiefen Halsschichten zeigen jüngere und gleichzeitig schlanke Patienten eine höhere BAT-Aktivität als ältere Patienten mit höherem BMI (Zingaretti et al., 2009).

Dennoch zeigt eine jüngst veröffentlichte Studie, dass eine Rekrutierung aktiven BATs durch eine Kälteakklimatisierung (bis zu sechs Stunden pro Tag für zehn Tage) auch bei adipösen Patienten möglich ist (Hanssen et al., 2016b).

Die detaillierte Erueierung der Relevanz einer BAT-Aktivierung für den Metabolismus wird mithilfe der hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Technik untersucht. Diese Methode dient der Quantifizierung der insulinabhängigen Glukoseverwertung. Gesunde Probanden, welche nach unterschiedlichen Protokollen kälteakklimatisiert wurden, zeigen eine erhöhte BAT-Aktivität gepaart mit einer verbesserten Insulinsensitivität (Chondronikola et al., 2014, Lee et al., 2014). Auch Probanden mit Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 zeigen auf eine BAT-Aktivierung hin eine verstärkte Glukoseaufnahme und eine Verbesserung der Insulinsensitivität (Hanssen et al., 2015, Hanssen et al., 2016a). Zur Steigerung des basalen Energieverbrauchs tragen, ähnlich wie bei Mäusen, Glukose mit rund 30 Prozent und Fettsäuren mit rund 70 Prozent bei (Chondronikola et al., 2014, Ma and Foster, 1986). Diese aus der Zirkulation stammenden Substrate dienen vermutlich der Kompensation der intrazellulär verbrauchten Lipide (Blondin et al., 2017b). Denn eine kürzlich von Blondin et al. veröffentlichte Studie zeigt, dass die Substrate für die adaptive Thermogenese beim Menschen insbesondere aus intrazellulär gespeicherten Lipiden stammen (Blondin et al., 2017a). Ob sich die BAT-Aktivierung auf die Komponenten im Lipidmetabolismus im humanen ebenso wie im murinen Organismus auswirkt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nur ansatzweise untersucht. So korrelieren die LPL-Expression ebenso wie die Expression von Genen, welche typisch für braune Adipozyten sind, in epikardialem Fettgewebe dyslipidämischer Patienten positiv mit dem HDL-Plasmaspiegel und negativ mit dem Plasmaspiegel der Triglyzeride (Chechi et al., 2013). Eine potentielle Rolle des BAT im Lipidmetabolismus unterstreicht auch eine Studie der Arbeitsgruppe Chondronikola et al., welche übergewichtige und adipöse Probanden in vivo anhand etablierter metabolischer Untersuchungsmethoden untersuchte. Der Beitrag kältestimulierten BATs zur Lipidmobilisation zeigt sich in der positiven Korrelation mit der Oxidation freier Fettsäuren, der Lipolyse im Fettgewebe und mit dem Triglyzerid-Freie-Fettsäuren-Cycling (Chondronikola, 2016). Eine verzögerte Auswirkung zeigt sich für die Plasmaspiegel der TG und Lipoproteine (Chondronikola, 2016). Während diese nach fünf Stunden Kälteexposition keine Änderung aufweisen, wurde am darauf folgenden Tag eine Abnahme der TG- und VLDL-Plasmaspiegel verzeichnet (Chondronikola, 2016). Die molekulare Untersuchung supraklavikulärer Proben thermogenen Fettgewebes zeigt eine Hochregulierung der Gene *UCP1*, *CD36* und *LPL* (Chondronikola, 2016).

1.4.1 Erhöhung des Energieumsatzes durch BAT-Aktivierung

Die Ausnutzung des therapeutischen Potentials einer Aktivierung der Thermogenese steht noch aus. Verschiedene pharmakologische Angriffspunkte, wovon einer der β_3 -Rezeptor ist, können in Betracht gezogen werden. Während frühere Aktivierungsversuche mit β_3 -adrenergen Agonisten aufgrund starker unerwünschter sympathomimetischer Wirkungen scheiterten, stellt der β_3 -adrenerge Agonist Mirabegron ein vielversprechendes Pharmakon dar (Cypess et al., 2015). Zugelassen ist dieses Medikament für die Therapie der hyperaktiven Blase. Eine von Patienten gut tolerierte Dosis von 200 mg/Tag ist, anders als Noradrenalin, in der Lage, die Thermogenese in humanem BAT zu stimulieren (Cypess et al., 2015, Cypess et al., 2012). Dennoch können potentielle Nebenwirkungen, wie beispielsweise Tachykardie, Bluthochdruck und Harnwegsinfektionen, den breiten Einsatz beim Menschen limitieren (Thiagamoorthy et al., 2016). Diese unerwünschten Wirkungen fehlen bei einer Aktivierung durch Kälte (Cypess et al., 2012). Der Bestimmung kälteaktivierter molekularer Targets in zentralen und peripheren Organen kommt daher eine besondere Bedeutung zu (Heeren and Munzberg, 2013).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Thermogene Fettgewebe stellen ein vielversprechendes Target zur Therapie der Adipositas und Adipositas-bedingter Erkrankungen dar. Die Erforschung der Lokalisation, Morphologie und Funktion an murinen Modellen ist aufschlussreich, kann die humane Erforschung jedoch nicht vollständig ersetzen. Bildgebende Verfahren, wie die kombinierte ^{18}F -FDG-PET/CT eignen sich nur bedingt dies zu untersuchen, da sie nur eine indirekte Darstellung durch die Aufnahme des Tracers Glukose erlauben. Eine Ergänzung der so gewonnenen Erkenntnisse durch alternative Untersuchungsmethoden ist notwendig. Durch die molekular-biochemische Bestimmung von Markern aus Fettgewebsbiopsien gelingt die genaue Charakterisierung und Lokalisierung thermogener Adipozyten. Anhand dieses Verfahrens sollen in dieser Arbeit verschiedene humane Fettgewebsdepots, die vor und nach einer Herzoperation am geöffneten Thorax gewonnen wurden, bezüglich der Existenz thermogener Adipozyten sowie der thermogenen Aktivität und Kapazität analysiert werden. Operativ-bedingt erfolgte die kurzzeitige Applikation eines Kältereizes, so dass in diesen Proben die spezifische Aktivierbarkeit des thermogenen Programms mittels Expressionsanalysen bei einzelnen Patienten bestimmt werden sollte. Durch die Wahl eines therapeutisch-operativen Kontextes zur Gewebegewinnung sollten so schwer zugängliche thorakale Depots untersucht werden.

2 Material und Methoden

Dieses Kapitel stellt die im Rahmen der Promotion angewandten Techniken und verwendeten Materialien zusammen. Die Gewinnung der Gewebeproben wird beschrieben und die Bedingungen während der Gewinnung werden erläutert. Dazu wird auf den Operationsablauf und auf Aspekte der Anästhesie eingegangen. Die Methoden der sich anschließenden molekularbiologischen Analyse werden dargelegt und die Verfahren der statistischen Datenanalyse genannt.

2.1 Gewinnung humaner Fettgewebsproben

Die für die vorliegende Arbeit untersuchten humanen Gewebeproben stammen von Patienten, die sich im Zeitraum von Januar 2013 bis September 2013 am Universitären Herzzentrum Eppendorf behandeln ließen. Alle Patienten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken ab.

Die Studie basiert auf Daten von 15 Patienten, die sich einer Operation am eröffneten Thorax unterzogen. Dabei handelte es sich in sechs Fällen um eine aortokoronare Bypassoperation zur Revaskularisierung bei bestehender koronarer Gefäßerkrankung und in einem Fall um die Revaskularisierung zur Behandlung eines Myokardinfarktes. Die elektive Operation zum Ersatz der Aortenklappe zur Behandlung einer Aortenstenose erfolgte bei einem Patienten. Bei zwei weiteren Patienten wurde bei kombiniertem Herzklappenvitium zusätzlich zur Aortenklappe auch die Mitralklappe ersetzt. Einer Kombination aus aortokoronarer Bypassoperation und Klappenersatz unterzogen sich fünf Patienten. Eine detaillierte Auflistung über die bei den Patienten durchgeführten Operationen und Operationsindikationen findet sich in Tabelle 2.

Die Auswahl der Patienten für die Studie erfolgte durch die Operateure. Als Kriterium galt der intraoperative Einsatz einer Hypothermie mit unabdingbarer Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) zur extrakorporalen Zirkulation. Die Hypothermie dient dem Schutz des Myokards vor schädlichen Metaboliten und Schäden durch eine Hypoxie. Dies wird durch eine Herabsetzung des Metabolismus und damit einhergehender Reduzierung des Sauerstoffbedarfs erreicht. Die gewählte Operationsmethode schien potentiell geeignet, den Einfluss von Hypothermie auf humanes Fettgewebe zu untersuchen und damit die Fragestellung dieser Arbeit zu bearbeiten.

Patient	Eingriff	Operationsindikation
1	ACB	Koronare Eingefäßerkrankung
	AKE	Hochgradige Aortenklappenstenose
2	AKE	Kombiniertes Aortenklappenventrium mit führender hochgradiger Stenose
3	ACB	Koronare Eingefäßerkrankung mit hochgradiger Stenose des Ramus interventricularis anterior
	AKE	Hochgradige Aortenklappeninsuffizienz bei Endokarditis
4	ACB	Myokardinfarkt bei bekannter koronarer Zweigefäßerkrankung
5	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung
6	ACB	Koronare Zweigefäßerkrankung mit Beteiligung des linken Hauptstammes
7	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung mit Hauptstammstenose
8	AKE	Hochgradige Aortenklappenstenose
	MKE	Mittelgradige Mitralklappeninsuffizienz
9	ACB	Koronare Herzkrankheit
	MKE	Kombiniertes Mitralklappenventrium mit führender hochgradiger Stenose und leichtgradiger Insuffizienz
10	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung
11	ACB	Koronare Eingefäßerkrankung
	AKE	Hochgradige Aortenklappenstenose
12	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung
13	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung
14	ACB	Koronare Dreigefäßerkrankung
	MKE	Mitralklappeninsuffizienz Grad III bei Prolaps des posterioren Mitralsegels
15	AKE	Kombiniertes Aortenklappenventrium mit hochgradiger Stenose und mittelgradiger Insuffizienz
	MKE	Kombiniertes Mitralklappenventrium mit mittelgradiger Stenose und mittelgradiger Insuffizienz

Tabelle 2 | Eingriffe und Indikationen pro Patient

Auflistung der Eingriffe und der zugehörigen indizierenden Diagnose für jeden Patienten. Patienten mit den Nummern 1, 3, 8, 9, 11, 14 und 15 unterzogen sich einer kombinierten Operation. Abkürzungen: ACB- Aortokoronare Bypassoperation; AKE- Aortenklappenersatz; MKE- Mitralklappenersatz

2.1.1 Ablauf der Operation

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurde der Patient für den Eingriff in Rückenlage gelagert. Der Zugang zum Herzen erfolgte bei 14 Patienten über die mediane Längssternotomie. Dabei wurde das Sternum in der Mittellinie eröffnet. Bei einem Patienten (Nr. 2) wurde eine Thorakotomie als Zugangsweg gewählt. Für diese wird der Thorax über einen Interkostalraum eröffnet. Die Wahl des Zugangs hatte einen Einfluss auf die Anzahl der gewonnenen Gewebeproben. So konnte bei einer Thorakotomie kein retrosternales Gewebe gewonnen werden, weil dieses im Brustkorb verborgen blieb. Es folgte die Vorbereitung der Patienten auf den Anschluss an die HLM. Diese ermöglichte es dem Operateur am blutleeren, nicht schlagenden Herzen zu operieren. Gleichzeitig machte sie die Gabe weiterer Medikamente notwendig, welche einen zusätzlichen beeinflussenden Faktor für das zu untersuchende Fettgewebe darstellten. Das Herz und die Lunge des Patienten wurden aus dem Kreislauf ausgeschaltet und deren Funktion von der HLM übernommen. Das venöse Blut strömte passiv vom Patienten in die HLM, wurde dort oxygeniert, von Kohlenstoffdioxid befreit und dem Patienten aktiv zugeführt. Integrierte Wärmeaustauscher dienten dem Hal-

ten der Körpertemperatur, externe Wärmeaustauscher machten das Abkühlen des Blutes möglich. Im nächsten Schritt der Operation wurde das Perikard eröffnet. Nach gesicherter Aufhebung der Blutgerinnung mittels Heparin erfolgte die arterielle und venöse Kanülierung der großen Gefäße. Bei der anschließenden extrakorporalen Zirkulation konnte so die Aufnahme des arterialisierten Blutes über die Aorta und die Drainage des venösen Blutes über die Venae cavae superior und inferior gewährleistet werden. Mit Beginn des kardiopulmonalen Bypasses wurde die Körperkerntemperatur des Patienten kontrolliert um 2 °C bis 5 °C gesenkt. Das Ausmaß der Hypothermie wurde vom Kardiotechniker mit dem Operateur abgestimmt und variierte zwischen den Patienten (Tabelle 3). Die folgende Einleitung der Kardioplegie schaffte die optimalen Operationsbedingungen für den anschließenden therapeutischen Eingriff. Für die Abkopplung von der HLM wurde der Patient wieder aufgewärmt. Abschließend wurde das Sternum verschlossen und der Patient zur Überwachung auf die Intensivstation verlegt.

2.1.2 Beschreibung der Gewebegewinnung

Die Abgabe der zwei Probensätze durch den Operateur erfolgte in der Regel zu zwei Zeitpunkten. Der erste Probensatz wurde unter normothermer Bedingung gewonnen, welche nach Eröffnung des Thorax bis zum Einsatz der HLM vorzufinden war. Der zweite Probensatz wurde nach Einleitung der Hypothermie gewonnen. Dabei waren die Patienten mit einer Temperatur zwischen 32,0 °C und 34,0 °C mindestens 30 Minuten hypotherm. Die längste Hypothermiezeit betrug 135 Minuten. Die Zeitpunkte des Gewebeerhalts wurden vom Operationsvorgehen mitbestimmt und variierten deshalb. Bei dem Patienten mit der Nummer 5 erfolgte die Abgabe gestaffelt. Die Abgabe epikardialen, perikardialen, mediastinalen und subkutanen Gewebes erfolgte 30 Minuten nach Beginn der Hypothermie, die Abgabe der retrosternalen Probe erfolgte nach 75 Minuten. Bei den Patienten mit den Nummern 6 und 7 fiel während der Operation die Entscheidung, keine Hypothermie anzuwenden. Eine genaue Dokumentation über die zeitlichen Abläufe der Gewebegewinnung, die gemessenen Temperaturen und die Hypothermiezeiten, aufgelistet für alle Patienten, findet sich in Tabelle 3.

Patient	Uhrzeit bei Beginn der Operation	Uhrzeit bei Beginn der Hypothermie	Uhrzeit bei Gewebeabgabe II	Hypothermiedauer bei Gewebeabgabe II	T (°C) bei Gewebeabgabe I	T (°C) min. bei Gewebeabgabe II
1	09.50 Uhr	k.A.	12.30 Uhr	k.A.	35,5	31,7
2	k.A.	k.A.	verschieden	k.A.	36,3	31,5
3	k.A.	09.35 Uhr	11.00 Uhr	85 min	36,3	31,4
4	k.A.	14.40 Uhr	15.37 Uhr	57 min	35,4	31,9
5	k.A.	10.25 Uhr	10.55 Uhr/ 11.40 Uhr	30 min*/ 75min**	35,3	32,2
6		ohne Hypothermie				
7		ohne Hypothermie			35,3	36,4
8	13.20 Uhr	13.47 Uhr	14.45 Uhr	58 min	k.A.	31,0
9	08.50 Uhr	10.20 Uhr	12.35 Uhr	135 min	k. A.	32,0
10	08.30 Uhr	10.25 Uhr	11.15 Uhr	50 min	34,4	34,0
11	08.20 Uhr	08.50 Uhr	10.50 Uhr	120 min	35,5	32,0
12	14.15 Uhr	15.35 Uhr	16.25 Uhr	50 min	35,1	33,6
13	11.05 Uhr	12.30 Uhr	13.15 Uhr	45 min	36,1	31,9
14	13.20 Uhr	15.15 Uhr	16.20 Uhr	65 min	36,0	31,9
15	13.30 Uhr	13.54 Uhr	15.10 Uhr	76 min	35,1	31,8

Tabelle 3 | Übersicht über zeitliche Eckpunkte im Verlauf der Operation, die Dauer der Hypothermie und die bei Gewebeabgabe gemessenen Temperaturen für jeden Patienten

Gewebeabgabe I erfolgte unter normothermen, Gewebeabgabe II unter hypothermen Bedingungen. Die Hypothermiedauer ergibt sich aus der Differenz der Uhrzeit bei Beginn der Hypothermie und Uhrzeit bei Gewebeabgabe II. Bei dem Patienten mit der Nummer 5 erfolgte die Abgabe gestaffelt. Temperatur-Messort: Blase. Abkürzung: k.A.- keine Angabe. *Depot: epikardial, perikardial, mediastinal, subkutan. **Depot: retrosternal.

Durch den Operateur wurden mittels Kauter jeweils kleine Portionen epikardialen, perikardialen, mediastinalen, retrosternalen und subkutanen Fettgewebes zur Konservierung abgegeben. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Depots. Subkutanes Fett, welches in der Unterhaut zu finden ist, wurde vom Schnittrand der Hautexzision gewonnen. Im oberen Mediastinum befindet sich retrosternales Fett. Dieses entspricht der Thymusinvolution und wurde hinter dem Manubrium sterni gewonnen. Im unteren, vorderen Mediastinum befindet sich dem Zwerchfell aufliegendes mediastinales Fettgewebe. Perikardiales Fettgewebe haftet dem Herzbeutel von innen und außen an. Epikardiales Fettgewebe liegt dem Epikard auf und bettet die Koronargefäße ein. Individuelle Eigenschaften der Patienten hatten einen Einfluss darauf, inwiefern der Probensatz vollständig gewonnen werden konnte. Die Abgabe blieb aus, wenn unzureichende Mengen des Fettgewebes vorhanden waren. Die erhaltenen Proben wurden zweigeteilt, um Genexpressionsanalysen und eventuell folgende histologische Untersuchungen derselben Gewebeprobe zu ermöglichen. Die Aufbewahrung erfolgte in Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss (Cryo Tube™ Vial), die vor Ort unverzüglich mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einem Styroporbehälter gelagert

wurden. Nach dem Erhalt aller Proben erfolgte die Lagerung in einem Tiefkühlschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur biochemischen Analyse.

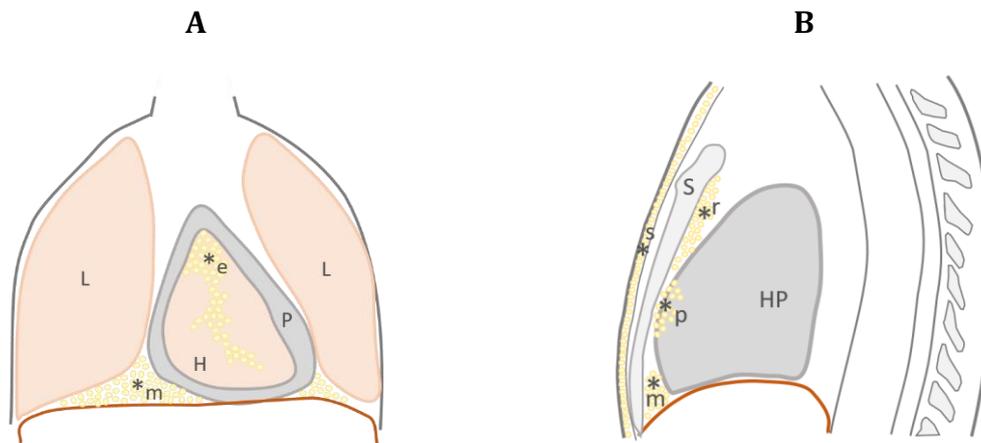


Abbildung 3 | Fettdepots

Schematische Darstellung des Thorax im Frontalschnitt (A) und Sagittalschnitt (B). Im Frontalschnitt (A) ist das Perikard eröffnet dargestellt und die Sicht auf das Herz freigegeben. Fettgewebe ist gelb dargestellt. Die Stelle der Fettgewebesenntnahme ist durch * gekennzeichnet. Fettgewebe wurde an folgenden Stellen gewonnen: epikardial (e), perikardial (p), mediastinal (m), retrosternal (r), subkutan (s). Weitere Abkürzungen: Herz (H), Perikard (P), Lunge (L), Herz im Perikard (HP), Sternum (S).

Die Bestimmung der Temperatur erfolgte über eine Temperatursonde in der Blase des Patienten sowie außerdem simultan über Temperatursonden im arteriellen und venösen Schenkel der HLM, sofern diese vom Kardiotechniker installiert wurden.

2.1.3 Ablauf der Anästhesie und perioperative Medikation

Die während der Anästhesie und Operation verabreichten Medikamente wirken in komplexer Weise auf den Organismus und die untersuchten Fettgewebe. Während sie eine für die Operation erwünschte Wirkung entfalten, ist ein Teil der Medikation in der Lage auch im thermogenen Fettgewebe eine Wirkung auszuüben (vgl. 4.2). Die Dosierung erfolgte nach anästhesiologischen Standards mit individueller, dem Patienten angepasster und den Operationsablauf stützender Einstellung. Die Applikation erfolgte intravenös, sofern nicht anders angegeben. Einen Überblick über alle Medikamente, welche eine Relevanz für die untersuchten Fettgewebe haben, gibt Tabelle 4.

Die Patienten erhielten zur antithrombotischen Prophylaxe eine Low-Dose-Heparin-Injektion. Sie waren mindestens sechs Stunden vor der Operation nüchtern und hatten seit zwei Stunden keine

klare Flüssigkeit mehr zu sich genommen. Alle Patienten bekamen eine balancierte Narkose, bei der Injektions- und Inhalationsanästhetika kombiniert eingesetzt wurden. Zur Prämedikation kamen Benzodiazepine mit anxiolytischer und sedierender Wirkung zum Einsatz. Die Patienten erhielten eine Stunde vor Beginn der Narkoseeinleitung eine oder eine halbe Tablette (7,5/3,75 mg) mit dem Wirkstoff Midazolam. Das Opioid Sufentanil wurde als Analgetikum verabreicht. Zur Muskelrelaxation wurde Pancuronium appliziert. Als volatiles Anästhetikum wurde Sevofluran eingesetzt. Abhängig vom Kreislaufzustand des Patienten wurde als intravenöses Anästhetikum Etomidat oder Propofol infundiert. Durch Opioide und Anästhetika verursachte Blutdruckabfälle wurden neben Lagerungsmaßnahmen durch Infusion des Vasopressors Noradrenalin behandelt. Den Patienten mit den Nummern 1, 4 und 9 wurde außerdem Adrenalin verabreicht. Dieses kommt im Allgemeinen zur Behandlung des Low-Output-Syndroms und des Herzstillstands zum Einsatz (Larsen, 2017b). Zur Vermeidung von Infektionen erfolgte die antibiotische Prophylaxe mittels Cefuroxim. Die extrakorporale Zirkulation verlangte eine hochdosierte Heparin-gabe (300-400 I.E./kg KG), um eine Gerinnung des Blutes bei Kontakt mit den Oberflächen der HLM zu vermeiden. Die intravenöse Applikation erfolgte nach Eröffnung des Perikards und vor Kanülierung der großen Gefäße. Nach Beendigung des Eingriffs wurde zur Antagonisierung Protamin verabreicht, welches auf die Gewebeproben keinen Einfluss hatte. Die Gabe des Antifibrinolytikums Tranexamsäure diente der Reduktion des Blutverlustes während und nach der Herzoperation und wurde vor der Kanülierung des Herzens zugeführt.

Patient	1, 9	2, 5, 8, 11	15	3, 6, 7, 10, 12, 13, 14	4
Tranquilizer	Midazolam	Midazolam	Midazolam	Midazolam	Midazolam
Analgetikum	Sufentanil	Sufentanil	Sufentanil	Sufentanil	Sufentanil
Hypnotikum	Etomidate	Etomidate	Etomidate	Propofol	Propofol
Muskelrelaxans	Pancuronium	Pancuronium	Pancuronium	Pancuronium	Pancuronium
Volatiles Anästhetikum	Sevofluran	Sevofluran	Sevofluran	Sevofluran	Sevofluran
Antibiotikum	Cefuroxim	Cefuroxim	Cefuroxim	Cefuroxim	Cefuroxim
Katecholamin	Noradrenalin	Noradrenalin	Noradrenalin	Noradrenalin	Noradrenalin
	Adrenalin	-	-	-	Adrenalin
Gerinnungshemmer	Heparin	Heparin	Heparin	Heparin	Heparin
Glukokortikoid	-	-	Prednisolon	-	-
Antifibrinolytikum	Tranexamsäure	Tranexamsäure	Tranexamsäure	Tranexamsäure	Tranexamsäure
Kardioplege Lösung	nach Buckberg	nach Buckberg	nach Buckberg	nach Buckberg	nach Buckberg

Tabelle 4 | Medikamente während Narkose und Operation

Überblick über die während der Narkoseeinleitung und im Verlauf der Operation applizierten Medikamente mit Relevanz für die untersuchten Fettgewebe. Präparate sind der jeweiligen Arzneimittelgruppe zugeordnet. Patienten, welche die gleichen Medikamente erhielten, sind gruppiert worden.

Nach Anschluss der HLM wurde bei allen Patienten eine Kardioplegie nach Buckberg (Köhler Chemie GmbH) durchgeführt. Die aus Elektrolyten, Puffersubstanzen und Glukose bestehende Lösung induzierte pharmakologisch einen schlaffen Herzstillstand und diente der Protektion der Myokardzellen des blutleeren, ischämischen Herzens. Eine detaillierte Auflistung der Komponenten mit zugehörigen erwünschten Wirkungen findet sich in Tabelle 5 (Buckberg, 1993, Baretta, 2010). Die Infusion erfolgte bei abgeklemmter Aorta in die Aortenwurzel, passierte den Koronarkreislauf und trat am Sinus coronarius in den rechten Vorhof aus, wo sie abgesaugt wurde (Larsen, 2017a). Dieses Medikament hatte aufgrund des Applikationszeitpunktes- und Ortes ausschließlich eine Wirkung auf das unter hypothermen Bedingungen gewonnene epikardiale Fettgewebe.

Kardioplegielösung	Stoff	Menge pro 500 ml	Funktion
Kalte Induktion	Kaliumchlorid	34,91 mmol	Induktion des Herzstillstands
	Natriumchlorid	16,12 mmol	Puffer
	Trometamol	17,45 mmol	Pufferung der Azidose
	Citronensäure x H ₂ O	0,45 mmol	Puffer
	Natriumcitrat x 2 H ₂ O	2,60 mmol	Bindung von Calcium- Ionen
	Natriumdihydrogenphosphat x 2 H ₂ O	0,47 mmol	Puffer
	Glucose x H ₂ O	92,42 mmol	Stoffwechselsubstrat
Kalte Reinfusion	Kaliumchlorid	12,21 mmol	Aufrechterhaltung des Herzstillstands
	Natriumchlorid	16,90 mmol	Puffer
	Trometamol	18,30 mmol	Pufferung der Azidose
	Citronensäure x H ₂ O	0,48 mmol	Puffer
	Natriumcitrat x 2 H ₂ O	2,73 mmol	Bindung von Calcium- Ionen
	Natriumdihydrogenphosphat x 2 H ₂ O	0,49 mmol	Puffer
	Glucose x H ₂ O	96,93 mmol	Stoffwechselsubstrat

Tabelle 5 | Zusammensetzung und Funktion der kardioplegischen Lösung nach Buckberg

Zusammensetzung der zwei für das untersuchte Patientenkollektiv relevanten Komponenten der kardioplegischen Lösung nach Buckberg (Köhler Chemie GmbH) mit jeweils entsprechender Mengenangabe und Wirkung im menschlichen Organismus. Vereinfachte Darstellung: Jede der Lösungen (500 ml) besteht real aus zwei Anteilen (100 + 400 ml). Die Verabreichung des „Hot Shots“, der dritten Komponente, erfolgte nach Probengewinnung und ist hier nicht berücksichtigt.

Alle Patienten erhielten zur Vorbereitung auf die Narkose einen peripher-venösen Zugang. Zur kontinuierlichen invasiven Blutdruckmessung erfolgte die Einführung eines Katheters in die Arteria radialis. Nach Einleitung der Narkose wurde den Patienten ein zentraler Venenkatheter zur Überwachung des zentralen Venendruckes und für die Applikation von kardiovaskulären Medikamenten gelegt. Zur Erfassung der Vitalparameter erhielten alle Patienten ein Standardmonitoring, bestehend aus einem Elektrokardiogramm zur Beobachtung der Herzaktion, der Pulsoxymetrie zur Kontrolle der arteriellen Sauerstoffsättigung, der nicht-invasiven Blutdruckmessung sowie

der Kapnometrie zur Überwachung der Atmung. Das Einlegen eines transurethralen Blasenkateters diente neben der Kontrolle der Urinableitung außerdem der kontinuierlichen Temperaturmessung über eine innenliegende Temperatursonde. Die Beatmung erfolgte über einen oral eingeführten endotrachealen Tubus mit einem Luft-Sauerstoffgemisch.

2.1.4 Datenerhebung

Alle Patientendaten stammen aus der elektronischen Patientenakte. Insbesondere wurden für die Erfassung der Diagnosen und Dauermedikation die Aufnahmebögen der Ärzte zu Rate gezogen. Die physiologischen Parameter wurden den Aufnahmeprotokollen des Pflegepersonals entnommen. Die Anästhesieprotokolle dienten der Erfassung der perioperativen Medikation. In der Arbeit aufgeführte Blutwerte sind am Vortag der Operation im Rahmen der routinemäßigen präoperativen Diagnostik bestimmt worden.

