

Aus der Klinik für Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Schieffer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# „Bedeutung des Adipokins CTRP3 für das Fettgewebe und die Entwicklung der Atherosklerose“

## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Sören Koch

aus Neustadt am Rübenberge

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 15.12.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. K. Grote

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Göke

***Meiner lieben Frau Laura gewidmet***

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Atherosklerose.....	1
1.1.1 Definition und klinische Bedeutung.....	1
1.1.2 Ätiologie .....	1
1.1.3 Klassifikation und Stadieneinteilung .....	2
1.1.4 Pathogenese.....	4
1.2 Metabolisches Syndrom.....	10
1.2.1 Definition und klinische Bedeutung.....	10
1.2.2 Pathophysiologie.....	11
1.2.2.1 Adipositas und das Fettgewebe .....	13
1.2.2.2 Insulinresistenz .....	16
1.2.2.3 Dyslipoproteinämie.....	17
1.2.2.4 Hypertonie.....	18
1.3 Adipokine.....	19
1.3.1 Das Adipokin CTRP3 .....	20
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
<b>3 Materialien</b> .....	<b>24</b>
3.1 Chemikalien.....	24
3.2 Puffer.....	25
3.3 Enzyme .....	25
3.4 Reagenzkits.....	25
3.5 Antikörper .....	25
3.6 Primer.....	26
3.7 Mäuse.....	26
3.8 Geräte .....	27

3.9	Verbrauchsmaterialien .....	28
3.10	Software .....	28
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>29</b>
4.1	Tierversuche an Mäusen .....	29
4.1.1	Rechtliche Grundlagen.....	29
4.1.2	Mausstämme .....	29
4.1.3	Tierhaltung.....	29
4.1.4	Entnahme und Aufbereitung der Organe.....	30
4.2	Genotypisierung .....	31
4.2.1	DNA-Isolation aus Mausgewebe .....	31
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	31
4.2.3	Gelelektrophorese.....	32
4.3	Genexpressionsanalyse.....	32
4.3.1	RNA-Isolierung.....	32
4.3.2	cDNA-Synthese.....	33
4.3.3	Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) .....	33
4.4	Analyse des Fettgewebes.....	34
4.4.1	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	34
4.4.2	Entparaffinierung und HE-Färbung.....	34
4.4.3	Mikroskopische Aufnahmen .....	36
4.4.4	Analyse der Adipozytengröße .....	36
4.4.5	Entparaffinierung und F4/80-Färbung.....	36
4.4.6	Analyse der Makrophagen .....	38
4.5	Analyse der Atherosklerose .....	38
4.5.1	Oil Red O (ORO)-Färbung der Aortenwurzel.....	38
4.5.2	Analyse der Lipidakkumulation in der Aortenwurzel .....	39
4.5.3	Analyse der Plaquefläche in der Aortenwurzel .....	39
4.5.4	Analyse des nekrotischen Kerns .....	40
4.5.5	MOMA-2-Färbungen der Aortenwurzel.....	40
4.5.6	Analyse des Makrophagenanteils in der Aortenwurzel .....	41
4.5.7	ORO-Färbung der thorakoabdominalen Aorta.....	41
4.5.8	Plaquelastung in der thorakoabdominalen Aorta .....	42
4.6	Statistische Analyse.....	42

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
5.1	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....	43
5.1.1	Erhöhte Gewichtszunahme der CTRP3-KO-Mäuse .....	43
5.1.2	Keine erhöhten Glukosewerte der CTRP3-KO-Mäuse .....	45
5.1.3	Erhöhte Cholesterinwerte der CTRP3-KO-Mäuse .....	47
5.2	Ergebnisse dieser Arbeit .....	48
5.2.1	Adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz führt zu morphologischen und immunhistologischen Veränderungen im WAT .....	48
5.2.1.1	Verstärkte Hypertrophie der Adipozyten der CTRP3-KO-Mäuse .....	48
5.2.1.2	Verstärkte Infiltration durch Makrophagen und Ausbildung von CLSs im WAT der CTRP3-KO-Mäuse .....	49
5.2.2	Adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz führt zu verstärkter vaskulärer Inflammation und Atherogenese .....	50
5.2.2.1	Verstärkte Akkumulation von Lipiden in der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse .....	50
5.2.2.2	Erhöhtes Vorkommen von atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse .....	51
5.2.2.3	Verstärkte Infiltration von Makrophagen in die Plaques der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse .....	52
5.2.2.4	Keine verstärkte Ausbildung nekrotischer Kerne in den Plaques der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse .....	53
5.2.2.5	Verstärkte Akkumulation von Lipiden in der thorakoabdominalen Aorta der CTRP3-KO-Mäuse .....	54
5.2.3	Expression von CTRP3 in verschiedenen Geweben wildtypischer C57BL/6J-Mäuse .....	55
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
6.1	Bedeutung von CTRP3 für das Fettgewebe .....	56
6.2	Bedeutung von CTRP3 für den Metabolismus .....	59
6.3	Bedeutung von CTRP3 für die Entstehung der Atherosklerose .....	61
6.4	Vorkommen von CTRP3 in verschiedenen Organen .....	63
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	<b>66</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>9</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b> .....	<b>79</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AGEs	<i>advanced glycation endproducts</i> (deutsch: fortgeschrittene Glykierungsendprodukte)
AHA	American Heart Association
Apo	Apolipoprotein
ApoE <sup>-/-</sup>	KO für das ApoE-Gen
ATLOs	<i>artery tertiary lymphoid organs</i> (deutsch: arteriell tertiär lymphoide Organe)
AT2	Angiotensin II
AUC	<i>area under the curve</i> (deutsch: Fläche unter der Kurve)
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
C1q	<i>complement component 1q</i> (deutsch: Komplementkomponente 1q)
CAM $\phi$	CLS-assozierte Makrophage
CD	<i>cluster of differentiation</i> (deutsch: Differenzierungscluster)
CLSs	<i>crown-like structures</i> (deutsch: kronenähnliche Strukturen)
Cre <sup>-</sup>	Maus ohne Gen für die Cre-Rekombinase
Cre <sup>+</sup>	Maus mit Gen für die Cre-Rekombinase
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i> (deutsch: Schwellenzyklus)
CTRP3	<i>C1q/TNF-related protein-3</i> (deutsch: C1q/TNF-bezogenes Protein-3)
CTRP3 <sup>-/-</sup>	KO für das CTRP3-Gen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i> (deutsch: schadensassoziierte

## Abkürzungsverzeichnis

	molekulare Muster)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (deutsch: Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EAT	<i>epicardial adipose tissue</i> (deutsch: epikardiales Fettgewebe)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii/aliae/alia</i> (deutsch: und andere)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
HDL	<i>high-density lipoprotein</i> (deutsch: Lipoprotein hoher Dichte)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	<i>high-fat diet</i> (deutsch: fettreiche Diät)
HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i> (deutsch: Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion)
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A- Reduktase
HO-LDL	hochoxydiertes LDL
Hrsg.	Herausgeber
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (deutsch: interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IDF	International Diabetes Federation
IDL	<i>Intermediate-density lipoprotein</i> (deutsch: Lipoprotein intermediärer Dichte)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ILC	<i>innate lymphoid cell</i> (deutsch: innate lymphoide Zelle)

## Abkürzungsverzeichnis

JIS	Joint Interim Statement
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low-density lipoprotein</i> (deutsch: Lipoprotein niedriger Dichte)
LDLR	<i>LDL receptor</i> (deutsch: LDL-Rezeptor)
LDLR <sup>-/-</sup>	KO für das LDLR-Gen
LFD	<i>low-fat diet</i> (deutsch: fettarme Diät)
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i> (deutsch: lektinähnlicher oxLDL-Rezeptor-1)
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphozytenantigen C6
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> (deutsch: monozytenkolonienstimulierender Faktor)
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i> (deutsch: Myeloide Suppressorzelle)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MO-LDL	minimal oxidiertes LDL
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i> (deutsch: nukleärer Faktor kappa B)
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
ORO	Oil Red O
oxLDL	oxidiertes LDL
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> (deutsch: Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Abkürzungsverzeichnis

RCT	<i>reverse cholesterol transport</i> (deutsch: reverser Cholesterintransport)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (deutsch: Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (deutsch: reaktive Sauerstoffspezies)
SAT	<i>subcutaneous adipose tissue</i> (deutsch: subkutanes Fettgewebe)
sdLDL	<i>small dense LDL</i> (deutsch: kleines, dichtes LDL)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (deutsch: kleine, interferierende RNA)
SR	Scavengerrezeptor
TE	Tris-EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i> (deutsch: transformierender Wachstumsfaktor)
TH1-Zellen	Typ-1-T-Helferzellen
TH2-Zellen	Typ-2-T-Helferzellen
TierSchG	Tierschutzgesetz
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i> (deutsch: Toll-artiger Rezeptor 4)
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VAT	<i>visceral adipose tissue</i> (deutsch: viszerales Fettgewebe)
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i> (deutsch: Gefäßzelladhäsionsmolekül-1)
VLA	<i>very late antigen</i> (deutsch: sehr spätes Antigen)
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i> (deutsch: Lipoprotein sehr niedriger Dichte)
WAT	<i>white adipose tissue</i> (deutsch: weißes Fettgewebe)
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose. ....	4
Abbildung 2: Pathogenese des metabolischen Syndroms.....	12
Abbildung 3: Inflammation des Fettgewebes.....	15
Abbildung 4: Körpergewicht und WAT-Gewicht nach 6 und 12 Wochen Fütterung mit HFD. ....	43
Abbildung 5: Anteil des WAT am Körpergewicht. ....	44
Abbildung 6: Nüchtern glukose und Glukose nach Applikation einer Glukoselösung. ..	45
Abbildung 7: Glukosespiegel vor und nach Applikation von Insulin. ....	46
Abbildung 8: AUC nach Applikation von Glukose bzw. Insulin. ....	46
Abbildung 9: Lipidprofil nach 6 und 12 Wochen Fütterung. ....	47
Abbildung 10: Größe der Adipozyten im WAT.....	48
Abbildung 11: Infiltration von Makrophagen im WAT.....	49
Abbildung 12: Lipideinlagerungen in der Aortenwurzel.....	50
Abbildung 13: Plaquefläche in der Aortenwurzel.....	51
Abbildung 14: Infiltration von Makrophagen in der Aortenwurzel.....	52
Abbildung 15: Quantifizierung des nekrotischen Kerns in atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel. ....	53
Abbildung 16: Lipideinlagerungen in der thorakoabdominalen Aorta.....	54
Abbildung 17: Expression von CTRP3-mRNA in verschiedenen Organen von WT-Mäusen. ....	55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Atherosklerose.....	3
Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose des metabolischen Syndroms.....	10
Tabelle 3: Chemikalien .....	24
Tabelle 4: Puffer .....	25
Tabelle 5: Enzyme .....	25
Tabelle 6: Reagenzkits .....	25
Tabelle 7: Antikörper.....	25
Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung.....	26
Tabelle 9: Primer zur Genexpressionsanalyse .....	26
Tabelle 10: Mäuse .....	26
Tabelle 11: Geräte .....	27
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 13: Software .....	28
Tabelle 14: Paraffineinbettung .....	30
Tabelle 15: Reaktionsbedingungen der PCR. ....	31
Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese .....	33
Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese.....	33
Tabelle 18: Reaktionsansatz für die qPCR.....	34
Tabelle 19: Reaktionsbedingungen der qPCR. ....	34
Tabelle 20: Waschschritte der Entparaffinierung.....	35
Tabelle 21: Waschschritte der HE-Färbung .....	35
Tabelle 22: Mikroskopische Aufnahmen der histologischen Schnitte .....	36

# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

### 1.1.1 Definition und klinische Bedeutung

Die Atherosklerose ist laut der World Health Organization (WHO) definiert als „[...] eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (WHO 1958). Abzugrenzen ist die Atherosklerose vom Begriff der Arteriosklerose, welche wörtlich eine Verhärtung der Arterien bedeutet und einen Oberbegriff für die Mönckeberg-Sklerose, die Arteriolosklerose sowie die Atherosklerose als bedeutendste Form darstellt (Böcker *et al.* 2008). Atherosklerotische Veränderungen entwickeln sich beim Menschen über viele Jahre oft unbemerkt und können unter anderem zur arteriellen Verschlusskrankheit (AVK) führen. Je nach Lokalisation unterscheidet man die koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrale Durchblutungsstörungen, viszerale Durchblutungsstörungen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). Es ist davon auszugehen, dass die KHK zu 95 %, Durchblutungsstörungen der Hirnarterien zu 70 % und die PAVK zu 90 % atherosklerotisch bedingt sind (Braun und Müller-Wieland 2017). Klinisch manifestiert sich die Atherosklerose unter anderem als Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Claudicatio intermittens, Gangrän der Extremitäten oder zum Beispiel als Nierenversagen (Longo *et al.* 2012). Weltweit stellen die KHK und nachfolgend der Schlaganfall die zwei häufigsten Todesursachen mit insgesamt ca. 15 Millionen Toten pro Jahr dar (WHO 2016). Aufgrund der großen klinischen Relevanz und der bisher teils unzulänglichen Erklärungs- und Therapieansätze (Haverich und Kreipe 2016) kommt der Erforschung der Atherosklerose eine wesentliche Bedeutung zu.

### 1.1.2 Ätiologie

Derzeit wird Atherosklerose als eine multifaktoriell bedingte, chronisch inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäße betrachtet (Brown *et al.* 2017). Bisher wurde eine Reihe von Faktoren identifiziert, die zur Entstehung von Atherosklerose beitragen. Das Konzept von Risikofaktoren in Bezug auf

kardiovaskuläre Erkrankungen wurde erstmals in der Framingham-Studie großangelegt untersucht (Hajar 2017). Die Ergebnisse prägten maßgeblich das Verständnis der Atherosklerose als multifaktoriell bedingte Erkrankung und führten zu effektiven Möglichkeiten der Therapie und Prävention (Kannel 1988). Die Risikofaktoren lassen sich vorwiegend in umweltbedingte und genetische Einflüsse einteilen. Einige der Risikofaktoren mit starker genetischer Komponente sind erhöhte Spiegel von *low-density lipoprotein* (LDL) und *very low-density lipoprotein* (VLDL), erniedrigte Spiegel von *high-density lipoprotein* (HDL), erhöhte Lipoprotein-A-Spiegel, Homozysteinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, systemische inflammatorische Erkrankungen, Depression, männliches Geschlecht sowie eine familiäre Vorbelastung. Zu den umweltbezogenen Risikofaktoren gehören unter anderem Rauchen, Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung und Infektionen wie beispielsweise mit *Chlamydomphila pneumoniae* (Lusis 2000). Insgesamt wird der Einfluss erblicher Faktoren für die Entstehung von KHK auf 50 % geschätzt (McPherson und Tybjaerg-Hansen 2016). Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren stets weitere Risikofaktoren beschrieben. So scheinen auch E-Zigaretten die Entwicklung einer Atherosklerose zu begünstigen (Lee *et al.* 2019), ebenso wie Schlafmangel (McAlpine *et al.* 2019), Feinstaub (Adar *et al.* 2013) und möglicherweise auch übermäßige körperliche Aktivität (Laddu *et al.* 2017). Die klassischen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose in den Koronararterien sind assoziiert mit atherosklerotischen Veränderungen anderer Arterien, wie zum Beispiel den Karotiden (Mannami *et al.* 2000). *Vice versa* konnte gezeigt werden, dass Atherosklerose in der Arteria carotis sowie der Aorta ein starker Indikator für die KHK ist (Sen *et al.* 2000). Von der Erkrankung sind vor allem Gefäße mit turbulentem Strömungsprofil und hohen Scherkräften betroffen. Daher sind Gefäßabschnitte in der Nähe von Bifurkationen prädestiniert für die Entwicklung von Atherosklerose (Gimbrone *et al.* 2000).

### 1.1.3 Klassifikation und Stadieneinteilung

Die atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwände äußern sich in einem variablen Erscheinungsbild. Für die Beschreibung und weiterführende Erforschung war es zunächst notwendig, eine einheitliche Terminologie dieser Veränderungen zu finden. Dies setzte sich die WHO zum Ziel und definierte in einer internationalen Erklärung bis heute verwendete Begriffe. Demnach werden „oberflächlich, gelbliche, fettige Läsionen“ als „*fatty streaks*“ bezeichnet. Eine „umschriebene, feste, grauweiße Intimaverdickung“ wird „*fibrous plaque*“ genannt. Als „*atheroma*“ wird „eine

atherosklerotische Plaque mit fettiger Erweichung“ bezeichnet. Kommt es zusätzlich zu Einblutungen, Thrombosen, Ulzerationen und Verkalkungen, wird der Begriff „*complicated lesion*“ verwendet (WHO 1958). Es zeigte sich später, dass die beobachteten atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand in einer bestimmten Reihenfolge ablaufen und in Typen beziehungsweise Stadien eingeteilt werden können. Eine gängige Einteilung geht auf den Pathologen Stary zurück (siehe Tabelle 1), welcher in einer großangelegten Studie die Koronararterien und Aorten von ca. 700 Patienten histomorphologisch untersuchte (Stary 2000a).

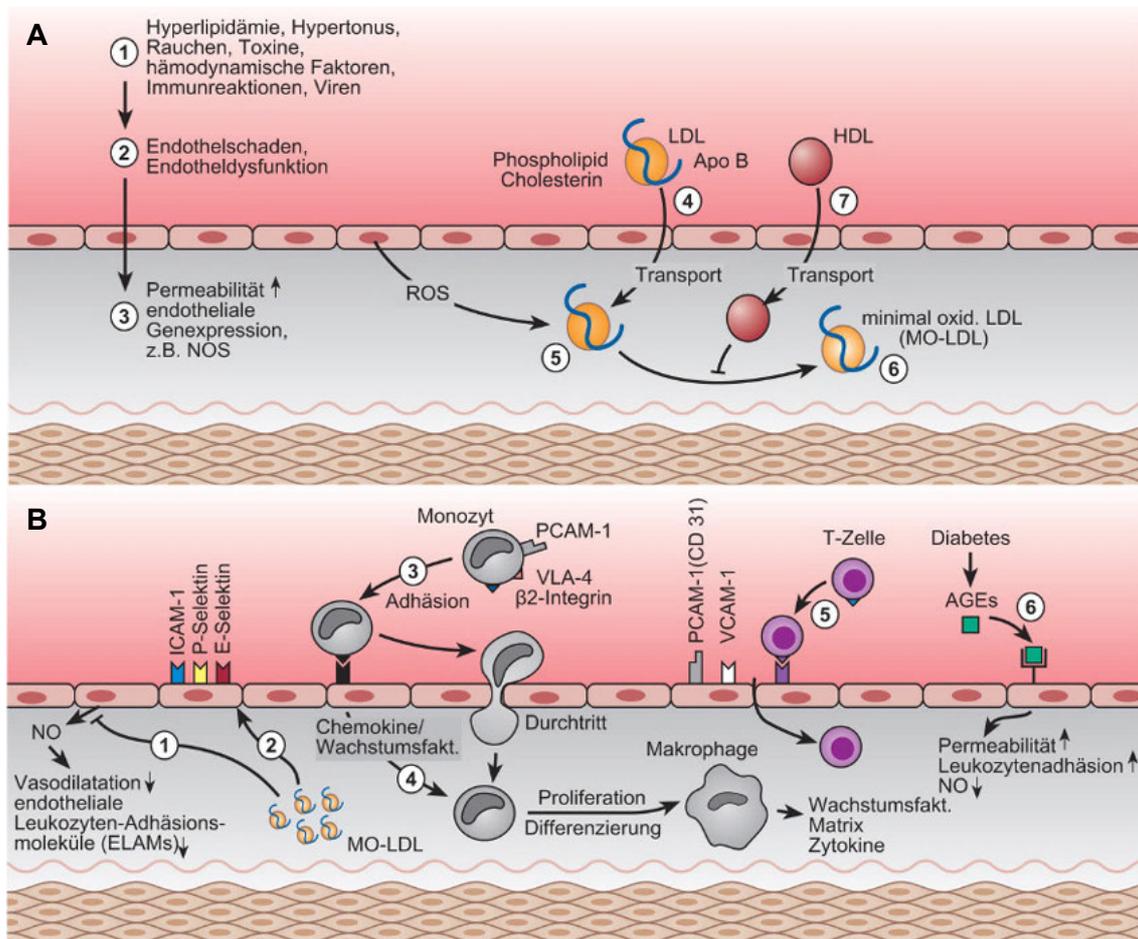
<b>Typ</b>	<b>Bezeichnungen</b>	<b>Pathologie</b>	<b>Verlauf</b>
<b>I</b>	fatty Streak	isolierte Schaumzellen	reversibel oder progredient zu II
<b>II</b>	fatty Streak	multiple Schaumzellen	reversibel oder progredient zu III
<b>III</b>	Präatherom intermediäre Läsionen	isolierte extrazelluläre Lipidablagerungen	reversibel oder progredient zu IV
<b>IV</b>	Atherom	konfluierende extrazelluläre Lipidablagerungen	progredient zu V, VI, VII, VIII
<b>V</b>	Fibroatherom fibröse Plaque	zusätzlich Bindegewebsschichten	progredient zu VI, VII, VIII
<b>VI</b>	komplizierte Läsion	Fissuren, Einblutungen, Thrombose	Endstadium
<b>VII</b>	kalzifizierte Läsion kalzifizierte Plaque	vorherrschende Kalzifizierung	Endstadium
<b>VIII</b>	fibrotische Läsion fibröse Plaque	vorherrschende Fibrosierung	Endstadium

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der Atherosklerose.** Modifiziert nach Stary (Stary *et al.* 1994; Stary *et al.* 1995; Stary 2000b).

Demnach sind frühe Stadien in Form von Fatty Streaks schon bei etwa 50 % der Neugeborenen zu finden, erreichen mit einer Prävalenz von unter 10 % um das 3. Lebensjahr einen Tiefpunkt und nehmen dann wieder bis zu einem Alter von 12 bis 15 Jahren zu. Ab etwa diesem Alter beginnt die Prävalenz höherer Stadien kontinuierlich zu steigen. Die früh beginnende Entwicklung der Atherosklerose verdeutlicht den großen Stellenwert von frühzeitiger Prävention bereits in jungen Jahren (Berenson *et al.* 1998).

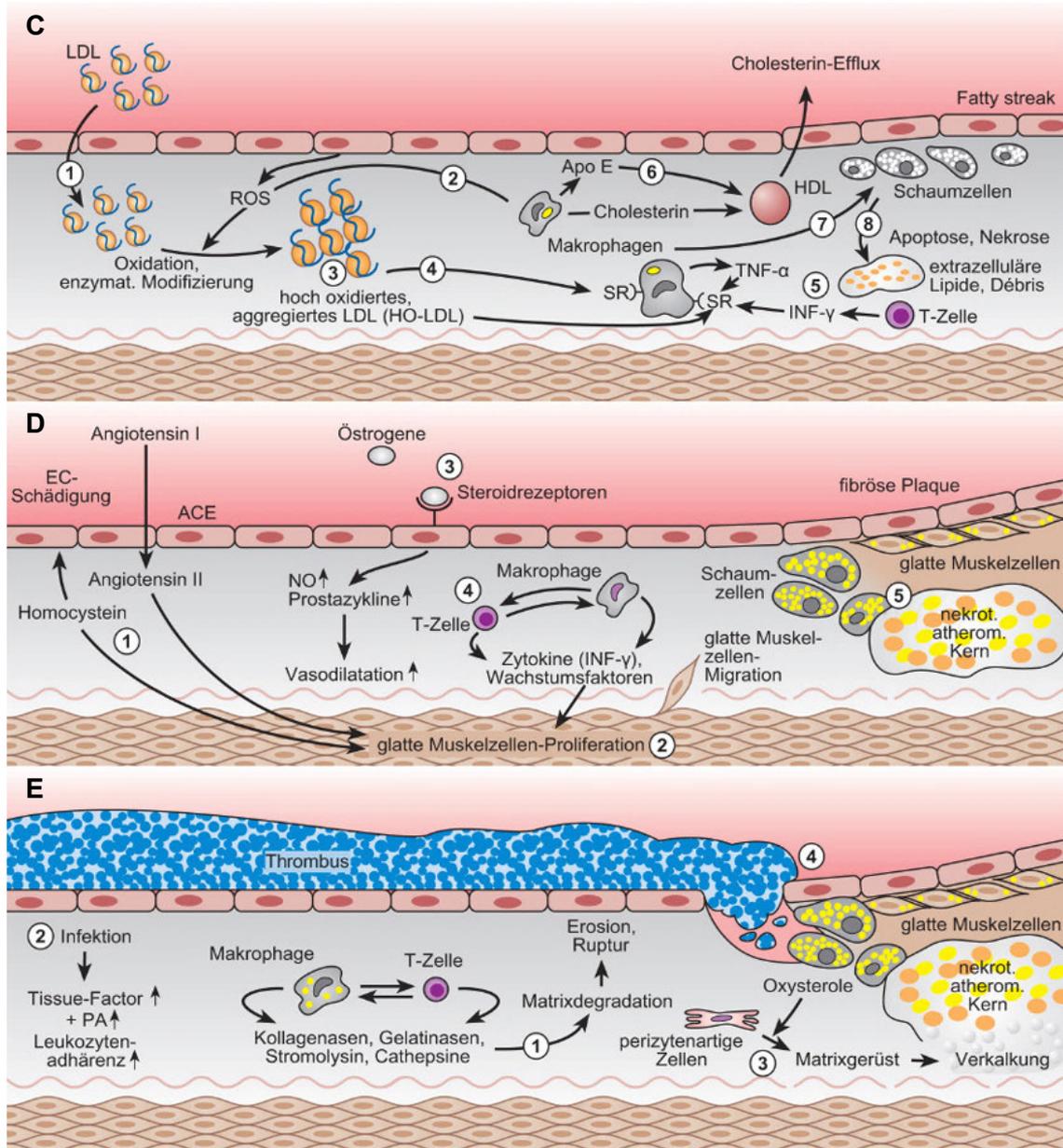
### 1.1.4 Pathogenese

Im Laufe des 19. und 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche Theorien zur Pathogenese der Atherosklerose aufgestellt, die verschiedene Aspekte der Krankheitsentstehung betonen. Eine umfassende und die bisher am weitesten akzeptierte Theorie zur Pathogenese der Atherosklerose geht auf die „*response-to-injury*“-Hypothese nach Ross zurück (Ross 1999). Demnach führen verschiedene Noxen zu einer endothelialen Dysfunktion mit einer nachfolgenden Infiltration von Leukozyten, Einlagerung von Lipiden, Bildung von Schaumzellen und Proliferation glatter Muskelzellen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose.** Modifiziert nach Höfler (Höfler *et al.* 2019). A) Verschiedene Noxen (1) führen entweder zu einem direkten Endothelschaden oder zu einer endothelialen Dysfunktion (1). Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels und zu einer Veränderung in der Genexpression (2), zum Beispiel der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) (3). LDL lagert sich in die Tunica intima ein (4) und wird durch Oxidation mit reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu sogenannten minimal oxidierten LDL (MO-LDL)-Partikeln (6). Die Oxidation kann durch HDL gehemmt werden (7). B) MO-LDL hemmt die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in den Endothelzellen (1) und stimuliert die Bildung von Zelladhäsionsmolekülen sowie von Wachstumsfaktoren wie dem monozytenkolonienstimulierenden Faktor (*macrophage colony-stimulating*

factor, M-CSF) (2). Mithilfe der Adhäsionsmoleküle Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PCAM-1), very late antigen-4 (VLA-4) und  $\beta$ 2-Integrin docken Monozyten an das Endothel an (3), wandern ein und differenzieren unter Einfluss von M-CSF zu Makrophagen (4). Die Makrophagen sezernieren selbst Wachstumsfaktoren, Matrixkomponenten und Zytokine und rekrutieren so zusätzlich T-Lymphozyten (5). Unter hyperglykämischen Bedingungen wird durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (advanced glycosylation endproducts, AGEs) die Inflammation verstärkt (6).



**Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose.** Modifiziert nach Höfler (Höfler *et al.* 2019). C) Das MO-LDL wird durch ROS und die von den Makrophagen gebildeten Myeloperoxidase (MPO) weiter oxidiert (2) und es entsteht hoch oxidiertes LDL (HO-LDL) (3), welches aggregiert. Die Makrophagen exprimieren unter Stimulation der Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) Scavengerrezeptoren (SR) (5). Über die SR wird das HO-LDL von den Makrophagen erkannt und phagozytiert (4). Durch die Anreicherung der Makrophagen mit Lipiden werden diese zu Schaumzellen (7). Die Schaumzellen sezernieren Apolipoprotein E (Apo E) (6), welches wiederum über HDL den Abtransport

von überschüssigem Cholesterin bewirkt und die weitere Schaumzellbildung reduziert. Mit der Apoptose der Schaumzellen sammeln sich extrazelluläre Überreste der Zellen und Lipide an (8). D) Eine Vielzahl von Risikofaktoren wie zum Beispiel erhöhte Plasmaspiegel von Angiotensin II und Homozystein stimulieren zusammen mit den freigesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Proliferation glatter Muskelzellen (2). Östrogenen (3) kommt eine protektive Wirkung zu, da diese Hormone unter anderem die Bildung von NO und Prostazyklin in den Endothelzellen stimulieren und somit eine Vasodilatation bewirken. Die Freisetzung von Zytokinen wird über die Interaktionen von T-Zellen und Makrophagen weiter aufrechterhalten (4). Glatte Muskelzellen migrieren aus der Tunica media in die Tunica intima, sezernieren extrazelluläre Matrixbestandteile und bilden so eine fibröse Kappe um den nekrotisch atheromatösen Kern (5). E) Durch Sekretion von Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysin und Cathepsinen aus Makrophagen und T-Zellen kommt es zur Degradation der Matrix (1) und Plaquestabilisierung. Diese kann durch Infektionen gefördert werden (2). Perizytenartige Zellen schaffen ein Matrixgerüst für die Ablagerung von Kalziumphosphat und fördern die Kalzifikation (3). Wird die Plaque zu instabil, rupturiert diese und es kommt zur Bildung eines Thrombus (4).

Die von Ross formulierte „*response-to-injury*“-Hypothese wird unter anderem dadurch gestützt, dass für eine Vielzahl der empirisch ermittelten Risikofaktoren ein negativer Einfluss auf die Funktion des Endothels nachgewiesen wurde. Die verursachte endotheliale Dysfunktion ist geprägt durch eine verminderte Produktion beziehungsweise ein vermindertes Ansprechen auf vasoprotektives NO (Gimbrone und García-Cardeña 2016). Diabetes, Hypertonie, Dyslipidämie und weitere Risikofaktoren führen zu oxidativem Stress. Während kurzfristig NO oxidiert und damit inaktiviert wird, kommt es langfristig zur Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), sodass aus Sauerstoff anstatt NO oxidativ wirksame Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) gebildet werden, die zur Gruppe der ROS gehören (siehe Abbildung 1A). Dies fördert eine Reihe atherogener Mechanismen, zum Beispiel die proinflammatorische Endothelzellaktivierung (Förstermann *et al.* 2017) mit einer gesteigerten Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen wie dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1) und dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1). Zudem kommt es zu einer gesteigerten Sekretion von Chemokinen und Zytokinen wie zum Beispiel Interleukin-1 (IL-1), IL-8 und Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) (Gimbrone und García-Cardeña 2016). Dies hat die Chemotaxis und Leukodiapedese von überwiegend Monozyten und T-Zellen zur Folge (siehe Abbildung 1B). Subendothelial differenzieren die Monozyten unter Einfluss von M-CSF zu Makrophagen aus (Johnson und Newby 2009). Gleichzeitig kommt es, ebenfalls bedingt durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels gegenüber LDL. Zum einen passiert LDL diffusionsbedingt über Lockerungen der Tight Junctions das Endothel, zum anderen wird LDL aufgrund einer verminderten Ausbildung der negativ geladenen Glykokalyx als natürliche Barriere

vermehrt transzytotisch durch endotheliale Vesikel aufgenommen (Mundi *et al.* 2018). Die endothelialen Veränderungen sind bei Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren zum Teil reversibel. So führte beispielsweise eine 8-wöchige Therapie mit Rosuvastatin bei Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer partiellen Normalisierung des Volumens der Glykokalyx (Meuwese *et al.* 2009). Durch die ROS, Myeloperoxidasen der Makrophagen oder den oxidativen Stress, bedingt durch die Risikofaktoren selbst, kommt es zur Oxidation von LDL (Förstermann *et al.* 2017). Das oxidierte LDL (oxLDL) wiederum verstärkt die Aktivierung des Endothels und die Infiltration durch Leukozyten. Die Makrophagen nehmen das modifizierte LDL über die Scavengerrezeptoren SR-A, Differenzierungscluster 36 (*cluster of differentiation 36*, CD36) und lektinähnlicher oxLDL-Rezeptor-1 (*lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1*, LOX-1) auf und werden zu Schaumzellen, welche nach ihrem Aussehen benannt sind (siehe Abbildung 1C). Dieser Prozess der Oxidation spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Atherosklerose (Kattoor *et al.* 2017). Klassische Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E und Carotinoide überzeugten bisher nicht in der Therapie (Toledo-Ibelles und Mas-Oliva 2018), jedoch sind selektiv gegen mitochondriale ROS wirksame Substanzen Gegenstand aktueller Forschungen (Kattoor *et al.* 2017). Liegen die Schaumzellen isoliert in der Intima vor, lassen sich diese Veränderungen nur schwer mit bloßem Auge erkennen. Akkumulieren mehrere Schaumzellen, machen sich diese als Fatty Streak im Sinne einer Typ II Läsion (siehe Tabelle 1) bemerkbar (Stary *et al.* 1994). Durch die Aufnahme von LDL werden die Makrophagen aktiviert und bilden eine Reihe weiterer Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6, welche zur weiteren Rekrutierung von Leukozyten und zur Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses beitragen. Die in den Makrophagen aufgenommenen Lipide werden enzymatisch hydrolysiert und das Cholesterin wird aus der Esterbindung freigesetzt. Das freie Cholesterin kann entweder die Makrophage wieder verlassen und abtransportiert werden, im endoplasmatischen Retikulum der Makrophage erneut verestert und zytoplasmatisch gespeichert werden oder zusammen mit anderen Faktoren zur Apoptose der Makrophage führen (Moore und Tabas 2011). Initial können die apoptotischen Makrophagen noch von intakten Makrophagen phagozytiert werden (Efferozytose) und die Entzündungsreaktion wird durch die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und transformierender Wachstumsfaktor beta (*transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) eingedämmt. In fortgeschrittenen Läsionen kommt es jedoch, bedingt durch das Milieu der Plaques, zu einer Zunahme der Apoptose bei gleichzeitig verminderter Efferozytose. Durch den unkontrollierten Zelltod der Makrophagen bildet sich ein entzündlicher, nekrotischer Kern (Tabas 2010) (siehe Abbildung 1C). Die Größe des nekrotischen Kerns wird neben der Verdünnung der

fibrösen Kappe als maßgeblicher Indikator für die Vulnerabilität der Plaques betrachtet (Gonzalez und Trigatti 2017). Sind histologisch extrazellulär verstreute Lipidtropfen nachweisbar, wird die Läsion Präatherom (Typ III Läsion) genannt. Liegen extrazellulär konfluierende Lipide im Sinne eines lipidreichen Kerns vor, so wird die Läsion als Atherom bezeichnet (Typ IV Läsion) und zu den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose gezählt (Stary 2000b). Die freigesetzten Zytokine und Wachstumsfaktoren führen zu Migration von glatten Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima (siehe Abbildung 1D). Die glatten Muskelzellen dedifferenzieren, nehmen einen synthetischen proliferativen Phänotyp an, bilden eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix und umgeben den nekrotischen Kern mit einer stabilisierenden fibrösen Kappe (Rudijanto 2007). Es bildet sich ein Fibroatherom (Typ V Läsion) (Stary 2000b). Mit zunehmender Infiltration von Makrophagen und Freisetzung proteolytischer Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen (MMP) kommt es jedoch zur Verdünnung der fibrösen Kappe und damit zur Instabilität der Plaques (Rudijanto 2007). Aufgrund der Fähigkeiten zur Bildung einer stabilisierenden fibrösen Kappe wurde das Vorkommen eines hohen Anteils glatter Muskelzellen in Relation zu dem Anteil von Makrophagen lange Zeit als günstig und das Vorkommen von Makrophagen als ungünstig in Bezug auf die Stabilität der Plaques bewertet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Funktion von glatten Muskelzellen in den Plaques sehr heterogen ist. So können glatte Muskelzellen, möglicherweise bedingt durch die Lipidakkumulation in den Plaques, ihren Phänotyp wechseln und einen proinflammatorischen, makrophagenähnlichen Zustand einnehmen. Sie tragen zur Bildung eines nekrotischen Kerns bei und sind selbst Bestandteil dessen (Bennett *et al.* 2016). Zudem leisten glatte Muskelzellen einen Beitrag zur inflammatorischen Aktivierung der Tunica adventitia. So bilden sich unter Einfluss von verschiedenen Chemokinen arteriell tertiär lymphoide Organe (*artery tertiary lymphoid organs*, ATLOs) mit zahlreichen kleinen Gefäßen und T- bzw. B-Zellclustern, welche zur Inflammation des Gefäßes beitragen (Hu *et al.* 2019). Der nekrotische Kern und die extrazelluläre Matrix können im Laufe der Zeit unter bisher nicht gänzlich geklärten Bedingungen überwiegend kalzifizieren und fibrosieren oder aber, infolge der Verdünnung der fibrösen Kappe, rupturieren (siehe Abbildung 1E) und nachfolgend zu einer Thrombose führen (Bentzon *et al.* 2014). Das Vorkommen von Fissuren, Einblutungen und Thrombosen in den Plaques wird nach dem Pathologen Stary als komplizierte Läsion bezeichnet (Typ VI Läsion) (Stary 2000b). Das Ausmaß der Thrombose ist entscheidend für das klinische Bild der Plaqueruptur und hängt Virchow zufolge von der Thrombogenität des freigesetzten Materials (vor allem Kollagen und Bestandteile des lipidreichen Kerns), der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes und systemischen

Einflussfaktoren wie zum Beispiel Nikotinabusus ab. Je nach Ausmaß der Thrombose kann es entweder zu einer klinisch unauffälligen Stenosierung des Gefäßes oder zu einem ausgeprägten Myokardinfarkt oder Schlaganfall kommen (Bentzon *et al.* 2014).

Im Laufe der Jahre wurde die ursprüngliche „*response-to-injury*“-Hypothese von Ross stets erweitert und die inflammatorischen Aspekte rückten mehr in den Fokus. Daher wird zuweilen auch der Begriff „*Inflammatory Hypothesis of Atherothrombosis*“ verwendet (Gimbrone und García-Cardena 2016). Dennoch ist fraglich, inwiefern ein initialer Endothelschaden in der Tunica intima der Atherosklerose vorausgeht. Haverich und Kreipe argumentieren, dass das Konzept von ubiquitär auf das Endothel wirksamen Noxen nicht erkläre, wieso es innerhalb eines stark atherosklerotisch veränderten Gefäßes Abschnitte gebe, die vollständig atherosklerosefrei sind (Haverich und Kreipe 2016). Haverich zufolge stellt Atherosklerose eine primär mikrovaskuläre Erkrankung der Vasa Vasorum dar, welche die größeren Arterien mit Sauerstoff versorgen. Dahingegen sind die größeren Arterien nur sekundär aufgrund einer Ischämie infolge einer gestörten Mikrozirkulation in den Vasa Vasorum betroffen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass typischerweise die von Atherosklerose verschonten Arterien, wie zum Beispiel die Arteria thoracica interna, wenig bis keine Vasa Vasorum enthalten, die erkranken können. Zudem ist bekannt, dass ein venöser Bypass weniger stark atheroskleroseähnlich degeneriert, wenn die Tunica adventitia inklusive der Vasa Vasorum bei der Operation erhalten bleibt (Haverich 2017). Einen weiteren Anhaltspunkt liefert eine Studie an 69 Patienten, die sich einer Karotisendariektomie unterzogen, und einen starken Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Vasa Vasorum externa und verschiedenen Kriterien der Plaquevulnerabilität (unter anderem das Vorkommen eines lipidreichen Kerns, Verdünnung der fibrösen Kappe und Infiltration von Makrophagen) zeigte. (Joo *et al.* 2019). Dies sind Bausteine im Verständnis der Pathogenese, die die Sicht auf die Atherosklerose in den kommenden Jahren möglicherweise weiter prägen werden.

## 1.2 Metabolisches Syndrom

### 1.2.1 Definition und klinische Bedeutung

Das metabolische Syndrom wurde bekannt als eine Gruppe von Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2, welche häufiger in Kombination als einzeln auftreten. Zu diesen gehören erhöhter Blutdruck, Dyslipidämie, erhöhte Nüchternblutzuckerwerte und zentrale Adipositas. Im Konsens haben mehrere Organisationen, unter anderem die American Heart Association (AHA), das National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) und die International Diabetes Federation (IDF), im sogenannten „Joint Interim Statement“ 2009 konkrete Kriterien (siehe Tabelle 2) zur Diagnose des metabolischen Syndroms definiert (Alberti *et al.* 2009).

	Männer	Frauen
erhöhter Taillenumfang	≥ 102 cm (AHA/NHLBI) ≥ 94 cm (IDF)	≥ 88 cm (AHA/NHLBI) ≥ 80 cm (IDF)
erhöhte Triglyceride	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl
erniedrigtes HDL-C	< 40 mg/dl	< 50 mg/dl
erhöhter Blutdruck	systolisch ≥ 130 und/oder diastolisch ≥ 85 mmHg	systolisch ≥ 130 und/oder diastolisch ≥ 85 mmHg
erhöhter Nüchternblutzucker	≥ 100 mg/dl	≥ 100 mg/dl

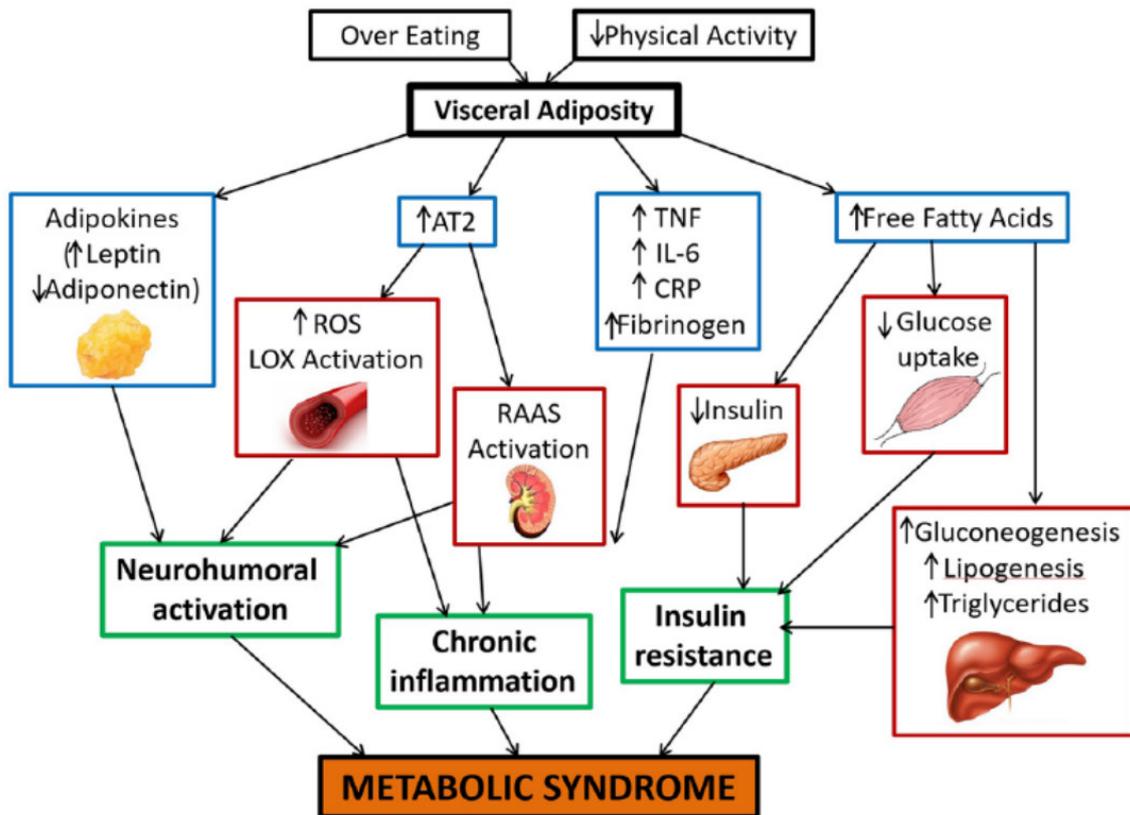
**Tabelle 2: Kriterien zur Diagnose des metabolischen Syndroms.** Nach dem Joint Interim Statement (Alberti *et al.* 2009). Bei medikamentöser Therapie mit Lipidsenkern, Antihypertensiva oder Antidiabetika werden die jeweiligen Kriterien ebenfalls als erfüllt betrachtet. Die hier angegebenen Kriterien für den Taillenumfang sind gültig für Europäer. Für andere ethnische Gruppen gelten abweichende Werte.

Zur Diagnosestellung des metabolischen Syndroms müssen 3 beliebige von den 5 möglichen Kriterien erfüllt sein. Für die Ermittlung des Taillenumfangs können entweder AHA/NHLBI-Kriterien herangezogen werden, welche etwa einem BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> entsprechen, oder die strengeren IDF-Kriterien, welche mit einem BMI von 25 kg/m<sup>2</sup> assoziiert sind (Alberti *et al.* 2009). Dem metabolischem Syndrom kommt klinisch eine beachtliche Bedeutung zu, da Patienten mit metabolischem Syndrom ein fünfmal erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 und ein zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer KHK innerhalb der nächsten 5 bis 10 Jahre haben (Alberti *et al.* 2009). Das metabolische Syndrom wird daher auch umgangssprachlich als „tödliches Quartett“ bezeichnet (McCracken *et al.* 2018). Zur Abschätzung des Risikos von kardiovaskulären Erkrankungen sollten jedoch alle

Risikofaktoren berücksichtigt werden, unabhängig davon, ob die Diagnose des metabolischen Syndroms gestellt werden kann. In den westlichen Ländern wird die Prävalenz insgesamt als hoch eingeschätzt, wobei es große Unterschiede zwischen den Nationen und den verwendeten Definitionen gibt (Kassi *et al.* 2011). Unter US-amerikanischen Erwachsenen wird unter Anwendung der Definition des Joint Interim Statements die Prävalenz beispielsweise auf 34,3 % geschätzt, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Ford *et al.* 2010).

### 1.2.2 Pathophysiologie

Die pathophysiologischen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt, dennoch scheinen zentrale Adipositas und Insulinresistenz eine primäre Rolle zu spielen, ebenso wie ein chronisch inflammatorischer Zustand und oxidativer Stress (McCracken *et al.* 2018). Dabei stellen Überernährung und Bewegungsmangel, resultierend in viszerale Adipositas, die wichtigsten Kausalitätsfaktoren für die Entstehung des metabolischen Syndroms dar (Rochlani *et al.* 2017). Das Fettgewebe fungiert als wichtiges endokrines Organ. Im Rahmen der Adipositas kommt es zu einer Dysbalance der sekretierten Botenstoffe (Nakamura *et al.* 2014), der sogenannten Adipokine (siehe Abschnitt 1.3). Dies führt zu einer verminderten Sekretion von Adiponektin und unter anderem zu einer gesteigerten Sekretion von Leptin, Angiotensin II (AT2), TNF- $\alpha$  und IL-6 in den Blutkreislauf. Darüber hinaus werden aus den Adipozyten große Mengen von Fettsäuren freigesetzt. Die freigesetzten Botenstoffe und Fettsäuren beeinflussen nachfolgend die Funktion verschiedener weiterer Organe. Es kommt zur neurohumoralen Aktivierung, chronischen systemischen Inflammation, Insulinresistenz und damit zum metabolischen Syndrom und zu kardiovaskulären Erkrankungen (Rochlani *et al.* 2017).



**Abbildung 2: Pathogenese des metabolischen Syndroms** (Rochlani *et al.* 2017). Überernährung und Bewegungsmangel führen zur viszeralen Adipositas. Dies führt im Fettgewebe zu einer veränderten Expression von Adipokinen, wobei es zu einer Erhöhung des Leptinspiegels und einer Verminderung des Adiponektinspiegels kommt. Dies führt zu einer neurohumoralen Aktivierung. Das Fettgewebe bildet zudem AT2, welches zum einen im Gefäß zur Bildung von ROS beiträgt und zur Expression von LOX-1 führt. Zum anderen wirkt AT2 über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), welches zusätzlich durch TNF, IL-6, C-reaktives Protein (CRP) und Fibrinogen aktiviert wird. Dies trägt ebenfalls zur neurohumoralen Aktivierung bei und führt zur chronischen Entzündung. Die vermehrte Freisetzung von Fettsäuren aus dem Fettgewebe führt zu einer verminderten Insulinfreisetzung aus dem Pankreas, zu einer verminderten Aufnahme von Glukose in die Muskelzellen sowie zu einer gesteigerten Glukoneogenese, Lipogenese und Triglyceridsynthese in den Leberzellen und somit zur Insulinresistenz.

Anzumerken ist jedoch, dass Adipositas und Insulinresistenz weder nach den Diagnosekriterien des Joint Interim Statements obligat sind, noch praktisch bei allen Patienten mit metabolischem Syndrom vorliegen und es zwischen den Geschlechtern Unterschiede gibt. So wiesen in der Studie von Ford *et al.* etwa 88 % aller Patienten mit metabolischem Syndrom Adipositas auf (Männer 81 %, Frauen 96,7 %) und etwa 69 % einen erhöhten Nüchternblutzucker (Männer 71,7 %, Frauen 65,2 %). Der Anteil der Patienten, zum Vergleich, mit erhöhten Triglyceriden lag bei etwa 70 %, mit erniedrigtem HDL bei 59 % und mit erhöhtem Blutdruck bei etwa 50 %. *Vice versa* entwickeln nicht alle adipösen Menschen ein metabolisches Syndrom (Ford *et al.* 2010). Dies mag zum einen daran liegen, dass weder Taillenumfang oder BMI eine direkte Aussage über den Körperfettanteil treffen, noch den inflammatorischen Zustand

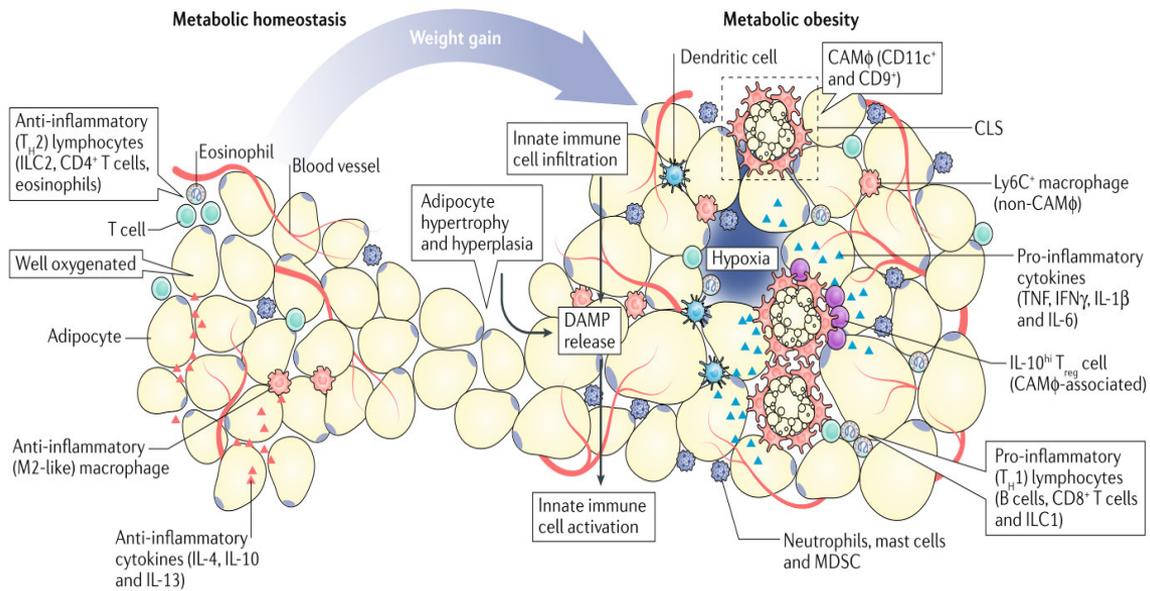
des Fettgewebes beschreiben (Quail und Dannenberg 2019). Zum anderen scheinen neben Adipositas eine Vielzahl weiterer Umweltfaktoren wie beispielsweise chronisch psychologischer Stress (Bergmann *et al.* 2014), die Zusammensetzung der Nahrung mit zum Beispiel hohem glykämischen Index unabhängig von den Kalorien (Ludwig und Friedman 2014), sowie genetische Einflüsse auf verschiedenen Ebenen eine Rolle zu spielen (Ordovas 2007). Das Zusammenspiel dieser Faktoren ist komplex und es ist daher fraglich, inwiefern es eine vereinende Pathogenese geben kann (Cornier *et al.* 2008).

### 1.2.2.1 Adipositas und das Fettgewebe

Zur Abschätzung des Körperfettanteils werden näherungsweise der Taillenumfang oder der Body-Mass-Index (BMI) verwendet. Bei einem BMI von 30,0 bis 34,9 kg/m<sup>2</sup> liegt bei Erwachsenen eine Adipositas Grad I vor, bei einem BMI von 35,0 bis 39,9 kg/m<sup>2</sup> eine Adipositas Grad II und bei einem BMI von 40 kg/m<sup>2</sup> oder mehr eine Adipositas Grad III (Greten *et al.* 2010). Übergewicht kann größtenteils durch eine Dysbalance zwischen der Energieaufnahme über die Nahrung und dem Energieverbrauch durch Bewegung erklärt werden. Zahlreiche Gene wurden identifiziert, die zur Entstehung des Übergewichtes beitragen (Qasim *et al.* 2018). Anhand von Zwillings- und Familienstudien wird die Erblichkeit von Adipositas auf über 50 % geschätzt (Elks *et al.* 2012).

Histologisch lässt sich eine Hypertrophie der Adipozyten beobachten während die Anzahl bei Erwachsenen überwiegend konstant bleibt. Dieser Prozess findet bei Männern vor allem an der vorderen Bauchwand, dem Rücken und dem Nacken statt. Bei Frauen nimmt das Fettgewebe vor allem an den Hüften, dem Gesäß, den Oberschenkeln und an den Oberarmen zu (Böcker *et al.* 2008; Ludwig und Friedman 2014). Von der Hypertrophie ist bei Erwachsenen das weiße Fettgewebe betroffen (*white adipose tissue*, WAT), welches allgemein als Speicherfett bekannt ist und abzugrenzen ist vom braunen Fettgewebe, welches überwiegend zur Wärmeproduktion dient (Roff und Jappy 2017). Initial werden überschüssige Kalorien in subkutanem Fettgewebe (*subcutaneous adipose tissue*, SAT) gespeichert. Ist die Aufnahmekapazität des subkutanen Fettgewebes erschöpft, wird der Energieüberschuss in Form von Fett in viszeralen Depots gespeichert (Blüher 2013). Bei Männer bildet sich hormonell bedingt leichter viszerales Fettgewebe (*visceral adipose tissue*, VAT), welches im Gegensatz zum SAT stark mit dem metabolischen Syndrom und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Palmer und Clegg 2015).

