

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Der Einfluss von Diät-induzierter Adipositas und Sport auf die Asprosin-Lokalisation und -Expression in murinem braunen Fettgewebe

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Janina Droxler
aus Reutlingen

promoviert am 29. April 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother und Herr Thorben Hoffmann.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Mausmodell wurde von der Arbeitsgruppe „Metabolismus und Perinatale Programmierung“ unter der Leitung von Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother entwickelt. Die tierexperimentellen Vorarbeiten dieser Arbeit inklusive Züchtung und Präparation sowie die Auswertung der Gewichtsentwicklungen, Laufdistanzen und Glukosetoleranztests wurden ohne meine Mitarbeit im Vorfeld im Labor der translationalen Neonatologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln von Herrn Thorben Hoffmann durchgeführt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente und die statistische Auswertung sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother, Herrn Thorben Hoffmann und Frau Christina Vohlen von mir selbst ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 22.10.2024

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne meinen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während der Durchführung und Erstellung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Jörg Dötsch und Frau Dr. med. Dr. nat. med. Eva Hucklenbruch-Rother für die Überlassung des Themas und das Vertrauen in die Erarbeitung desselben sowie für die Möglichkeit der Promotion in dieser Arbeitsgruppe.

Vielen Dank auch an Thorben Hoffmann, der mir als erster Ansprechpartner in diesem Projekt stets mit offenem Ohr und guten Ratschlägen zur Seite gestanden und große Teile der Vorarbeiten geleistet hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei Christina Vohlen für die unendliche Geduld und Ruhe in der Anleitung zur Durchführung der Experimente sowie die vielen lustigen Momente bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mit-Doktoranden und gutem Freund Maximilian Földvary, der mich während der gesamten Zeit stets motiviert und unterstützt hat, und ohne den die Zeit im Labor nicht dieselbe gewesen wäre.

Ich möchte mich ebenfalls bei Robin Ackfeld bedanken, der mir stets zur Seite gestanden, mich bedingungslos unterstützt und mich immer wieder ermuntert hat und somit ebenfalls einen wesentlichen Teil an der Vollendung dieser Arbeit hatte.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken – ihr wart und seid jederzeit an meiner Seite und habt mich nicht nur während der Zeit meiner Dissertation, sondern schon mein Leben lang bedingungslos unterstützt.

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1. Übergewicht und Adipositas	11
2.2. Weißes Fettgewebe (WAT)	11
2.3. Braunes Fettgewebe (BAT)	12
2.3.1. BAT und Übergewicht	14
2.3.2. BAT und Sport	15
2.4. Asprosin	17
2.4.1. Asprosin und Übergewicht	18
2.4.2. Asprosin und Sport	19
2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Material	21
3.1.1. Geräte und Software	21
3.1.2. Enzyme und Chemikalien	23
3.1.3. Stammlösungen und Puffer	27
3.1.4. Mausmodell	28
3.1.5. Präparation	29
3.2. Histologische Methoden	30
3.2.1. Einbetten und Schneiden	30
3.2.2. H&E-Färbung	30
3.2.3. Picrosirius Red Färbung	30
3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung	31
3.2.5. Auswertung Histologie	32
3.3. Western Blot	35
3.3.1. Proteinisolation	35
3.3.2. Messung der Konzentration	35
3.3.3. SDS-PAGE	35

3.3.4.	Ablauf Western Blot	36
3.3.5.	Auswertung Western Blot	37
3.4.	qRT-PCR	38
3.4.1.	RNA-Isolation	38
3.4.2.	Messung der Reinheit und Konzentration	38
3.4.3.	Umschreiben in cDNA	38
3.4.4.	Ablauf der qRT-PCR	39
3.4.5.	Auswertung qRT-PCR	40
3.5.	Statistische Auswertung	41
4.	ERGEBNISSE	42
4.1.	Vorarbeiten: Mausmodell	42
4.2.	Morphologie des BAT	45
4.3.	Lokalisation von Asprosin im BAT	47
4.3.1.	Lokalisation in den Gefäßen	48
4.3.2.	Lokalisation im Gewebe	51
4.4.	Lokalisation von Fibrillin-1 im BAT	52
4.4.1.	Lokalisation in den Gefäßen	53
4.4.2.	Lokalisation im Gewebe	55
4.5.	Vergleich Lokalisation von Asprosin und Fibrillin-1 im BAT	59
4.6.	Expression von Asprosin auf Proteinebene	61
4.7.	Expression von Fibrillin-1 auf Proteinebene	62
4.8.	Expression von Fibrillin-1 auf Genebene	63
5.	DISKUSSION	64
5.1.	Lokalisation von Asprosin im BAT	64
5.2.	Auswirkungen von DIO auf Asprosin im BAT	66
5.3.	Auswirkungen von Sport auf Asprosin im BAT	68
5.4.	Einfluss von Übergewicht und Sport auf BAT	69
5.5.	Diskussion der Limitation der genutzten Methodik	69

5.6.	Ausblick	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72
7.	ANHANG	76
7.1.	Abbildungsverzeichnis	76
7.2.	Tabellenverzeichnis	77

Abkürzungsverzeichnis

AgRP	Agouti related peptide
APS	Ammoniumpersulfat
α -SMA	alpha smooth muscle actin
BAT	Brown adipose tissue (braunes Fettgewebe)
BMI	Body Mass Index
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD-31	Cluster of Differentiation 31
Ct	Cycle threshold
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DEPC A.d.	RNAse freies Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIO	diet-induced obesity (Diät-induziertes Übergewicht)
DIT	diet-induced thermogenesis (Diät-induzierte Thermogenese)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECM	extracellular matrix (Extrazellulärmatrix)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FDG	Fluordesoxyglukose
FFS	freie Fettsäuren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTT	Glukosetoleranztest
HCl	Salzsäure
HFD	High fat diet (hochkalorische Nahrung)
HSL	Hormon-sensitive Lipase
IL-6	Interleukin 6
JNK	c-Jun N-terminal-Kinase
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NO	Stickstoffmonoxid
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2

OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKC δ	Proteinkinase C-delta
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuklease
RUN	freiwilliges Laufbandtraining
SD	Standarddiät
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNS	Sympathisches Nervensystem
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TBST	Tris buffered saline with Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglycerid
TLR-4	Toll-like receptor 4
UCP-1	Uncoupling protein 1
WAT	White adipose tissue (weißes Fettgewebe)
WHO	World Health Organization

1. Zusammenfassung

Asprosin, das C-terminale Spaltprodukt von Profibrillin-1, ist ein neues fasteninduziertes Adipokin und wird mit Übergewicht und assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Während das weiße Fettgewebe (white adipose tissue = WAT) als Hauptort der Produktion von Asprosin bekannt ist, gibt es bisher in der Literatur keinerlei Aussagen über den Zusammenhang zum braunen Fettgewebe (brown adipose tissue = BAT). Jedoch ist auch das BAT als endokrin aktives Organ bekannt und sezerniert ebenfalls Adipokine. Außerdem wird es sowohl durch Ernährung als auch durch Sport in seiner Funktion beeinflusst. Es gelangt daher immer wieder in den Fokus von Studien zur Therapie von Übergewicht und Adipositas und gilt in diesem Zusammenhang als ein vielversprechendes Zielorgan. Auch Asprosin erscheint hierbei als ein möglicher Ansatzpunkt. Wir stellten daher die Frage, ob Asprosin in BAT lokalisiert und exprimiert ist und wie sich diese Expression durch metabolische Interventionen in Form von anderer Nahrungszusammensetzung und Sport verändert.

Hierfür verwendeten wir ein Mausmodell mit männlichen Wildtyp-Mäusen. Diese wurden in drei Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Standarddiät (SD), ein freiwilliges Laufradtraining (RUN) oder eine Western-Style-Diät mit dadurch induziertem Übergewicht (DIO). Wir untersuchten interskapuläres BAT mittels Immunfluoreszenzfärbungen, Western Blots und qPCRs hinsichtlich der Expression und Lokalisation von Asprosin und Fibrillin-1.

Eine spezifische Immunreaktivität zeigte sich insbesondere rund um die Blutgefäße, für Asprosin primär in den Endothelzellen, für Fibrillin-1 auch darüberhinausgehend. Außerdem konnten wir für Asprosin eine schwächere Immunreaktivität innerhalb der braunen Adipozyten nachweisen, welche vor allem perinukleär ausgeprägt war und für Fibrillin-1 eine Immunreaktivität entlang von Gewebelappen und Zellmembranen. Während endotheliales Asprosin durch Laufradtraining tendenziell erniedrigt und durch DIO tendenziell erhöht und damit gegensätzlich reguliert schien, zeigte sich das intrazelluläre Asprosin nach Laufradtraining wie bei DIO tendenziell erhöht. Auf Proteinebene von Asprosin zeigte sich ein Anstieg bei DIO, während sich bei Fibrillin-1 weder auf Proteinebene noch auf Genebene ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen beobachten ließ.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Asprosin im BAT lokalisiert ist und durch Sport und Übergewicht beeinflusst wird. Die Erhöhung von Asprosin als Effekt diätinduzierten Übergewichts könnte darauf hinweisen, dass Asprosin als proinflammatorisches Adipokin auf das BAT wirkt. Dabei scheinen die Endothelzellen als Ursprungsort von Asprosin eine wichtige Rolle zu spielen. Für die Zukunft sind weitere Untersuchungen nötig, um die Frage nach dem exakten Ursprung von Asprosin im BAT zu beantworten. Unsere Ergebnisse tragen zum weiteren Verständnis von Asprosin und seinen Effekten auf den Körper bei. Langfristig könnte die Modulation von Asprosin ein vielversprechendes Ziel in der Prävention und Therapie von Übergewicht und assoziierten Erkrankungen sein.

2. Einleitung

2.1. Übergewicht und Adipositas

Übergewicht und Adipositas sind ein weltweit zunehmendes Problem. Laut WHO hat sich die weltweite Prävalenz seit 1975 verdreifacht ¹. In Europa sind fast 60 % der Erwachsenen und je nach Altersgruppe 20 bis 30 % der Kinder übergewichtig oder adipös ². Mit einhergehend sind weitere assoziierte Erkrankungen wie beispielsweise Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck und Dyslipidämie, verschiedene Krebsarten und chronische Rückenschmerzen ^{3,4}. Definiert werden Übergewicht und Adipositas anhand des Body Mass Index (BMI). Ab einem BMI von $> 25 \text{ kg/m}^2$ spricht man demnach von Übergewicht, ab einem BMI von $> 30 \text{ kg/m}^2$ von Adipositas ¹. Hierbei gilt vor allem eine Erhöhung des viszeralen Fettgewebes, auch abdominelles Fettgewebe genannt, als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen oder Diabetes und es herrscht eine starke Korrelation zwischen einer Erhöhung des abdominellen Fettanteils und dem Auftreten dieser Krankheiten ⁵. Die Messung des Hüftumfangs als direktes Maß des abdominellen Fettanteils gilt daher als noch bessere diagnostische Möglichkeit zur Früherkennung eines erhöhten Risikos für mit Übergewicht und Adipositas assoziierte Erkrankungen und wird als Ergänzung zur Messung des BMIs empfohlen ⁶.

2.2. Weißes Fettgewebe (WAT)

Das bei Übergewicht und Adipositas hauptsächlich vermehrte Fettgewebe ist das weiße Fettgewebe (white adipose tissue = WAT). Dieses ist im ganzen Körper vorhanden, und zwar vor allem als viszerales und als subkutanes Fettgewebe ³. WAT besteht histologisch vor allem aus Adipozyten. Diese enthalten einen großen, univakuolären Fetttropfen. Da dieser den Hauptteil der Zellen ausfüllt und die Adipozyten nur wenige Mitochondrien enthalten, erscheinen sie weiß und sind namensgebend für das Gewebe ³. Eine wichtige Funktion von WAT ist die Speicherung von überschüssiger Energie in Form von Triglyceriden in ebenjenen Adipozyten. Jedoch ist das WAT ebenfalls schon lange dafür bekannt, auch als endokrines Organ eine wichtige Rolle zu spielen ⁷. Zum einen sezerniert das WAT Proteine mit endokriner Funktion, sogenannte Adipokine (z.B. Leptin, Adiponektin, Insulin-like Growth Factor), zum anderen besitzen die weißen Adipozyten Rezeptoren für metabolische Signalwege (z.B. den Insulin-Rezeptor) ⁷. Zusätzlich werden auch Zytokine produziert, welche verschiedene Entzündungs- und Reparaturprozesse im Gewebe steuern ⁸.

Übergewicht und Adipositas bewirken einen Zustand chronischer Inflammation im WAT. Sie führen zu einer Hypertrophie der Adipozyten, zu einer Invasion von Immunzellen (z.B. M1-Makrophagen) und zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Adipokine und Zytokine (z.B. Leptin, IL-6, TNF- α) bei gleichzeitig verminderter Produktion

antiinflammatorischer Proteine (z.B. Adiponektin) durch die Adipozyten⁸. Auch ein erhöhter Gehalt an freien Fettsäuren (FFS) und Hypoxie durch die vergrößerten Zellen bei gleichbleibender vaskulärer Versorgung tragen zur Inflammation des Gewebes bei⁹. Insgesamt bewirkt die Entzündung im WAT eine systemische Inflammation und begünstigt metabolische Folgeerscheinungen wie die zuvor bereits erwähnten assoziierten Erkrankungen. Es entstehen unter anderem eine vermehrte Insulinsekretion aus dem Pankreas bei gleichzeitig verminderter Insulinsensitivität in Leber und Muskeln, was die Entwicklung eines T2DM zur Folge hat⁹, oder eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter Relaxation an den Gefäßen und daraus resultierend verschiedene kardiovaskuläre Folgeerkrankungen³.

2.3. Braunes Fettgewebe (BAT)

Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue = BAT) besteht im Gegensatz zum univakuolären WAT aus Adipozyten mit vielen kleinen, multivakuolären Fetttropfen, in denen ebenfalls Triglyceride gespeichert sind¹⁰. Außerdem besitzt es eine hohe Anzahl an Mitochondrien, welche ihm sein braunes Aussehen verleihen. Die Mitochondrien enthalten das für BAT charakteristische uncoupling protein 1 (UCP-1), welches die Freisetzung von Energie in Form von Wärme ermöglicht¹¹.

Aktiviert wird BAT dabei über das sympathische Nervensystem (SNS)¹⁰. Der Transmitter Noradrenalin (NA) bindet an β -Rezeptoren der Adipozyten und führt über ein G-Protein, cAMP und PKA zur Aktivierung von Enzymen wie der Hormon-sensitiven Lipase (siehe Abbildung 1). Diese wiederum bewirkt die Lipolyse von Triglyceriden in den braunen Adipozyten und so eine Freisetzung von Glycerol und freien Fettsäuren. Letztere werden zum einen durch die Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA aktiviert, zum anderen ins Mitochondrium transportiert. Hier aktivieren sie das UCP-1-Protein¹⁰. Die Acyl-CoA-Moleküle werden ebenfalls ins Mitochondrium transportiert und die in ihnen enthaltene Energie über β -Oxidation und den Citratzyklus in die Elektronentransporter FADH und NADH umgewandelt. Diese werden schließlich in der sich anschließenden Atmungskette mithilfe von Sauerstoff zu Wasser oxidiert. Gleichzeitig werden die dabei entstehenden Protonen in den Intermembranraum gepumpt, den Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Dadurch entsteht ein elektrochemischer Gradient über der Mitochondrienmembran, welcher die treibende Kraft für einen Rückstrom der Protonen ist¹⁰. Der Gradient wird normalerweise von einer in der Membran befindlichen ATP-Synthase genutzt, um aus ADP und Phosphat ATP zu generieren, dem allgemeinen Energieträger der Zelle¹². Im BAT jedoch fließen die Protonen durch das ebenfalls in der Membran sitzende UCP-1-Protein. Die Energie des elektrochemischen Gradienten wird dabei in Form von Wärme in der Zelle frei. Dies bezeichnet man als Thermogenese^{10,11}.

Es gibt zwei Hauptformen der Thermogenese, die kälteinduzierte Thermogenese zur Erhaltung der Körpertemperatur bei Kälte und die nahrungsinduzierte Thermogenese (diet-induced thermogenesis = DIT) zur Erhaltung des Körpergewichts bei übermäßiger Kalorienzufuhr ¹³. Erstere führt dabei durch zitterfreie Thermogenese zur Produktion von Wärme, zweitere bewirkt bei Zufuhr hochkalorischer Nahrung einen gewissen Verbrauch der übermäßigen Energie durch Wärme. Für beide Arten ist eine intakte Innervation über das SNS essenziell, ebenso das Vorhandensein von UCP-1 ¹³.

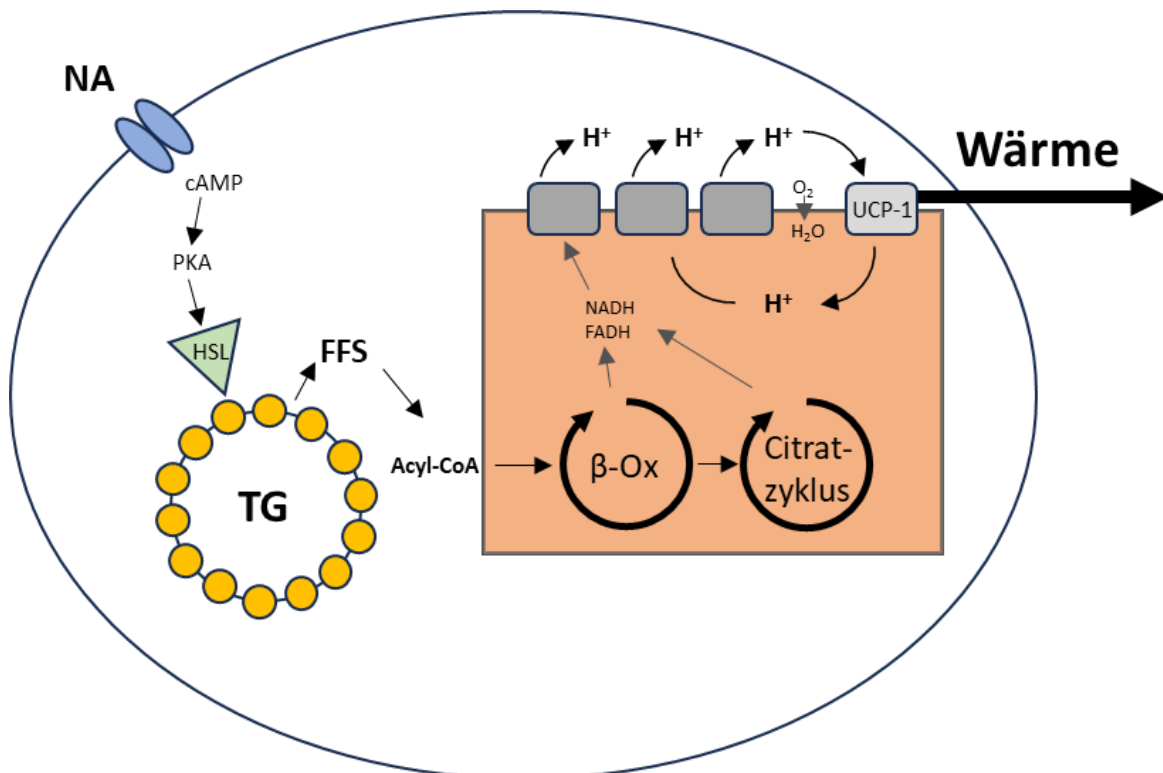


Abbildung 1: Aufbau und Funktionsweise eines Adipozyten des braunen Fettgewebes. Über das sympathische Nervensystem und den Transmitter Noradrenalin (NA) kommt es zur Aktivierung eines cAMP-PKA-Signalweges und zur Spaltung von Triglyceriden (TG) durch die Hormon-sensitive Lipase (HSL). Daraus entstehende freie Fettsäuren (FFS) werden aktiviert, im Mitochondrium durch β-Oxidation und Citratzyklus in die Elektronentransporter NADH und FADH umgewandelt und in der Atmungskette oxidiert. Die entstehenden Protonen fließen durch das UCP-1 Protein, wodurch die Energie des elektrochemischen Gradienten als Wärme freigesetzt wird. In Anlehnung an Canon et al. 2004 ¹⁰.

Für die Funktion der Thermogenese ist das BAT schon sehr lange bekannt. Vor allem Neugeborene haben eine große Menge an BAT. Lange Zeit herrschte die Annahme, dass sich dieses nach der Neugeborenenperiode im Laufe der Zeit zurückbildet und Erwachsene kein BAT mehr besitzen ¹⁴. Mithilfe von PET-CT-Aufnahmen mit dem häufig verwendeten Marker 2-18F-Fluorodesoxyglucose (FDG) entdeckte man jedoch, dass BAT auch bei Erwachsenen vorkommt ¹⁵. Die am häufigsten angetroffenen und größten Ansammlungen finden sich hierbei supraklavikulär und im Bereich des Nackens. Dies unterscheidet sich etwas von der Verteilung bei Mäusen und Ratten, hier ist das interskapuläre das am häufigsten vorkommende BAT ¹⁴.

Ähnlich wie das WAT, das als endokrin aktives Organ Adipokine produziert, zeigt auch das BAT eine endokrine Funktion. Die von ihm produzierten Adipokine werden häufig auch als Batokine bezeichnet ¹⁶. Während WAT vor allem Proteine des Kohlenhydratmetabolismus sezerniert, produziert BAT hauptsächlich Proteine der Extrazellulärmatrix (ECM) wie Kollagene oder Lysozyme. Unter Stimulation des BAT durch Noradrenalin verschiebt sich dies zugunsten der Produktion von anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Proteinen ¹⁶. Durch die Produktion der Batokine und den Energieverbrauch via Thermogenese hat auch BAT einen Einfluss auf den Metabolismus des Körpers. Hierbei zeigt sich unter anderem eine negative Korrelation von BAT und der Menge an viszeralem Fettgewebe sowie Inflammation des Fettgewebes. Außerdem ist das Vorhandensein von BAT negativ assoziiert mit dem Auftreten von T2DM und Dyslipidämie, bei ebenso verbesserter Blutglukose und verbesserten Triglycerid- und HDL-Blutwerten ¹⁷.

2.3.1. BAT und Übergewicht

Da BAT einen Einfluss auf den Metabolismus ausübt, hat umgekehrt auch eine Veränderung des Metabolismus einen Effekt auf das BAT. Übergewicht und Adipositas führen hierbei ähnlich wie im WAT ebenfalls zu einer Inflammation des Gewebes ¹⁸. Eine Möglichkeit, den durch Übergewicht und Adipositas bewirkten Zustand der Inflammation im BAT auch experimentell zu erzeugen und eine sogenannte Diät-induzierte Adipositas (diet-induced obesity = DIO) zu erreichen, ist die Fütterung von Tieren mit einer hochkalorischen Diät, beispielsweise einer High fat diet (HFD) ¹⁹.