2.2 Molekularbiologische Analyse humaner Fettgewebsproben

2.2.1 Kits, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit verwendeten Kits, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien mit entsprechendem Hersteller genannt:

- *mirVana™ miRNA Isolation Kit*, Thermofisher Scientific Waltham USA
- *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor*, Applied Biosystems Inc. USA
- *qPCR Mastermix Plus without UNG*, Eurogentec Deutschland
- *TaqMan® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems Inc. USA
- Ethanol pro Analyse, Merck Darmstadt
- Aqua ad iniectabilia, Braun Melsungen
- Kryoröhrchen, Sarstedt Nümbrecht
- Metallkugel 4 mm, Quiagen Niederlande
- Pipetten, Greiner Frickenhausen
- Pipettenspitzen, Sarstedt Nümbrecht
- Reaktionsgefäß 2 ml safe-lock, Eppendorf Hamburg

2.2.2 RNA-Extraktion und Quantifizierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Gewebeproben, inklusive sehr kleiner RNA-Spezies, kam das *mirVana™ miRNA Isolation Kit* zur Anwendung. Bei diesem Kit wird die chemische Extraktion der RNA mit der Methode der Immobilisation der RNA auf einem Glasfaserfilter kombiniert und somit auch die Erfassung sehr kleiner RNA-Spezies, wie micro-RNAs, gewährleistet.

Es wurde gemäß den Herstellerangaben für gefrorenes Gewebe verfahren. Mindestens 20 mg wurden von jeder Probe eingesetzt. Zur Zerkleinerung und Lyse wurden die Proben im ersten Schritt mit einer Metallkugel und *Lysis/Binding Buffer* versetzt und im TissueLyser (Quiagen) homogenisiert (2 x 3 Minuten bei 20 Hertz). Nach Zugabe von *miRNA Homogenate Additive* erfolgte die 10-minütige Inkubation auf Eis. Die organische Extraktion erfolgte durch Zugabe von *Acid-Phenol: Chloroform* mit anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 10 000 rpm). Die RNA-enhaltene, obere Phase wurde abpipettiert, in ein *Collection Tube* mit Filtereinsatz überführt und einer Präzipitation mit Ethanol p.a. unterzogen. Nach dreimaligem Waschen mit *Wash Solution* gemäß Herstellerangaben wurde die RNA in 100 µL *RNase-freiem*, 95 °C temperiertem *Wasser* von der Säule eluiert. Die Lösung wurde unverzüglich gekühlt und bis zur RNA-Konzentrationsbestimmung auf Eis gelagert. Sofern die Proben nicht sofort der cDNA-Synthese zugeführt wurden, erfolgte die Lagerung bei -80°C.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab) mit Messung der Absorption bei 260 und 280 nm. Für die Bestimmung der Reinheit der Probe aus dem Verhältnis A260/A280 wurden Werte zwischen 1,8-2,1 für reine RNA akzeptiert.

2.2.3 Synthese von cDNA

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* verwendet. Die Herstellung der Reaktionsgemische erfolgte nach den in Tabelle 6 aufgeführten Protokollen. Es wurden 400 ng RNA je Probe eingesetzt. Sofern mehr als 40 ng/µl RNA in der Probe enthalten war, wurde nach Protokoll 1 verfahren. Für Proben die weniger als 40 ng/µl RNA enthielten, war die Modifizierung des Protokolls notwendig, um für alle Proben eine ausreichende cDNA-Ausbeute zu gewährleisten. Auf die Zugabe von Wasser wurde hier, mit dem Ziel ein größeres Probenvolumen einsetzen zu können, verzichtet (Protokoll 2). Die Inkubation von 20 µl Reaktionsvolumen erfolgte im T3 Thermocycler (Biometra®) nach folgendem, in Tabelle 7 aufgeführten Protokoll.

	Protokoll 1	Protokoll 2
	<i>RNA-Konz.>40ng/μl</i>	<i>RNA-Konz.<40ng/μl</i>
	Volumen/Röhrchen*	Volumen/Röhrchen*
Reverse Transcription Buffer	2,00 μl	2,00 μl
dNTPs Mix	0,80 μl	0,80 μl
Random primers	2,00 μl	2,00 μl
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase	1,00 μl	1,00 μl
RNase Inhibitor	1,00 μl	1,00 μl
Nuclease-free (DEPC-treated) H ₂ O	3,20 μl	
Zwischensumme	10,00 μl	6,8 μl
Proben-RNA	10 μl	13,2 μl
Summe	20 μl	20 μl

Tabelle 6 | Protokolle für die Synthese der cDNA

Für eine in der Probe gemessene RNA-Konzentration von >40 ng/μl wurde nach Protokoll 1 verfahren. Für eine Konzentration <40ng/μl wurde Protokoll 2 verwendet. Jede Komponente wurde um den Faktor 1,04 als Sicherheitszugabe erweitert.

Zeit	Temperatur
10 Minuten	25 °C
120 Minuten	37 °C
5 Sekunden	85 °C
	4 °C

Tabelle 7 | cDNA-Syntheseprotokoll für den Thermocycler

2.2.4 Quantitative real-time PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine quantitative real time PCR (qPCR) durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende cDNA im Verhältnis 1:5 verdünnt. Dieser Verdünnung wurde Wasser a.i., *qPCR Mastermix Plus without UNG* und *TaqMan® Gene Expression Assays* für die zu bestimmenden Gene zugesetzt. Tabelle 8 enthält eine Auflistung der untersuchten Gene mit zugehörigen Assay-On-Demand-Kennzeichnungen. Die qPCR Reaktion sowie die Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgten mittels *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Zur Auswertung wurde die Softwareversion SDS 2.3 verwendet. Die Berechnung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode wie von K. J. Livak und T. D. Schmittgen beschrieben (Livak and Schmittgen, 2001). Die erhaltene Kopienzahl wurde anschließend auf die Referenzgene *Template-activating factor 1* (TAF1) und *Acidic ribosomal phosphoprotein PO* (36B4) normiert.

Gen	Assay on Demand
hTAF1;DYT3	Hs00270322_m1
h36B4 = hRPLP0	Hs99999902_m1
hUCP1	Hs00222453_m1
hPRDM16	Hs00922674_m1
hFABP4	Hs00609791_m1
hPPARGC1A	Hs01016722_m1
hDIO2	Hs00988260_m1

Tabelle 8 | Auflistung der untersuchten Gene

2.3 Statistik

2.3.1 Beschreibende Statistik

Zur ersten Analyse der Daten wurden sowohl Mittelwert (\bar{x}), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Minimum- und Maximumwerte ermittelt, als auch Häufigkeitsauszählungen erstellt.

Die Daten der Patienten wurden gekoppelt graphisch dargestellt, um einen Vorher-Nachher-Vergleich für je zwei Gene und jede Region zu beschreiben.

Der Einfluss von Faktoren wie Alter, Body-Mass-Index (BMI), Triglyceriden, Cholesterin, HDL und LDL auf die auf *TAF1* normierte Kopienzahl der Gene wurde untersucht. Dazu wurde eine lineare Regression durchgeführt und die Ergebnisse in Streudiagrammen dargestellt. Mit angegeben sind Bestimmtheitsmaß (R^2) und p-Wert.

2.3.2 Inferenzstatistik

Unterschiede der normothermen Daten der fünf verschiedenen Lokalisationen wurden mit ANOVA getestet. Anschließend wurde der Tukey-Test als post-hoc-Vergleich durchgeführt. Zweifaktorielle ANOVA wurde benutzt um den Einfluss der Hypothermie auf die sechs Gene zu untersuchen. Als post-hoc-Test wurde der Šidák-Test angewendet.

Alle Tests wurden mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ durchgeführt. Alle statistischen Tests wurden mit logarithmierten Daten durchgeführt, da sich bei einzelnen Vergleichen von Median und Mittelwert herausstellte, dass nicht normalverteilte Daten zur Verfügung standen. Eine Gegenüberstellung der Mediane und Mittelwerte ist in Anhang A zu finden. Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism 6.03 durchgeführt. Für das Datenmanagement wurde Excel benutzt.

Für die Bearbeitung der statistischen Auswertung wurde eine Beratung des epidemiologischen Instituts des UKE in Anspruch genommen.

3 Ergebnisse

Dieses Kapitel stellt die im Rahmen der klinisch-experimentellen Studie erzielten Ergebnisse dar. Dabei wird die untersuchte Stichprobe zunächst hinsichtlich der physiologischen und klinischen Merkmale beschrieben. Dies erlaubt die adäquate Einordnung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen, die im zweiten Teil präsentiert werden. Die fünf Fettdepots werden hinsichtlich der Genexpression von Aktivitäts- und Differenzierungsmarkern des braunen und beigen Fettgewebes untersucht. Im Mittelpunkt der Analyse steht die Frage nach der Auswirkung der Kälteexposition auf die Genexpression. Um eine Aussage zu treffen, werden im Folgenden die Genexpressionsraten unter hypothermen in Relation zu denen unter normothermen Bedingungen vorgestellt. Dann werden die Patienten spezifisch hinsichtlich der Genexpression in Bezug auf die Zeit der Kälteexposition analysiert. Somit erfolgt zusätzlich zur Beurteilung der statistischen Signifikanz einer etwaigen kälteaktivierten Genexpressionsinduktion, die Beurteilung der individuellen Relevanz einer solchen. Im letzten Teil wird mittels linearer Regressionsanalyse untersucht, ob die Variabilität der Genexpression durch ausgewählte physiologische und metabolische Marker zu erklären ist.

3.1 Charakterisierung der Untersuchungsgruppe

3.1.1 Physiologische Merkmale

Die Altersverteilung in der Untersuchungsgruppe lag zum Zeitpunkt der Operation zwischen 55 und 82 Jahren. Das Durchschnittsalter der Gruppe betrug 71,4 Jahre, mit einem Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean-SEM*) von 2,0 Jahren (Abbildung 4-A). Im Schnitt hatte die Untersuchungsgruppe eine Körpergröße von 170,9 cm (SEM 1,1 cm) und ein Gewicht von 80,2 kg (SEM 2,6 kg). Aus diesen Daten lässt sich der Body-Mass-Index errechnen. Dieser gibt indirekt Aufschluss über die Fettmasse des Körpers und wird zur Klassifizierung einer Adipositas herangezogen. Mit einem durchschnittlichen BMI von 27,7 kg/m² war die untersuchte Gruppe nach der Klassifizierung der Weltgesundheits-Organisation größtenteils übergewichtig. Lediglich ein Drittel der Gruppe wies ein Normalgewicht auf (Patienten Nr. 8, 10, 12, 13, 15). Sieben Patienten waren präadipös, sie zeigten einen BMI zwischen 25 und 29,9 kg/m² (Patienten Nr. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9). Von den drei übrigen Patienten zeigten zwei (Patienten Nr. 6, 11) eine Adipositas ersten Grades und ein Patient (Patient Nr. 14) eine Adipositas zweiten Grades. (Abbildung 4-B)

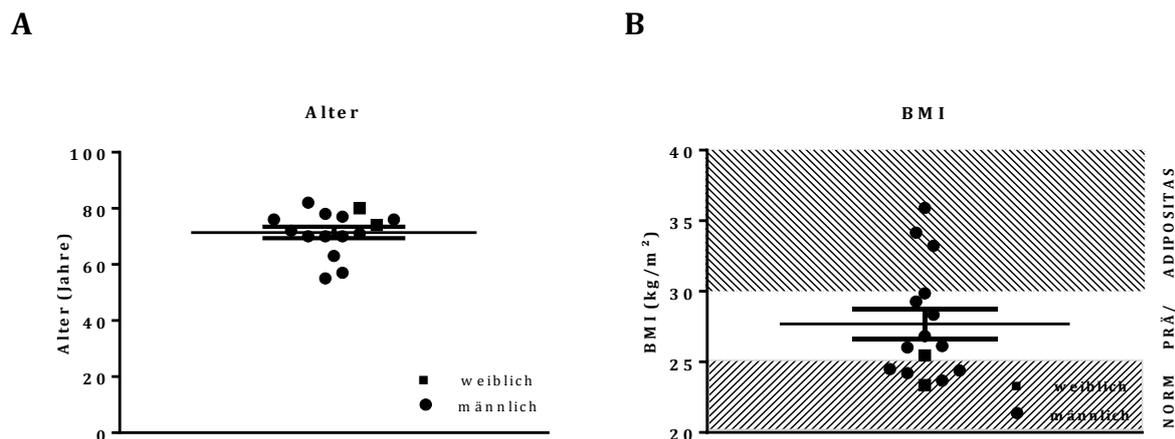


Abbildung 4 | Physiologische Merkmale der Untersuchungsgruppe

Darstellung der Altersverteilung (A) und der Verteilung des BMI (B) innerhalb der Untersuchungsgruppe. Verwendung unterschiedlicher Symbole für männliche und weibliche Patienten. (B) Schraffierte untere Fläche: Normalgewicht; Weiße Fläche: Präadipositas; Schraffierte obere Fläche: Adipositas. Darstellung mit $\bar{x} \pm SEM$; n=15. Genaue Maßzahlen sind in Tabelle 9 zu finden.

Die Lebenszeitprävalenz der Erkrankung KHK ist in Deutschland für Männer doppelt so hoch wie für Frauen. 30 Prozent der Männer bekommen in ihrem Leben eine KHK, während dies nur bei 15 Prozent der Frauen diagnostiziert wird (Herold, 2011). Zudem werden deutlich mehr Männer als Frauen bei bestehender KHK operiert (Oswald, 2016). Dies schlug sich in der Geschlechterverteilung der Untersuchungsgruppe nieder. Mit 86,8 Prozent machten Personen männlichen Geschlechts einen Großteil der untersuchten Stichprobe aus. Zwei der insgesamt 15 Patienten waren weiblichen Geschlechts (Patienten Nr. 8, 9). Die Parameter Alter, BMI, Größe, Gewicht und Geschlecht wurden für die 15 Patienten vollständig erfasst. Eine Übersicht über die Lage- und Streuungsmaße für die Parameter Alter, BMI, Größe und Gewicht findet sich in Tabelle 9. Zusammenfassend war die untersuchte Stichprobe eine relativ homogene Gruppe älterer Männer, welche sich mehrheitlich übergewichtig präsentierten.

(n=15)	\bar{x}		SEM	Spannweite
Alter (Jahre)	71,4	±	2,0	(55 - 82)
Größe (cm)	170,9	±	1,1	(165 - 178)
Gewicht (kg)	80,2	±	2,6	(63,6 - 97,8)
BMI (kg/m ²)	27,7	±	1,0	(23,4 - 35,9)

Tabelle 9 | Übersicht über die physiologischen Merkmale

3.1.2 Klinische Charakterisierung

In der untersuchten Gruppe bestand eine Multimorbidität mit durchschnittlich drei Dauerdiagnosen pro Patient. Bei einem Patienten (Patient Nr. 14) bestanden fünf Erkrankungen parallel, dieser zeigte ebenfalls den höchsten BMI der untersuchten Gruppe. Zwei Patienten hatten lediglich eine diagnostizierte Vorerkrankung, die gleichzeitig auch Behandlungsgrund war. In die Analyse einbezogen wurden kardiovaskuläre Diagnosen und metabolische Erkrankungen. Dazu gehört die koronare Herzkrankheit, die bei 12 der 15 Patienten diagnostiziert war. Acht der 15 Patienten wiesen Klappenvitien auf. Davon hatten fünf Patienten ein isoliertes und drei Patienten ein kombiniertes Klappenvitium. Die Diagnose Hypertonie fand sich bei elf Patienten. Unter Vorhofflimmern (VHF) litten vier Patienten. Ein Patient hatte einen Diabetes mellitus und vier Patienten eine nicht näher bezeichnete Hyperlipidämie. Während also fünf Patienten eine metabolische Erkrankung aufwiesen, waren zehn Patienten metabolisch gesund. Einen Überblick gibt Tabelle 10.

Diagnose	Häufigkeit
Klappenvitium	8/15
KHK	12/15
Hypertonie	11/15
VHF	4/15
Hyperlipidämie	4/15
Diabetes	1/15
n* Diagnosen/Patient	3
Spannweite	(1 - 5)

Tabelle 10 | Häufigkeiten unterschiedlicher Diagnosen in der Stichprobe

Berücksichtigt wurden das Herz-Kreislaufsystem betreffende Diagnosen und Stoffwechselerkrankungen. Der Punkt Klappenvitium umfasst Stenosen und Insuffizienzen der Aorten- und Mitralklappe. Kombinierte Vitien stellen eine Diagnose dar. Abkürzungen: KHK-Koronare Herzkrankheit; VHF-Vorhofflimmern; n*-durchschnittliche Anzahl.

Für die Therapie der Grunderkrankungen der Patienten ist die tägliche Einnahme von Medikamenten unerlässlich. Im Durchschnitt nahmen die Patienten der Untersuchungsgruppe vier Medikamente pro Tag ein. Die Spannweite beträgt zwei bis sechs Medikamente pro Tag. Die in der untersuchten Stichprobe am stärksten vertretene Arzneimittelgruppe waren Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI), welche von 80 Prozent der Patienten eingenommen wurden. β -Adrenozeptor-Antagonisten (auch β -Blocker genannt) gehörten zur täglichen Medikation von 73,3 Prozent der Untersuchungsgruppe und machten somit die zweithäufigste Medikamentengruppe aus. Dabei wurden die Präparate Metoprolol und Bisoprolol, welche eine hohe β_1 -Affinität aufweisen, addiert von zehn Patienten täglich eingenommen. Nebivolol, mit hoher β_1 -Affinität und zusätzlicher va-

sodilatierender Wirkung, wurde von einem Patienten täglich eingenommen. Zwei Drittel der Untersuchungsgruppe nahmen Medikamente ein, welche ihre Wirkung im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System entfalten. Vier Patienten nahmen ACE-Hemmer und weitere sechs Patienten nahmen Angiotensin₁-Rezeptorantagonisten ein. Annähernd 47 Prozent der Patienten bekamen täglich Statine (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren), wovon ein Patient ein mit einem Cholesterinsenker kombiniertes Präparat einnahm. Ebenso hatten knapp 47 Prozent der Patienten in der Untersuchungsgruppe Acetylsalicylsäure (ASS) in ihrer täglichen Medikation. Dieses wurde mindestens sieben Tage vor der Operation pausiert. Zwei weitere Patienten nahmen einen zusätzlichen Thrombozytenaggregationshemmer, welcher im Vorfeld der Operation ebenso pausiert wurde, ein. Vier Patienten nahmen täglich einen Calcium-Kanalblocker ein. Vier weitere Patienten bekamen täglich ein Diuretikum, welches im Vorfeld der Operation abgesetzt wurde. Der Diabetespatient wurde mit einer täglichen Gabe von Metformin und Sitagliptin behandelt. Diese wurden 24 Stunden vor der Operation abgesetzt. Ein Patient bekam die Antibiotika Gentamicin und Sultamicillin. Bei jeweils einem Patienten beinhaltete die tägliche Medikation Tamsulosin, Vitamin D3 und Magnesium. In Tabelle 11 ist die Medikation spezifisch für jeden Patienten aufgelistet.

Durch die Erfassung chemischer Kenngrößen aus dem Blut eines Patienten können biochemische und physiologische Vorgänge des Körpers abgebildet werden. Dabei ermöglicht die Bestimmung von Stoffwechselfparametern eine Einschätzung hinsichtlich der metabolischen Gesundheit eines jeden Patienten. Untrennbar mit dem Glukose- und Lipidmetabolismus des Organismus verbunden ist die Funktion thermogenen Fettgewebes. Glukose und aus VLDL und LDL stammende freie Fettsäuren dienen den thermogenen Adipozyten als Brennstoff (Cannon and Nedergaard, 2004). Eine Aktivierung thermogenen Fettgewebes resultiert in gesenkten Triglycerid- und Cholesterinplasmaspiegeln (Bartelt et al., 2011, Berbee et al., 2015). Auch wirkt sich eine Aktivierung, wenn auch nicht im Sinne einer Plasmaspiegelsenkung, auf den Umsatz des HDL aus (Bartelt et al., 2017).

Eine wichtige Kenngröße des Glukosestoffwechsels ist der Anteil glykierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin (HbA_{1c}), welcher die Blutglukosekonzentration der vergangenen acht Wochen widerspiegelt. Für zehn der Patienten aus der Untersuchungsgruppe lagen Werte vor. Mit einer Spannweite von 5,1 Prozent bis 6,0 Prozent befanden sich alle Werte im Referenzbereich. Der durchschnittliche HbA_{1c} betrug 5,5 Prozent mit einem SEM von 0,1 Prozent.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
β-Blocker	Metoprolol	x			x		x	x				x		x		
	Bisoprolol					x			x				x		x	
	Nebivolol															x
ACE-Hemmer	Ramipril				x		x				x			x		
AT₁-Antagonist	Candesartan	x	x			x		x	x			x				
Calciumkanal-blocker	Amlodipin	x					x		x		x					
Diuretika	Hydrochlorothiazid		x													
	Torasemid			x					x							x
Statine/ Cholesterin-senker	Simvastatin	x								x		x		x		
	Atorvastatin					x										
	Fluvastatin			x												
	Ezetimib/ Simvastatin				x											
Thrombozyten-aggregations-hemmer	ASS	x		x	x	x		x			x			x		
	Clopidogrel				x											
	Ticagrelor					x										
Antidiabetika	Metformin															x
	Sitagliptin															x
PPI	Pantoprazol	x	x	x	x		x	x	x	x			x	x	x	x
Antibiotika	Gentamicin			x												
	Sultamicillin			x												
α-Rezeptor-blocker	Tamsulosin					x										
Vitamin D3	Cholecalciferol									x						
Mineralsstoff	Magnesium (40 mg)											x				

Durchschnittliche Anzahl von Medikamenten pro Patient: 4

Tabelle 11 | Übersicht über die tägliche Medikation jedes Patienten

Die Präparate wurden den jeweiligen Arzneimittelgruppen zugeordnet und für jeden Patienten einzeln erfasst. Das Kreuzchen kennzeichnet die Einnahme. Abkürzung: ASS-Acetylsalicylsäure, PPI-Protonenpumpen-Inhibitor.

Kennzeichnende Parameter des Lipidmetabolismus sind die Triglyceride und das Gesamtcholesterin, welches weiter unterteilt werden kann in HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin. Für 9 der 15 Patienten waren diese Werte verfügbar. Der Gesamtcholesterin-Durchschnittswert liegt mit 175,6 mg/dl im Referenzbereich. Die Spannweite zeigt hingegen, dass der Gesamtcholesterinwert einzelner Patienten außerhalb des Referenzbereichs liegt. Zwei Patienten haben eine Hypercholesterinämie und zwei Patienten liegen mit ihrem Gesamtcholesterinwert unterhalb der unteren Grenze. Somit haben sechs Patienten einen Gesamtcholesterinwert im Referenzbereich. Der SEM

beträgt 10,1 mg/dl. Das durchschnittliche HDL-Cholesterin liegt mit 47,4 mg/dl im Referenzbereich, der SEM beträgt 3,6 mg/dl. Ein Patient zeigt einen niedrigeren Wert, zwei Patienten zeigen höhere Werte als den empfohlenen Wert. Auch das LDL-Cholesterin liegt mit dem Durchschnittswert von 97 mg/dl im Referenzbereich. Der SEM beträgt 8,3 mg/dl. Die LDL-Werte aller Patienten liegen zwischen 78 mg/dl und 144 mg/dl und somit alle im empfohlenen Bereich. Die Triglyceride liegen im Durchschnitt bei 155,6 mg/dl mit einem SEM von 25,7 mg/dl. Auch in diesem Fall liegt der Durchschnittswert im Referenzbereich. Die Verteilung der Werte variierte jedoch von 61 mg/dl bis 263 mg/dl. Zwei der neun Patienten, für die Werte vorlagen, haben eine Hyper-Triglyzeridämie. Ein Patient weist einen Triglyzeridwert unterhalb des Referenzbereichs auf. Anhand der Analyse wichtiger metabolischer Kenngrößen lässt sich die Untersuchungsgruppe insgesamt als metabolisch intakt einstufen. Dies schließt physiologische Zustände ebenso ein, wie adäquat therapierte Erkrankungen. Einige Patienten zeigen abweichende Werte. Inwiefern diese eine Variabilität in der Expression thermogener Gene erklären können, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein (vgl. 3.3).

Die Funktion thermogener Adipozyten ist abhängig von einer adäquaten sympathischen Aktivierung und unterliegt zudem einer Regulierung durch Hormone. Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) ist ein Hormon, welches eine wichtige Rolle in der Schilddrüsenfunktion spielt. Schilddrüsenhormone wiederum spielen eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulierung der Thermogenese (Ribeiro et al., 2001, Ribeiro et al., 2010, Wulf et al., 2008). Somit ist ein intakter thyreotroper Regelkreis wichtig für die Funktion brauner und beiger Adipozyten. Der durchschnittliche TSH-Wert der untersuchten Gruppe beträgt 0,98 mU/L. Der SEM liegt bei 0,1 mU/L. Damit hat die gesamte Untersuchungsgruppe, auch bei Betrachtung der Spannweite mit Werten zwischen 0,34 mU/L und 2,10 mU/L, ein TSH im Normbereich. Eine Übersicht über alle vorgestellten Werte bietet Tabelle 12.

Blutwerte	\bar{x}		SEM	Spannweite	Referenzbereich
HbA1c (%)	5,5	±	0,1	(5,1 - 6,0)	(4,3- 6,1)
Cholesterin total (mg/dl)	175,6	±	10,1	(142 - 217)	(150- 200)
HDL (mg/dl)	47,4	±	3,6	(33 - 66)	(35- 55)
LDL (mg/dl)	97,0	±	8,3	(78 - 144)	<160
Triglyceride (mg/dl)	155,6	±	25,7	(61 - 263)	(70-180)
TSH (mU/L)	0,98	±	0,1	(0,34 - 2,10)	(0,27- 4,20)

Tabelle 12 | Übersicht über metabolische und hormonelle Parameter

Für die Berechnung der Lage- und Streuungsmaße standen unterschiedlich große Datensätze zur Verfügung: HbA1c (n=10); Cholesterin total, HDL, LDL und Triglyceride (n=9); TSH (n=15).

3.2 Expressionsanalyse adipozytärer Gene in humanen Fettgewebsdepots

Alle vorhandenen Fettgewebsproben wurden für die molekularbiochemische Analyse aufbereitet. Ein vollständiger Probensatz umfasst zehn Gewebeproben für jeden Patienten, wobei fünf Proben unter normothermen (Probensatz I) und fünf Proben unter hypothermen Bedingungen (Probensatz II) gewonnen wurden. Insgesamt wurden somit 15 Proben pro Gewebe und Zustand angestrebt. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die tatsächlich gewonnenen Proben. Nichtrealisierungen hatten operative und individuelle Gründe. So ließ in einem Fall das Operationsvorgehen die Abgabe nicht zu. Durch die Zugangsmethode, der Thorakotomie, war das retrosternale Fettdepot nicht zugänglich. In der Mehrheit der Fälle konnte keine Probe abgegeben werden, wenn der Patient nicht über ausreichende Mengen an Fettgewebe verfügte und die Abgabe somit nicht vertretbar war. Bei den Proben des Probensatzes II fehlen jeweils zwei Proben, da intraoperativ bei zwei Patienten die Entscheidung getroffen wurde, auf die Anwendung einer Hypothermie zu verzichten.

Es wurden für die RNA-Extraktion 20 mg bis 40 mg Gewebe je Probe eingewogen. Die Fettgewebsproben stellten sich makroskopisch gelb dar. Anhang C gibt einen Überblick über die RNA-Ausbeute der Gewebeproben pro Patient, Zustand und Gewebe.

Gewebe	n Probensatz I (normotherm)	n Probensatz II (hypotherm)
Epikardial	12	13
Perikardial	14	11
Retrosternal	9	7
Mediastinal	13	11
Subkutan	15	13

Tabelle 13 | Übersicht über die Anzahl der Proben pro Gewebe

Ein vollständiger Satz umfasst 15 Proben pro Gewebe und Zustand (normotherm/hypotherm).

3.2.1 Expressionsanalyse adipozytärer Gene unter Normothermie

Um eine Aussage hinsichtlich der Expressionsraten von Aktivitäts- und Differenzierungsmarkern braunen und beigen Fettgewebes zu treffen, werden die unter normothermer Bedingung gewonnenen Gewebeproben analysiert. Dazu werden die absoluten auf den Housekeeper normierten Kopienzahlen zwischen den fünf Depots verglichen. Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Geweben zu gewährleisten, ist einer von zwei gemessenen Housekeepern für die Normierung der Werte ausgewählt worden. Wenn auch statistisch nicht signifikant, unterlag der Housekeeper *36B4* einer ausgeprägteren interventionell abhängigen Regulierung als der House-

keeper *TAF1*, weshalb letzterer verwendet wurde (Anhang B). Analysiert wurden epikardiale, perikardiale, retrosternale, mediastinale und subkutane Fettgewebe.

UCP1 ist eines der wichtigsten Proteine der adaptiven Thermogenese und kommt ausschließlich in braunem und beigem Fettgewebe vor (Cannon and Nedergaard, 2004). Auch wenn die physiologische Relevanz einer *UCP1*-Induktion Gegenstand aktueller Diskussionen ist, wird die *UCP1*-Expression oft als Marker für die thermogene Kapazität herangezogen (Nedergaard and Cannon, 2013). Zusätzlich wurden weitere Indikatoren der thermogenen Aktivität gemessen. *PGC1 α* , *PRDM16* und *DIO2* sind Gene, deren Translationsprodukte an der Regulierung der adaptiven Thermogenese beteiligt sind (vgl. 1.3). Außerdem wurde *FABP4* als Fettgewebemarker bestimmt (Bernlohr et al., 1985).

