

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung der eNOS-Expression in verschiedenen  
Organen und Geweben der Adipozyten-spezifischen eNOS-  
Knockout-Mäuse

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Alica Maria Helena Camp  
aus Bonn

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. H. Li

2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. A. Daiber

Tag der Promotion:

18. Juni 2024

Teile der Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden publiziert:

Andy W C Man, Yawen Zhou, Gisela Reifenberg, Alica Camp, Thomas Münzel, Andreas Daiber, Ning Xia, Huige Li.

**Deletion of adipocyte NOS3 potentiates high-fat diet-induced hypertension and vascular remodelling via chemerin.** *Cardiovascular Research*, 2023; 119(17): 2755-69, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad164>

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Adipositas	6
1.2 Fettgewebe und Adipozyten	7
1.3 Aufbau der Gefäßwand	8
1.4 Endotheliale NO-Synthase	9
1.5 Zielsetzung	9
<b>Literaturdiskussion</b>	<b>11</b>
2.1 Aufbau Fettgewebe	11
2.2 Funktion des Fettgewebes	11
2.3 Verschiedene Arten von Fettgewebe und Adipozyten	13
2.3.1 Braunes Fettgewebe (BAT)	15
2.3.2 Weißes Fettgewebe (WAT)	18
2.3.3 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT)	19
2.3.4 Thorakales- vs. abdominales- vs. mesenteriales-PVAT	22
2.4 NO-Synthase	26
2.4.1 Aufbau	26
2.4.2 Isoenzyme	27
2.4.3 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	28
2.4.4 Entkopplung des Enzyms	29
2.4.5 eNOS im PVAT	29
2.4.6 Neuere Untersuchungen zu eNOS	31
2.4.7 Regulation der eNOS-Expression	31
2.4.8 Regulation von eNOS	32
2.5 Stickstoffmonoxid (NO)	34
2.6 Endotheliale Dysfunktion	35
2.7 Knockout Mausmodelle	37
2.8 Konditionelles KO	38
2.9 Mutierter Östrogenrezeptor (ER <sup>T2</sup> )	39
2.10 Gewebespezifischer Promotor - Adiponektin	40
2.11 CRISPR/Cas9	41
<b>Material und Methoden</b>	<b>43</b>
3.1 Material	43
3.1.1 Geräte	44
3.1.2 Herkunft der Mäuse	45
3.1.3 Haltung und Zucht der Mäuse	45
3.1.4 Kreuzung	45
3.1.5 Expression von Cre	47
3.1.6 Gentergeting mittels Rekombinase	48
3.1.7 Intraperitonealinjektion	48

<b>3.2 Methoden</b>	<b>49</b>
3.2.1 Western Blot	49
3.2.3 Puffer und Lösungen	50
3.2.4 Gewebegewinnung	52
3.2.5 Präparation des PVAT und m-PVAT	53
3.2.6 Erstellung des Proteinlysats	53
3.2.7 Bicinchoninic Acid Assay (BCA)	53
3.2.8 Gelelektrophorese	54
3.2.9 Blotting	54
3.2.10 Anfärben	54
3.2.11 Blockieren	54
3.2.12 Primärer Antikörper	54
3.2.13 Sekundärer Antikörper	55
3.2.14 Chemiluminescence und Fotoentwicklung	55
3.2.15 Auswertung der Western Blots	55
3.2.16 Genotypisierung und PCR	56
3.2.17 Probengewinnung	56
3.2.18 Isolation der DNA	56
3.2.19 Elektrophorese	59
3.2.20 Visualisierung der Bande	59
<b>3.4 Statistische Auswertung</b>	<b>59</b>
<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1 Ergebnisse der PCR	60
4.2 Western Blot Ergebnisse	62
4.2.1 Allgemein	62
4.2.2 Braunes Fettgewebe (BAT)	63
4.2.3 Epididymales Fettgewebe (eWAT)	65
4.2.4 Inguinales weißes Fettgewebe (iWAT)	67
4.2.5 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT)	69
4.2.6 Mesenterial-arterielles Perivaskuläres Fettgewebe (m-PVAT)	71
4.2.7 Aorta	73
4.2.8 Leber	75
4.2.9 Gehirn	77
4.2.10 Herz	79
4.3 Körpergewicht	81
4.4 Gewebe	81
<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1 Einführung	83
5.2 Spezifität des Modells	84
5.3 Selektivität des Modells	85
5.4 Effektivität	87
5.5 Gewicht der eNOS KO-Mäuse	88
5.6 Limitationen und Fazit	90
<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung</b>	<b>94</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>95</b>
<b>Anhang</b>	<b>97</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A-PVAT	abdominal perivascular adipose tissue
ADRF	adipocyte derived relaxing factor
BCA	Bicinchoninic Acid
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BMP7	Bone morphogenic Protein 7
Bp	Basenpaare
C/EBP	CCAAT/Enhancer binding protein
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
Cidea	cell death inducing DFFA like effector A
Cre	Rekombinase
DSB	Doppelstrangbruch
eNOS/NOS3	endotheliale NO Synthase
ERK	extracellular signal-related kinase
eWAT	epididymal/gonadal white adipose tissue
FAD	flavin adenin dinucleotide
FMN	flavin adenin mononucleotide
gRNA	guide ribonucleic acid
HFD	High fat diet
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IL1	Interleukin 1
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$

iWAT	inguinal white adipose tissue
KAT1	Kynurenin Aminotransferase 1
KI	Knockin
KO	Knockout
M-PVAT	mesenterial artery-perivascular adipose tissue
MA	mesenterial artery
MAZ	Myc-assoziierte Zinkfingerprotein
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
mRNA	messenger ribonucleic acid
NADPH	nicotinamid adenin dinucleotid phosphate
NF $\kappa$ b	nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PRDM16	PR-domain 16 Proteinkinase G
PVAT	perivascular adipose tissue
Sca1	stem cell antigen 1
SM22 $\alpha$	smooth muscle protein 22 $\alpha$
SVF	stromal vascular fraction
T-PVAT	thoracic perivascular adipose tissue
TAG	Triacylglyceride
Tbx1	T-Box-1 Protein
Tcf21	Transkriptionsfaktor-21

Tmem26	Transmembranprotein-26
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cell
Zic1	Zinkfingerprotein-1

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	<b>Auflistung der Materialien</b>
<b>Tabelle 2</b>	<b>Auflistung der Geräte</b>
<b>Tabelle 3</b>	<b>Auflistung der Puffer und Lösungen für den Western Blot</b>
<b>Tabelle 4</b>	<b>Rezepte für Western Blot Gele</b>
<b>Tabelle 5</b>	<b>Auflistung Material für die PCR</b>
<b>Tabelle 6</b>	<b>Auflistung der PCR-Primer</b>
<b>Tabelle 7</b>	<b>PCR Mix AdipoqCre/ER<sup>T2</sup></b>
<b>Tabelle 8</b>	<b>PCR Mix fl/fl</b>
<b>Tabelle 9</b>	<b>Ablaufprotokoll PCR fl/fl</b>
<b>Tabelle 10</b>	<b>Ablaufprotokoll PCR Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup></b>
<b>Tabelle 11</b>	<b>Reagenzien für die PCR</b>
<b>Tabelle 12</b>	<b>Gewichte der Organe von weiblichen Mäusen</b>
<b>Tabelle 13</b>	<b>Gewichte der Organe von männlichen Mäusen</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Aufbau einer arteriellen Gefäßwand
- Abb. 2** Schematische Darstellung der verschiedenen Fettdepots bei Mäusen
- Abb. 3** Entwicklung der drei Arten von Adipozyten aus ihren Vorläuferzellen
- Abb. 4** Histologische Bilder der verschiedenen Arten von Fettgewebe
- Abb. 5** Darstellung der Charakteristiken und Marker unterschiedlicher (Vorläufer-) Zellen der verschiedenen PVATs
- Abb. 6** molekularer Aufbau der NO-Synthase
- Abb. 7** Charakteristiken und Vorkommen der verschiedenen NOS Isoformen
- Abb. 8** Entstehung von NO durch die NO-Synthase mittels Redox-Reaktion aus L-Arginin und O<sub>2</sub>
- Abb. 9** Verschiedene KO-Verfahren im Überblick
- Abb. 10** Wirkprinzip der induzierbaren Rekombinase
- Abb. 11** Targeting Strategie zur Generierung von NOS3<sup>(flox/flox)</sup> Mäusen mithilfe von gRNA
- Abb. 12** Schema des Kreuzungsvorganges der Mäuse über vier Generationen hinweg
- Abb. 13** Genotypisierung mittels PCR mit dem Protokoll für den Nachweis der Cre Rekombinase
- Abb. 14** Genotypisierung mittels PCR mit dem Protokoll für den Nachweis des fl/fl Genotyps
- Abb. 15** eNOS-Expression im BAT der männlichen Mäuse
- Abb. 16** eNOS-Expression im BAT der weiblichen Mäuse
- Abb. 17** eNOS-Expression im eWAT der männlichen Mäuse
- Abb. 18** eNOS-Expression im eWAT der weiblichen Mäuse
- Abb. 19** eNOS-Expression im iWAT der männlichen Mäuse
- Abb. 20** eNOS-Expression im iWAT der weiblichen Mäuse
- Abb. 21** eNOS-Expression im PVAT der männlichen Mäuse