Das VAT zeichnet sich funktionell im Unterschied zum SAT durch eine verminderte Fähigkeit zur Angiogenese, ein vermindertes Ansprechen auf Insulin und durch eine erhöhte lipolytische Fähigkeit mit einer gesteigerten Freisetzung von Fettsäuren aus. Hypertrophes Fettgewebe ist zudem mit einer verstärkten Inflammation assoziiert, bedingt durch die infolge der Hypertrophie verminderte Sauerstoffversorgung und den verstärkten oxidativen Stress, aber auch durch die aus der Nahrung aufgenommen und gespeicherten Antigene (Blüher 2013). Normotrophe Adipozyten bilden überwiegend antiinflammatorische Adipokine, vor allem Adiponektin. Die Mikroumgebung ist durch die antiinflammatorischen Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  geprägt sowie von Makrophagen mit M2-Phänotyp (siehe Abbildung 3). Kommt es zur Hypertrophie, wird überwiegend Leptin gebildet, welches die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12, IL-18 und TNF- $\alpha$  bewirkt. Die Makrophagen nehmen einen proinflammatorischen M1-Phänotyp ein (Mancuso 2016). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Klassifizierung zwischen M1- und M2-Makrophagen eine starke Vereinfachung darstellt und die Makrophagen im Fettgewebe eine Vielzahl verschiedener Aktivierungszustände einnehmen können (Quail und Dannenberg 2019). Diese inflammatorischen Prozesse finden vor allem im viszeralen Fettgewebe statt (Mancuso 2016). Im Zuge der Hypertrophie kommt es durch bisher nicht geklärte Mechanismen zum Zelltod der Adipozyten, vermutlich durch Nekrose oder Pyroptose. Dabei werden eine Reihe von Bestandteilen wie zum Beispiel Lipide, Fettsäuren, Zytokine und Nukleinsäuren freigesetzt, welche als schadensassoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) die Akkumulation phagozytischer Makrophagen begünstigen (Quail und Dannenberg 2019). Dabei umgeben die Makrophagen den apoptotischen Adipozyten und bilden sogenannte kronenähnliche Strukturen (*crown-like structures*, CLSs). Innerhalb der CLSs sezernieren die Makrophagen lysosomale Enzyme durch Exozytose und bilden ein hydrolytisches Kompartiment, mit welchem sie größere Bestandteile des Adipozyten spalten. Die freigesetzten Lipide werden phagozytiert und es bilden sich, ähnlich wie in der Pathogenese der Atherosklerose, Schaumzellen. Die Makrophagen werden durch den nukleären Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) inflammatorisch weiter aktiviert, was möglicherweise den Zelltod weiterer Adipozyten zur Folge hat und die Inflammation aufrechterhält (Haka *et al.* 2016).



**Abbildung 3: Inflammation des Fettgewebes** (Quail und Dannenberg 2019). Bei Normalgewicht ist das Fettgewebe durch eine metabolische Homöostase gekennzeichnet und gut vaskularisiert. Es enthält Typ-2-Immunzellen wie Makrophagen mit M2-Phänotyp, Typ-2-T-Helferzellen (TH2-Zellen) und Eosinophile. Die Mikroumgebung des Fettgewebes ist durch antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13) geprägt. Bei Gewichtszunahme kommt es zur Hypertrophie und unter Umständen auch zur Hyperplasie der Adipozyten. Dies kann eine Hypoxie und den Zelltod der Adipozyten zur Folge haben. DAMPs werden freigesetzt und führen zur Infiltration von Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen und dendritischer Zellen. Es kommt zur Ausbildung von CLSs um den sterbenden Adipozyten herum, zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) sowie zur Akkumulation von proinflammatorischen Immunzellen wie Typ-1-T-Helferzellen (TH1-Zellen), B-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Die CLS-assoziierten Makrophagen (CAM $\phi$ ) exprimieren CD11c und CD9 und unterscheiden sich dadurch von den nicht-CLS-assoziierten Makrophagen (non-CAM $\phi$ ), welche das Lymphozytenantigen C6 (Ly6C) exprimieren. T<sub>reg</sub>: regulatorische T-Zelle; ILC: Innate lymphoide Zellen (*innate lymphoid cells*); MDSC: Myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*).

Die Entstehung von CLSs ist ein wichtiges Strukturmerkmal für die pathologischen Veränderungen im Fettgewebe im Rahmen der Adipositas. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorkommen von CLSs im Fettgewebe sowohl mit dem Auftreten von Insulinresistenz als auch mit dem metabolischen Syndrom korreliert (Quail und Dannenberg 2019). Daher werden CLSs nicht nur als wichtiger Biomarker für die Inflammation des Fettgewebes, sondern auch als guter Indikator für das metabolische Syndrom genutzt. Auch in Bezug auf andere Erkrankungen werden CLSs derzeit untersucht und sind beispielsweise prognoserelevant für Brustkrebserkrankungen (Quail und Dannenberg 2019). Hinsichtlich der Atherosklerose wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von CLSs und endothelialer Dysfunktion (Apovian *et al.* 2008) sowie der Bildung atherosklerotischer Plaques beschrieben (Öhman *et al.* 2008).

Viele der aus dem inflammatorischen Fettgewebe freigesetzten Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-6 spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose (Abschnitt 1.1.4). Ein Anstieg dieser Adipokine im Serum ist mit einer endothelialen Dysfunktion und einer atherogenen Wirkung assoziiert. Gleichzeitig kommt es im Zusammenhang mit Adipositas unter anderem zu einer verminderten Sekretion des antiinflammatorischen und kardioprotektiven Adipokins Adiponektin, welches beispielsweise am Funktionserhalt der eNOS beteiligt ist. Auf diese Weise trägt die viszerale Adipositas entscheidend zur Entstehung der Atherosklerose bei (Sarvottam und Yadav 2014).

Zum viszeralen Fettgewebe wird unter anderem auch das epikardiale Fettgewebe (*epicardial adipose tissue*, EAT) gezählt, in welchem die Herzkranzgefäße eingebettet sind. Neben der pathologischen Wirkung von endokrin sezernierten Adipokinen wird angenommen, dass auch die parakrine Sekretion aus dem EAT für die Entstehung der Atherosklerose relevant ist und die Adipokine durch Diffusion ebenfalls Vasa Vasorum, glatte Muskelzellen, Plauebestandteile und Endothelzellen erreichen können (Talman *et al.* 2014). Durch Transplantation von geringen Mengen Fettgewebe in gefäßnahe Regionen konnten Konanah *et al.* zeigen, dass entzündetes CLS-reiches Fettgewebe, im Vergleich zu gesundem Fettgewebe, selektiv in der direkten Umgebung Atherosklerose induziert (Konanah *et al.* 2017).

### 1.2.2.2 Insulinresistenz

Insulinresistenz bezeichnet im Allgemeinen ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf Insulin mit einer damit verbundenen reduzierten Aufnahme von Glukose. Neben genetischen Faktoren spielt in diesem Prozess Adipositas maßgeblich eine Rolle (Lebovitz 2001).

Hypertrophe Adipozyten im viszeralen Fettgewebe weisen eine gesteigerte lipolytische Aktivität auf und sezernieren vermehrt freie Fettsäuren (Blüher 2013). Die aus dem Adipozyten freigesetzten Fettsäuren führen über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) zu einer Aktivierung der Makrophagen und zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, zum Beispiel TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  wiederum führt bei Adipozyten zu einer verminderten Expression des Insulinrezeptors. So kommt es infolge des inflammatorischen Zustandes des Fettgewebes zunächst zu einer lokalen und primären Insulinresistenz. Ähnliche Prozesse können in der Leber stattfinden, bedingt durch einen hohen Anteil an Makrophagen und der Leberverfettung (Steatosis hepatis),

welche häufig in Zusammenhang mit Adipositas gefunden werden. Die verstärkte Freisetzung von Fettsäuren und Zytokinen kann eine sekundäre Insulinresistenz in anderen Organen wie der Skelettmuskulatur zur Folge haben (Luca und Olefsky 2008). Freie Fettsäuren werden in den Muskelzellen durch Diffusion sowie durch spezifische Transporter aufgenommen. Zusammen mit Entzündungsmediatoren führen die freien Fettsäuren im Zytoplasma zu einer Aktivierung verschiedener Serinkinasen, welche die Signaltransduktion über den Insulinrezeptor inhibieren. Das verminderte Ansprechen von Muskelzellen auf Insulin kann bereits mehrere Jahrzehnte vor Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 vorliegen (Rachek 2014). Dies wird zunächst durch eine vermehrte Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas kompensiert. Jedoch wirken die vermehrt freigesetzten Fettsäuren auch lipotoxisch auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas und es kommt im Verlauf zu einer Abnahme der Insulinsekretion. Infolgedessen kann zunehmend weniger Glukose in die Zellen transportiert werden (Rochlani *et al.* 2017). Daraus resultiert ein Anstieg des Blutzuckers. Beträgt dieser nüchtern  $\geq 126$  mg/dl, kann die Diagnose Diabetes mellitus gestellt werden. Im Verlauf der Erkrankung kann es zu makroangiopathischen (vorwiegend atherosklerotischen) und mikroangiopathischen Veränderungen kommen. Dabei werden Mikroangiopathien als diabetespezifisch angesehen und äußern sich klinisch in Folgeerkrankungen wie der diabetischen Retinopathie, der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Neuropathie (Braun und Müller-Wieland 2017). Mikroangiopathische Veränderungen sind zudem im Zusammenhang mit der Hypothese von Haverich von Bedeutung, welcher Atherosklerose als die Folge einer mikrovaskulären Erkrankung der Vasa Vasorum betrachtet (Haverich 2017). Pathomechanistisch kommt es zur Zunahme des oxidativen Stresses, unter anderem durch Autoxidation der Glukose, sowie zur Bildung von AGEs (Katakami 2018).

### **1.2.2.3 Dyslipoproteinämie**

Der Begriff Dyslipoproteinämie bezeichnet allgemein Fettstoffwechselstörungen und wird verwendet, um das Abweichen der Blutfettwerte von definierten risikoorientierten Grenzen zu beschreiben (Braun und Müller-Wieland 2017).

Die im Rahmen der Adipositas freigesetzten Fettsäuren werden auch von Leberzellen aufgenommen und tragen dort zur Entstehung einer Steatosis hepatis bei. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Synthese und Sekretion von VLDL-Partikeln, welche zum größten Teil aus Triglyceriden bestehen. HDL-Partikel reichern sich mit Triglyceriden an und werden verstärkt von hepatischen Lipoproteinlipasen abgebaut. In

der Folge kommt es zu erhöhten Triglycerid- und erniedrigten HDL-Spiegeln im Serum (Bays *et al.* 2013). Beides sind Diagnosekriterien des metabolischen Syndroms (siehe oben).

Für HDL wurden eine Reihe atheroprotektiver Effekte nachgewiesen, zum Beispiel die Wiederaufnahme von phagozytiertem Cholesterin aus Makrophagen (*reverse cholesterol transport*, RCT) sowie eine antiinflammatorische Wirkung auf das Endothel. Erniedrigte HDL-Werte sind wiederum mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (Hafiane und Genest 2013). Eine medikamentöse Erhöhung von HDL überzeugte bisher jedoch nicht hinsichtlich des kardiovaskulären Outcomes (Rosenson und Gotto 2013). Erhöhte Triglyceridwerte sind mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko assoziiert, jedoch ist nach Bereinigung gleichzeitig auftretender Risikofaktoren die Studienlage nicht mehr eindeutig (Bays *et al.* 2013). Dagegen ist für erhöhte LDL- und Gesamtcholesterinspiegel die Studienlage hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos klar und die Senkung durch Medikamente oder Lebensstiländerungen stellen ein zentrales Therapiekonzept dar (Reiner *et al.* 2011). In Bezug auf Adipositas zeigen die meisten Studien keine Assoziation mit erhöhten LDL-Werten, jedoch konnte eine veränderte Komposition der LDL-Partikel mit erhöhtem Gehalt an Apolipoprotein B bei verringerter Größe und erhöhter Anzahl nachgewiesen werden. Diese werden als *small dense* LDL (sdLDL)-Partikel bezeichnet und sind auch bei LDL-Werten im Normbereich mit einem erhöhten Risiko assoziiert, an KHK zu erkranken (Bays *et al.* 2013). Es konnte gezeigt werden, dass sdLDL-Partikel länger im Blut zirkulieren, anfälliger für Oxidation sind und leichter von Makrophagen aufgenommen werden können. Das im Rahmen der Adipositas vermehrte Vorkommen von sdLDL-Partikeln zusammen mit erhöhten Konzentrationen von Triglyceriden und verminderten Konzentrationen von HDL wird als atherogene Lipidtriade bezeichnet (Kulanuwat *et al.* 2015).

### 1.2.2.4 Hypertonie

Im Rahmen des metabolischen Syndroms weisen etwa 50 % der Patienten einen erhöhten Blutdruck auf (Ford *et al.* 2010). Die Pathogenese ist multifaktoriell und im Detail nicht geklärt (Braun und Müller-Wieland 2017). Es wird jedoch angenommen, dass im Rahmen des metabolischen Syndroms die Insulinresistenz zu einer Natriumretention in der Niere führt und zusammen mit den im Blut vermehrt zirkulierenden freien Fettsäuren eine Vasokonstriktion bewirkt. Die im viszeralen Fettgewebe vermehrte Bildung von AT<sub>2</sub> (siehe Abbildung 2) und verminderte

Produktion von Adiponektin tragen ebenfalls zur Entstehung der Hypertonie bei. Im Endothel kommt es dadurch unter anderem über die Aktivierung des Angiotensin-1 Rezeptors zur Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) und somit zur Bildung von ROS und zur Inflammation des Endothels (Rochlani *et al.* 2017).

### 1.3 Adipokine

Adipokine beschreiben eine heterogene Gruppe bioaktiver Peptide und Proteine, welche hauptsächlich im Fettgewebe produziert werden (Mugnai und Danese 2015). Der Begriff Adipokin wird in der Literatur jedoch nicht einheitlich verwendet. Einige Autoren fassen unter den Begriff Adipokin Zytokine auf, welche in den Adipozyten selbst produziert werden, beispielsweise Adiponektin, Leptin, Resistin, Visfatin, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Straub 2015). Die Mehrheit der Autoren schließen jedoch auch im Fettgewebe residente Zelltypen wie Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten ein. In der Tat wird ein Großteil der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) im Fettgewebe von Makrophagen und anderen Immunzellen gebildet (Fève *et al.* 2016). Die Begriffe Zytokin und Hormon werden in diesem Zusammenhang zuweilen auch synonym verwendet (Blüher 2019). Konsens besteht jedoch darüber, dass Adipokine komplexe regulatorische Funktionen erfüllen, zum Beispiel hinsichtlich des Energiestoffwechsels, der Gewichtshomöostase und der Insulinempfindlichkeit (Gressner und Arndt 2019). Im Rahmen der Adipositas kommt es, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, zu einer Dysregulation der Adipokinsekretion und damit zu metabolischen und kardiovaskulären Folgeerkrankungen. Der Erforschung von Adipokinen kommt daher ein großer Stellenwert zu. In der klinischen Praxis könnte beispielsweise zukünftig die Bestimmung von Adipokinen im Serum als zusätzlicher Indikator zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos etabliert werden oder etwa zur Erfolgskontrolle hinsichtlich der Reduktion von viszeralem Fettgewebe im Rahmen einer Adipositas- beziehungsweise Typ-2-Diabetestherapie dienen. Ebenso könnten zukünftig Adipokine oder Derivate als medikamentöse Therapie für metabolische und kardiovaskuläre Erkrankungen eingesetzt werden (Blüher 2019).

### 1.3.1 Das Adipokin CTRP3

Das Adipokin *C1q/TNF-related protein-3* (CTRP3) gehört zusammen mit dem Adipokin Adiponektin zur Familie der *C1q/TNF-related proteins* (CTRPs) (Wong *et al.* 2004), welche nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Komplementfaktor C1q und dem Zytokin TNF- $\alpha$  benannt ist (Shapiro und Scherer 1998). Aufgrund seiner überwiegend antiinflammatorischen Wirkung auf den Metabolismus und das kardiovaskuläre System steht CTRP3 derzeit im Interesse aktueller Forschungen (Chen *et al.* 2019).

CTRP3 wird vor allem im Fettgewebe exprimiert, weniger ausgeprägt auch in anderen Organen wie der Leber, der Skelettmuskulatur, den Testis und den Blutgefäßen (Li *et al.* 2017). Dabei wird CTRP3 beim Menschen im SAT stärker exprimiert als im VAT, bei Mäusen wiederum stärker im VAT als im SAT. Die CTRP3-Spiegel im Blutkreislauf korrelieren positiv mit den Adiponektin- und Leptinspiegeln (Schmid *et al.* 2020). In Hungerphasen wird vermehrt CTRP3 in den Blutkreislauf freigesetzt (Peterson *et al.* 2010). Ebenso konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität (Hasegawa *et al.* 2018) und eine Therapie mit Metformin (Tan *et al.* 2013) beim Menschen die Konzentration von CTRP3 im Serum erhöhen. Umgekehrt zeigen Studien mehrheitlich, jedoch nicht konsensuell, eine verringerte CTRP3-Konzentration im Serum bei Adipositas und/oder Typ-2-Diabetes. Zudem zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede, wobei Männer überwiegend erniedrigte CTRP3-Konzentrationen gegenüber Frauen aufweisen (Li *et al.* 2017). Eine Querschnittsstudie zeigte, dass adipöse Männer niedrigere CTRP3-Spiegel aufweisen als normalgewichtige Männer, adipöse Frauen hingegen höhere CTRP3-Spiegel als normalgewichtige Frauen (Wagner *et al.* 2016). Gewichtsreduzierende Interventionen an einem überwiegend weiblichen Patientenkollektiv führten zu einer Abnahme der CTRP3-Spiegel (Schmid *et al.* 2020). Unterschiede in der Studienlage könnten neben geschlechtsspezifischen Ursachen durch nicht einheitliche Kriterien für Adipositas zustande kommen. So konnte gezeigt werden, dass der Taillenumfang, welcher ein starker Indikator für viszerale Adipositas ist, deutlicher mit der CTRP3-Konzentration negativ korreliert als der BMI. Abweichend hohe CTRP3-Konzentrationen trotz Adipositas könnten als Schutzmechanismus gegen den metabolischen Stress aufgefasst werden (Elsaid *et al.* 2019).

Auf Adipozyten und Monozyten antagonisiert CTRP3 den TLR4, welcher unter anderem durch Lipopolysaccharid (LPS) und Fettsäuren aktiviert werden kann. Die Antagonisierung mit CTRP3 führt zu einer verminderten Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  sowie von MCP-1 (Kopp *et al.* 2010a). Bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus

kommt es jedoch durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Resistenz von CTRP3 hinsichtlich seiner antiinflammatorischen Wirkung auf die Monozyten (Kopp *et al.* 2010b). Ein *small interfering ribonucleic acid* (siRNA)-vermittelter Knockout (KO) in Adipozyten führt umgekehrt zu einem unreifen und proinflammatorischen Phänotyp, assoziiert mit einer verringerten Insulinsensitivität und einer verringerten Freisetzung von Adiponektin (Kopp *et al.* 2010a). Adiponektin wiederum weist antiinflammatorische, antidiabetogene und antiatherogene Eigenschaften auf (Blüher 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die antiinflammatorische Wirkung von intraperitoneal verabreichtem CTRP3 gegenüber LPS auch auf der Inhibition des Signalwegs der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) basiert (Schmid *et al.* 2014). Hinsichtlich des Fettgewebes ist bekannt, dass TLR4 für die Infiltration von Makrophagen essentiell ist und ein KO von TLR4 in Mäusen zudem der diätinduzierten Hypertrophie der Adipozyten, bei gleicher Energieaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe, entgegenwirkt (Davis *et al.* 2008).

Bei adipösen Mäusen zeigte eine Überexpression von CTRP3, bei gleichem Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe, eine verringerte hepatische Triglyceridsynthese, schützte vor der Entwicklung einer Steatosis hepatis und war mit einer verbesserten systemischen Insulinsensitivität assoziiert. Zudem zeigten sich niedrigere Konzentrationen von Gesamtcholesterin und TNF- $\alpha$  im Serum. Eine Therapie mit rekombinantem CTRP3 reduzierte eine Verfettung der Leber innerhalb kurzer Zeit (Peterson *et al.* 2013). Bei Mäusen mit CTRP3-KO zeigte sich jedoch, unabhängig von der Diät, nach 24 Wochen Fütterung keine Auswirkung auf die Insulinsensitivität oder das Lipidprofil im Serum. Dies führen Wolf *et al.* auf einen bisher unbekanntem Kompensationsmechanismus zurück. Das Körpergewicht und die magnetresonanztechnisch ermittelte Körperfettmasse waren in beiden Gruppen gleich. Die Leber wies einen höheren Triglyceridgehalt auf und die Serumkonzentrationen von IL-6 waren erhöht (Wolf *et al.* 2016). Eine Untersuchung an CTRP3-KO-Mäusen nach 20 Wochen Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Diät (*high-fat diet*, HFD) zeigte ebenfalls keine Auswirkung auf die Insulinsensitivität und das Körpergewicht. Die CTRP3-KO-Mäuse wiesen jedoch sowohl eine Verminderung der WAT-Masse als auch der Adipozytengröße auf. Eine Analyse des WAT zeigte eine verminderte Expression von Genen relevant für die Adipogenese, Lipogenese und Lipolyse, woraus Maeda und Wakisaka noch keine weiteren Schlussfolgerungen zogen (Maeda und Wakisaka 2020). Bei Mäusen mit einem adipozytenspezifischen CTRP3-KO unter einer Standarddiät zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion des Körpergewichts, der WAT-Masse sowie der Leptinspiegel. Die Morphologie der Leber und des WAT waren ebenso unverändert wie die Zelldifferenzierung und

Lipidakkumulation in isolierten Adipozyten. Es zeigte sich ein eher antiinflammatorischer Phänotyp des WAT mit verminderter MCP-1- und erhöhter CD206-Genexpression. Ein Einfluss auf die CTRP3-Serumspiegel ließ sich nicht nachweisen. Daher schließen Schmid *et al.* auf primär auto- oder parakrine Funktionen des adipozytären CTRP3 (Schmid *et al.* 2021). Insgesamt sind die Auswirkungen eines adipozytenspezifischen CTRP3-KO auf den Gesamtorganismus bisher wenig erforscht. Die Bedeutung einer adipozytären CTRP3-Defizienz unter metabolischem Stress wie zum Beispiel einer Fütterung mit HFD ist unbekannt.

In Bezug auf das kardiovaskuläre System konnte gezeigt werden, dass Patienten mit erhöhtem Blutdruck (Deng *et al.* 2015), KHK (Fadaei *et al.* 2016) und Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (*heart failure with reduced ejection fraction*, HFrEF) je nach Schweregrad (Gao *et al.* 2019) verringerte Konzentrationen von CTRP3 im Serum aufweisen. Erniedrigte CTRP3-Spiegel sind zudem mit einer erhöhten Hospitalisierungsrate aufgrund von HFrEF sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert (Gao *et al.* 2019). Die Konzentration von CTRP3 im Serum korreliert positiv mit der von HDL (Schmid *et al.* 2020). Anhand von Tiermodellen konnten für CTRP3 überwiegend eine Reihe kardioprotektiver Eigenschaften nachgewiesen werden. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass CTRP3 die hypoxieinduzierte Apoptose von murinen Kardiomyozyten abschwächen kann (Yi *et al.* 2012) oder die TNF- $\beta$ -vermittelte kardiale Fibrosierung in Rattenherzen nach einem Myokardinfarkt reduziert (Wu *et al.* 2015). Vereinzelt zeigten Studien jedoch auch gegensätzliche Effekte. Zum Beispiel aggravierte CTRP3 eine druckinduzierte Kardiohypertrophie (Ma *et al.* 2019) oder eine adenininduzierte arterielle Kalzifizierung (Zhou *et al.* 2014). Hinsichtlich der Atherogenese ist jedoch die Bedeutung von CTRP3 bislang wenig erforscht. Rekombinantes CTRP3 inhibiert *in vitro* die Aktivierung von Makrophagen über den TLR4-NF- $\kappa$ B-Signalweg, führt zum Efflux von Cholesterin und reduziert die oxLDL-induzierte Schaumzellbildung (Lin *et al.* 2017). Eine Überexpression von CTRP3 in Endothelzellen schützt vor einer oxLDL-induzierten Apoptose, reduziert die Expression von ICAM-1 und VCAM-1, vermindert die Produktion von IL-6 sowie von TNF- $\alpha$  und steigert die Bildung von NO durch die eNOS. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ApoE-KO-Mäuse mit atherosklerotischem Phänotyp eine verminderte Expression von CTRP3 in den atherosklerotischen Läsionen gegenüber der Kontrollgruppe mit ApoE-Wildtyp (ApoE-WT) aufweisen (Chen *et al.* 2019). Der Einfluss von CTRP3 als Adipokin auf die Plaquebelastung und die Komposition der Plaques ist jedoch bisher nicht erforscht. Auf der Grundlage bisheriger Forschung ist zu erwarten, dass CTRP3 inhibitorisch auf atherosklerotische Prozesse wirkt.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Im Fokus dieses Projekts steht der Einfluss des Adipokins CTRP3 auf metabolische Veränderungen im Lipid- und Insulinstoffwechsel, die Morphologie und Inflammation des Fettgewebes, sowie auf die Entwicklung der Atherosklerose im experimentellen Mausmodell. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass Mäuse mit einem adipozytenspezifischen CTRP3-KO nach 6 Wochen Fütterung mit einer HFD eine stärkere Zunahme des Körper- sowie des WAT-Gewichts im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Zudem wurde beobachtet, dass es bei den CTRP3-KO-Mäusen nach 6 Wochen zu Veränderungen im Lipidprofil bei einem insgesamt erhöhten Cholesterin kommt. Ein Einfluss auf die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität wurde nicht nachgewiesen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit folgenden Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat der adipozytenspezifische CTRP3-KO im Fettgewebe auf die Adipozytengröße, die Infiltration von Makrophagen und die Ausbildung von CLSs?
- Wie wirkt sich die adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz auf das Vorkommen, die Inflammation und die Morphologie von atherosklerotischen Plaques aus?
- In welchen weiteren Organen neben dem WAT wird CTRP3 exprimiert?

Zur Klärung dieser Fragen werden in dieser Arbeit LDLR-defiziente Mäuse mit adipozytenspezifischem CTRP3-KO untersucht und mit einer Kontrollgruppe, die CTRP3 exprimiert (CTRP3-WT), verglichen. Dabei wurden die Mäuse in beiden Gruppen für jeweils 6 beziehungsweise 12 Wochen mit einer HFD gefüttert, um einen metabolischen Phänotyp sowie atherosklerotische Plaquebildung auszulösen. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen erfolgt nach 6 beziehungsweise 12 Wochen Fütterung, um metabolische und atherosklerotische Veränderungen im Verlauf der Gewichtszunahme beurteilen zu können. An seriellen Schnitten des WAT soll die Größe der Adipozyten morphometrisch bestimmt und immunhistologisch das Vorkommen von Makrophagen und CLSs als Inflammationsmarker untersucht werden. Die Plaquebelastung soll quantitativ in der Aortenwurzel sowie in der thorakoabdominalen Aorta gemessen werden. Darüber hinaus soll die Komposition der Plaques hinsichtlich der Infiltration von Makrophagen, der Einlagerung von Lipiden und des Vorkommens eines nekrotischen Kerns charakterisiert werden. Neben der Charakterisierung des Fettgewebes und der Plaques bei KO-Mäusen soll zudem die Expression von CTRP3 in verschiedenen Organen von WT-Mäusen analysiert werden.

## 3 Materialien

### 3.1 Chemikalien

<u>Name:</u>	<u>Hersteller:</u>
1,2-Propandiol	Carl Roth GmbH
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DirectPCR® Lysis Reagent	Peqlab Biotechnologie GmbH
EDTA	Carl Roth GmbH
Eosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Formalin	Carl Roth GmbH
Gluko Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hämatoxylin Gill II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ImmPACTTM DAB Chromogen	Vector Laboratories Inc.
ImmPACTTM DAB Diluent	Vector Laboratories Inc.
Isofluran	Abbvie Deutschland GmbH & Co. KG
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Normal Goat Serum	Vector Laboratories Inc.
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Thermo Fischer Scientific Inc.
RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH
RNA-Solv® Reagent	Omega Bio-tek Inc.
Roti®-GelStain	Carl Roth GmbH
Salzsäure	Thermo Fischer Scientific Inc.
Tris/EDTA (TE)	Carl Roth GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH
VectaMount™ AQ	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA
Xylen	Thermo Fischer Scientific Inc.