Die Expression von *UCP1* war in epikardialem und mediastinalem Fettgewebe in vergleichsweise größerem Ausmaß detektierbar, während sie in perikardialem und insbesondere in subkutanem Gewebe an der Nachweisgrenze lag. Die epikardialen und mediastinalen Fettgewebe weisen eine um rund 90 Prozent höhere Expressionsrate auf, als die subkutanen oder perikardialen Fettgewebe (Abbildung 5-A). Auch in retrosternalem Gewebe ist eine signifikant höhere *UCP1*-Expression detektierbar als in subkutanem Fettgewebe, wenngleich hier niedrigere auf *TAF1* berechnete Kopienzahlen vorliegen als in epikardialem und mediastinalem Fettgewebe. Diese Konstellation zeigt sich für die übrigen Gene nicht. *PGC1 α* ist ein Marker für die mitochondriale Biogenese und damit Surrogatmarker für die thermogene Aktivität. In epikardialem Fettgewebe ist es signifikant schwächer exprimiert als in perikardialem Gewebe, im Vergleich zu retrosternalem und mediastinalem Gewebe sogar deutlich schwächer (Abbildung 5-B). Kein Unterschied zeigt sich für die *PGC1 α* -Expression zwischen epikardialem und subkutanem Gewebe. Ähnliche Muster kennzeichnen die Expression von *PRDM16*. In epikardialem Fettgewebe ist ein deutlich niedrigerer *PRDM16*-Gehalt als in allen übrigen Geweben detektierbar (Abbildung 5-C). Das Gen *DIO2* ist in den verschiedenen Fettgewebsdepots ähnlich schwach exprimiert (Abbildung 5-D). Alle Gewebeproben weisen hohe *FABP4*-Expressionsraten auf (Abbildung 5-E). Die Bestimmung dieses Gens erfolgte um nachzuweisen, dass die gewonnenen Proben tatsächlich Fettgewebe enthalten. Obwohl auch zum Teil in Vorläuferzellen der stromavaskulären Fraktion nachzuweisen, wird *FABP4* hauptsächlich von Adipozyten exprimiert (Shan et al., 2013). Insgesamt zeigt sich, dass sich die Expressionsraten der bestimmten Gene zwischen den Geweben unterschiedlich verhalten. So findet sich im perikardialen Fettgewebe eine deutlich niedrigere *UCP1*-Expressionsrate als im epikardialen Fettgewebe, wohingegen die *PGC1 α* - und *PRDM16*-Expressionen gegenläufig reguliert sind. Die Ergebnisse stehen in einem Widerspruch, da alle drei Gene von Bedeutung für die Regulierung und Funktion der thermogenen Aktivität sind.

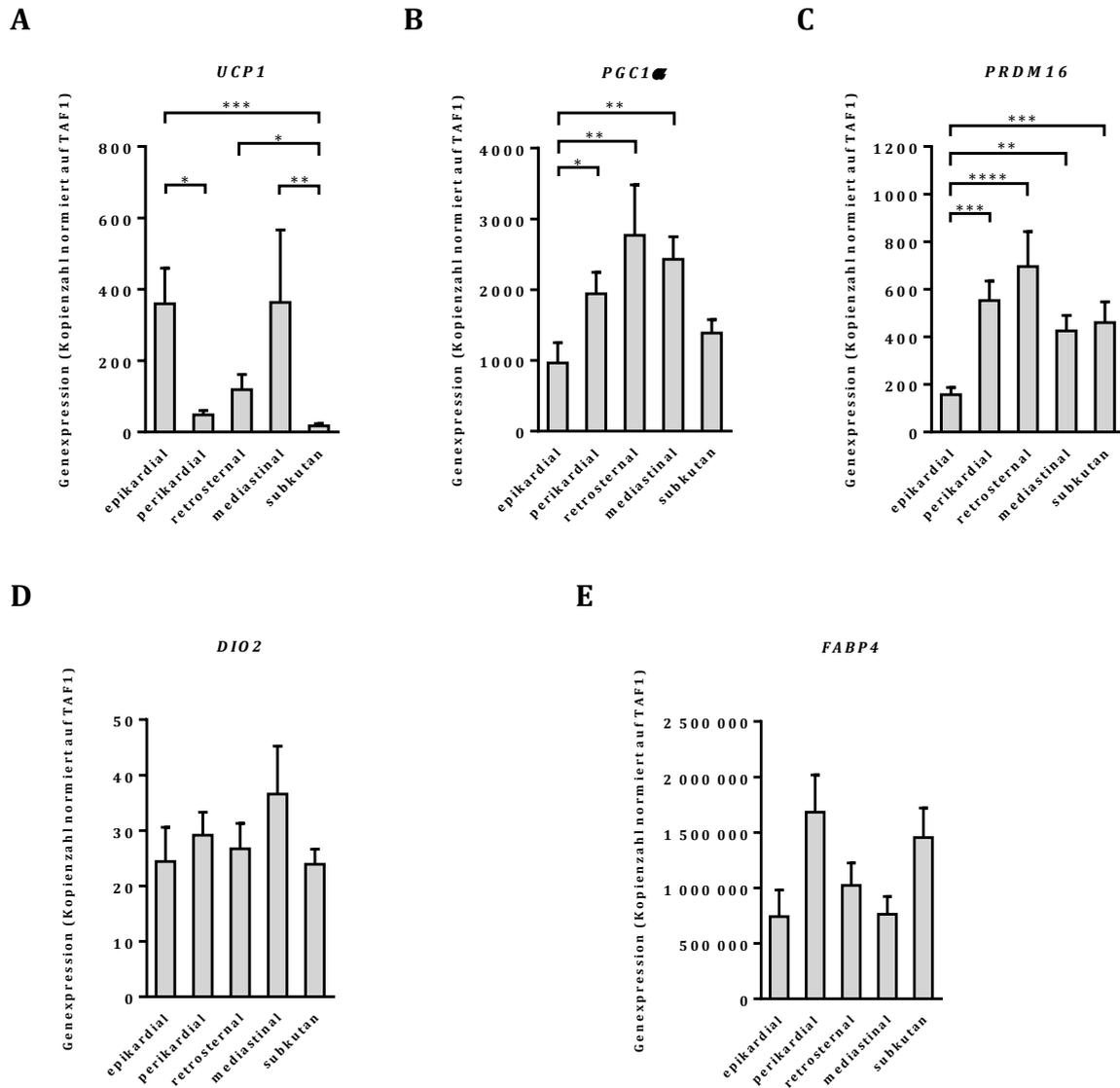


Abbildung 5 | Expressionsanalyse adipozytärer Gene in den Fettgewebsdepots unter Normothermie

Die Gewebe aus fünf Fettdepots wurden präpariert und die Expression der Gene (A–E) mittels Taqman®-Technologie bestimmt. Aufgetragen sind absolute, auf *TAF1* normierte Kopienzahlen. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. Epikardial: n=12, perikardial: n=13(A)/14(B, C, D, E), retrosternal: n=5(A)/9(B, C, D, E), mediastinal n=11(A, D)/13(B, C, E), subkutan: n=10(A, D)/15(B, C, E). Abweichungen in der Anzahl ergeben sich, weil durch den Taqman® Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden. Einseitige Varianzanalyse, post-hoc: Tukey-Test, 95% Konfidenzintervall, $P < 0,05$: *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$; ***, $P < 0,0001$: ****.

Die absolute Expression von *UCP1* ist mit der absoluten Expression von *PRDM16* vergleichbar. Verglichen mit der *PGC1 α* -Expression ist sie jedoch 10-fach niedriger, verglichen mit der absoluten *FABP4*-Expression deutlich, nämlich 1000-fach niedriger.

3.2.2 Verhalten der Genexpression bei Einfluss von Hypothermie

Bei Kälteexposition werden das braune und das beige Fettgewebe sympathisch aktiviert (Cannon and Nedergaard, 2004). Dies resultiert auf molekularer Ebene in einem Anstieg der Expressionsraten von Genen, die für die Thermogenese unerlässlich sind (Cannon and Nedergaard, 2004). Um den Einfluss der intraoperativ angewandten Hypothermie auf die Genexpressionsraten in der Untersuchungsgruppe zu analysieren, wird die auf den Housekeeper *TAF1* bezogene, durchschnittliche Kopienzahl der hypothermen ins Verhältnis zur normothermen Genexpression gesetzt.

Der auf einen Kältereiz zu erwartende Anstieg der Aktivitäts- und Differenzierungsmarker thermogener Fettgewebe zur Initiierung der Thermogenese bleibt größtenteils aus. Ein signifikanter Unterschied in der Genexpression eines adipozytären Gens zwischen den verglichenen Gewebeproben zeigt sich in einem Fall, wobei dieser in einer Abnahme besteht. *UCP1* wird in retrosternalem Gewebe unter hypothermen Bedingungen signifikant schwächer exprimiert als unter normothermen Bedingungen. Es findet sich eine um rund 80 Prozent verminderte Expression verglichen zur basalen Genexpressionsrate (Abbildung 6-C). Mit einer Reduzierung der Genexpression um 76 Prozent zeigt sich eine Tendenz in diesem Sinne auch für *UCP1* in mediastinalem Gewebe, die jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 6-D). Bei Entfernung des Maximalwertes zeigt sich eine Reduktion der Genexpression um 50 Prozent. Im Gegensatz dazu ist im anatomisch nah gelegenen perikardialen Gewebe ein höherer *UCP1*-Gehalt unter Hypothermie als unter Normothermie detektierbar. Die fast sechsfache Induktion relativiert sich bei Entfernung des oberen Ausreißers zu einer immer noch doppelt so hohen Genexpression nach Kälteexposition. Eine Ansprache auf den Kältereiz kann außerdem für *DIO2* festgestellt werden, jenem Gen, welches für die Iodothyronin-Deiodinase Typ 2 kodiert und maßgeblich an der Regulation der *UCP1*-Induktion beteiligt ist (Arrojo et al., 2013). In perikardialem Gewebe hat sich die durchschnittliche Expression von *DIO2* nach Kälteinduktion verdoppelt (Abbildung 6-B). In gleicher Weise verhält sich die Expression im retrosternalen Fettdepot. Es lässt sich eine mehr als doppelt so hohe Genexpression nach Kälteexposition ablesen, eine Abschwächung des Effektes auf eine 1,4-fache Induktion ergibt sich bei Entfernung des hohen Wertes (Abbildung 6-C). Im epikardialen sowie auch im subkutanen Fettdepot zeigen sich keine Änderungen der Genexpressionsraten nach Einfluss von Kälte (Abbildung 6-A und E). Zusammenfassend ist der Einfluss der intraoperativen Hypothermie auf die untersuchten Fettgewebe gering. Aus den Ergebnissen geht jedoch auch hervor, dass *UCP1* und *DIO2* im Gegensatz zu den übrigen Genen veränderte Expressionsraten zeigen. Dieser Befund dient im folgenden Teil der Untersuchung eines etwaigen Zusammenhanges zwischen der Variabilität der Genexpressionsrate und der individuellen Hypothermiedauer eines jeden Patienten.

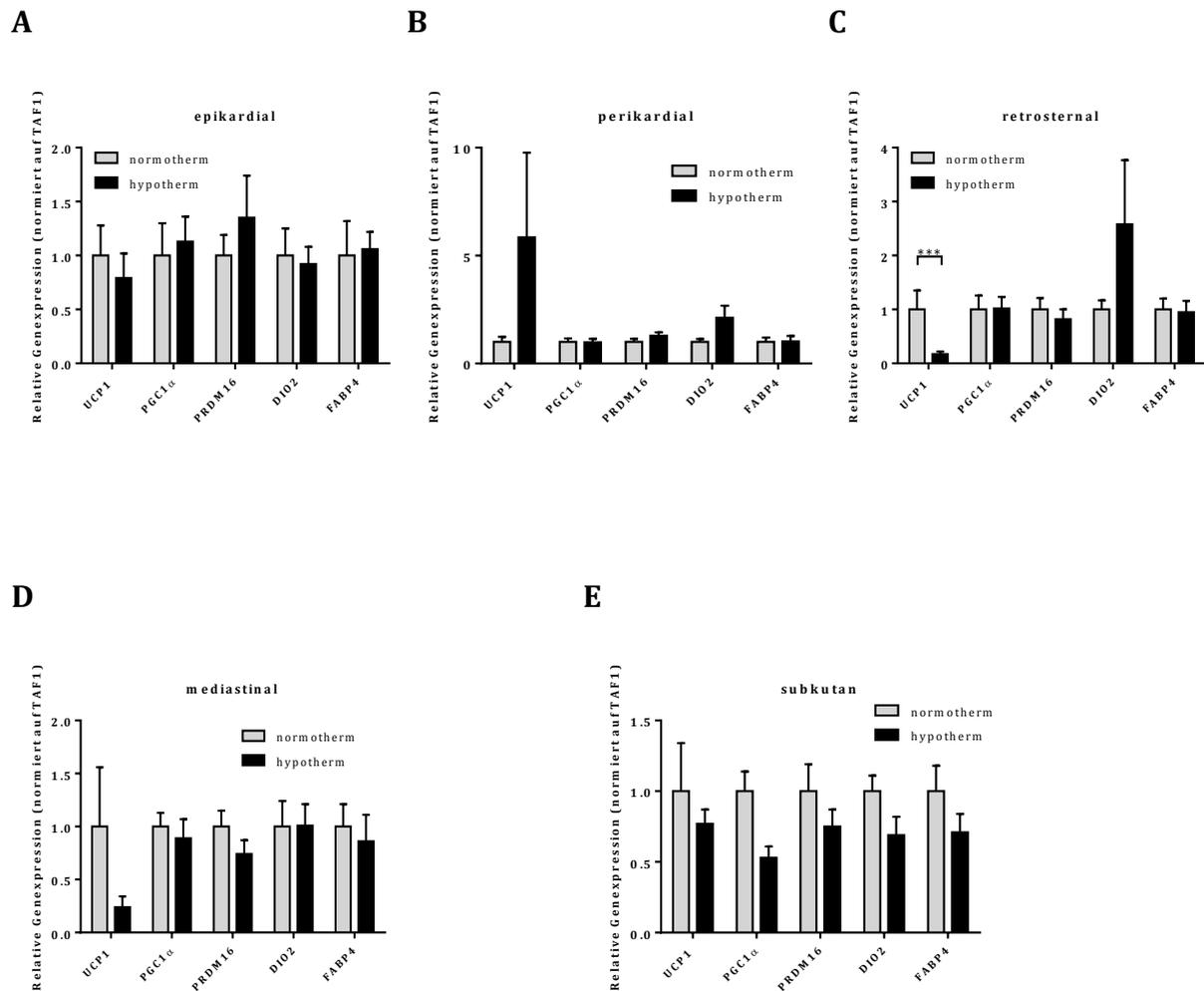


Abbildung 6 | Verhalten der Genexpression unter Hypothermie in Relation zur Genexpression unter Normothermie

Die unter hypothermen Bedingungen gewonnenen Gewebe aus fünf Fettdepots (**A-E**) wurden präpariert und die Genexpression mittels Taqman®-Technologie bestimmt. Aufgetragen ist die relative Genexpression. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. n der normothermen Daten wie in Abbildung 5. Hypotherme Daten wie folgt:

(**A**) n=12(FABP4)/13 (UCP1, PGC1 α , PRDM16, DIO2); (**B**) n=10 (UCP1, DIO2)/11 (PGC1 α , PRDM16, FABP4); (**C**) n=6 (UCP1)/7 (PGC1 α , PRDM16, DIO2, FABP4); (**D**) n=9 (DIO2)/10 (UCP1)/11 (PGC1 α , PRDM16, FABP4); (**E**) n=7 (UCP1)/10 (DIO2)/13 (PGC1 α , PRDM16, FABP4). Abweichungen in der Anzahl ergeben sich, weil durch den Taqman® Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden. Zweiseitige Varianzanalyse, post-hoc: Šidák-Test, 95% Konfidenzintervall, $P < 0,001$: ***.

3.2.3 Patientenspezifische Analyse für UCP1 und DIO2 in den Fettgewebsdepots

Die bisher durchgeführte Analyse der Mittelwerte verdeckt unweigerlich die Heterogenität der Untersuchungsgruppe. Gerade in kleinen Stichproben ist davon auszugehen, dass der Einfluss unterschiedlicher Störfaktoren, die eine Streuung der unterschiedlichen Merkmalsausprägungen

bedingen, nicht ausgeglichen werden kann. In diesem Teil soll deshalb eine differenzierte Betrachtung der Daten stattfinden, was eine Berücksichtigung medizinisch-biologischer Aspekte erlaubt und zusätzlich zur statistischen Signifikanz die individuelle Relevanz der Genexpressionsänderung abbildet. Insbesondere *UCP1* und *DIO2* zeigten Änderungen in den Expressionsraten in drei, beziehungsweise zwei Geweben. Für diese Gene wird eine Analyse der Expression spezifisch für jeden Patienten vorgenommen. Dazu werden die Genexpressionsraten und deren Änderung unter der Kälteexposition beurteilt und individuelle Hypothermiezeiten der Patienten verglichen.

3.2.3.1 Epikardial

Epikardiales Gewebe weist bei der statistischen Auswertung, verglichen zu den übrigen Geweben, die höchste basale *UCP1*-Expression auf. Unter normothermen Bedingungen ist hier signifikant mehr *UCP1*-Expression vorhanden, als in den perikardialen und subkutanen Fettdepots.

In den aufgeschlüsselten Daten zeigen sich bei Betrachtung der basalen Genexpressionsraten zwei Gruppen. Eine Gruppe, der vier Patienten zuzuordnen sind (Patienten Nr. 2, 3, 5, 9), zeigt bis zu 16 Mal höhere *UCP1*-Expressionsraten als die andere Gruppe, welche aus sieben Patienten besteht (Abbildung 7-A). Der Vergleich von sich etwaig überschneidenden individuellen Störfaktoren zwischen den beiden Gruppen zeigt interessanterweise einen Unterschied für die Einnahme von β -Adrenozeptor-Antagonisten. In der Untersuchungsgruppe gibt es vier Patienten, zu deren täglicher Medikation kein β -Blocker gehörte. Während bei einem dieser vier Patienten auf die Abgabe epikardialen Fettgewebes verzichtet wurde, gehören die anderen drei zu der Gruppe der Patienten, welche hohe *UCP1*-Expressionsraten aufweist. Nur ein Patient dieser Gruppe nahm täglich einen β -Blocker ein, so wie alle Patienten der Gruppe mit niedriger *UCP1*-Expression. Bedeutsam für die Signaltransduktion in thermogenen Adipozyten ist der β_3 -Adrenozeptor (Cannon and Nedergaard, 2004). Dies ist einer von drei Subtypen der Gruppe der β -Adrenozeptoren, welche das pharmakologische Ziel der β -Adrenozeptor-Antagonisten darstellen (vgl. 4.1).

In braunem und beigem Fettgewebe würde der Kälteexposition die Initiierung der Thermogenese folgen. In der Expression der Gene *UCP1* und *DIO2* ließe sich dann ein Anstieg beobachten (Cannon and Nedergaard, 2004, Arrojo et al., 2013). In epikardialem Gewebe zeigte die statistische Auswertung keinen signifikanten Einfluss der intraoperativen Hypothermie auf die Expression von *UCP1*. Jedoch zeigt sich die Genexpression der Patienten im Verhalten unterschiedlich. Zur spezifischen Betrachtung werden die Probanden drei Gruppen zugeordnet. Während die *UCP1*-Expression bei fünf Patienten abnimmt (Patienten Nr. 3, 5, 9, 12, 14), ist sie bei fünf anderen Patienten verstärkt (Patienten Nr. 2, 4, 8, 13, 15), wobei ein Patient (Patient Nr. 13) eine nur minimale Änderung der *UCP1*-Expression aufweist (Abbildung 7-A). Ein weiterer Patient (Patient Nr. 11) zeigt keine Änderung der *UCP1*-Expression.

Fraglich ist, ob die Dauer der Hypothermie diese Unterschiede begründen kann. Es wäre zu erwarten, dass die Patienten mit stärkerer *UCP1*-Induktion einer eher längeren Zeit der Hypothermie ausgesetzt waren, da von der sympathischen Aktivierung des Adipozyten durch Kälte bis zum Erhalt des detektierten Transkriptionsproduktes mRNA mit einer gewissen zeitlichen Latenz gerechnet werden muss. Im umgekehrten Sinne müssten Patienten ohne wesentliche Veränderung der Genexpression einer kürzeren Zeit der Hypothermie ausgesetzt gewesen sein. Die Analyse der Untersuchungsgruppe zeigt jedoch, dass die Dauer der Hypothermie kein hinreichendes Kriterium für die Veränderung der *UCP1*-Expression ist. In der Gruppe der Patienten, bei denen eine *UCP1*-Induktion detektiert wurde, zeigt der Patient (Patient Nr. 15) mit der stärksten Zunahme der Genexpression auch die längste Hypothermiedauer. Die Gewebeprobe unter Hypothermie wurde bei diesem Patienten nach 76 Minuten gewonnen. In dieser Probe wird eine mehr als doppelt so hohe *UCP1*-Expression im Vergleich zum normothermen Gewebe detektiert. Bei Betrachtung der kompletten Untersuchungsgruppe nimmt er zeitlich jedoch eine Mittelstellung ein. Mit 135 und 120 Minuten am längsten und fast doppelt so lang der Hypothermie ausgesetzt wie Patient Nr. 15, waren die Patienten Nr. 9 und 11. Diese weisen jedoch keinen Anstieg in der Genexpression, sondern sogar eine Abnahme beziehungsweise keine Änderung der *UCP1*-Expression auf. Auch bei der Betrachtung drei weiterer Patienten der Gruppe mit *UCP1*-Induktion ist unter Einbezug des beschriebenen Patienten Nr. 15 kein linearer Zusammenhang zwischen der Hypothermiedauer und der Stärke der *UCP1*-Induktion festzustellen. So weist der Patient (Patient Nr. 13) mit einer vergleichsweise moderaten Induktion um 13 Prozent mit 65 Minuten eine längere Kälteexposition auf, als die Patienten (Patienten Nr. 4, 8), welche bei einer Hypothermiezeit von 58 Minuten eine Zunahme der *UCP1*-Expression um ein Viertel zeigen. Für den Patienten mit der Nummer 2, welcher eine 30-prozentige Steigerung der Expression von *UCP1* aufweist, fehlt die Angabe der Hypothermiedauer. Dieser zeigt als Einziger eine *UCP1*-Zunahme bei schon relativ hoher basaler *UCP1*-Expression von relativ zur *TAF1*-Expression errechneten 738 Kopien. Die drei weiteren Patienten mit hohen basalen *UCP1*-Expressionsraten zeigen in Gewebeprobe II eine Abnahme der Genexpression. Verschiedene Studien belegen, dass Kälte ein Aktivator der Thermogenese in braunen und beige Adipozyten ist (van der Lans et al., 2013, Saito et al., 2009a, Vitali et al., 2012a). β -adrenerg stimuliert werden vermehrt Proteine synthetisiert, welche für die Wärmebildung unerlässlich sind. Zu diesen gehört *UCP1*. Die mRNA als Transkriptionsprodukt ließe sich vermehrt messen. Folglich ist eine detaillierte Analyse der Gruppe, welche eine Abnahme der *UCP1*-Expression zeigt, hinsichtlich des Einflussfaktors Kälte widersinnig. Wahrscheinlich ist bei diesen fünf Patienten die Einflussnahme eines unbekanntes Faktors (vgl. 4). Dies gilt auch für die Patienten, welche eine Abnahme in der *DIO2*-Expression bei Kälteexposition zeigen.

Wie für *UCP1*, wurde auch für *DIO2* eine durch Kälte aktivierte Zunahme der Genexpression beschrieben (Arrojo et al., 2013). Die Analyse der *DIO2*-Expression im epikardialen Gewebe der Untersuchungsgruppe macht ersichtlich, dass auch für dieses Gen kein eindeutiger Zusammenhang mit der Dauer der intraoperativen Hypothermie nachweisbar ist. Auch das Gen *DIO2* wird bei einem Teil der Patienten in der zweiten Gewebeprobe vermindert (Patienten Nr. 5, 8, 11, 14, 15) und bei der gleichen Anzahl an Patienten (Patienten Nr. 3, 4, 9, 12, 13) verstärkt detektiert (Abbildung 7-B). Ein Patient (Patient Nr. 2) zeigt keine Änderung der *DIO2*-Expression. Die zwei Patienten mit der stärksten Induktion zeigen unter den insgesamt fünf Patienten, welche eine Zunahme der *DIO2*-Expression aufweisen, auch die längste Hypothermiedauer. Dabei war der Patient mit einer Verdreifachung des Genproduktes (Patient Nr. 9) 135 Minuten hypotherm und der Patient, der eine Verdopplung des Genproduktes zeigte, 85 Minuten hypotherm. Ein entsprechender Zusammenhang zeigt sich für die anderen drei Patienten nicht.

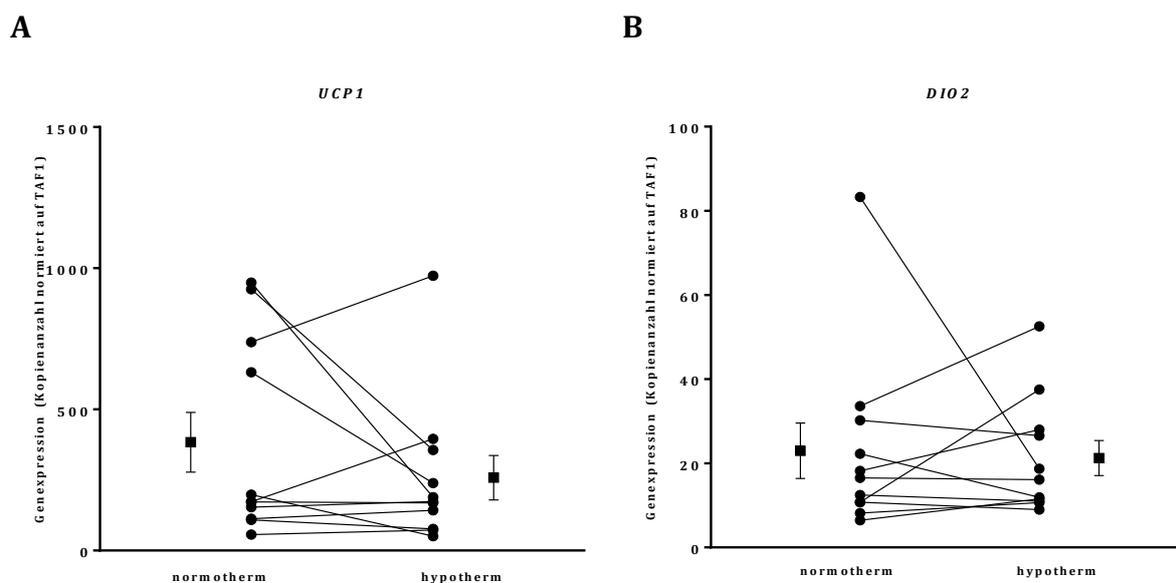


Abbildung 7 | *UCP1/DIO2*- Expression unter Normothermie und Hypothermie in epikardialen Gewebe

Von 11 Patienten wurden komplette Probensätze gewonnen und analysiert. Die Expression von *UCP1* (A) und *DIO2* (B) sind hier für jeden einzelnen Patienten zur Darstellung gebracht. Quadrate sind Mittelwerte \pm SEM.

Insgesamt liegt die *DIO2*-Expression nahe der Nachweisgrenze und ist verglichen zur *UCP1*-Expression wesentlich geringer. Es ist eine zehnmal geringere *DIO2*- als *UCP1*-Expression messbar. Eine Induktion um den Faktor drei führt somit zu einer Expression, die immer noch unter jener der basalen *UCP1*-Expression liegt.

In der Antwort auf Kälteexposition zeigen die Patienten sowohl in der *UCP1*- als auch der *DIO2*-Expression ein sehr heterogenes Bild. Dabei ist die Expression beider Gene bei zwei Patienten gleichsinnig. Bei den neun übrigen Patienten ist eine Abnahme des einen Gens mit einer Zunahme des anderen Gens verbunden. Zusammenfassend kann für die untersuchte Stichprobe in epikardialem Gewebe kein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der *UCP1*- und *DIO2*-Expression und der Dauer der intraoperativen Hypothermie festgestellt werden. Auch das *UCP1*-Basisniveau hat keinen Einfluss auf die Ausprägung der Genexpression bei Kälteexposition. Insgesamt stützen die durch diese Stichprobe gewonnenen Ergebnisse die theoretische Annahme einer von der Hypothermiedauer abhängigen *UCP1*- und *DIO2*-Expression nicht.

3.2.3.2 Perikardial

In perikardialem Gewebe zeigen sich für alle Patienten relativ niedrige basale *UCP1*-Expressionsraten mit relativ zur *TAF1*-Expression errechneten Kopienzahlen zwischen 5 und 110. Der Mittelwert wird hier durch drei hohe Werte nach oben verzerrt. Ein Abgleich etwaiger gemeinsamer Einflussgrößen dieser Patienten mit höherem basalen adipozytären *UCP1*-Gehalt lässt kein Wirken eines gemeinsamen Störfaktors erkennen. Dieser Befund gilt auch für die Einnahme von β -Adrenozeptor-Antagonisten. Mehr als die Hälfte der auf *TAF1* normierten Werte sind in perikardialem Gewebe kleiner oder gleich 30 Kopien.