- Abb. 22** eNOS-Expression im PVAT der weiblichen Mäuse
- Abb. 23** eNOS-Expression im m-PVAT der männlichen Mäuse
- Abb. 24** eNOS-Expression im m-PVAT der weiblichen Mäuse
- Abb. 25** eNOS-Expression in der Aorta der männlichen Mäuse
- Abb. 26** eNOS-Expression in der Aorta der weiblichen Mäuse
- Abb. 27** eNOS-Expression in der Leber der männlichen Mäuse
- Abb. 28** eNOS-Expression in der Leber der weiblichen Mäuse
- Abb. 29** eNOS-Expression im Gehirn der männlichen Mäuse
- Abb. 30** eNOS-Expression im Gehirn der weiblichen Mäuse
- Abb. 31** eNOS-Expression im Herz der männlichen Mäuse
- Abb. 32** eNOS-Expression im Herz der weiblichen Mäuse
- Abb. 33** Körpergewicht der männlichen (A) und weibliche (B) Mäuse. Angaben in Gramm

## Einleitung

Der theoretische Kontext dieser Dissertation schließt die Pathophysiologie und Begleiterscheinungen einer Adipositas sowie die wesentlichen Eigenschaften verschiedener Arten von Fettgewebe und der darin enthaltenen Adipozyten ein. Zum besseren Verständnis der Charakteristiken unterschiedlicher Arten von Fettgewebe wird die genaue Herkunft der Adipozyten ausführlich erörtert. In den folgenden Kapiteln wird zudem die Funktion und Relevanz der endothelialen NO-Synthase eingehend erläutert. Zum Abschluss wird ein kurzer Einblick in die Funktionsweise und den Aufbau des induzierbaren gewebespezifischen Knockout-Mausmodells gegeben.

### 1.1 Adipositas

Adipositas ist ein allseits bekannter Risikofaktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität (Flegal et al., 2013). Getrieben von einer chronischen Imbalance zwischen überschüssiger Energieaufnahme in Form von Nahrung und/oder reduziertem Energieverbrauch aufgrund verminderter körperlicher Aktivität, wird sie häufig als eine globale Epidemie des 21. Jahrhunderts betitelt (Marlatt and Ravussin, 2017).

Sie ist mit den bekannten Volkskrankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus Typ II, Hypertonie, kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) u.v.m. assoziiert (Lavie et al., 2009) (Roberto et al., 2015).

Diese Erkrankungen gehen sowohl mit metabolischen (z.B. Inflammation) als auch funktionellen Veränderungen und Pathologien einher. Das sog. metabolische Syndrom wird auch als proinflammatorischer und prothrombotischer Zustand charakterisiert, in welchem das Fettgewebe für die Pathophysiologie eine zentrale Rolle spielt (McCracken et al., 2018). Die abdominelle Adipositas ist neben einer Dyslipidämie, Hyperglykämie und Hypertonie eine der am häufigsten beobachteten Komponenten des metabolischen Syndroms (Engin, 2017). Alle diese Zustände sind mit einem erhöhten Vorhandensein oder einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) assoziiert. Hierauf wird im weiteren Verlauf (Kapitel Endotheliale Dysfunktion) näher eingegangen (Carr and Frei, 2000).

## 1.2 Fettgewebe und Adipozyten

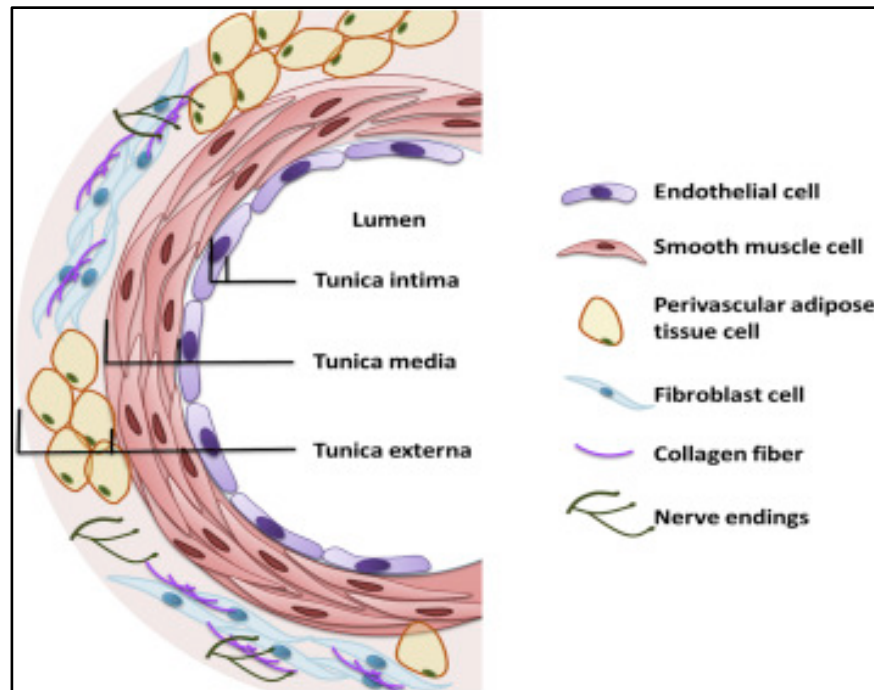
Entgegen der langjährigen Annahme, das Fettgewebe sei ein reiner Speicher überschüssiger Energie oder agiere lediglich als Stützgewebe von Organen oder Muskulatur, ist es mittlerweile wissenschaftlicher Konsens, dass das Fettgewebe weitaus mehr Funktionen erfüllt. Insbesondere dem weißen Fettgewebe schreibt man die Funktion eines endokrin aktiven Organs zu (Kershaw and Flier, 2004), das sog. Adipokine und Zytokine freisetzt. Diese Adipokine sind an vielen metabolischen Systemen und Signalkaskaden beteiligt. Dadurch nehmen sie Einfluss auf die Glucoseaufnahme, Insulinantwort, Fettsäureoxidation und viele weitere Prozesse, welche eine zentrale Rolle im Rahmen des Energiehaushalts spielen (Ahima and Lazar, 2008). Eine Zunahme an Fettgewebe bspw. im Rahmen von Adipositas führt in den Adipozyten durch phänotypische Veränderung zu Inflammation und Dysfunktion, sowie einer Einwanderung von Immunzellen in das Fettgewebe (Hotamisligil, 2017b, Hotamisligil, 2006). Die normale Funktion der Adipozyten wird gestört, was wiederum auch andere Organsysteme und Gewebe in ihrer Funktion beeinflusst. (Hotamisligil, 2017a).

Somit haben Adipozyten einen Einfluss auf die Pathogenese einiger Erkrankungen, (s.o.) die mit einer systemischen Inflammation assoziiert sind.

Welche genaue Rolle das Fettgewebe bzw. die Adipozyten spielen und in welchem Ausmaß ihr Einfluss im Rahmen der Pathogenese dieser Erkrankungen zu charakterisieren und einzuordnen ist, bleibt Gegenstand aktueller Forschung.

Fettgewebe stellt zudem nicht einfach eine homogene Gewebsentität dar. Vielmehr weiß man, dass es relevante Unterschiede zwischen verschiedenen Formen von Fettgeweben wie bspw. dem weißen Fettgewebe (WAT) und dem braunen Fettgewebe (BAT) gibt (Esteve Ràfols, 2014). Dies ist zum einen durch die unterschiedliche Lokalisation und deren umgebenden Gewebe (z.B. Gefäße) und zum anderen durch die Abstammung aus verschiedenen Vorläuferzellen zu erklären. (Saely et al., 2012). Die Verteilung bzw. relative Masse unterschiedlicher Formen von Fettgewebe ist mit jeweils anderem Risikoausmaß für die Entwicklung metabolischer Erkrankungen assoziiert. Es ergibt sich vor allem aus den Charakteristiken einzelner Adipozytensubtypen (Yang Loureiro et al., 2022).

### 1.3 Aufbau der Gefäßwand



**Abb. 1 Aufbau einer arteriellen Gefäßwand.** Zu sehen ist die charakteristische Dreischichtung und die in den einzelnen Schichten enthaltenen Zelltypen. Grafik aus (Zhao et al., 2015b)

Gefäßwände sind aus drei Schichten aufgebaut (Abb.1). Dazu gehört die äußerste Tunica adventitia oder externa, die mittlere Tunica media und die innere Tunica intima. Jede dieser Schichten enthält ihre eigenen, für sie charakteristischen Strukturen.

In der Tunica adventitia liegt das sog. Perivaskuläre Fettgewebe (PVAT) sowie Nervenendigungen und bindegewebige Strukturen, die für einen festen Halt an ihrem jeweiligen Organ sorgen.

Die mittlere Schicht (tunica media), bestehend aus glatten Muskelzellen (VSMC), ist für den Vasotonus bzw. die Dilatation oder Konstriktion der Gefäße verantwortlich.

Die Tunica intima enthält eine einschichtige Lage aus Endothelzellen und kleidet das gesamte Gefäßsystem von innen aus. Das heißt von den kleinsten Kapillaren bis zum Herzen inbegriffen (Montezano and Touyz, 2012). Das Endothel fungiert demnach als Barriere zwischen dem im Gefäßlumen fließenden Blut und den umgebenden Strukturen. Außerdem besitzt es die Eigenschaft auf diverse Stimuli wie Hormone oder Druck, Zug oder Schubspannung reagieren zu können (Montezano and Touyz, 2012).