**Tabelle 3: Chemikalien**

### 3.2 Puffer

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
TE-Puffer	Carl Roth GmbH
EDTA	Carl Roth GmbH

Tabelle 4: Puffer

### 3.3 Enzyme

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
MyTaq DNA Polymerase	Bioline GmbH
Proteinase K	GeneOn GmbH
SuperScript III Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 5: Enzyme

### 3.4 Reagenzkits

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
High Capacity cDNA Reverse Transcription	Applied Biosystems Inc.
ImmPACTTM DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc.

Tabelle 6: Reagenzkits

### 3.5 Antikörper

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
F4/80-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc.
MOMA-2	Acris Antibodies GmbH
Vector ImmPRESS Anti-rat IgG (Peroxidase)	Vector Laboratories Inc.

Tabelle 7: Antikörper

### 3.6 Primer

<u>Gen</u>	<u>Forward</u>	<u>Reverse</u>
Cre	5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3'	5'-CTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'
LoxP	5'-GAC ATA ATT CTC AGA GCT TGA CCG-3'	5'-CTT TGG ACA AGA GGA ATA TAT GGC-3'
LDLR	5'-ACC CCA AGA CGT GT CCC AGG ATG-3	5'-CGC AGT GCT CCT CAT CTG ACT TGT-3'
		5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA-3'

Tabelle 8: Primer zur Genotypisierung

<u>Gen</u>	<u>Forward</u>	<u>Reverse</u>
CTRP3	5'-GGG GTT CTT TAT GGA GCA TT-3'	5'-AAA TGC ATC CTT TGA GGT-3'

Tabelle 9: Primer zur Genexpressionsanalyse

### 3.7 Mäuse

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
LDLR <sup>-/-</sup> (B6.129S7-Ldlr <sup>tm1Her</sup> )	Jackson Laboratory and Charles River Inc.
CTRP3-Cre <sup>+</sup> (B6NTac.Cg-Tg(Fabp4-cre)1Rev.	TaconicArtemis GmbH
CTRP3-LoxP (B6NTac;Cg-C1qtnf3 <sup>tm3113Arte</sup> )	TaconicArtemis GmbH
CTRP3 <sup>-/-</sup> LDLR <sup>-/-</sup> Cre <sup>+</sup>	Eigene Züchtung
CTRP3 <sup>+/+</sup> LDLR <sup>-/-</sup> Cre <sup>-</sup>	Eigene Züchtung

Tabelle 10: Mäuse

### 3.8 Geräte

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Glukometer OneTouch Verio Flex®.	Johnson & Johnson Medical GmbH
Inkubator Heraeus b 5060 ek-c02	Kendro Laboratory Products GmbH
Integra Pipetboy	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH
Kamera EOS 600D Canon	Canon Deutschland GmbH
Kryotom Leica CM3050 S	Leica Microsystems GmbH
Leica DMI3000 B Mikroskop	Leica Microsystems GmbH
Mikrotom Microm HM 330	MICROM International GmbH
Nanodrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetten	Eppendorf AG
Präzisionswaage A&D EK-i	A&D Europe GmbH
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	Kendro Laboratory Products GmbH
Sicherheitswerkbank Heraeus Hb2448	Thermo Fisher Scientific Inc.
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH
Tissue-Tek® VIP E150 Tissue Processor	Sakura Finetek Europe B.V.
Vortex	Eppendorf AG
Wärmeschrank Memmert U10	Memmert GmbH + Co.KG
Wasserbad Microm SB 80	MICROM International GmbH

**Tabelle 11: Geräte**

### 3.9 Verbrauchsmaterialien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
BD Plastipak™ 1 ml	Becton Dickinson GmbH
CELLSTAR® Cell Culture Dishes	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel GmbH & Co KG
EDTA-beschichtete Röhrchen	Sarstedt AG & Co. KG
Falcon (50 und 15 ml)	Greiner Bio-One GmbH
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories, Inc.
Minutien Pins 0,2 mm	Fine Science Tools GmbH
Objekträger SuperFrost®Plus 25 x 75 x 1,00 mm	Menzel GmbH & Co KG
Papierhandtücher Kleenex® Medium	KIMBERLY-CLARK GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf AG
Sempercare® nitrile skin <sup>2</sup>	Semperit Technische Produkte Gesellschaft m.b.H
Standardfutter R-16	LASvendi gmbh
Tissue-Tek® Cryomold® Cryomold	Sakura Finetek Europe B.V.
Tissue-Tek® O.C.T™ Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH
Western Diet D12079B	Research Diets Inc.

**Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien**

### 3.10 Software

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Citavi 6.3	Swiss Academic Software GmbH
GraphPad Prism, Version 8.2.0.	GraphPad Software
ImageJ, Version 1.52	Wayne Rasband
Leica Application Suite, Version 4.7.0.	Leica Microsystems CMS GmbH
Office 2010	Microsoft

**Tabelle 13: Software**

## 4 Methoden

### 4.1 Tierversuche an Mäusen

#### 4.1.1 Rechtliche Grundlagen

Die hier beschriebene Züchtung und Haltung sowie die durchgeführten Versuche an den Mäusen erfolgten entsprechend den Anforderungen des Tierschutzgesetzes (TierSchG) und der Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA). Alle hier durchgeführten Tierversuche wurden zuvor durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Antragsnummer: G36/2017).

#### 4.1.2 Mausstämme

Um den Einfluss des Gens CTRP3 auf die Atherosklerose zu untersuchen, wurden  $LDLR^{-/-}$   $CTRP3^{-/-}$   $cre^{+}$  und  $LDLR^{-/-}$   $CTRP3^{+/+}$   $cre^{-}$  Mäuse im C57BL/6J-Hintergrund gezüchtet. Dazu wurden die in Tabelle 10 gelisteten Mauslinien verwendet. Der Erfolg der Züchtung wurde durch Genotypisierung (siehe unten) bestätigt.

#### 4.1.3 Tierhaltung

Die Mäuse wurden artgerecht entsprechend den Anforderungen des TierSchG und der FELASA in der Tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität Marburg gehalten. Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in individuell ventilierten Käfigen bei konstanter Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur. Der Tag-Nacht-Rhythmus erfolgte im 12-Stunden Takt bei künstlicher Beleuchtung. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig betrug 3 bis 6. Eine fett- und cholesterinreiche Diät (Western Diet, D12079B) sowie Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Diät setzte sich unter anderem aus 50 % Kohlenhydraten, 20 % Protein, 21 % Fett und 1,5 % Cholesterin zusammen. Nach 6 beziehungsweise 12 Wochen wurden unter Einhaltung einer Fastenzeit von 4 Stunden das Körpergewicht und die Glukosetoleranz bzw. Insulinresistenz gemessen. Zudem wurde unter Anästhesie mit Isofluran retroorbital Blut entnommen und in einem EDTA-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Mäuse durch eine Überdosis an

Ketamin und Xylazin getötet und die Organe für die weitere Durchführung der Experimente entnommen.

#### 4.1.4 Entnahme und Aufbereitung der Organe

An Organen wurden neben dem Blut das inguinale/epididymale Fettgewebe, die Aortenwurzel sowie die thorakoabdominale Aorta entnommen. Die Aorta wurde zunächst über den linken Ventrikel nach Durchtrennen der Vena cava mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bis zur Entfärbung des durchgeflossenen Puffers gespült. Nach Entnahme der Aortenwurzel folgte eine intrakardiale sowie anschließend distale Spülung mit Tissue-Tek® O.C.T™ Compound, um das Lumen inklusive der Aortenklappen darzustellen. Die Aortenwurzel wurde in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei minus 20 °C eingefroren. Die thorakoabdominale Aorta wurde in 4 % Formalin fixiert und bei 4 °C gelagert. Das Fettgewebe wurde jeweils gewogen und anschließend in Kooperation mit Prof. Kinscherf vom Institut für Anatomie und Zellbiologie in Paraffin gebettet. Dies geschah mithilfe des Tissue-Tek® VIP E150 Tissue Processor nach dem folgenden Protokoll (siehe Tabelle 14).

<u>Schritt:</u>	<u>Lösungsmittel:</u>	<u>Dauer:</u>	<u>Temperatur:</u>
1	70 % Ethanol	1 min	40 °C
2	80 % Ethanol	1 min	40 °C
3	90 % Ethanol	1 min	40 °C
4	96 % Ethanol	1 min	40 °C
5	100 % Ethanol	1 min	40 °C
6	100 % Ethanol	1 min	40 °C
7	100 % Ethanol	1 min	40 °C
8	100 % Xylol	1 min	40 °C
9	100 % Xylol	1 min	40 °C
10	100 % Xylol	1 min	40 °C
11	Paraffin	1 min	60 °C
12	Paraffin	1 min	60 °C
13	Paraffin	1 min	60 °C
14	Paraffin	1 min	60 °C

**Tabelle 14: Paraffineinbettung**

## 4.2 Genotypisierung

### 4.2.1 DNA-Isolation aus Mausgewebe

Eine Gewebeprobe aus dem Ohr der Mäuse wurde entsprechend der Herstelleranweisungen in 200 µl DirectPCR® Lysis Reagent mit 30 µl Proteinase K [20 mg/ml] über Nacht bei 56 °C unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 45 min bei 85 °C und Schütteln. Das nicht lysierte Gewebe wurde anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 21000 g abgetrennt. Zur Präzipitation der DNA wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Ethanol abpipettiert und das DNA-Pellet getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C verwahrt.

### 4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die isolierte DNA wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem T3000 Thermocycler amplifiziert. Zur Identifikation des CTRP3-Gens wurden die in Tabelle 8 beschriebenen Primer verwendet. Als DNA-Polymerase diente MyTaq™. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen (Tabelle 15).

Schritt	1	2	3	4	5	6
Temperatur (°C)	95	95	63	72	72	4
Zeit (s)	60	15	15	10	420	bis zur Entnahme
Wiederholungen	1	40	40	40	1	1

**Tabelle 15: Reaktionsbedingungen der PCR.** Schritt 1: Initiation; Schritt 2: Denaturierung; Schritt 3: Annealing; Schritt 4: Elongation; Schritt 5: Amplifikation; Schritt 6: Lagerung.

### 4.2.3 Gelelektrophorese

Die PCR Produkte wurden elektrophoretisch im 1,5 bis 2,0 % Agarosegel entsprechend ihrer Ladung beziehungsweise Größe aufgetrennt. Die Spannung betrug 120 V und die Laufzeit 30 min. Zur Auswertung der Banden dienten DNA-Fragmente definierter Größe als Referenz. Mittels des DNA-interkalierenden Farbstoffs Roti®-GelStain erfolgte die Detektion der Nukleinsäuren unter UV-Licht. Für den LDLR-KO zeigte sich eine Bande bei 800 bp, für LoxP bei 348 bp und für Cre bei 100 bp.

## 4.3 Genexpressionsanalyse

### 4.3.1 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels RNA-Solv® Reagent aus verschiedenen Organen entsprechend der Herstelleranweisung isoliert. Dazu wurden die Proben zunächst mechanisch zerkleinert und in 1 ml RNA-Solv® Reagent aufgenommen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde der Ansatz für 15 s im Vortex gemischt, für 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde entnommen und in 1,5 ml Röhrchen überführt. Auf Eis folgte die Zugabe von 2 µl GlycoBlue sowie von 500 µl eiskaltem Isopropanol. Die Proben wurden für 2 Stunden bei -20 °C stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das blaue RNA Pellet dreimal in 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen, wobei jeweils für 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Nachfolgend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet unter dem Abzug getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in bis zu 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Der Gehalt an RNA sowie die Reinheit wurde mit dem Nanodrop 1000 photometrisch bei 230 nm gemessen. Anschließend wurde die RNA bei minus 80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 4.3.2 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mittels dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit entsprechend den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Es wurden jeweils 10 µl Mastermix auf Eis angesetzt (siehe Tabelle 16) und die RNA der jeweiligen Probe in einem Volumen von 10 µl dazugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend in einem T3000 Thermocycler mit den in Tabelle 17 gelisteten Einstellungen.

<u>Komponente</u>	<u>Volumen [µl]</u>
10x RT-Puffer	2,0
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8
10x RT Random-Primer	2,0
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0
RNase-freies Wasser	4,2
Gesamt	10

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermix für die cDNA-Synthese**

Schritt	1	2	3	4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (s)	10	120	5	bis zur Entnahme

**Tabelle 17: Reaktionsbedingungen der cDNA-Synthese.** Schritt 1: Annealing der Primer; Schritt 2: cDNA-Synthese; Schritt 3: Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase; Schritt 4: Lagerung

### 4.3.3 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der transkribierten cDNA wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix verwendet und der Reaktionsansatz für die qPCR wie in Tabelle 18 beschrieben hergestellt. Für die Durchführung der qPCR wurde das System StepOnePlus™ und die in Tabelle 19 gelisteten Einstellungen verwendet. Als Haushaltsgen diente GAPDH. Nach jedem Zyklus wurde die Intensität der Fluoreszenz von SYBR Green gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand des Wertes des Threshold Cycle ( $C_T$ ), d.h. der Zyklusnummer, bei der die Fluoreszenz erstmals über das Hintergrundsignal ansteigt und die exponentielle Phase der Amplifikation beginnt. Die relative Genexpression wurde dabei nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode berechnet.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
Power SYBR <sup>®</sup> Green PCR Master Mix	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
RNase-freies Wasser	6
cDNA	2

**Tabelle 18: Reaktionsansatz für die qPCR**

Schritt	1	2	3	4
Temperatur (°C)	95	95	60	72
Zeit (s)	600	15	60	10
Wiederholungen	1	40	40	40

**Tabelle 19: Reaktionsbedingungen der qPCR.** Schritt 1: Initiale Denaturierung; Schritt 2: Denaturierung; Schritt 3: Annealing der Primer; Schritt 4: Elongation.

## 4.4 Analyse des Fettgewebes

### 4.4.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Aufgrund der besseren Strukturhaltung (Fischer *et al.* 2008) des Fettgewebes wurden Paraffinschnitte gegenüber Kryoschnitten vorgezogen. Das im Paraffin eingebettete Fettgewebe wurde auf minus 20 °C gefroren und anschließend bei Raumtemperatur am Mikrotom Microm HM 330 geschnitten. Die Schichtdicke betrug je nach Beschaffenheit des Fettgewebes 3 bis 4  $\mu$ m. Mehrere Schnitte wurden im Wasserbad Microm SB 80 bei 60 °C jeweils auf einen Objektträger gezogen und anschließend im Trockenschrank bei 60 °C für 1 Stunde fixiert.

### 4.4.2 Entparaffinierung und HE-Färbung

Vor der eigentlichen Färbung erfolgte zunächst eine Entparaffinierung der auf den Objektträgern fixierten Schnitte. Dies geschah mehrstufig in Küvetten mit verschiedenen Lösungsmitteln nach dem folgenden Schema (siehe Tabelle 20).

<b><u>Küvette:</u></b>	<b><u>Lösungsmittel:</u></b>	<b><u>Verweildauer:</u></b>
1	100 % Xylol	10 min
2	100 % Xylol	10 min
3	100 % Ethanol	5 min
4	100 % Ethanol	5 min
5	95 % Ethanol	2 min
6	70 % Ethanol	2 min
7	Destilliertes Wasser	5 min

**Tabelle 20: Waschschritte der Entparaffinierung**

Nachfolgend wurden die Objektträger 30 min lang bei 95 °C und einem pH von 8,0 in 1 mM EDTA-Lösung inkubiert, um verbleibendes Paraffin sowie mehrwertige Kationen herauszulösen.

Die HE-Färbung wurde durchgeführt, um die Adipozyten untereinander optisch abzugrenzen und nachfolgend eine Analyse der Adipozytengröße durchführen zu können. Während Hämatoxylin vor allem Zellkerne anfärbt, wird Eosin für die Färbung des Zytoplasmas verwendet (Burck 1988). Für die HE-Färbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 2 min mit einer nach Gill 2 modifizierten Hämatoxylin-Lösung gefärbt, für 2 s in 0,1 % Salzsäure differenziert und anschließend für 5 min unter fließendem warmem Leitungswasser gewaschen. Die Gegenfärbung geschah unter Einwirkung von 0,5 % Eosin-G für 5 min. Es folgten die in der Tabelle untenstehenden Waschschritte:

<b><u>Küvette:</u></b>	<b><u>Lösungsmittel:</u></b>	<b><u>Verweildauer:</u></b>
1	Destilliertes Wasser, fließend	30 s
2	50 % Ethanol	zehnmal Eintauchen
3	70 % Ethanol	zehnmal Eintauchen
4	95 % Ethanol	30 s
5	100 % Ethanol	1 min
6	100 % Xylol	zehnmal Eintauchen

**Tabelle 21: Waschschritte der HE-Färbung**

Mittels VectaMount™ AQ wurden die Objektträger eingedeckt.

### 4.4.3 Mikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen aller histologisch gefärbten Schnitte (siehe Tabelle 22) erfolgten am Leica DMI3000 B Mikroskop mit der dazugehörigen Software Leica Application Suite, Version 4.7.0. Als Mikroskopieverfahren wurde die Hellfeldmikroskopie gewählt.

Organ	Färbung	Aufnahmen pro Maus	Vergrößerung
WAT	HE	3	zehnfach
WAT	F4/80	3 x 2	zehnfach
Aortenwurzel	ORO	3 x 2	fünffach
Aortenwurzel	MOMA-2	2 x 2	fünffach

**Tabelle 22: Mikroskopische Aufnahmen der histologischen Schnitte**

### 4.4.4 Analyse der Adipozytengröße

Für die Messung der Adipozytengröße wurde das Programm ImageJ in der Version 1.52 verwendet. Die Adipozytengröße wurde über zwei verschiedene Methoden bestimmt. Zum einen erfolgte eine manuelle Auswertung durch Zählung aller Adipozyten auf einer definierten Fläche von 240000  $\mu\text{m}^2$  und anschließender Berechnung der mittleren Adipozytengröße [ $\mu\text{m}^2$ ]. Zum anderen erfolgte eine automatische Auswertung. Dazu wurde zunächst eine Farbtiefe von 8 Bit verwendet und der Einfluss variierender Intensitäten des Hintergrunds über die Funktion „*subtract background*“ minimiert. Über die Funktion „*threshold*“ wurde jeweils ein Schwellenwert gewählt, welcher unter bestmöglicher Bewahrung von Form und Größe die Adipozyten untereinander differenzierte. Daraufhin folgte eine Messung der Adipozytengröße [ $\mu\text{m}^2$ ] über die Funktion „*analyse particles*“. Objekte kleiner als 200  $\mu\text{m}^2$  und größer als 7000  $\mu\text{m}^2$  wurden über diese Funktion ausgeschlossen, da diese überwiegend Artefakte darstellten. Bei beiden Verfahren wurden für die Bestimmung der mittleren Größe der Adipozyten pro Maus jeweils 3 Aufnahmen herangezogen.

### 4.4.5 Entparaffinierung und F4/80-Färbung

Um das Vorkommen von Makrophagen im Fettgewebe auswerten zu können, wurde eine für murine Makrophagen etablierte F4/80-Färbung durchgeführt. F4/80 ist ein

Oberflächenrezeptor von Makrophagen, welcher zum Teil jedoch auch von dendritischen Zellen exprimiert wird (Murray und Wynn 2011).

Für die F4/80-Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung wie in Tabelle 20 geschildert. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min bei Raumtemperatur in einem Gemisch mit 40 % Methanol und 0,3 % Wasserstoffperoxid inkubiert, um durch Blocken der endogenen Peroxidase eine unspezifische Färbung zu verhindern. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mit ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen umrandet. Es folgte eine Antigendemaskierung mit der Proteinase K für 4 min. Die Konzentration der Proteinase K betrug 20 µg/ml in der Arbeitslösung bestehend aus einem TE-Puffer mit einem pH von 8,0. Vor jeder Färbung wurde die Arbeitslösung frisch hergestellt. Dazu wurde 1 ml Proteinase K Stammlösung aufgetaut und mit 19 ml TE-Puffer gemischt. Nach der Antigendemaskierung folgte für 5 min ein Waschschriff in einem Gemisch aus 0,1 % Tween 20 in PBS. Anschließend folgte für 30 min eine Blockierung mit 2,5 % Normal Goat Serum, um eine unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Die Inkubation mit dem für Makrophagen spezifischen Primärantikörper F4/80 erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Konzentration der Arbeitslösung betrug 0,5 µg/ml und wurde jeweils frisch hergestellt aus 1 µl Stammlösung des Herstellers (0,5 mg/ml) und 999 µl 2,5 % Normal Goat Serum. Als Negativkontrolle wurde pro Objektträger jeweils 1 Schnitt von der F4/80-Färbung ausgespart und stattdessen über Nacht mit 2,5 % Normal Goat Serum inkubiert. Am nächsten Tag folgten für jeweils 5 min 3 Waschschriffe mit einem Gemisch aus 0,1 % Tween 20 in PBS. Es folgte für 30 min die Inkubation mit dem Zweitantikörper ImmPRESS™ Anti-rat IgG Peroxidase bei Raumtemperatur. Nach 3 weiteren Waschschriffen für jeweils 5 min mit 0,1 % Tween 20 in PBS folgte die Färbung durch Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für 45 min. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde ein Tropfen ImmPACT™ DAB Chromogen (ca. 30 µl) entsprechend der Herstelleranweisungen mit 1 ml ImmPACT™ DAB Diluent gemischt. Es folgten 2 Waschschriffe für jeweils 5 min in destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit nach Gill II modifiziertem Hämatoxylin für 1 min. Die Objektträger wurden für 1 min in fließendem warmem Leitungswasser gespült und für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Mittels VectaMount™ AQ wurden die Objektträger eingedeckt.

#### 4.4.6 Analyse der Makrophagen

Für die Messung der über den Antikörper F4/80 angefärbten Fläche wurde das Programm ImageJ in der Version 1.52 verwendet. Es erfolgte eine automatische Auswertung der Fläche über die Funktion „*analyse particles*“. Dazu wurde zunächst der Einfluss variierender Intensitäten des Hintergrunds über die Funktion „*subtract background*“ minimiert. Es folgte eine Aufarbeitung der Braunfärbung durch das DAB über das Tool „*colour deconvolution*“ mit dem Vektor „H DAB“. Über die Funktion „*threshold*“ wurde jeweils ein Schwellenwert gewählt, welcher die Färbung auf den Schnitten bestmöglich darstellte und dabei wenig Fläche in der Negativkontrolle markierte. Es folgte die Messung der markierten Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ] über die Funktion „*analyse particles*“. Pro Maus wurden 3 Aufnahmen jeweils mit und ohne Färbung ausgewertet und die Messergebnisse gemittelt. Die mittlere Farbfläche der Negativkontrolle [ $\mu\text{m}^2$ ] wurde als Nullwert definiert und von der mittleren Farbfläche unter F4/80-Färbung [ $\mu\text{m}^2$ ] subtrahiert.

### 4.5 Analyse der Atherosklerose

#### 4.5.1 Oil Red O (ORO)-Färbung der Aortenwurzel

Zur Darstellung von Lipideinlagerungen und atherosklerotischen Plaques wurde die Aortenwurzel mit dem lipophilen Farbstoff ORO angefärbt. ORO ist für diese Zwecke ein häufig verwendeter Farbstoff, welcher sich zwischen neutrale Lipide wie Triglyceride und Cholesterinester lagert, jedoch nicht zwischen polare Lipide wie sie in Zellmembranen zu finden sind (Andrés-Manzano *et al.* 2015).

Zunächst wurden am Kryotom Leica CM3050 S von der Aortenwurzel jeweils 8  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Für die Färbung wurden pro Maus dreimal 2 Schnitte in ca. 200, 500 und 800  $\mu\text{m}$  Entfernung zum Beginn der Aortenklappen ausgewählt. Die Schnitte wurden jeweils 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Es folgte eine Fixierung mit 4 % kaltem Formalin für 5 min sowie ein weiterer Trocknungsschritt für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Aortenwurzeln für 3 min mit 100 % 1,2-Propandiol dehydriert und mit 0,6 % ORO in 85 % 1,2-Propandiol für 2 Stunden bei 60 °C gefärbt. Die Schnitte wurden dreimal für jeweils 5 min in Küvetten mit 85 % 1,2-Propandiol unter mehrmaligem Eintauchen gewaschen. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Dazu wurden die Schnitte zunächst für 2 min in destilliertem Wasser rehydriert, für 2 min mit Hämatoxylin nach Gill II gefärbt und anschließend für 5 min unter fließendem warmem Wasser gewaschen. Mittels VectaMount™ AQ wurden die Schnitte auf den Objektträgern eingedeckt.

#### 4.5.2 Analyse der Lipidakkumulation in der Aortenwurzel

Zur Analyse der ORO-gefärbten Fläche wurde das Programm ImageJ in der Version 1.52 verwendet. Zunächst wurde der Einfluss variierender Intensitäten des Hintergrunds über die Funktion „*subtract background*“ minimiert. Es folgte eine Aufarbeitung der roten ORO-Färbung durch das Tool „*colour deconvolution*“ mit dem Vektor „RGB“. Über die Funktion „*threshold*“ wurde ein Schwellenwert gewählt, welcher die Färbung auf den Schnitten bestmöglich darstellte. Über die Funktion „*analyse particles*“ wurde innerhalb der Aorta die markierte Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ] bis zur Grenze zwischen Tunica adventitia und Tunica media gemessen. Anschließend wurde die markierte Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ] innerhalb des Lumens inklusive distaler Klappenanteile gemessen und vom ersten Wert subtrahiert, um eine Aussage über die ORO-gefärbte Fläche innerhalb der Tunica media und Tunica intima inklusive des proximalen Ansatzes der Klappen treffen zu können. Dieser Wert wurde in Relation zu der Querschnittsfläche der Aorta [ $\mu\text{m}^2$ ] gesetzt, bemessen anhand des Umfangs an der Grenze zwischen Tunica adventitia und Tunica media durch das Tool „*freehand*“ und die Funktion „*measure*“. Pro Maus wurden 3 Aufnahmen in ca. 200, 500 und 800  $\mu\text{m}$  Entfernung zum Aortenursprung ausgewertet und gemittelt.

#### 4.5.3 Analyse der Plaqueläche in der Aortenwurzel

Zusätzlich zur Analyse der ORO-positiven Fläche wurde die Plaqueläche direkt vermessen. Dazu wurden die Plaques mit dem Programm ImageJ Version 1.52 manuell ohne vorherige Farbaufarbeitung mit dem Tool „*freehand*“ umrandet. Anschließend wurde mit der Funktion „*measure*“ der Flächeninhalt [ $\mu\text{m}^2$ ] bestimmt. Die Fläche wurde prozentual zur Querschnittsfläche der Aorta [ $\mu\text{m}^2$ ] (siehe oben) angegeben. Pro Maus wurden ebenfalls 3 Aufnahmen in ca. 200, 500 und 800  $\mu\text{m}$  Entfernung zum Aortenursprung ausgewertet und gemittelt.

#### 4.5.4 Analyse des nekrotischen Kerns

Für die Analyse des nekrotischen Kerns wurden die Aufnahmen der mit ORO und Hämatoxylin gefärbten Aortenwurzeln herangezogen. Als nekrotischer Kern wurde nach Solanki *et al.* die Fläche innerhalb einer Plaque definiert, welche frei von hämatoxylingefärbten Zellkernen ist. Dabei darf die Fläche azellulär und ORO gefärbt sein (Solanki *et al.* 2017).