Bei Kälteexposition ist die Antwort bei sechs der neun Patienten verstärkt (Abbildung 8-A). Davon zeigen zwei Patienten einen starken Anstieg der *UCP1*-Expression. Bei Patient 9 wird in der Gewebeprobe II eine 70 Mal höhere *UCP1*-Expression detektiert als in Gewebeprobe I. Dieser Patient war mit 135 Minuten auch die längste Zeit der Hypothermie ausgesetzt. Patient Nr. 13 weist zwar ebenfalls eine starke Steigerung der *UCP1*-Expression um den Faktor 90 unter hypothermen Bedingungen auf, jedoch war er der Hypothermie lediglich 45 Minuten ausgesetzt. Das ist die zweitniedrigste Dauer der gesamten Untersuchungsgruppe. So wie dieses Beispiel, zeigt auch die Analyse der übrigen Wertepaare keine eindeutige Abhängigkeit des Ausmaßes der Genexpressionsänderung von der Hypothermiedauer. So war Patient 14 der Kälte 65 Minuten ausgesetzt. In der zweiten Gewebeprobe wird bei ihm eine um 70 Prozent verstärkte Genexpression detektiert. Verglichen dazu zeigt ein weiterer Patient eine *UCP1*-Erhöhung geringeren Ausmaßes (50 Prozent) bei 13 Minuten kürzerer Kälteexposition. Ein weiterer Patient mit einer *UCP1*-Erhöhung um 15 Prozent lässt sich zeitlich wiederum nicht in diese Reihe einordnen, denn er weist mit 85 Minuten die zweitlängste Hypothermiedauer der gesamten Untersuchungsgruppe auf. Bei Fehlen des Hypothermiewertes kann für Patient 1, welcher eine Versechsfachung der Genexpression zeigt, keine Aussage getroffen werden. Zwei der insgesamt neun Patienten zeigen in der Gewebeprobe II bei einer Hypothermiedauer von 50 Minuten eine Abnahme der Expression von *UCP1*.

Patient 10 zeigt eine leichte Abnahme, um etwas mehr als ein Viertel. Patient 12 zeigt eine Abnahme um zwei Drittel.

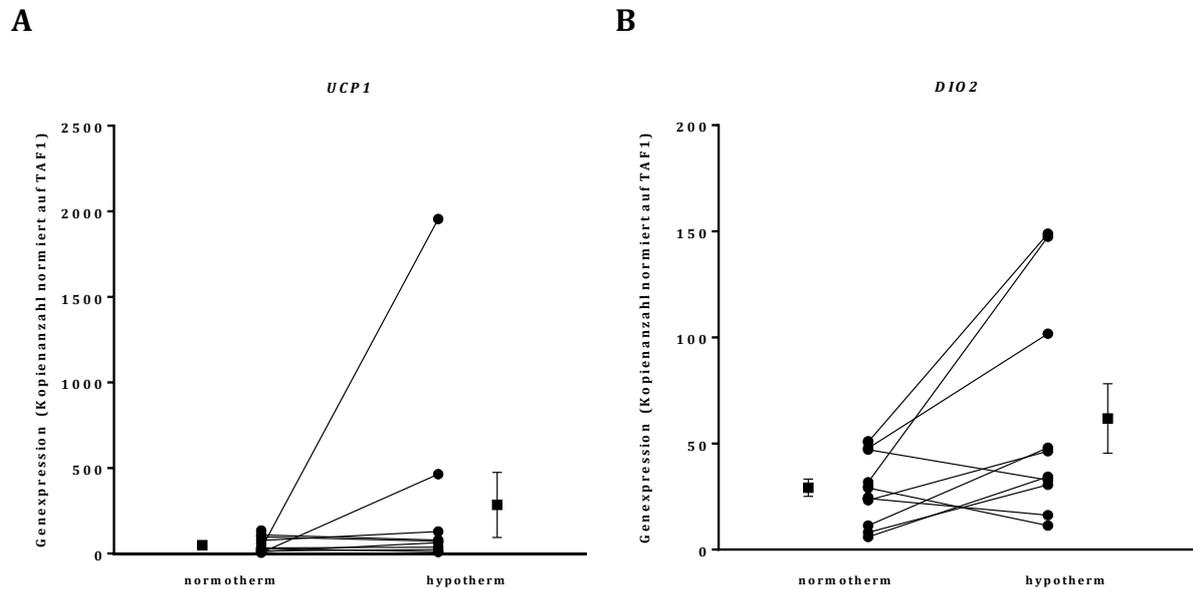


Abbildung 8 | *UCP1/DIO2*-Expression unter Normothermie und Hypothermie in perikardialen Gewebe

(A) n=9. (B) n=10. Komplette Probensätze wurden von 11 Patienten gewonnen. Differenzen zwischen dargestellten und gewonnenen Probensätzen ergeben sich, weil bei der Messung Ct-Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden und Wertepaare dadurch unvollständig waren. Quadrate sind Mittelwerte \pm SEM.

Ebenso wie für *UCP1* weist der überwiegende Teil der Patienten eine höhere Expression für das Gen *DIO2* in der Gewebeprobe II auf. Sechs der neun Patienten zeigen eine Induktion (Abbildung 8-B). Davon zeigen drei Patienten auch eine Erhöhung der *UCP1*-Expression. Das Mindestmaß zeigt Patient 5 mit einer Verdopplung des *DIO2*-Genproduktes. Dieser weist mit 30 Minuten auch die kürzeste Kälteexposition auf. Wiederum war der Patient mit der zweitstärksten Induktion, er zeigt eine Vervierfachung des *DIO2*-Gehalts, mit 76 Minuten die längste Zeit hypotherm. Der Patient mit der steilsten Zunahme steht für diese Auswertung aufgrund des fehlenden Hypothermiewertes nicht zur Verfügung. Die drei übrigen Patienten mit einer *DIO2*-Erhöhung bei Kälteexposition liegen sowohl zeitlich, als auch in der Stärke der Induktion zwischen den eben genannten. Eine Abhängigkeit der Induktionsstärke von der Hypothermiedauer kann bei diesen nicht festgestellt werden. Bei drei Patienten wurden in der Gewebeprobe II niedrigere *DIO2*-Expressionsraten detektiert. Dabei handelt es sich in einem Fall um einen Patienten, der auch eine *UCP1*-Abnahme zeigte.

Insgesamt zeigt sich in perikardialem Gewebe für jeweils sechs Patienten eine Induktion der *UCP1*- und *DIO2*-Expression, die statistisch nicht signifikant ist, aber für den einzelnen Patienten eine gewisse Relevanz haben könnte. Die Patienten mit der höchsten Expression zeigen gleichzeitig auch die längste Hypothermiedauer. Im Falle von *UCP1* beträgt diese 135 Minuten, für *DIO2* 76 Minuten. Der Patient mit der schwächsten *DIO2*-Induktion zeigt auch die kürzeste Hypothermiedauer. Somit lässt sich für drei der zwölf überprüften Konstellationen ein erwartbarer Zusammenhang finden. In der Gesamtbetrachtung aller Patienten kann jedoch auch in perikardialem Gewebe die Hypothermiezeit nicht als ursächlicher, alleiniger Faktor für die Genexpressionsänderung gewertet werden. Die Ausprägungsrichtung der Expression der zwei besprochenen Gene ist mehrheitlich entgegengesetzt.

3.2.3.3 Retrosternal

In retrosternalem Gewebe zeigt sich bei der statistischen Auswertung die dritthöchste *UCP1*-Expressionsrate, die immer noch signifikant höher ist als in subkutanem Gewebe. Für die Auswertung der Abhängigkeit der Genexpression von der Hypothermiedauer entfällt im retrosternalen Gewebe eine erhebliche Anzahl an Werten. So waren komplette Probensätze überhaupt nur von 6 der 15 Patienten verfügbar. Von diesen scheidet weitere Werte aus, weil die Genexpression bei der Bestimmung durch die Taqman-Technologie unter der Nachweisgrenze lag. Es bleiben zur spezifischen Analyse zwei Patienten. Beide zeigen eine *UCP1*-Expression, die in der zweiten Gewebeprobe vermindert detektiert wird (Abbildung 9-A). Bei einem Patienten sinkt die Genexpression um 70 Prozent, bei dem anderen sogar um 87 Prozent. Dies liegt im Trend der gesamten Gruppe. Die Betrachtung der Verteilung aller vorhandenen Werte zeigt, dass bei allen Patienten eine basale Genexpression über die relativ zur *TAF1*-Expression errechneten 50 Kopien detektiert wird. Die basalen Genexpressionsraten variieren zwischen 56 und 280 auf *TAF1* normierte Kopienzahlen. In den unter hypothermen Bedingungen gewonnenen Gewebeproben findet sich bei allen Patienten eine *UCP1*-Expression, die unter jener der basalen liegt. Das zeigt, dass die retrosternalen Gewebe aller Patienten in gleicher Weise, nämlich mit einem Abfall der *UCP1*-Expression, reagieren. In der Auswertung der Mittelwerte zeigt sich dies auch als statistisch signifikante Abnahme (Abbildung 6-C).

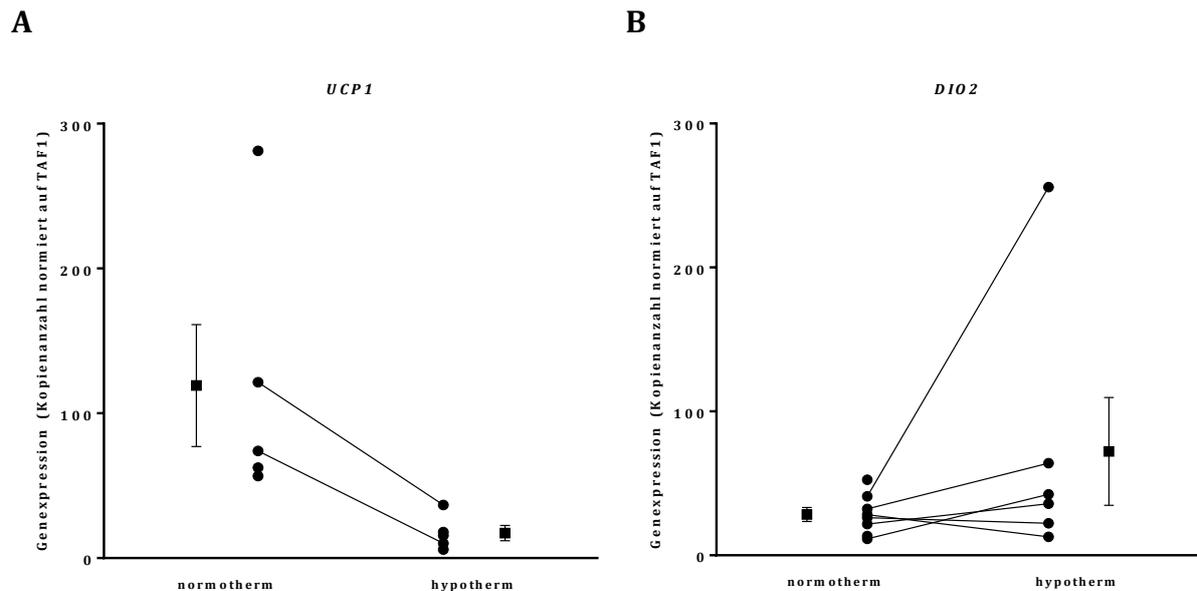


Abbildung 9 | *UCP1/DIO2*-Expression unter Normothermie und Hypothermie in retrosternalem Gewebe

(A) n=2. (B) n=6. Komplette Probensätze wurden von 6 Patienten gewonnen. Differenzen zwischen dargestellten und gewonnenen Probensätzen ergeben sich, weil bei der Messung Ct-Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden und Wertepaare dadurch unvollständig waren. Korrespondierende Werte sind durch eine Linie verbunden. Quadrate sind Mittelwerte \pm SEM.

Anders verhält es sich in der *DIO2*-Antwort bei Kälteexposition in retrosternalem Gewebe. Bei vier der sechs Patienten wird *DIO2* in der zweiten Gewebeprobe verstärkt transkribiert (Abbildung 9-B). Die stärkste Induktion ist eine Versechsfachung des *DIO2*-Gehalts in der Gewebeprobe II gegenüber der Gewebeprobe I bei Patient 14. Dieser zeigt den höchsten *DIO2*-Wert aller Gewebe in der gesamten Untersuchungsgruppe. Patient 1 zeigt eine Vervielfachung der *DIO2*-Expression, Patient 12 noch eine Verdopplung. Die geringste Induktion ist eine um den Faktor 1,6 erhöhte *DIO2*-Expression (Patient Nr. 5). Die Zuordnung der Hypothermiewerte zeigt, dass die Dauer der Kälteexposition das Ausmaß der *DIO2*-Expressionszunahme nicht begründen kann. Zwei Patienten weisen eine verringerte *DIO2*-Expression in der Gewebeprobe II auf.

Während der *UCP1*-Gehalt der gewonnenen Zellen der zweiten Proben also abnimmt, zeigt die Mehrheit der untersuchten Patienten in retrosternalem Gewebe eine Zunahme des Gens *DIO2*. Etwaige Gründe für den Abfall sämtlicher *UCP1*-Expressionsraten müssen diskutiert werden. Die Zunahme des *DIO2*-Gehalts korreliert in retrosternalem Gewebe nicht mit der Hypothermiedauer. Die *UCP1*- und *DIO2*-Expressionen verhalten sich bei den einzelnen Patienten teilweise gleichsinnig und teilweise entgegengesetzt.

3.2.3.4 Mediastinal

In mediastinalem Gewebe zeigt sich bei der statistischen Auswertung die basale *UCP1*-Expression signifikant höher als in subkutanem Gewebe. Das arithmetische Mittel liegt bei 364 relativ zur *TAF1*-Expression errechneten Kopienzahlen und damit in etwa so hoch wie in epikardialem Gewebe. Bei spezifischer Betrachtung fällt auf, dass vor allem drei Patienten höhere basale Genexpressionsraten aufweisen. Diese liegen um ein Vielfaches höher (Patient Nr. 4, 9, 10), als jene der übrigen sechs Patienten (Abbildung 10-A). Der Vergleich von sich etwaig überschneidenden individuellen Störfaktoren zeigt für zwei der drei Patienten (Patienten Nr. 9, 10) die fehlende Einnahme von β -Adrenozeptor-Antagonisten.

Bei Kälteexposition zeigen drei Patienten im mediastinalen Fettgewebe einen Anstieg der *UCP1*-Expression. Dieser ist insbesondere bei Patient Nr. 2 ausgeprägt, hier zeigt sich eine um den Faktor 3 verstärkte *UCP1*-Expression (Abbildung 10-A). Patient Nr. 13 zeigt eine verdoppelte *UCP1*-Expression. Bei Patient 15 findet sich eine Induktion um 53 Prozent. Es zeigt sich bei diesen, wie auch schon in den anderen untersuchten Geweben, kein Zusammenhang mit der Dauer der Hypothermie. Der überwiegende Teil der Gruppe weist eine abgeschwächte *UCP1*-Expression auf (Patienten Nr. 4, 5, 9, 10, 11, 14). Bei sechs Patienten wird *UCP1* in dem unter hypothermen Bedingungen gewonnenen Gewebe um 12 bis 99 Prozent schwächer transkribiert. Da eine Zunahme der *UCP1*-Expression unter Kälte zu erwarten wäre, ist bei diesen die Einflussnahme anderer Faktoren anzunehmen.

Während die *UCP1*-Expression bei der Mehrheit der Patienten abnimmt, zeigt sich bei der *DIO2*-Expression bei der Mehrheit der Patienten eine Zunahme in der zweiten Gewebeprobe. Sechs Patienten zeigen eine *DIO2*-Induktion (Patienten Nr. 1, 2, 5, 11, 14) und drei Patienten eine Abnahme der *DIO2*-Expression (Patienten Nr. 10, 13, 15) (Abbildung 10-B). Es zeigt sich bei Patient 15 die höchste basale Genexpression der gesamten Untersuchungsgruppe aller Gewebe, die in der zweiten Gewebeprobe jedoch um drei Viertel abfällt. Die stärkste Induktion weist Patient 11 mit einer Verdopplung des *DIO2*-Gehalts auf. Bei Betrachtung der Hypothermiezeiten in der Induktionsgruppe war dieser mit 120 Minuten auch am längsten hypotherm. Für zwei weitere Patienten mit einer Zunahme der *DIO2*-Expression sind Hypothermiezeiten vorhanden. Diese zeigen sich in ihrer Stellung invers zum Ausmaß der *DIO2*-Expression bei den Patienten.

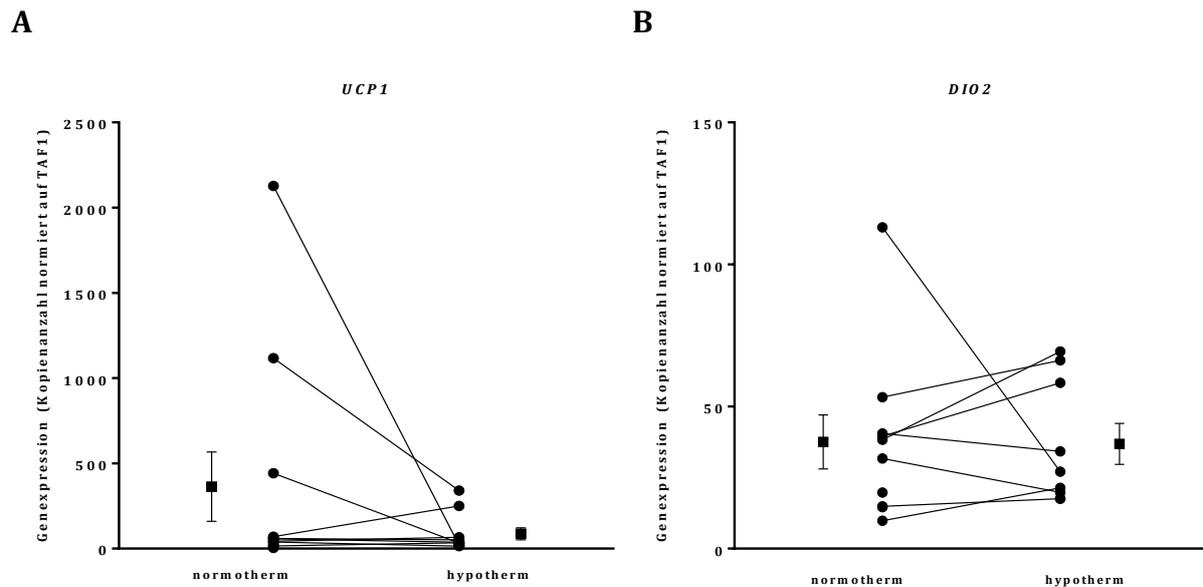


Abbildung 10 | *UCP1/DIO2*-Expression unter Normothermie und Hypothermie in mediastinalem Gewebe

(A) n=9. (B) n=8. Komplette Probensätze wurden von 11 Patienten gewonnen. Differenzen zwischen dargestellten und gewonnenen Probensätzen ergeben sich, weil bei der Messung Ct-Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden und Wertepaare dadurch unvollständig waren. Quadrate sind Mittelwerte \pm SEM.

Zusammenfassend zeigt in mediastinalem Gewebe der Großteil der Patienten eine *UCP1*-Abnahme und eine *DIO2*-Zunahme. Der Patient mit der stärksten *DIO2*-Zunahme war die längste Zeit aller induzierten Patienten hypotherm. Dennoch kann für alle anderen überprüften Konstellationen kein Einfluss der Dauer der Hypothermie auf das Ausmaß der Induktion festgestellt werden. Die *UCP1*- und *DIO2*-Expressionen verhalten sich bei zwei Patienten gleichsinnig und bei fünf Patienten entgegengesetzt.

3.2.3.5 Subkutan

In subkutanem Gewebe finden sich die niedrigsten *UCP1*-Expressionsraten der untersuchten Fettdepots. Es sind unter normothermen Bedingungen auf *TAF1* normierte Kopienzahlen zwischen 3 und 67 detektierbar, wobei der überwiegende Teil der Patienten im unteren Bereich dieser Spanne einzuordnen ist (Abbildung 11-A). Fünf Patienten weisen eine *UCP1*-Expression nahe der Nachweisgrenze auf (unter 6 errechnete, auf *TAF1* relativierte Kopienzahlen). Weitere vier Patienten zeigen eine *UCP1*-Expression von 15 bis 25 auf *TAF1* normierte Kopienzahlen. Ein Patient weist 67 relativ zur *TAF1*-Expression errechnete Kopien auf. Für die Auswertung vollständiger

Wertepaare bleiben fünf Patienten. Es entfallen fünf der normothermen Werte und sechs der hypothermen Werte, da die Genexpression bei der Bestimmung durch die Taqman-Technologie unter der Nachweisgrenze lag. Von diesen fünf zeigen drei Patienten eine stärkere und zwei eine schwächere Expression in der zweiten Gewebeprobe. Eine annähernde Vervierfachung der Expression bei einem Patienten, sowie die Verdopplung der Expression bei zwei weiteren impliziert eine starke Steigerung der *UCP1*-Expression. Bei Betrachtung der absoluten Werte ist jedoch fraglich, ob dieses Gewebe einen wesentlichen Beitrag zur Thermogenese leisten kann. Es finden sich bei keinem Patienten mehr als 20 relativ zur *TAF1*-Expression errechneten Kopien in der zweiten Gewebeprobe. Bezüglich der Hypothermiezeit zeigen die zwei Patienten mit der Verdopplung der *UCP1*-Expression mit 58 Minuten die gleiche Dauer. Für den Patienten mit der höchsten Induktion ist der Hypothermiewert nicht verfügbar.

Bei der *DIO2*-Expression zeigen zwei der acht für die Analyse verfügbaren Patienten eine Induktion (Abbildung 11-B). Eine Induktion um 143 Prozent weist Patient 15 nach einer Kälteexposition von 76 Minuten auf. Eine leichte Erhöhung zeigt Patient 10 nach 50 Minuten Hypothermie. Sechs Patienten haben in der zweiten Gewebeprobe eine niedrigere *DIO2*-Expression als in der unter normothermer Bedingung gewonnenen Probe.

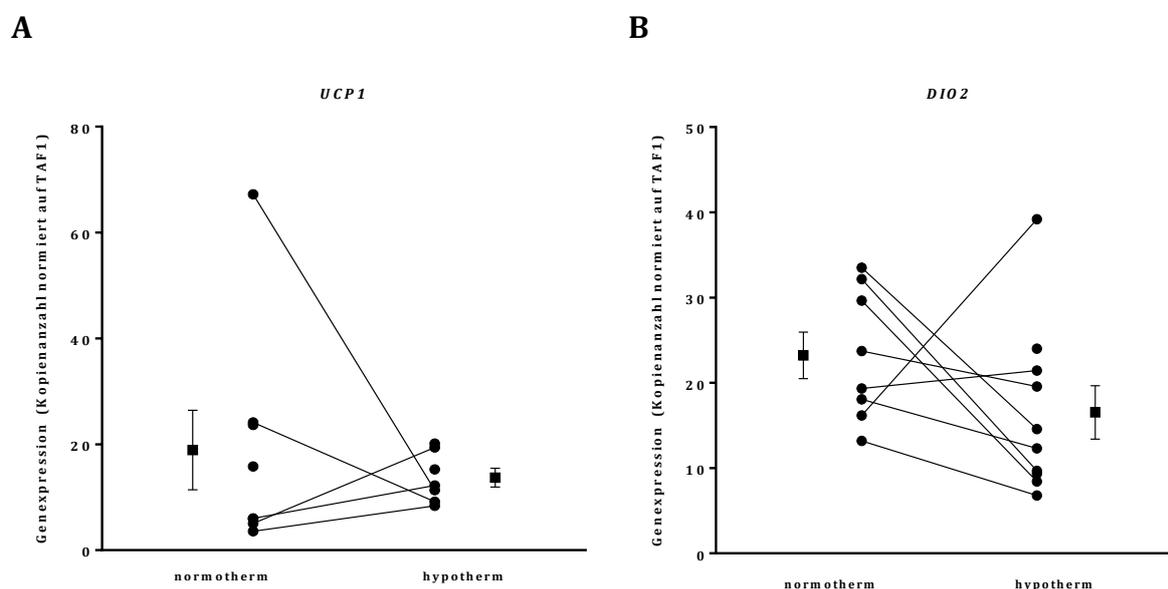


Abbildung 11 | *UCP1/DIO2*-Expression unter Normothermie und Hypothermie in subkutanem Gewebe

(A) n=5. (B) n=8. Komplette Probensätze wurden von 13 Patienten gewonnen. Differenzen zwischen dargestellten und gewonnenen Probensätzen ergeben sich, weil bei der Messung Ct-Werte als „undetermined“ ausgegeben wurden und Wertepaare dadurch fehlten oder unvollständig waren. Korrespondierende Werte sind durch eine Linie verbunden. Quadrate sind Mittelwerte \pm SEM

Es scheiden in subkutanem Gewebe viele Werte für die Analyse aus. Bei den zur Verfügung stehenden Werten zeigen sich insbesondere für *UCP1* insgesamt niedrige Expressionsraten unter basalen Bedingungen. Das Gen *UCP1* wird bei drei von fünf Patienten induziert, das Gen *DIO2* wird lediglich bei zwei von acht Patienten induziert. Die Expression beider Gene zeigt einen zu erwartenden Zusammenhang mit der Dauer der Hypothermie. Sie zeigen ein größeres Ausmaß der Induktion, bei einer längeren Hypothermiedauer innerhalb der Gruppe der Induktion. Bei einem Vergleich von nur zwei Werten ist ein zufälliges Geschehen nicht auszuschließen. Insgesamt ist auch bei einer Induktion der Gene eine nur geringe Genexpression detektiert worden. Die vier Patienten, bei denen sowohl die *UCP1*- als auch die *DIO2*-Expression bestimmt werden konnte, zeigen ein jeweils gegensinniges Verhalten in der Expression der beiden Gene.

3.3 Korrelation der Genexpression

Der Entdeckung thermogener Fettgewebe beim erwachsenen Menschen folgten retrospektive ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchungen und ^{18}F -FDG-PET/CT-Studien an gesunden Probanden, welche Erkenntnisse bezüglich der Aktivierbarkeit lieferten. Neben diesen interessierte auch die Identifizierung von Merkmalen und Faktoren, welche als Prädiktor für das Vorhandensein brauner und beiger Adipozyten fungieren könnten. So fanden verschiedene Arbeitsgruppen eine abnehmende BAT-Aktivität mit steigendem Alter und höherem BMI (Zingaretti et al., 2009, Cypess et al., 2009, Saito et al., 2009a, Lichtenbelt et al., 2009). Der Zusammenhang zwischen der BAT-Aktivität und dem BMI deutet bereits einen Einfluss thermogen aktiver Fettgewebe auf den Metabolismus des Organismus an. Durch murine Studien gewonnene Erkenntnisse belegen, dass sich die Stoffwechselaktivität thermogener Adipozyten in positiver Weise im Fettstoffwechsel niederschlägt. So resultiert eine BAT-Aktivierung nicht nur in der Senkung der Triglycerid-Plasmaspiegel, sondern auch in der Senkung der Cholesterin-Plasmaspiegel (Bartelt et al., 2011, Berbee et al., 2015). Ebenso ist der HDL-Metabolismus an die metabolische Aktivität thermogener Adipozyten gekoppelt, auch wenn sich dies nicht in einer Plasmaspiegeländerung zeigt (Bartelt et al., 2017).

Inwiefern das Ausmaß der *UCP1*- und *DIO2*-Expression in den epikardialen und mediastinalen Fettdepots in der vorliegenden Stichprobe eine Abhängigkeit von physiologischen und metabolischen Markern zeigt, ist Gegenstand dieses Kapitels. Die Vergleiche der Genexpressionsraten unter normo- bzw. hypothermen Bedingungen lassen keine Ansprechbarkeit der Genexpression hinsichtlich der Kälteexposition erkennen. Der Einfluss externer Störfaktoren ist zu vermuten. Die Korrelationsanalyse soll klären, ob zumindest bei den basalen Genexpressionsraten eine Assoziation mit ausgewählten physiologischen und metabolischen Parametern identifizierbar ist und sich anhand der Parameter eine Vorhersage bezüglich des Umfangs von *UCP1*- und *DIO2*-exprimierenden Adipozyten treffen lässt. Es wird dazu eine einfache lineare Regressionsanalyse

durchgeführt. Die auf *TAF1* normierte *UCP1*- und *DIO2*-Expression jedes Patienten wird gegen die Parameter Alter, BMI, Triglyceride, Gesamtcholesterin, sowie die Lipoproteine HDL und LDL aufgetragen und der lineare Zusammenhang der Variablen untersucht. Die Größen Alter und BMI waren für jeden Patienten aus der elektronischen Krankenakte verfügbar. Die klinischen Parameter wurden am Tag vor der Operation entnommen und bestimmt. Diese waren für acht Patienten verfügbar.

Es besteht die Annahme, dass Probanden mit aktivem braunem Fettgewebe nicht nur höhere *UCP1*- und *DIO2*-Expressionsraten, sondern auch ein jüngeres Lebensalter und ein günstigeres metabolisches Profil, mit im Rahmen des Referenzbereiches niedrigen Plasmaspiegeln an TG, Cholesterin und LDL und hohen HDL-Plasmaspiegeln, aufweisen.