## 1.4 Endotheliale NO-Synthase

Das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) spielt im Kontext der Entstehung systemischer, inflammatorischer und kardiovaskulärer Erkrankungen eine zentrale Rolle. ENOS befindet sich überwiegend im Endothel und produziert das vasodilatatorisch wirkende Stickstoffmonoxid (NO). Dazu nutzt sie als Substrat die Aminosäure L-Arginin (Li and Förstermann, 2000). Der Pathogenese der oben genannten Erkrankungen (Diabetes mellitus II, CVDs etc.) liegt unter anderem der Mechanismus einer eNOS-Entkopplung zugrunde. In diesem Zusammenhang kommt es vermehrt zu oxidativem Stress und (Łuczak et al., 2020) einer endothelialen Dysfunktion.

Ein besonders zentraler Aspekt im Kontext dieser Dissertation ist, dass eNOS abhängig von ihrer Lokalisation einen unterschiedlich großen Einfluss auf die Entstehung kardiovaskulärer und metabolischer Pathologien ausübt. Diesen Einfluss und ihre Rolle genauer zu charakterisieren ist Forschungsobjekt dieser und zukünftiger experimenteller Untersuchungen, welche auf den Erkenntnissen dieser Arbeit fußen.

## 1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Quantifizierung bzw. Charakterisierung der Effizienz und Effektivität von Adipozyten-spezifischem eNOS-Knockout (KO). Zu diesem Zweck wurde ein spezielles Mausmodell entwickelt - die induzierbaren Adipozyten-spezifischen eNOS-Knockout-Mäuse. Mittels PCR-Analyse hat zunächst eine genotypische Charakterisierung der Mäuse stattgefunden. Die Induktion des KOs erfolgte durch Tamoxifen mittels intraperitonealer Injektion. Der Nachweis einer eNOS-Expression in verschiedenen Geweben gelang mithilfe des Western Blots.

Im Fokus der Versuchsreihe stand die Quantifizierung der eNOS-Expression bei Mäusen mit und ohne Adipozyten-spezifischer Rekombinase (Adipoq-Cre/ERT<sup>2</sup>). Beide dieser Gruppen erhielten eine Tamoxifeninjektion. Als Kontrolle dienten Mäuse mit einem globalen eNOS-KO.

Unter den untersuchten Geweben waren vor allem das mesenteriale perivaskuläre Fettgewebe (m-PVAT), das aortale perivaskuläre Fettgewebe (PVAT), das braune Fettgewebe (BAT) und das weiße Fettgewebe (WAT) von besonderem Interesse. Zu den weiteren untersuchten Geweben gehörten das Gehirn, das Herz, die Leber und die Aorta.

Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit eine Reduktion der eNOS-Expression erreicht werden kann und wie sich diese in den unterschiedlichen Typen der Fettgewebe darstellt. Zudem kann diskutiert werden, wodurch sich mögliche Unterschiede in den Gewebetypen etablieren.

Ziel der Untersuchung ist es, darzustellen in welchem Maß es möglich ist, durch das gewählte Mausmodell eine Reduktion oder Elimination des Enzyms eNOS in verschiedenen Fettgewebstypen zu erreichen.

Das Modell ist unabdinglich für eine spätere präzise Charakterisierung des Einflusses der Adipozyten-spezifischen eNOS auf bestimmte kardiovaskuläre sowie metabolische Funktionen und Prozesse, wie z.B. den Sauerstoffbedarf, die Glucosetoleranz oder die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen. Es soll außerdem Grundlage für zukünftigen Studien sein, um Erkenntnisse über die pathophysiologische Relevanz von eNOS in verschiedenen Fettgeweben erzielen zu können. Dies bietet die Chance sie als pharmakologisches Target im Rahmen der Therapie vaskulärer und metabolischer Erkrankungen zu nutzen.

## Literaturdiskussion

### 2.1 Aufbau Fettgewebe

Das Fettgewebe besteht aus verschiedenen Typen von Zellen. Den Großteil der Zellen machen die Adipozyten aus. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Fettgewebes ist die sog. "stromal vascular fraction" (SVF). Sie beschreibt eine heterogene Gruppe an Zellen, zu denen unter anderem Immunzellen, endotheliale Progenitorzellen, mesenchymale Stammzellen, Makrophagen, T-regulatorische Zellen sowie glatte Muskelzellen und Präadipozyten, gehören (Nguyen et al., 2016).

### 2.2 Funktion des Fettgewebes

In den letzten Jahren hat die Forschung zur Biologie und Funktion des Fettgewebes zu einem Umdenken hinsichtlich der Rolle bei der Aufrechterhaltung von Gesundheit und der Entstehung von Krankheit geführt. Durch seine endokrine und parakrine Aktivität wird es nunmehr als relevantes Regulationsorgan im Rahmen kardiovaskulärer Gesundheit angesehen (Oikonomou and Antoniades, 2019).

Seine Hormone und Zytokine besitzen sowohl metabolische als auch immunologische Funktionen (Torres et al., 2019). Im Rahmen der Pathophysiologie der Adipositas vollzieht sich ein Shift in der Produktion der Hormone des Fettgewebes hin zu proinflammatorisch wirkenden Substanzen. Dabei kommt es zu einer lokalen Inflammation, die einen Beitrag zu der beim metabolischen Syndrom vorherrschenden niedriggradigen systemischen Inflammation (Nishimura et al., 2009).

Im Mausmodell konnte eine Hochregulation proinflammatorischer Adipokine und Zytokine unter dem Einfluss hochkalorischer Nahrung (HFD) beobachtet werden, während gleichzeitig antiinflammatorisch wirkende Botenstoffe herunterreguliert wurden. Zu den proinflammatorisch wirkenden Adipokinen gehören Leptin, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1- $\beta$  (IL1) und Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ). Adiponektin und Interleukin-10 stellen Vertreter der antiinflammatorischen Adipokine dar. Adiponektin ist eines der ersten beschriebenen Adipokine, welches bei Übergewicht dysreguliert ist. Die Forschungsgruppe von Sena et al. konnte

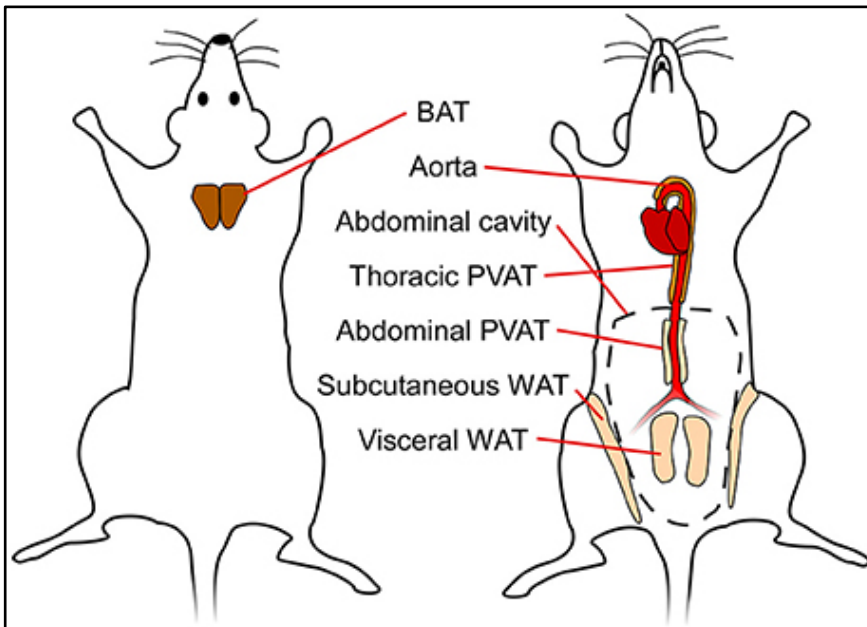
nachweisen, dass die Behandlung mit exogenem Adiponektin den proinflammatorischen Zustand, der durch Übergewicht ausgelöst wird, im PVAT verbessern konnte (Sena et al., 2017).

Übergewicht induziert zudem die Hochregulation der Monozytenchemotaxine, wie das "monocyte chemotactic protein 1" (MCP-1) und der Makrophagenmarker CD68 und F4/80 (Xia et al., 2016).

Die Fettgewebsphysiologie und Pathophysiologie weist eine regionale Variabilität auf. So ist z.B. viszerales Fettgewebe, welches Organe umgibt mit einem proinflammatorischen Effekt und vaskulärer Pathogenese assoziiert und nimmt bei zentraler bzw. abdominaler Adipositas an Masse zu (Alexopoulos et al., 2014). Subkutanes Fettgewebe wurde hingegen als eine Art Puffersystem, mit einerseits Speicherfunktion für überschüssige Energie und andererseits positiven Effekten auf Adipokine, welche einen fördernden Einfluss auf die kardiometabolische Gesundheit haben, beschrieben (Snijder et al., 2005, Antonopoulos et al., 2011, Buemann et al., 2006).