Mäuse, die mit einer HFD gefüttert wurden, zeigten eine Gewichtszunahme und eine Hyperglykämie, ebenso eine morphologische Veränderung im BAT mit eher univakuolär erscheinenden Fetttropfen. Des Weiteren waren eine verstärkte Infiltration mit Immunzellen wie Makrophagen und erhöhte mRNA-Spiegel für pro-inflammatorische Proteine wie IL-6 zu sehen. Außerdem waren die Proteinmengen von UCP-1 erhöht und die Mitochondrien zeigten eine erhöhte Zellatmung ²⁰. Insgesamt zeigte das BAT trotz der morphologischen Veränderungen jedoch im Gegensatz zum WAT keine Fibrose und scheint daher im Vergleich zu WAT resistenter gegen Inflammation zu sein ²⁰.

Eine Transplantation von BAT bei mit HFD gefütterten Mäusen führte wiederum zu einer verminderten Gewichtszunahme, einer erhöhten Glukosetoleranz und einer verbesserten Insulinsensitivität und verringerte die Inflammation des Gewebes, was sich beispielsweise in einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer M1-Makrophagen oder mRNA-Expression pro-inflammatorischer Proteine wie IL-6 darstellte ²¹.

Auch im BAT wandern bei Übergewicht und Adipositas Immunzellen in das Gewebe. Eine bei der Inflammation in WAT und BAT wichtige Immunzellgruppe ist die der Makrophagen ²². Im Vergleich scheint BAT zunächst weniger von dieser Inflammation durch Makrophagen

betroffen zu sein als WAT ¹⁸. Es zeigte sich zum Beispiel, dass in BAT eine geringere Basalmenge von IL-6 vorlag. In einer Co-Kultur von Makrophagen und jeweils braunen und weißen Adipozyten ließ sich außerdem ein deutlich geringerer Anstieg in der Sekretion von IL-6 in BAT beobachten ²³. Mit zunehmender Dauer einer HFD kommt es jedoch auch im BAT schließlich zu einem Zustand chronischer Inflammation, zu einer Invasion von Immunzellen wie Makrophagen und Leukozyten und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine ^{18,24}. Hierbei spielt insbesondere eine Hochregulation von Genen der Immunantwort eine Rolle, welche wiederum die Infiltration durch Immunzellen begünstigt ²⁴.

Ob und wie weit dadurch eine Auswirkung auf die Funktionalität des BAT und seine Fähigkeit der Thermogenese entsteht, erscheint anhand der Literatur noch unklar. Während in einigen Studien bei Mäusen unter HFD zum Beispiel eine erhöhte mRNA-Expression und zum Teil auch eine erhöhte Proteinexpression von UCP-1 zu beobachten war, wurde in anderen kein oder ein inverser Effekt beobachtet ²⁵. Auf der anderen Seite hat sich jedoch gezeigt, dass Mäuse ohne UCP-1 eine erhöhte Anfälligkeit für Übergewicht hatten, welche sich sogar schon unter Standarddiät zeigte und sich unter HFD nochmal deutlich verstärkte ²⁶. Zusätzlich ist die durch hochkalorische Nahrung induzierte DIT vollständig vom Vorhandensein von UCP-1 abhängig ²⁷. Es besteht die Möglichkeit, dass DIT und UCP-1 kurzzeitig vor Übergewicht durch HFD schützen, jedoch nicht die Entstehung von Übergewicht an sich verhindern können ²⁷. Insgesamt wird das Vorhandensein von UCP-1 bisher zumindest als gewisser Schutz vor der Entwicklung von Übergewicht betrachtet ²⁴.

2.3.2. BAT und Sport

Der positive Einfluss von Sport auf das Herz-Kreislaufsystem und die Skelettmuskulatur sind schon lange bekannt. Seine Effekte sind dabei unter anderem eine erhöhte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität ²⁸. Sport hat aber auch einen Einfluss auf andere Gewebe wie zum Beispiel das Fettgewebe. Den positiven Einfluss auf das WAT haben dabei schon einige Studien gezeigt, er stellt sich zum Beispiel in Form von verringerter Adipozytengröße, erhöhter mitochondrialer Aktivität und vermehrter Expression wichtiger Gene für den Glukosemetabolismus und die Oxidation von Fettsäuren dar ²⁸. Der Einfluss auf das BAT scheint jedoch noch nicht eindeutig zu sein und ist möglicherweise auch unterschiedlich zwischen Nagetieren und Menschen ²⁹.

Während in Studien mit Mäusen und Ratten sowohl eine verstärkte BAT-Aktivität zum Beispiel in Form von erhöhter Expression von mitochondrialen Genen wie *Ucp-1* als auch eine unveränderte oder sogar verminderte Aktivität zu beobachten war, scheint Sport bei Menschen eher eine Reduktion der BAT-Aktivität zu bewirken ³⁰. In einer Studie von Mortiani et al. wurde die durch Insulin bewirkte Glukoseaufnahme in Skelettmuskulatur und BAT nach 2-wöchigem Training bei gesunden Probanden mit jeweils hoher und niedriger Ausgangs-BAT-Aktivität

gemessen ³¹. Während sich im Skelettmuskel eine verbesserte Glukoseaufnahme durch das Training zeigte, war diese im BAT bei denjenigen mit niedriger BAT-Aktivität unverändert und bei denjenigen mit hoher BAT-Aktivität sogar vermindert ³¹. Die Tatsache, dass die Gruppe mit hoher BAT-Aktivität bereits zu Beginn der Studie eine geringere Fettmasse insbesondere des viszeralen Fettgewebes, eine verbesserte Insulinsensitivität und eine höhere HDL-Konzentration aufwies, zeigt jedoch die wichtige Rolle von BAT, selbst wenn seine Aktivität durch Training verringert wird ³¹.

Auch in einer Studie von Lehnig et al., die die Veränderung durch Training in allen vorkommenden BAT-Depots von Mäusen untersuchte, zeigte sich eine verringerte BAT-Aktivität durch Sport ³². Zwar wurde eine Erhöhung der Expression von mitochondrialen Genen (z.B. *Ucp-1*), Genen des Glukosemetabolismus (z.B. *Glut-4*) und Genen der Fettsäureoxidation (z.B. *Fabp-3*) festgestellt, es gab jedoch keine Veränderungen auf Proteinebene, und die Glukoseaufnahme und die Lipolyse waren letztlich verringert. Außerdem konnte nur ein kurzzeitiges Training über 5 Tage die mitochondriale Aktivität erhöhen, während ein länger andauerndes Training über 11 Tage diese wieder reduzierte ³². Eine mögliche Erklärung hierfür sehen die Autoren darin, dass eine thermogene Aktivierung von BAT während des Sports nicht nötig ist, da die Körpertemperatur durch Sport sowieso schon erhöht wird ³². Es besteht aber die Ansicht, dass Sport trotzdem eine Auswirkung auf das BAT-Gewebe haben kann, beispielsweise, indem dessen endokrine Funktion erhöht wird und metabolisch günstige Adipokine produziert werden ^{30,32,33}.

Sport aktiviert zudem das sympathische Nervensystem und führt zu einer Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin. ³⁴ Da BAT ebenfalls über das sympathische Nervensystem und den Transmitter Noradrenalin aktiviert wird, erscheint es möglich, dass Sport ebenso zu einer Aktivierung von BAT führt ²⁹. Eine mögliche Aktivierung seiner endokrinen Funktion ist dabei plausibel, da unter Noradrenalin-Stimulation braune Adipozyten veränderte Batokine freisetzen ¹⁶.

2.4. Asprosin

Asprosin ist ein von Romere et al. im Jahr 2016 neu entdecktes Adipokin und Proteinormon, welches Fasten-induziert die Glukosefreisetzung aus der Leber bewirkt und bei Menschen und Mäusen mit Insulinresistenz erhöht ist ³⁵. Umgekehrt führt eine Neutralisierung zirkulierenden Asprosins durch einen monoklonalen Antikörper zu einer Reduktion der Insulinkonzentration und ebenso der Glukosefreisetzung aus der Leber. Die Entdecker folgerten daraus, dass eine Verringerung von Asprosin dem Hyperinsulinismus entgegenwirken kann, der mit dem metabolischen Syndrom einhergeht ³⁵. Asprosin wird von den letzten beiden Exons des Fibrillin-1 Gens (*Fbn-1*) codiert, Exon 65 und 66. Das daraus entstehende Protein Profibrillin-1 wird durch das Enzym Furin am C-terminalen Ende gespalten und daraus entstehen dann das circa 30 kDa große Asprosin sowie Fibrillin-1, ein wichtiges Protein der ECM ³⁵. Der Hauptort der Produktion von Asprosin ist das WAT, was zu dessen Rolle als sekretorisches und endokrin aktives Organ passt. Jedoch sahen Romere et al. bereits damals die Möglichkeit, dass auch andere Organe eine Quelle von Asprosin sein könnten. Die Untersuchung der *Fbn1* mRNA-Expression bei Wildtyp und Ob/Ob-Mäusen ergab bei den Ob/Ob-Mäusen neben der am stärksten ansteigenden Menge an *Fbn-1* mRNA im WAT auch einen Anstieg in Skelettmuskel und BAT ³⁵.

Asprosin hat verschiedene zentrale und periphere Effekte (siehe Abbildung 2). Im Hypothalamus aktiviert es über einen cAMP-PKA-Signalweg die sogenannten agouti-related peptide neurons (AgRP), was eine Steigerung des Appetits bewirkt ³⁶. In der Leber führt es über den olfaktorischen Rezeptor OR4M1 bei Menschen bzw. OLFR734 bei Mäusen über einen cAMP-PKA-Mechanismus zur Produktion von Glukose ³⁷. Im Pankreas wirkt Asprosin über den Toll-like receptor (TLR) 4 und hat zum einen über eine Hemmung von cAMP eine verminderte Insulinsekretion zur Folge, zum anderen resultieren über den JNK-Signalweg (c-Jun N-terminal-Kinase) eine vermehrte Inflammation mit Produktion proinflammatorischer Zytokine, Apoptose und ebenfalls eine Beeinträchtigung der Insulinsekretion ³⁸. Im Skelettmuskel führt Asprosin über Aktivierung der Proteinkinase C-delta (PKC δ) und verschiedene Signalwege zu Inflammation und Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und dadurch zu erhöhter Insulinresistenz ³⁹. In Adipozyten bewirkt es über den Nrf2-Signalweg eine verminderte Expression von UCP-1 und damit einhergehend eine verminderte Thermogenese, bei gleichzeitig erhöhter Fettsynthese und Speicherung in Fetttropfen ⁴⁰. Interessanterweise zeigte sich in Makrophagen durch Asprosin eine verminderte Akkumulation von Lipiden ⁴¹. Ebenso zeigte sich eine schützende Wirkung auf mesenchymale Stromazellen, welche durch Asprosin weniger radikale Sauerstoffspezies und Apoptose aufwiesen ⁴².

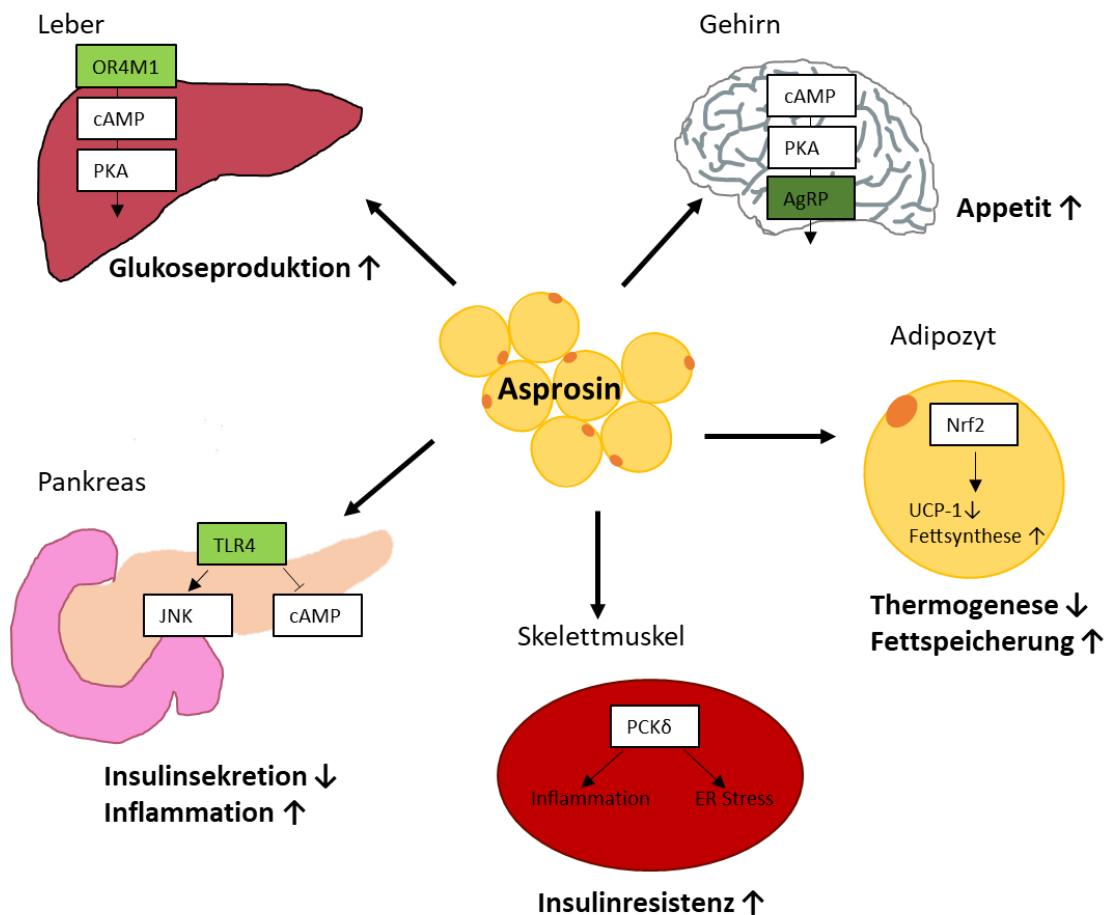


Abbildung 2: Überblick über die zentralen und peripheren Effekte von Asprosin. Nach seiner Produktion im weißen Fettgewebe wirkt Asprosin in unterschiedlicher Weise auf die einzelnen Organe. Im Hypothalamus aktiviert es über cAMP und PKA die AgRP-Neurone und steigert den Appetit. In der Leber bewirkt es über Bindung an den OR4M1-Rezeptor und den cAMP-PKA-Signalweg eine erhöhte Glukoseproduktion. Im Pankreas führt es über einen TLR4-Rezeptor zu einer verminderten Insulinsekretion sowie zu Inflammation. Im Skelettmuskel resultieren über den PCKδ-Signalweg Inflammation und ER-Stress und somit eine Insulinresistenz. In den weißen Adipozyten selbst führt Asprosin über Nrf2 zu einer verminderten Thermogenese und einer erhöhten Fettspeicherung. In Anlehnung an Farrag et al. 2023 ³⁷.

2.4.1. Asprosin und Übergewicht

Es gibt zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasmaspiegeln von Asprosin, BMI und Übergewicht sehen, umgekehrt reduzieren sich Gewicht und Nahrungsaufnahme bei der Gabe von Antikörpern gegen Asprosin ⁴³. In einer Studie zu bariatrischer Chirurgie zeigten Patienten 6 Monate postoperativ eine signifikante Abnahme der Asprosin Spiegel. Hier ergab sich außerdem, dass bei Patienten mit hohen initialen Mengen an Asprosin der bariatrische Eingriff zu einer stärkeren Reduktion ihres Körpergewichts führte ⁴⁴. Jedoch scheint der Zusammenhang zwischen Übergewicht und erhöhtem Serumasprosin bei Kindern noch nicht ganz klar zu sein. Silistre et al. fanden erhöhte Mengen an Asprosin bei übergewichtigen Kindern und damit ein mit Erwachsenen übereinstimmendes Ergebnis ⁴⁵. Dahingegen ergab sich bei Long et al. und Corica et al. eine verminderte Menge

Asprosin bei übergewichtigen Kindern im Vergleich mit normalgewichtigen Kindern. Ebenso fanden sie eine stärkere Verringerung der Spiegel bei Jungen als bei Mädchen ^{46,47}.

Insgesamt ist die Datenlage also noch nicht ganz klar und zeigt, dass Asprosin möglicherweise eine komplexe Rolle im Zusammenhang mit Übergewicht spielt ⁴³.

2.4.2. Asprosin und Sport

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Sport und der Menge an Asprosin gibt es ebenfalls verschiedenen Ergebnisse. Studien mit aerobem Training haben ergeben, dass dieses sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen zu einer Reduktion der Asprosin Spiegel führte. Dies galt sowohl für übergewichtige als auch für normalgewichtige Probanden ⁴⁸⁻⁵⁰. Ko et al. zeigten bei Ratten mit T1DM, dass aerobes Training über eine Hemmung des cAMP-PKA-Signalwegs zu einer verminderten Asprosinfreisetzung aus der Leber und damit einer reduzierten Blutglukose führte ⁵¹. Bei all diesen Studien schien dabei die Art des aeroben Trainings keinen Einfluss zu haben, es waren zum Beispiel sowohl Radfahren und Schwimmen, als auch Laufbandtraining effektiv ⁴⁸.

Akutes anaerobes Training (z.B. Sprint auf dem Laufband) schien im Gegenteil entweder keinen Effekt zu haben oder führte zu einem Anstieg an Asprosin ^{52,53}. Eine mögliche Erklärung könnte hier der Zusammenhang über die Blutglukose sein. Da anaerobes Training eine Verminderung der Glukosespiegel in Blut und Muskeln bewirkt, könnte Asprosin dem über seinen Effekt in der Leber entgegenwirken ⁴⁸. Insgesamt schien es bei den beiden Studien jedoch auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern und im Vergleich von übergewichtigen und normalgewichtigen Probanden gegeben zu haben ^{52,53}.

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Da das BAT wie bereits erwähnt eine wichtige metabolische Rolle durch die Produktion von Adipokinen spielt und Asprosin als Adipokin wiederum einige Einflüsse auf den Metabolismus zeigt, stellt sich die Frage, ob BAT eine mögliche Quelle von Asprosin sein kann. Hierüber gibt es bisher keine Angaben in der Literatur. Gleichzeitig soll die Frage geklärt werden, wo genau möglicherweise im BAT vorhandenes Asprosin lokalisiert ist und ob es dabei Unterschiede innerhalb des Gewebes gibt.

Sowohl das BAT als auch Asprosin werden durch Übergewicht und Sport beeinflusst. Es kommt daher außerdem zum einen die Frage auf, wie sich eine mögliche Asprosinexpression im BAT durch Übergewicht und Sport jeweils verhält, und zum anderen, wie sich das BAT selbst durch diese metabolischen Eingriffe verändert. Auch hierfür gibt es bisher keinerlei oder nur sehr widersprüchliche Antworten in der Literatur.

Da Asprosin eine proinflammatorische Wirkung auf andere Gewebe zeigt, wäre weiterhin interessant zu wissen, ob es auch im BAT eine solche Wirkung hat bzw. welchen Einfluss Asprosin möglicherweise auf das BAT ausübt. Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lauten daher wie folgt:

1. Ist Asprosin im BAT lokalisiert?
2. Wie verändert sich die Asprosinexpression durch eine Intervention mit DIO?
3. Wie verändert sich die Asprosinexpression durch Sport?
4. Welche morphologischen Veränderungen entstehen im BAT durch DIO und Sport?

Mit den Erkenntnissen dieser Doktorarbeit soll ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis von Asprosin geleistet werden. Da bisher noch wenig Wissen über dieses Proteinormon existiert, ihm gleichzeitig aber eine große Bedeutung in der Erkennung und Behandlung von Adipositas und assoziierten Erkrankungen zugeschrieben wird ⁴³, ist eine genaue Kenntnis seiner Lokalisation, Expression und Veränderung durch metabolische Interventionen wichtig. Dabei sollen insbesondere seine bisher unbekannten Effekte auf das BAT näher beleuchtet werden, welches als metabolisch günstiges Organ ebenfalls bereits in den Fokus der Forschung geraten ist. Insgesamt soll so ein weiterer Baustein im Verständnis der Pathogenese von Adipositas und langfristig der Entwicklung möglicher Therapien geschaffen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Software

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Software

Name	Hersteller, Herstellersitz
Leica ASP300S Fully Enclosed Tissue Processor	Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA
Shandon Finesse ME+ Mikrotom	Thermo Fisher, Rockford, IL, USA
Paraffin Streckbad 1052	GFL, Burgwedel, Deutschland
NanoZoomer S360 Digital Slide Scanner	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
VS200 Slidescanner	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX53	Olympus, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzlichtquelle U-HGLGPS	Olympus, Hamburg, Deutschland
DP80 dual CCD Kamera	Olympus, Hamburg, Deutschland
Software CellSensDimension (V1.8)	Olympus, Hamburg, Deutschland
Bildauswertungssoftware QuPath v. 0.2.3	Olympus, Hamburg, Deutschland
Bildauswertungssoftware ImageJ v. 1.53d	National Institutes of Health, USA

Ultraschall-Homogenisator + GM2070 Stab SH 70G	Bandelin, Berlin, Deutschland
Heiz-Thermomixer MHR23 1,5ml	HLC, Bovenden, Deutschland
Doppelgel-Elektrophorese-System PerfectBlue™ Twin	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Power Supplies, PEQLAB Power Supply EV231	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Folienschweißgerät Severin Folio	Severin, Sundern, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad, München, Deutschland
Software Image Lab v. 4.0.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Schwingmühle MM 400	Retsch, Haan, Deutschland
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle, Gosheim, Deutschland
Nano Quant infinite M200 Pro, NanoDrop-Spektrophotometer	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Software IControl 2.0	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Thermozykler 7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Software 7500 Software v2.0.6	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Software Graphpad Prism (V. 9.0)	Insightful Science (Dotmatics), San Diego, CA, USA

3.1.2. Enzyme und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Chemikalien

Name	Hersteller, Herstellersitz
Tissue-Tek O.C.T. TM Compound	Sakura Finetek, Umkirch, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NeoClear	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Neo-Mount Anhydrous mounting medium	Merck, Darmstadt, Deutschland

Picro-Sirius-Red-Lösung	SkyTek Laboratories, Logan, UT, USA
0,2 % Phosphomolybdän-Säure	SkyTek Laboratories, Logan, UT, USA
0,5 % Essigsäurelösung	SkyTek Laboratories, Logan, UT, USA
PBS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sea Block	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Antibody Diluent	Dako (Agilent Technologies), Santa Clara, CA, USA
Fluoroshield mit DAPI	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Fluoromount Aqueous mountin medium	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Igepal	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumdesoxycholat	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Leupetin	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA

Aprotinin	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Pepstatin A	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
PMSF	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Na ₃ VO ₄	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
NaF	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APS	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

BSA	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Ponceau-S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GE Healthcare Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chicago, USA
TriReagent	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase-I-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-free DNase	Promega, Mannheim, Deutschland
EDTA	Sigma Adrich, St. Louis, Missouri, USA
Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Oligo-dt-Primer	Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland
Random Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
M-MLV-Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
GoTaq Mastermix	Promega, Mannheim, DeutschlandE

3.1.3. Stammlösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Stammlösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 1 % Igepal, 0,25 % Natriumdesoxycholat
RIPA-Puffer Modifikator	1 mg/ml Leupetin, 5 mg/ml Aprotinin, 1,5 mg/ml Pepstatin A, 200 mM PMSF, 200 mM Na ₃ VO ₄ und 200 mM NaF
Trenngel 6 %	je 10 ml: 5,3 ml dH ₂ O, 2 ml 30 % Acrylamid Mix, 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8), 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % APS, 0,008 ml TEMED
Trenngel 10 %	je 10 ml: 4 ml dH ₂ O, 3,3 ml 30 % Acrylamid Mix, 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris pH 8,8), 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % APS, 0,004 ml TEMED
Sammelgel 4 %	je 10 ml: 6,8 ml dH ₂ O, 1,7 ml 30 % Acrylamid Mix, 1,3 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8), 0,1 ml 10 % SDS, 0,1 ml 10 % APS, 0,01 ml TEMED
Probenpuffer 5x	0,082 M Sammelgelpuffer, 10 % SDS, 0,005 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 25 % β -Mercaptoethanol, 625 mM Tris
Laufpuffer (Lämmli-Puffer) 10x	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
Transferpuffer	10 % Towbin-Puffer, 10 % Methanol und 80 % dH ₂ O
Towbinpuffer 10x	0,25 M Tris, 2 M Glycin

Blocking Solution	5 % Milch, 2 % BSA in TBS-Tween
TBS-Tween	NaCl 10 mM, Tris 1 mM, 0,05 % Tween-20

3.1.4. Mausmodell

Zur Untersuchung der metabolischen Interventionen Übergewicht und Sport wurden männliche BL/6J Wildtyp-Mäuse zufällig auf drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt eine Standarddiät (SD-Gruppe, für Zusammensetzung der SD siehe Tabelle 4), die zweite Gruppe erhielt ebenfalls die Standarddiät und hatte zusätzlich vom postnatalen Tag P42 bis P70 ein Laufrad im Käfig, auf welchem sie nach Belieben ein freiwilliges Laufradtraining absolvieren konnten (RUN-Gruppe), die letzte Gruppe erhielt eine Western-Style-Diät, welche bei den Tieren eine Diät-induzierte Adipositas bewirkte (diet-induced obesity, DIO-Gruppe, für Zusammensetzung der Nahrung siehe Tabelle 4).