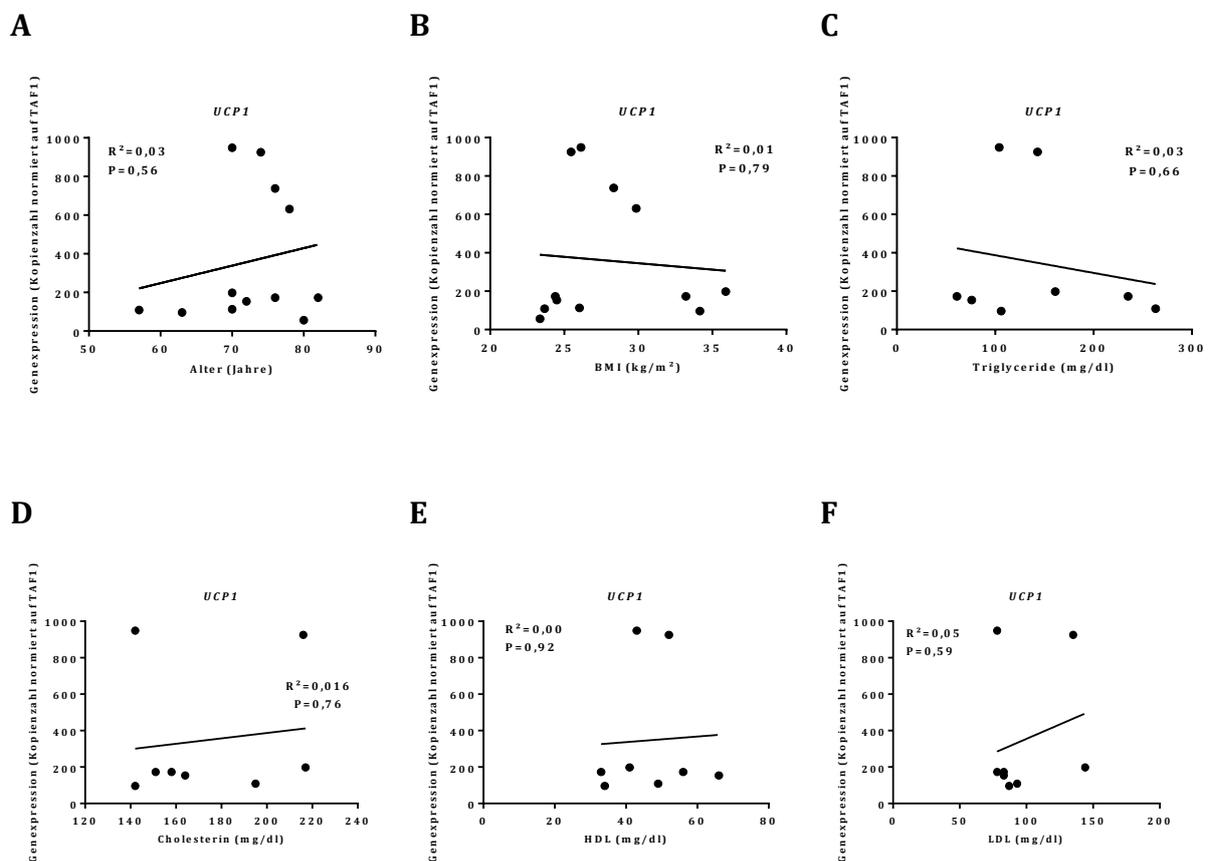


Abbildung 12 | *UCP1*-Expression in epikardialem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen

Die Expression von *UCP1* unter Normthermie wurde mittels Taqman quantifiziert und auf das „housekeeping gen“ *TAF1* normiert. Die erhaltene, auf *TAF1* normierte Kopienzahl wurde in Abhängigkeit von Alter und BMI (A und B; n=12) sowie am Tag vor der Operation bestimmter Stoffwechselfparameter (C-F, n=8) aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt den Zusammenhang zwischen der basalen *UCP1*-Expressionsrate und verschiedenen Einflussfaktoren und beeinflussten Faktoren im epikardialen Fettdepot. Es zeigt sich, dass die ausgewählten Parameter nicht in der Lage sind, die Variabilität der basalen *UCP1*-Expression zu erklären. Im geringen Stichprobenumfang kann kein verzerrender Effekt vermutet werden. Die geringen Bestimmtheitsmaße lassen auch auf keine anderslautenden Ergebnisse bei einem größeren Stichprobenumfang schließen. Auffällig ist jedoch eine Gruppierung von vier Werten in den Abbildung 12-A und 12-B. Es handelt sich bei der Gruppe der vier Patienten mit bis zu zehnmal höheren Genexpressionsraten wiederum um jene Gruppe, der drei Patienten angehören, welche in ihrer täglichen Medikation keinen β -Adrenozeptor-Antagonisten hatten. Eine separate Auswertung dieser Gruppe ergäbe ein Bestimmtheitsmaß, welches eine negative Korrelation der *UCP1*-Expressionsraten mit den Parametern Alter und BMI vermuten ließe. Eine Aussage zu einem Zusammenhang bezüglich metabolischer Parameter (Abbildung 12-C bis F) kann in dieser Untergruppe aufgrund der für zwei Patienten fehlenden Bestimmung von TG, Cholesterin, HDL und LDL nicht getroffen werden. Ein verallgemeinerbarer Schluss kann aus diesem Sachverhalt keinesfalls gezogen werden. Er ist einzig als Hinweis für weitere Untersuchungen dienlich.

Ein ähnliches Bild zeigt auch die Analyse des Zusammenhangs zwischen der basalen *DIO2*-Expression sowie unterschiedlichen Einflussgrößen und beeinflussten Größen im epikardialen Fettdepot (Abbildung 13). Auffällig ist jedoch eine mittlere positive Korrelation ($R^2=0,43$) zwischen dem BMI und der Genexpression (Abbildung 13-B). Dieser Zusammenhang kann auf Basis der Daten auch für die Grundgesamtheit vermutet werden ($p = 0,02$). Dies steht im Widerspruch zur Annahme, dass ein höherer BMI mit einer niedrigeren BAT-Aktivität und niedrigerem assoziierten adipozytären *DIO2*-Gehalt einhergeht. Die niedrigere *DIO2*-Expression in sowohl viszeralen als auch subkutanen Fettgeweben bei adipösen im Vergleich zu normgewichtigen Probanden wurde durch eine humane Studie bestimmt (Kurylowicz et al., 2015). Es ist anzunehmen, dass die ermittelten Werte in der Stichprobe durch Kolinearitäten mit weiteren Faktoren beeinflusst sind. Die untersuchte Stichprobe ermöglicht es jedoch nicht, diese Faktoren zu identifizieren und ihrer Einflussstärke nach zu differenzieren. Im abschließenden Kapitel werden mögliche Ursachen diskutiert.

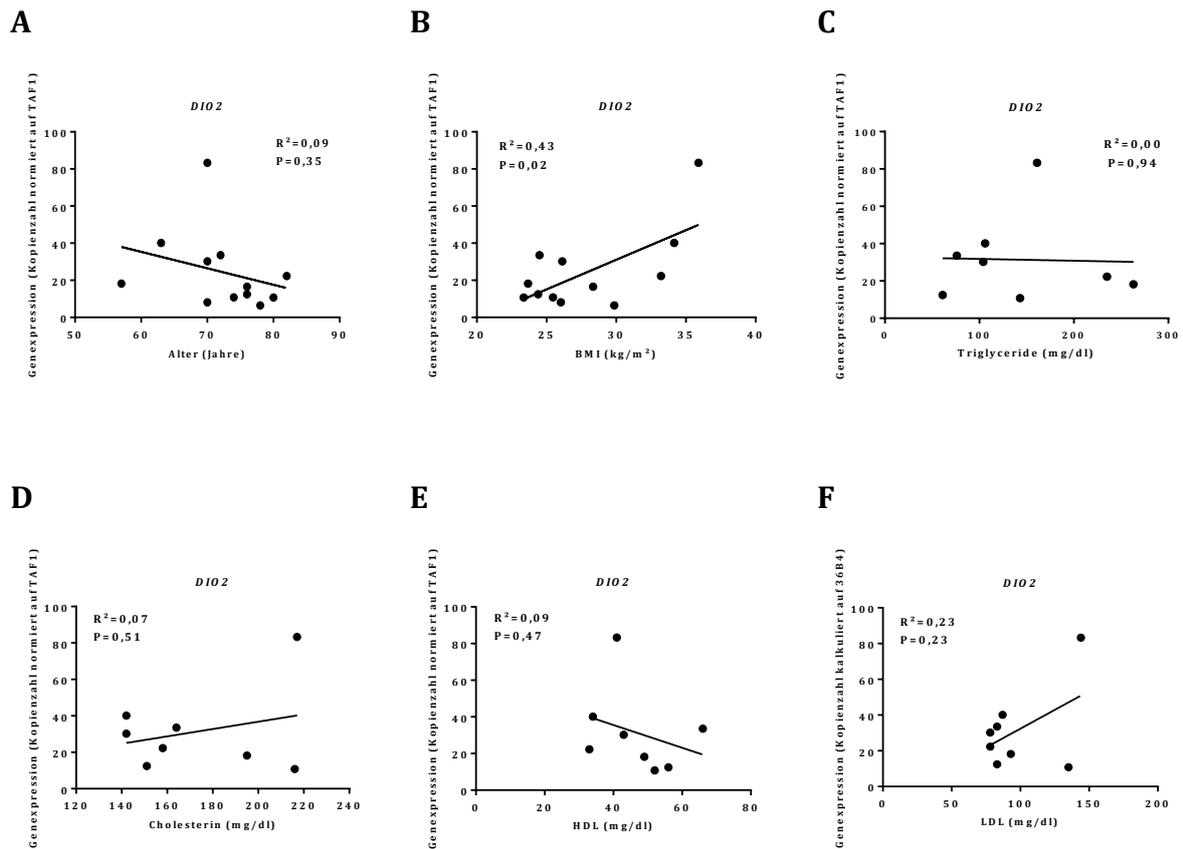


Abbildung 13 | *DIO2*-Expression in epikardialen Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen

Die Expression von *DIO2* unter Normothermie wurde mittels Taqman quantifiziert und auf das „housekeeping gen“ *TAF1* normiert. Die erhaltene, auf *TAF1* normierte Kopienzahl wurde in Abhängigkeit von Alter und BMI (A und B; n=12) sowie am Tag vor der Operation bestimmter Stoffwechselfparameter (C-F, n=8) aufgetragen.

Im epikardialen Fettdepot lässt sich auf Basis der untersuchten Stichprobe kein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen physiologischen und metabolischen Parametern und der basalen Genexpression von *UCP1* sowie *DIO2* identifizieren. Um den Einfluss der gewonnenen Gewebeproben zu überprüfen, wird die Korrelationsanalyse auch für das mediastinale Fettdepot durchgeführt (Abbildung 14 und Abbildung 15).

Die Analysen zeigen, dass die überprüften Einflussfaktoren und beeinflussten Faktoren auch im mediastinalen Fettdepot nur einen sehr geringen Teil der Variabilität der detektierten Genexpression erklären können. Zwar deuten die Bestimmtheitsmaße der Parameter Cholesterin (Abbildung 14-D) sowie LDL (Abbildung 14-F) auf einen schwachen Zusammenhang hin ($R^2=0,29 / 0,33$), gleichwohl muss jeweils der starke Einfluss eines einzelnen Extremwertes berücksichtigt werden. Dieser Extremwert weist jeweils eine Höhe auf, die jene der anderen Werte um das 10-fache übersteigt. In Kombination mit der Lage am Rande des jeweiligen Wertebereichs des jeweiligen Einflussfaktors führt dies zu einer stark positiven Beeinflussung des Bestimmtheitsmaßes. Die hohen p-Werte lassen außerdem darauf schließen, dass die Bestimmtheitsmaße der Stichprobe nicht auf die Grundgesamtheit übertragen werden dürfen ($p=0,21/0,18$).

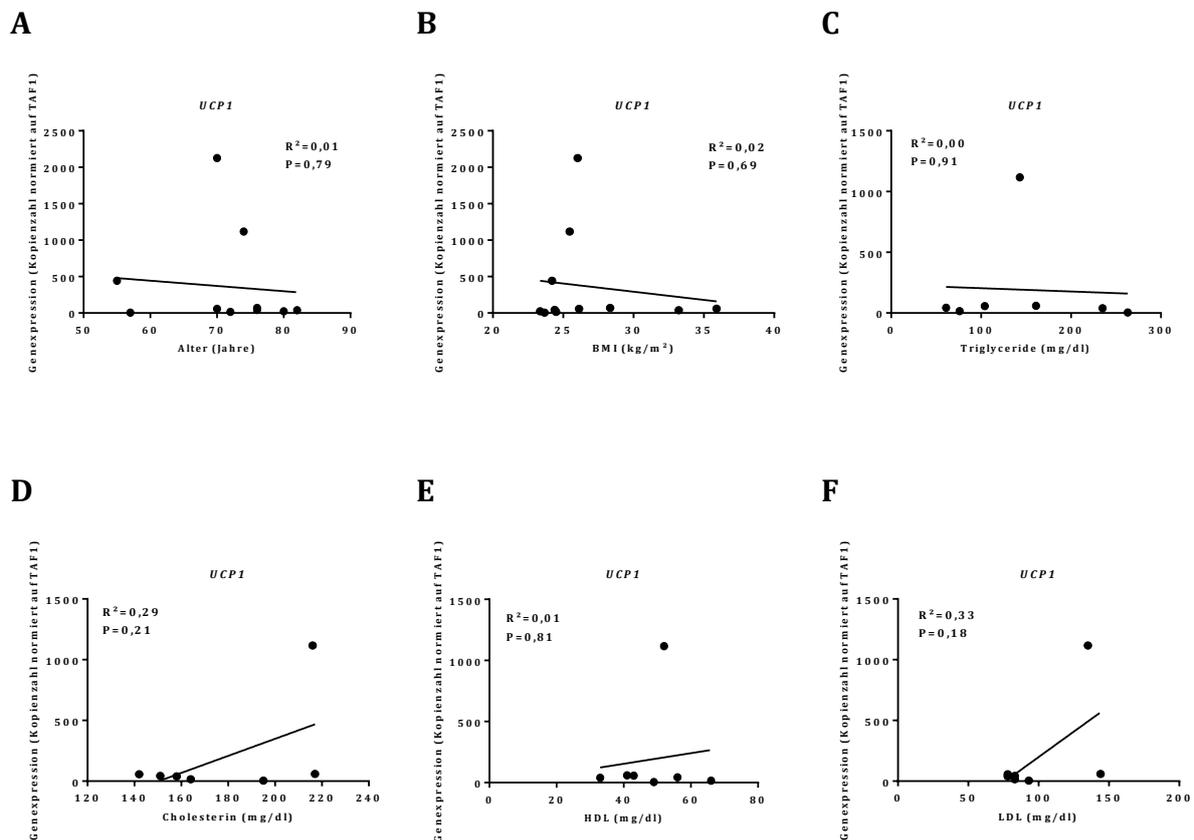


Abbildung 14 | *UCP1*-Expression in mediastinalem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen

Die Expression von *UCP1* unter Normothermie wurde mittels Taqman quantifiziert und auf das „housekeeping gen“ *TAF1* normiert. Die erhaltene, auf *TAF1* normierte Kopienzahl wurde in Abhängigkeit von Alter und BMI (A und B; $n=11$) sowie am Tag vor der Operation bestimmter Stoffwechselfparameter (C-F, $n=7$) aufgetragen.

Die Variabilität der *DIO2*-Genexpression lässt sich zu einem sehr geringen Teil mit dem Einfluss von TG erklären (Abbildung 15-C). Dem Bestimmtheitsmaß von 0,27 steht jedoch eine Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,19 gegenüber. Insofern ist auch hier ein Rückschluss auf die Grundgesamtheit nicht zulässig.

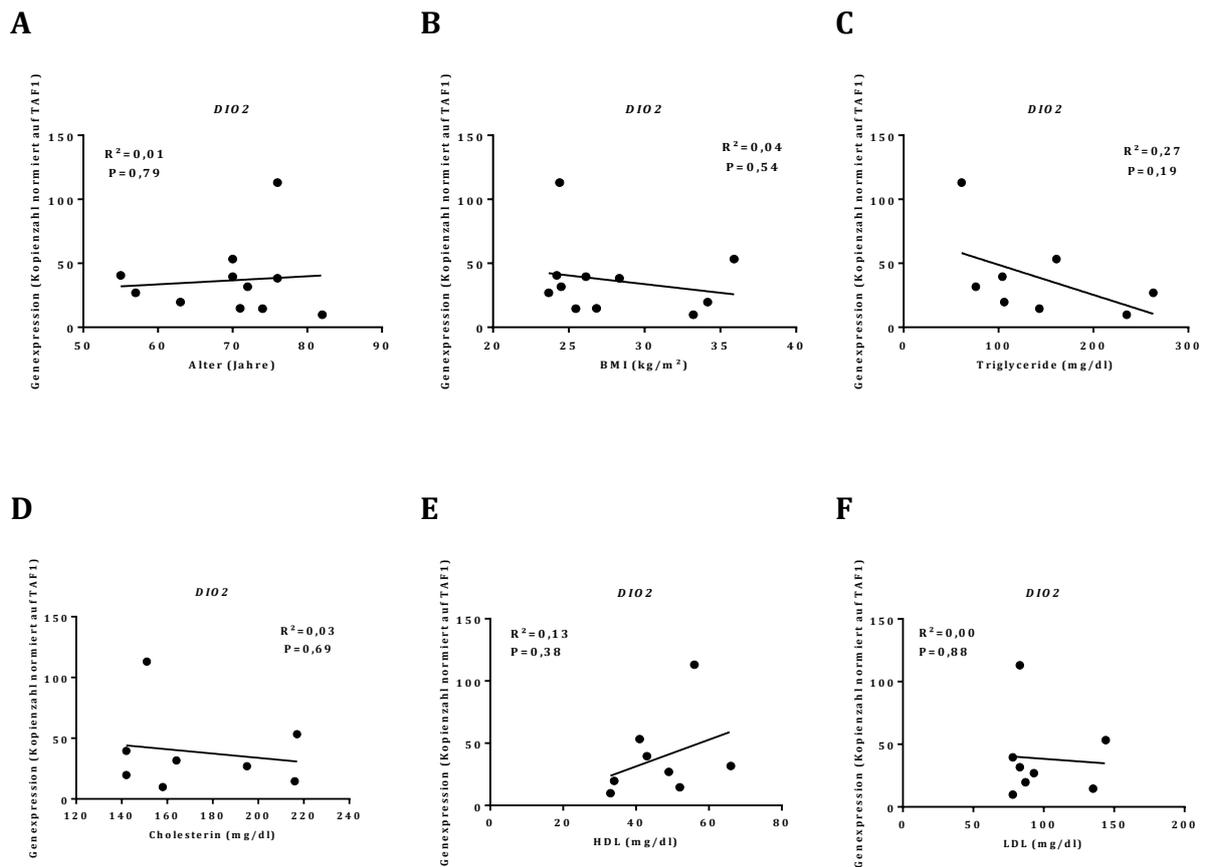


Abbildung 15 | *DIO2*-Expression in mediastinalem Fettdepot in Korrelation zum Alter und zu metabolischen Merkmalen

Die Expression von *DIO2* unter Normothermie wurde mittels Taqman quantifiziert und auf das „housekeeping gen“ *TAF1* normiert. Die erhaltene, auf *TAF1* normierte Kopienzahl wurde in Abhängigkeit von Alter und BMI (A und B; n=11) sowie am Tag vor der Operation bestimmter Stoffwechselfparameter (C-F, n=8) aufgetragen.

Insgesamt muss konstatiert werden, dass die im Forschungsumfeld etablierten Annahmen hinsichtlich der Beeinflussung der Genexpression in braunem Fettgewebe nicht geeignet sind, die Variabilität der Genexpression in der untersuchten Stichprobe zu beschreiben. Es muss davon

ausgegangen werden, dass diese Ergebnisse maßgeblich durch bisher nicht diskutierte Faktoren beeinflusst wurden.

4 Diskussion

Um die Möglichkeit einer Identifizierung und Lokalisierung braunen oder beigen Fettgewebes im menschlichen Körper zu eruieren, wurden in dieser Studie Fettgewebe fünf verschiedener humaner Depots auf molekularer Ebene analysiert. Schwerpunktmäßig wurde die etwaige Aktivierung thermogener Fettgewebe durch eine intraoperativ angewendete Hypothermie untersucht. Dazu erfolgte die Bestimmung von Expressionsraten von Markern klassischer brauner und beiger Adipozyten unter Hypothermie und Normothermie. Im Sinne eines Vorher-Nachher-Vergleichs wurde die Expression von Genen, welche die funktionelle und transkriptionelle Aktivität thermogener Adipozyten beeinflussen, bewertet. Durch radiologische Untersuchungen gibt es ausreichend Hinweise für eine Aktivierbarkeit brauner und beiger Fettgewebe durch einen Kältereiz beim Menschen (Lichtenbelt et al., 2009, Saito et al., 2009a). Es ist davon auszugehen, dass in thermogenen Fettgeweben durch einen Kältereiz die Transkription induziert würde und die mRNA der bestimmten Gene dann vermehrt nachweisbar wäre.

Die Genexpression unter Hypothermie verhält sich zwischen den Patienten einerseits und den Geweben andererseits sehr unterschiedlich. Während die Expression der Gene *PRDM16*, *PGC-1 α* und *FABP4* unter Kälteexposition nicht verändert ist, zeigen die Gene *UCP1* und *DIO2* veränderte, unterschiedlich gerichtete Expressionsraten. Eine statistische Signifikanz ergibt sich allerdings in nur einem Fall. In retrosternalem Gewebe wird die Genexpression von *UCP1* unter Kälteexposition signifikant vermindert detektiert. Dass statistische Tests bei kleinen Stichproben konservativ sind, ist bekannt (Bühner and Ziegler, 2009). Daher interessiert ein Blick auf die individuellen *UCP1*- und *DIO2*-Expressionen der einzelnen Patienten. Bei dieser patientenspezifischen Analyse zeigen einige Patienten keine Änderung der Genexpression, andere weisen eine Abnahme oder eine Zunahme der Genexpression auf. Die Analyse der Genexpressionsraten zeigt dabei keinerlei Abhängigkeit in Bezug auf die Dauer der Hypothermie. Eine Abnahme der Genexpression lässt sich mit der Dauer der Hypothermie keinesfalls erklären, sondern könnte durch andere Faktoren hervorgerufen worden sein. Diese sollen an späterer Stelle noch erläutert werden. Aber auch eine mehr oder weniger starke Zunahme der Genexpression kann durch die Variabilität der Dauer der Hypothermie in dieser Studie nicht erklärt werden. Die gewonnene, sich nicht eindeutig darstellende Ergebnislage sollte jedoch nicht als Beleg einer fehlenden Kälte-Aktivierbarkeit beiger und brauner Fettgewebe gewertet werden. Vielmehr ist die Beantwortung der Frage nach dem Einfluss der intraoperativen Hypothermie auf die untersuchten Fettgewebe schwierig, weil der für die Gewebegewinnung gewählte Kontext der Operation ebenso wie die damit ausgewählte Stichprobe strukturelle Merkmale aufweisen, welche zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben.

Auch wenn eine Induktion durch die intraoperative Hypothermie nicht nachweisbar ist, wurden in den Fettdepots der in dieser Arbeit untersuchten Patienten auf molekularer Ebene dennoch Gene nachgewiesen, welche zur Genausstattung brauner und beiger Adipozyten gehören.

Verglichen zum subkutanen Fettdepot, welches das typische weiße Fettgewebe repräsentiert, wird sowohl in epikardialem als auch in mediastinalem Fettgewebe signifikant mehr *UCP1* nachgewiesen. Es wird dort ein 18 Mal höherer *UCP1*-Gehalt detektiert als in subkutanem Fettgewebe, wo es an der Nachweisgrenze liegt. Ebenfalls wurde in perikardialem und retrosternalem Fettgewebe *UCP1* nachgewiesen. *UCP1* befähigt die thermogenen Adipozyten zur zitterfreien Thermogenese, da es den entkoppelten Elektronenfluss über die Mitochondrienmembran ermöglicht und damit Energie in Wärme umwandelt (Golozoubova et al., 2004, Cannon and Nedergaard, 2004). Ebenfalls nachweisbar sind die Gene *PGC-1 α* , *PRDM16* und *DIO2*, welche eine wichtige Rolle in der Entwicklung thermogener Zellen und Zellkomponenten und der Regulierung der Proteinbiosynthese von *UCP1* spielen. Es sind jedoch unterschiedliche Expressionsraten von *UCP1* auf der einen und *PGC-1 α* und *PRDM16* auf der anderen Seite nachweisbar. Obwohl die Gene *PGC-1 α* und *PRDM16* ebenso wie *UCP1* in der Regel eine stabile Induktion bei Kälteaktivierung zeigen, waren diese zwei Gene in dem Gewebe mit dem höchsten *UCP1*-Gehalt am geringsten nachweisbar. Es fand sich in epikardialem Fettgewebe signifikant weniger *PGC-1 α* und *PRDM16* als in perikardialem, retrosternalem und mediastinalen Fettgewebe, im Falle von *PRDM16* auch signifikant weniger als in subkutanem Fettgewebe. Nichtsdestotrotz deutet der Nachweis der genannten Gene die Anwesenheit thermogener Adipozyten in den beschriebenen Fettdepots an.

Insgesamt zeigen sich die Expressionsraten der Marker braunen und beigen Fettgewebes auf sehr niedrigem Niveau. So sind beispielsweise die *UCP1*-Expressionsraten deutlich niedriger als diejenigen, welche von murinen Studien veröffentlicht wurden. Cheung et al. fanden nicht nur in murinem BAT um den Faktor 1000, sondern auch in murinem weißen Fettgewebe 30 Mal höhere *UCP1*-Expressionsraten als im mediastinalen humanen Depot. Eine artefakte Detektion könnte bei so geringer mRNA-Ausbeute diskutiert werden. Da die *UCP1*-Ct-Werte der quantitativen PCR dieser Arbeit mit denen der Cheung-Studie vergleichbar sind (mittlerer Ct-Wert für *UCP1* im mediastinalen Depot: 33 bei Cheung et al. verglichen zu 33,8 in dieser Arbeit), lässt sich ein Experiment dieser Arbeitsgruppe zur Verifizierung der gemessenen Werte heranziehen. Humane Leberproben, welche der Negativkontrolle dienten, wiesen dort keine *UCP1*-Expression auf (Cheung et al., 2013). Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Detektion des *UCP1*-Gehalts in dieser Arbeit um eine wahre Detektion handelt. Die Ursachen einer nur minimalen Auffindbarkeit thermogener Adipozyten könnten wiederum in strukturellen Merkmalen der Stichprobe zu finden sein.

Diese könnten ebenfalls eine Erklärung für die in dieser Arbeit von anderen Studien abweichenden, erhaltenen Ergebnisse der Korrelationsanalysen der Genexpression von *UCP1* und *DIO2* bieten. Die Variabilität der *UCP1*- und *DIO2*-Expression in epikardialem und mediastinalem Gewebe lassen sich nicht durch Unterschiede in den Parametern Alter, BMI, Triglyceride, Cholesterin, HDL und LDL erklären.

Die Beantwortung der Frage nach der Präsenz und Aktivierbarkeit thermogener Fettgewebe muss vor dem Hintergrund getroffen werden, dass es sich bei der untersuchten Stichprobe um 15 Einzelfälle handelt. Diese sind durch eine jeweils spezifische Zusammensetzung beeinflussender Faktoren gekennzeichnet, die im Rahmen dieser Arbeit nicht kontrolliert werden konnten. Zu den wichtigsten gehören die Medikation, das Alter, der BMI und die für jeden Patienten spezifischen Operationsbedingungen. Die in der vorliegenden Studie nicht eindeutig sichtbare Aktivierbarkeit der Vorläuferzellen beiger und brauner Adipozyten durch Kälte muss im Kontext dieser Faktoren beurteilt werden.

4.1 Faktoren im Kontext der Stichprobe

Alle Patienten der Untersuchungsgruppe unterzogen sich einer Operation am offenen Herzen, die im Allgemeinen eher eine Patientengruppe betrifft, welche multimorbide und zudem älter ist. So gehörten die untersuchten Patienten einer relativ homogenen Gruppe eher älterer Personen an. Das durchschnittliche Alter betrug 71 Jahre. Außerdem waren die meisten untersuchten Patienten übergewichtig. Es ist bekannt, dass die Menge und Aktivität braunen und beigen Fettgewebes mit zunehmendem Alter und BMI abnimmt (Cypess et al., 2009, Saito et al., 2009a, Lichtenbelt et al., 2009). Gegenüber jungen, schlanken Menschen war die Möglichkeit, die ohnehin kleinen Mengen thermogenen Fettgewebes in der Untersuchungsgruppe zu aktivieren, also durch das höhere Lebensalter und den BMI beeinträchtigt. Daher sind die Ergebnisse für diese spezifische Gruppe von Menschen eingeschränkt gültig.

Abgesehen von den beschriebenen Voraussetzungen des Alters und BMI in der Stichprobe, bringt jeder Patient ein spezifisches Genom mit. In ^{18}F -FDG-PET/CT-Studien variierte die Intensität des Signals unter den Individuen, welche eine ^{18}F -Flouoro-Deoxy-Glukose-Aufnahme zeigten, signifikant (Nedergaard et al., 2010). Schon in den 90er Jahren wurde ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im Promotor des humanen *UCP1* beschrieben, welcher mit einem unterschiedlichen Ausmaß der *UCP1*-Expression in humanem Fettgewebe sowie einer unterschiedlichen altersabhängigen Abnahme thermogenen Fettgewebes assoziiert ist (Yoneshiro et al., 2013b, Oppert et al., 1994, Esterbauer et al., 1998). Daher kann angenommen werden, dass eine genetische Variabilität im

regulatorischen Element der UCP1-Gensequenz auch in dieser Studie für die zwischen den Patienten unterschiedlichen UCP1-Expressionsraten sowie deren Aktivierbarkeit mitverantwortlich ist.