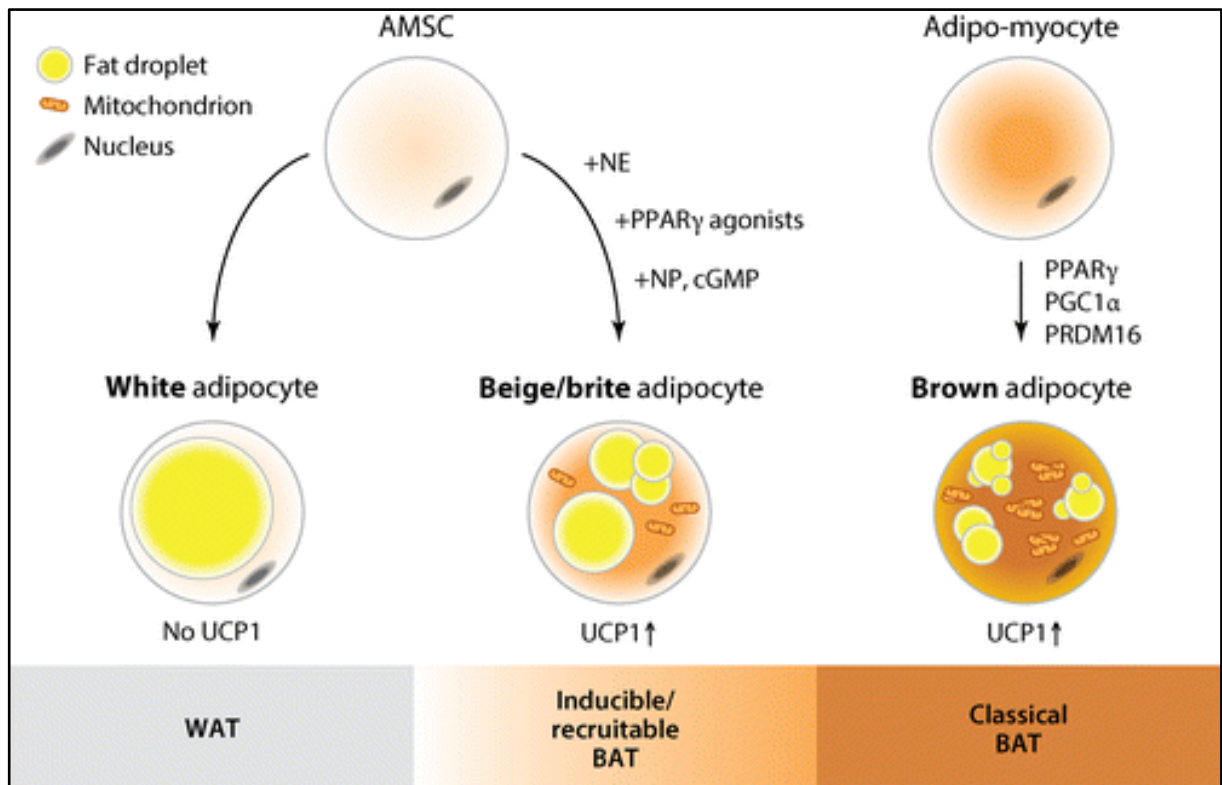
Dies unterstreicht die Komplexität seines Einwirkens auch auf die Pathogenese vaskulärer Erkrankungen und lässt annehmen, dass sowohl die regionale Variabilität als auch die genaue biologische Funktion entscheidender für seine Effekte sind, als die reine Masse des Fettgewebes (Akoumianakis et al., 2017).

## 2.3 Verschiedene Arten von Fettgewebe und Adipozyten



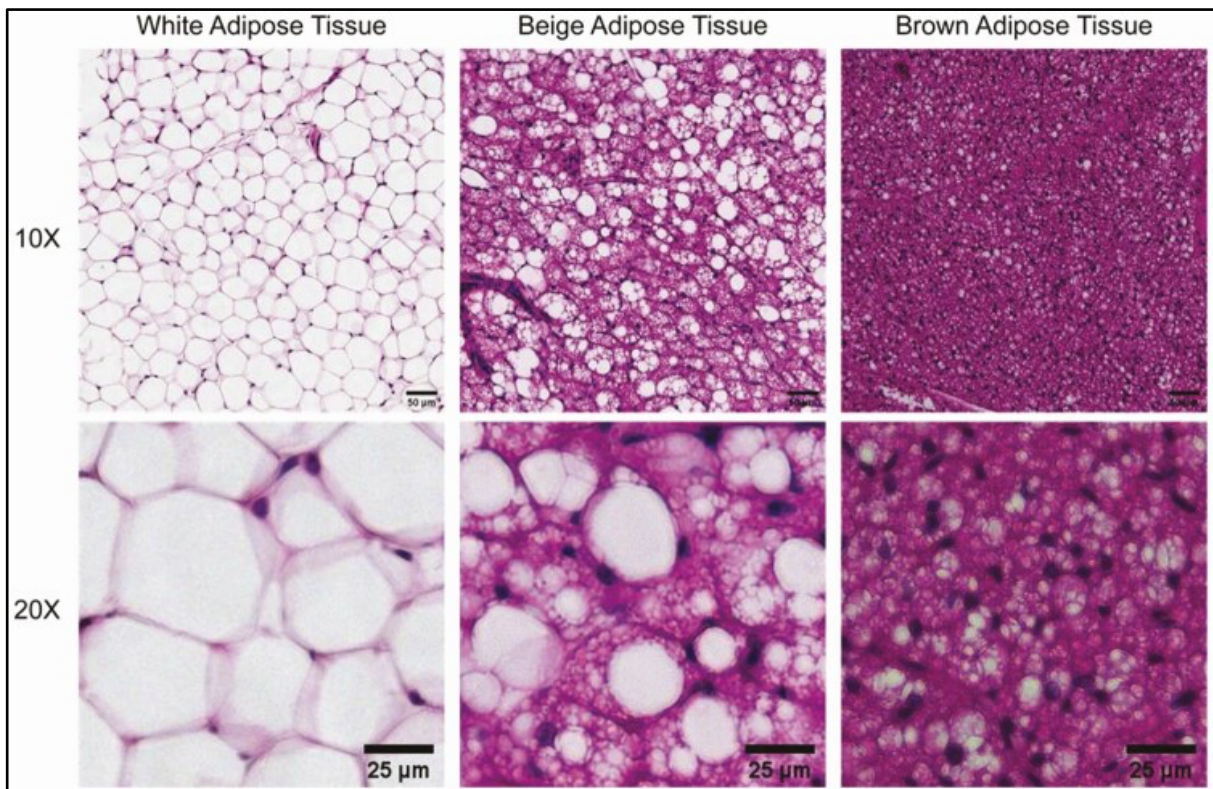
**Abb. 2 Schematische Darstellung der verschiedenen Fettdepots bei Mäusen.**  
Grafik aus (Hildebrand et al., 2018)

Fettgewebe ist an verschiedenen anatomischen Lokalisationen zu finden (siehe Abb. 2) und besteht aus mehreren Arten von Adipozyten (siehe Abb. 3). In der Interskapularregion von Mäusen findet sich vorrangig das BAT. Das viszerale Fettgewebe umschließt die Organe, das subkutane Fettgewebe befindet sich direkt unter der Haut und die Gefäße werden von perivaskulärem Fettgewebe umschlossen.



**Abb. 3 Entwicklung der drei Arten von Adipozyten aus ihren Vorläuferzellen.** Die weißen Adipozyten stammen von den AMSCs ab (links). Aus den AMSCs können sich durch Stimuli wie NE, PPAR $\gamma$ , NP und cGMP auch die beigen Adipozyten (mitte) differenzieren. Sie exprimieren das UCP1 ebenso wie die braunen Adipozyten (rechts). Diese wiederum entwickeln sich aus anderen Vorläuferzellen, die sog. Adipomyozyten. Stimuli wie PPAR $\gamma$ , PGC1 $\alpha$  und PRDM16 tragen hierzu bei. Abkürzungen: AMSC, adipose tissue–derived mesenchymal stem cell; BAT, brown adipose tissue; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; NE, norepinephrine; NP, natriuretic peptide; PGC1 $\alpha$ , peroxisome proliferator–activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator–activated receptor  $\gamma$ ; PRDM16, PR domain 16; UCP1, uncoupling protein 1; WAT, white adipose tissue. aus (Pfeifer and Hoffmann, 2015)

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, gibt es 3 Arten von Adipozyten, welche sich verschieden differenzieren und präsentieren (Pfeifer and Hoffmann, 2015). Für die Untersuchung der einzelnen Zelltypen wurden verschiedene Adipozyten-Markergene entdeckt. Dazu gehört das Zinkfingerprotein-1 (Zic1) als Marker für braune, Transkriptionsfaktor-21 (Tcf21) und T-Box-1 Protein (Tbx1) für weiße und das Transmembranprotein-26 (Tmem26) für beige Adipozyten (de Jong et al., 2015, Contreras et al., 2016).



**Abb. 4 Histologische Bilder der verschiedenen Arten von Fettgewebe.** Zu erkennen sind die Unterschiede in der Zellanordnung und Morphologie. Das weiße Fettgewebe (WAT) besteht aus deutlich größeren Lipidtropfen im Vergleich zum braunen Fettgewebe (BAT). Grafik aus (Yang Loureiro et al., 2022)

### 2.3.1 Braunes Fettgewebe (BAT)

BAT hat antagonistisch zum WAT die Aufgabe und Funktion die aus der Fettoxidation gewonnene Energie in Form von Wärme abzugeben, was auch als "non shivering thermogenesis" bezeichnet wird. Dieser Vorgang wird durch die hohe Zahl an Mitochondrien und einen Entkopplungsmechanismus, mittels Entkopplungsprotein (UCP-1) der Atmungskette gewährleistet (van Marken Lichtenbelt, 2012). Bei Aktivierung entkoppelt das UCP-1 den mitochondrialen Protonengradienten von der ATP-Synthese. Somit wird anstatt Energie, durch Verbrennung großer Mengen an Fettsäuren, Glucose und anderen Substraten, Hitze produziert (Cannon and Nedergaard, 2004a).