Alle zwei bis drei Tage wurden die aufgenommene Nahrung sowie die gelaufene Strecke und Dauer des Trainings ausgelesen. Wöchentlich wurde das Gewicht der Tiere gemessen. An Tag P56 wurden im Anschluss an eine 6-stündige Fastenperiode Glukosetoleranztests (GTTs) durchgeführt und dabei nach Verabreichung von 2g/kg Glukose die Glukosemenge in den Minuten 0, 15, 30, 60 und 120 gemessen. An Tag P70 wurden die Tiere geopfert und die Organe entnommen.

Alle Tierversuche entsprechen den ethischen Standards der einschlägigen nationalen Leitfäden für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (AZ81-02.04.2019.A130, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Düsseldorf, Deutschland) und wurden außerdem vom Institutsausschuss (Universitätsklinikum Köln, Deutschland) genehmigt. Diese Arbeiten wurden im Vorfeld von Thorben Hoffmann durchgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung Tiernahrung; SD = Standarddiät, DIO = Diet-induced obesity durch Western-Style Diät

		SD	DIO
Fett	kJ %	9	45
Protein	kJ %	24	20
Kohlenhydrate	kJ %	67	35
Zucker	kJ %	8,8	19,1

3.1.5. Präparation

Das aus dem Nacken entnommene BAT entspricht dem interskapulären BAT (iBAT) der Mäuse. Es wurde im Folgenden entweder direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren für folgende Protein- und RNA-Extraktionen, oder in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek) eingebettet und in stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren, oder für 24 Stunden in 4 % PFA und anschließend mindestens 24 Stunden und maximal eine Woche in 70 % Isopropanol eingelegt und mit dem Leica ASP300S Fully Enclosed Tissue Processor (CMMC Tissue Embedding and Histology Facility der Universität Köln) entwässert und eingebettet.

3.2. Histologische Methoden

3.2.1. Einbetten und Schneiden

Die bei 4°C gelagerten Paraffinblöcke wurden mithilfe eines Mikrotoms (Shandon Finesse ME+ Mikrotom, Thermo Fisher Scientific) zu je 5 µm dicken Schnitten verarbeitet und im Wasserbad (Paraffin Streckbad 1052, GFL) gestreckt. Anschließend wurden je 4 Schnitte auf einen Objektträger gebracht, diese über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

3.2.2. H&E-Färbung

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Schnitte zunächst für drei Mal 5 Minuten in Neo-Clear entparaffiniert und anschließend mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 % und 70 % EtOH je 1 Minute) entwässert. Nach einem Waschschrift von 1 Minute mit destilliertem Wasser (dH₂O) wurden sie zur Färbung der basophilen Zellkerne für 5 Minuten in einer sauren Hämalalaunlösung nach Mayer (Carl Roth GmbH + Co. KG) inkubiert. Es folgte ein kurzer Waschschrift in dH₂O, ein anschließendes 6-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser und ein erneutes kurzes Waschen in dH₂O. Nun erfolgte eine Inkubation in 0,5 % wässrigem Eosin G (Carl Roth GmbH + Co. KG) für 3 Minuten zur Färbung der azidophilen Gewebestrukturen. Nach einem erneuten kurzen Waschschrift in dH₂O wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % EtOH je 1 Minute) entwässert, mittels zwei Mal 5 Minuten Neo-Clear geklärt und mit Neo-Mount (Anhydrous mounting medium, Merck) eingedeckelt.

3.2.3. Picrosirius Red Färbung

Die Färbung der Schnitte mittels Picro-Sirius-Red-Lösung dient der Darstellung von Kollagenfasern. Die hierfür verwendeten Reagenzien stammten allesamt von SkyTek Laboratories. Es erfolgte zunächst wieder eine Entparaffinierung in drei Mal 5 Minuten Neo-Clear, eine Entwässerung in absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 % und 70 % EtOH je 1 Minute) und ein 1-minütiger Waschschrift in dH₂O. Die Schnitte wurden dann für 3 Minuten mit 0,2 % Phosphomolybdic Acid Solution bedeckt. Anschließend wurde die Picro-Sirius-Red Solution auf das Gewebe gegeben und dieses für 60 Minuten inkubiert. Es folgten ein zweimaliges kurzes Spülen mit 0,5 % Acetic Acid Solution, eine Entwässerung mittels zwei Mal 30 Sekunden 100 % EtOH und eine Klärung mittels zwei Mal 1 Minute Neo-Clear. Zum Schluss erfolgte ein Eindeckeln der Schnitte mit Neo-Mount (Anhydrous mounting medium, Merck).

3.2.4. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden kryokonservierte Schnitte verwendet. Diese wurden nach einer 15-minütigen Aufwärmphase zunächst 10 Minuten lang in 4 % PFA fixiert und drei Mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden sie für je 30 Minuten in PBS-Tween 0,1 % und in 300 mM Glycin permeabilisiert. Im Anschluss erfolgte eine 1-stündige Blockung mit 60 µl Sea Block (Thermo Fisher Scientific) pro Schnitt. Nun wurden die mit Antibody Diluent (Dako) verdünnten Primär-Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 5) auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert. Am Tag darauf erfolgte ein erneuter Waschschrift für drei Mal 5 Minuten in PBS. Anschließend wurden die entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundär-Antikörper auf die Schnitte gegeben (ebenfalls in Antibody Diluent verdünnt, Verdünnung siehe Tabelle 6) und diese für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS für drei Mal 5 Minuten erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI (Verdünnung 1:1000 in PBS), welche nach 15 Minuten Einwirkzeit bei RT erneut durch drei Mal 5 Minuten PBS ausgewaschen wurde. Zum Schluss erfolgte ein 2-minütiger Waschschrift mit dH₂O und ein Eindeckeln mit Fluoromount (Aqueous mounting medium, Sigma-Aldrich). Die Schnitte wurden dann bei 4 °C gelagert. Eine Negativkontrolle wurde durch Weglassen der jeweiligen Primär-Antikörper erreicht.

Tabelle 5: Verdünnung Primär-Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen

Name	Host	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Asprosin	Kaninchen	1:100	MyBiosource	MBS7607159
Fibrillin-1	Kaninchen	1:1000	hergestellt im Labor der Biochemie der Universität Köln	
α-SMA	Maus Cy3-konjugiert	1:500	Sigma Aldrich	C6198
CD-31	Ratte	1:200	Novus Biologicals	NB600-1475SS

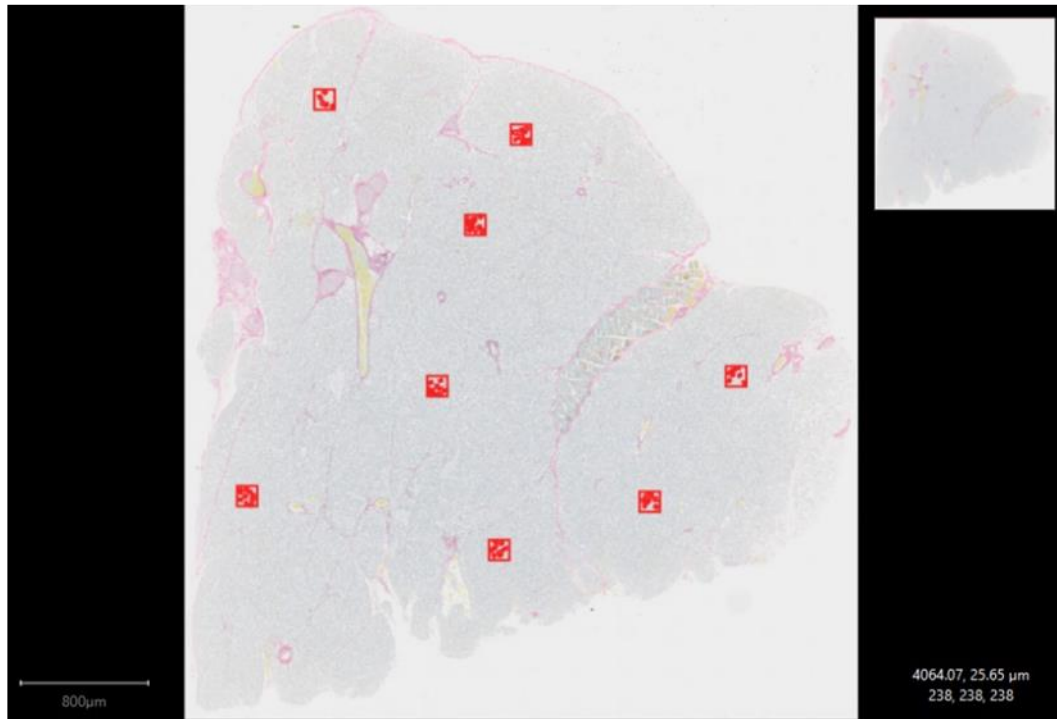
Tabelle 6: Verdünnung Sekundär-Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen

Name/Farbe	Eigenschaft	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Alexa 647	donkey anti-rabbit	1:500	Jackson Immuno Research	711-605-152
Cy3	goat anti-rat	1:500	Jackson Immuno Research	112-165-003
Cy3	goat anti-mouse	1:500	Jackson Immuno Research	115-165-003

3.2.5. Auswertung Histologie

Die HE-Schnitte wurden mithilfe des Slidescanners NanoZoomer S360 digital slide scanner (Hamamatsu) der CECAD Imaging Facility der Universität Köln gescannt. Die Sirius-Red-Schnitte wurden mit dem Slidescanner VS200 (Olympus) aufgenommen. Die Immunfluoreszenzschnitte wurden mithilfe des manuellen Systemmikroskop BX43 und der Fluoreszenzlichtquelle U-HGLGPS (beide von Olympus) mikroskopiert und in einer Vergrößerung von 10 x, 20 x und 40 x aufgenommen (DP80 dual CCD Kamera, Olympus). Zur Quantitativen Auswertung wurde QuPath verwendet (v. 0.2.3). Für die Auswertung der Größe der Fetttropfen wurde eigenständig eine Methode entwickelt (siehe Abbildung 3), bei der zunächst zufällig 8 gleich große Quadrate (regions of interest, ROIs) im ganzen Gewebe ausgewählt und anschließend in diesen mithilfe des Polygon-Werkzeuges die Fetttropfen markiert wurden. Dabei wurde darauf geachtet, nur solche Fetttropfen zu verwenden, die vollständig innerhalb der ROIs lagen und zusätzlich deutlich abzugrenzen waren. Mithilfe des Measure Tools wurden die Durchmesser der markierten Polygone gemessen und schließlich der Mittelwert aus allen Durchmessern gebildet.

A



B

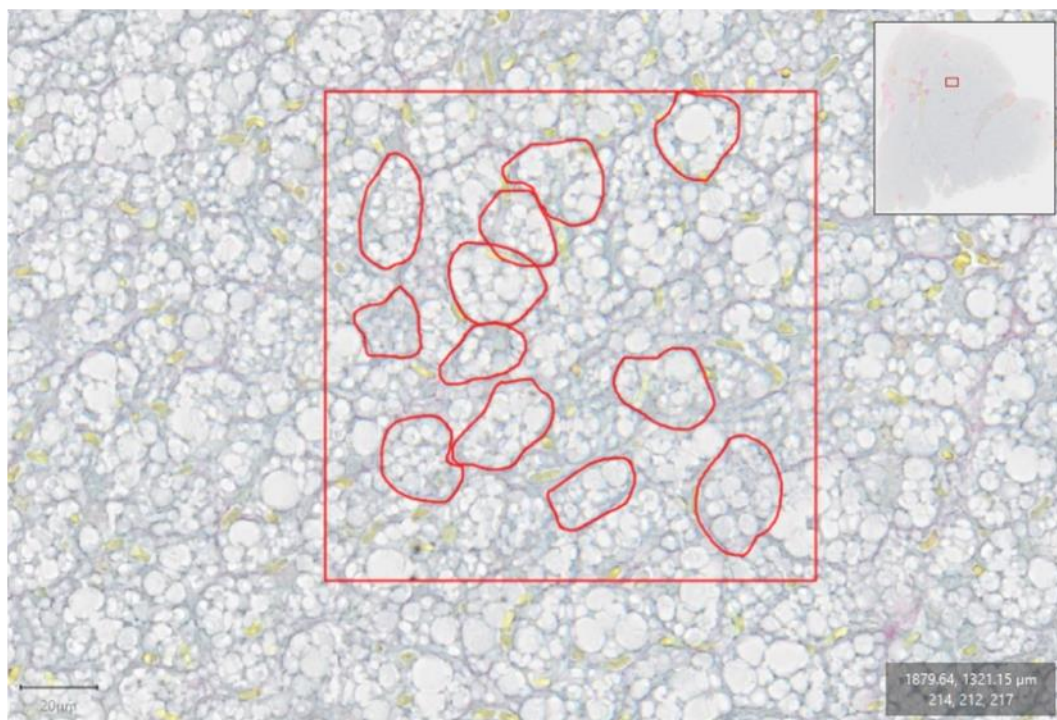


Abbildung 3: Methode zur Auswertung der Fetttropfengröße im Gewebe des BAT mithilfe von QuPath. (A) Auswahl von 8 gleich großen Quadraten (ROIs) im gesamten Gewebeschnitt. (B) Markierung der Fetttropfen mithilfe des Polygonwerkzeuges. Dabei wurden nur Polygone markiert, die deutlich abzugrenzen und vollständig innerhalb der ROIs waren. Im Anschluss wurden mithilfe des Measure Tools die Durchmesser der markierten Polygone gemessen und der Mittelwert aller Durchmesser gebildet.

Zur quantitativen Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Intensität der Fluoreszenzfärbung mittels Schwellenwert gemessen. Bei der Untersuchung der Gefäße wurde diese sowohl in der Asprosinfärbung als auch in der Fibrillin-1-Färbung jeweils einmal auf die Gesamtgefäßfläche und einmal auf die Anzahl an Zellen im Gefäß normiert. Bei der Untersuchung der Fibrillin-1-Färbung in Lappchen und Gewebe wurden jeweils ROIs ausgewählt und die Intensität der Färbung innerhalb der ROIs auf die gemessene Gesamtfläche der ROIs bezogen. Bei der Untersuchung der Asprosinfärbung im Gewebe wurde die Intensität erneut sowohl auf die Gesamtfläche als auch auf die Anzahl an Zellen normiert, da Asprosin vor allem intrazellulär vorzufinden war. Repräsentative Beispielbilder wurden mithilfe von QuPath (v. 0.2.3) und ImageJ (v. 1.53d) erstellt.

3.3. Western Blot

3.3.1. Proteinisolation

Für die Isolation der Proteine wurde RIPA-Puffer mit RIPA-Puffer-Modifikator (Zusammensetzungen siehe Tabelle 3) versetzt und anschließend pro Gewebe 100 µl dieses modifizierten RIPA-Puffers hinzugefügt. Das Gewebe wurde nun zunächst zerkleinert und mittels Ultraschalls für je 20 Sekunden bei 50 % Energie homogenisiert (Ultraschall-Homogenisator + GM2070 Stab SH 70G, Bandelin). Nach einer Stunde Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben bei 14.000 U/min und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5804R, Eppendorf). Es folgten eine Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß und das Einfrieren der Proteine bei -80 °C.

3.3.2. Messung der Konzentration

Für die Messung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Entsprechend Herstelleranleitung wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl dieses Gemischs zu 10 µl Probe bzw. Standard. Für die Messung der Konzentration an Proteinen wurde der NanoQuant infinite M200 Pro (Tecan) mit der zugehörigen Software iControl 2.0 verwendet. Dabei wurde nach einer 30-minütigen Inkubation der Proben bei 37 °C die Absorption bei 562 nm gemessen und anschließend in Bezug zur Standardreihe gesetzt.

3.3.3. SDS-PAGE

Für die Analyse der Proteine mittels Western Blot müssen diese zunächst entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies geschieht mithilfe einer Gelelektrophorese, der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis). Verwendet wurden je 20 µg Proteinprobe, die mithilfe von dH₂O auf ein einheitliches Volumen verdünnt wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 µl 5x Probenpuffer. Das in ihm enthaltene β-Mercaptoethanol sorgt für eine Spaltung der Disulfidbrücken der Proteinstruktur, das enthaltene SDS bewirkt eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine. Durch anschließendes Erhitzen der Proben für 10 Minuten bei 70 °C werden die Wasserstoffbrückenbindungen gelöst und damit auch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Dadurch sind die Proteine nur noch von ihrer Molekülmasse abhängig.

In der Gelelektrophorese sollen sie entsprechend dieser Molekülmasse aufgetrennt werden. Hierfür wird über dem Gel eine Spannung angelegt und die negativ geladenen Proben wandern in Richtung der Anode. Das im Gel enthaltene Polyacrylamid wirkt dabei als eine Art Sieb. Je kleiner ein Protein ist, desto leichter und damit weiter wandert es durch das Gel. Man unterscheidet zwischen Sammelgel und Trenngel, welche sich wiederum in ihrem

Polyacrylamid-Anteil unterscheiden. Die Proteine durchlaufen zunächst das Sammelgel. Hier werden sie alle auf einen Bereich konzentriert, sodass im Folgenden saubere Banden entstehen können. Im anschließenden Trenngel erfolgt dann die Auftrennung entsprechend ihrer Molekülmasse. Neben den Proteinen lässt man noch einen Proteinmarker durch das Gel laufen, welcher Proteine bekannter Größe enthält und diese jeweils farbig darstellt.

In diesem Ansatz liefen die Proben für 45 Minuten bei 80 V durch das Sammelgel und für 3 Stunden bei 120 V durch das Trenngel (Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 3). Der verwendete Proteinmarker war der PageRuler Prestained von Thermo Fisher Scientific. Als Gelelektrophoresegerät diente das Doppelgel-Elektrophorese-System PerfectBlue™ Twin von Peqlab.

3.3.4. Ablauf Western Blot

Im Anschluss folgt der eigentliche Vorgang des Blottens, bei dem die Proteinbanden mithilfe eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Die Membran wurde hierfür zunächst mittels kaltem dH₂O aktiviert und zusammen mit Filterpapieren in kalten Transferpuffer bestehend aus 10 % Towbin-Puffer, 10 % Methanol und 80 % dH₂O für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden Gel, Membran und Filterpapiere in einer Blotting-Kammer (Semi-Dry-Elektroblotter PerfectBlue™, Peqlab) so ausgerichtet, dass die Membran näher an der positiven und das Gel näher an der negativen Elektrode lagen. Dann wurde für 2 Stunden ein elektrisches Feld mit 1,3 mA/cm² Stromdichte angelegt (Power Supply EV231, Peqlab). Auf diese Weise konnten die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern. Das ursprüngliche Bandenmuster der Proteine aus der Gelelektrophorese wurde dabei erhalten. Die hier verwendete Membran war die Nitrocellulose Blotting Membrane Amersham Protran mit 0,45 µm Porengröße von GE Healthcare Life Science.

Nach dem Blotting-Vorgang wurde die Membran in eine Ponceau-Lösung gegeben. Diese bindet reversibel an positive Aminogruppen von Proteinen und dient so dem Nachweis, dass die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgreich war. Sie kann anschließend mit dH₂O komplett wieder ausgewaschen werden.

Nun folgte zunächst eine 90-minütige Inkubation der Membran mit Blocking Solution (5 % Milch, 2 % BSA), die mögliche Bindungsstellen auf der Membran blockiert und so eine unspezifische Bindung der Antikörper verhindert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der jeweiligen Primär-Antikörper (Verdünnung jeweils in 5 % BSA/TBST oder 5 % Milch/TBST, siehe Tabelle 7) und die Inkubation mit diesen über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph).

Am Folgetag wurden alle unspezifisch gebundenen Primär-Antikörper mittels drei Mal 10 Minuten TBST gewaschen und anschließend die mit HRP-gekoppelten Sekundär-

Antikörper zugegeben (Verdünnung siehe Tabelle 7, alle von cell signaling). Nach einer 1-stündigen Inkubation bei RT unter permanentem Schütteln wurden auch die unspezifisch gebundene Sekundär-Antikörper durch einen drei Mal 10-minütigen Waschschrift mit TBST entfernt.