Die definierten Flächen wurden mit dem Programm ImageJ, Version 1.52, manuell mit dem Tool „*freehand*“ markiert. Anschließend wurde über die Funktion „*measure*“ der Flächeninhalt [ $\mu\text{m}^2$ ] bestimmt. Flächen  $< 3000 \mu\text{m}^2$  wurden nach Solanki *et al.* von der Auswertung ausgeschlossen, da diese häufig in den gefärbten Schnitten vorkommen, möglicherweise Artefakt bedingt sind und nicht substanziiell zur Fläche des nekrotischen Kerns beitragen (Solanki *et al.* 2017). Die Fläche des nekrotischen Kerns wurde in Relation zur ermittelten Plaquefläche (siehe oben) angegeben.

#### 4.5.5 MOMA-2-Färbungen der Aortenwurzel

Zur Darstellung der Infiltration von Makrophagen in der Aortenwurzel wurden pro Maus zweimal 2 Schnitte mit dem Antikörper MOMA-2 gefärbt. Mit der MOMA-2-Färbung werden sowohl Monozyten als auch Makrophagen angefärbt. Dendritische Zellen interagieren nur schwach mit dem MOMA-2 Antikörper (Kraal *et al.* 1987).

Die Schnitte wurden zunächst für 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend folgte für 5 min eine Fixierung in Aceton bei minus 20 °C. Die Schnitte wurden erneut für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und nachfolgend dreimal für jeweils 5 min in einem Gemisch aus 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 30 min in 100 % Methanol mit 0,3 % Wasserstoffperoxid inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte für jeweils 5 min in PBS mit 0,05 % Tween 20. Die Schnitte wurden mit ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen umrandet und für 30 min bei Raumtemperatur mit 2,5 % Normal Goat Serum geblockt. Die Inkubation mit dem Primäantikörper MOMA-2 erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Konzentration der Arbeitslösung betrug 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und wurde jeweils frisch hergestellt aus 3  $\mu\text{l}$  Stammlösung des Herstellers und 1197  $\mu\text{l}$  2,5 % Normal Goat Serum. Am nächsten Tag folgten für jeweils 5 min 3 Waschschrte mit 0,05 % Tween 20 in PBS. Es folgte für 30 min die Inkubation mit dem Zweitantikörper ImmPRESS™ Anti-rat IgG Peroxidase bei Raumtemperatur. Nach 3

weiteren Waschschritten für jeweils 5 min mit 0,05 % Tween 20 in PBS folgte die Färbung durch Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für 30 s. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde ein Tropfen ImmPACT™ DAB Chromogen (ca. 30 µl) entsprechend der Herstelleranweisungen mit 1 ml ImmPACT™ DAB Diluent gemischt. Es folgten 2 Waschschriffe für jeweils 5 min mit destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit nach Gill II modifiziertem Hämatoxylin für 1 min. Die Objektträger wurden für 1 min in fließendem warmem Leitungswasser gespült und für 5 min in destilliertem Wasser gewaschen. Mittels VectaMount™ AQ wurden die Objektträger eingedeckt.

#### 4.5.6 Analyse des Makrophagenanteils in der Aortenwurzel

Die Analyse des Gehaltes an Makrophagen erfolgte mit dem Programm ImageJ in der Version 1.52. Der Einfluss variierender Intensitäten des Hintergrunds wurde über die Funktion „*subtract background*“ minimiert. Anschließend wurde mithilfe des Tools „*colour deconvolution*“ und dem Vektor „H DAB“ die Braunfärbung herausgefiltert. Es wurde mit der Funktion „*threshold*“ ein Schwellenwert gewählt, welcher die Färbung bestmöglich darstellte, und anschließend über die Funktion „*analyse*“ die Gesamtfläche der Färbung [ $\mu\text{m}^2$ ] bestimmt.

Das Ergebnis wurde prozentual auf die Querschnittsfläche der Aorta [ $\mu\text{m}^2$ ] beziehungsweise auf die Plaquefläche [ $\mu\text{m}^2$ ] bezogen, welche, wie oben bereits beschrieben, bestimmt wurden. Pro Maus wurden 2 Aufnahmen in verschiedenen Entfernungen zum Aortenursprung ausgewertet und gemittelt.

#### 4.5.7 ORO-Färbung der thorakoabdominalen Aorta

Nach der Fixierung in Formalin wurden die Aorten über Nacht unter Schwenken in PBS bei 4 °C gewaschen. Am nächsten Tag wurden die Aorten mit 100 % 1,2-Propandiol dehydriert und für 2 Stunden bei 37 °C mit 0,6 % ORO in 85 % 1,2-Propandiol gefärbt. Anschließend wurden die Aorten für dreimal 5 min unter Schütteln in 85 % 1,2-Propandiol gewaschen und über Nacht bei 4 °C in PBS gelagert. Zur Darstellung des Lumens wurden die Aorten longitudinal eröffnet und mit Nadeln auf schwarz gefärbtes Silikon gepinnt. Nachfolgend wurden Aufnahmen mit der Kamera EOS 600D Canon gemacht.

#### 4.5.8 Plaquebelastung in der thorakoabdominalen Aorta

Die Analyse der Plaquebelastung erfolgte mit dem Programm ImageJ in der Version 1.52. Zunächst wurde die Intimafläche der gepinnten Aorta [ $\mu\text{m}^2$ ] über das Tool „*freehand*“ markiert und über die Funktion „*measure*“ bestimmt. Nachfolgend wurde über die Funktion „*subtract background*“ der Einfluss variierender Intensitäten des Hintergrunds minimiert. Mithilfe des Tools „*colour deconvolution*“ und dem Vektor „RGB“ wurde nach der Farbe der rot gefärbten Plaques gefiltert. Über die Funktion „*threshold*“ wurde ein Schwellenwert gewählt, welcher die Plaques darstellte und dabei die anderen Teile der Aorta aussparte. Die Gesamtfläche der Plaques [ $\mu\text{m}^2$ ] wurde mithilfe der Funktion „*analyse*“ bestimmt und das Ergebnis von jeder Maus prozentual bezogen auf die Querschnittsfläche der Aorta angegeben.

#### 4.6 Statistische Analyse

Die abschließende statistische Auswertung zwischen den Gruppen sowie die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism in der Version 8.2.0. Es wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Sofern nicht anders angegeben wurde ein Zweistichproben-t-Test verwendet, unter der Annahme, dass die Stichproben der Mausgruppen voneinander unabhängig sind. Ein P-Wert  $< 0,05$  wurde dabei als statistisch signifikant betrachtet.

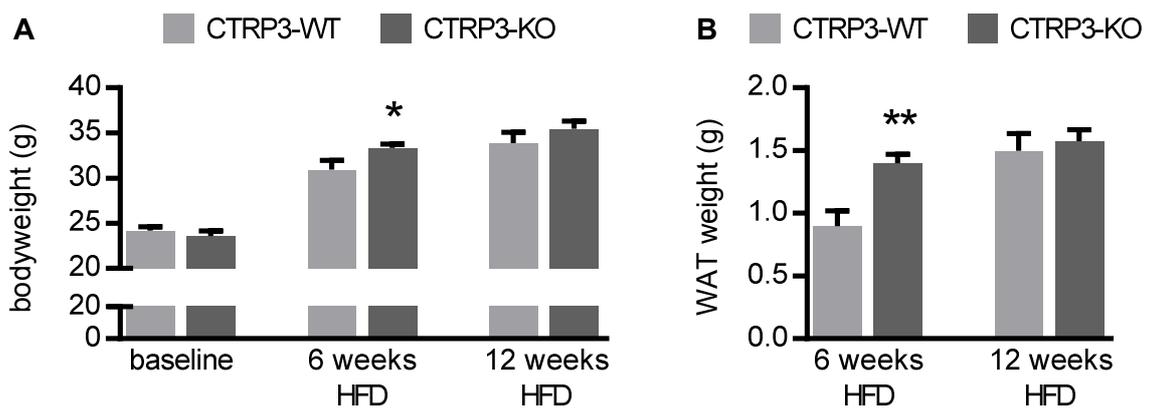
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Zum besseren Verständnis sind im Nachfolgenden Ergebnisse dargestellt, die vor Beginn dieser Dissertation bereits vorlagen.

#### 5.1.1 Erhöhte Gewichtszunahme der CTRP3-KO-Mäuse

Im Alter von 10 Wochen begann die Fütterung mit einer HFD für insgesamt 12 Wochen. Im Verlauf wurde das Körpergewicht sowie das WAT-Gewicht nach 6 beziehungsweise 12 Wochen gemessen (siehe Abbildung 4).



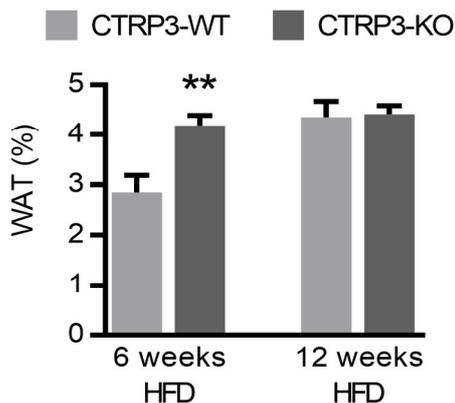
**Abbildung 4: Körpergewicht und WAT-Gewicht nach 6 und 12 Wochen Fütterung mit HFD.** Angegeben ist das Körpergewicht (A) beziehungsweise das WAT-Gewicht (B) mit den Mittelwerten + SEM. n = 7 – 12 pro Genotyp. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01 versus CTRP3-WT.

Vor Beginn der Fütterung mit einer HFD (baseline) unterschieden sich CTRP3-KO- und CTRP3-WT-Mäuse nicht im Körpergewicht und wogen ca. 24 g. Nach 6 Wochen zeigten die CTRP3-KO- verglichen mit den CTRP3-WT-Mäusen ein signifikant erhöhtes Körpergewicht ( $33,5 \pm 0,5$  g gegenüber  $31,3 \pm 0,8$  g). Der Trend im Gewichtsunterschied blieb nach 12 Wochen bestehen ( $35,4 \text{ g} \pm 0,9$  g gegenüber  $33,9 \text{ g} \pm 1,2$  g), jedoch war dieser nicht mehr signifikant.

Analog zeigten nach 6 Wochen die CTRP3-KO- gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen eine signifikante WAT-Gewichtszunahme. Dementsprechend hatten nach 6 Wochen die CTRP3-KO-Mäuse ca. 60 % größere WAT-Depots als die CTRP3-WT-Mäuse. Dieser Effekt war jedoch ebenfalls nach 12 Wochen nicht mehr vorhanden.

Von Woche 6 zu Woche 12 zeigten die CTRP3-KO-Mäuse nur noch eine geringe Zunahme des WAT-Gewichts um ca. 10 %. Das WAT-Gewicht der CTRP3-WT-Mäuse nahm in diesem Zeitraum um ca. 70 % zu.

Um zu überprüfen, ob das erhöhte WAT-Gewicht für das erhöhte Körpergewicht verantwortlich ist, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil des WAT-Gewichts am Körpergewicht berechnet. Nach 6 Wochen unterschied sich der WAT-Anteil der beiden Gruppen signifikant, wobei die CTRP3-KO- gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen einen ca. 50 % größeren Anteil des WAT-Gewichts am Körpergewicht aufwiesen. Nach 12 Wochen war jedoch der Anteil des WAT-Gewichts beider Gruppen annähernd gleich (siehe Abbildung 5). Folglich lässt sich das erhöhte Körpergewicht der CTRP3-KO-Mäuse nach 6 Wochen maßgeblich auf eine Zunahme des WAT-Gewichts zurückführen.

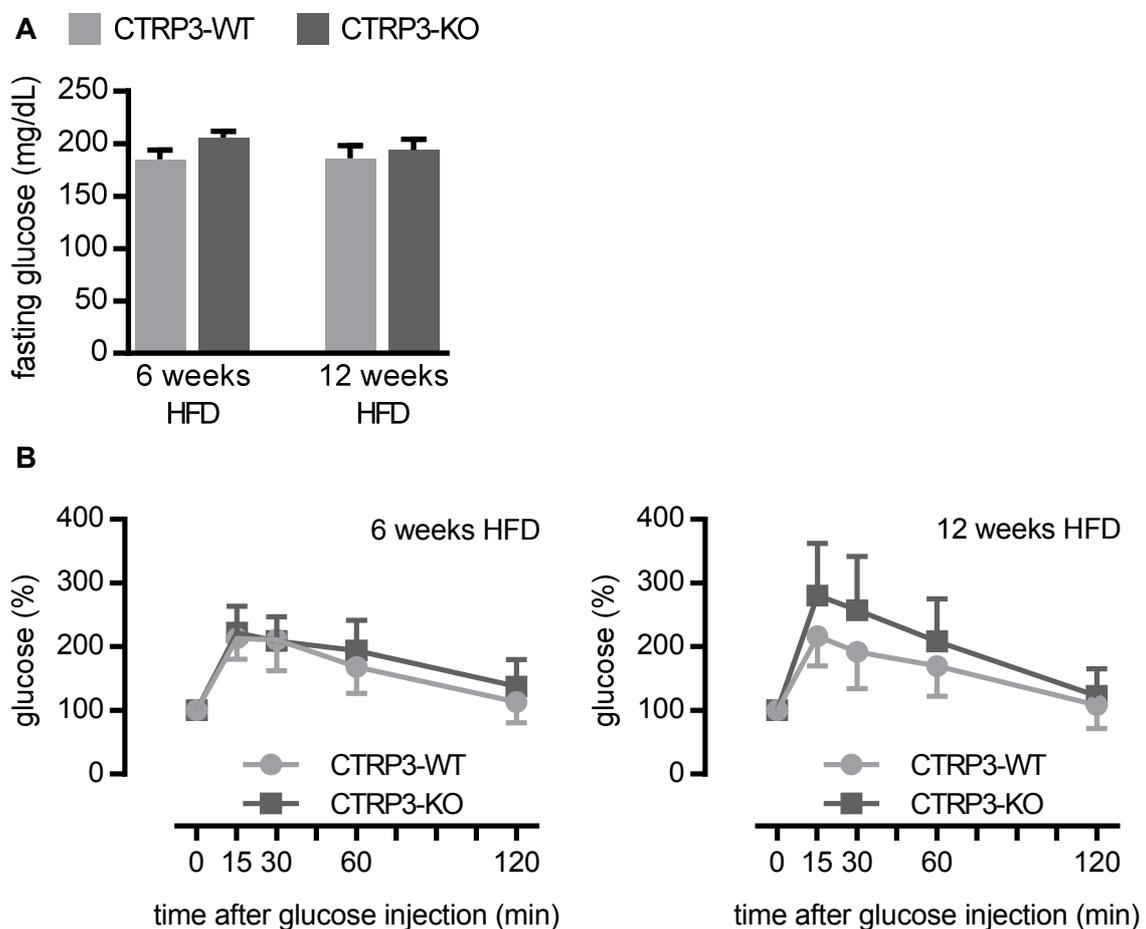


**Abbildung 5: Anteil des WAT am Körpergewicht.** Das WAT-Gewicht wurde prozentual auf das Körpergewicht bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM. n = 7 – 12 pro Genotyp. \*\*P < 0,01 versus Kontrollgruppe.

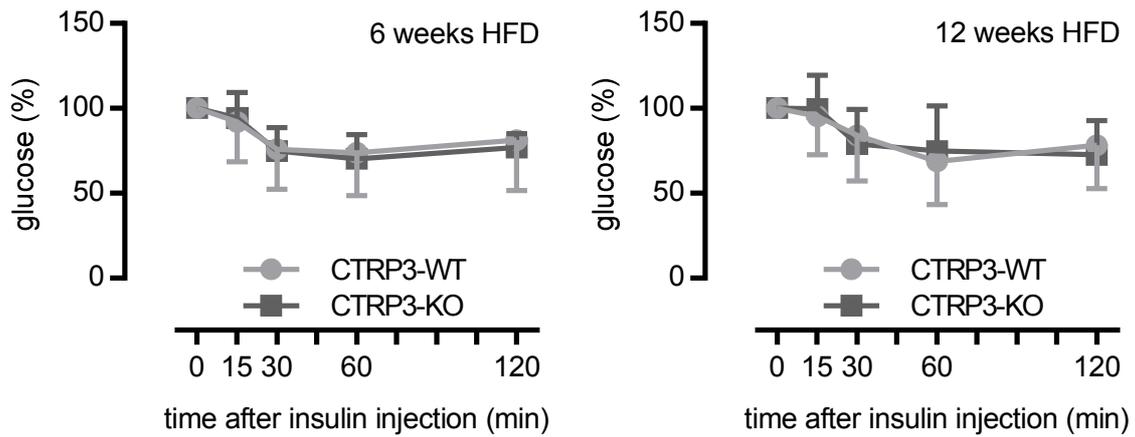
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CTRP3-KO- und CTRP3-WT-Mäuse sich nach 6 Wochen Fütterung mit einer HFD signifikant im Körper- und WAT-Gewicht, aber auch im WAT-Anteil unterscheiden. Diese Differenzen sind nach 12 Wochen Fütterung nicht mehr zu beobachten. Bei gleichen Ausgangsgewichten zeigt der zeitliche Verlauf eine schnellere Gewichtszunahme der CTRP3-KO-Mäuse in der ersten Hälfte der Fütterungsperiode und ein Angleichen auf ein Gewichtsniveau ähnlich der CTRP3-WT-Mäuse zum Ende der Fütterungsperiode.

### 5.1.2 Keine erhöhten Glukosewerte der CTRP3-KO-Mäuse

Nach einer Fastenzeit von 4 Stunden wurde die Nüchternglukose im venösen Blut gemessen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den CTRP3-KO- und den CTRP3-WT-Mäusen. Zur Messung der Glukosetoleranz (siehe Abbildung 6) und Insulinsensitivität (siehe Abbildung 7) wurden intraperitoneal entweder eine Glukose- oder Insulinlösung verabreicht und die Glukosekonzentration im venösen Blut über einen Zeitraum von 2 Stunden gemessen. Zu den gemessenen Zeitpunkten bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Glukosewerten der CTRP3-KO- und der CTRP3-WT-Mäuse.

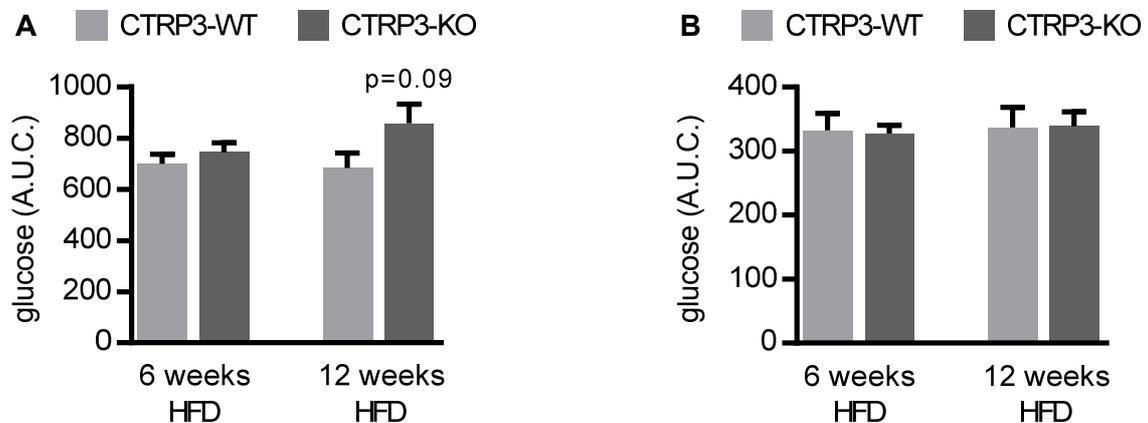


**Abbildung 6: Nüchternglukose und Glukose nach Applikation einer Glukoselösung.** Das Säulendiagramm zeigt die Nüchternglukose nach 4 Stunden Fastenzeit (A). Die Liniendiagramme (B) zeigen den Verlauf der Glukosewerte nach Applikation von Glukose (1,25 g/kg Körpergewicht) nach 6 Wochen Fütterung (links) und 12 Wochen Fütterung (rechts). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abbildung 7: Glukosespiegel vor und nach Applikation von Insulin.** Die Liniendiagramme zeigen den Verlauf der Glukosewerte nach Applikation von Insulin (0,75 IU/kg Körpergewicht) nach 6 Wochen Fütterung (links) und 12 Wochen Fütterung (rechts). Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Um Abweichungen der Glukosetoleranz beziehungsweise Insulinsensitivität über den Gesamtzeitraum zu bestimmen, wurde die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, A.U.C.) bestimmt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den CTRP3-KO- und den CTRP3-WT-Mäusen (siehe Abbildung 8).

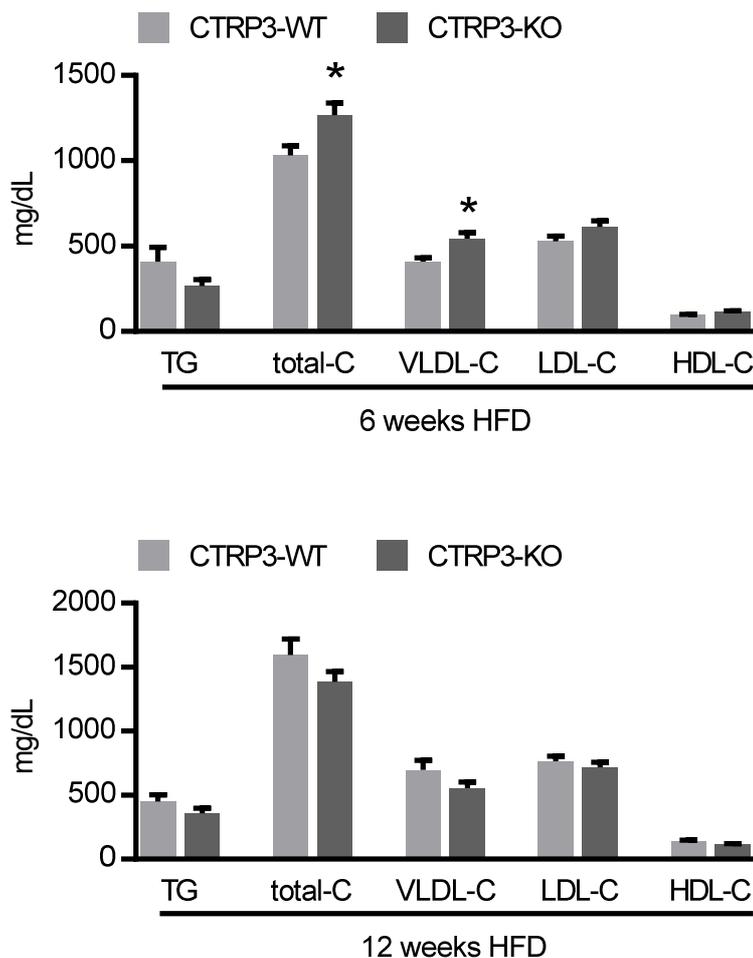


**Abbildung 8: AUC nach Applikation von Glukose bzw. Insulin.** Die Säulendiagramme zeigen die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, A.U.C.) nach Applikation von Glukose (A) und nach Applikation von Insulin (B). Angegeben sind die Mittelwerte der A.U.C. + SEM.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Fütterungsexperiment mit einer HFD eine diabetische Stoffwechsellage induziert. Zwischen den CTRP3-KO- und den CTRP3-WT-Mäusen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied bezüglich der Nüchternglukose, Glukosetoleranz und Insulinsensitivität nachgewiesen werden.

### 5.1.3 Erhöhte Cholesterinwerte der CTRP3-KO-Mäuse

Um zu analysieren, ob der CTRP3-KO zu Veränderungen im Lipidstoffwechsel führt, wurden die Triglyceridspiegel sowie die LDL-, VLDL-, HDL- und Gesamtcholesterinspiegel im Plasma bestimmt. Nach 6 Wochen Fütterung mit HFD zeigten die CTRP3-KO- gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen signifikant erhöhte Spiegel an Gesamtcholesterin und VLDL-Cholesterin im Plasma. Nach 12 Wochen Fütterung waren diese Effekte nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 9).



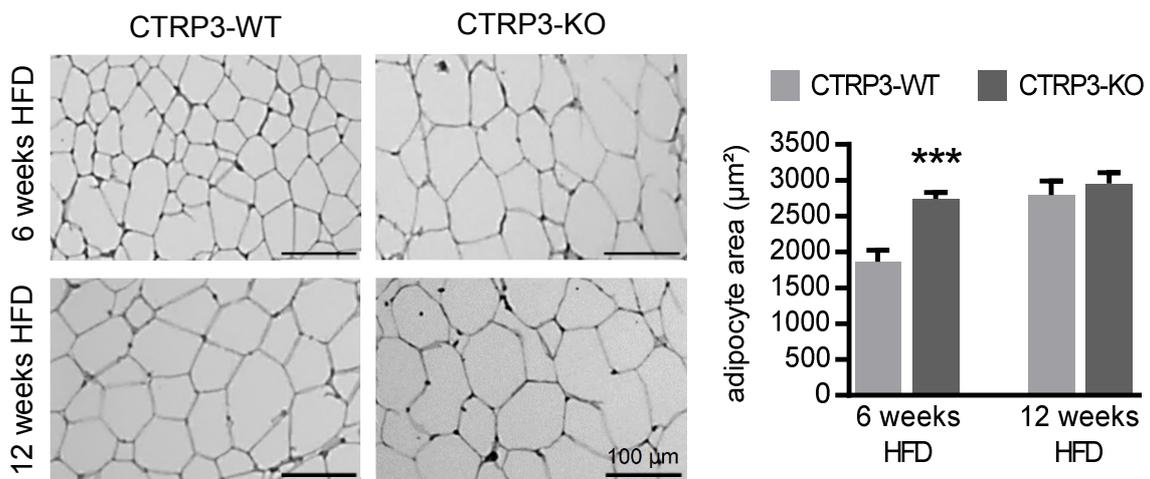
**Abbildung 9: Lipidprofil nach 6 und 12 Wochen Fütterung.** Dargestellt sind die Konzentrationen von Triglyceriden (TG) sowie Gesamtcholesterin (total-C) und VLDL-, LDL-, HDL-Cholesterin (VLDL-, LDL-, HDL-C) nach 6 Wochen Fütterung (oben) und 12 Wochen Fütterung (unten). Angegeben sind die Mittelwerte + SEM. \*P < 0,05 versus Kontrollgruppe.

## 5.2 Ergebnisse dieser Arbeit

### 5.2.1 Adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz führt zu morphologischen und immunhistologischen Veränderungen im WAT

#### 5.2.1.1 Verstärkte Hypertrophie der Adipozyten der CTRP3-KO-Mäuse

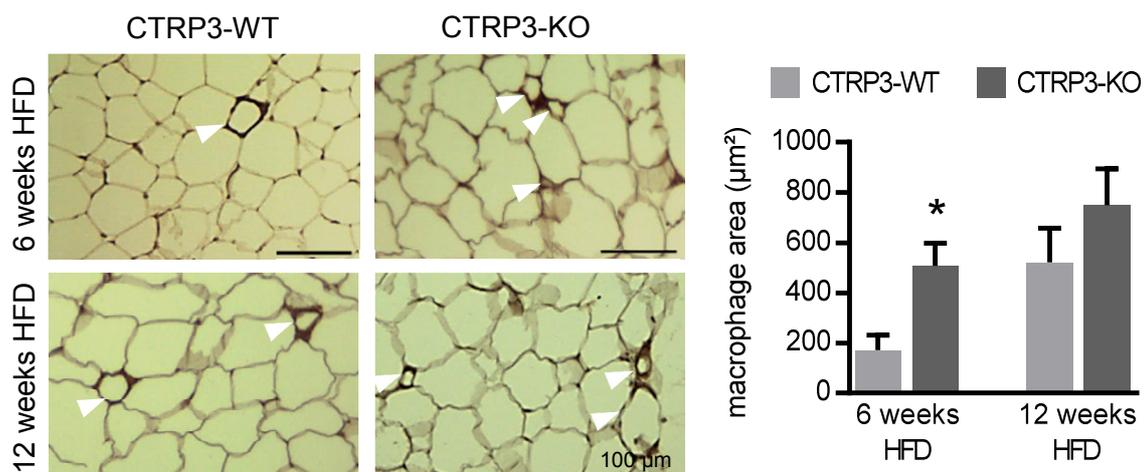
Zur Analyse der Adipozytengröße wurde das WAT mit HE gefärbt und die Größe der Adipozyten bestimmt (siehe Abbildung 10). Nach 6 Wochen Fütterung wiesen die CTRP3-KO-Mäuse signifikant ca. 50 % größere Adipozyten auf als die CTRP3-WT-Mäuse. Nach 12 Wochen Fütterung zeigte sich jedoch kein Größenunterschied der Adipozyten beider Gruppen. Von Woche 6 zu Woche 12 zeigten die Adipozyten der CTRP3-KO-Mäuse keine weitere Größenzunahme. Die Adipozytengröße der CTRP3-WT-Mäuse nahm in diesem Zeitraum um ca. 50 % zu.