Das BAT besitzt auch im metabolischen Kontext, bzgl. einer Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Adipositas, dem weißen Fettgewebe entgegengesetzte protektive Effekte (Bartelt and Heeren, 2014).

Seine Vorläuferzellen sind andere als die der weißen Adipozyten. Sie sind näher verwandt mit denen einer Muskelzelle (Saely et al., 2012) und werden daher auch als

Adipomyozyten bezeichnet (Pfeifer and Hoffmann, 2015). Das sog. zentrale Dermomyotom ist der Ursprung der braunen Adipozyten. Es handelt sich hierbei um embryonale Ursegmente, die für die spätere Entwicklung der Haut und der Muskelzellen verantwortlich sind (Atit et al., 2006). Walden et al. konnte beim BAT anders als im WAT ein microRNA-Expressionsmuster, das dem von Muskelzellen gleicht, darstellen (Walden et al., 2009). MicroRNAs sind etwa 22 Nukleotid lange nichtkodierende RNA-Sequenzen, welche die Genexpression regulieren können (Trajkovski and Lodish, 2013).

Die braune Erscheinung der Adipozyten verdanken sie zum einen der hohen Anzahl an eisenhaltigen Mitochondrien und zum anderen der Fülle an Kapillaren, welche die Zellen mit Blut versorgen. Bis zu 5 Kapillaren reichen dabei an nur einen Adipozyten heran. Die Zellen sind mit 20-40µm deutlich kleiner als weiße Adipozyten (siehe Abb.4) (Robidoux et al., 2004).

Das BAT befindet sich bei Säugetieren vor allem in der Interskapularregion (Abb.2). Der Mensch verfügt insbesondere als Neugeborenes über BAT, um ihn vor dem Erfrieren zu schützen. Allerdings weiß man inzwischen, dass auch der erwachsene Mensch, abhängig von Stimuli wie z.B. Kälte oder metabolischen Faktoren, eine Form von BAT entwickeln kann (Lean, 1989). Diesen Vorgang nennt man "browning". Aus Vorläuferzellen des weißen Fettgewebes entstehen durch die genannten Stimuli, Adipozyten, welche in ihren Charakteristika denen der braunen sehr ähnlich sind. Sie werden auch "brite" für "brown in white", und "beige" genannt (Barquissau et al., 2016).

Der Prozess des "browning" tritt durch sog. physiologisch reversible Transdifferenzierung aus adulten Adipozyten auf (Frontini and Cinti, 2010) (Granneman et al., 2005) und kann durch bestimmte Stimuli bidirektional zwischen weißen und induzierbaren braunen Adipozyten verlaufen. (Rosenwald et al., 2013) Dabei kommt es z.B. unter Kälteexposition durch Sympathikusaktivierung über  $\beta_3$ -adrenerge Fasern (Robidoux et al., 2004) zur Umstrukturierung des Fettgewebes. Die Kapillarisation und Innervation sowie das Expressionsmuster zellulärer Bestandteile ändern sich (Murano et al., 2009, Granneman et al., 2005).

Die Induktion der braunen Adipogenese auf dem Weg der  $\beta_3$ -Adrenorezeptoraktivierung geht mit dem Untergang von weißen Adipozyten einher, welche im Verlauf von Makrophagen eliminiert werden (Lee et al., 2013). Zwar konnte

man feststellen, dass das BAT alle 3 Arten von  $\beta$ -Adrenozeptoren ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$ ) exprimiert, jedoch scheint der  $\beta_3$ -Adrenozeptor für reife braune Adipozyten die relevanteste Rolle zu spielen (CANNON and NEDERGAARD, 2004b). Sowohl der  $\beta_1$ - als auch der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor werden insbesondere in unreifen Adipozyten in geringen Mengen exprimiert (Fève et al., 1990).

Im Zusammenhang mit der Differenzierung von Adipozyten wurden verschiedene Regulatoren identifiziert, die zur Ausprägung des braunen Phäno- und Genotyps beitragen (Abb. 3). Hierzu gehören das Zinkfingerprotein PRDM16, das über Bindung an PPAR $\gamma$  (peroxisome-proliferator-activated-receptor-gamma) dessen Transkriptionsfunktion aktiviert (Seale et al., 2008, Seale et al., 2007) und BMP7 (Bone morphogenic Protein). Dies trägt ebenso zur braunen Adipogenese bei (Tseng et al., 2008). PPAR $\gamma$  ist ein nukleärer Rezeptor, welcher Fettsäure- und Eicosanoid-abhängig ist. Synthetisch hergestellte Agonisten dieses Rezeptors werden bspw. in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt (Anghel and Wahli, 2007).

Schulz et al. konnten belegen, dass humane Präadipozyten, welche aus dem iWAT isoliert werden, eine höhere Tendenz bzw. Fähigkeit zum "browning" aufweisen als Zellen aus dem mesenterialen oder omentalen WAT (Schulz et al., 2011). Die überwiegende Zahl induzierbarer brauner Adipozyten im iWAT stammt aus dem Prozess der oben beschriebenen Transdifferenzierung von bestehenden weißen Adipozyten. Induzierbare braune Adipozyten des eWATs hingegen haben ihren Ursprung fast alle in eigenen Vorläuferzellen, welche unter anderem das Stammzellantigen-1(Sca-1), CD34, und den PDGFR $\alpha$  (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ) exprimieren (Lee et al., 2012).

Einige Studien liefern Hinweise, dass nicht nur das sympathische Nervensystem zur Aktivierung oder Differenzierung von BAT, sondern auch Stimuli ausgehend von der Muskulatur und dem Herzen, einen Beitrag leisten (Villarroya and Vidal-Puig, 2013). Dazu zählt z.B. das durch körperliche Muskelaktivität freigesetzte Myokin Irisin, welches durch die p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) und die ERK-Signalkaskade (extracellular signal-related kinase) zum "browning" führen kann (Boström et al., 2012, Zhang et al., 2014).

### 2.3.2 Weißes Fettgewebe (WAT)

Das weiße Fettgewebe ist vorrangig als Energiespeicherorgan bekannt. Es speichert diese Energie in Form von Triacylglyceriden (TAG), welche bei Energiebedarf durch Lipolyse mobilisiert werden. Die Lipolyse wiederum wird unter anderem durch Noradrenalinbindung an dem entsprechenden  $\beta$ -adrenergen-Rezeptor induziert. In der weiteren Kaskade wird die Produktion von cyclischem Adenosin-monophosphat (cAMP) initiiert. Es fungiert als second messenger und aktiviert mittels Proteinkinase A (PKA) die hormonsensitive Lipase zur Freisetzung von Fettsäuren aus dem TAG-Speicher (Duncan et al., 2007).

Das weiße Fettgewebe besteht neben den ausgereiften weißen Adipozyten auch aus der SVF. Letztere enthält sowohl Fibroblasten, als auch Immunzellen, Stammzellen, Endothelzellen und Präadipozyten (Sun et al., 2019).

Zu den relevantesten Präadipozyten der weißen Adipozyten, gehören die Zelllinien 3T3-F442A und 3T3-L1. Aus Studien geht hervor, dass insbesondere 2 Gruppen von Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung der Adipozyten von Bedeutung sind. Hierzu zählen die "CCAAT/Enhancer binding proteins" (C/EBPs) (Darlington et al., 1998, Dixon et al., 2001) und der PPAR $\gamma$  (Rosen et al., 2002, Robidoux et al., 2004). Das C/EBP $\alpha$  wird für die Differenzierung von WAT allerdings nicht für die des BAT benötigt (Linhart et al., 2001).

Weißes Fettgewebe entwickelt sich an verschiedenen anatomischen Lokalisationen, welche sowohl metabolische als auch endokrine Unterschiede aufweisen. Wesentlich sind diese vor allem zwischen dem subkutanen (bei der Maus z.B. "inguinal white adipose tissue" (iWAT) und dem viszeralen (bei der Maus z.B. "epididymal/gonadal white adipose tissue" (eWAT)) Fett (Giralt and Villarroya, 2013).

Die weißen Adipozyten sind aus großen Lipidtropfen aufgebaut (20–200  $\mu\text{m}$ ), was in der histologischen Aufbereitung zu dem typischen Erscheinungsbild mit einem beinahe verschwindenden Zytoplasma und der Kompression des Zellkerns an den Rand der Plasmamembran führt (Abb.4) (Cushman, 1970).

Bei Adipositas nimmt der Quotient aus viszeralem zu subkutanem Fett zu, dementsprechend wird die Masse des viszeralen Fettgewebes im Verhältnis größer.

Diese Tendenz ist ebenso im Prozess des Alterns zu beobachten (Reyes-Farias et al., 2021).

Einige Studien zeigen, dass eine große Menge an viszeralem Fett mit einer erhöhten Glucoseintoleranz, Insulinresistenz (Philipsen et al., 2015) und einer metabolischen Dysregulation einhergeht (Schlecht et al., 2017, Shuster et al., 2012).

Das subkutane Fettgewebe hingegen ist weniger metabolisch aktiv und zudem mit einem geringeren Mortalitätsrisiko als das viszerale Fettgewebe assoziiert. (Ibrahim, 2010).