Während letztgenannte Aspekte beim Menschen recht gut erforscht und breit akzeptiert sind, ist die Rolle vieler Arzneimittel in der Funktion und Entwicklung thermogener Adipozyten weitgehend unklar. Gerade diese haben in der vorliegenden Studie jedoch einen bedeutenden Einfluss. Die Operation erfolgt bei der Therapie einer koronaren Herzkrankheit mehr noch als bei der Therapie eines Klappenvitiums als letzter Schritt in einem Therapieplan, dem eine oft langjährige Behandlung mit Medikamenten vorausging. Alle Patienten nahmen täglich Medikamente ein, die allermeisten mehr als ein Präparat. Hinzu kommt die notwendige Gabe einer Reihe von Arzneimitteln, die den operativen Eingriff möglich machen. Die Auswirkung einiger dieser Medikamente könnte für die Funktion und Regulation thermogener Adipozyten eher unerheblich sein, da sie zum bisherigen Forschungsstand jeglicher, pharmakologischer Angriffspunkte entbehren. Für andere gibt es jedoch Hinweise für eine Auswirkung auf thermogene Fettgewebe.

An erster Stelle sollen hier β -Adrenozeptor-Antagonisten genannt werden, welche von der überwiegenden Mehrheit der Patienten täglich eingenommen wurden (Tabelle 11). Diese Medikamente schirmen das Zielorgan durch einen Antagonismus an β -Rezeptoren von sympathischer Stimulierung ab. Eben diese Rezeptoren sind jedoch maßgeblich an der Genese und der Funktion thermogener Adipozyten beteiligt. Der β -Blocker Propranolol wurde in radiologischen Studien als Agens, welches in der Lage ist, die Aktivität brauner Adipozyten zu inhibieren, identifiziert (Parysow et al., 2007, Tatsumi et al., 2004). Damit übereinstimmend fanden Cypess et al. bei der Auswertung von ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchungen eine zehnmal niedrigere Wahrscheinlichkeit wesentliche Mengen braunen Fettes zu besitzen, wenn β -Blocker eingenommen wurden (Cypess et al., 2009). Interessanterweise gibt es in der vorliegenden Arbeit eine Gruppe von vier Patienten, welche in epikardialem Fettgewebe im Durchschnitt sechsmal höhere basale UCP1-Expressionsraten aufweisen als die anderen Patienten. Drei dieser vier Patienten nahmen keinen β -Blocker ein. Auch bei der Untersuchung der UCP1-Expression in mediastinalem Gewebe gibt es drei Patienten, welche durch höhere basale Expressionsraten gekennzeichnet sind. Zwei dieser Patienten nahmen ebenfalls keinen β -Blocker ein. Es ist also denkbar, dass sich die tägliche Einnahme von β -Blockern in der Untersuchungsgruppe negativ auf die Zahl thermogener Adipozyten in mediastinalem und insbesondere epikardialem Fettgewebe auswirkte. Untersuchungen zu diesem Sachverhalt durch humane Studien sind kaum dokumentiert. Die Relevanz dieses Aspektes ist jedoch groß. β -Rezeptorenblocker zählen in Deutschland zu den am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln. Im Jahr 2015 wurden rund 2,26 Milliarden definierte Tagesdosen β -Blocker verordnet (Schwabe and Paffrath, 2016). Die am weitaus meisten verschriebenen Wirkstoffe sind

Metoprolol gefolgt von Bisoprolol (Schwabe and Paffrath, 2016, Lemmer, 2016). Diese sogenannten kardioselektiven Präparate kommen bei kardiovaskulären Indikationen, wie denen der Untersuchungsgruppe, zum Einsatz. Sie könnten in zweierlei Weise eine Bedeutung für die untersuchten thermogenen Fettgewebe haben.

Kardioselektive β -Rezeptorenblocker besitzen eine höhere Affinität zum β_1 -Rezeptor, dessen Dichte am Herzen besonders groß ist. Doch auch braunes Fettgewebe ist von der intakten Funktion dieses Rezeptortyps abhängig. Über β_1 -Rezeptoren reagiert braunes Fettgewebe von Mäusen mit einer erhöhten Proliferation von Vorläuferzellen auf Kälte (Bronnikov et al., 1992, Lee et al., 2015). Eine Antagonisierung der Rezeptoren würde also in einer verminderten Rekrutierung von Vorläuferzellen brauner Adipozyten - auch in der Untersuchungsgruppe - resultieren und letztendlich zu einer verminderten Menge braunen Fettgewebes führen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt zudem, dass BAT-ansässige β_3 -Rezeptoren in bestimmten Mausmodellen für die adaptive Thermogenese entbehrlich sind und wirft neben der Möglichkeit einer nicht-adrenergen Aktivierung auch eine Aktivierung brauner Adipozyten über andere β -Rezeptoren auf (de Jong et al., 2017). Ginge man hypothetisch von einer Aktivierung über β_1 -Rezeptoren aus, würde die Einnahme von β -Adrenozeptor-Antagonisten somit neben der Proliferation auch die Aktivierung brauner Adipozyten hemmen. Zudem ist über die Wirkung von kardioselektiven Adrenozeptor-Antagonisten an humanen β_3 -Rezeptoren, die lange Zeit als die primären Vermittler der Aktivierung thermogener Adipozyten galten, wenig bekannt (Golozoubova et al., 2004). Denn in höherer Dosierung verschwindet die β_1 -Selektivität der kardioselektiven Adrenozeptor-Antagonisten und es gibt ebenfalls eine Wirkung an β_2 -Rezeptoren (Mutschler, 2013). Auch ist eine antagonistische Wirkung am β_3 -Rezeptor und eine damit verbundene Inaktivierung thermogener Adipozyten denkbar. In beiden genannten Fällen wäre es möglich, dass sich eine Hemmung der adaptiven Thermogenese durch die fehlende Verbrennung von Fettsäuren und Glukose metabolisch in einer Gewichtszunahme äußerte. Tatsächlich gibt es Studien an den β -Adrenozeptor-Antagonisten Atenolol, Metoprolol und Propranolol, welche eine Assoziation zwischen der Einnahme dieser Medikamente und einer Gewichtszunahme beschreiben (Sharma et al., 2001). Unklar ist, ob diese Gewichtszunahme durch eine abnehmende Menge braunen und beigen Fettgewebes verursacht ist. Zusammengefasst ist es wahrscheinlich, dass durch die Einnahme bestimmter β -Adrenozeptor-Antagonisten ein wichtiger Schalter in der Aktivierung thermogener Adipozyten blockiert wird. Dies könnte sich negativ auf das Vorhandensein und die Aktivierbarkeit thermogener Adipozyten bei der Mehrheit der untersuchten Patienten ausgewirkt haben.

Die Relevanz der Erforschung unterschiedlicher Wirkstoffe zeigt sich am Beispiel von Nebivolol, einem weiteren β -Adrenozeptor-Antagonisten. Dieser ist ebenfalls ein β_1 -selektiver Antagonist und zeichnet sich durch eine zusätzliche vasodilatierende Wirkung aus. Eine Studie an humanen Adipozyten zeigt, dass der Wirkstoff Nebivolol in vitro über β_3 -Rezeptoren die Induktion der Li-

polyse und der Gene *UCP1* und *PGC-1 α* initiiert und außerdem zu einer Reduktion der Lipidtropfengröße führt (Bordicchia et al., 2014). Eine im Vergleich zum weißen Fettgewebe kleine Lipidtropfengröße ist kennzeichnend für thermogene Fettgewebe (Bartelt and Heeren, 2013). Ein Agonismus des Wirkstoffes Nebivolol am β_3 -Rezeptor wurde auch für humane Endomyokardzellen beschrieben (Rozec et al., 2009). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt zudem eine durch Nebivolol induzierte mitochondriale Biogenese in murinen Adipozyten (3T3-L1) (Huang et al., 2013). Somit könnte dieser Adrenozeptor-Antagonist neben seiner erwünschten hemmenden Wirkung am β_1 -Rezeptor sogar begünstigende Effekte auf die Funktion und Genese thermogener Adipozyten und infolgedessen auf den Metabolismus haben. In der Untersuchungsgruppe dieser Studie gibt es einen Patienten, der Nebivolol täglich einnahm. Dieser unterscheidet sich in der Genexpression nicht von den anderen Patienten, zeigt aber bezüglich seines Stoffwechselprofils interessante Aspekte. Der Cholesterinwert zeigte sich ebenso wie das LDL im unteren Normbereich, das HDL oberhalb und die Triglyceride unterhalb des Referenzbereiches. Der Patient ist normgewichtig. Im Vergleich zum Gruppendurchschnitt zeigt dieser Patient ein durchweg günstigeres Fettstoffwechselprofil. Ein solches ist wiederum assoziiert mit einer höheren Aktivität thermogener Fettgewebe (Bartelt et al., 2011, Berbee et al., 2015). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich hier um einen einzigen Patienten handelt, können diese Ergebnisse bestenfalls als Hinweis für eine förderliche Auswirkung des Medikamentes Nebivolol auf die Aktivität thermogener Fettgewebe gewertet werden.

Neben den β -Adrenozeptor-Antagonisten gibt es eine weitere Medikamentengruppe unter den täglich eingenommenen Medikamenten, die in der Untersuchungsgruppe quantitativ eine Rolle spielt. Insgesamt nahmen zehn der untersuchten Patienten einen ACE-Hemmer oder AT_1 -Rezeptorantagonisten ein (Tabelle 11). Diese Arzneimittel greifen in das Renin-Angiotensin-System (RAS) ein, welches den Salz- und Wasserhaushalt und den Blutdruck reguliert.

Zunehmend ist jedoch auch die Rolle des RAS in der Regulierung der Energie- und Glukosehomöostase anerkannt. Gegenstand derzeitiger Forschung ist die Frage nach einer Assoziation der Dysregulation des RAS mit der Pathogenese der Adipositas und der Dysfunktion von Fettgewebe. Komponenten, welche für die Vermittlung der Effekte des RAS bedeutsam sind, konnten in humanen und murinen weißen Fettgeweben nachgewiesen werden (Karlsson et al., 1998, Pinterova et al., 2000, Engeli et al., 1999). Zudem wurde eine erhöhte Aktivität des mit dem Fettgewebe verbundenen RAS bei adipösen Mäusen und Menschen nachgewiesen (Boustany et al., 2004, Cooper et al., 1998, Rahmouni et al., 2004). Die lokale Wirkung des RAS im Fettgewebe ist die Lipidsynthese und die Einlagerung der Lipide ins Fettgewebe (Jones et al., 1997). Dementsprechend reduziert die periphere Inhibition des RAS durch ACE-Hemmer und AT_1 -Rezeptorantagonisten das Körpergewicht und Adipositas (de Kloet et al., 2009, Shimabukuro et al., 2007, Weisinger et al., 2009). Auch in *UCP1*-exprimierendem, perivaskulärem Fettgewebe von Ratten wurden wichtige

RAS-Komponenten, wie Hormone, Enzyme und Rezeptoren detektiert (Galvez-Prieto et al., 2008). Zudem wurde erst kürzlich gezeigt, dass im weißem Fettgewebe AT_{1A} -Rezeptor-defizienter Mäuse vermehrt Browning registriert werden kann (Tsukuda et al., 2016). AT_{1A} -Rezeptoren vermitteln die Wirkung des Schlüsselhormons Angiotensin II im RAS und gehören zu den Rezeptorsubtypen, welche durch AT_1 -Rezeptorantagonisten gehemmt werden. Es könnte aus diesen Untersuchungen eine den thermogenen Fettgeweben zuträgliche Wirkung der Einnahme von Medikamenten, welche das RAS hemmen, abgeleitet werden. Dem entgegen stehen Untersuchungen zur zentralen Wirkung des Hormons Angiotensin II. Denn eine erhöhte Aktivität des RAS im Gehirn fördert eine negative Energiebalance (de Kloet et al., 2009, Porter and Potratz, 2004). Die permanente zerebrale Gabe von Angiotensin II führt bei Ratten zu einer Erhöhung des Energieumsatzes und zu einer wahrscheinlich sympathischen Aktivierung von braunem Fettgewebe (de Kloet et al., 2011). Dies deutet einen negativen Feedback-Mechanismus, der regulierend in die periphere Angiotensin II-Wirkung einwirkt, an. Die Relevanz des RAS für das Vorhandensein und die Aktivierbarkeit thermogenen Fettgewebes ist daher noch ungewiss und bedarf weiterer Forschung. Somit lässt sich eine Auswirkung der Einnahme von ACE-Hemmern und AT_1 -Rezeptorantagonisten auf die untersuchten Fettgewebe bei den betroffenen Patienten zwar vermuten, deren Einfluss auf die Messergebnisse jedoch schwer definieren.

Hinweise für einen Einfluss auf braunes Fettgewebe gibt es auch für Cholesterinsenker. Sogenannte Statine wurden von sieben Patienten täglich eingenommen (Tabelle 11). Deren Hauptindikationen sind die Hypercholesterinämie und, bedeutend in der Untersuchungsgruppe, die Primär- und Sekundärprophylaxe der Arteriosklerose zur Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse. In einer murinen Studie wurde gezeigt, dass der Wirkstoff Lovastatin in braunem Fettgewebe zu einer Aktivierung der Iodothyronine Deiodinase 2 und zu einem erhöhten *Dio2*- und *Ucp1*-mRNA-Gehalt führt (Miller et al., 2012). Eine Interpolation dieser Ergebnisse auf die in dieser Untersuchungsgruppe relevanten Wirkstoffe Simvastatin, Atorvastatin und Fluvastatin ließe eine vermehrte *DIO2*- und *UCP1*-Expression vermuten.

Diabetesmedikamente wurden von einem Patienten eingenommen und fallen daher quantitativ nicht ins Gewicht (Tabelle 11). Erwähnenswert ist dennoch, dass diese eine begünstigende Auswirkung auf die Aktivität thermogenen Fettgewebes haben. So vermittelt Metformin seine positiven Stoffwechseleffekte auch über eine BAT-Aktivierung (Geerling et al., 2014). Sitagliptin wirkt sich bei Ernährungs-induziert, adipösen Mäusen positiv auf den Proteingehalt von u.a. UCP1 und PGC-1 α aus (Shimasaki et al., 2013).

4.2 Faktoren im operativen und methodischen Kontext

Abgesehen von den diskutierten patientenspezifischen Faktoren, welche sich durch die Auswahl der Patientengruppe ergeben, sind auch Faktoren zu nennen, welche aus dem Operationskontext resultieren und unweigerlich den Versuchsaufbau prägen. Neben der Handhabung der Variablen Hypothermie, sind hier die hormonelle Adaption des Organismus auf perioperative Stressoren und die Auswirkungen der perioperativ verabreichten Medikation von Bedeutung.

Während die tägliche Medikation in ihrer Zusammensetzung und Dosierung zwischen den Patienten variierte, lassen sich in der perioperativen Medikation nur geringfügige Unterschiede feststellen. Diese sind vor allem durch die Verwendung unterschiedlicher Präparate innerhalb einer Medikamentenklasse gekennzeichnet. Der Zeitpunkt der Verabreichung ist hier ausschlaggebend in der Beurteilung der Möglichkeit einer Einflussnahme auf die Aktivität thermogener Fettgewebe.

Bedeutsam im Hinblick auf eine negative Auswirkung im Sinne einer Hemmung der Aktivität thermogener Fettgewebe sind die volatilen Anästhetika. Wegen ihrer hypnotischen und muskelrelaxierenden Wirkung wurde allen Patienten zur Vorbereitung auf den operativen Eingriff Sevofluran verabreicht. Dies ist ein volatiles Anästhetikum, welches zur Gruppe der Flurane gehört. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Hypothermie während der Anästhesie bei Kindern führte zur näheren Auseinandersetzung mit dem Einfluss der Anästhetika auf braune Adipozyten. Tatsächlich wurden volatile Anästhetika, anders als Injektionsanästhetika, als Hemmer der Thermogenese an braunen Adipozyten von Hamstern identifiziert. Die Inkubation der Zellen mit anästhetisch relevanten Konzentrationen volatiler Anästhetika führte zu einer signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs der mit Noradrenalin stimulierten Zellen (Ohlson et al., 1994). Im Fokus der Experimente stand der Wirkstoff Halothan, welcher inzwischen obsolet ist. Eine ebenso potente Wirkung riefen aber auch die ebenfalls zur Gruppe der Flurane gehörenden Stoffe Enfluran und Isofluran hervor (Ohlson et al., 1994). Die enge chemische Verwandtschaft dieser Stoffe mit dem in der Untersuchungsgruppe eingesetzten Wirkstoff Sevofluran führt zu der Annahme, dass die Thermogenese auch in den untersuchten Gewebeproben durch die Gabe des volatilen Anästhetikums gehemmt worden sein könnte. Inwiefern sich dies auf molekularer Ebene gezeigt haben könnte, ist unklar. Während für den Wirkstoff Halothan eine Hemmung der Adenylatzyklase mit daraus resultierender reduzierter cAMP-Konzentration nachgewiesen wurde, blieb die Gruppe der Flurane hinsichtlich des Wirkmechanismus im braunen Adipozyten unerforscht (Ohlson et al., 2004). Auch wenn eine Hemmung der Thermogenese in den untersuchten Gewebeproben angenommen werden kann, bleibt somit offen, ob die verwendeten volatilen Anästhetika auch in der Lage sind, die Expression der gemessenen Gene zu beeinflussen. Die Kenntnis des Wirkmechanismus wäre auch insofern bedeutsam, da während der Operation allen Patienten

kontinuierlich Noradrenalin verabreicht wurde. Dies ist ein potenter Aktivator der Thermogenese, der seine Wirkung durch die Aktivierung der Adenylatzyklase entfaltet. Bei einer der des Halothans ähnlichen Wirkweise der Flurane, könnte Noradrenalin keine Wirkung an thermogenen Adipozyten mehr auslösen.

Ein weiteres Medikament, welches negative Auswirkungen auf die Aktivierbarkeit der untersuchten Fettgewebe gehabt haben könnte, ist Heparin. Dieses Medikament betraf alle untersuchten Gewebeproben in unterschiedlicher Weise. Zum einen ist hier die niedrigdosierte Heparin-Gabe zu nennen, welche zur Thromboseprophylaxe im Vorfeld der Operation erfolgte. Außerdem waren alle der unter Hypothermie gewonnenen Gewebeproben sowie auch ein Teil der unter Normothermie gewonnenen Gewebeproben von einer hochdosierten Heparin-Gabe betroffen. Weil Heparin möglicherweise indirekt zu einer Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität in den thermogenen Adipozyten führt, könnten die Untersuchungsergebnisse der betroffenen Proben verzerrt worden sein.

Heparine führen durch das Abwaschen der Lipoproteinlipase (LPL) von der Endothelzelle zu einem Entzug von freien Fettsäuren im thermogenen Adipozyten (Chevreuil et al., 1993). An murinen Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass freie Fettsäuren eine wichtige Rolle in zellulären Signalprozessen spielen. Durch die Aktivierung von *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) und eine stromabwärts verursachte Induktion von Targetgenen, wie unter anderem *Pgc-1 α* , werden intrazelluläre Prozesse reguliert (Haemmerle et al., 2011). Dies sind Gene, die auch in der adaptiven Thermogenese des Adipozyten regulativ beteiligt sind. Unter physiologischen Bedingungen wird die LPL kälteinduziert vermehrt vom Adipozyten sezerniert und zur Endothelzelle verlagert (Bartelt et al., 2011). Damit wird eine ausreichende Versorgung des Adipozyten mit dem Brennstoff freie Fettsäuren gewährleistet. Durch die von Heparin vermittelte Ablösung zirkulieren LPLs nun im Blut und spalten dort Triglyceride zu freien Fettsäuren, welche dann nicht von Adipozyten, sondern vorrangig von der Leber aufgenommen werden (Schlein et al., 2016). Eine eventuelle transkriptionelle Aktivierung durch freie Fettsäuren in den thermogenen Adipozyten könnte daher vermindert sein. Dies würde sich in den betroffenen Gewebeproben auf molekularer Ebene in einer verminderten Induktion des Gens *PGC-1 α* mit negativer Auswirkung auf die UCP1-Induktion zeigen. Ebenso wäre auch die Mitochondriogenese, für die PGC-1 α ein Hauptregulator ist, eingeschränkt aktiviert. Da ein Effekt mehr noch bei der High Dose-Heparin-Gabe als bei der Low-Dose-Gabe zu erwarten wäre, beträfe das insbesondere die unter Hypothermie gewonnenen Proben.

Um eine gute Vergleichbarkeit der Genexpression zwischen den Patienten zu gewährleisten, ist ein standardisiertes Protokoll bezüglich der Dauer und des Ausmaßes der Hypothermie notwen-

dig. Dauer und Stärke der Hypothermie unterlagen in dieser Arbeit den Erfordernissen der Operation. Folglich war es nicht möglich, vergleichbare Bedingungen zwischen den einzelnen Probanden sicherzustellen. Grundsätzlich jedoch ist die gewählte Methode der Kühlung des Organismus durch die Herz-Lungen-Maschine der Kühlung des Körpers über die Raumluft, kaltes Wasser oder Eis derzeit überlegen. Aktuell diskutiert wird ein möglicher Isolierungseffekt durch die subkutane Fettschicht, welche im Zustand der Adipositas ausgeprägter ist als bei schlanken Menschen (Nedergaard et al., 2010). Eine etwaige Isolierung resultierte einerseits in einer verminderten BAT-Aktivierung mit daraus folgenden Konsequenzen für den Metabolismus (vgl. 1.4). Andererseits bedeutete diese im methodischen Kontext eine schlechte Vergleichbarkeit von normgewichtigen mit übergewichtigen Individuen. Zumindest für adipöse Mäuse konnte keine stärkere Isolierung im Vergleich zu nicht-adipösen Tieren festgestellt werden (Fischer et al., 2016). Humane Studien stehen noch aus. Die Kühlungsmethode in der vorliegenden Arbeit schließt eventuelle Isolierungseffekte durch die subkutane Fettschicht aus. Patienten würden im Falle eines standardisierten Kühlungsprotokolls unabhängig ihres BMIs gleich stark durch die Kälte aktiviert.

Methodisch interessant wäre zudem die Bestimmung der Expression thermogener Gene als Funktion der Zeit. Damit könnte verifiziert werden, ob die Zeitspanne von der Aktivierung thermogener Fettgewebe durch die intraoperative Hypothermie bis zur Gewebegewinnung ausreichend ist, um eine veränderte Genexpression nachweisen zu können.

Nicht zuletzt muss auch der Aspekt der endogenen Stressreaktion des Körpers als Antwort auf die perioperativen Reize beachtet werden. Die perioperative Stressreaktion ist ein multifaktorielles Geschehen, zu der die mitunter starke Reizung von Nozizeptoren ebenso beiträgt wie perioperative Hypovolämie, Hypoxämie und Azidose (Bauer et al., 1998). Wenn auch teilweise kompensiert durch anästhetische Medikamente, reagiert der Organismus letztendlich mit einer erhöhten Sekretion von katabol aktiven Hormonen, wobei Glukagon, Cortison und Katecholamine maßgeblich sind. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme von anabolen Hormonen wie dem Insulin (Holte and Kehlet, 2002). Dies zeigt ein weiteres Mal, dass die Gewebegewinnung in einem für den Organismus speziellen, unphysiologischen Zustand stattfand.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammengefasst wird durch die vorangegangene Diskussion deutlich, dass der Versuchsaufbau in dieser Form nicht geeignet ist, die Aktivierung thermogener Fettgewebe durch Kälte zu untersuchen. Letztendlich ist es auf Basis dieser relativ kleinen und heterogenen Stichprobe kaum mög-

lich, aufgrund der jeweils unterschiedlichen spezifischen Einflussfaktoren und der nicht vollständig erklärbaren Wechselwirkungen zwischen diesen Einflussfaktoren, verallgemeinerbare Schlussfolgerungen zu ziehen.

Die Erörterung der möglichen Einflussnahme verschiedener Medikamente zeigt deutlich, dass die Ursachen der fehlenden Aktivierbarkeit der thermogenen Fettgewebe in dieser Studie auf unterschiedlichen Ebenen zu finden sind. Dazu gehört das hemmende Eingreifen von β -Adrenozeptor-Antagonisten in die Entwicklung thermogener Adipozyten. Weiterhin ist die etwaige Hemmung von Rezeptoren und Enzymen, welche maßgeblich an der Aktivierung der Thermogenese beteiligt sind, durch β -Adrenozeptor-Antagonisten und volatile Anästhetika zu nennen. Eine Reduzierung der Funktion sowie die eventuelle Reduzierung der transkriptionellen Aktivierung thermogener Adipozyten könnte durch den Heparin-vermittelten Entzug freier Fettsäuren stattgefunden haben. Der intraoperative Kältereiz scheint bei dieser Fülle an Einflussfaktoren trivial zu sein.

Um eine Aussage über die Aktivierbarkeit thermogenen Fettgewebes durch Hypothermie treffen zu können, sollten die erläuterten Einflussfaktoren im Experiment kontrolliert werden.

β -Adrenozeptor-Antagonisten waren in dieser Studie scheinbar in der Lage, die basalen Genexpressionsraten von *UCP1* zu dezimieren und hätten sich damit von den anderen Faktoren als die potentesten abgegrenzt. Eine Untersuchung an Menschen, welche keine β -Adrenozeptor-Antagonisten zu sich nehmen, könnten zu Erkenntnissen bezüglich der Physiologie und der molekularbiologischen Eigenschaften des humanen thermogenen Fettgewebes beitragen.

Dennoch ist es lohnenswert, das Augenmerk auch auf die Rolle der β -Adrenozeptor-Antagonisten in der Regulierung thermogener Fettgewebe zu richten. β -Blocker sind in unserer Gesellschaft von großer Bedeutung, denn deren Hauptindikationen zählen zu den weitaus häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen. Dazu gehören die arterielle Hypertonie und koronare Herzkrankheit ebenso wie tachykarde Herzrhythmusstörungen und chronische Herzinsuffizienz. Die Hauptziele der Erforschung thermogener Fettgewebe sind die Minderung der Adipositas und der Arteriosklerose. Beide pathologischen Zustände sind vermehrt auch unter Personen zu finden, welche β -Adrenozeptor-Antagonisten einnehmen. Eine etwaige Hemmung der adaptiven Thermogenese durch β -Adrenozeptor-Antagonisten würde mit einer angestrebten Aktivierung unweigerlich in Konkurrenz treten.

Neben der Auswahl geeigneter Probanden für die Untersuchung der Aktivierbarkeit thermogener Fettgewebe, muss auch der Versuchsaufbau adaptiert werden. Einen für die Gewebegewinnung geeigneten Kontext zu finden, welcher vom klinischen Geschehen mit all seinen implizierten Einflussgrößen, wie Alter, Multimorbidität und Medikamenten unabhängig ist und gleichzeitig eine Hypothermie zur Aktivierung der adaptiven Thermogenese bereitstellt, ist jedoch schwierig. Vola-

tile Anästhetika und Heparin könnten die adaptive Thermogenese in dieser Studie gehemmt haben. Zwar gibt es Operationen, bei denen kein Heparin und anstelle der volatilen Anästhetika Injektionsanästhetika eingesetzt werden, jedoch lassen diese eine Hypothermie vermissen.

Sicher ließe aber eine deutlich größere Stichprobe die Möglichkeit zu, aussagekräftige Teilgruppen bezüglich der Einflussfaktoren zu bilden. In solchen könnten, anders als bei der in dieser Arbeit stattgefundenen Auswertung von Einzelfällen, zufällige von signifikanten Ergebnissen abgegrenzt werden und es ließen sich möglicherweise verallgemeinerbare Muster erkennen.

Nichtsdestotrotz liefert diese Studie wertvolle Hinweise für die Auseinandersetzung mit der adaptiven Thermogenese beim Menschen. Die detektierten basalen Genexpressionsraten sollten als minimal mögliche Expressionsraten gewertet werden. Denn es kann angenommen werden, dass sowohl Alter und BMI, als auch die tägliche Medikation in der Summe zu einem Zustand der Inaktivität thermogener Fettgewebe beigetragen haben.

5 Zusammenfassung

Adipositas ist das Resultat einer den Energieverbrauch anhaltend übersteigenden Energiezufuhr. Sie geht einher mit Störungen des Glukose-, Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels und begünstigt die Entstehung von metabolischen, kardiovaskulären und neoplastischen Erkrankungen. Die anteiligen Kosten der Adipositas allein für das Gesundheitssystem belaufen sich in vielen Ländern auf bis zu sechs Prozent. Dabei ist nicht nur in Ländern mit hohem, sondern auch in Ländern mit mittlerem und niedrigem Einkommen eine steigende Prävalenz zu beobachten. Adipositas wird zunehmend ein globales Problem für die Volksgesundheit.

In der Entwicklung therapeutischer Strategien für die Adipositas und damit assoziierte Erkrankungen, kommt der Erhöhung des Energieverbrauchs eine besondere Bedeutung zu. Thermogene Fettgewebe, zu denen braune und beige Fettgewebe gehören, sind durch eine hohe metabolische Aktivität charakterisiert. Eine Aktivierung klassischer brauner Adipozyten resultiert ebenso wie die Aktivierung der Thermogenese in weißem Fettgewebe (sog. Browning) in der Umwandlung chemischer in thermische Energie. Die dabei notwendige Utilisierung von Glukose und insbesondere Fettsäuren kommt dem Metabolismus des Organismus zugute.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Lokalisierung humaner Fettdepots, welche die Fähigkeit haben kälteaktiviert adaptive Thermogenese zu betreiben. Es werden dazu fünf humane Fettdepots einer molekular-biochemischen Analyse bezüglich der Genexpression thermogener Aktivitäts- und Differenzierungsmarker unterzogen. Die Gewinnung der Gewebeprobe aus den epikardialen, perikardialen, mediastinalen, retrosternalen und subkutanen Fettgewebepots erfolgte während kardiochirurgischer Eingriffe.