**Abbildung 10: Größe der Adipozyten im WAT.** Die Adipozyten wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und sind in schwarzweiß dargestellt (links). Randständig sind Zellkerne zu erkennen. Angegeben sind die Mittelwerte + SEM (rechts). n = 7 – 12 pro Genotyp. \*\*\*P < 0,001 versus Kontrollgruppe.

### 5.2.1.2 Verstärkte Infiltration durch Makrophagen und Ausbildung von CLSs im WAT der CTRP3-KO-Mäuse

Zur Analyse der Infiltration und CLSs-Ausbildung durch Makrophagen im WAT wurden Färbungen mit dem für Makrophagen spezifischen Antikörper F4/80 durchgeführt (siehe Abbildung 11). Nach 6 Wochen Fütterung mit HFD konnte ein signifikant erhöhtes Vorkommen von Makrophagen im WAT der CTRP3-KO-Mäuse nachgewiesen werden. Im Verlauf der Fütterungsperiode zwischen der 6. und 12. Woche kam es insgesamt zu einer Zunahme der Makrophagen im WAT, jedoch war nach 12 Wochen Fütterung kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Genotypen zu beobachten. Innerhalb der Kontrolltiere zeigte sich eine signifikante Zunahme der fettgewebsständigen Makrophagen im zeitlichen Verlauf der Fütterung. Die Ausbildung von CLSs als Inflammationsmarker konnte in allen Gruppen identifiziert werden. Die Anzahl der CLSs unterschied sich jedoch weder nach 6 noch nach 12 Wochen signifikant zwischen den Gruppen.

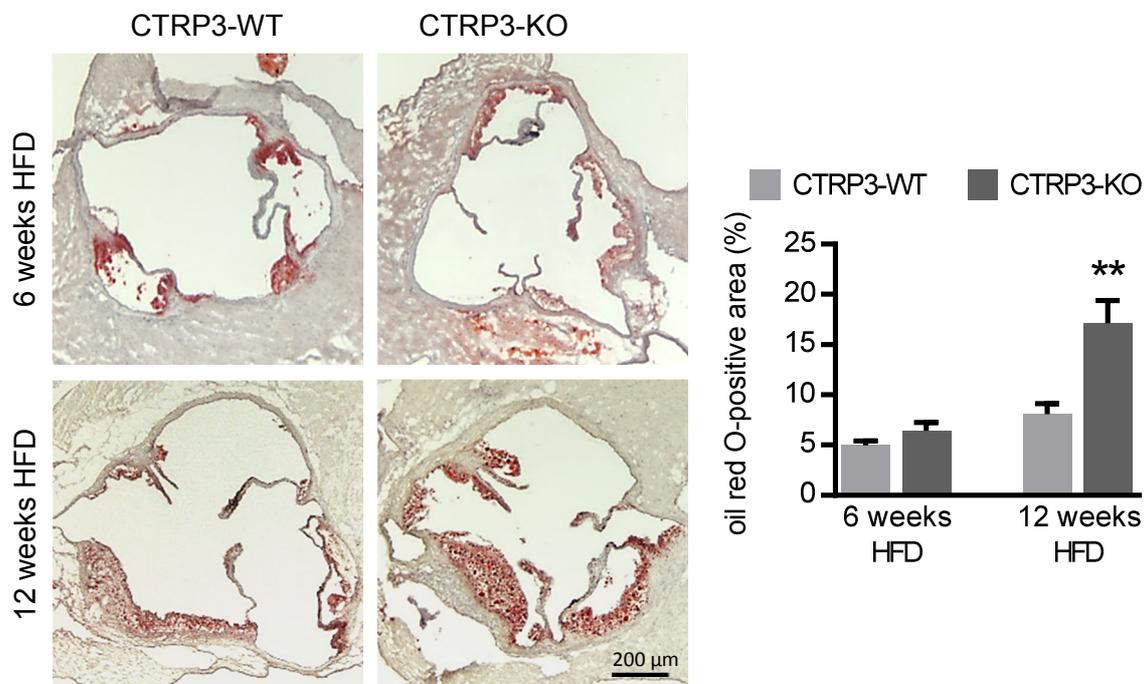


**Abbildung 11: Infiltration von Makrophagen im WAT.** Die Makrophagen im WAT (links) wurden selektiv mit dem Antikörper F4/80 und DAB gefärbt. Die Braunfärbung stellt die Fläche der Makrophagen dar. Die weißen Pfeile zeigen CLSs. Das WAT wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Fläche der Makrophagen ist mit dem Mittelwert + SEM angegeben (rechts). Die Fläche der Makrophagen bezieht sich auf einen Bildausschnitt des WAT von insgesamt 870000 µm<sup>2</sup>. n = 7 – 12 pro Genotyp. \*P < 0,05 versus Kontrollgruppe.

## 5.2.2 Adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz führt zu verstärkter vaskulärer Inflammation und Atherogenese

### 5.2.2.1 Verstärkte Akkumulation von Lipiden in der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse

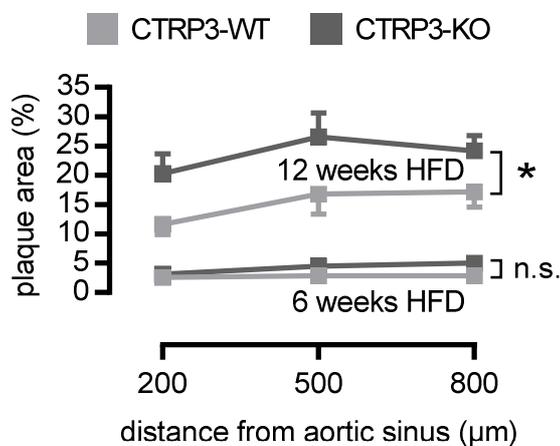
Um das Ausmaß der Lipidakkumulation in der Aortenwurzel während der Fütterungsperiode zu bestimmen, wurden die Aortenwurzeln mit ORO gefärbt und die ORO-positive Fläche analysiert. In der Aortenwurzel zeigten die CTRP3-KO gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen nach 6 Wochen Fütterung noch keine Unterschiede, aber nach 12 Wochen eine verstärkte Einlagerung von Lipiden (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Lipideinlagerungen in der Aortenwurzel.** Die Aortenwurzel wurde mit Oil Red O (ORO) und Hämatoxylin gefärbt. Die ORO-positive Fläche ist rot und stellt Lipideinlagerungen dar (links). Die Fläche der Lipideinlagerungen wurde prozentual auf die Querschnittsfläche der Aortenwurzel bezogen und ist mit dem Mittelwert + SEM angegeben (rechts). n = 7 – 10 pro Genotyp. \*\*P < 0,01 versus Kontrollgruppe.

### 5.2.2.2 Erhöhtes Vorkommen von atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse

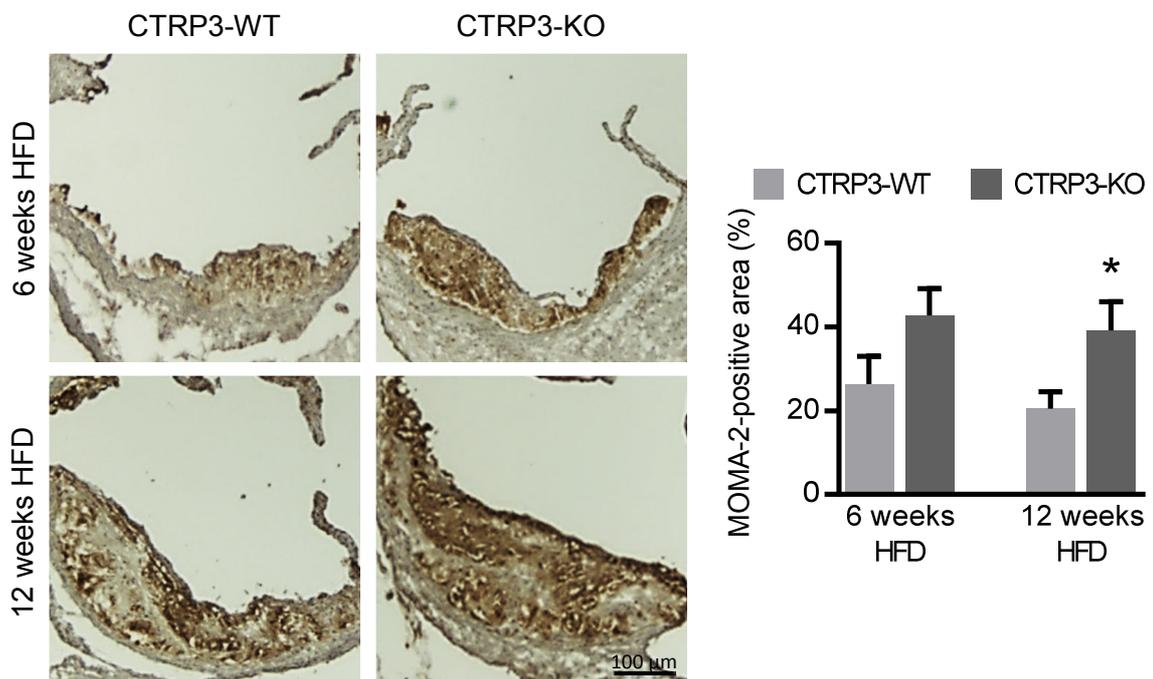
Um die Plauefläche im Bereich der Aortenwurzel zu bestimmen, wurden die Plaques in verschiedenen Abständen zu den Sinus aortae manuell vermessen und die Fläche prozentual auf die Querschnittsfläche der Aortenwurzel bezogen (siehe Abbildung 13). Nach 6 Wochen zeigten die CTRP3-KO- gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen kein signifikant vermehrtes Vorkommen von atherosklerotischen Plaques in der Aortenwurzel. Nach 12 Wochen Fütterung war bei den CTRP3-KO-Mäusen eine insgesamt signifikant erhöhte Plauefläche nachweisbar.



**Abbildung 13: Plauefläche in der Aortenwurzel.** Die Plauefläche wurde prozentual auf die Querschnittsfläche der Aortenwurzel bezogen. Die Mittelwerte  $\pm$  SEM sind in Abhängigkeit von der Entfernung zu den Sinus aortae dargestellt (200, 500 und 800 µm). n = 7 – 10 pro Genotyp. \*P < 0,05 versus Kontrollgruppe. n.s.: nicht signifikant.

### 5.2.2.3 Verstärkte Infiltration von Makrophagen in die Plaques der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse

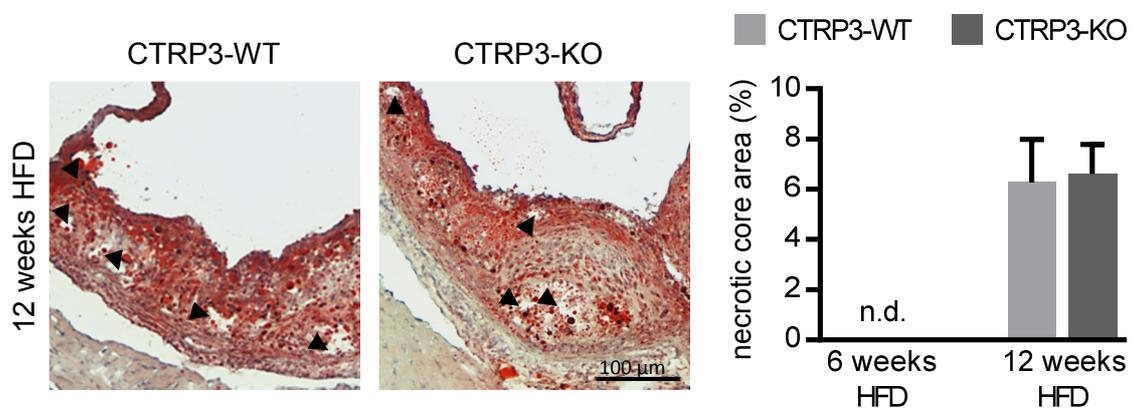
Zur Analyse der Infiltration von Makrophagen wurden die Aortenwurzeln mit MOMA-2 gefärbt und die MOMA-2-positive Fläche in den atherosklerotischen Plaques gemessen (siehe Abbildung 14). In den Plaques zeigten die CTRP3-KO- gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen bereits nach 6 Wochen Fütterung in der Tendenz ein erhöhtes Vorkommen von Makrophagen, welches nach 12 Wochen Fütterung signifikant war.



**Abbildung 14: Infiltration von Makrophagen in der Aortenwurzel.** Die Makrophagen wurden selektiv mit MOMA-2 und DAB gefärbt. Die Braunfärbung stellt die Fläche der Makrophagen dar (links). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Die Fläche der Makrophagen wurde prozentual auf die Plaqueläche bezogen und ist mit dem Mittelwert + SEM angegeben (rechts). n = 7 – 11 pro Genotyp. \*P < 0,05 versus Kontrollgruppe.

#### 5.2.2.4 Keine verstärkte Ausbildung nekrotischer Kerne in den Plaques der Aortenwurzel der CTRP3-KO-Mäuse

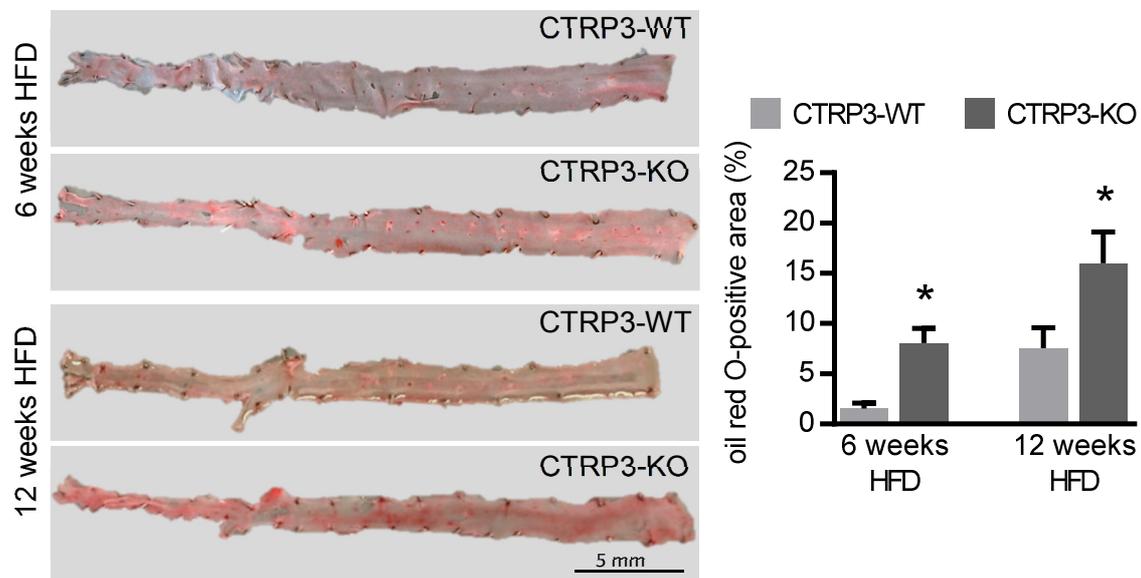
Zur Analyse morphologischer Unterschiede in den atherosklerotischen Plaques der CTRP3-KO- und CTRP3-WT-Mäuse wurden die Hämatoxylin- und ORO-gefärbten Plaques der Aortenwurzel betrachtet und das Vorkommen von nekrotischen Kernen ausgewertet (siehe Abbildung 15). Nekrotische Kerne konnten nach 12 Wochen Fütterung, nicht jedoch nach 6 Wochen Fütterung in den Plaques identifiziert werden. Die CTRP3-KO-Mäuse wiesen gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen prozentual keine größeren Bereiche an nekrotischen Kernen auf.



**Abbildung 15: Quantifizierung des nekrotischen Kerns in atherosklerotischen Plaques der Aortenwurzel.** Die Aortenwurzel wurde mit ORO und Hämatoxylin gefärbt. Die schwarzen Pfeile markieren nekrotische Kerne, welche als azelluläre beziehungsweise anukleäre Bereiche erkennbar sind (links). Die Fläche der nekrotischen Kerne wurde prozentual auf die Plaquesfläche bezogen und ist mit dem Mittelwert + SEM angegeben (rechts). n = 7 – 10 pro Genotyp. n.d.: nicht detektiert.

### 5.2.2.5 Verstärkte Akkumulation von Lipiden in der thorakoabdominalen Aorta der CTRP3-KO-Mäuse

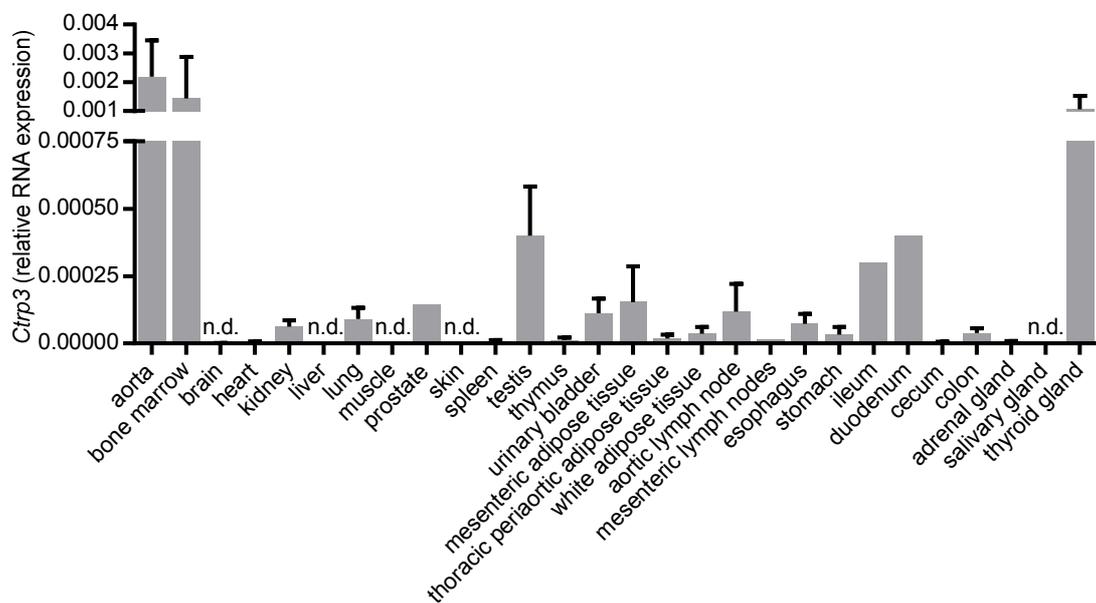
Neben der Aortenwurzel wurden zudem die thorakale und die abdominale Aorta hinsichtlich der Akkumulation von Lipiden untersucht. Die Aorten wurden mit ORO gefärbt, longitudinal eröffnet und die ORO-positive Fläche wurde gemessen (siehe Abbildung 16). Sowohl nach 6 Wochen als auch nach 12 Wochen Fütterung zeigten die CTRP3-KO-Mäuse gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen eine signifikant erhöhte Lipidakkumulation.



**Abbildung 16: Lipideinlagerungen in der thorakoabdominalen Aorta.** Die Aorten wurden mit ORO gefärbt und longitudinal eröffnet. Die ORO-positive Fläche wurde prozentual bezogen auf die Gesamtfläche der Aorta und ist mit dem Mittelwert + SEM angegeben. n = 6 – 12 pro Genotyp. \*P < 0,05 versus Kontrollgruppe.

### 5.2.3 Expression von CTRP3 in verschiedenen Geweben wildtypischer C57BL/6J-Mäuse

Um einen Überblick über die Expression von CTRP3 zu gewinnen, wurden verschiedene Organe und Gewebe wildtypischer C57BL/6J-Mäuse entnommen und mittels qPCR analysiert (siehe Abbildung 17). Insbesondere in der Aorta, dem Knochenmark, den Testikeln und der Schilddrüse zeigte sich eine hohe Expression der CTRP3-mRNA. Obwohl im WAT eine starke Expression von CTRP3 als Adipokin zu erwarten wäre, zeigte sich diese nicht.



**Abbildung 17: Expression von CTRP3-mRNA in verschiedenen Organen von WT-Mäusen.** Die relative Genexpression normalisiert auf GAPDH wurde mittels qPCR ermittelt. Angezeigt ist der Mittelwert + SEM von 6 Mäusen. n.d.: nicht detektiert.

## 6 Diskussion

Es gibt mehrere Studien, die CTRP3 im Kontext von metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen beschreiben. Generell wird CTRP3 in dieser Hinsicht mit überwiegend antiinflammatorischen Funktionen assoziiert und eine Defizienz von CTRP3 steht im Zusammenhang mit dem Auftreten dieser Erkrankungen (Yagmur *et al.* 2019). Viele dieser Erkenntnisse basieren jedoch entweder auf Experimenten *in vitro* oder auf Querschnittsuntersuchungen. Nur wenige Studien evaluierten die Bedeutung von CTRP3 experimentell *in vivo*. Obwohl CTRP3 hauptsächlich im WAT gebildet wird, scheint es auch in anderen Organen eine funktionelle Rolle zu spielen (Wong *et al.* 2008). Dies ist die erste Arbeit, die ein experimentelles Mausmodell mit metabolischem Phänotyp und adipozytenspezifischem CTRP3-KO verwendet, um die Bedeutung des Adipokins CTRP3 für das Fettgewebe und die Entwicklung der Atherosklerose zu untersuchen.

### 6.1 Bedeutung von CTRP3 für das Fettgewebe

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTRP3-KO-Mäuse bei Fütterung mit einer HFD *ad libitum* eine schnellere Körpergewichtszunahme in der ersten Hälfte der Fütterung zeigten. Nach 6 Wochen wiesen die CTRP3-KO-Mäuse außerdem mehr WAT, einen höheren WAT-Anteil und größere Adipozyten auf. Nach 12 Wochen waren in dieser Hinsicht keine Unterschiede mehr zur Kontrollgruppe zu erkennen. Diese Ergebnisse sind von Relevanz, da viszerale Adipositas als wichtigster Kausalitätsfaktor für die Entstehung des metabolischen Syndroms und der daraus resultierenden kardiovaskulären Folgeerkrankungen angesehen wird (Rochlani *et al.* 2017).

Diese Ergebnisse unterscheiden sich zu bisherigen Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses von CTRP3 auf das Körpergewicht und die WAT-Masse. Peterson *et al.* zeigten, dass eine CTRP3-Überexpression mit fünffach erhöhten CTRP3-Konzentrationen im Serum sowohl unter einer Fütterung mit HFD als auch mit einer fettreduzierten Diät (*low-fat diet*, LFD) über einen gesamten Verlauf von 14 Wochen zu keinen Veränderungen hinsichtlich des Körpergewichts oder des Energieverbrauches führen (Peterson *et al.* 2013). Wolf *et al.* zeigten, dass ein CTRP3-KO sowohl unter Fütterung mit HFD als auch mit LFD über einen Zeitraum von 24 Wochen ebenfalls zu keinen Veränderungen in Bezug auf das Körpergewicht führt. Es zeigte sich kein Unterschied in der magnetresonanztchnisch ermittelten Körperfettmasse (Wolf *et al.*

2016), wobei diese aufgrund der unterschiedlichen Methodik nicht direkt mit dem WAT zu vergleichen ist. Maeda und Wakisaka zeigten, dass ein CTRP3-KO nach Fütterung mit HFD für 20 Wochen zu einer Verminderung der WAT-Masse und der Adipozytengröße bei gleichem Körpergewicht führt (Maeda und Wakisaka 2020). Die oben genannten Studien verwendeten im Gegensatz zu dieser Arbeit ein systemisches CTRP3-KO-Modell beziehungsweise CTRP3-Überexpressionsmodell. Da CTRP3 auch in anderen Organen vorkommt, bleibt bei Untersuchungen am systemischen CTRP3-KO unklar, welche Bedeutung CTRP3 als Adipokin im engeren Sinne einnimmt. Schmid *et al.* zeigten kürzlich, dass ein adipozytenspezifischer CTRP3-KO, nach Fütterung mit einer Standarddiät, zu einer Reduktion des Körpergewichts und der WAT-Masse bei gleicher Adipozytengröße führt (Schmid *et al.* 2021).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen möglicherweise auf eine besondere Rolle des adipozytenspezifischen CTRP3 bei metabolischem Stress durch eine fettreiche Diät hin. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht bekannt. Die Untersuchungen von Davis *et al.* geben Grund zur Annahme, dass ein adipozytenspezifischer KO, wie in dieser Studie, zu einer Zunahme des Körpergewichtes, des WAT-Gewichtes und der Adipozytengröße führen kann. Unter Fütterung einer HFD schützt ein TLR4-KO vor einer diätinduzierten Zunahme und Hypertrophie der Adipozyten, was auf eine fehlende Aktivierung von TLR4 durch freie Fettsäuren zurückgeführt wird (Davis *et al.* 2008). CTRP3 antagonisiert die TLR4-vermittelte Wirkung von Fettsäuren (Kopp *et al.* 2010a), sodass beim Verlust von CTRP3 einer HFD-induzierten Gewichtszunahme und Hypertrophie der Adipozyten nicht entgegenwirkt wird, was die hier dargelegten Ergebnisse nach 6 Wochen Fütterung zeigen. Interessant ist, warum dieser Effekt nach 6 weiteren Wochen HFD nicht mehr zu beobachten ist. Parallel dazu zeigen CTRP3-KO- und CTRP3-WT-Mäuse hinsichtlich des Gewichtes, der Inflammation im WAT und der Cholesterinspiegel eine Angleichung im metabolischen Phänotyp nach 12 Wochen Fütterung. Dies ist die erste Studie, welche das WAT beim CTRP3-KO zu verschiedenen Zeitpunkten analysierte und einen Effekt in Abhängigkeit von der Fütterungsdauer mit HFD zeigt. Zukünftige Studien sollten diesen Effekt ebenfalls beim systemischen CTRP3-KO untersuchen, um einen Vergleich zwischen beiden Modellen zu ermöglichen. Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre eine infolge der verstärkten Gewichtszunahme der CTRP3-KO-Mäuse erhöhte Freisetzung von Leptin und eine damit verbundene Reduktion der weiteren Nahrungsaufnahme. In der Tat zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine signifikante Erhöhung in der Expression von Leptin im WAT der CTRP3-KO-Mäuse nach 6 Wochen Fütterung. Eine andere mögliche Erklärung wäre ein sekundär erworbener Funktionsverlust beziehungsweise

eine Verminderung von CTRP3 in CTRP3-WT-Mäusen nach mehreren Wochen Fütterung. Kopp *et al.* konnten zeigen, dass ein metabolischer Phänotyp die Wirkung von CTRP3 reduziert (Kopp *et al.* 2010b). Gleichzeitig zeigen Studien mehrheitlich, dass Adipositas mit einer Reduktion von CTRP3 im Serum assoziiert ist (Li *et al.* 2017). Eine Reduktion von CTRP3 im Laufe der Fütterung könnte ebenfalls eine Angleichung der WT-Mäuse an den CTRP3-KO-Phänotyp nach 12 Wochen zur Folge haben. Eine Untersuchung der CTRP3- und Leptinspiegel im Serum könnte möglicherweise Aufschluss über die zugrundeliegenden Mechanismen liefern, ebenso wie eine Quantifizierung der Nahrungsaufnahme. Eine Analyse der CTRP3-Spiegel ist insbesondere relevant, da Schmid *et al.* keinen Einfluss einer adipozytenspezifischen CTRP3-Defizienz auf den zirkulierenden CTRP3-Spiegel zeigten (Schmid *et al.* 2021). Sollte sich dies bestätigen, deutet dies in der Tat, wie von Schmid *et al.* postuliert, auf primär auto- oder parakrine Regulationsmechanismen des adipozytenspezifischen CTRP3 hin. Diese könnten sich möglicherweise funktionell von der endokrinen Wirkung des nicht adipozytenspezifischen CTRP3 unterscheiden. Daher könnten sie, neben einem Effekt abhängig von der Fütterungsdauer, einen möglichen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Beobachtungen im Vergleich zum systemischen CTRP3-KO-Modell bei metabolischem Stress liefern. Eine Analyse der Expression von Genen der Adipogenese und des Fettstoffwechsels, wie von Maeda und Wakisaka beschrieben, könnte weiteren Aufschluss über die zugrunde liegenden Mechanismen liefern.