### **2.3.3 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT)**

Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass das perivaskuläre Fettgewebe einzig die Aufgabe hat Blutgefäße von außen zu bekleiden, um somit eine stützende Funktion auszuüben. Mittlerweile ist seine Funktion weitergehend erforscht und zeigt, dass es sich um weit mehr als nur ein Stütz- und Bindegewebe handelt (Brown et al., 2014a). Das PVAT umkleidet bis auf die zerebralen Gefäße alle anderen Gefäße des Organismus (Gao, 2007). Mäuse besitzen im Vergleich zum Menschen kein PVAT um die Koronargefäße (Brown et al., 2014a).

PVAT besteht größtenteils aus Adipozyten und setzt eine weite Bandbreite biologisch aktiver Moleküle frei. Hierzu gehören diverse Adipokine, Chemokine, Hormonähnliche Faktoren, wie Leptin, Adiponektin und Resistin, freie Fettsäuren und vasoaktive Substanzen (Ouwens et al., 2010, Szasz and Webb, 2012).

Die Charakteristika von PVAT ähneln sowohl dem BAT als auch dem WAT (Szasz and Webb, 2012). Dies variiert abhängig von der Lokalisation (siehe Kapitel 2.3.4). Etwas neuere Studien weisen darauf hin, dass PVAT andere Vorläuferzellen als BAT und WAT aufweist (Qi et al., 2018). Es teilt allerdings einige biochemische und morphologische Charakteristika mit beiden Gruppen. Folglich ist zu berücksichtigen, dass Erkenntnisse zu klassischen Fettdepots möglicherweise nicht die (Patho-) Physiologie der Adipozyten des PVAT widerspiegeln (Oikonomou and Antoniades, 2019).

Takemori et al. beobachteten die Entstehung einer Hypertonie nach dem Verlust von Fettgewebe bei lipoatropen Mäusen (A-ZIP/F1). Daraus folgerten sie, dass PVAT auch eine physiologische Relevanz haben muss (Takemori et al., 2007). PVAT wird mittlerweile als aktive Komponente von Gefäßwänden angesehen und ist daher auch an der vaskulären Homöostase beteiligt (Szasz and Webb, 2012). Es reguliert den Gefäßtonus durch die Freisetzung von Adipokinen und übt damit eine endokrine Funktion aus. Zudem hat PVAT einen direkten Effekt auf die Gefäßwand mittels parakriner Mechanismen (Szasz and Webb, 2012).

Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass Übergewicht-induzierte vaskuläre Dysfunktion PVAT-abhängig ist (Xia et al., 2017). Hierfür spricht auch die Entdeckung durch Chang et al., die bei Mäusen eine Abschwächung der altersbedingten und HFD-induzierten endothelialen Dysfunktion sowie Reduktion von Atherosklerose durch kälteinduzierte PVAT-Aktivierung beobachten konnten (Chang et al., 2012). Eine andere Studie konnte die Entstehung einer ausgeprägten Intimahyperplasie nach Entfernung von gesundem PVAT bestätigen (Tanaka and Sata, 2018).

Die Entstehung vaskulärer Dysfunktion lässt sich unter anderem durch die aus dem PVAT stammenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erklären (Victorio and Davel, 2020). Diese halten sich in einem „gesunden“ PVAT mit protektiven Faktoren wie Adiponektin und Omentin-1 in gegenseitigem Gleichgewicht (Antonopoulos et al., 2015, Lin et al., 2019).

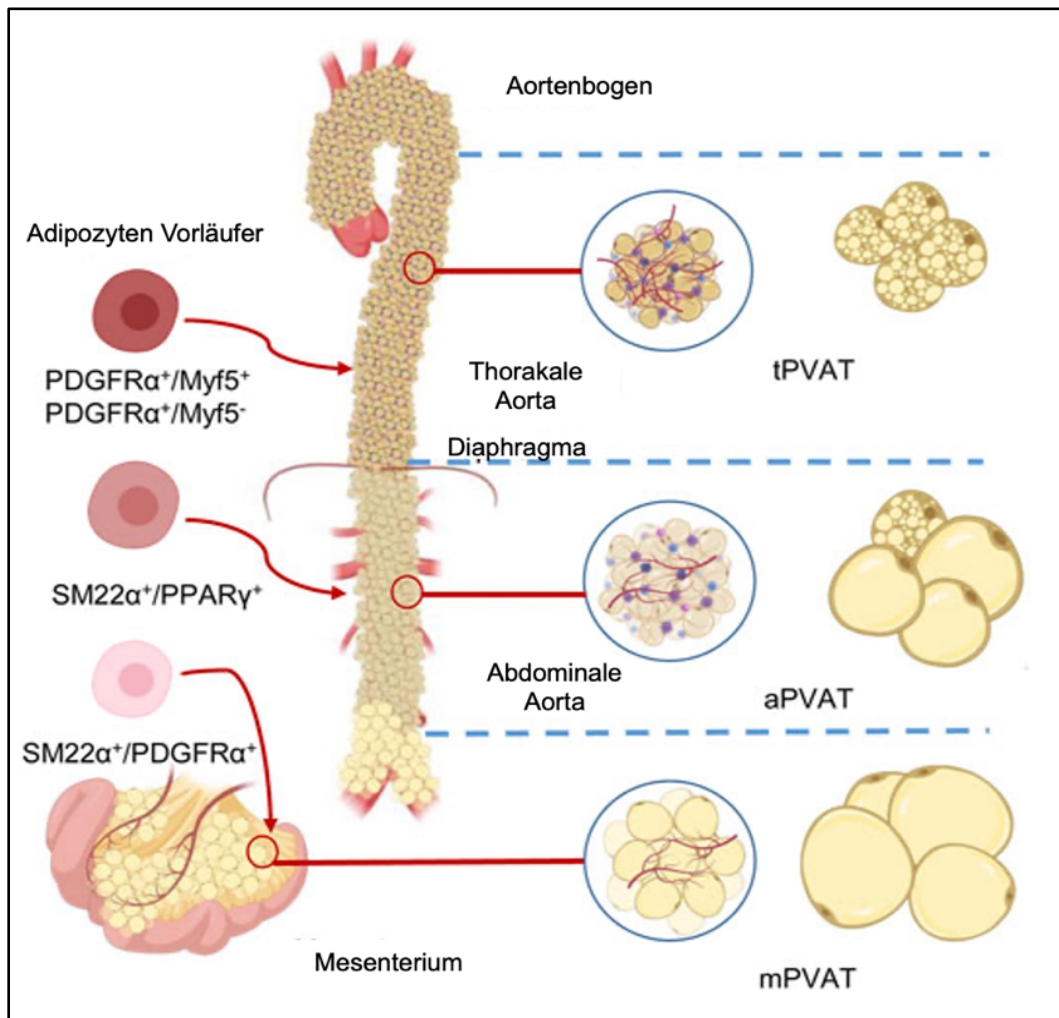
Die Forschungsgruppe von Wang et al. hat zudem belegen können, dass die Kynureninsäure, welche überwiegend von braunen perivaskulären Adipozyten sezerniert wird, an der Interaktion von PVAT und dem Gefäß beteiligt ist. Sie übt ihren Einfluss durch Aktivierung des sog. PI3K-Akt-eNOS Signalweges im Endothel aus (Wang et al., 2022). Dadurch trägt die Kynureninsäure physiologischerweise zu einer Vasodilation bzw. Relaxation des Gefäßes bei. Eine HFD, die zu einer Abnahme des BAT im PVAT führt (Sacks and Symonds, 2013), reguliert ebenso die Kynurenin Aminotransferase 1 (KAT1) Expression herunter, dessen Produkt die Kynureninsäure ist. Es kommt zu einem erhöhten vaskulären Tonus bzw. endothelialer Dysfunktion. (Wang et al., 2022)

Die Charakteristiken einer Inflammation, welche sich typischerweise im viszeralen Fett bei Übergewicht beobachten lassen, unterscheiden sich von denen einer Inflammation im PVAT. Ein entscheidender Unterschied ist dabei die Lokalisation und insbesondere die Freisetzung anderer Adipokine, Chemokine und Zytokine (Mikolajczyk et al., 2016). Im Rahmen einer Inflammation des PVAT kommt es folglich zu phänotypischen und biochemischen Veränderungen des PVAT. Diese Umwandlung wird in der Literatur auch als „PVAT-Dysfunktion“ betitelt (Ahmadi et al., 2020, Tanaka and Sata, 2018, Lin et al., 2019).

Während inflammatorischer Prozesse ist zudem eine gesteigerte Expression vom "vascular endothelial growth factor" (VEGF) durch die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen wie NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) zu beobachten. Eine Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass perivaskuläre Adipozytenvorläuferzellen unter diabetischen Bedingungen eine deutlich höhere Expression des VEGF-Gens aufweisen, als das viszerale und subkutane Fettgewebe. Der VEGF fördert die Angiogenese in vaskulären Pathologien durch die Aktivierung des VEGF-Rezeptors-2. Dies resultiert in der Proliferation des Endothels und der Migration und Proliferation von VSMC (Shibuya, 2006, Lamers et al., 2011). Als Folge ließ sich demnach eine erhöhte Proliferation und Migration von VSMCs beobachten (Schlich et al., 2013).