Tabelle 7: Verdünnung Primär- und Sekundär-Antikörper Western Blot

Name	Größe kDa	Host	Verdünnung	Sekundär- AK mit Verdünnung	Her- steller	Bestell- nummer
Asprosin	20	Kaninchen	1:1000 in BSA	anti- Kaninchen 1:1000 in Milch	MyBio- source	MBS76071 59
Fibrillin-1	285	Kaninchen	1:500 in Milch	anti- Kaninchen 1:3000 in Milch	Thermo Fisher Scientific	PA5-99225
GAPDH	37	Kaninchen	1:3000 in BSA	anti- Kaninchen 1:5000 in Milch	Cell Signaling	2118
α - Tubulin	55	Maus	1:5000 in Milch	anti-Maus 1:5000 in Milch	Sigma Aldrich	T9026

3.3.5. Auswertung Western Blot

Die Auswertung der Proteinbanden wurde mit dem ChemiDoc XRS+-System (Bio-Rad) durchgeführt. Anschließend wurde mithilfe der Image Lab Software (Version 4.0.1, Bio-Rad) das Volumen der jeweiligen Banden gemessen und in Bezug zum Volumen der Kontrollladungen GAPDH und α -Tubulin gesetzt.

3.4. qRT-PCR

3.4.1. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden zunächst je 500 µl TriReagent (Sigma-Aldrich) zur Gewebeprobe gegeben, was eine Lyse und Freisetzung der Zellbestandteile bewirken soll. Anschließend wurden die Proben 40 Sekunden lang homogenisiert (Schwingmühle MM400, Retsch) und 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl Chloroform zur Bindung der RNA und nach 15 Sekunden Mischen eine Inkubation bei RT für 3 Minuten. Dann wurden die Proben für 15 Minuten bei 12.000U/min und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Z 216 MK, Hermle), wodurch eine Phasentrennung der Proben in RNA (obere wässrige Phase), DNA (weiße Interphase) und Proteine (untere phenolhaltige Phase) erfolgte. Die RNA wurde jeweils abpipettiert und 250 µl Isopropanol hinzugegeben. Dies bewirkt im Folgenden ein Ausfällen der RNA in Form eines Pellets. Nach erneutem Mischen wurden die Proben für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und bei 15.000 U/min und 4 °C erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Nun wurde das Isopropanol abgekippt und das entstandene RNA-Pellet zweimalig mit 500 µl 75 % EtOH gewaschen, invertiert und 5 Minuten bei 15.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Pellets für 45 Minuten und die Lösung in 30 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-A.d.).

3.4.2. Messung der Reinheit und Konzentration

Die Messung der Reinheit und Konzentration der RNA erfolgte erneut durch das NanoDrop Spektrometer (NanoQuant infinite M200 Pro, Tecan) und die zugehörige Software iControl 2.0. Das zugrundeliegende Prinzip ist die UV-Spektrophotometrie. Dabei wird die Absorption von UV-Licht durch die RNA bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen und daraus die optische Dichte (OD) bestimmt. RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine haben ihres bei 280 nm. Um eine mögliche Verunreinigung der RNA durch Proteine zu detektieren, bildet man daher anschließend den Quotienten aus OD260/OD280. Dieser sollte bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration kann man aus der OD260 berechnen. Eine OD260 von 1 entspricht dabei einer Menge von 40 µg RNA pro ml DEPC A.d..

3.4.3. Umschreiben in cDNA

Da RNA für eine Vervielfältigung und Analyse mittels PCR zu instabil ist, muss diese zunächst noch zu ihrer komplementären DNA (cDNA) umgewandelt werden. Dafür wurde je 1 µg RNA pro Probe verwendet und mit DEPC A.d. auf ein einheitliches Volumen verdünnt.

Es folgte der Verdau von möglichen Resten genomischer DNA durch 1 µl DNase-I-Puffer und 1 µl RNase-free DNase für 15 Minuten bei RT. Zur Beendigung des DNAase-Verdaus wurde anschließend 1 µl 25 mM EDTA als Stop-Solution zu den Proben hinzugefügt und diese für

15 Minuten bei 65 °C inkubiert. Das für die Synthese der cDNA benötigte Enzym ist die Reverse Transkriptase. Diese kann einen DNA-Strang nur verlängern, nicht aber beginnen. Daher werden zusätzlich Primer benötigt, die der Reversen Transkriptase einen Ausgangspunkt für die Synthese der cDNA liefern. Man unterscheidet zwischen Oligo-dT-Primern und Random Primern. Oligo-dT-Primer bestehen aus einer Sequenz von mehreren Thymin-Basen. Diese sind komplementär zu den Adenin-Basen des Poly-A-Schwanzes, den die RNA nach ihrer Transkription zum Schutz vor einem vorzeitigen Abbau durch RNasen erhält. Random Primer hingegen bestehen aus jeweils sechs zufälligen Basen; in der Summe sind alle möglichen Kombinationen dieses Nukleotid-Hexamers vorhanden, wodurch sich an jedem RNA-Strang Bindungsstellen ergeben. Durch Verwendung von sowohl Oligo-dT- als auch Random Primern wird sichergestellt, dass wirklich die gesamte RNA zu cDNA umgewandelt wird.

In diesem Ansatz wurden 0,4 µl Oligo-dT-Primer und 0,6 µl Random Primer verdünnt in 4 µl DEPC A.d. zu den Proben gegeben und für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase (M-MLV, 200 U), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U), 1,25 µl dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid), 5 µl M-MLV-Puffer und 2,25 µl DEPC A.d. und eine Inkubation der Proben für 1 Stunde bei 37 °C. Die entstandene cDNA wurde zum Schluss bei -20 °C eingefroren und gelagert. Die verwendeten Enzyme und Lösungen stammen bis auf den dNTP-Mix (Thermo Fisher Scientific) allesamt von Promega.

3.4.4. Ablauf der qRT-PCR

Zur Untersuchung der cDNA hinsichtlich der Expression verschiedener Gene wurde eine quantitative Real-Time PCR im SYBR-Verfahren durchgeführt. Beim SYBR-Verfahren wird ein SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der sich in doppelsträngige DNA interkaliert. Dadurch erhöht sich die Menge an Fluoreszenzsignal mit zunehmender Amplifikation der DNA. Um zu garantieren, dass eine spezifische Bindung an die zu untersuchenden Gene stattgefunden hat, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurve erstellt. Hierfür wird die amplifizierte DNA zu Einzelsträngen aufgeschmolzen, wodurch das Fluoreszenzsignal wieder abnimmt. Spezifisch amplifizierte DNA hat dabei einen höheren Schmelzpunkt als unspezifisch amplifizierte, was sich in der Schmelzkurve zeigt. Vergleichbar werden die entstehenden Messkurven mithilfe des Ct-Werts. Dabei handelt es sich um den Amplifikationszyklus, bei dem die exponentielle Phase erreicht ist und das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Neben der Amplifizierung der zu untersuchenden Gene erfolgt während der PCR auch eine Quantifizierung der vorhandenen Menge an Genen (daher der Name quantitative real-time PCR, qRT-PCR).

Für die Durchführung der PCRs wurden 10 µl GoTaq Mastermix (Promega), 0,5 µl Primer forward (10 µM), 0,5 µl Primer reverse (10 µM), 1 µl der jeweiligen cDNA und 8 µl dH₂O

gemischt. In dieser Arbeit wurden die Primer für das Fibrillin-1-Gen (*Fbn1*) und als Housekeeping-Gen das β -Actin-Gen (*Actb*) verwendet. Die entsprechenden Primersequenzen finden sich in Tabelle 8, sie stammen allesamt von Eurofins Genomics.

Die Ansätze wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben und anschließend für 3 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge Rotina 420R, Hettich). Dann folgte die PCR nach dem folgenden Schema: zunächst 2 Minuten bei 50 °C, dann 10 Minuten bei 95 °C, anschließend 40 Zyklen lang je 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °. Im Anschluss erfolgte eine erneute Erhitzung und dadurch Aufschmelzung der DNA bei 95 °C für 15 Sekunden. Das verwendete Gerät war das 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), mit der dazugehörigen Software 7500 Software v2.0.6 (Life Technologies).

Tabelle 8: Primer-Sequenzen qt-RT-PCR, ACTB = β -Actin, FBN1 = Fibrillin-1

ACTB for	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
ACTB rev	GCCACCGATCCACACAGAGT
FBN1 for	GGTCAATGCAACGATCGAAA
FBN1 rev	AGTGTGACAAAGGCAGTAGAAGCTT

3.4.5. Auswertung qRT-PCR

Zur Auswertung wurden abschließend die gemessenen Ct-Werte von *Fbn-1* auf die Ct-Werte des gleichmäßig exprimierten Haushaltsgens β -Actin normiert. Mit dieser $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wurde die relative Genexpression in Excel berechnet ⁵⁴.

3.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der GraphPad Prism Software (v. 9.0) durchgeführt. Bei einer Probenanzahl von mehr als $n = 8$ wurde zunächst überprüft, ob die Daten normalverteilt waren. Hierfür wurde der D'Agostinos K^2 -Test angewandt. Falls die Daten einer Normalverteilung folgten, wurde im Folgenden eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt, und im Anschluss ein ungepaarter T-Test. Falls die Daten nicht normalverteilt waren, wurde ein Kruskal-Wallis-Test angewandt, gefolgt von einem Mann-Whitney-U-Test. Beim Vergleich von verschiedenen Zeitpunkten wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) durchgeführt, an welche sich ein ungepaarter T-Test anschloss.

Als statistisch signifikant wurden die Ergebnisse wie folgt definiert: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Alle Daten sind dabei als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben.

4. Ergebnisse

4.1. Vorarbeiten: Mausmodell

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten und Ergebnisse wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Thorben Hoffmann durchgeführt und sind nicht Teil der hier beschriebenen Promotionsleistung. Zum besseren Verständnis der eigenen Ergebnisse werden sie hier dennoch gezeigt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Übergewicht und Sport auf das BAT und die Asprosinlokalisierung und -expression wurde ein Mausmodell aus drei Gruppen entwickelt. Die SD-Gruppe und die RUN-Gruppe bekamen eine Standarddiät mit 9 kJ% Fett und 67 kJ% Kohlenhydraten, die DIO-Gruppe eine Western-Style-Diät mit 45 kJ% Fett und 35 kJ% Kohlenhydraten. Die RUN-Gruppe hatte zusätzlich von Tag P42 bis P70 jederzeit Zugang zu einem Laufrad im Käfig, auf welchem sie insgesamt eine durchschnittliche Laufrate von 8,75 km/Tag zurücklegten. Es zeigte sich dabei über die Zeit eine signifikante Gewichtszunahme in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe und gegen Ende auch ein signifikant geringeres Gewicht in der RUN-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe (siehe Abbildung 4).

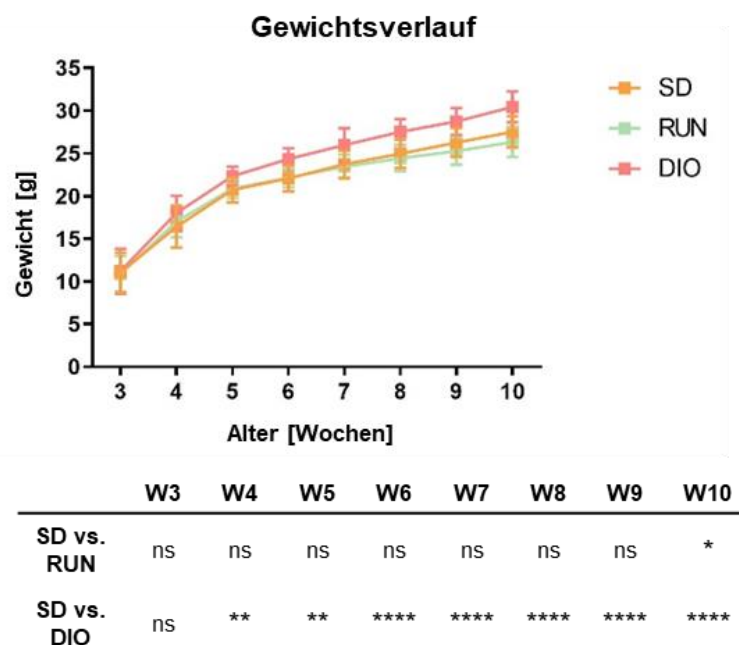


Abbildung 4: Absolutes Körpergewicht in Gramm abhängig vom Alter in Wochen in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Zur statistischen Auswertung wurden eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) und im Anschluss ein ungepaarter T-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich ein signifikant vermindertes Gewicht ab Woche 10 in der RUN-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe sowie ein signifikant erhöhtes Gewicht in der DIO-Gruppe ab Woche 4.

Trotzdem war die Nahrungsaufnahme in der DIO-Gruppe vermindert. Die am letzten Tag (P70) in Kilokalorien gemessene Nahrungsaufnahme war in der DIO-Gruppe tendenziell vermindert, die in Gramm gemessene Nahrungsaufnahme sogar signifikant (siehe Abbildung 5).

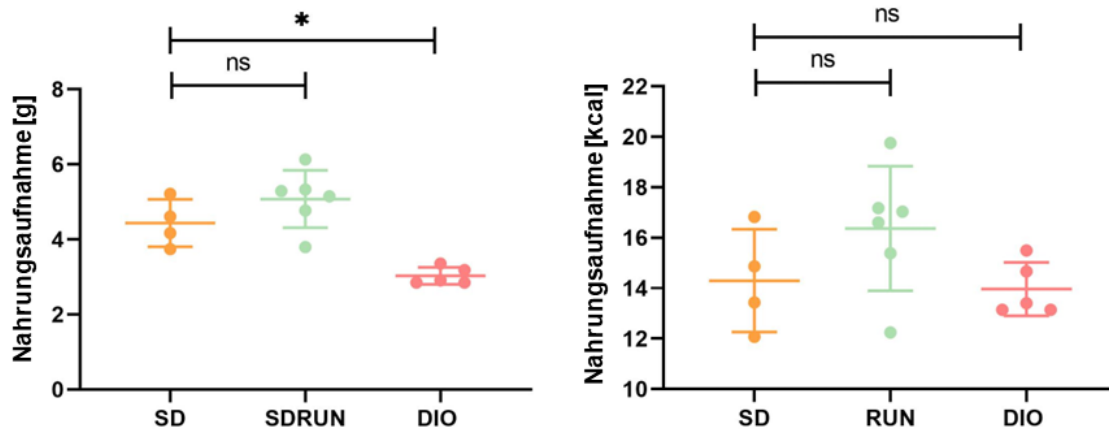


Abbildung 5: Nahrungsaufnahme in Gramm und in Kilokalorien in den drei Gruppen SD, RUN und DIO an Tag P70. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigte sich eine signifikant geringere Nahrungsaufnahme in Gramm gemessen in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe sowie eine tendenziell ebenfalls verminderte Nahrungsaufnahme in Kilokalorien in der DIO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe.

Ein an Tag P56 nach 6h Fasten durchgeführter Glukosetoleranztest ergab zudem signifikant erhöhte Blutglukosewerte in der DIO-Gruppe 30 und 60 Minuten nach Start des Tests verglichen mit der SD-Gruppe (siehe Abbildung 6).

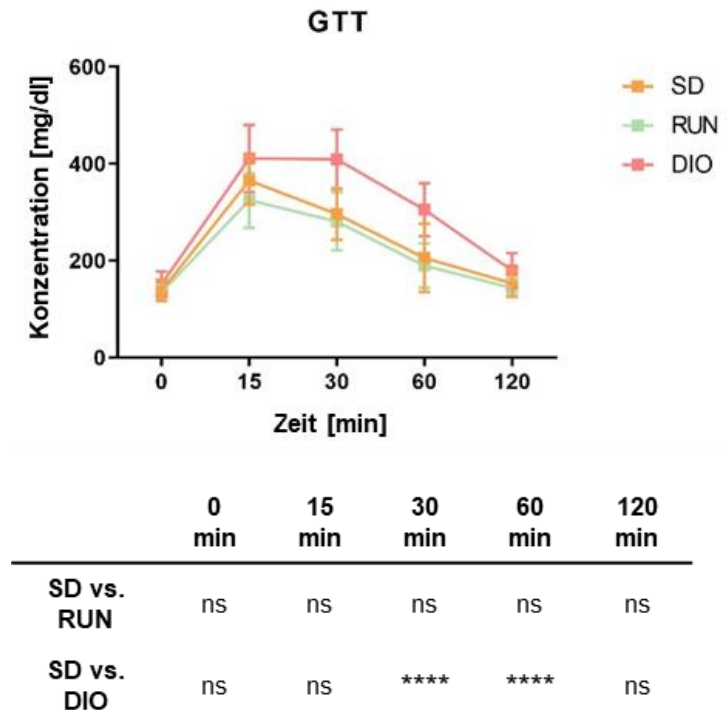


Abbildung 6: Glukosetoleranztests (GTT) mit den jeweiligen Blutglukosekonzentrationen über der Zeit in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Hierfür wurden an Tag P65 nach 6 h Fasten 2 g/kg Glukose verabreicht und die Blutglukose in mg/dl nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten gemessen. Zur statistischen Auswertung wurden eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) und im Anschluss ein ungepaarter T-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Glukosekonzentration in der DIO-Gruppe 30 und 60 Minuten nach Verabreichung im Vergleich zur SD-Gruppe.

4.2. Morphologie des BAT

Um einen Überblick über die Struktur des BAT zu erhalten, wurde eine H&E-Färbung durchgeführt. Für eine zusätzliche übersichtliche Aussage über die Anordnung von Kollagenfasern im BAT wurde diese noch durch eine Picrosirius Red-Färbung ergänzt (siehe Abbildung 7). Im Vergleich zeigten die beiden Färbungen morphologisch deutliche Unterschiede zwischen den drei Mausmodell-Gruppen. Die Fetttröpfchen der RUN-Gruppe erschienen kleiner als die der SD und DIO-Gruppe. In der DIO-Gruppe wirkten die Tröpfchen insgesamt aufgelockerter, weniger strukturiert und mehr wie einzelne große Tropfen.

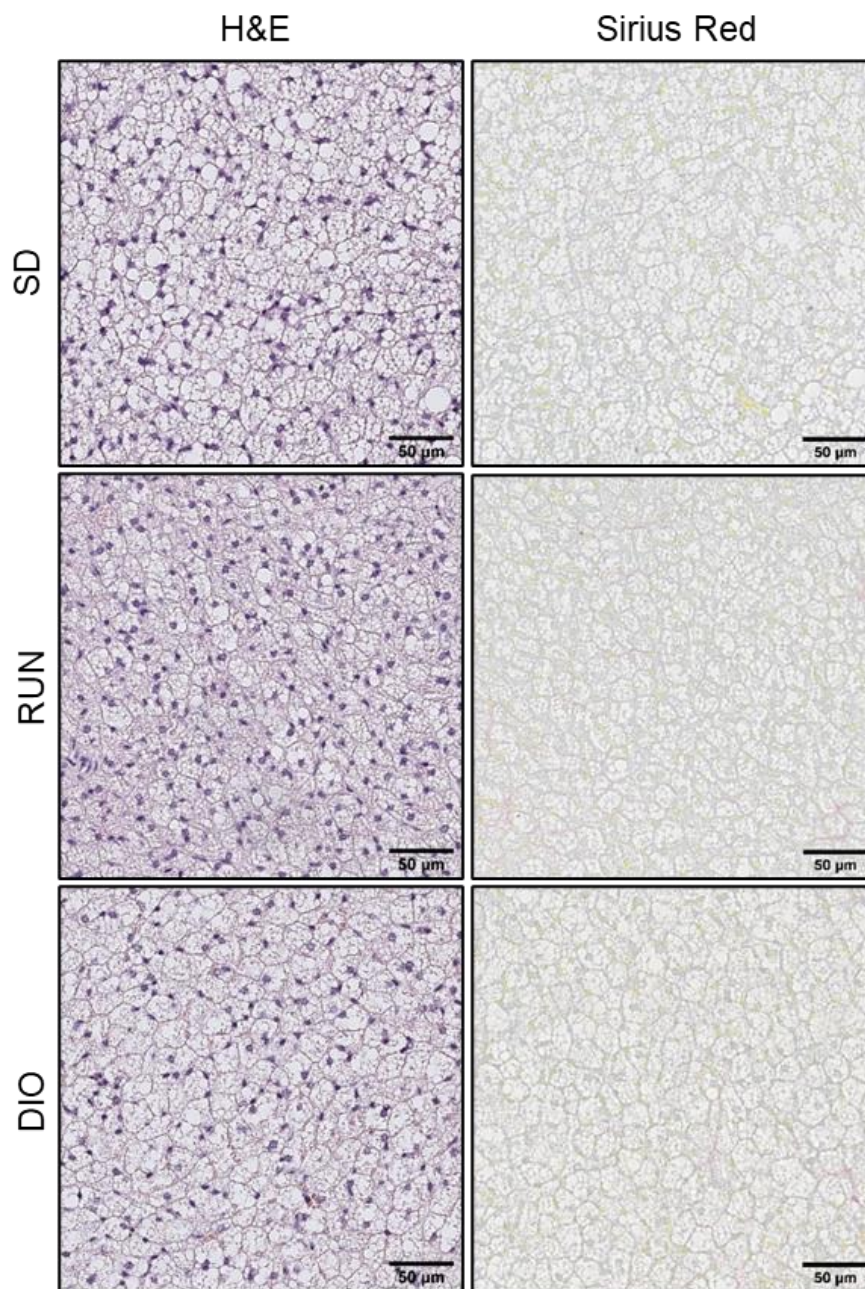


Abbildung 7: Übersicht über die BAT-Morphologie und die braunen Adipozyten anhand histologischer Färbungen (links H&E, rechts Sirius-Red) in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigten sich morphologisch kleinere Fetttröpfchen in der RUN-Gruppe und eine aufgelockerte Struktur mit eher univakuolär erscheinenden Fetttröpfchen in der DIO-Gruppe. Die Sirius-Red-Färbung zeigte wenige bis keine Kollagenfasern rund um die braunen Adipozyten.

Kollagenfasern präsentierten sich vor allem rund um die Blutgefäße, außerdem waren sie in den Lappengrenzen vorhanden. Zwischen den einzelnen Adipozyten selbst fanden sich eher wenige bis keine Kollagenfasern (siehe Abbildung 8).