Neben den morphologischen Veränderungen der Adipozyten konnte in dieser Arbeit zudem eine verstärkte Infiltration von Makrophagen im WAT der CTRP3-KO-gegenüber den CTRP3-WT-Mäusen identifiziert werden. Diese zeigte sich im gesamten Verlauf der Fütterung und war nach 6 Wochen signifikant, nicht aber nach 12 Wochen. Zudem kam es im Verlauf der Fütterung zur verstärkten Ausbildung von CLSs, welche als aussagekräftige Inflammationsmarker im Fettgewebe angesehen werden (Quail und Dannenberg 2019). Trotz des erhöhten Vorkommens von Makrophagen bei den CTRP3-KO-Mäusen ließen sich, eventuell bedingt durch eine große Streuung, keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CLSs zwischen den Mausgruppen detektieren. Eine größere Anzahl von Mäusen könnte hier eventuell weitere Erkenntnisse liefern. Das insgesamt signifikant erhöhte Vorkommen von Makrophagen bei den CTRP3-KO-Mäusen stimmt dennoch mit den bisherigen Beobachtungen überein, dass die CTRP3-KO-Mäuse nach 6 Wochen eine verstärkte Hypertrophie der Adipozyten aufweisen. Es ist bekannt, dass eine diätinduzierte Hypertrophie der Adipozyten eine Inflammation des Fettgewebes zur Folge hat (Quail und Dannenberg 2019). Dementsprechend ist eine ähnlich stark ausgeprägte Makrophageninfiltration im Fettgewebe beider Mausgruppen nach 12 Wochen

möglicherweise auf die beschriebene Angleichung der Adipozytengröße zurückzuführen. Die Auswirkungen eines KO oder einer Überexpression von CTRP3 auf die diätinduzierte Inflammation im Fettgewebe wurden bisher noch nicht direkt untersucht. Bekannt ist, dass unter Fütterung mit HFD ein KO zu erhöhten Konzentrationen (Wolf *et al.* 2016) und eine Überexpression (Peterson *et al.* 2013) zu erniedrigten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen im Serum führt. Ebenso bekannt ist, dass ein Großteil der aus dem Fettgewebe sekretierten proinflammatorischen Zytokine von fettgewebsständigen Makrophagen stammt (Fève *et al.* 2016). Die in dieser Arbeit beobachteten inflammatorischen Veränderungen im Fettgewebe der CTRP3-KO-Mäuse deuten darauf hin, dass die bekannte systemische Inflammation bei CTRP3-Defizienz (Wolf *et al.* 2016) anteilig auf eine Inflammation des WAT zurückzuführen ist. Dies ist relevant, da eine Inflammation des Fettgewebes und die Freisetzung proinflammatorischer Adipokine unter anderem zur Entstehung von Insulinresistenz und von Atherosklerose beitragen (Smekal und Vaclavik 2017). Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen ferner die jüngste Studie von Schmid *et al.*, welche bei fehlendem metabolischen Stress und adipozytenspezifischer CTRP3-Defizienz einen eher antiinflammatorischen Phänotyp des WAT zeigte (Schmid *et al.* 2021). Dies deutet auf differenziert regulatorische Funktionen des adipozytenspezifischen CTRP3 auf die Inflammation des Fettgewebes in Abhängigkeit vom Ernährungszustand hin. In weiteren Untersuchungen könnte ein umfassendes Screening der zirkulierenden Zytokine, unter anderem IL-6 und TNF- $\alpha$ , durchgeführt werden. Zudem könnten die fettgewebsständigen Makrophagen im WAT hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern charakterisiert werden. Für Letzteres bietet sich insbesondere eine Analyse der Expression von CD9 und CD11c an, welche mit dem Auftreten von inflammatorisch aktiven CLSs assoziiert sind, sowie von Ly6C für nicht inflammatorisch aktivierte Makrophagen im WAT (Quail und Dannenberg 2019). So könnte der Einfluss von adipozytenspezifischem CTRP3 auf die Polarisation der gewebsständigen Makrophagen untersucht werden.

## 6.2 Bedeutung von CTRP3 für den Metabolismus

Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass die CTRP3-Defizienz nicht zu Veränderungen der Glukosetoleranz und Insulinsensitivität, wohl aber zu einem erhöhten Gesamtcholesterin und VLDL-C im Plasma nach 6 Wochen Fütterung führt. Während Peterson *et al.* zeigten, dass sowohl eine Überexpression als auch rekombinant verabreichtes CTRP3 eine diätinduzierte Insulinresistenz abschwächen

(Peterson *et al.* 2013), zeigten Wolf *et al.*, dass ein systemischer CTRP3-KO keinen Einfluss auf die Nüchtern glukose, Glukosetoleranz und Insulinsensitivität hat (Wolf *et al.* 2016). In Bezug auf den Glukosestoffwechsel stützen die hier aufgeführten Ergebnisse die Schlussfolgerung von Wolf *et al.*, dass die Defizienz von CTRP3 zu keinen metabolischen Veränderungen führt. Es ist jedoch auch bekannt, dass eine Insulinresistenz mit niedrigen CTRP3-Konzentrationen im Serum korreliert (Deng *et al.* 2015). Dies könnte darauf hindeuten, dass erniedrigtes CTRP3 vor allem eine Folge der metabolischen Veränderungen ist und lediglich substantiell erhöhte Konzentrationen trotz metabolischen Phänotyps zu einer Linderung der Ausprägung führen, wie Peterson *et al.* zeigten. Außerdem ist bekannt, dass eine Inflammation des Fettgewebes zur Entstehung einer Insulinresistenz beiträgt (Blüher 2013). Daher könnte man erwarten, dass die CTRP3-KO-induzierte Inflammation des Fettgewebes zur verstärkten Ausprägung einer Insulinresistenz führt. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Anzumerken ist dabei, dass bereits die Fütterung mit HFD im Verlauf zu einer Insulinresistenz führt, wie Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigen. Die Ergebnisse können daher nicht zeigen, dass der CTRP3-KO keine Insulinresistenz auslöst, sondern vielmehr zu keiner weiteren Verschlechterung einer diätinduzierten Insulinresistenz führt.

Die beobachtete Erhöhung von VLDL-C und des Gesamtcholesterins nach 6 Wochen Fütterung stehen im Gegensatz zu der Studie von Wolf *et al.*, welche keinen Einfluss auf das Lipidprofil durch einen systemischen CTRP3-KO zeigt (Wolf *et al.* 2016). Die Ergebnisse sind jedoch im Zusammenhang mit der bereits diskutierten WAT-Zunahme nach 6 Wochen zu sehen und sind möglicherweise durch eine erhöhte Aufnahme von Cholesterin über die Nahrung bedingt. Es ist bekannt, dass LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse unter Fütterung mit einer cholesterinreichen Diät eine Zunahme von VLDL, LDL und Gesamtcholesterin zeigen (Lee *et al.* 2017). Dabei ist der Cholesteringehalt der Nahrung maßgeblich für das Ausmaß der Veränderungen im Lipidprofil verantwortlich (Escolà-Gil *et al.* 2011). Anzumerken ist allerdings, dass die aufgenommene Menge an HFD nicht bestimmt wurde und prinzipiell auch andere Mechanismen für die Gewichtszunahme und somit für die Veränderungen im Lipidprofil in Frage kommen. Das Lipidprofil bei den CTRP3-KO-Mäusen ist für diese Arbeit wesentlich, da die beschriebenen Veränderungen mit der Entstehung von Atherosklerose assoziiert sind (Lee *et al.* 2017). In weiteren Analysen könnte in der Leber beispielsweise die Expression der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) untersucht werden, um die Synthese von Cholesterin in den CTRP3-KO-Mäusen zu charakterisieren.

### 6.3 Bedeutung von CTRP3 für die Entstehung der Atherosklerose

In dieser Arbeit wurde bei den adipozytenspezifischen CTRP3-KO-Mäusen ein erhöhtes Vorkommen von Plaques nach 12 Wochen in der Aortenwurzel und sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen in der thorakoabdominalen Aorta detektiert. Die Diskrepanz zwischen dem erhöhten Vorkommen von Plaques in der thorakoabdominalen Aorta und dem nicht verstärkten Auftreten in der Aortenwurzel nach 6 Wochen Fütterung ist möglicherweise methodenbedingt zu erklären. Bei der Plaquequantifizierung in der thorakoabdominalen Aorta wurde die ORO-positive Fläche im Längsschnitt bestimmt und auf die Längsschnittfläche beziehungsweise die Intimafläche bezogen, wobei frühe Stadien der Atherosklerose in Form von Fatty Streaks großflächig detektiert werden können. In der Aortenwurzel wurde die ORO-positive Fläche im Querschnitt bestimmt und auf die Querschnittsfläche bezogen, wobei hier vor allem in das Lumen vorragende, fortgeschrittenere Plaquestadien maßgeblich zur ORO-positiven Fläche beitragen. Insofern ergänzen sich die Methoden schwerpunktmäßig in der Detektion von Plaques. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine erhöhte Plaquebelastung an mehreren typischen Prädilektionsstellen und liefern starke Evidenz dafür, dass eine adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz bei metabolischem Phänotyp die Entwicklung der Atherosklerose fördert.

Vergleichbare experimentelle Studien *in vivo* hinsichtlich der Entstehung atherosklerotischer Plaques in Bezug auf adipozytäres CTRP3 existieren bisher nicht. Jedoch zeigten Chen *et al.* an murinen Endothelzellen, dass eine CTRP3-Defizienz zur Endotheldysfunktion führt und dass das Vorkommen von CTRP3 unter anderem einen oxLDL-induzierten Endothelschaden abschwächt (Chen *et al.* 2019). Die durch die CTRP3-Defizienz verursachte endotheliale Dysfunktion könnte eine zugrundeliegende Ursache für das hier beobachtete vermehrte Auftreten atherosklerotischer Plaques darstellen. Zudem sind wahrscheinlich auch die beobachtete Inflammation des WAT und das erhöhte Cholesterin, wenn auch nur vorübergehend nach 6 Wochen detektiert, relevant für die verstärkte Atherogenese der KO-Mäuse. Sowohl eine Inflammation des Fettgewebes (Sarvottam und Yadav 2014) als auch erhöhte Cholesterinwerte (Lusis 2000) sind mit der Entstehung von Atherosklerose assoziiert. Da atherosklerotische Läsionen ab einem gewissen Stadium irreversibel sind (Stary 2000b), können sich die beschriebenen Risikofaktoren auch in der Plaquebelastung nach 12 Wochen widerspiegeln. Um die atherosklerotische Plaquebildung weiter zu charakterisieren, wurde das Ausmaß der Infiltration durch Makrophagen in den Plaques bestimmt. Die

Plaques der CTRP3-KO-Mäuse wiesen nach 6 Wochen Fütterung einen erhöhten und nach 12 Wochen einen signifikant erhöhten Anteil an Makrophagen gegenüber den WT-Mäusen auf. Dies bedeutet neben der erhöhten Plaquebelastung zudem eine verstärkte Inflammation der Plaques und steht im Einklang mit den *in vitro* Erkenntnissen von Lin *et al.*, wonach rekombinantes CTRP3 die Aktivierung von Makrophagen über den TLR4 und NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibiert und die Schaumzellbildung reduziert (Lin *et al.* 2017). Die Infiltration und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen nimmt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose ein und kann im Verlauf durch den Zelltod der Makrophagen zur Bildung von nekrotischen Kernen in den Plaques führen (Bobryshev *et al.* 2016). Das Vorkommen von nekrotischen Kernen wird beim Menschen als Kriterium für die Vulnerabilität der atherosklerotischen Plaques betrachtet (Gonzalez und Trigatti 2017). Im murinen Modell kommt jedoch eine Plaqueruptur wie bei Menschen nicht vor. Daher sind nekrotische Kerne hier nicht im Sinne einer Vulnerabilität zu verstehen, sondern als Indikator für den Zelluntergang in den Plaques (Schwartz *et al.* 2007). Die Entstehung von nekrotischen Kernen zeigte sich zwar im Verlauf der Fütterung, es konnte jedoch kein relativer Unterschied bezogen auf die Plaquefläche zwischen den CTRP3-KO-Mäusen und der Kontrollgruppe beobachtet werden. Da die Entstehung von nekrotischen Kernen auf einer Dysbalance zwischen Apoptose der Makrophagen und Efferozytose basiert (Solanki *et al.* 2017), zeigen die Ergebnisse, dass das adipozytäre CTRP3 für dieses Verhältnis nicht wesentlich ist.

Zusammenfassend zeigen die histomorphologischen Analysen, dass eine adipozytenspezifische CTRP3-Defizienz eine verstärkte Inflammation der Plaques zur Folge hat und nicht mit einer verstärkten Ausbildung von nekrotischen Kernen assoziiert ist.

Weiterführende Analysen sind notwendig, um die Bedeutung von CTRP3 für die Atherosklerose detaillierter zu charakterisieren. Hinsichtlich der Histomorphologie liefert möglicherweise eine Färbung der glatten Muskelzellen oder der Kollagenfasern weiteren Aufschluss über den Einfluss von CTRP3 auf die Komposition der Plaques. Zudem könnten M1- oder M2-makrophagenspezifische Färbungen der Plaques vorgenommen werden, um den möglichen Einfluss der verstärkten Infiltration von Makrophagen in Bezug auf die Atherogenese besser abschätzen zu können. Die Messung des Blutdrucks könnte zusätzlich Aufschluss über den Einfluss von adipozytenspezifischem CTRP3 auf den metabolischen Phänotyp und den Beitrag zur Entstehung der Atherosklerose liefern. Zukünftig sind Interventionsstudien notwendig, um ein therapeutisches Potenzial von CTRP3 weiter evaluieren zu können. So

schwächt möglicherweise die Applikation von rekombinantem CTRP3 die bei den CTRP3-defizienten Mäusen beobachteten inflammatorischen Veränderungen des WAT ab oder führt zur Besserung metabolischer Parameter, einhergehend mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose.

## 6.4 Vorkommen von CTRP3 in verschiedenen Organen

Die Genexpressionsanalyse zeigte insbesondere in der Aorta, dem Knochenmark, der Schilddrüse und in den Testikeln eine hohe Expression der CTRP3-mRNA. Obwohl bekannt ist, dass CTRP3 überwiegend im Fettgewebe exprimiert wird (Li *et al.* 2017), zeigte die Analyse verhältnismäßig wenig CTRP3-mRNA im WAT. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass der hohe Lipidanteil im WAT bei relativ geringer Zellzahl die mRNA-Isolation erschwert (Cirera 2013). Eine Optimierung des Protokolls zur mRNA-Isolation im Fettgewebe ist deshalb erforderlich. Gleichwohl verdeutlicht die Analyse, dass CTRP3 in verschiedenen anderen Organen ebenfalls exprimiert wird, wenn auch die genauen Funktionen bisher größtenteils unbekannt sind.

Klinisch gesehen erschwert dies potenziell die Entwicklung eines zielgerichteten Therapieansatzes basierend auf CTRP3. Im Kontext von kardiovaskulären Erkrankungen ist insbesondere die hohe Expression von CTRP3-mRNA in der Aorta von Interesse. Einerseits zeigten Chen *et al.*, dass in atherosklerotischen Läsionen der Aorta die Expression von CTRP3-mRNA erniedrigt ist und somit die Defizienz von CTRP3 in der Aorta mit Atherosklerose assoziiert ist (Chen *et al.* 2019). Andererseits wurde *in vitro* nachgewiesen, dass CTRP3 die Bildung von ROS sowie eine vaskuläre Kalzifizierung induzieren kann (Feng *et al.* 2016), was auf eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen hinweist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung von CTRP3 als Adipokin untersucht und dazu ein adipozytenspezifischer CTRP3-KO verwendet. Dennoch ist eine Beeinflussung der aortalen CTRP3-mRNA Expression prinzipiell im Sinne eines Synergismus oder einer kompensatorischen Hochregulation möglich. In der Fortführung des Projektes wäre zu prüfen, inwiefern sich der adipozytenspezifische CTRP3-KO auf die Expression von CTRP3-mRNA in der Aorta auswirkt. Möglicherweise liefert dies Aufschluss über potentielle Rückkopplungsmechanismen des Adipokins CTRP3 und über die Funktion der CTRP3-Expression in der Aorta.

## 7 Zusammenfassung

Atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen und sind stark mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Infolge von Überernährung kommt es zu einer Hypertrophie und einer Inflammation des Fettgewebes, zu einer Dysbalance der sekretierten Adipokine und damit zur Induktion von systemisch metabolischen Veränderungen.

CTRP3 ist ein Adipokin mit überwiegend antiinflammatorischer Wirkung. Erniedrigte CTRP3-Spiegel sind mit metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen sowie einer erhöhten Mortalität assoziiert. Die Bedeutung von CTRP3 in Bezug auf die Entstehung dieser Erkrankungen *in vivo* ist jedoch bisher experimentell wenig erforscht.

Um Aufschluss über die Funktion von CTRP3 zu erhalten, wurden Mäuse mit adipozytenspezifischem CTRP3-KO nach Fütterung mit einer fett- und cholesterinreichen Diät untersucht und mit einer Kontrollgruppe ohne CTRP3-KO verglichen.

Die CTRP3-Defizienz führte in den ersten 6 Wochen der Fütterung zu einer beschleunigten Gewichtszunahme bei erhöhtem Körperfettanteil und war mit einer verstärkten Hypertrophie der Adipozyten sowie einer erhöhten Infiltration von Makrophagen in das Fettgewebe assoziiert. Nach 12 Wochen zeigten sich diese Effekte nicht mehr.

Im Plasma konnten erhöhte Konzentrationen von VLDL und Gesamtcholesterin nachgewiesen werden. Nach 12 Wochen waren keine dieser Veränderungen mehr nachweisbar. Ein Einfluss der CTRP3-Defizienz auf die Nüchtern glukose, die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität ließ sich nicht nachweisen.

Sowohl nach 6 als auch nach 12 Wochen konnte eine erhöhte Plaquebelastung in der Aorta detektiert werden, begleitet von einer erhöhten Akkumulation von Lipiden in der Aortenwurzel und einer erhöhten Infiltration von Makrophagen in den Plaques nach 12 Wochen. Ein erhöhtes Vorkommen von nekrotischen Kernen zeigte sich nicht.

Neben den Untersuchungen an CTRP3-KO-Mäusen wurde zudem die Genexpression von CTRP3 in verschiedenen Organen von WT-Mäusen analysiert. Von den getesteten Organen wies die Aorta die größte Expression von CTRP3-mRNA auf.

In weiterführenden Arbeiten sollte ein Screening auf systemische Inflammationsmarker erfolgen und die Reversibilität der beobachteten Veränderungen durch Applikation von rekombinantem CTRP3 geprüft werden.

Das Angleichen im metabolischen Phänotyp nach 12 Wochen Fütterung ist möglicherweise auf eine kompensatorisch reduzierte Nahrungsaufnahme der CTRP3-KO-Mäuse oder aber auf eine sekundär erworbene Verminderung beziehungsweise ein Funktionsverlust von CTRP3 in CTRP3-WT-Mäusen zurückzuführen und erfordert weitere Analysen.

Obwohl CTRP3 hauptsächlich als Adipokin gilt, scheint CTRP3 auch in anderen Organen gebildet zu werden. Hinsichtlich der Atherosklerose bedarf insbesondere die Expression von CTRP3 in der Aorta weiterer Aufklärung.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die adipozytenspezifische Defizienz des Adipokins CTRP3 zur Hypertrophie und Inflammation des Fettgewebes, zu erhöhten Konzentrationen von Cholesterin im Plasma sowie zur Entstehung von Atherosklerose beiträgt.

## 8 Summary

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of death in the Western world. The metabolic syndrome is highly associated with an increased risk of the development of atherosclerosis. Excessive food intake leads to hypertrophy and inflammation of adipose tissue, a condition characterised by an imbalance of adipokine secretion that causes systemic metabolic alterations.

CTRP3 is an anti-inflammatory adipokine. Decreased levels of CTRP3 are associated with metabolic and cardiovascular diseases and are a predictor of total mortality. However, there has been little experimental research on the relation between CTRP3 and the development of these diseases *in vivo*.

In order to analyse the function of CTRP3, adipocyte-specific CTRP3-KO mice were fed with a high-fat diet for 6 and 12 weeks respectively and compared to a control group without CTRP3-KO.

After 6 weeks of high-fat diet feeding, deficiency of CTRP3 led to an increased weight gain and body fat mass. This was accompanied by an increased adipocyte size and macrophage infiltration into adipose tissue. After 12 weeks of feeding, none of these differences could be observed.

Furthermore, elevated plasma VLDL and total cholesterol levels were detected. After 12 weeks of feeding, none of these alterations could be identified. An impact of CTRP3 deficiency on fasting glucose, glucose tolerance and insulin sensitivity could not be observed.

With regards to atherosclerosis, CTRP3-KO mice demonstrated an increase in aortic plaque burden after both 6 and 12 weeks. Moreover, CTRP3-KO mice showed an increased lipid content in the aortic root and an increased macrophage plaque infiltration. There was no difference in the necrotic core area.

In addition to the analysis of CTRP3-KO mice, the expression of CTRP3-mRNA in CTRP3-WT mice was analysed to gain an overview of CTRP3 distribution. Overall, the aorta showed the highest expression of CTRP3 out of all organs tested.

Further research should focus on markers of systemic inflammation in CTRP3-KO mice and on the application of recombinant CTRP3 to assess reversibility of the observed alterations.

The alignment between CTRP3-KO mice and CTRP3-WT mice in terms of the metabolic phenotype after 12 weeks of feeding may be attributed to decreased food

intake of CTRP3-KO mice or an acquired decrease or loss of function of CTRP3 in CTRP3-WT mice and should be subject to further analysis.

Although CTRP3 is predominantly considered as an adipokine, CTRP3 is also expressed in other organs than adipose tissue. Concerning atherosclerosis, particularly the role of CTRP3 expression in the aorta needs to be clarified.

In conclusion, this work reveals that CTRP3 deficiency contributes to hypertrophy and inflammation of adipose tissue, elevated plasma cholesterol concentrations as well as the development of atherosclerosis.

## 9 Literatur

- Adar, Sara D., Lianne Sheppard, Sverre Vedal, Joseph F. Polak, Paul D. Sampson, Ana V. Diez Roux, Matthew Budoff, David R. Jacobs, R. Graham Barr, Karol Watson und Joel D. Kaufman. 2013. Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: a prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution. *PLoS medicine* 10 (4): e1001430. doi: 10.1371/journal.pmed.1001430.
- Alberti, K. G. M. M., Robert H. Eckel, Scott M. Grundy, Paul Z. Zimmet, James I. Cleeman, Karen A. Donato, Jean-Charles Fruchart, W. Philip T. James, Catherine M. Loria und Sidney C. Smith. 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120 (16): 1640–1645. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- Andrés-Manzano, M. Jesús, Vicente Andrés und Beatriz Dorado. 2015. Oil Red O and Hematoxylin and Eosin Staining for Quantification of Atherosclerosis Burden in Mouse Aorta and Aortic Root. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1339: 85–99. doi: 10.1007/978-1-4939-2929-0\_5.
- Apovian, Caroline M., Sherman Bigornia, Melanie Mott, Melissa R. Meyers, Jagadish Ullloor, Manana Gagua, Marie McDonnell, Donald Hess, Lija Joseph und Noyan Gokce. 2008. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28 (9): 1654–1659. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170316.
- Bays, Harold E., Peter P. Toth, Penny M. Kris-Etherton, Nicola Abate, Louis J. Aronne, W. Virgil Brown, J. Michael Gonzalez-Campoy, Steven R. Jones, Rekha Kumar, Ralph La Forge und Varman T. Samuel. 2013. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of clinical lipidology* 7 (4): 304–383. doi: 10.1016/j.jacl.2013.04.001.
- Bennett, Martin R., Sanjay Sinha und Gary K. Owens. 2016. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation research* 118 (4): 692–702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
- Bentzon, Jacob Fog, Fumiyuki Otsuka, Renu Virmani und Erling Falk. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research* 114 (12): 1852–1866. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- Berenson, G. S., S. R. Srinivasan, W. Bao, W. P. Newman, R. E. Tracy und W. A. Wattigney. 1998. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *The New England journal of medicine* 338 (23): 1650–1656. doi: 10.1056/NEJM199806043382302.

- Bergmann, N., F. Gyntelberg und J. Faber. 2014. The appraisal of chronic stress and the development of the metabolic syndrome: a systematic review of prospective cohort studies. *Endocrine Connections* 3 (2): R55-80. doi: 10.1530/EC-14-0031.
- Blüher, Matthias. 2013. Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 27 (2): 163–177. doi: 10.1016/j.beem.2013.02.005.
- Blüher, Matthias. 2019. Adipokine & klinische Bedeutung. *Adipositas - Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie* 13 (01): 6–13. doi: 10.1055/a-0804-6353.
- Bobryshev, Yuri V., Ekaterina A. Ivanova, Dimitry A. Chistiakov, Nikita G. Nikiforov und Alexander N. Orekhov. 2016. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *BioMed research international* 2016: 9582430. doi: 10.1155/2016/9582430.
- Böcker, W., Philipp U. Heitz und Adriano Aguzzi (Hrsg.). 2008. *Pathologie. Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; www.studentconsult.de*, 4. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.
- Braun, Jörg und Dirk Müller-Wieland. 2017. *Basislehrbuch Innere Medizin. Kompakt-Greifbar-verständlich*, 6. Aufl. Philadelphia: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG.
- Brown, Richard A., Eduard Shantsila, Chetan Varma und Gregory Y. H. Lip. 2017. Current Understanding of Atherogenesis. *The American journal of medicine* 130 (3): 268–282. doi: 10.1016/j.amjmed.2016.10.022.
- Burck, Hans-Christian. 1988. *Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*, 6. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Chen, Lei, Lijun Qin, Xin Liu und Xiangyun Meng. 2019. CTRP3 Alleviates Ox-LDL-Induced Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction in Mouse Aortic Endothelial Cells by Activating the PI3K/Akt/eNOS Pathway. *Inflammation* 42 (4): 1350–1359. doi: 10.1007/s10753-019-00996-1.
- Cirera, Susanna. 2013. Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue. *BMC research notes* 6: 472. doi: 10.1186/1756-0500-6-472.
- Cornier, Marc-Andre, Dana Dabelea, Teri L. Hernandez, Rachel C. Lindstrom, Amy J. Steig, Nicole R. Stob, Rachael E. van Pelt, Hong Wang und Robert H. Eckel. 2008. The metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 29 (7): 777–822. doi: 10.1210/er.2008-0024.
- Davis, Jeremy E., Nicholas K. Gabler, Jennifer Walker-Daniels und Michael E. Spurlock. 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (6): 1248–1255. doi: 10.1038/oby.2008.210.
- Deng, Wuquan, Changyan Li, Yuping Zhang, Jie Zhao, Mengliu Yang, Mingyuan Tian, Ling Li, Yanling Zheng, Bing Chen und Gangyi Yang. 2015. Serum C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3) levels are decreased in obesity and hypertension and are negatively correlated with parameters of insulin resistance. *Diabetology & metabolic syndrome* 7: 33. doi: 10.1186/s13098-015-0029-0.