Die Freisetzung von ADRF (adipocyte-derived relaxing factor) ist besonders bei vaskulärer Dysfunktion oder Pathologien, welche mit dieser einhergehen, reduziert. Währenddessen werden im PVAT eine Vielzahl parakriner Faktoren wie Adipokine (Resistin, Leptin, Visfatin), Zytokine (IL-6 und TNF- $\alpha$ ) und Chemokine (RANTES, CCL5, MCP-1, CCL2) freigesetzt. Sie können einen direkten Effekt auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwände und auf die Endothelzellen ausüben und zu einer vaskulären Inflammation führen (Nosalski and Guzik, 2017).

### 2.3.4 Thorakales vs. abdominales vs. mesenteriales-PVAT



**Abb. 5** Darstellung der Charakteristika und Marker unterschiedlicher (Vorläufer-)Zellen der verschiedenen PVATs. Hierzu gehören das perivaskuläre Fettgewebe um die thorakale Aorta (tPVAT), abdominale Aorta (aPVAT), und die mesenteriale Arterie (mPVAT). Zu den Zellmarkern der platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), myogenic factor 5 (Myf5), smooth muscle protein 22- $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ) und peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). modifiziert aus (Li et al., 2021)

Wie bereits angedeutet existieren relevante Unterschiede zwischen thorakalem PVAT und abdominalem PVAT (Victorio and Davel, 2020).

Generell unterscheiden sich das thorakale, abdominale und das mesenteriale PVAT (t-PVAT; a-PVAT; m-PVAT) in ihrer Herkunft (siehe Abb.5) und ihrer Funktionsweise (Chang et al., 2020). Es handelt sich beim PVAT demnach um eine heterogene Gruppe von PVATs mit relevanten regionalen Unterschieden (Li et al., 2021).

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, wurden verschiedene Marker für die Vorläuferzellen der unterschiedlichen PVATs ausfindig gemacht.

PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/Myf5<sup>+/-</sup> sind die Marker der Progenitorzellen des t-PVATs (Ye et al., 2019). Das t-PVAT lässt sich in drei Untergruppen, die von Ye et al. als anteriores und links/rechts laterales t-PVAT betitelt werden, unterteilen. Sie besitzen für die Marker PDGFR $\alpha$  und Myf5 voneinander verschiedene Expressionsmuster.

Das laterale-t-PVAT enthält mehr UCP-1 positive braune Adipozyten als das anteriore t-PVAT und hat zudem einen größeren Einfluss auf die Relaxation des Gefäßes. Das t-PVAT wird überwiegend als BAT charakterisiert (Tran et al., 2018). Es teilt sich unter anderem morphologische Gemeinsamkeiten wie die Zusammensetzung aus vielen kleinen, Lipidtropfen (siehe Abb.4) und die Menge an Mitochondrien. Außerdem ist eine Überlappung des genetischen Expressionsprofils zu finden. Hierzu gehören die hohe Expression an UCP-1, dem "cell death inducing DFFA activator-A" (Cidea) und weiterer Gene (Fitzgibbons et al., 2011, Tran et al., 2018).

Dieser Kontext wurde von Fitzgibbons et al. im Rahmen einer genomischen Microarraystudie untersucht. Die Reaktion von t-PVAT auf Kälteexposition sowie die Abhängigkeit vom Transkriptionsfaktor "early-B-cell-factor-2" (EBF2) und Resistenz gegenüber diätinduzierter Inflammation sind weitere Eigenschaften, die es mit dem BAT teilt (Angueira et al., 2021).

Einige mit der Fettsäureoxidation und der mitochondrialen Biogenese assoziierten Gene werden bereits in den Präadipozyten des PVAT, nicht aber in denen des WAT exprimiert. Dies untermauert die These, dass bereits im Stadium der Präadipozyten eine metabolische Spezialisierung dieser vorliegt (Angueira et al., 2021).

Trotz morphologischer Ähnlichkeiten zwischen BAT und PVAT der thorakalen Aorta weisen sie keine gleiche entwicklungsgeschichtliche Herkunft auf. Im thorakalen PVAT findet sich bspw. keine Genexpression für Zic1, das eine relevante Rolle bei der Entwicklung des BAT bei Säugetieren darstellt (Contreras et al., 2016). Nichts destotrotz geht man davon aus, dass das Fettgewebe insbesondere den thorakalen Anteil der Aorta umgebend überwiegend braunes ist (Sassmann et al., 2010).

Die Adipozyten des t-PVAT durchlaufen im Rahmen eines diätinduzierten Übergewichts auch eine Transdifferenzierung zu „weißeren“ Adipozyten, während die Menge oder Masse an BAT abnimmt (Sacks and Symonds, 2013)

A-PVAT zeigt seine Entwicklung betreffend eine ähnliche Herkunft wie das Fettgewebe der Gonaden. Es trägt Eigenschaften, welche sowohl dem weißen als

auch dem beigeen Fettgewebe zuzuordnen sind (Contreras et al., 2016). Lokalisiert ist es im Übergang von t-PVAT zum m-PVAT und stellt eine Mischung dieser beiden dar. Es enthält dementsprechend sowohl braune als auch weiße Adipozyten (Padilla et al., 2013). Zu diesem Ergebnis kommen auch Brown et al. (Brown et al., 2014b). Die Morphologie betreffend, befinden sich die weißen Adipozyten überwiegend in der Peripherie des a-PVAT. Contreras et al. beschreiben zudem geschlechterspezifische Unterschiede in der Verteilung der Adipozyten (Contreras et al., 2016)

Die Progenitorzellen des a-PVAT exprimieren das "smooth muscle protein 22 $\alpha$ " (SM22 $\alpha$ ), einen der frühesten Marker glatter Muskelzellen. Die Expression ist allerdings in ausgereiften Adipozyten nicht mehr zu identifizieren. Die Differenzierung der Zellen des a-PVAT ist ebenso von PPAR $\gamma$  abhängig (Chang et al., 2012).

Man geht davon aus, dass es sich bei m-PVAT eher um WAT handelt, da es eine sehr geringe Expression an UCP-1 aufweist (Gálvez-Prieto et al., 2008). Bei Nagetieren gilt dies ebenso für das PVAT der Karotis und der Femoralarterie (Brown et al., 2014b). Besonders prominente Marker in den Adipozytenvorläufern des m-PVAT sind CD34 $^{+}$ , CD44 $^{+}$ , PDGFR $\alpha^{+}$  (Cawthorn et al., 2012, Lee et al., 2012, Lee et al., 2013, Contreras et al., 2016). Auch beim m-PVAT spielt PPAR $\gamma$  eine wichtige Rolle bzgl. der Zelldifferenzierung (Chang et al., 2012).

Betrachtet man die Physiologie der verschiedenen PVATs lassen sich auch hier Unterschiede feststellen. Das a-PVAT speichert zirkulierende Triglyzeride und bereinigt das Blut von Fettsäuren. Das t-PVAT hingegen vollzieht dies auf dem Wege der Thermogenese (van Dam et al., 2017). Außerdem ist a-PVAT stärker von einer Inflammation betroffen und hat in diesem Zustand eine niedrigere Produktion von NO aus eNOS als das thorakal gelegene Pendant. Aus dieser Dysfunktion des a-PVAT resultiert ein deutlich beeinträchtigter antikontraktiler Effekt. (Victorio et al., 2016, Padilla et al., 2013)

T-PVAT ist gegenüber der Einwanderung von Immunzellen sowie einer Inflammation im Rahmen einer HFD überwiegend resistent. Sein Effekt wird auch als antiatherosklerotisch und antiinflammatorisch beschrieben. Dieser wurde allerdings nur im Mausmodell beobachtet (Fitzgibbons et al., 2011). Die Ergebnisse aus Studien am Menschen zeigen entgegen der Ergebnisse am Mausmodell, dass das thorakale-

periaortale Fettgewebe mit einem höheren Grad an abdominal-aortaler und Koronargefäß-Kalzifikation assoziiert ist (Lehman et al., 2010, Britton et al., 2012).

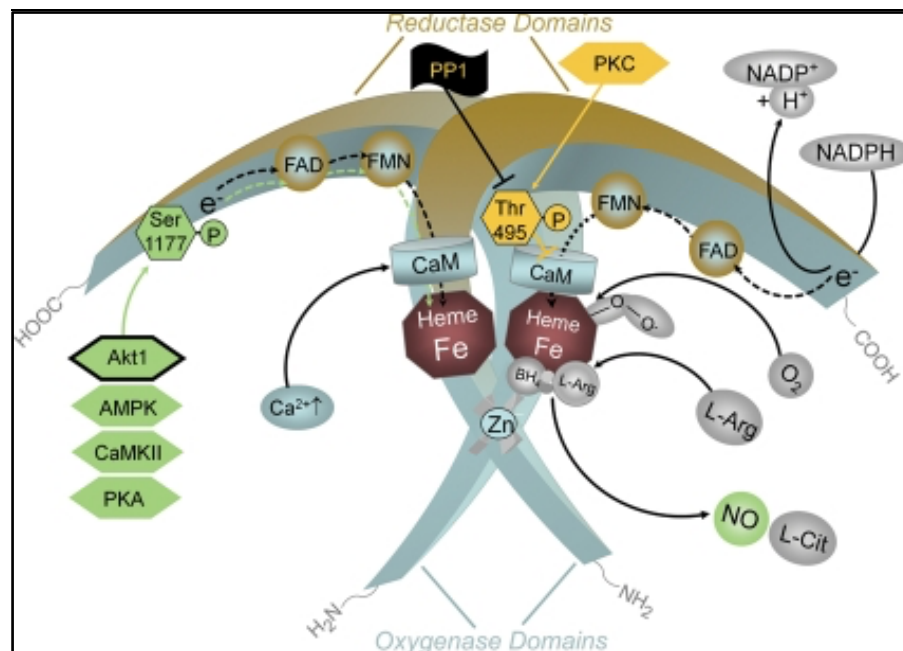
Das a-PVAT ist wie bereits erwähnt nicht resistent gegenüber einer Inflammation. Übergewicht erhöht im a-PVAT die Expression proinflammatorischer Zytokine, sowie deren Rezeptoren und begünstigt des weiteren die Einwanderung und Infiltration von Makrophagen. Unter diesen Umständen wird zudem die Entstehung von Aneurysmen begünstigt (Police et al., 2009, Takaoka et al., 2009).