Im Rahmen dieser Arbeit wird in keinem der untersuchten Fettgewebepots eine auf der Ebene der Genexpression stattgefundenen Aktivierung thermogener Adipozyten durch Kälte ersichtlich. Die nach Einfluss von Kälte unveränderten Genexpressionsraten einiger Aktivitäts- und Differenzierungsmarker sind begleitet von unterschiedlich gerichteten Veränderungen zweier weiterer Aktivitätsmarker. Dabei ist das Ausmaß der Genexpressionsänderung durch unterschiedliche Wirkzeiten der Kälte nicht erklärbar. Das Transkriptionsprodukt des ausschließlich in thermogenen Fettgewebe vorkommenden Uncoupling Protein 1 ist in epikardialem und mediastinalem Gewebe signifikant höher nachweisbar als in den übrigen Geweben. Die Variabilität seiner Expression ist durch die Variabilität ausgewählter physiologischer und metabolischer Marker in dieser Arbeit nicht erklärbar.

6 Summary

Obesity arises when energy intake constantly exceeds energy expenditure. Abnormal and excessive fat accumulation is accompanied by impaired glucose, lipid and lipoprotein metabolism and promotes the development of metabolic, cardiovascular and neoplastic diseases. The costs to the health services from obesity are estimated to be up to six percent of total health care expenditure in many countries. Once considered a high-income country problem, overweight and obesity are now on the rise in low- and middle-income countries. It is a major public health and economic problem of global significance.

In the development of therapeutic strategies against obesity and associated diseases, the increase in energy expenditure is of high interest. Thermogenic adipose tissues, such as brown and beige adipose tissues, are characterized by a high metabolic activity. Both the activation of classical brown adipocytes and the activation of thermogenesis in white adipose tissue (so called Browning) result in the transformation of chemical energy to heat. Required in this process is the utilization of glucose and particularly fatty acids, which positively affects the whole-body's metabolism.

The purpose of this work is to identify and locate human fat depots, which are capable of cold-activated adaptive thermogenesis. Five human fat depots are put on a biochemical and molecular analysis concerning the gene expression of thermogenic activity and differentiation markers. The adipose tissue samples from epicardial, pericardial, mediastinal, retrosternal and subcutaneous depots were obtained from patients undergoing cardiac surgery interventions.

In this work, adaptive thermogenesis is not activated upon short term cold exposure in any of the examined adipose tissue depots. Patient specific gene expression rates under cold exposure vary among different activity and differentiation markers, though the magnitude of gene expression alterations is not dependent on the duration of cold exposition. The transcription product of the unique Uncoupling protein 1 is significantly more abundant in epicardial and mediastinal adipose tissue compared to the other fat depots. The variability of its expression is not dependent on the variability of a set of physiological and metabolic markers.

7 Anhang

Anhang A | Übersicht über Mittelwerte und Mediane der Genexpression aller Gewebe und Gene

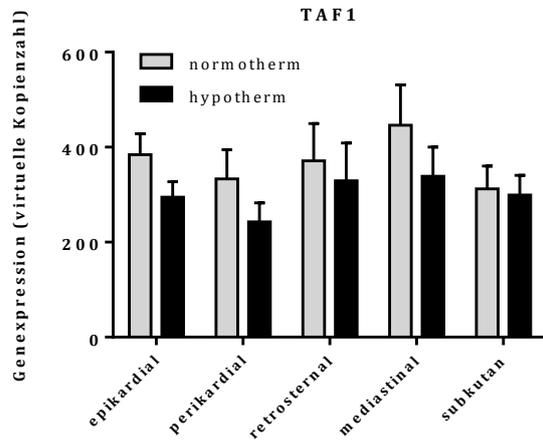
Die Gewebe aus fünf Fettdepots wurden präpariert und die Expression der Gene mittels Taqman®-Technologie bestimmt. Aufgelistet sind die Mittelwerte und Mediane der absoluten, auf *TAF1* normierten Kopienzahlen.

Gen			<i>TAF1</i>	<i>UCP1</i>	<i>FABP4</i>	<i>PGC1A</i>	<i>PRDM16</i>	<i>DIO2</i>
Epikardial	normotherm	Mittelwert	384	360	741.777	963	157	24
		Median	386	173	465.099	605	172	17
	hypotherm	Mittelwert	295	283	785.329	1.086	212	22
		Median	315	174	782.852	940	161	16
Perikardial	normotherm	Mittelwert	333	49	1.682.746	1.943	553	29
		Median	335	30	1.839.742	1.989	514	27
	hypotherm	Mittelwert	243	284	1.732.331	1.923	717	62
		Median	253	68	1.788.458	1.841	739	40
Retrosternal	normotherm	Mittelwert	372	119	1.022.587	2.770	696	27
		Median	391	74	980.865	2.184	545	26
	hypotherm	Mittelwert	329	21	970.021	2.814	569	69
		Median	396	17	809.862	2.396	494	42
Mediastinal	normotherm	Mittelwert	446	364	763.728	2.428	425	37
		Median	351	57	807.153	2.480	456	32
	hypotherm	Mittelwert	339	87	654.191	2.157	314	37
		Median	342	35	497.834	1.621	361	27
Subkutan	normotherm	Mittelwert	312	18	1.454.748	1.388	460	24
		Median	299	11	1.208.142	1.333	372	22
	hypotherm	Mittelwert	299	14	1.026.128	741	346	17
		Median	254	12	965.529	794	353	13

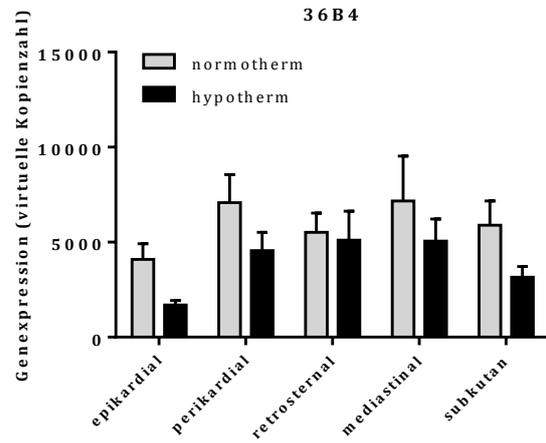
Anhang B | Expressionsanalyse der *Housekeeping*-Gene

Die gewonnenen Gewebe aus fünf Fettdepots wurden präpariert und die Genexpression der *housekeeping gens* TAF1 (A) und 36B4 (B) mittels Taqman®-Technologie bestimmt. Aufgetragen ist die absolute Genexpression. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. *Multipler t-Test, post-hoc: Holm-Šidák-Test, 95% Konfidenzintervall.*

A



B



Anhang C | RNA-Ausbeute der Gewebeprobe

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab). Aufgeführt sind die RNA-Konzentrationen pro Fettdepot, Patient und Zustand (normo-normotherm/hypo-hypotherm). Nicht realisierte Gewebeabgaben sind folgendermaßen gekennzeichnet: n.v. – nicht vorhanden.

Patient Nr.	RNA-Ausbeute (ng/µl)				
	Epikardial	Perikardial	Mediastinal	Retrosternal	Subkutan
1 normo	n.v.	116,12	65,35	49,57	14,32
1 hypo	17,24	59,35	107,92	42,29	81,61
2 normo	36,94	n.v.	114,72	n.v.	53,74
2 hypo	24,21	n.v.	124,24	n.v.	8,78
3 normo	24,92	41,81	n.v.	36,22	36,64
3 hypo	16,58	35,71	n.v.	28,92	12,45
4 normo	54,11	27,46	119,71	36,74	13,99
4 hypo	46,17	26,31	135,60	35,42	31,32
5 normo	25,38	25,33	85,08	32,31	13,58
5 hypo	21,68	28,31	87,02	29,74	13,43
6 normo	n.v.	47,48	n.v.	20,25	19,21
6 -	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
7 normo	24,09	30,76	157,45	n.v.	30,80
7 -	10,56	36,15	360,98	n.v.	29,37
8 normo	23,91	41,71	105,12	n.v.	29,80
8 hypo	52,16	44,55	25,09	n.v.	21,84
9 normo	22,24	69,35	71,18	67,29	27,64
9 hypo	20,83	40,09	401,11	n.v.	12,68
10 normo	n.v.	46,61	70,40	n.v.	18,53
10 hypo	30,46	32,62	83,44	n.v.	24,50
11 normo	24,76	28,11	54,56	n.v.	10,40
11 hypo	56,11	n.v.	45,34	n.v.	14,01
12 normo	37,38	83,44	318,85	60,54	21,16
12 hypo	35,26	472,13	n.v.	43,29	19,80
13 normo	18,01	102,48	61,53	n.v.	169,3
13 hypo	45,40	203,91	51,23	53,86	25,22
14 normo	63,75	109,77	33,79	56,32	16,39
14 hypo	74,08	67,50	45,59	32,77	12,65
15 normo	98,38	69,48	48,41	46,34	21,54
15 hypo	29,87	66,55	70,50	28,47	19,88

8 Quellenverzeichnis

- ARROJO, E. D. R., FONSECA, T. L., WERNECK-DE-CASTRO, J. P. & BIANCO, A. C. 2013. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 3956-64.
- ASANO, A., KIMURA, K. & SAITO, M. 1999. Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *J Vet Med Sci*, 61, 403-9.
- ASANO, A., MORIMATSU, M., NIKAMI, H., YOSHIDA, T. & SAITO, M. 1997. Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. *Biochem J*, 328 (Pt 1), 179-83.
- ASTRUP, A., BULOW, J., CHRISTENSEN, N. J. & MADSEN, J. 1984. Ephedrine-induced thermogenesis in man: no role for interscapular brown adipose tissue. *Clin Sci (Lond)*, 66, 179-86.
- BAGCHI, M., KIM, L. A., BOUCHER, J., WALSH, T. E., KAHN, C. R. & D'AMORE, P. A. 2013. Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB J*, 27, 3257-71.
- BARBATELLI, G., MURANO, I., MADSEN, L., HAO, Q., JIMENEZ, M., KRISTIANSEN, K., GIACOBINO, J. P., DE MATTEIS, R. & CINTI, S. 2010. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298, E1244-53.
- BARETTI, R. 2010. *Aspekte der Myocardprotektion und Cardioplegie im klinischen Vergleich*. Berlin, Univ.-Medizin, Habil.-Schr., 2011.
- 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. & HEEREN, J. 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, 17, 200-5.
- BARTELT, A. & HEEREN, J. 2012. The holy grail of metabolic disease: brown adipose tissue. *Curr Opin Lipidol*, 23, 190-5.
- BARTELT, A. & HEEREN, J. 2013. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 24-36.
- BARTELT, A. & HEEREN, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 24-36.
- BARTELT, A., JOHN, C., SCHALTENBERG, N., BERBEE, J. F. P., WORTHMANN, A., CHERRADI, M. L., SCHLEIN, C., PIEPENBURG, J., BOON, M. R., RINNINGER, F., HEINE, M., TOEDTER, K., NIEMEIER, A., NILSSON, S. K., FISCHER, M., WIJERS, S. L., VAN MARKEN LICHTENBELT, W., SCHEJA, L., RENSEN, P. C. N. & HEEREN, J. 2017. Thermogenic adipocytes promote HDL turnover and reverse cholesterol transport. *Nat Commun*, 8, 15010.
- BARTELT, A., MERKEL, M. & HEEREN, J. 2012. A new, powerful player in lipoprotein metabolism: brown adipose tissue. *J Mol Med (Berl)*, 90, 887-93.
- BAUER, M., RENSING, H. & ZIEGENFUSS, T. 1998. [Anesthesia and perioperative immune function]. *Anaesthesist*, 47, 538-56.
- 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. & RENSEN, P. C. 2015. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun*, 6, 6356.
- BERNLOHR, D. A., DOERING, T. L., KELLY, T. J., JR. & LANE, M. D. 1985. Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 132, 850-5.
- BLONDIN, D. P., FRISCH, F., PHOENIX, S., GUERIN, B., TURCOTTE, E. E., HAMAN, F., RICHARD, D. & CARPENTIER, A. C. 2017a. Inhibition of Intracellular Triglyceride Lipolysis Suppresses Cold-Induced Brown Adipose Tissue Metabolism and Increases Shivering in Humans. *Cell Metab*, 25, 438-447.

- BLONDIN, D. P., TINGELSTAD, H. C., NOLL, C., FRISCH, F., PHOENIX, S., GUERIN, B., TURCOTTE, E. E., RICHARD, D., HAMAN, F. & CARPENTIER, A. C. 2017b. Dietary fatty acid metabolism of brown adipose tissue in cold-acclimated men. *Nat Commun*, 8, 14146.
- BOORD, J. B., MAEDA, K., MAKOWSKI, L., BABAIEV, V. R., FAZIO, S., LINTON, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2004. Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 110, 1492-8.
- BORDICCHIA, M., POCOGNOLI, A., D'ANZEO, M., SIQUINI, W., MINARDI, D., MUZZONIGRO, G., DESSI-FULGHERI, P. & SARZANI, R. 2014. Nebivolol induces, via beta3 adrenergic receptor, lipolysis, uncoupling protein 1, and reduction of lipid droplet size in human adipocytes. *J Hypertens*, 32, 389-96.
- 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. & SPIEGELMAN, B. M. 2012. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481, 463-8.
- BOUSTANY, C. M., BHARADWAJ, K., DAUGHERTY, A., BROWN, D. R., RANDALL, D. C. & CASSIS, L. A. 2004. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R943-9.
- BRONNIKOV, G., HOUSTEK, J. & NEDERGAARD, J. 1992. Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *J Biol Chem*, 267, 2006-13.
- BUCKBERG, G. D. 1993. Myocardial protection: an overview. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 5, 98-106.
- BÜHNER, M. & ZIEGLER, M. 2009. *Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler*, Pearson Studium.
- BUKOWIECKI, L., COLLET, A. J., FOLLEA, N., GUAY, G. & JAHJAH, L. 1982. Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia. *Am J Physiol*, 242, E353-9.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84, 277-359.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2008. Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature*, 454, 947-8.
- CAO, H., SEKIYA, M., ERTUNC, M. E., BURAK, M. F., MAYERS, J. R., WHITE, A., INOUE, K., RICKEY, L. M., ERCAL, B. C., FURUHASHI, M., TUNCMAN, G. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2013. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab*, 17, 768-78.
- CAO, W., DANIEL, K. W., ROBIDOUX, J., PUIGSERVER, P., MEDVEDEV, A. V., BAI, X., FLOERING, L. M., SPIEGELMAN, B. M. & 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, 3057-67.
- CEDERBERG, A., GRONNING, L. M., AHREN, B., TASKEN, K., CARLSSON, P. & ENERBACK, S. 2001. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*, 106, 563-73.
- CHECHI, K., BLANCHARD, P. G., MATHIEU, P., DESHAIES, Y. & RICHARD, D. 2013. Brown fat like gene expression in the epicardial fat depot correlates with circulating HDL-cholesterol and triglycerides in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 167, 2264-70.
- CHEUNG, L., GERTOW, J., WERNGREN, O., FOLKERSEN, L., PETROVIC, N., NEDERGAARD, J., FRANCO-CERECEDA, A., ERIKSSON, P. & FISHER, R. M. 2013. Human mediastinal adipose tissue displays certain characteristics of brown fat. *Nutr Diabetes*, 3, e66.
- CHEVREUIL, O., HULTIN, M., OSTERGAARD, P. & OLIVECRONA, T. 1993. Depletion of lipoprotein lipase after heparin administration. *Arterioscler Thromb*, 13, 1391-6.
- CHONDRONIKOLA, M. 2016. Brown adipose tissue activation is linked to distinct systemic effects on lipid metabolism in humans. *Cell Metab*.

- CHONDRONIKOLA, M., VOLPI, E., BORSHEIM, E., PORTER, C., ANNAMALAI, P., ENERBACK, S., LIDELL, M. E., SARAF, M. K., LABBE, S. M., HURREN, N. M., YFANTI, C., CHAO, T., ANDERSEN, C. R., CESANI, F., HAWKINS, H. & SIDOSSIS, L. S. 2014. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, 63, 4089-99.
- CINTI, S. 2001. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc*, 60, 319-28.
- COOPER, R., FORRESTER, T., OGUNBIYI, O. & MUFFINDA, J. 1998. Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. ICASHB Investigators. *J Hypertens*, 16, 571-5.
- COPPOLA, A., LIU, Z. W., ANDREWS, Z. B., PARADIS, E., ROY, M. C., FRIEDMAN, J. M., RICQUIER, D., RICHARD, D., HORVATH, T. L., GAO, X. B. & DIANO, S. 2007. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab*, 5, 21-33.
- CYPESS, A. M., CHEN, Y. C., SZE, C., WANG, K., ENGLISH, J., CHAN, O., HOLMAN, A. R., TAL, I., PALMER, M. R., KOLODNY, G. M. & KAHN, C. R. 2012. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 10001-5.
- 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. & KAHN, C. R. 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360, 1509-17.
- 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. & KOLODNY, G. M. 2015. Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab*, 21, 33-8.
- CYPESS, A. M., WHITE, A. P., VERNOCHE, C., SCHULZ, T. J., XUE, R., SASS, C. A., HUANG, T. L., ROBERTS-TOLER, C., WEINER, L. S., SZE, C., CHACKO, A. T., DESCHAMPS, L. N., HERDER, L. M., TRUCHAN, N., GLASGOW, A. L., HOLMAN, A. R., GAVRILA, A., HASSELGREN, P. O., MORI, M. A., MOLLA, M. & TSENG, Y. H. 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med*, 19, 635-9.
- DAVIES, B. S., BEIGNEUX, A. P., FONG, L. G. & YOUNG, S. G. 2012. New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol*, 23, 35-42.
- DAVIS, T. R. 1961. Chamber cold acclimatization in man. *J Appl Physiol*, 16, 1011-5.
- DAVIS, T. R., JOHNSTON, D. R., BELL, F. C. & CREMER, B. J. 1960. Regulation of shivering and non-shivering heat production during acclimation of rats. *Am J Physiol*, 198, 471-5.
- DE JONG, J. M., LARSSON, O., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2015. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308, E1085-105.
- DE JONG, J. M., WOUTERS, R. T., BOULET, N., CANNON, B., NEDERGAARD, J. & PETROVIC, N. 2017. The beta3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, ajpgendo 00437 2016.
- DE KLOET, A. D., KRAUSE, E. G., KIM, D. H., SAKAI, R. R., SEELEY, R. J. & WOODS, S. C. 2009. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology*, 150, 4114-23.
- DE KLOET, A. D., KRAUSE, E. G., SCOTT, K. A., FOSTER, M. T., HERMAN, J. P., SAKAI, R. R., SEELEY, R. J. & WOODS, S. C. 2011. Central angiotensin II has catabolic action at white and brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E1081-91.
- DESPRES, J. P. & LEMIEUX, I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881-7.
- ENERBACK, S. 2010. Human brown adipose tissue. *Cell Metab*, 11, 248-52.
- ENGELI, S., GORZELNIAK, K., KREUTZ, R., RUNKEL, N., DISTLER, A. & SHARMA, A. M. 1999. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens*, 17, 555-60.
- ESTERBAUER, H., OBERKOFER, H., LIU, Y. M., BREBAN, D., HELL, E., KREMPLER, F. & PATSCH, W. 1998. Uncoupling protein-1 mRNA expression in obese human subjects: the role of sequence variations at the uncoupling protein-1 gene locus. *J Lipid Res*, 39, 834-44.
- EZZATI, M., HOORN, S. V., LOPEZ, A. D., DANAEI, G., RODGERS, A., MATHERS, C. D. & MURRAY, C. J. L. 2006. Comparative Quantification of Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected

- Risk Factors. In: LOPEZ, A. D., MATHERS, C. D., EZZATI, M., JAMISON, D. T. & MURRAY, C. J. L. (eds.) *Global Burden of Disease and Risk Factors*. Washington (DC).
- FEDORENKO, A., LISHKO, P. V. & KIRICHOK, Y. 2012. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell*, 151, 400-13.
- FINUCANE, M. M., STEVENS, G. A., COWAN, M. J., DANAEI, G., LIN, J. K., PACIOREK, C. J., SINGH, G. M., GUTIERREZ, H. R., LU, Y., BAHALIM, A. N., FARZADFAR, F., RILEY, L. M., EZZATI, M. & GLOBAL BURDEN OF METABOLIC RISK FACTORS OF CHRONIC DISEASES COLLABORATING, G. 2011. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*, 377, 557-67.
- FISCHER, A. W., CSIKASZ, R. I., VON ESSEN, G., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2016. No insulating effect of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 311, E202-13.
- FLIER, J. S. 2004. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116, 337-50.
- FRIEDMAN, K. E., REICHMANN, S. K., COSTANZO, P. R., ZELLI, A., ASHMORE, J. A. & MUSANTE, G. J. 2005. Weight stigmatization and ideological beliefs: relation to psychological functioning in obese adults. *Obes Res*, 13, 907-16.
- FRONTINI, A., VITALI, A., PERUGINI, J., MURANO, I., ROMITI, C., RICQUIER, D., GUERRIERI, M. & CINTI, S. 2013. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 950-9.
- FURUHASHI, M. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 489-503.
- GALVEZ-PRIETO, B., BOLBRINKER, J., STUCCHI, P., DE LAS HERAS, A. I., MERINO, B., ARRIBAS, S., RUIZ-GAYO, M., HUBER, M., WEHLAND, M., KREUTZ, R. & FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. 2008. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol*, 197, 55-64.
- GEERLING, J. J., BOON, M. R., VAN DER ZON, G. C., VAN DEN BERG, S. A., VAN DEN HOEK, A. M., LOMBES, M., PRINCEN, H. M., HAVEKES, L. M., RENSEN, P. C. & GUIGAS, B. 2014. Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes*, 63, 880-91.
- GESSNER, K. 1551. *Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I de Quadripedibus uiuiparis* 842.
- GOLOZOUBOVA, V., GULLBERG, H., MATTHIAS, A., CANNON, B., VENNSTROM, B. & NEDERGAARD, J. 2004. Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*, 18, 384-401.
- GREENWOOD, M. R. 1985. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes*, 9 Suppl 1, 67-70.
- GUNAWARDANA, S. C. & PISTON, D. W. 2012. Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes*, 61, 674-82.
- HAEMMERLE, G., MOUSTAFA, T., WOELKART, G., BUTTNER, S., SCHMIDT, A., VAN DE WEIJER, T., HESSELINK, M., JAEGER, D., KIENESBERGER, P. C., ZIERLER, K., SCHREIBER, R., EICHMANN, T., KOLB, D., KOTZBECK, P., SCHWEIGER, M., KUMARI, M., EDER, S., SCHOISWOHL, G., WONGSIRIROJ, N., POLLAK, N. M., RADNER, F. P., PREISS-LANDL, K., KOLBE, T., RULICKE, T., PIESKE, B., TRAUNER, M., LASS, A., ZIMMERMANN, R., HOEFLER, G., CINTI, S., KERSHAW, E. E., SCHRAUWEN, P., MADEO, F., MAYER, B. & ZECHNER, R. 2011. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR-alpha and PGC-1. *Nat Med*, 17, 1076-85.
- HALL, K. D., SACKS, G., CHANDRAMOHAN, D., CHOW, C. C., WANG, Y. C., GORTMAKER, S. L. & SWINBURN, B. A. 2011. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet*, 378, 826-37.
- HANSEN, M. J., HOEKS, J., BRANS, B., VAN DER LANS, A. A., SCHAART, G., VAN DEN DRIESSCHE, J. J., JORGENSEN, J. A., BOEKSCHOTEN, M. V., HESSELINK, M. K., HAVEKES, B., KERSTEN, S., MOTTAGHY, F. M., VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. & SCHRAUWEN, P. 2015. Short-term

- cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nat Med*, 21, 863-5.
- HANSEN, M. J., VAN DER LANS, A. A., BRANS, B., HOEKS, J., JARDON, K. M., SCHAART, G., MOTTAGHY, F. M., SCHRAUWEN, P. & VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. 2016a. Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. *Diabetes*, 65, 1179-89.
- HANSEN, M. J. W., VAN DER LANS, A. A. J. J., BRANS, B., HOEKS, J., JARDON, K. M. C., SCHAART, G., MOTTAGHY, F. M., SCHRAUWEN, P. & LICHTENBELT, W. D. V. 2016b. Short-term Cold Acclimation Recruits Brown Adipose Tissue in Obese Humans. *Diabetes*, 65, 1179-1189.
- HEATON, J. M. 1972. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat*, 112, 35-9.
- HEEREN, J. & MUNZBERG, H. 2013. Novel aspects of brown adipose tissue biology. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 42, 89-107.
- HEROLD, G. 2011. Innere Medizin 2012. Köln: Herold, Gerd.
- HILBERT, A., RIEF, W. & BRAEHLER, E. 2008. Stigmatizing attitudes toward obesity in a representative population-based sample. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1529-34.
- HIMMS-HAGEN, J. 1979. Obesity may be due to a malfunctioning of brown fat. *Can Med Assoc J*, 121, 1361-4.
- HIMMS-HAGEN, J., MELNYK, A., ZINGARETTI, M. C., CERESI, E., BARBATELLI, G. & CINTI, S. 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C670-81.
- HOLTE, K. & KEHLET, H. 2002. Epidural anaesthesia and analgesia - effects on surgical stress responses and implications for postoperative nutrition. *Clin Nutr*, 21, 199-206.
- HONDARES, E., MORA, O., YUBERO, P., RODRIGUEZ DE LA CONCEPCION, M., IGLESIAS, R., GIRALT, M. & VILLARROYA, F. 2006. Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation. *Endocrinology*, 147, 2829-38.
- HONDARES, E., ROSELL, M., DIAZ-DELFIN, J., OLMOS, Y., MONSALVE, M., IGLESIAS, R., VILLARROYA, F. & GIRALT, M. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) induces PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene expression and contributes to thermogenic activation of brown fat: involvement of PRDM16. *J Biol Chem*, 286, 43112-22.
- HOTAMISLIGIL, G. S. & ERBAY, E. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol*, 8, 923-34.
- HUANG, C., CHEN, D., XIE, Q., YANG, Y. & SHEN, W. 2013. Nebivolol stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 211-7.
- HUTTUNEN, P., HIRVONEN, J. & KINNULA, V. 1981. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 46, 339-45.
- INAGAKI, T., SAKAI, J. & KAJIMURA, S. 2016. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 480-95.
- JESPERSEN, N. Z., LARSEN, T. J., PEIJS, L., DAUGAARD, S., HOMOE, P., LOFT, A., DE JONG, J., MATHUR, N., CANNON, B., NEDERGAARD, J., PEDERSEN, B. K., MOLLER, K. & SCHEELE, C. 2013. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab*, 17, 798-805.
- JONES, B. H., STANDRIDGE, M. K. & MOUSTAID, N. 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*, 138, 1512-9.
- KAJIMURA, S., SEALE, P., KUBOTA, K., LUNSFORD, E., FRANGIONI, J. V., GYGI, S. P. & SPIEGELMAN, B. M. 2009. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature*, 460, 1154-8.
- KAJIMURA, S., SEALE, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2010. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab*, 11, 257-62.
- KAJIMURA, S., SEALE, P., TOMARU, T., ERDJUMENT-BROMAGE, H., COOPER, M. P., RUAS, J. L., CHIN, S., TEMPST, P., LAZAR, M. A. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*, 22, 1397-409.

- KAJIMURA, S., SPIEGELMAN, B. M. & SEALE, P. 2015. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab*, 22, 546-59.
- KARLSSON, C., LINDELL, K., OTTOSSON, M., SJOSTROM, L., CARLSSON, B. & CARLSSON, L. M. 1998. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 3925-9.
- KAZAK, L., CHOUCANI, E. T., JEDRYCHOWSKI, M. P., ERICKSON, B. K., SHINODA, K., COHEN, P., VETRIVELAN, R., LU, G. Z., LAZNIK-BOGOSLAVSKI, D., HASENFUSS, S. C., KAJIMURA, S., GYGI, S. P. & SPIEGELMAN, B. M. 2015. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat. *Cell*, 163, 643-55.
- KERSTEN, S. 2014. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 919-33.
- KOPECKY, J., CLARKE, G., ENERBACK, S., SPIEGELMAN, B. & KOZAK, L. P. 1995. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*, 96, 2914-23.
- KROTKIEWSKI, M., BJORNTORP, P., SJOSTROM, L. & SMITH, U. 1983. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*, 72, 1150-62.
- KURYLOWICZ, A., JONAS, M., LISIK, W., JONAS, M., WICIK, Z. A., WIERZBICKI, Z., CHMURA, A. & PUZIANOWSKA-KUZNICKA, M. 2015. Obesity is associated with a decrease in expression but not with the hypermethylation of thermogenesis-related genes in adipose tissues. *J Transl Med*, 13, 31.
- LAHESMAA, M., ORAVA, J., SCHALIN-JANTTI, C., SOINIO, M., HANNUKAINEN, J. C., NOPONEN, T., KIRJAVAINEN, A., IIDA, H., KUDOMI, N., ENERBACK, S., VIRTANEN, K. A. & NUUTILA, P. 2014. Hyperthyroidism increases brown fat metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, E28-35.
- LARSEN, R. 2017a. Herz-Lungen-Maschine und extrakorporale Zirkulation. *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LARSEN, R. 2017b. Kardiovaskuläre Medikamente. *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LEE, P., SMITH, S., LINDERMAN, J., COURVILLE, A. B., BRYCHTA, R. J., DIECKMANN, W., WERNER, C. D., CHEN, K. Y. & CELI, F. S. 2014. Temperature-acclimated brown adipose tissue modulates insulin sensitivity in humans. *Diabetes*, 63, 3686-98.
- LEE, P., ZHAO, J. T., SWARBRICK, M. M., GRACIE, G., BOVA, R., GREENFIELD, J. R., FREUND, J. & HO, K. K. 2011. High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, 2450-5.
- LEE, Y. H., PETKOVA, A. P., KONKAR, A. A. & GRANNEMAN, J. G. 2015. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J*, 29, 286-99.
- LEE, Y. H., PETKOVA, A. P., MOTTILLO, E. P. & GRANNEMAN, J. G. 2012. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*, 15, 480-91.
- LEMMER, B. 2016. Betarezeptorenblocker. In: SCHWABE, U. & PAFFRATH, D. (eds.) *Arzneiverordnungs-Report 2016: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LEONE, T. C., LEHMAN, J. J., FINCK, B. N., SCHAEFFER, P. J., WENDE, A. R., BOUDINA, S., COURTOIS, M., WOZNIAK, D. F., SAMBANDAM, N., BERNAL-MIZRACHI, C., CHEN, Z., HOLLOSZY, J. O., MEDEIROS, D. M., SCHMIDT, R. E., SAFFITZ, J. E., ABEL, E. D., SEMENKOVICH, C. F. & KELLY, D. P. 2005. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*, 3, e101.
- LICHTENBELT, W. D. V., VANHOMMERIG, J. W., SMULDERS, N. M., DROSSAERTS, J. M. A. F. L., KEMERINK, G. J., BOUVY, N. D., SCHRAUWEN, P. & TEULE, G. J. J. 2009. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *New England Journal of Medicine*, 360, 1500-1508.