- Elks, Cathy E., Marcel den Hoed, Jing Hua Zhao, Stephen J. Sharp, Nicholas J. Wareham, Ruth J. F. Loos und Ken K. Ong. 2012. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Frontiers in endocrinology* 3: 29. doi: 10.3389/fendo.2012.00029.
- Elsaid, Hanaa H., Marwan N. Elgohary und Arafa M. Elshabrawy. 2019. Complement c1q tumor necrosis factor-related protein 3 a novel adipokine, protect against diabetes mellitus in young adult Egyptians. *Diabetes & metabolic syndrome* 13 (1): 434–438. doi: 10.1016/j.dsx.2018.10.004.
- Escolà-Gil, Joan Carles, Gemma Llaverias, Josep Julve, Matti Jauhiainen, Jesús Méndez-González und Francisco Blanco-Vaca. 2011. The cholesterol content of Western diets plays a major role in the paradoxical increase in high-density lipoprotein cholesterol and upregulates the macrophage reverse cholesterol transport pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (11): 2493–2499. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.236075.
- Fadaei, Reza, Nariman Moradi, Mehdi Baratchian, Hassan Aghajani, Mojtaba Malek, Ali Akbar Fazaeli und Soudabeh Fallah. 2016. Association of C1q/TNF-Related Protein-3 (CTRP3) and CTRP13 Serum Levels with Coronary Artery Disease in Subjects with and without Type 2 Diabetes Mellitus. *PloS one* 11 (12): e0168773. doi: 10.1371/journal.pone.0168773.
- Feng, Han, Jin-Yu Wang, Ming Zheng, Cheng-Lin Zhang, Yuan-Ming An, Li Li und Li-Ling Wu. 2016. CTRP3 promotes energy production by inducing mitochondrial ROS and up-expression of PGC-1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *Experimental cell research* 341 (2): 177–186. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.02.001.
- Fève, Bruno, Claire Bastard, Soraya Fellahi, Jean-Philippe Bastard und Jacqueline Capeau. 2016. New adipokines. *Annales d'endocrinologie* 77 (1): 49–56. doi: 10.1016/j.ando.2016.01.001.
- Fischer, Andrew H., Kenneth A. Jacobson, Jack Rose und Rolf Zeller. 2008. Cryosectioning tissues. *CSH protocols* 2008: pdb.prot4991. doi: 10.1101/pdb.prot4991.
- Ford, Earl S., Chaoyang Li und Guixiang Zhao. 2010. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *Journal of diabetes* 2 (3): 180–193. doi: 10.1111/j.1753-0407.2010.00078.x.
- Förstermann, Ulrich, Ning Xia und Huige Li. 2017. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation research* 120 (4): 713–735. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
- Gao, Chao, Shasha Zhao, Kun Lian, Baibing Mi, Rui Si, Zhijun Tan, Feng Fu, Shuai Wang, Rutao Wang, Xinliang Ma und Ling Tao. 2019. C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) and 9 (CTRP9) concentrations are decreased in patients with heart failure and are associated with increased morbidity and mortality. *BMC cardiovascular disorders* 19 (1): 139. doi: 10.1186/s12872-019-1117-0.
- Gimbrone, Michael A. und Guillermo García-Cardeña. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research* 118 (4): 620–636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

- Gimbrone, Michael A., JAMES N. TOPPER, TOBI NAGEL, KEITH R. ANDERSON und GUILLERMO GARCIA-CARDEÑA. 2000. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 902 (1): 230–240. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06318.x.
- Gonzalez, Leticia und Bernardo Louis Trigatti. 2017. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *The Canadian journal of cardiology* 33 (3): 303–312. doi: 10.1016/j.cjca.2016.12.010.
- Gressner, Axel M. und Torsten Arndt. 2019. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Aufl. Springer Reference Medizin.
- Greten, Heiner, Franz Rinninger, Tim Friedrich Greten und Michael Amling (Hrsg.). 2010. *Innere Medizin. 395 Tabellen*, 13. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Hafiane, Anouar und Jacques Genest. 2013. HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol* 2013. doi: 10.1155/2013/891403.
- Hajar, Rachel. 2017. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views : The Official Journal of the Gulf Heart Association* 18 (3): 109–114. doi: 10.4103/HEARTVIEWS.HEARTVIEWS\_106\_17.
- Haka, Abigail S., Valéria C. Barbosa-Lorenzi, Hyuek Jong Lee, Domenick J. Falcone, Clifford A. Hudis, Andrew J. Dannenberg und Frederick R. Maxfield. 2016. Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation. *Journal of lipid research* 57 (6): 980–992. doi: 10.1194/jlr.M064089.
- Hasegawa, Natsuki, Shumpei Fujie, Naoki Horii, Masataka Uchida, Toshiyuki Kurihara, Kiyoshi Sanada, Takafumi Hamaoka und Motoyuki Iemitsu. 2018. Aerobic exercise training-induced changes in serum C1q/TNF-related protein levels are associated with reduced arterial stiffness in middle-aged and older adults. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 314 (1): R94-R101. doi: 10.1152/ajpregu.00212.2017.
- Haverich, Axel. 2017. A Surgeon's View on the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation* 135 (3): 205–207. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025407.
- Haverich, Axel und Hans H. Kreipe. 2016. Ursachenforschung Arteriosklerose: Warum wir die KHK nicht verstehen. *Dtsch Arztebl* 2016 (113(10): A-426 / B-358 / C-358).
- Höfler, Gerald, Hans H. Kreipe und Holger Moch (Hrsg.). 2019. *Pathologie. Das Lehrbuch*, 6. Aufl. München: Elsevier, Urban et Fischer.
- Hu, Desheng, Changjun Yin, Shanshan Luo, Andreas J. R. Habenicht und Sarajo K. Mohanta. 2019. Vascular Smooth Muscle Cells Contribute to Atherosclerosis Immunity. *Frontiers in immunology* 10: 1101. doi: 10.3389/fimmu.2019.01101.
- Johnson, Jason L. und Andrew C. Newby. 2009. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Current opinion in lipidology* 20 (5): 370–378. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283309848.
- Joo, Sung-Pil, Seung-Won Lee, Yong-Hwan Cho, You-Sub Kim, Bo-Ra Seo, Hyung-Seok Kim und Tae-Sun Kim. 2019. Vasa Vasorum Densities in Human Carotid Atherosclerosis Is Associated with Plaque Development and Vulnerability. *Journal of Korean Neurosurgical Society*. doi: 10.3340/jkns.2019.0077.

- Kannel, William B. 1988. Contributions of the framingham study to the conquest of coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 62 (16): 1109–1112. doi: 10.1016/0002-9149(88)90558-9.
- Kassi, Eva, Panagiota Pervanidou, Gregory Kaltsas und George Chrousos. 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC medicine* 9: 48. doi: 10.1186/1741-7015-9-48.
- Katakami, Naoto. 2018. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 25 (1): 27–39. doi: 10.5551/jat.RV17014.
- Kattoor, Ajoy John, Naga Venkata K. Pothineni, Deepak Palagiri und Jawahar L. Mehta. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* 19 (11): 42. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Konaniah, Eddy S., David G. Kuhel, Joshua E. Basford, Neal L. Weintraub und David Y. Hui. 2017. Deficiency of LRP1 in Mature Adipocytes Promotes Diet-Induced Inflammation and Atherosclerosis—Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37 (6): 1046–1049. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309414.
- Kopp, Andrea, Margarita Bala, Christa Buechler, Werner Falk, Philipp Gross, Markus Neumeier, Jürgen Schölmerich und Andreas Schäffler. 2010a. C1q/TNF-related protein-3 represents a novel and endogenous lipopolysaccharide antagonist of the adipose tissue. *Endocrinology* 151 (11): 5267–5278. doi: 10.1210/en.2010-0571.
- Kopp, Andrea, Margarita Bala, Johanna Weigert, Christa Buechler, Markus Neumeier, Charalampos Aslanidis, Jürgen Schölmerich und Andreas Schäffler. 2010b. Effects of the new adiponectin paralogous protein CTRP-3 and of LPS on cytokine release from monocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Cytokine* 49 (1): 51–57. doi: 10.1016/j.cyto.2009.10.001.
- Kraal, G., M. Rep und M. Janse. 1987. Macrophages in T and B cell compartments and other tissue macrophages recognized by monoclonal antibody MOMA-2. An immunohistochemical study. *Scandinavian journal of immunology* 26 (6): 653–661. doi: 10.1111/j.1365-3083.1987.tb02301.x.
- Kulanuwat, Sirikul, Rungsunn Tungtrongchitr, David Billington und Ian G. Davies. 2015. Prevalence of plasma small dense LDL is increased in obesity in a Thai population. *Lipids in health and disease* 14: 30. doi: 10.1186/s12944-015-0034-1.
- Laddu, Deepika R., Jamal S. Rana, Rosenda Murillo, Michael E. Sorel, Charles P. Quesenberry, Norrina B. Allen, Kelley P. Gabriel, Mercedes R. Carnethon, Kiang Liu, Jared P. Reis, Donald Lloyd-Jones, J. Jeffrey Carr und Stephen Sidney. 2017. 25-Year Physical Activity Trajectories and Development of Subclinical Coronary Artery Disease as Measured by Coronary Artery Calcium: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Mayo Clinic proceedings* 92 (11): 1660–1670. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.07.016.
- Lebovitz, H. E. 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 109 Suppl 2: S135-48. doi: 10.1055/s-2001-18576.

- Lee, Won Hee, Sang-Ging Ong, Yang Zhou, Lei Tian, Hye Ryeong Bae, Natalie Baker, Adam Whitlatch, Leila Mohammadi, Hongchao Guo, Kari C. Nadeau, Matthew L. Springer, Suzaynn F. Schick, Aruni Bhatnagar und Joseph C. Wu. 2019. Modeling Cardiovascular Risks of E-Cigarettes With Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Journal of the American College of Cardiology* 73 (21): 2722–2737. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.476.
- Lee, Yee Ting, Hiu Yu Lin, Yin Wah Fiona Chan, Ka Hou Christien Li, Olivia Tsz Ling To, Bryan P. Yan, Tong Liu, Guangping Li, Wing Tak Wong, Wendy Keung und Gary Tse. 2017. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in health and disease* 16 (1): 12. doi: 10.1186/s12944-016-0402-5.
- Li, Ying, Gary L. Wright und Jonathan M. Peterson. 2017. C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP3) Function and Regulation. *Comprehensive Physiology* 7 (3): 863–878. doi: 10.1002/cphy.c160044.
- Lin, Jiale, Qi Liu, Hui Zhang, Xingtao Huang, Ruoxi Zhang, Shuyuan Chen, Xuedong Wang, Bo Yu und Jingbo Hou. 2017. C1q/Tumor necrosis factor-related protein-3 protects macrophages against LPS-induced lipid accumulation, inflammation and phenotype transition via PPAR $\gamma$  and TLR4-mediated pathways. *Oncotarget* 8 (47): 82541–82557. doi: 10.18632/oncotarget.19657.
- Longo, Dan L., Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, S. L. Hauser, J. Larry Jameson und Joseph Loscalzo. 2012. *Harrisons Innere Medizin. Ausgabe in 4 Bänden inklusive Registerband*, 18. Aufl. New York, NY, Berlin: McGraw-Hill; ABW Wissenschaftsverlag.
- Luca, Carl de und Jerrold M. Olefsky. 2008. Inflammation and insulin resistance. *FEBS letters* 582 (1): 97–105. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.057.
- Ludwig, David S. und Mark I. Friedman. 2014. Increasing adiposity: consequence or cause of overeating? *JAMA* 311 (21): 2167–2168. doi: 10.1001/jama.2014.4133.
- Lusis, A. J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407 (6801): 233–241. doi: 10.1038/35025203.
- Ma, Zhen-Guo, Yu-Pei Yuan, Xin Zhang, Si-Chi Xu, Chun-Yan Kong, Peng Song, Ning Li und Qi-Zhu Tang. 2019. C1q-tumour necrosis factor-related protein-3 exacerbates cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovascular research* 115 (6): 1067–1077. doi: 10.1093/cvr/cvy279.
- Maeda, Takashi und Satoshi Wakisaka. 2020. Deficiency of C1q/TNF-related protein 3 (CTRP3) decreases adipose tissue weight in diet-induced obesity mice. *Molecular biology reports* 47 (11): 9219–9224. doi: 10.1007/s11033-020-05905-6.
- Mancuso, Peter. 2016. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and therapy* 5: 47–56. doi: 10.2147/ITT.S73223.
- Mannami, T., S. Baba und J. Ogata. 2000. Strong and significant relationships between aggregation of major coronary risk factors and the acceleration of carotid atherosclerosis in the general population of a Japanese city: the Suita Study. *Archives of internal medicine* 160 (15): 2297–2303.

- McAlpine, Cameron S., Máté G. Kiss, Sara Rattik, Shun He, Anne Vassalli, Colin Valet, Atsushi Anzai, Christopher T. Chan, John E. Mindur, Florian Kahles, Wolfram C. Poller, Vanessa Frodermann, Ashley M. Fenn, Annemijn F. Gregory, Lennard Halle, Yoshiko Iwamoto, Friedrich F. Hoyer, Christoph J. Binder, Peter Libby, Mehdi Tafti, Thomas E. Scammell, Matthias Nahrendorf und Filip K. Swirski. 2019. Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis. *Nature* 566 (7744): 383–387. doi: 10.1038/s41586-019-0948-2.
- McCracken, Emma, Monica Monaghan und Shiva Sreenivasan. 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in dermatology* 36 (1): 14–20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
- McPherson, Ruth und Anne Tybjaerg-Hansen. 2016. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circulation research* 118 (4): 564–578. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306566.
- Meuwese, Marijn C., Hans L. Mooij, Max Nieuwdorp, Bart van Lith, Roos Marck, Hans Vink, John J. P. Kastelein und Erik S. G. Stroes. 2009. Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of lipid research* 50 (1): 148–153. doi: 10.1194/jlr.P800025-JLR200.
- Moore, Kathryn J. und Ira Tabas. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145 (3): 341–355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Mugnai, Giacomo und Alessandra Danese. 2015. Sleep Deprivation and Metabolic Syndrome. In *Modulation of Sleep by Obesity, Diabetes, Age, and Diet*, hrsg. Ronald Ross Watson, 185–192. Burlington: Elsevier Science.
- Mundi, Santa, Marika Massaro, Egeria Scoditti, Maria Annunziata Carluccio, Victor W. M. van Hinsbergh, Marial Luisa Iruela-Arispe und Raffaele de Caterina. 2018. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review. *Cardiovascular research* 114 (1): 35–52. doi: 10.1093/cvr/cvx226.
- Murray, Peter J. und Thomas A. Wynn. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* 11 (11): 723–737. doi: 10.1038/nri3073.
- Nakamura, Kazuto, José J. Fuster und Kenneth Walsh. 2014. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of cardiology* 63 (4): 250–259. doi: 10.1016/j.jcc.2013.11.006.
- Öhman, Miina K., Yuechun Shen, Chinyere I. Obimba, Andrew P. Wright, Mark Warnock, Daniel A. Lawrence und Daniel T. Eitzman. 2008. Visceral Adipose Tissue Inflammation Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* 117 (6): 798–805. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.717595.
- Ordovas, Jose M. 2007. Genetic links between diabetes mellitus and coronary atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 9 (3): 204–210. doi: 10.1007/s11883-007-0020-9.
- Palmer, Biff F. und Deborah J. Clegg. 2015. The sexual dimorphism of obesity. *Molecular and cellular endocrinology* 402: 113–119. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.029.

- Peterson, Jonathan M., Marcus M. Seldin, Zhikui Wei, Susan Aja und G. William Wong. 2013. CTRP3 attenuates diet-induced hepatic steatosis by regulating triglyceride metabolism. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 305 (3): G214-24. doi: 10.1152/ajpgi.00102.2013.
- Peterson, Jonathan M., Zhikui Wei und G. William Wong. 2010. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output. *The Journal of biological chemistry* 285 (51): 39691–39701. doi: 10.1074/jbc.M110.180695.
- Qasim, A., M. Turcotte, R. J. de Souza, M. C. Samaan, D. Champredon, J. Dushoff, J. R. Speakman und D. Meyre. 2018. On the origin of obesity: identifying the biological, environmental and cultural drivers of genetic risk among human populations. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 19 (2): 121–149. doi: 10.1111/obr.12625.
- Quail, Daniela F. und Andrew J. Dannenberg. 2019. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nature reviews. Endocrinology* 15 (3): 139–154. doi: 10.1038/s41574-018-0126-x.
- Rachek, Lyudmila I. 2014. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Progress in molecular biology and translational science* 121: 267–292. doi: 10.1016/B978-0-12-800101-1.00008-9.
- Reiner, Zeljko, Alberico L. Catapano, Guy de Backer, Ian Graham, Marja-Riitta Taskinen, Olov Wiklund, Stefan Agewall, Eduardo Alegria, M. John Chapman, Paul Durrington, Serap Erdine, Julian Halcox, Richard Hobbs, John Kjekshus, Pasquale Perrone Filardi, Gabriele Riccardi, Robert F. Storey und David Wood. 2011. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European heart journal* 32 (14): 1769–1818. doi: 10.1093/eurheartj/ehr158.
- Rochlani, Yogita, Naga Venkata Pothineni, Swathi Kovelamudi und Jawahar L. Mehta. 2017. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 11 (8): 215–225. doi: 10.1177/1753944717711379.
- Roff, Heather und Colette Jappy. 2017. Adiposity and the Role of Neuroendocrine Hormones in Energy Balance. *AACN advanced critical care* 28 (3): 284–288. doi: 10.4037/aacnacc2017712.
- Rosenson, Robert S. und Antonio M. Gotto. 2013. When clinical trials fail to address treatment gaps: the failure of niacin-laropiprant to reduce cardiovascular events. *Current atherosclerosis reports* 15 (6): 332. doi: 10.1007/s11883-013-0332-x.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal* 138 (5 Pt 2): S419-20.
- Rudijanto, Achmad. 2007. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta medica Indonesiana* 39 (2): 86–93.
- Sarvottam, Kumar und Raj Kumar Yadav. 2014. Obesity-related inflammation & cardiovascular disease: Efficacy of a yoga-based lifestyle intervention. *The Indian Journal of Medical Research* 139 (6): 822–834.

- Schmid, Andreas, Jonas Gehl, Miriam Thomalla, Alexandra Hochberg, Anja Kreiß, Marissa Patz, Thomas Karrasch und Andreas Schäffler. 2020. Downregulation of CTRP-3 by Weight Loss In Vivo and by Bile Acids and Incretins in Adipocytes In Vitro. *International journal of molecular sciences* 21 (21). doi: 10.3390/ijms21218168.
- Schmid, Andreas, Andrea Kopp, Frank Hanses, Thomas Karrasch und Andreas Schäffler. 2014. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP-3) attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation and adipose tissue Erk-1/2 phosphorylation in mice in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 452 (1): 8–13. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.054.
- Schmid, Andreas, Martin Roderfeld, Jonas Gehl, Elke Roeb, Andrea Nist, Ho-Ryun Chung, Thorsten Stiewe, Thomas Karrasch und Andreas Schäffler. 2021. C1q/TNF-Related Protein 3 (CTRP-3) Deficiency of Adipocytes Affects White Adipose Tissue Mass but Not Systemic CTRP-3 Concentrations. *International journal of molecular sciences* 22 (4). doi: 10.3390/ijms22041670.
- Schwartz, Stephen M., Zorina S. Galis, Michael E. Rosenfeld und Erling Falk. 2007. Plaque rupture in humans and mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (4): 705–713. doi: 10.1161/01.ATV.0000261709.34878.20.
- Sen, S., K. Wu, R. McNamara, J. Lima, S. Piantadosi und S. M. Oppenheimer. 2000. Distribution, severity and risk factors for aortic atherosclerosis in cerebral ischemia. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 10 (2): 102–109. doi: 10.1159/000016038.
- Shapiro, Lawrence und Philipp E. Scherer. 1998. The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Current Biology* 8 (6): 335–340. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70133-2.
- Smekal, Ales und Jan Vaclavik. 2017. Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 161 (1): 31–40. doi: 10.5507/bp.2017.002.
- Solanki, Sumeet, Prabhatchandra R. Dube, Lutz Birnbaumer und Guillermo Vazquez. 2017. Reduced Necrosis and Content of Apoptotic M1 Macrophages in Advanced Atherosclerotic Plaques of Mice With Macrophage-Specific Loss of Trpc3. *Scientific reports* 7: 42526. doi: 10.1038/srep42526.
- Sary, H. C. 2000a. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *The American journal of clinical nutrition* 72 (5 Suppl): 1297S-1306S. doi: 10.1093/ajcn/72.5.1297s.
- Sary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner und R. W. Wissler. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92 (5): 1355–1374. doi: 10.1161/01.cir.92.5.1355.
- Sary, H. C., A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner und R. W. Wissler. 1994. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89 (5): 2462–2478. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2462.

- Sary, Herbert C. 2000b. Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (5): 1177–1178. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1177.
- Straub, Rainer H. 2015. *The Origin of Chronic Inflammatory Systemic Diseases and their Sequelae*. Waltham, MA: Academic Press.
- Tabas, Ira. 2010. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circulation research* 107 (7): 839–850. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.224766.
- Talman, Andrew H., Peter J. Psaltis, James D. Cameron, Ian T. Meredith, Sujith K. Seneviratne und Dennis T. L. Wong. 2014. Epicardial adipose tissue: far more than a fat depot. *Cardiovascular diagnosis and therapy* 4 (6): 416–429. doi: 10.3978/j.issn.2223-3652.2014.11.05.
- Tan, Bee K., Jing Chen, Jiamiao Hu, Omar Amar, Harman S. Mattu, Raghu Adya, Vanlata Patel, Manjunath Ramanjaneya, Hendrik Lehnert und Harpal S. Randeva. 2013. Metformin increases the novel adipokine cartonectin/CTRP3 in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (12): E1891-900. doi: 10.1210/jc.2013-2227.
- Toledo-Ibelles, Paola und Jaime Mas-Oliva. 2018. Antioxidants in the Fight Against Atherosclerosis: Is This a Dead End? *Current atherosclerosis reports* 20 (7): 36. doi: 10.1007/s11883-018-0737-7.
- Wagner, Roy Marshal, Kamesh Sivagnanam, William Andrew Clark und Jonathan M. Peterson. 2016. Divergent relationship of circulating CTRP3 levels between obesity and gender: a cross-sectional study. *PeerJ* 4: e2573. doi: 10.7717/peerj.2573.
- Wolf, Risa M., Xia Lei, Zhi-Chun Yang, Maeva Nyandjo, Stefanie Y. Tan und G. William Wong. 2016. CTRP3 deficiency reduces liver size and alters IL-6 and TGF $\beta$  levels in obese mice. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 310 (5): E332-45. doi: 10.1152/ajpendo.00248.2015.
- Wong, G. William, Sarah A. Krawczyk, Claire Kitidis-Mitrokostas, Tracy Revett, Ruth Gimeno und Harvey F. Lodish. 2008. Molecular, biochemical and functional characterizations of C1q/TNF family members: adipose-tissue-selective expression patterns, regulation by PPAR-gamma agonist, cysteine-mediated oligomerizations, combinatorial associations and metabolic functions. *The Biochemical journal* 416 (2): 161–177. doi: 10.1042/BJ20081240.
- Wong, Guang W., Jin Wang, Christopher Hug, Tsu-Shuen Tsao und Harvey F. Lodish. 2004. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (28): 10302–10307. doi: 10.1073/pnas.0403760101.
- World Health Organisation. 1958. The classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group. WHO Technical Report Series No. 143. World Health Organisation, Geneva
- Wu, Dan, Hong Lei, Jin-Yu Wang, Cheng-Lin Zhang, Han Feng, Feng-Ying Fu, Li Li und Li-Ling Wu. 2015. CTRP3 attenuates post-infarct cardiac fibrosis by targeting Smad3 activation and inhibiting myofibroblast differentiation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 93 (12): 1311–1325. doi: 10.1007/s00109-015-1309-8.

- Yagmur, Eray, Simone Otto, Ger H. Koek, Ralf Weiskirchen, Christian Trautwein, Alexander Koch und Frank Tacke. 2019. Decreased CTRP3 Plasma Concentrations Are Associated with Sepsis and Predict Mortality in Critically Ill Patients. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 9 (2). doi: 10.3390/diagnostics9020063.
- Yi, Wei, Yang Sun, Yuexing Yuan, Wayne Bond Lau, Qijun Zheng, Xiaoliang Wang, Yajing Wang, Xiyang Shang, Erhe Gao, Walter J. Koch und Xin-Liang Ma. 2012. C1q/tumor necrosis factor-related protein-3, a newly identified adipokine, is a novel antiapoptotic, proangiogenic, and cardioprotective molecule in the ischemic mouse heart. *Circulation* 125 (25): 3159–3169. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099937.

## 10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während des Studiums der Pharmazie in Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Anagnostou, Bakowsky, Brüßler, Bünemann, Culmsee, Diederich, Feuser, Friedrich, Grünweller, Hartmann, Jedelska, Keusgen, Klebe, Kockskämper, Kolb, Kreuzsch, Laufenberg, Li, Nieweg, Ortmann, Petersen, Reichenberg, Reuter, Runkel, Schäfer, Schlitzer, Steinmetzer, Strauer.

Meine akademischen Lehrer während des Studiums der Humanmedizin in Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Aigner, Al-Fakhri, Bacher, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Bauer, Baumann, Becker, Bender, Berger, Bien, Birk, Bliemel, Bohlander, Bogdan, Bonaterra, Brehm, Bücking, Burchert, Carl, Cetin, Czubayko, Decher, Damanakis, Denkert, Dettmeyer, Divchev, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eggers, Eggert, Ehlenz, Eming, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Fritz, Fröbuis, Fuchs-Winkelmann, Gallmeier, Garn, Görg, Gress, Greulich, Grimm, Grosse, Günther, Haug, Hegele, Hertl, Hildebrandt, Hoch, Hofmann, Holzer, Hoyer, Jansen, Jaques, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Karatolios, Keller, Kill, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Knake, Koczulla, Köhler, Kömhoff, Kruse, Kühnert, Leonhardt, Lohoff, Luster, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisner, Maurer, Menzler, Meyer, Mirow, Moll, Morin, Müller, Mutters, Nenadić, Neubauer, Nikolaizik, Nimsky, Oberwinkler, Oertel, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Parahuleva, Pfützner, Plant, Plant, Rastan, Reese, Renke, Renz, Richter, Rierra-Knorrenschild, Ruchholtz, Rüsche, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schneider, Schu, Schulze, Schumacher, Schütt, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sieveking, Sommer, Stuck, Strik, Tackenberg, Thum, Teymoortash, Thieme, Thomas, Thiede, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Vojnar, Wagner, Wahl, Weber, Weihe, Werner, Westermann, Wiesmann, Wissniowski, Wittig, Worzfeld, Wulf, Zemlin, Ziller, Zimmer, Zwiorek.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen meinen Dank entgegenbringen, die mich während der Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Schieffer für die freundliche Unterstützung bei der Themenfindung, die Aufnahme als Doktorand in die Klinik für Kardiologie und für den ideenreichen Austausch im Verlaufe dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Karsten Grote danke ich für die interessante Themenstellung, die Übernahme der Betreuung und die ausgeprägte Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. Ann-Kathrin Vlacil danke ich für die geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung im Labor, die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und die kritische Durchsicht dieser Dissertation.

Für die gute Kooperation bei der Durchführung der Paraffinierung des WAT danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg.

Dem Förderverein des Universitären Herzzentrums Marburg e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums, welches mir ermöglichte, meine Arbeitszeit uneingeschränkt dem Studium und der Promotion zu widmen.

Daniela, Silke und Kinan danke ich für die harmonische Arbeitsatmosphäre, die praktische Unterstützung im Labor und den freundschaftlichen Austausch.

Herzlichst danke ich meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und dieser Dissertation. Insbesondere danke ich meiner Frau Laura für den emotionalen Rückhalt, die vielen motivierenden Gespräche, die Unterstützung zu Hause und den sportlichen Ausgleich in dieser Zeit.