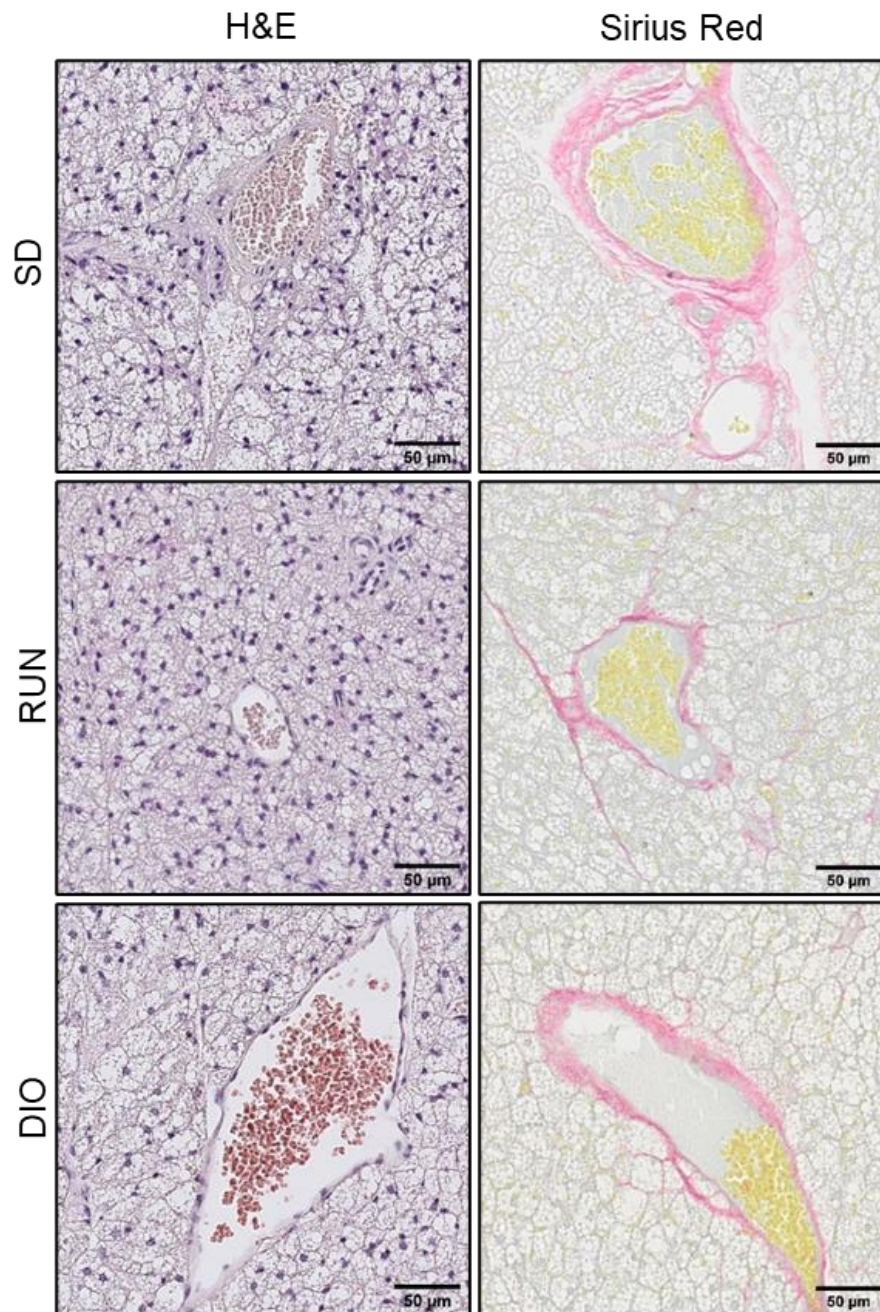


Abbildung 8: Darstellung von Blutgefäßen innerhalb des BATs anhand histologischer Färbungen (links H&E, rechts Sirius-Red) in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. In der Sirius-Red-Färbung zeigte sich eine Anfärbung von Kollagenfasern rund um die Blutgefäße und entlang von Lappengrenzen.

Die statistische Auswertung der Größe der Fetttropfen bestätigte einen signifikanten Unterschied zwischen der SD- und der RUN-Gruppe mit durchschnittlich $76.06 \mu\text{m} \pm 0.079$ in SD und $64.44 \mu\text{m} \pm 0.057$ in RUN ($p < 0.01$) (siehe Abbildung 9). Zwischen der SD- und DIO-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($76.06 \mu\text{m} \pm 0.079$ vs. 73.73 ± 0.064), es blieb beim morphologisch erscheinenden Unterschied.

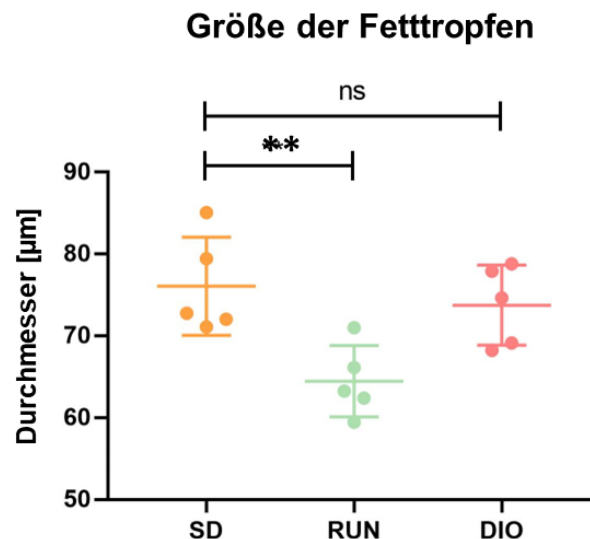


Abbildung 9: Quantitative Auswertung der Größe der Fetttropfen. Dargestellt ist die Fetttropfengröße in μm in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigte sich ein signifikant geringerer Durchmesser der Fetttropfen in der RUN-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe ($64.44 \mu\text{m} \pm 0.057$ vs. $76.06 \mu\text{m} \pm 0.079$).

4.3. Lokalisation von Asprosin im BAT

Um das Vorkommen von Asprosin im BAT genauer zu klassifizieren und seine Lokalisation im Gewebe zunächst morphologisch zu eruieren, wurden mehrere Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich zunächst, dass Asprosin vor allem rund um die Gefäße des BAT vorhanden war. Auch im Gewebe zeigte sich eine leichte Färbung, jedoch im Vergleich deutlich weniger intensiv als perivaskulär.

4.3.1. Lokalisation in den Gefäßen

Asprosin zeigte eine primäre Färbung rund um die Blutgefäße (siehe Abbildung 10). Zur Quantifizierung der Intensität der Färbung wurde diese vergleichend einmal in Relation zur Anzahl an Zellkernen und einmal in Relation zur Fläche des Gefäßes gesetzt. Diese Intensitäten wurden jeweils zwischen den drei Gruppen verglichen (siehe Abbildung 11). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine tendenziell stärkere Intensität in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe und eine geringere Intensität in der RUN-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe. Beim Anzeigen dieser Tendenzen schien es auch keinen Unterschied zu machen, ob die Färbeintensität auf die Gefäßfläche oder auf die Anzahl an Zellkernen bezogen wurde.

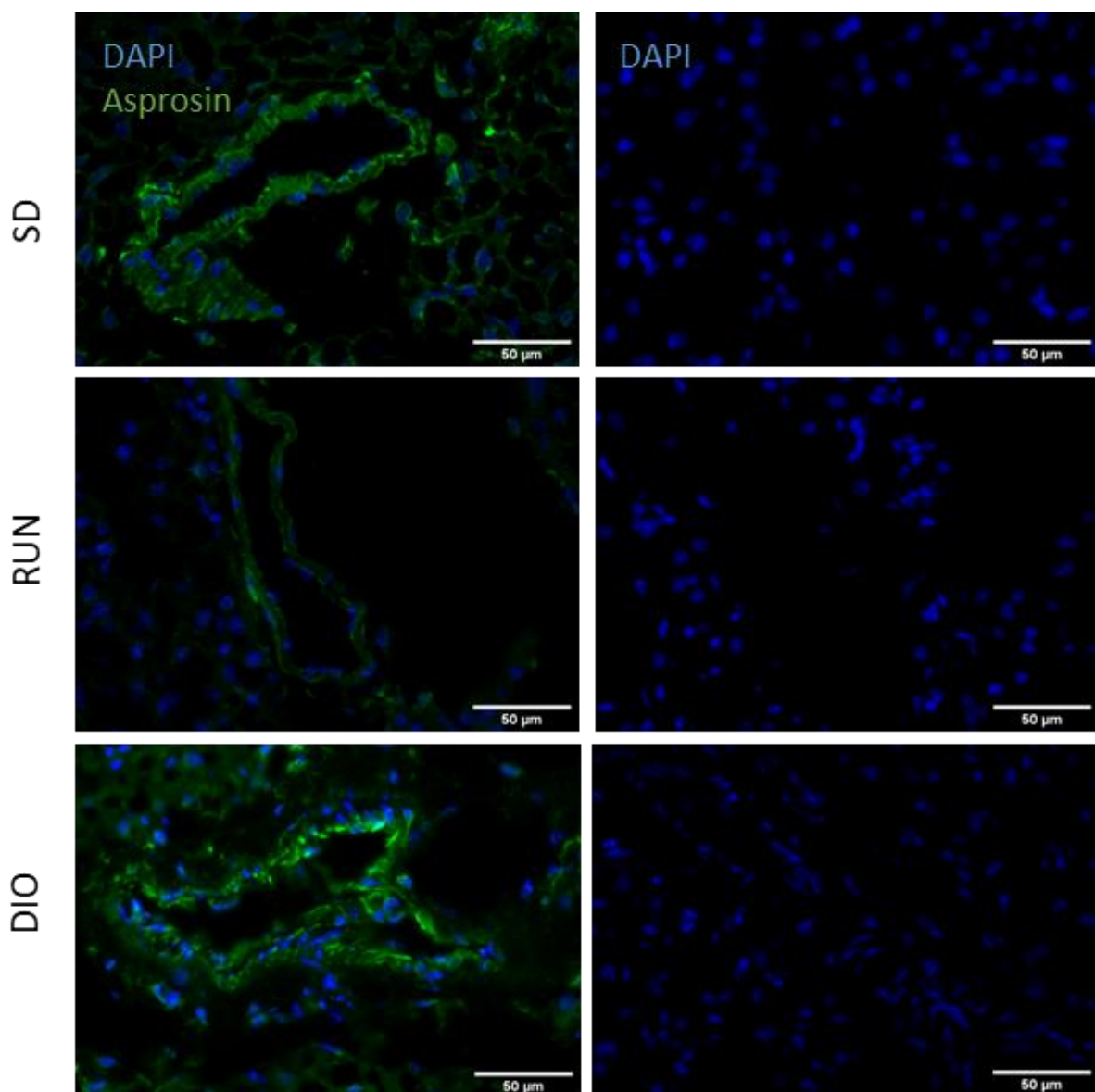


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Asprosin in Blutgefäßen des BAT in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO sowie Negativkontrollen wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich eine primäre Färbung rund um die Blutgefäße im Vergleich zum restlichen Gewebe.

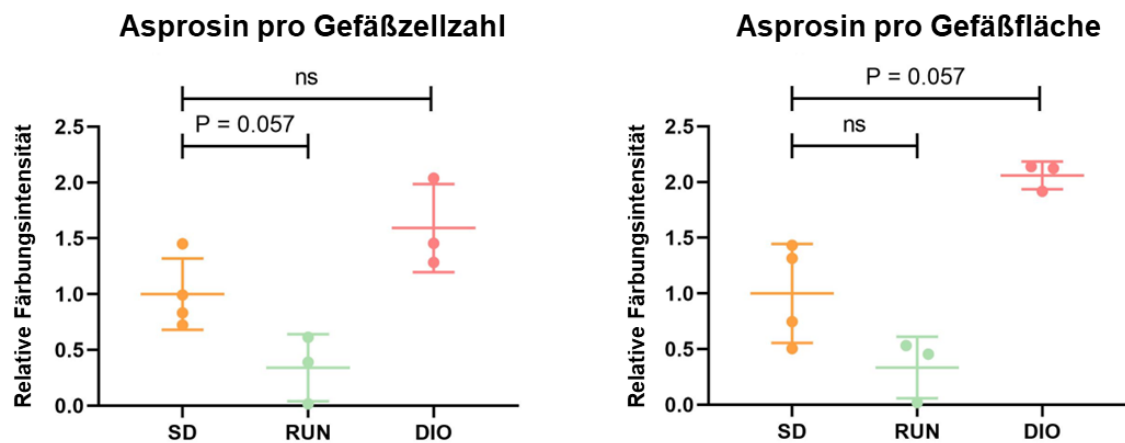


Abbildung 11: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Asprosin an den Blutgefäßen im BAT. Mithilfe von QuPath wurde hierfür die Färbungsintensität jeweils auf die Zellzahl und die Gesamtfläche der Gefäße normiert. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch leichte Tendenzen zu einer verminderten Färbungsintensität in der RUN-Gruppe und einer erhöhten Färbungsintensität in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

Da sich die deutlichste Färbung von Asprosin rund um die Gefäße präsentierte, wurden zur genaueren Lokalisation von Asprosin im Gefäß Co-Färbungen mit vaskulären Markern durchgeführt. Diese waren zum einen der endotheliale Marker CD-31 und zum anderen der mesenchymale Marker α -SMA (siehe Abbildung 12). Hierbei zeigte sich in der Co-Färbung mit CD-31 eine deutliche Überlappung mit Asprosin. In der Co-Färbung mit α -SMA zeigte sich jedoch keine Überlappung. Daraus folgerten wir eine Lage von Asprosin in der Tunica intima des Gefäßes und nicht in der Tunica media.

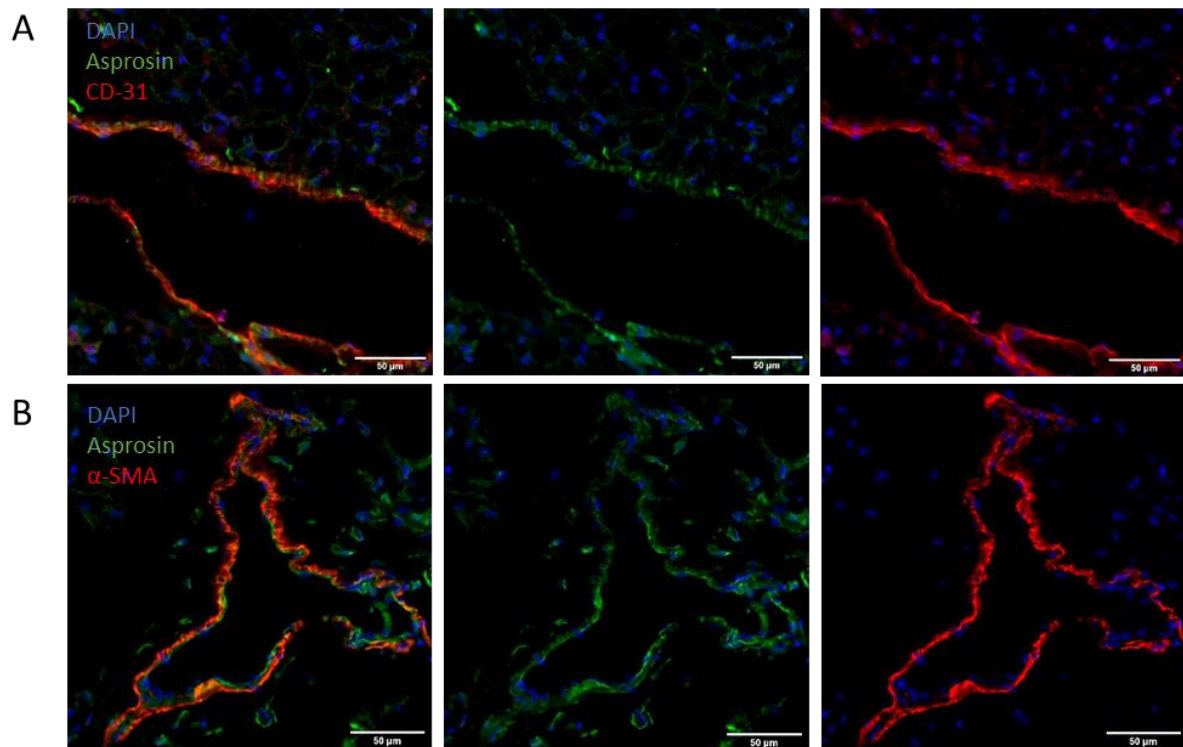


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung von Asprosin in Blutgefäß des BAT in 40-facher Vergrößerung und Co-Färbung mit vaskulären Markern. (A) Co-Färbung mit dem endothelialen Marker CD-31. (B) Co-Färbung mit dem mesenchymalen Marker α -SMA. Die Bilder wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich eine deutliche Überlappung von Asprosin mit dem endothelialen Marker CD-31, jedoch keine Überlappung mit dem mesenchymalen Marker α -SMA. Asprosin ist somit in der Tunica intima des Gefäßes vorhanden und nicht in der Tunica media.

4.3.2. Lokalisation im Gewebe

Zuletzt wurde die Asprosin-Färbung im Gewebe ausgewertet. Morphologisch konnte man hier eine im Vergleich zur Gefäßfärbung deutlich schwächere Intensität der Färbung erkennen, welche bei höherer Vergrößerung jedoch ebenfalls deutlich sichtbar war (siehe Abbildung 13). Auch hier wurde die Intensität der Färbung sowohl in Relation zur Fläche als auch in Relation zur Zellkernanzahl gesetzt (siehe Abbildung 14). Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Es ließ sich jedoch im Vergleich zur SD-Gruppe die Tendenz einer verstärkten Intensität sowohl in der RUN- als auch der DIO-Gruppe beobachten.

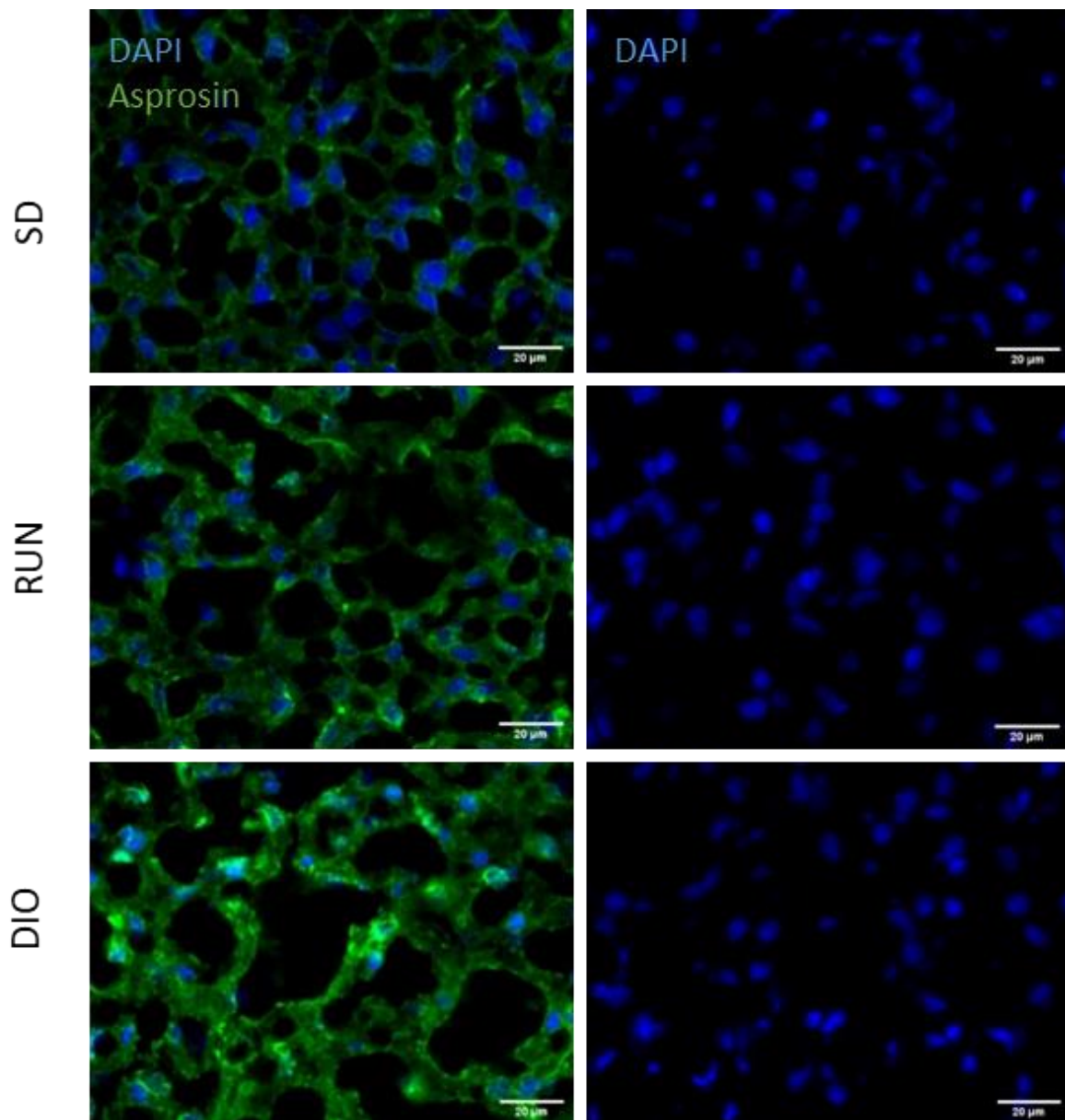


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von Asprosin in BAT-Gewebe in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO sowie Negativkontrollen wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich eine primär intrazelluläre Färbung im Zytosol sowie perinukleär.

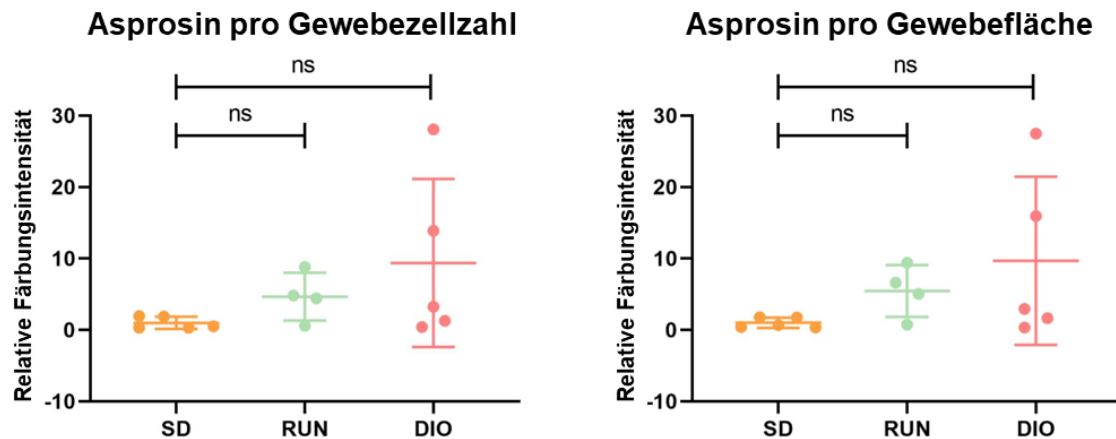


Abbildung 14: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Asprosin im BAT-Gewebe. Mithilfe von QuPath wurde hierfür die Färbungsintensität jeweils auf die Zellzahl und die Gesamtfläche des Gewebes normiert. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch leichte Tendenzen zu einer erhöhten Färbungsintensität sowohl in der RUN-Gruppe als auch in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

4.4. Lokalisation von Fibrillin-1 im BAT

Da Asprosin ein Spaltprodukt von Profibrillin-1 ist, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen von Fibrillin-1 durchgeführt. Diese zeigten ebenfalls ein Vorliegen von Fibrillin-1 rund um die Blutgefäße des BAT. Zusätzlich war auch eine Färbung des BAT selbst zu sehen, und zwar vor allem in Form langer gleichmäßiger Fasern, die sich durch das gesamte Gewebe zogen.