- LIDELL, M. E., BETZ, M. J., DAHLQVIST LEINHARD, O., HEGLIND, M., ELANDER, L., SLAWIK, M., MUSSACK, T., NILSSON, D., ROMU, T., NUUTILA, P., VIRTANEN, K. A., BEUSCHLEIN, F., PERSSON, A., BORGA, M. & ENERBACK, S. 2013. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*, 19, 631-4.
- LIN, J., HANDSCHIN, C. & SPIEGELMAN, B. M. 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1, 361-70.
- LIN, J., WU, P. H., TARR, P. T., LINDENBERG, K. S., ST-PIERRE, J., ZHANG, C. Y., MOOHTHA, V. K., JAGER, S., VIANNA, C. R., REZNICK, R. M., CUI, L., MANIERI, M., DONOVAN, M. X., WU, Z., COOPER, M. P., FAN, M. C., ROHAS, L. M., ZAVACKI, A. M., CINTI, S., SHULMAN, G. I., LOWELL, B. B., KRAINIC, D. & SPIEGELMAN, B. M. 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*, 119, 121-35.
- LIU, W., BI, P., SHAN, T., YANG, X., YIN, H., WANG, Y. X., LIU, N., RUDNICKI, M. A. & KUANG, S. 2013. miR-133a regulates adipocyte browning in vivo. *PLoS Genet*, 9, e1003626.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LÖFFLER, G. 2014. Lipogenese und Lipolyse – Bildung und Verwertung der Fettspeicher. In: HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. (eds.) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- LONG, J. Z., SVENSSON, K. J., BATEMAN, L. A., LIN, H., KAMENECKA, T., LOKURKAR, I. A., LOU, J., RAO, R. R., CHANG, M. R., JEDRYCHOWSKI, M. P., PAULO, J. A., GYGI, S. P., GRIFFIN, P. R., NOMURA, D. K. & SPIEGELMAN, B. M. 2016. The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria. *Cell*, 166, 424-35.
- LOPEZ, M., VARELA, L., VAZQUEZ, M. J., RODRIGUEZ-CUENCA, S., GONZALEZ, C. R., VELAGAPUDI, V. R., MORGAN, D. A., SCHOENMAKERS, E., AGASSANDIAN, K., LAGE, R., MARTINEZ DE MORENTIN, P. B., TOVAR, S., NOGUEIRAS, R., CARLING, D., LELLIOTT, C., GALLEGU, R., ORESIC, M., CHATTERJEE, K., SAHA, A. K., RAHMOUNI, K., DIEGUEZ, C. & VIDAL-PUIG, A. 2010. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med*, 16, 1001-8.
- LOWELL, B. B. & SPIEGELMAN, B. M. 2000. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404, 652-60.
- LOWELL, B. B., V, S. S., HAMANN, A., LAWITTS, J. A., HIMMS-HAGEN, J., BOYER, B. B., KOZAK, L. P. & FLIER, J. S. 1993. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, 366, 740-2.
- MA, S., YU, H., ZHAO, Z., LUO, Z., CHEN, J., NI, Y., JIN, R., MA, L., WANG, P., ZHU, Z., LI, L., ZHONG, J., LIU, D., NILIUS, B. & ZHU, Z. 2012. Activation of the cold-sensing TRPM8 channel triggers UCP1-dependent thermogenesis and prevents obesity. *J Mol Cell Biol*, 4, 88-96.
- MA, S. W. & FOSTER, D. O. 1986. Uptake of glucose and release of fatty acids and glycerol by rat brown adipose tissue in vivo. *Can J Physiol Pharmacol*, 64, 609-14.
- MARTINEZ-DEMENA, R. & 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, 139-51.
- MATSUSHITA, M., YONESHIRO, T., AITA, S., KAMEYA, T., SUGIE, H. & SAITO, M. 2014. Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *International Journal of Obesity*, 38, 812-817.
- MATTSSON, C. L., CSIKASZ, R. I., CHERNOGUBOVA, E., YAMAMOTO, D. L., HOGBERG, H. T., AMRI, E. Z., HUTCHINSON, D. S. & BENGTSSON, T. 2011. beta(1)-Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated beta(3)-adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E1108-18.
- MILLER, B. T., UETA, C. B., LAU, V., JACOMINO, K. G., WASSERMAN, L. M. & KIM, B. W. 2012. Statins and downstream inhibitors of the isoprenylation pathway increase type 2 iodothyronine deiodinase activity. *Endocrinology*, 153, 4039-48.

- MIN, S. Y., KADY, J., NAM, M., ROJAS-RODRIGUEZ, R., BERKENWALD, A., KIM, J. H., NOH, H. L., KIM, J. K., COOPER, M. P., FITZGIBBONS, T., BREHM, M. A. & CORVERA, S. 2016. Human 'brite/beige' adipocytes develop from capillary networks, and their implantation improves metabolic homeostasis in mice. *Nat Med*, 22, 312-8.
- MURANO, I., BARBATELLI, G., GIORDANO, A. & CINTI, S. 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *J Anat*, 214, 171-8.
- MUTSCHLER, E. G., GERD; KROEMER, HEYO KLAUS; MENZEL, SABINE ; RUTH, PETER 2013. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- MUZIK, O., MANGNER, T. J., LEONARD, W. R., KUMAR, A., JANISSE, J. & GRANNEMAN, J. G. 2013. 150 PET measurement of blood flow and oxygen consumption in cold-activated human brown fat. *J Nucl Med*, 54, 523-31.
- NEDERGAARD, J., BENGTSOON, T. & CANNON, B. 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E444-52.
- NEDERGAARD, J., BENGTSOON, T. & CANNON, B. 2010. Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci*, 1212, E20-36.
- NEDERGAARD, J. & CANNON, B. 2013. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 943-9.
- NILSSON, S. K., HEEREN, J., OLIVECRONA, G. & MERKEL, M. 2011. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis*, 219, 15-21.
- NORDESTGAARD, B. G. & VARBO, A. 2014. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*, 384, 626-35.
- OHLSON, K. B., MOHELL, N., CANNON, B., LINDAHL, S. G. & NEDERGAARD, J. 1994. Thermogenesis in brown adipocytes is inhibited by volatile anesthetic agents. A factor contributing to hypothermia in infants? *Anesthesiology*, 81, 176-83.
- OHLSON, K. B., SHABALINA, I. G., LENNSTROM, K., BACKLUND, E. C., MOHELL, N., BRONNIKOV, G. E., LINDAHL, S. G., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2004. Inhibitory effects of halothane on the thermogenic pathway in brown adipocytes: localization to adenylyl cyclase and mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem Pharmacol*, 68, 463-77.
- OHNO, H., SHINODA, K., SPIEGELMAN, B. M. & KAJIMURA, S. 2012. PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*, 15, 395-404.
- OPPERT, J. M., VOHL, M. C., CHAGNON, M., DIONNE, F. T., CASSARD-DOULCIER, A. M., RICQUIER, D., PERUSSE, L. & BOUCHARD, C. 1994. DNA polymorphism in the uncoupling protein (UCP) gene and human body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 18, 526-31.
- ORAVA, J., NUUTILA, P., LIDELL, M. E., OIKONEN, V., NOPONEN, T., VIJANEN, T., SCHEININ, M., TAITTONEN, M., NIEMI, T., ENERBACK, S. & VIRTANEN, K. A. 2011. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*, 14, 272-9.
- OSWALT, D. I. 2016. Deutscher Herzbericht 2016. Frankfurt am Main.
- OUELLET, V., LABBE, S. M., BLONDIN, D. P., PHOENIX, S., GUERIN, B., HAMAN, F., TURCOTTE, E. E., RICHARD, D. & CARPENTIER, A. C. 2012. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*, 122, 545-52.
- PARYSOW, O., MOLLERACH, A. M., JAGER, V., RACIOPPI, S., SAN ROMAN, J. & GERBAUDO, V. H. 2007. Low-dose oral propranolol could reduce brown adipose tissue F-18 FDG uptake in patients undergoing PET scans. *Clin Nucl Med*, 32, 351-7.
- PETROVIC, N., WALDEN, T. B., SHABALINA, I. G., TIMMONS, J. A., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, 285, 7153-64.

- PINTEROVA, L., KRIZANOVA, O. & ZORAD, S. 2000. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. *Gen Physiol Biophys*, 19, 329-34.
- PORTER, C., HERNDON, D. N., CHONDRONIKOLA, M., CHAO, T., ANNAMALAI, P., BHATTARAI, N., SARAF, M. K., CAPEK, K. D., REIDY, P. T., DAQUINAG, A. C., KOLONIN, M. G., RASMUSSEN, B. B., BORSHEIM, E., TOLIVER-KINSKY, T. & SIDOSSIS, L. S. 2016. Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab*, 24, 246-55.
- PORTER, J. P. & POTRATZ, K. R. 2004. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287, R422-8.
- PUIGSERVER, P., WU, Z., PARK, C. W., GRAVES, R., WRIGHT, M. & SPIEGELMAN, B. M. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92, 829-39.
- RAHMOUNI, K., MARK, A. L., HAYNES, W. G. & SIGMUND, C. D. 2004. Adipose depot-specific modulation of angiotensinogen gene expression in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E891-5.
- RIBEIRO, M. O., BIANCO, S. D., KANESHIGE, M., SCHULTZ, J. J., CHENG, S. Y., BIANCO, A. C. & BRENT, G. A. 2010. Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 151, 432-40.
- RIBEIRO, M. O., CARVALHO, S. D., SCHULTZ, J. J., CHIELLINI, G., SCANLAN, T. S., BIANCO, A. C. & BRENT, G. A. 2001. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest*, 108, 97-105.
- RIDKER, P. M. 2014. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. *Lancet*, 384, 607-17.
- ROSEN, E. D. & SPIEGELMAN, B. M. 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156, 20-44.
- ROSENWALD, M., PERDIKARI, A., RULICKE, T. & WOLFRUM, C. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*, 15, 659-67.
- ROSENWALD, M. & WOLFRUM, C. 2014. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*, 3, 4-9.
- ROSSATO, M., GRANZOTTO, M., MACCHI, V., PORZIONATO, A., PETRELLI, L., CALCAGNO, A., VENCATO, J., DE STEFANI, D., SILVESTRIN, V., RIZZUTO, R., BASSETTO, F., DE CARO, R. & VETTOR, R. 2014. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol*, 383, 137-46.
- ROTHWELL, N. J. & STOCK, M. J. 1979. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281, 31-5.
- ROTHWELL, N. J. & STOCK, M. J. 1984. Effects of denervating brown adipose tissue on the responses to cold, hyperphagia and noradrenaline treatment in the rat. *J Physiol*, 355, 457-63.
- ROZEC, B., ERFANIAN, M., LAURENT, K., TROCHU, J. N. & GAUTHIER, C. 2009. Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1532-8.
- SACKS, H. S., FAIN, J. N., HOLMAN, B., CHEEMA, P., CHARY, A., PARKS, F., KARAS, J., OPTICAN, R., BAHOUTH, S. W., GARRETT, E., WOLF, R. Y., CARTER, R. A., ROBBINS, T., WOLFORD, D. & SAMAHA, J. 2009. Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acids in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab*, 94, 3611-5.
- SAITO, M., OKAMATSU-OGURA, Y., MATSUSHITA, M., WATANABE, K., YONESHIRO, T., NIO-KOBAYASHI, J., IWANAGA, T., MIYAGAWA, M., KAMEYA, T., NAKADA, K., KAWAI, Y. & TSUJISAKI, M. 2009a. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity. *Diabetes*, 58, 1526-1531.
- SAITO, M., OKAMATSU-OGURA, Y., MATSUSHITA, M., WATANABE, K., YONESHIRO, T., NIO-KOBAYASHI, J., IWANAGA, T., MIYAGAWA, M., KAMEYA, T., NAKADA, K., KAWAI, Y. & TSUJISAKI, M. 2009b. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*, 58, 1526-31.

- SCHLEIN, C. & HEEREN, J. 2016. Implications of thermogenic adipose tissues for metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 30, 487-496.
- SCHLEIN, C., TALUKDAR, S., HEINE, M., FISCHER, A. W., KROTT, L. M., NILSSON, S. K., BRENNER, M. B., HEEREN, J. & SCHEJA, L. 2016. FGF21 Lowers Plasma Triglycerides by Accelerating Lipoprotein Catabolism in White and Brown Adipose Tissues. *Cell Metab*, 23, 441-53.
- SCHULZ, T. J., HUANG, P., HUANG, T. L., XUE, R., MCDOUGALL, L. E., TOWNSEND, K. L., CYPESS, A. M., MISHINA, Y., GUSSONI, E. & TSENG, Y. H. 2013. Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat. *Nature*, 495, 379-83.
- SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., TRAN, T. T., ZHANG, H., TOWNSEND, K. L., SHADRACH, J. L., CERLETTI, M., MCDOUGALL, L. E., GIORGADZE, N., TCHKONIA, T., SCHRIER, D., FALB, D., KIRKLAND, J. L., WAGERS, A. J. & TSENG, Y. H. 2011. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 143-8.
- SCHWABE, U. & PAFFRATH, D. 2016. Arzneiverordnungen 2015 im Überblick. In: SCHWABE, U. & PAFFRATH, D. (eds.) *Arzneiverordnungs-Report 2016: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 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. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454, 961-7.
- SEALE, P., CONROE, H. M., ESTALL, J., KAJIMURA, S., FRONTINI, A., ISHIBASHI, J., COHEN, P., CINTI, S. & SPIEGELMAN, B. M. 2011. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*, 121, 96-105.
- SEALE, P., KAJIMURA, S., YANG, W., CHIN, S., ROHAS, L. M., ULDRY, M., TAVERNIER, G., LANGIN, D. & SPIEGELMAN, B. M. 2007. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab*, 6, 38-54.
- SHAN, T., LIU, W. & KUANG, S. 2013. Fatty acid binding protein 4 expression marks a population of adipocyte progenitors in white and brown adipose tissues. *FASEB J*, 27, 277-87.
- SHARMA, A. M., PISCHON, T., HARDT, S., KUNZ, I. & LUFT, F. C. 2001. Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis. *Hypertension*, 37, 250-4.
- SHARP, L. Z., SHINODA, K., OHNO, H., SCHEEL, D. W., TOMODA, E., RUIZ, L., HU, H., WANG, L., PAVLOVA, Z., GILSANZ, V. & KAJIMURA, S. 2012. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One*, 7, e49452.
- SHIMABUKURO, M., TANAKA, H. & SHIMABUKURO, T. 2007. Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome. *J Hypertens*, 25, 841-8.
- SHIMASAKI, T., MASAKI, T., MITSUTOMI, K., UENO, D., GOTOH, K., CHIBA, S., KAKUMA, T. & YOSHIMATSU, H. 2013. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor des-fluoro-sitagliptin regulates brown adipose tissue uncoupling protein levels in mice with diet-induced obesity. *PLoS One*, 8, e63626.
- SHIMIZU, I., APRAHAMIAN, T., KIKUCHI, R., SHIMIZU, A., PAPANICOLAOU, K. N., MACLAUCHLAN, S., MARUYAMA, S. & WALSH, K. 2014. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*, 124, 2099-112.
- SHU, L., HOO, R. L., WU, X., PAN, Y., LEE, I. P., CHEONG, L. Y., BORNSTEIN, S. R., RONG, X., GUO, J. & XU, A. 2017. A-FABP mediates adaptive thermogenesis by promoting intracellular activation of thyroid hormones in brown adipocytes. *Nat Commun*, 8, 14147.
- SIDOSSIS, L. S., PORTER, C., SARAF, M. K., BORSHEIM, E., RADHAKRISHNAN, R. S., CHAO, T., ALI, A., CHONDRONIKOLA, M., MLCAK, R., FINNERTY, C. C., HAWKINS, H. K., TOLIVER-KINSKY, T. & HERNDON, D. N. 2015. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab*, 22, 219-27.
- SIKORSKI, C., LUPPA, M., KAISER, M., GLAESMER, H., SCHOMERUS, G., KONIG, H. H. & RIEDEL-HELLER, S. G. 2011. The stigma of obesity in the general public and its implications for public health - a systematic review. *BMC Public Health*, 11, 661.

- SILVA, J. E. & LARSEN, P. R. 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*, 305, 712-3.
- STANFORD, K. I., MIDDELBECK, R. J., TOWNSEND, K. L., AN, D., NYGAARD, E. B., HITCHCOX, K. M., MARKAN, K. R., NAKANO, K., HIRSHMAN, M. F., TSENG, Y. H. & GOODYEAR, L. J. 2013. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*, 123, 215-23.
- SUSULIC, V. S., FREDERICH, R. C., LAWITTS, J., TOZZO, E., KAHN, B. B., HARPER, M. E., HIMMS-HAGEN, J., FLIER, J. S. & LOWELL, B. B. 1995. Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*, 270, 29483-92.
- SYAMSUNARNO, M. R., ISO, T., YAMAGUCHI, A., HANAOKA, H., PUTRI, M., OBOKATA, M., SUNAGA, H., KOITABASHI, N., MATSUI, H., MAEDA, K., ENDO, K., TSUSHIMA, Y., YOKOYAMA, T. & KURABAYASHI, M. 2014. Fatty acid binding protein 4 and 5 play a crucial role in thermogenesis under the conditions of fasting and cold stress. *PLoS One*, 9, e90825.
- TAKAHASHI, A., SHIMAZU, T. & MARUYAMA, Y. 1992. Importance of sympathetic nerves for the stimulatory effect of cold exposure on glucose utilization in brown adipose tissue. *Jpn J Physiol*, 42, 653-64.
- TATSUMI, M., ENGLER, J. M., ISHIMORI, T., NICELY, O., COHADE, C. & WAHL, R. L. 2004. Intense (18)F-FDG uptake in brown fat can be reduced pharmacologically. *J Nucl Med*, 45, 1189-93.
- THIAGAMOORTHY, G., KOTES, S., ZACCHE, M. & CARDOZO, L. 2016. The efficacy and tolerability of mirabegron, a beta3 adrenoceptor agonist, in patients with symptoms of overactive bladder. *Ther Adv Urol*, 8, 38-46.
- TIRABY, C., TAVERNIER, G., LEFORT, C., LARROUY, D., BOUILLAUD, F., RICQUIER, D. & LANGIN, D. 2003. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem*, 278, 33370-6.
- TORRES, D. M., WILLIAMS, C. D. & HARRISON, S. A. 2012. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10, 837-58.
- TRAJKOVSKI, M., AHMED, K., ESAU, C. C. & STOFFEL, M. 2012. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat Cell Biol*, 14, 1330-5.
- TSENG, Y. H., KOKKOTOU, E., SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., WINNAY, J. N., TANIGUCHI, C. M., TRAN, T. T., SUZUKI, R., ESPINOZA, D. O., YAMAMOTO, Y., AHRENS, M. J., DUDLEY, A. T., NORRIS, A. W., KULKARNI, R. N. & KAHN, C. R. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454, 1000-4.
- TSUKUDA, K., MOGI, M., IWANAMI, J., KANNO, H., NAKAOKA, H., WANG, X. L., BAI, H. Y., SHAN, B. S., KUKIDA, M., HIGAKI, A., YAMAUCHI, T., MIN, L. J. & HORIUCHI, M. 2016. Enhancement of Adipocyte Browning by Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade. *PLoS One*, 11, e0167704.
- ULDRY, M., YANG, W., ST-PIERRE, J., LIN, J., SEALE, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2006. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*, 3, 333-41.
- VAN DER LANS, A. A., HOEKS, J., BRANS, B., VIJGEN, G. H., VISSER, M. G., VOSELMAN, M. J., HANSEN, J., JORGENSEN, J. A., WU, J., MOTTAGHY, F. M., SCHRAUWEN, P. & VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. 2013. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*, 123, 3395-403.
- VAN DER LANS, A. A. J. J., WIERTS, R., VOSELMAN, M. J., SCHRAUWEN, P., BRANS, B. & LICHTENBELT, W. D. V. 2014. Cold-activated brown adipose tissue in human adults: methodological issues. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 307, R103-R113.
- VAN GAAL, L. F., MERTENS, I. L. & DE BLOCK, C. E. 2006. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444, 875-80.
- VERGNES, L., DAVIES, G. R., LIN, J. Y., YEH, M. W., LIVHITS, M. J., HARARI, A., SYMONDS, M. E., SACKS, H. S. & REUE, K. 2016. Adipocyte Browning and Higher Mitochondrial Function in Periadrenal But Not SC Fat in Pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 4440-4448.
- VIJGEN, G. H. E. J., BOUVY, N. D., TEULE, G. J. J., BRANS, B., SCHRAUWEN, P. & LICHTENBELT, W. D. V. 2011. Brown Adipose Tissue in Morbidly Obese Subjects. *Plos One*, 6.

- VILLANUEVA, C. J., VERGNES, L., WANG, J., DREW, B. G., HONG, C., TU, Y., HU, Y., PENG, X., XU, F., SAEZ, E., WROBLEWSKI, K., HEVENER, A. L., REUE, K., FONG, L. G., YOUNG, S. G. & TONTONOZ, P. 2013. Adipose subtype-selective recruitment of TLE3 or Prdm16 by PPAR γ specifies lipid storage versus thermogenic gene programs. *Cell Metab*, 17, 423-35.
- VILLARROYA, F., CERREJO, R., VILLARROYA, J. & GIRALT, M. 2017. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 13, 26-35.
- VIRTANEN, K. A., LIDELL, M. E., ORAVA, J., HEGLIND, M., WESTERGREN, R., NIEMI, T., TAITTONEN, M., LAINE, J., SAVISTO, N. J., ENERBACK, S. & NUUTILA, P. 2009. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults (vol 360, pg 1518, 2009). *New England Journal of Medicine*, 361, 1123-1123.
- VITALI, A., MURANO, I., ZINGARETTI, M. C., FRONTINI, A., RICQUIER, D. & CINTI, S. 2012a. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 53, 619-629.
- VITALI, A., MURANO, I., ZINGARETTI, M. C., FRONTINI, A., RICQUIER, D. & CINTI, S. 2012b. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res*, 53, 619-29.
- WANG, Q., ZHANG, M., NING, G., GU, W., SU, T., XU, M., LI, B. & 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, e21006.
- WATANABE, M., HOUTEN, S. M., MATAKI, C., CHRISTOFFOLETE, M. A., KIM, B. W., SATO, H., MESSADDEQ, N., HARNEY, J. W., EZAKI, O., KODAMA, T., SCHOONJANS, K., BIANCO, A. C. & AUWERX, J. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439, 484-9.
- WEISINGER, R. S., STANLEY, T. K., BEGG, D. P., WEISINGER, H. S., SPARK, K. J. & JOIS, M. 2009. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav*, 98, 192-7.
- WENDE, A. R. & ABEL, E. D. 2010. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 311-9.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND / AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. 2007. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR, 2007
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2000. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. Genf, Schweiz.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION 2007. Prevention and control of noncommunicable diseases: implementation of the global strategy. Sixty-first World Health Assembly, Resolution WHA61.14. Geneva: World Health Organisation.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2017. *Obesity and overweight Fact sheet* [Online]. [Accessed].
- 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. & HEEREN, J. 2017. Cold-induced conversion of cholesterol to bile acids in mice shapes the gut microbiome and promotes adaptive thermogenesis. *Nat Med*.
- WU, J., BOSTROM, P., SPARKS, L. M., YE, L., CHOI, J. H., GIANG, A. H., KHANDEKAR, M., VIRTANEN, K. A., NUUTILA, P., SCHAART, G., HUANG, K., TU, H., VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D., HOEKS, J., ENERBACK, S., SCHRAUWEN, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150, 366-76.
- WULF, A., HARNEIT, A., KROGER, M., KEBENKO, M., WETZEL, M. G. & WEITZEL, J. M. 2008. T3-mediated expression of PGC-1 α via a far upstream located thyroid hormone response element. *Mol Cell Endocrinol*, 287, 90-5.
- XU, A. & VANHOUTTE, P. M. 2012. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H1231-40.
- XU, A., WANG, Y., XU, J. Y., STEJSKAL, D., TAM, S., ZHANG, J., WAT, N. M., WONG, W. K. & LAM, K. S. 2006. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Chem*, 52, 405-13.

- XUE, B., RIM, J. S., HOGAN, J. C., COULTER, A. A., KOZA, R. A. & KOZAK, L. P. 2007. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res*, 48, 41-51.
- YANG, R. & BAROUCH, L. A. 2007. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res*, 101, 545-59.
- YE, L., WU, J., COHEN, P., KAZAK, L., KHANDEKAR, M. J., JEDRYCHOWSKI, M. P., ZENG, X., GYGI, S. P. & SPIEGELMAN, B. M. 2013. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 12480-5.
- YONESHIRO, T., AITA, S., MATSUSHITA, M., KAMEYA, T., NAKADA, K., KAWAI, Y. & SAITO, M. 2011. Brown Adipose Tissue, Whole-Body Energy Expenditure, and Thermogenesis in Healthy Adult Men. *Obesity*, 19, 13-16.
- YONESHIRO, T., AITA, S., MATSUSHITA, M., KAYAHARA, T., KAMEYA, T., KAWAI, Y., IWANAGA, T. & SAITO, M. 2013a. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 3404-3408.
- YONESHIRO, T., OGAWA, T., OKAMOTO, N., MATSUSHITA, M., AITA, S., KAMEYA, T., KAWAI, Y., IWANAGA, T. & SAITO, M. 2013b. Impact of UCP1 and beta 3AR gene polymorphisms on age-related changes in brown adipose tissue and adiposity in humans. *International Journal of Obesity*, 37, 993-998.
- ZECHNER, R., ZIMMERMANN, R., EICHMANN, T. O., KOHLWEIN, S. D., HAEMMERLE, G., LASS, A. & MADEO, F. 2012. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 15, 279-91.
- ZINGARETTI, M. C., CROSTA, F., VITALI, A., GUERRIERI, M., FRONTINI, A., CANNON, B., NEDERGAARD, J. & CINTI, S. 2009. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J*, 23, 3113-20.

9 Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst **Prof. Jörg Heeren** für die interessante Aufgabenstellung am Schnittpunkt zwischen klinischer Forschung und Grundlagenforschung und die großartige und konsequente Unterstützung während meiner Arbeit. Außerdem danke ich **Prof. Patrick Diemert**, der die Kooperation mit dem Universitären Herzzentrum des UKE möglich machte. Den Chirurgen **Dr. Lenard Conradi** und **Dr. Björn Sill** danke ich für die professionelle Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei der Gewinnung der Gewebeproben.

Bei dem gesamten Team des IBMZ möchte ich mich herzlich für die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonders denke ich hier an **Christine Runge**, die mich gerade zu Beginn meiner Arbeit wertvoll unterstützte. Ich denke an **Sandra Ehret**, **Birgit Henkel** und **Eva-Marie Azizi**, die mich in die Methoden der experimentellen Arbeit einführten und mit ihrem reichen Schatz an Erfahrungen immer zur Seite standen, und an **Ludger Scheja**, der mir bei Fragen zur Statistik weiterhalf. **Nico** und **Anna**, ich danke euch für die bereichernden und lustigen Stunden und die vielen kleinen Ratschläge – die Zeit war viel zu kurz!

Ganz besonders danke ich **Christian** für viele interessante Diskussionen, für die fachliche Unterstützung und für die unzähligen Minuten, die halben und ganzen Stunden – für die Zeit - die du dir genommen hast.

Herzlich danken möchte ich auch **Kathrin**, **Felix**, **Krie** und **Thomas**. Eure moralische Unterstützung und die vielen kleinen Alltagsfreuden waren Gold wert.

Bedanken möchte ich mich auch bei **meiner Familie**, die mir in jeglicher Hinsicht Rückhalt gibt und mich auf meinem Weg bis hierher begleitet hat.

Zuletzt gilt mein ganzer Dank **Marcus**. Danke für deine Hilfe beim Verfolgen des roten Fadens und für die Soforthilfe bei vielen kleinen Hilferufen. Danke für deine Geduld und dein Verständnis.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 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.

Carolin Hanschke

Hamburg, 19.09.2018