4.4.1. Lokalisation in den Gefäßen

Bei Färbung der Gefäße war deutlich zu sehen, dass diese über die Tunica intima als innerste Gefäßschicht hinausging (siehe Abbildung 15). Auch in der Fibrillin-1-Färbung erfolgte eine quantitative Auswertung der Färbeintensität. Hierfür wurde diese erneut jeweils auf die Gefäßfläche und auf die Anzahl an Zellkernen bezogen (siehe Abbildung 16). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied, jedoch wie schon bei Asprosin eine Tendenz zu einer geringeren Färbeintensität in der RUN-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe und einer teilweise erhöhten Intensität in der DIO-Gruppe.

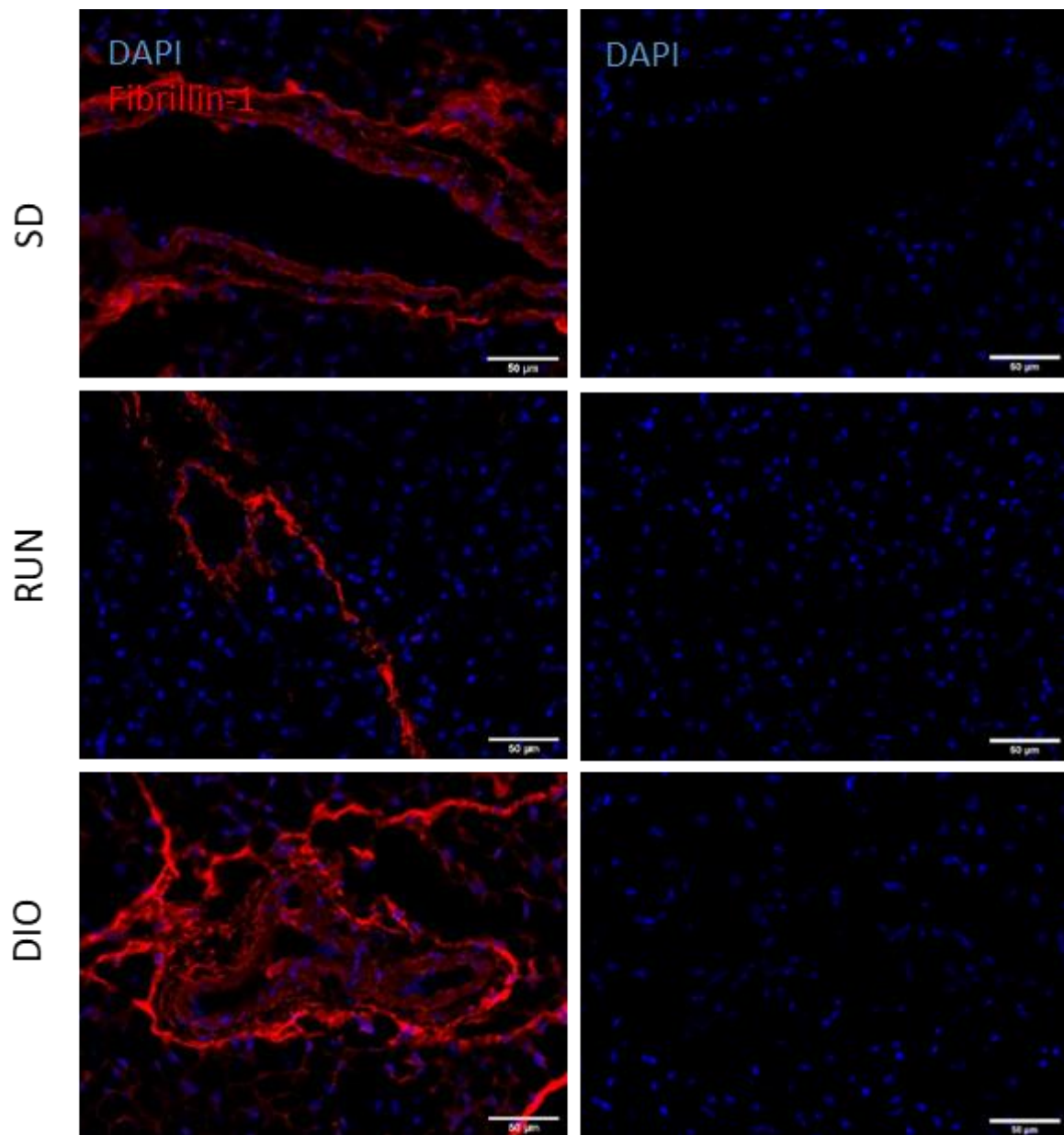


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 in Blutgefäßen des BAT in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO sowie Negativkontrollen wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich eine Färbung rund um die Gefäße, welche über die Tunica intima hinausging.

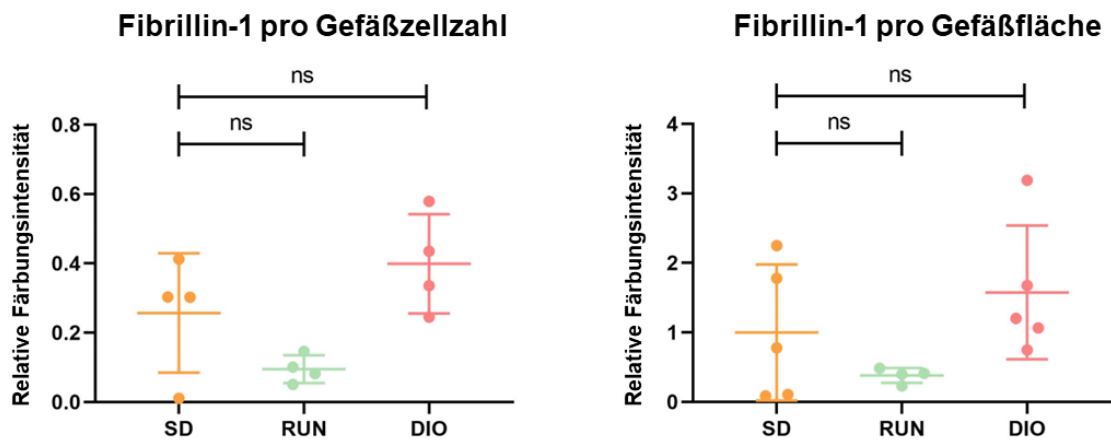


Abbildung 16: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 an den Blutgefäßen im BAT. Mithilfe von QuPath wurde hierfür die Färbungsintensität jeweils auf die Zellzahl und die Gesamtfläche der Gefäße normiert. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch leichte Tendenzen zu einer verminderten Färbungsintensität in der RUN-Gruppe und einer erhöhten Färbungsintensität in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

4.4.2. Lokalisation im Gewebe

Bei Betrachtung der Färbung des Gewebes fielen zunächst die langen Fasern durch das Gewebe, entlang von Läppchengrenzen und am Rande des BAT auf (siehe Abbildung 17). Auch rund um die Adipozyten zeigte sich eine leichte Färbung (siehe Abbildung 19). Es erfolgte erneut eine quantitative Auswertung dieser Färbungen. Zunächst wurde die Intensität ausgewählter identisch großer ROIs entlang der Läppchenfärbung auf die gemessene Gesamtfläche der ROIs normiert (siehe Abbildung 18). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, jedoch erneut eine leichte Tendenz zu einer teilweise verminderten Färbungsintensität in der RUN- und einer erhöhten Intensität in der DIO-Gruppe.

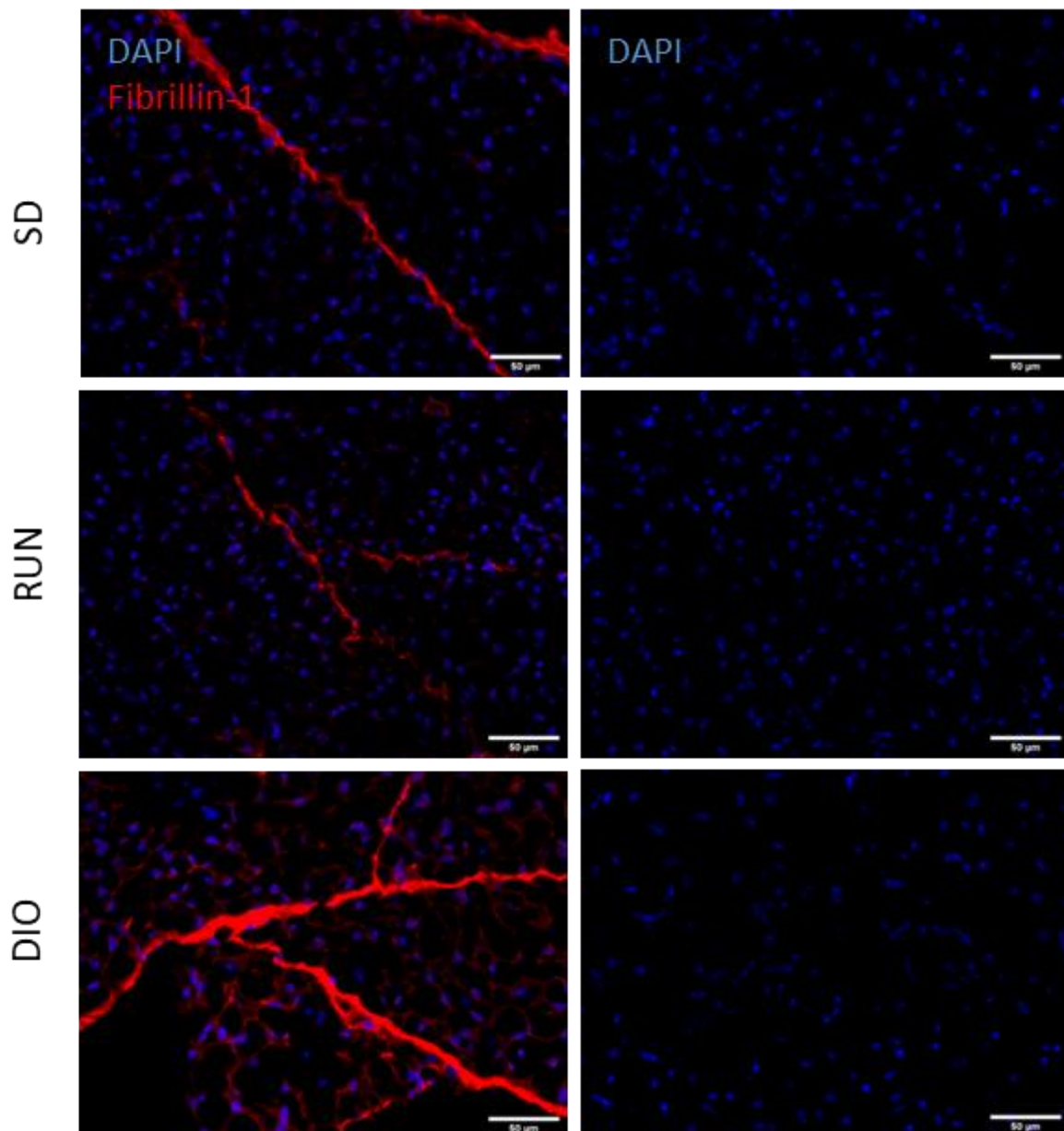


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 entlang von Läppchengrenzen des BAT in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO sowie Negativkontrollen wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich eine Färbung in Form von langen Fasern durch das Gewebe, am Rand des Gewebes und entlang von Läppchengrenzen.

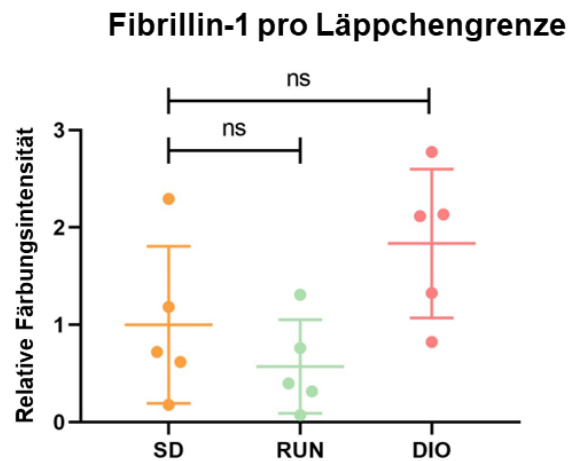


Abbildung 18: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 an den Läppchengrenzen im BAT. Mithilfe von QuPath wurde hierfür die Färbungsintensität zufällig gesetzter ROIs an den Läppchen jeweils ins Verhältnis zur Gesamtfläche der ROIs gesetzt. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch leichte Tendenzen zu einer verminderten Färbungsintensität in der RUN-Gruppe und einer erhöhten Färbungsintensität in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

Im Folgenden wurde die Intensität ausgewählter identisch großer ROIs im Gewebe auf die gemessene Gesamtfläche der ROIs bezogen und daraus eine quantitative Analyse der Gewebefärbung von Fibrillin-1 erstellt (siehe Abbildung 20). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, aber eine Tendenz zu einer verstärkten Färbung in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD- und RUN-Gruppe.

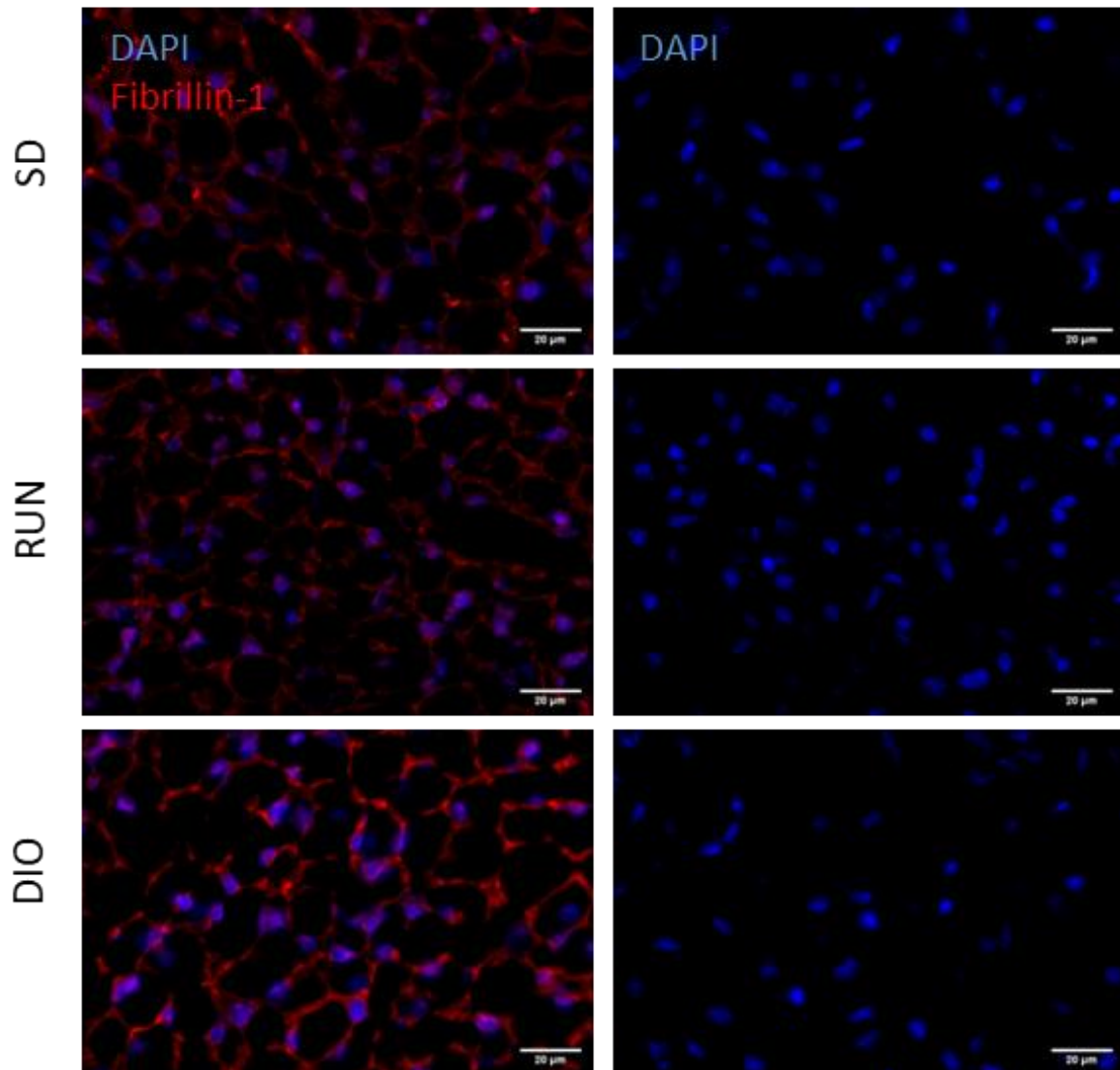


Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 im Gewebe des BAT in 40-facher Vergrößerung. Repräsentative Beispielbilder der drei Gruppen SD, RUN und DIO sowie Negativkontrollen wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Es zeigte sich primär eine Färbung extrazellulär rund um die braunen Adipozyten.

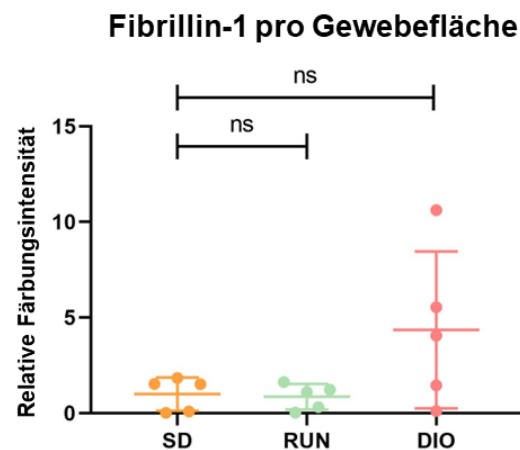


Abbildung 20: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 im Gewebe des BAT. Mithilfe von QuPath wurde hierfür die Färbungsintensität zufällig gesetzter ROIs im Gewebe jeweils ins Verhältnis zur Gesamtfläche der ROIs gesetzt. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch eine tendenziell erhöhte Färbungsintensität in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

4.5. Vergleich Lokalisation von Asprosin und Fibrillin-1 im BAT

Im direkten Vergleich der beiden Proteine Asprosin und Fibrillin-1 zeigten sich Unterschiede sowohl in der Färbung der Gefäße als auch in der Färbung des Gewebes (siehe Abbildung 21). Am Gefäß war Asprosin wie bereits erwähnt vor allem in der Tunica intima vorhanden, wohingegen Fibrillin-1 deutlich darüber hinausging. Auch imponierte die Form der Färbung unterschiedlich, bei Asprosin eher ordentlich und sauber abgrenzbar, bei Fibrillin-1 mit etwas weniger Struktur, weniger deutlich abgrenzbar und etwas faseriger. Ein Vergleich der quantitativen Färbungsintensität in den Gefäßen bei Asprosin und Fibrillin-1 ergab bei beiden zumindest eine tendenziell verminderte Färbung in der RUN-Gruppe und eine verstärkte Färbung in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe (siehe Abbildungen 11 und 16). Schaute man sich die Färbung des Gewebes an, war Asprosin hier eher schwächer vertreten, während Fibrillin-1 deutlich als lange Fasern quer durch das gesamte Gewebe zog. Bei genauerer Betrachtung des Gewebes und in höherer Vergrößerung sah man auch bei Asprosin eine Färbung (siehe oben, Abbildung 13). Diese war am deutlichsten rund um die Zellkerne und an einzelnen Stellen auch im Zytosol der braunen Adipozyten sichtbar. In dieser Vergrößerung sah man auch bei Fibrillin-1 eine Färbung innerhalb des Gewebes (siehe oben, Abbildung 19). Diese ähnelte von der Form sehr den einzelnen Adipozyten des BAT, umgab diese also wie ein Gerüst. Im Vergleich der beiden Gewebefärbungen von Asprosin und Fibrillin-1 fiel bei beiden zumindest eine leichte Tendenz zu einer verstärkten Intensität der Färbung in der DIO-Gruppe auf (siehe oben, Abbildungen 14 und 20).

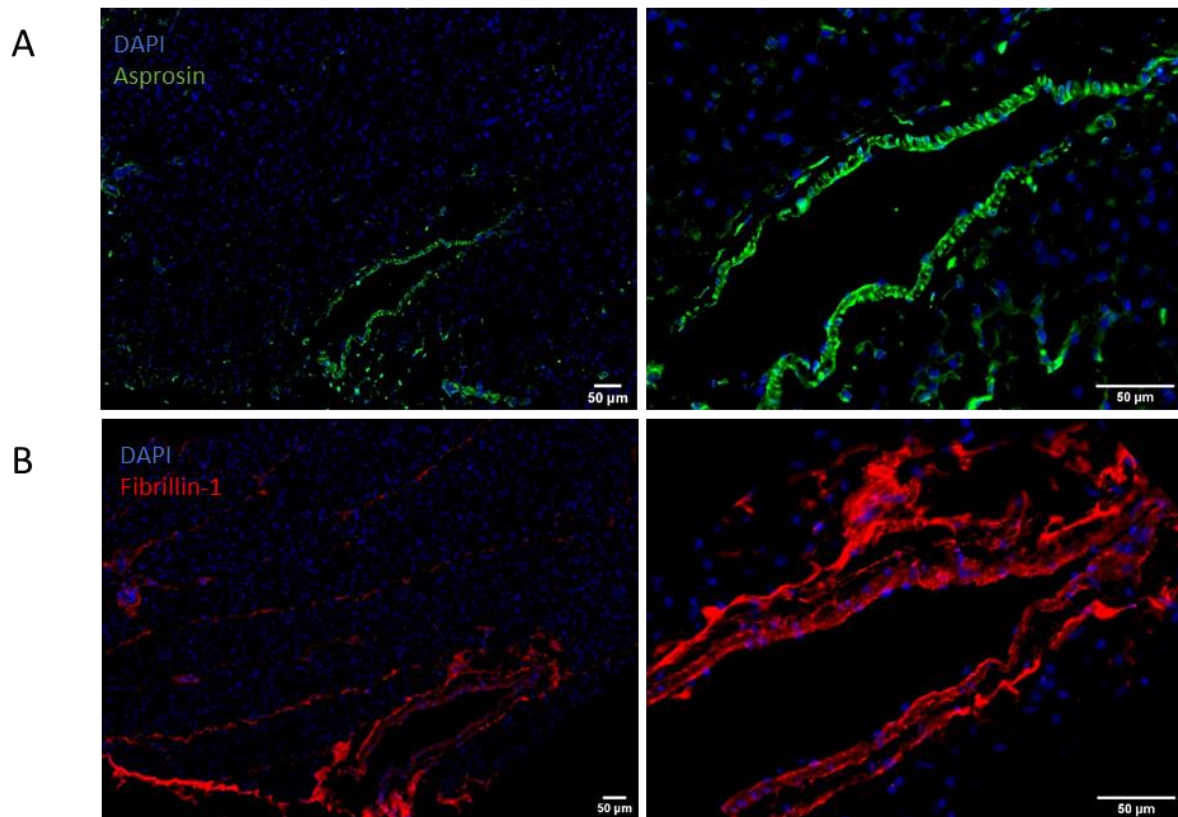


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Immunfluoreszenzfärbungen von (A) Asprosin und (B) Fibrillin-1 im BAT mit Fokus auf Gefäße und Läppchengrenzen in 10- und 40-facher Vergrößerung. Die Bilder wurden mithilfe der QuPath und ImageJ Software erstellt. Sowohl Asprosin als auch Fibrillin-1 zeigten eine deutliche Färbung rund um die Blutgefäße, Asprosin entlang der Tunica intima, Fibrillin-1 darüber hinaus. Im Gewebe selbst zeigte Asprosin eine schwächere Färbung, welche primär intrazellulär und perinukleär ausgeprägt war. Fibrillin-1 dagegen präsentierte sich in Form langer Fasern und extrazellulär rund um die braunen Adipozyten.

4.6. Expression von Asprosin auf Proteinebene

Um nicht nur morphologische und semiquantitative Aussagen zur Präsenz von Asprosin und Fibrillin-1 im BAT zu erhalten, wurden im nächsten Schritt die Proteine isoliert und das Gewebe mithilfe von Western Blots auch auf Proteinebene analysiert. Hier zeigte sich bei Asprosin eine signifikant erhöhte Proteinexpression in der DIO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe ($p < 0.01$). Kein signifikanter Unterschied war zwischen der RUN- und der SD-Gruppe zu beobachten, jedoch tendenziell eine leichte Erhöhung auch in der RUN-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe (siehe Abbildung 22).

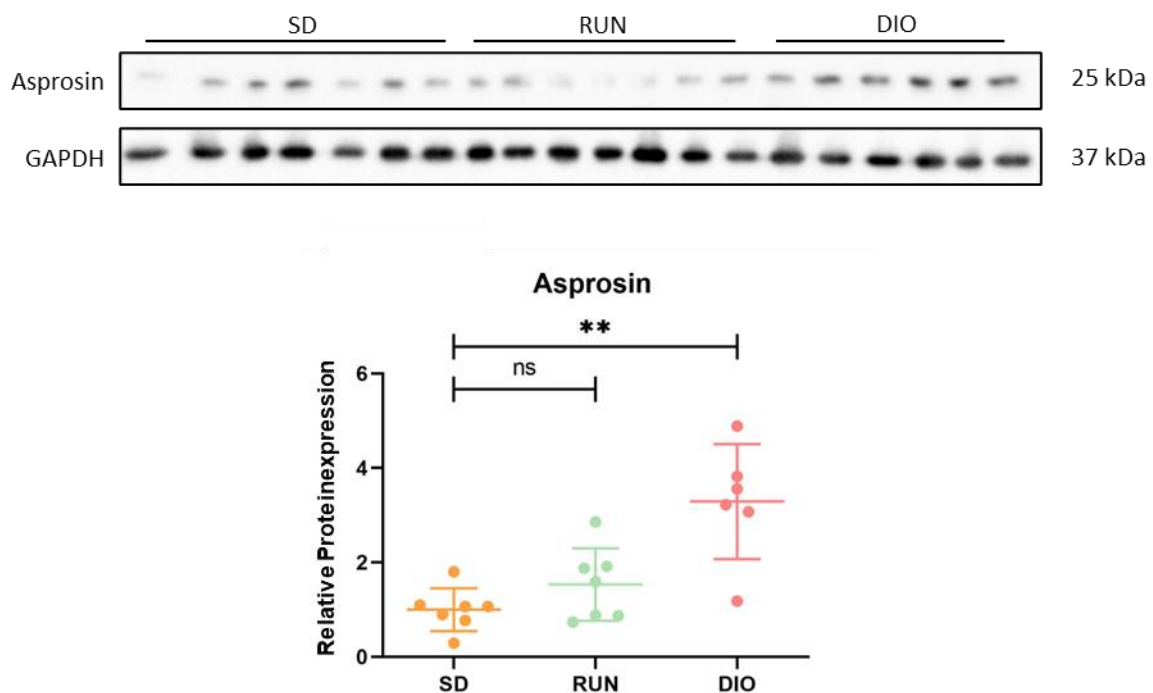


Abbildung 22: Asprosinexpression im Western Blot in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH verwendet. Zur quantitativen Auswertung der relativen Proteinexpression von Asprosin wurde mithilfe der ImageLab Software das Volumen der Banden von Asprosin auf das Volumen der Banden von GAPDH normiert. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinexpression in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

4.7. Expression von Fibrillin-1 auf Proteinebene

In der Analyse von Fibrillin-1 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Tendenziell gab es eine Verminderung in der RUN- und DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe (siehe Abbildung 23).

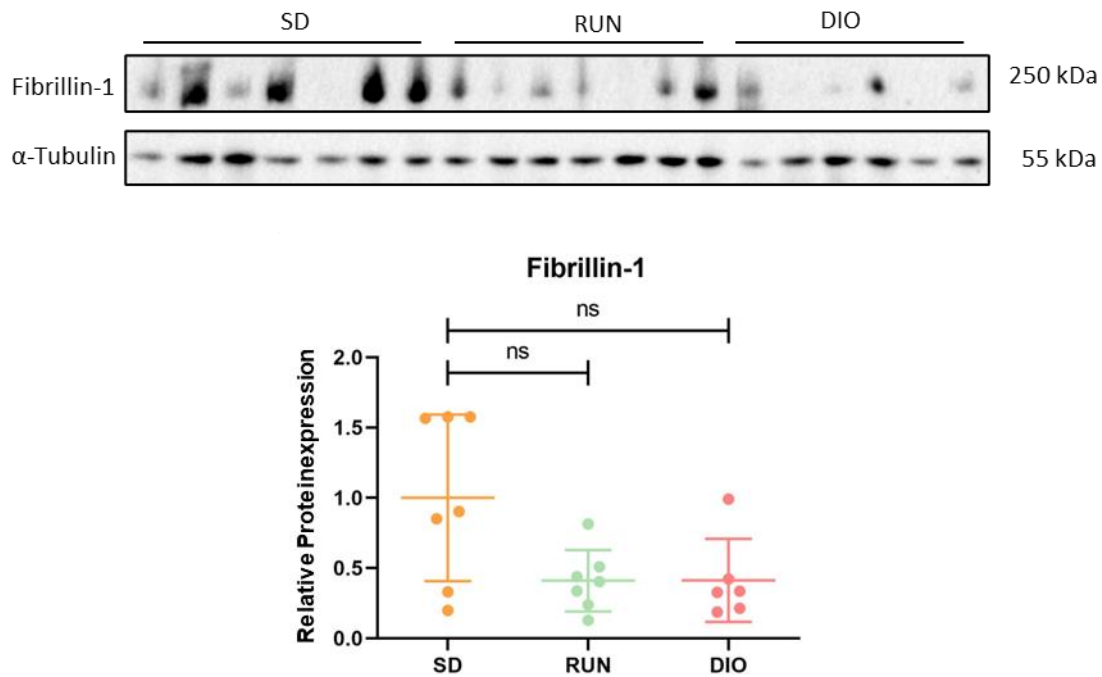


Abbildung 23: Fibrillin-1-Expression im Western Blot in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Als Ladungskontrolle wurde α-Tubulin verwendet. Zur quantitativen Auswertung der relativen Proteinexpression von Asprosin wurde mithilfe der ImageLab Software das Volumen der Banden von Fibrillin-1 auf das Volumen der Banden von α-Tubulin normiert. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch eine leichte Tendenz einer verminderten Proteinexpression in der RUN- und DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe.

4.8. Expression von Fibrillin-1 auf Genebene

Da Asprosin als Spaltprodukt von Profibrillin-1 entsteht, wurde zuletzt noch die Expression auf Genebene betrachtet und hierfür das *Fbn1*-Gen untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied und auch keine Tendenz zwischen den drei Gruppen (siehe Abbildung 24).

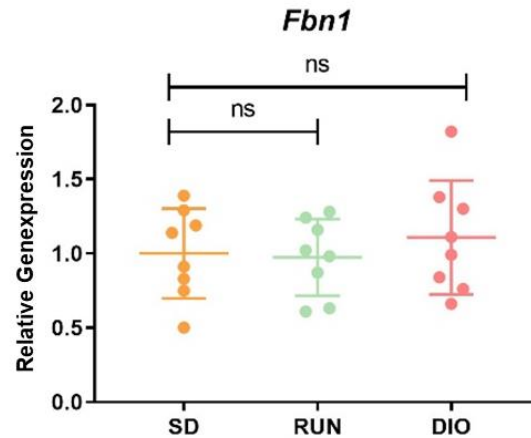


Abbildung 24: Fibrillin-1-Expression in der qPCR in den drei Gruppen SD, RUN und DIO. Zur quantitativen Auswertung der relativen Genexpression von Fibrillin-1 wurden die gemessenen Ct-Werte von Fibrillin-1 auf die des Haushaltsgens β -Actin normiert und mithilfe der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode die relative Genexpression berechnet. Zur statistischen Analyse wurden ein Kruskal-Wallis-Test und im Anschluss ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns = nicht signifikant). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den potenziellen Einfluss von Übergewicht und Sport auf die Lokalisation und Expression des neu entdeckten Adipokins Asprosin im BAT zu klären. Hierfür wurde ein Mausmodell entwickelt, das die entsprechenden metabolischen Interventionen durch Nahrung und Sport bewirkte. Da Asprosin zusammen mit dem ECM-Protein Fibrillin-1 aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein Profibrillin-1 entsteht ³⁵, betrachteten wir zur Klärung der Frage nach Asprosin auch Fibrillin-1 auf Gen- und Proteinebene sowie im Gewebe. Der Einfluss von Übergewicht und Sport auf das BAT selbst wurde übersichtsweise anhand von Färbungen beleuchtet. Im Folgenden sollen die initial vorgestellten Fragestellungen der Reihe nach beantwortet und diskutiert werden.

5.1. Lokalisation von Asprosin im BAT

Immunfluoreszenzfärbungen von Asprosin zeigten sowohl im BAT-Gewebe selbst als auch in den Blutgefäßen des BAT ein Signal, wobei es in letzteren deutlich intensiver ausgeprägt war. Auch die direkte Messung der Gesamtmenge Asprosin in Western Blot Analysen ergab den Nachweis von Asprosin. Daraus lässt sich zunächst einmal schließen, dass Asprosin tatsächlich im BAT lokalisiert ist. Ob das BAT dabei selbst Asprosin produziert, oder ob es über das Blut ins Gewebe transportiert wird, ist nicht ganz klar und erfordert weitere Untersuchungen. Bei genauerer Betrachtung der Asprosinfärbung der Blutgefäße durch Co-Färbungen mit endothelialen und mesenchymalen Markern ergab sich jedoch zumindest, dass Asprosin insbesondere im Endothel vorhanden ist. Ein vorherrschendes Auftreten von Asprosin in Endothelzellen wurde zuvor bereits in Untersuchungen von Asprosin in der Plazenta gezeigt ⁵⁵. Eine gewisse endokrine Funktion ist daher möglich und passt auch zu einer der Aufgaben des BAT als sekretorisches Organ ⁵⁶. Ähnlich wie das WAT als bekannter Hauptproduktionsort von Asprosin ³⁵ ist es also möglich, dass auch das BAT dieser Aufgabe der Produktion von Asprosin nachkommt. Dabei wäre eine Möglichkeit, dass Asprosin im BAT produziert und anschließend in den Endothelzellen gespeichert wird.

Es gilt jedoch zu bedenken, wie Asprosin entsteht, nämlich zusammen mit Fibrillin-1 als C-terminales Spaltprodukt von Profibrillin-1 ³⁵. Fibrillin-1 wiederum ist ein wichtiges Protein der ECM. Durch die Bildung von 10-12 nm dicken Mikrofibrillen sorgt es für Stabilität und gleichzeitig Elastizität von Geweben ⁵⁷. Die Herstellung der Mikrofibrillen erfordert dabei in jedem Fall eine erfolgreiche Abspaltung des C-terminal gelegenen Asprosins, jedoch stellt sich umgekehrt die Frage, ob für die Herstellung von Asprosin auch immer die Herstellung von Fibrillin-1 notwendig ist ⁵⁷. Bisher war man der Ansicht, dass für jedes Asprosin auch ein Fibrillin-1 produziert wird, da keine Mechanismen des alternativen Splicings bekannt sind ⁵⁸.

Prinzipiell ist es auch kein neues Phänomen, dass Spaltprodukte von ECM-Proteinen als metabolisch aktive Proteine fungieren. Dieser Gruppe von Proteinhormonen wurde kürzlich der Name Caudamine gegeben, vom lateinischen Begriff cauda für Schwanz, denn sie alle sind das C-terminale Spaltprodukt eines viel größeren Proteins, das keinerlei metabolische Funktion ausübt⁵⁹. Ein Beispiel ist Endotrophin, das C-terminale Spaltprodukt von Kollagen 6, welches im Fettgewebe zu Inflammation, Fibrose und Insulinresistenz führt⁶⁰. Ein anderes Beispiel ist das vom C-terminalen Ende von Kollagen 18 abgespaltene Endostatin, welches durch die Erhöhung intrazellulären Stickstoffmonoxids (NO) vasodilatierend auf die Endothelzellen von Gefäßen wirkt⁶¹. All diesen Caudaminen wird eine große Bedeutung im Verständnis und der Behandlung von Krankheiten wie dem metabolischen Syndrom zugeschrieben⁵⁹.

Jedoch warfen bereits Muthu et al. die Frage auf, wie genau die Produktion des starren ECM-Proteins Fibrillin-1 mit der periodischen Freisetzung von Asprosin in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechsellage zusammenpasse. Sie vermuteten daher intra- oder extrazelluläre Speicher, aus denen Asprosin bei Bedarf freigesetzt werden könne⁵⁸. Auch Summers et al. sahen das Argument der täglichen Schwankungen in der AsprosinKonzentration und die fasten-induzierte Freisetzung im Widerspruch⁵⁷. Sie stellten ebenfalls den berechtigten Einwand, dass die Produktion eines Fibrillin-1 pro Asprosin eine große Verschwendung von Ressourcen in der Zelle wäre, wenn man bedenkt, dass die Umwandlung von Profibrillin-1 zu fertigem Fibrillin-1 bis zu 20 Stunden dauert, und dabei bis zu 3000 Aminosäuren produziert werden, um letztlich das nur 140 Aminosäuren lange Asprosin herzustellen⁵⁷. Sie nehmen daher an, dass Asprosin unabhängig von der Synthese von Fibrillin-1 produziert oder zumindest freigesetzt wird⁵⁷. Hierfür sehen sie zwei Möglichkeiten – zum einen das Vorliegen eines separaten Promotors auf der C-terminalen Seite des Fibrillin-1-Gens, zum anderen eine Speicherung von Asprosin nach der Abspaltung in denjenigen Geweben, die es sezernieren, und ein Abbau in allen anderen⁵⁷. Ein ähnliches Prinzip gibt es zum Beispiel bei Insulin, welches in Granula in der Zelle gespeichert und erst bei Stimulation der Zelle freigesetzt wird⁶².

Dabei könnten vor allem metabolisch und endokrin aktive Organe als solcher Speicherort fungieren. Ein solches könnte das BAT sein. Hier stellte sich die Färbung von Asprosin im Gewebe vor allem rund um die Zellkerne und zum Teil auch im Zytosol der braunen Adipozyten dar. Dies korreliert mit den Ergebnissen anderer Färbungen, bei denen Asprosin in metabolisch aktiven Organen wie der Leber ebenfalls eher intrazellulär in vesikelähnlichen Strukturen angesiedelt war⁶³. In anderen Organen wie beispielsweise dem Herz oder der Plazenta war es hingegen ähnlich wie Fibrillin-1 extrazellulär und als lange Fasern vorherrschend.

In den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen von Fibrillin-1 hat sich eine gewisse Co-Lokalisation am Endothel der Blutgefäße ergeben, jedoch ging die Färbung darüber hinaus. Außerdem zog sich Fibrillin-1 als Fasern durch das gesamte Gewebe. Rund um die Adipozyten selbst war es wie ein Gerüst entlang der Zellmembranen vorhanden. Das alles passt zu seiner erwähnten Funktion als ECM-Protein und korreliert wie auch schon die Färbung von Asprosin mit Ergebnissen anderer Immunfluoreszenzfärbungen ^{63,64}. Es scheint also im BAT trotz des gemeinsamen Ursprungs einen Unterschied zwischen dem ECM-Protein Fibrillin-1 und dem metabolisch aktiven Asprosin zu geben. Erneut stellt sich die Frage, was nach der Spaltung von Profibrillin-1 in Fibrillin-1 und Asprosin geschieht und ob sie gleichzeitig oder unabhängig voneinander produziert und freigesetzt werden.

5.2. Auswirkungen von DIO auf Asprosin im BAT

Western-Blot-Analysen von Asprosin zeigten eine signifikant erhöhte Proteinmenge in der DIO-Gruppe verglichen mit der SD-Gruppe. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, bei denen die Menge an Asprosin im Plasma bei übergewichtigen Erwachsenen und teilweise auch Kindern erhöht war und positiv mit dem BMI korrelierte ^{37,43}. Wie bereits erwähnt führt Übergewicht zu einem Zustand chronischer Inflammation im Fettgewebe ⁸. Auch Asprosin hat nachweislich eine proinflammatorische Wirkung auf Gewebe wie den Skelettmuskel, das Pankreas und das WAT ³⁷. Es ist also gut möglich, dass Asprosin auch im BAT einen proinflammatorischen Effekt hat, möglicherweise ausgehend von den Endothelzellen. Im Vergleich der drei Mausgruppen zeigte sich hier tendenziell eine stärkere Färbungsintensität in der DIO-Gruppe. Endothelzellen sind bekannt dafür, eine wichtige Rolle in der Entstehung von Inflammation in Geweben zu spielen. Bei Aktivierung werden Signalwege in Gang gesetzt, die über die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen zur Einwanderung von Leukozyten führen ⁶⁵. Im Fettgewebe stellen auch die von ihm produzierten Adipokine einen wichtigen Teil in der Aktivierung der Endothelzellen dar ⁶⁵. Eines dieser Adipokine ist das Leptin, ein Proteinormon, das von weißem Fettgewebe sezerniert wird und im Hypothalamus das Hungergefühl hemmt. Bei Übergewicht und Adipositas liegen paradoxerweise erhöhte Leptinspiegel im Blut vor, weshalb man hier von einer Leptinresistenz spricht ⁶⁶. Neben seiner metabolischen Wirkung ist Leptin auch als proinflammatorisches Adipokin bekannt und wirkt zum Beispiel proinflammatorisch in Endothelzellen ⁶⁷. Es wäre möglich, dass Asprosin in einer ähnlichen Weise wie Leptin bei Übergewicht erhöht ist und regulatorisch und proinflammatorisch auf das Endothel wirkt.

Ein proinflammatorischer Effekt von Asprosin auf das Endothel wurde kürzlich von zwei Studien gezeigt. Huang et al. konnten nachweisen, dass Asprosin ähnlich einer HFD zu einer Inflammation des Endothels führte und hier proinflammatorische Zytokine wie IL-6 erhöhte. Durch eine Neutralisierung mithilfe eines Asprosin-Antikörpers konnte dieser Effekte wiederum

rückgängig gemacht werden. Sie folgerten daraus eine proinflammatorische Wirkung von Asprosin im Endothel und der mit Übergewicht assoziierten endothelialen Dysfunktion ⁶⁸. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Lu et al., auch sie fanden eine durch Asprosin verstärkte endotheliale Dysfunktion bei HFD und konnten diese ebenfalls durch Neutralisierung mittels eines entsprechenden Antikörpers vermindern ⁶⁹.

Sowohl Asprosin als auch Fibrillin-1 zeigten sich perivaskulär und im BAT-Gewebe selbst in der DIO-Gruppe tendenziell stärker gefärbt, was bei Asprosin auch mit den Ergebnissen des Western Blots und den hier signifikant erhöhten Proteinmengen an Asprosin übereinstimmte. Es ist bekannt, dass es bei einer Gewichtszunahme zu einem starken Remodelling des Fettgewebes kommt ⁵⁸. Die ECM spielt dabei eine wichtige Rolle und ermöglicht es den Adipozyten, sich auszudehnen. Fibrillin-1 ist in diesem Prozess ein wichtiges ECM-Protein ⁵⁸, daher erscheint es logisch, dass sich seine Präsenz in der DIO-Gruppe erhöht. Dazu passt auch, dass es sich nicht nur rund um die Adipozyten selbst, sondern auch entlang der Läppchen und rund um die Gefäße stärker gefärbt zeigte. Allerdings war dieser Unterschied allein in der Färbung zu sehen, auf Protein- und Genebene kamen keine Unterschiede zur Darstellung. Möglicherweise ist dies der Tatsache geschuldet, dass BAT wie bereits initial erwähnt resistenter gegen Inflammation zu sein scheint als WAT ¹⁸ und sich daher die Veränderungen erst später auf Gen- und Proteinebene manifestieren. Im WAT hingegen gibt es Studien, wo es sowohl zu histologischen Veränderungen der Adipozyten als auch zu einer Hochregulation der *Fbn1* mRNA kam ⁶⁴. Es bleibt fraglich, inwieweit dies auch auf das BAT zutrifft. Gleichzeitig verweist der deutliche Unterschied in der Proteinmenge an Asprosin im Vergleich zum ausbleibenden Unterschied bei Fibrillin-1 erneut auf die unterschiedlichen Funktionen der beiden im BAT.

Bei genauerer Betrachtung der Gewebefärbungen sowohl von Asprosin als auch von Fibrillin-1 fallen in der DIO-Gruppe starke interindividuelle Unterschiede auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die einzelnen Tiere verschieden stark auf die HFD angesprochen haben. Auch bei Leptin wurde bereits ein ähnlicher Effekt beobachtet. Bei Probanden, die eine Diät mit verminderter Kalorienmenge bekamen, zeigte sich ein besseres Ansprechen auf die Diät bei Vorliegen einer verminderten Methylierung des Leptinpromotors ⁷⁰. Auf der anderen Seite bewirkte eine HFD eine erhöhte Methylierung des Leptinpromotors bei Ratten ⁷¹. Die Methylierung der Promotorregion stellt dabei eine Art von epigenetischer Regulation dar und verhindert eine Transkription des entsprechenden Gens ⁷². Epigenetische Mechanismen stellen neben Ernährung und Bewegung einen wichtigen Faktor dar, welcher zur Entstehung von Übergewicht beiträgt und können wiederum durch metabolische Interventionen und Ernährung beeinflusst werden ⁷³. Außerdem sind sie eine Erklärung dafür, dass interindividuelle Unterschiede bei Übergewicht zustande kommen ⁷⁰. In der hier vorliegenden Arbeit könnten die beobachteten interindividuellen Unterschiede der Mäuse der DIO-Gruppe

also ebenfalls durch unterschiedliche Methylierung des *Fbn1*-Gens oder der vorgeschlagenen möglichen eigenen Promotorregion von Asprosin zustande kommen.

5.3. Auswirkungen von Sport auf Asprosin im BAT

In der RUN-Gruppe zeigten sich sowohl bei Asprosin als auch bei Fibrillin-1 tendenziell verminderte Intensitäten der Färbungen an den Gefäßen. Sport führt zum einen zu einer Verringerung der Menge an WAT und der Größe der Adipozyten im Körper, zum anderen auch zu einem Effekt auf die Sekretion von Adipokinen ⁷⁴. Da im WAT ein Hauptanteil an im Blutkreislauf zirkulierendem Asprosin produziert wird ³⁵, ist es möglich, dass Sport diesen verringert und dadurch auch weniger im Endothel des BAT ankommt. Auch die Endothelzellen selbst werden durch Sport positiv beeinflusst. Reguläres Training führt in ihnen zu einem erhöhten Blutfluss, erhöhter Verfügbarkeit von NO und dadurch verbesserter Vasodilatation ⁷⁵. Falls die Endothelzellen wie zuvor vorgeschlagen ein Speicherort von Asprosin im BAT sind und sich dieses bei Vorhandensein proinflammatorisch auf die Endothelzellen auswirkt, kann Sport dem möglicherweise entgegenwirken oder zumindest den proinflammatorischen Effekt von Asprosin abschwächen.

Ein günstiger Effekt von Sport auf das Gewebe zeigt sich auch in einer ebenfalls tendenziell verminderten Färbungsintensität von Fibrillin-1 entlang der Lappengrenzen des BAT und auch der Proteinmenge im Western Blot. Das deckt sich mit der Sekretomanalyse brauner Adipozyten von Ali Khan et al., bei der nach Noradrenalin-Stimulation die Sekretion von ECM-Proteinen vermindert wurde, obwohl die braunen Adipozyten initial im unstimulierten Zustand im Vergleich zu weißen Adipozyten deutlich höhere Mengen dieser Proteine sezernierten ¹⁶. Gleichzeitig wurden auch Proteine in ihrer Anzahl verringert, die eine Rolle in der Angiogenese spielen, was zur verminderten Gefäßfärbung von Fibrillin-1 passt ¹⁶.

Interessanterweise war die Intensität der Färbung von Asprosin im Gewebe in der RUN-Gruppe tendenziell erhöht, was von der Tendenz mit den Ergebnissen der Proteinanalyse im Western Blot übereinstimmte. Sowohl für die Effekte von Sport auf das BAT als auch für die Effekte auf die Menge an zirkulierendem Asprosin gibt es einige widersprüchliche Angaben in der Literatur ^{28,48}. Erhöhte Asprosinpiegel im Plasma wurden bisher bei Frauen nach Fahrradsprints beobachtet ⁵³, sowie bei Männern nach akutem Lauftraining ⁷⁶. Mögliche Wege, wie Sport zu einem Anstieg der Asprosinpiegel führen könnte, sehen die Autoren der letzteren Studie darin, dass es durch die mechanische Belastung einerseits zu einer anabolen Reaktion und daraufhin Produktion von Asprosin kommt, andererseits zu einem Abbau von ECM-Gewebe und dadurch Freisetzung von darin enthaltenem Asprosin ins Blut ⁷⁶.

Inwieweit dies auch beim BAT eine Rolle spielt, bleibt fraglich und von der Rolle des Gewebes während und nach Sport abhängig. Messungen der Größe der Fetttropfen im BAT ergaben

zumindest eine signifikante Verringerung der Durchmesser der Fetttropfen in der RUN-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe, was einen Einfluss von Sport auf das BAT impliziert.

5.4. Einfluss von Übergewicht und Sport auf BAT

Die Analysen unseres Mausmodells zeigten eine signifikante Gewichtszunahme der DIO-Gruppe mit zunehmendem Alter bei gleichzeitig geringerer Nahrungsaufnahme. Außerdem ergab ein durchgeführter Glukosetoleranztest in der DIO-Gruppe signifikant erhöhte Blutglukosewerte. In der RUN-Gruppe war hingegen eine Gewichtsabnahme zu beobachten. All diese Ergebnisse lassen auf eine erfolgreiche Übertragung der metabolischen Interventionen auf das Tiermodell schließen.

Im BAT selbst präsentierten sich morphologisch ebenfalls Unterschiede. Die Fetttropfen der RUN-Gruppe waren signifikant kleiner als die der SD-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch schon in anderen histologischen Untersuchungen ⁷⁷. In der DIO-Gruppe waren die Fetttropfen zwar in der Größe unverändert, jedoch imponierte ein deutlich sichtbarer Unterschied. Im Vergleich zur SD-Gruppe zeigte sich das Gewebe insgesamt aufgelockerter und die Fetttropfen erschienen eher univakuolär, geringer strukturiert und weniger deutlich voneinander abzugrenzen. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass Übergewicht zu einem Zustand chronischer Inflammation im Fettgewebe führt ⁸ und wurde ebenfalls bereits in anderen histologischen Analysen des BAT beobachtet ²⁰.

Insgesamt scheint sich in unserem Modell also RUN eher positiv und DIO eher negativ auf das Gewebe auszuwirken. Inwieweit sich dies auch in Veränderungen auf Genexpressions- und Proteinebene niederschlägt und die von BAT sezernierten Batokine beeinflusst, erfordert weitere Untersuchungen.

5.5. Diskussion der Limitation der genutzten Methodik

Bei kritischer Betrachtung der von uns angewandten Methodik, soll zunächst einmal der Blick auf das Mausmodell gerichtet werden. Hier lässt sich anmerken, dass die von uns verwendeten Mäuse relativ jung waren und bereits im Alter von 10 Wochen am postnatalen Tag P70 geopfert wurden. Genanalysen im Zeitverlauf über insgesamt 24 Wochen zeigten hingegen, dass einige molekulare Veränderungen im BAT durch eine HFD erst gegen Ende dieser Zeitspanne auftraten ²⁴. Das betraf insbesondere die Genexpression von Immunzellen und damit die Inflammation des Gewebes. Die Autoren schlussfolgern aus den Analysen, dass Inflammation und Fibrose durch eine HFD im BAT erst bei Langzeittiermodellen nachzuweisen sein könnten ²⁴. Dies könnte eine Erklärung für die ausgebliebenen Veränderungen von Fibrillin-1 auf Genexpressions- und Proteinebene in unserem Tiermodell gewesen sein.

Beim Blick auf unsere Immunfluoreszenzfärbungen muss gesagt werden, dass es sich bei diesen um eine semiquantitative Methode handelt und die gemessenen Werte unter Umständen vom Erfolg der jeweiligen Färbung bei den einzelnen Gewebeschnitten abhängt. Außerdem war die Stichprobenanzahl zum Teil aufgrund von Misserfolgen bei der Färbung oder unebenem Gewebe der Schnitte gering. Asprosinfärbungen im Gewebe präsentierten sich insbesondere perinukleär und im Zytosol der Zellen, während Fibrillin-1-Färbungen im Gewebe eher entlang der Zellmembran und entlang von Läppchen verliefen. Summers et al. kritisierten, dass häufig unspezifische Antikörper verwendet würden und daher eine intrazelluläre Lokalisation von Asprosin schwierig sei ⁵⁷. Häufig würden diese zudem an unpassenden Geweben getestet, welche keinerlei Fibrillin-1 produzierten. Daher würden die Antikörper eher ein anderes intrazelluläres Protein entdecken und anfärben, und nicht etwa Asprosin oder Fibrillin-1 ⁵⁷. Der von uns verwendete Asprosin-Antikörper wurde in menschlichem Lungengewebe getestet, welches Fibrillin-1 enthält ⁷⁸. Außerdem ergaben Immunfluoreszenzfärbungen von Morcos et al. mit einem erfolgreich selbsthergestellten hochspezifischen Antikörper gegen Asprosin ⁷⁶ ganz ähnliche Ergebnisse. Abhängig vom untersuchten Gewebe war Asprosin entweder extra- oder intrazellulär präsent ⁶³. In der Leber zum Beispiel waren eher intrazelluläre Ansammlungen in vesikelähnlichen Strukturen zu sehen, in Herz und Plazenta war Asprosin eher extrazellulär in Form von Fasern vorhanden. Die intrazelluläre Lokalisierung in der Leber sahen die Autoren in der schnellen Verstoffwechselung in diesem metabolisch aktiven Organ begründet ⁶³. Dies könnte ebenfalls auf das BAT zutreffen.

5.6. Ausblick

Diese Arbeit gibt einen wichtigen Überblick über die Asprosinlokalisierung und -expression im BAT-Gewebe von Wildtyp-Mäusen. Es lässt sich anhand der Immunfluoreszenzfärbungen und der Ergebnisse der Western Blots sagen, dass Asprosin im BAT vorhanden ist und durch Ernährung und Sport beeinflusst wird. Dabei wird auch auf lageabhängige Unterschiede hingewiesen, wodurch die Interventionen Ernährung und Sport unterschiedliche Effekte auf die einzelnen Teile des BAT-Gewebes haben. Außerdem wird eine möglicherweise wichtige Rolle von Endothelzellen deutlich, vielleicht sogar in verschiedenen weiteren Geweben. Die Versuche dieser Arbeit stellen daher einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis von Asprosin und seiner Wirkung im BAT dar.

Offen bleibt aus den Versuchen die Frage, ob das BAT Asprosin dabei selbst produziert, oder ob es nur als Speicherort fungiert. Die erhöhten Proteinmengen im Western Blot lassen auf eine gewisse endogene Produktion schließen. Um die Frage nach dem Ursprung von Asprosin endgültig zu klären, sind jedoch weitere Versuche nötig. Hier wäre zum Beispiel ein Versuchsaufbau mit Zellkulturen brauner Adipozyten denkbar. Auch weitere Untersuchungen

der Rolle von Endothelzellen in der Asprosinexpression und -prozessierung erscheint anhand unserer Ergebnisse sinnvoll und vielversprechend.

Langfristig soll so ein immer besseres Verständnis der Wirkung von Asprosin im Körper geschaffen und somit ein möglicher Mechanismus in der Entstehung von Übergewicht und Adipositas identifiziert werden. Am Ende steht dann die Hoffnung auf erfolgreiche Therapien dieser Krankheiten.

6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Obesity and Overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. (accessed Aug 03, 2023).
2. World Health Organization. WHO European Regional Obesity Report 2022. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/353747/9789289057738-eng.pdf> (accessed Aug 03, 2023).
3. Koenen M, Hill MA, Cohen P, Sowers JR. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. *Circ Res* 2021; **128**(7): 951-68.
4. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2009; **9**: 88.
5. Casanueva FF, Moreno B, Rodríguez-Azaredo R, et al. Relationship of abdominal obesity with cardiovascular disease, diabetes and hyperlipidaemia in Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; **73**(1): 35-40.
6. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**(3): 379-84.
7. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(6): 2548-56.
8. Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2021; **320**(3): C375-c91.
9. Lee MJ, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 2013; **34**(1): 1-11.
10. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; **84**(1): 277-359.
11. Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *Int J Biochem* 1991; **23**(9): 791-801.
12. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; **23**(2): 141-61.
13. Fischer AW, Schlein C, Cannon B, Heeren J, Nedergaard J. Intact innervation is essential for diet-induced recruitment of brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019; **316**(3): E487-E503.
14. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**(2): E444-52.
15. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; **360**(15): 1518-25.
16. Ali Khan A, Hansson J, Weber P, et al. Comparative Secretome Analyses of Primary Murine White and Brown Adipocytes Reveal Novel Adipokines. *Mol Cell Proteomics* 2018; **17**(12): 2358-70.
17. Becher T, Palanisamy S, Kramer DJ, et al. Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health. *Nat Med* 2021; **27**(1): 58-65.
18. Omran F, Christian M. Inflammatory Signaling and Brown Fat Activity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; **11**: 156.
19. Li J, Wu H, Liu Y, Yang L. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim* 2020; **69**(3): 326-35.
20. Alcala M, Calderon-Dominguez M, Bustos E, et al. Increased inflammation, oxidative stress and mitochondrial respiration in brown adipose tissue from obese mice. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 16082.
21. Shankar K, Kumar D, Gupta S, et al. Role of brown adipose tissue in modulating adipose tissue inflammation and insulin resistance in high-fat diet fed mice. *Eur J Pharmacol* 2019; **854**: 354-64.
22. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**(11): 738-49.

23. Dowal L, Parameswaran P, Phat S, et al. Intrinsic Properties of Brown and White Adipocytes Have Differential Effects on Macrophage Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm* 2017; **2017**: 9067049.
24. McGregor RA, Kwon EY, Shin SK, et al. Time-course microarrays reveal modulation of developmental, lipid metabolism and immune gene networks in intrascapular brown adipose tissue during the development of diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013; **37**(12): 1524-31.
25. Fromme T, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; **300**(1): R1-8.
26. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 2009; **9**(2): 203-9.
27. von Essen G, Lindsund E, Cannon B, Nedergaard J. Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2017; **313**(5): E515-E27.
28. Dewal RS, Stanford KI. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2019; **1864**(1): 71-8.
29. Scheel AK, Espelage L, Chadt A. Many Ways to Rome: Exercise, Cold Exposure and Diet-Do They All Affect BAT Activation and WAT Browning in the Same Manner? *Int J Mol Sci* 2022; **23**(9).
30. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise regulation of adipose tissue. *Adipocyte* 2016; **5**(2): 153-62.
31. Motiani P, Virtanen KA, Motiani KK, et al. Decreased insulin-stimulated brown adipose tissue glucose uptake after short-term exercise training in healthy middle-aged men. *Diabetes Obes Metab* 2017; **19**(10): 1379-88.
32. Lehnig AC, Dewal RS, Baer LA, et al. Exercise Training Induces Depot-Specific Adaptations to White and Brown Adipose Tissue. *iScience* 2019; **11**: 425-39.
33. Stanford KI, Lynes MD, Takahashi H, et al. 12,13-diHOME: An Exercise-Induced Lipokine that Increases Skeletal Muscle Fatty Acid Uptake. *Cell Metab* 2018; **27**(5): 1111-20.e3.
34. Kjaer M. Adrenal medulla and exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998; **77**(3): 195-9.
35. Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, et al. Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *Cell* 2016; **165**(3): 566-79.
36. Duerrschmid C, He Y, Wang C, et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med* 2017; **23**(12): 1444-53.
37. Farrag M, Ait Eldjoudi D, González-Rodríguez M, et al. Asprosin in health and disease, a new glucose sensor with central and peripheral metabolic effects. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; **13**: 1101091.
38. Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 2019; **486**: 96-104.
39. Jung TW, Kim HC, Kim HU, et al. Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKCdelta-activated ER stress and inflammation in skeletal muscle. *J Cell Physiol* 2019; **234**(11): 20888-99.
40. Miao Y, Qin H, Zhong Y, Huang K, Rao C. Novel adipokine asprosin modulates browning and adipogenesis in white adipose tissue. *J Endocrinol* 2021; **249**(2): 83-93.
41. Zou J, Xu C, Zhao ZW, Yin SH, Wang G. Asprosin inhibits macrophage lipid accumulation and reduces atherosclerotic burden by up-regulating ABCA1 and ABCG1 expression via the p38/Elk-1 pathway. *J Transl Med* 2022; **20**(1): 337.
42. Zhang Z, Tan Y, Zhu L, et al. Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sci* 2019; **231**: 116554.
43. Yuan M, Li W, Zhu Y, Yu B, Wu J. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; **11**: 64.

44. Wang CY, Lin TA, Liu KH, et al. Serum asprosin levels and bariatric surgery outcomes in obese adults. *Int J Obes (Lond)* 2019; **43**(5): 1019-25.
45. Sünnetçi Silistre E, Hatipoğlu HU. Increased serum circulating asprosin levels in children with obesity. *Pediatr Int* 2020; **62**(4): 467-76.
46. Long W, Xie X, Du C, et al. Decreased Circulating Levels of Asprosin in Obese Children. *Horm Res Paediatr* 2019; **91**(4): 271-7.
47. Corica D, Aversa T, Currò M, et al. Asprosin serum levels and glucose homeostasis in children with obesity. *Cytokine* 2021; **142**: 155477.
48. Ceylan HI, Saygin O. An investigation of the relationship between new fasting hormone asprosin, obesity and acute-chronic exercise: current systematic review. *Arch Physiol Biochem* 2021; **127**(4): 373-84.
49. Nakhaei H, Nayebifar S, Fanaei H. Decrease in serum asprosin levels following six weeks of spinning and stationary cycling training in overweight women. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2023; **44**(1): 21-6.
50. Ceylan H, Öztürk ME, Öztürk D, et al. Acute effect of moderate and high-intensity interval exercises on asprosin and BDNF levels in inactive normal weight and obese individuals. *Sci Rep* 2023; **13**(1): 7040.
51. Ko JR, Seo DY, Kim TN, et al. Aerobic Exercise Training Decreases Hepatic Asprosin in Diabetic Rats. *J Clin Med* 2019; **8**(5).
52. Schumann U, Qiu S, Enders K, et al. Asprosin, A Newly Identified Fasting-Induced Hormone Is Not Elevated In Obesity And Is Insensitive To Acute Exercise: 3592 Board #39 June 3 8. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2017; **49**: 1023.
53. Więcek M, Szymura J, Maciejczyk M, Kantorowicz M, Szygula Z. Acute Anaerobic Exercise Affects the Secretion of Asprosin, Irisin, and Other Cytokines-A Comparison Between Sexes. *Frontiers in Physiology* 2018; **9**: 1782.
54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**(4): 402-8.
55. Hoffmann T, Morcos YAT, Janoschek R, et al. Correlation of metabolic characteristics with maternal, fetal and placental asprosin in human pregnancy. *Endocr Connect* 2022; **11**(3).
56. Villarroya J, Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Peyrou M, Giralt M, Villarroya F. New insights into the secretory functions of brown adipose tissue. *J Endocrinol* 2019; **243**(2): R19-r27.
57. Summers KM, Bush SJ, Davis MR, Hume DA, Keshvari S, West JA. Fibrillin-1 and asprosin, novel players in metabolic syndrome. *Mol Genet Metab* 2023; **138**(1): 106979.
58. Muthu ML, Reinhardt DP. Fibrillin-1 and fibrillin-1-derived asprosin in adipose tissue function and metabolic disorders. *J Cell Commun Signal* 2020.
59. Basu B, Jain M, Chopra AR. Caudamins, a new subclass of protein hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2021; **32**(12): 1007-14.
60. Sun K, Park J, Gupta OT, et al. Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nat Commun* 2014; **5**: 3485.
61. Wenzel D, Schmidt A, Reimann K, et al. Endostatin, the proteolytic fragment of collagen XVIII, induces vasorelaxation. *Circ Res* 2006; **98**(9): 1203-11.
62. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc. Copyright © 2000-2023, MDTText.com, Inc.; 2000.
63. Morcos YAT, Prymachuk G, Lütke S, et al. Transglutaminase mediated asprosin oligomerization allows its tissue storage as fibers. *bioRxiv* 2023: 2022.01.04.474899.
64. Davis MR, Arner E, Duffy CR, et al. Expression of FBN1 during adipogenesis: Relevance to the lipodystrophy phenotype in Marfan syndrome and related conditions. *Mol Genet Metab* 2016; **119**(1-2): 174-85.
65. Sengenès C, Miranville A, Lolmède K, Curat CA, Bouloumié A. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med* 2007; **262**(4): 415-21.
66. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients* 2019; **11**(11).
67. Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Faseb j* 1999; **13**(10): 1231-8.

68. Huang Q, Chen S, Xiong X, et al. Asprosin Exacerbates Endothelium Inflammation Induced by Hyperlipidemia Through Activating IKK β -NF- κ Bp65 Pathway. *Inflammation* 2023; **46**(2): 623-38.
69. Lu Y, Yuan W, Xiong X, et al. Asprosin aggravates vascular endothelial dysfunction via disturbing mitochondrial dynamics in obesity models. *Obesity (Silver Spring)* 2023; **31**(3): 732-43.
70. Cordero P, Campion J, Milagro FI, et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem* 2011; **67**(3): 463-70.
71. Milagro FI, Campión J, García-Díaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martínez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* 2009; **65**(1): 1-9.
72. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *J Periodontol* 2008; **79**(8 Suppl): 1514-9.
73. Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; **10**(4): 383-92.
74. Sakurai T, Ogasawara J, Shirato K, et al. Exercise Training Attenuates the Dysregulated Expression of Adipokines and Oxidative Stress in White Adipose Tissue. *Oxid Med Cell Longev* 2017; **2017**: 9410954.
75. Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J. Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *Int J Cardiol* 2010; **141**(3): 214-21.
76. Morcos YAT, Lütke S, Tenbrieg A, et al. Sensitive asprosin detection in clinical samples reveals serum/saliva correlation and indicates cartilage as source for serum asprosin. *Sci Rep* 2022; **12**(1): 1340.
77. De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, et al. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; **23**(6): 582-90.
78. Quondamatteo F, Reinhardt DP, Charbonneau NL, Pophal G, Sakai LY, Herken R. Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. *Matrix Biol* 2002; **21**(8): 637-46.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines braunen Adipozyten in Anlehnung an Canon et al.2004	13
Abbildung 2: Effekte von Asprosin in Anlehnung an Farrag et al. 2023.....	18
Abbildung 3: Methode zur Auswertung der Fetttropfendurchmesser im BAT	33
Abbildung 4: Veränderung des Körpergewichts über die Zeit.....	42
Abbildung 5: Nahrungsaufnahme an Tag P70	43
Abbildung 6: Glukosetoleranztests (GTT) nach 6 h Fasten	44
Abbildung 7: Braune Adipozyten im BAT in H&E und Sirius-Red-Färbung.....	45
Abbildung 8: Blutgefäße im BAT in H&E und Sirius-Red-Färbung	46
Abbildung 9: Durchmesser der Fetttropfen	47
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Asprosin im Blutgefäß.....	48
Abbildung 11: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Asprosin im Blutgefäß	49
Abbildung 12: Co-Färbung von Asprosin und CD-31 bzw. α -SMA im Blutgefäß.	50
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung von Asprosin im Gewebe.....	51
Abbildung 14: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Asprosin im Gewebe	52
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 im Blutgefäß	53
Abbildung 16: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 im Blutgefäß....	54
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 im Lappchen.....	55
Abbildung 18: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 im Lappchen ...	56
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung von Fibrillin-1 im Gewebe	57
Abbildung 20: Quantitative Messung der Färbungsintensität von Fibrillin-1 im Gewebe.....	58
Abbildung 21: Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen von Asprosin und Fibrillin-1.....	60
Abbildung 22: Asprosinexpression im Western Blot.....	61
Abbildung 23: Fibrillin-1-Expression im Western Blot.....	62
Abbildung 24: Fibrillin-1-Expression in der qPCR	63

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Software	21
Tabelle 2: Verwendete Enzyme und Chemikalien	23
Tabelle 3: Verwendete Stammlösungen und Puffer	27
Tabelle 4: Zusammensetzung Tiernahrung	29
Tabelle 5: Verwendete Primär-Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen	31
Tabelle 6: Verwendete Sekundär-Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen	32
Tabelle 7: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper Western Blot	37
Tabelle 8: Verwendete Primer-Sequenzen qPCR	40