Im Rahmen von Übergewicht oder mit fortgeschrittenem Alter ist auch das m-PVAT von einer Inflammation betroffen. Proinflammatorische sowie proatherogene Biomarker haben eine deutlich erhöhte Expression. Dazu zählen unter anderem Lipocalin-2, Leptin, CCL2 und CCL5. Das m-PVAT trägt folglich zur Atherogenese bei (Sena et al., 2017).

## 2.4 NO-Synthase

Wie der Name bereits erkennen lässt, ist die NO-Synthase ein Enzym, welches für die Produktion von NO verantwortlich ist. NO ist das kleinste bekannte Signalmolekül, das existiert. Alle NO-Synthasen verwenden die Aminosäure L-Arginin und molekularen Sauerstoff als Substrate. Weitere benötigte Cofaktoren sind Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH), Flavin Adenin Dinucleotid (FAD), Flavin Mononucleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) (Förstermann and Sessa, 2012).

### 2.4.1 Aufbau



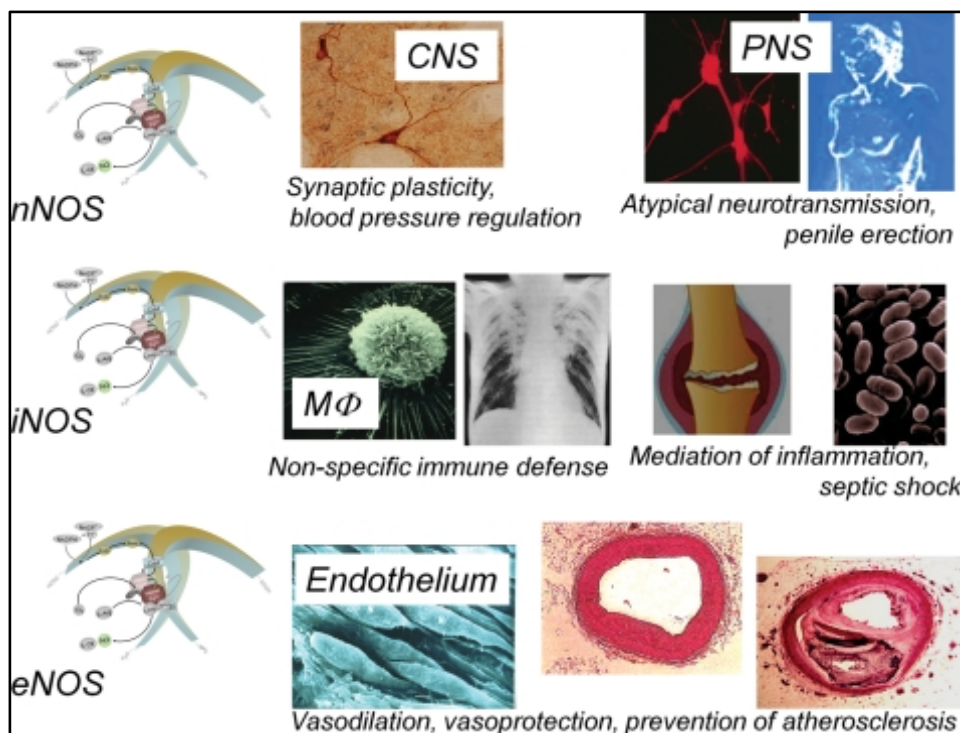
**Abb. 6 zeigt den molekularen Aufbau von der NO-Synthase** bestehend aus den zwei Monomeren und den jeweiligen Reduktase- und Oxidase-Domänen. Grafik aus (Förstermann and Sessa, 2012)

Das Enzym besteht aus zwei Monomeren und besitzt ein molekulares Gewicht von 134kDA. Die beiden Monomere enthalten jeweils eine Amino(NH<sub>2</sub>)-Terminale, die sog. Oxygenase Domäne und eine Carboxy(COOH)-Terminale, die sog. Reduktase Domäne. Das aminoterniale Ende ist zuständig für die Bindung von Cofaktoren wie

Häm, Zink, BH<sub>4</sub>, Calmodulin und dem Substrat L-Arginin, während die Reduktase Domäne FMN, FAD und NADPH bindet.

Für die Formation einer funktionellen Einheit ist es notwendig, dass die beiden Monomere sich zu einem Homodimer verbinden. Dies ermöglicht die später im Text beschriebene Redox-Reaktion zur Bildung von NO aus L-Arginin (Benson et al., 2013, Qian and Fulton, 2013).

## 2.4.2 Isoenzyme



**Abb. 7** Charakteristiken und Vorkommen der verschiedenen NOS Isoformen. Grafik aus (Förstermann and Sessa, 2012)

Es existieren verschiedene Isoformen des NOS-Enzyms, die jeweils unterschiedliche Rollen im Prozess der Atherogenese erfüllen (Liu and Huang, 2008).

Physiologischerweise sind 3 verschiedene Formen der NO-Synthese im menschlichen Organismus vorhanden (Abb.7). Dazu gehören die neuronale (nNOS), die induzierbare (iNOS) und die endotheliale NO-Synthese (eNOS). Sie besitzen alle die gleiche Domänenstruktur und katalytische Funktion (Leber et al., 1999).

Die Hauptunterschiede liegen in ihrer Regulation. Während die induzierbare Form zytostatische Effekte hat, sowie zur Entstehung von entzündlichen Erkrankungen beiträgt (Abb.7), also eher proatherogen wirkt, weisen die beiden anderen Formen antiatherosklerotische und vasoprotektive Effekte auf. Die neuronale NO-Synthase findet sich sowohl in zentralen als auch in peripheren Neuronen und einigen weiteren Zelltypen. Die zentrale Blutdruckregulation, eine glatte Muskelzellrelaxation, Vasodilatation in peripheren nitrergen Nerven, sowie eine Kontribution zu einer Synaptischen Plastizität gehören zu ihren Funktionen.

Die eNOS, welche sich überwiegend in den Endothelzellen von Gefäßen befindet (Abb.7), spielt eine entscheidende Rolle bei der Blutdruckregulation, Vasodilatation und hat antiatherosklerotische und vasoprotektive Effekte (Förstermann and Sessa, 2012).

### **2.4.3 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)**

Die endotheliale NO-Synthase schützt durch Produktion von NO die Intima vor einer Adhäsion von Leukozyten und einer Plättchenaggregation. In eNOS-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwände hier um das 10-fache erhöht ist (Lefer et al., 1999).

Dieser Effekt sorgt außerdem dafür, dass die glatten Muskelzellen der Tunica media vor den aus den Plättchen stammenden Wachstumsfaktoren geschützt werden. Somit wird die Proliferation glatter Muskelzellen verhindert, was der fibrösen Plaquentstehung, einem späteren Schritt der Atherogenese, vorbeugt (Förstermann and Münzel, 2006a). Das aus eNOS stammende NO führt im Kontext vaskulärer Homöostase zu einer Vasodilatation (Li and Förstermann, 2000). eNOS trägt zudem zu einer antihypertensiven, antithrombotischen und antiatherosklerotischen Wirkung bei (Förstermann et al., 2017).

Unabhängig von der Blutdruckregulation spielt eNOS eine bedeutende Rolle bei der Suppression der Atherogenese. Ein starker Indikator dafür ist, dass sich auch bei fehlendem Bluthochdruck in ApoE/eNOS-Doppelknockout-Tieren eine verstärkte Atherogenese zu beobachten ist. Ein ApoE-KO führt zu einer hypercholesterinämischen Stoffwechsellage bei den Mäusen (Li and Förstermann, 2013b)) (Chen et al., 2001).

Zudem weiß man, dass Gene, die eine Rolle bei der Atherogenese spielen, in ihrer Expression auch von endothelialelem NO reguliert werden (Förstermann and Sessa, 2011).

Mittels Messung der flussvermittelten Dilatation (FMD) konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Kausalität zwischen der eNOS-Dysfunktion bzw. -Entkopplung und der endothelialen Dysfunktion von Koronararterien und peripheren Gefäßen besteht. Für die Atherogenese und der im Verlauf damit einhergehenden höheren Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse ist die FMD ein früher Prädiktor (Heitzer et al., 2001).

In ApoE-KO-Mäusen beschleunigt die Überexpression von eNOS sogar die Atherogenese. Ein relativer Mangel des eNOS-Cofaktors BH<sub>4</sub> und eine dadurch bedingte eNOS-Entkopplung sind der Grund für dieses paradoxe Phänomen (Förstermann et al., 2017).

#### **2.4.4 Entkopplung des Enzyms**

Der Zustand der Entkopplung beschreibt, dass die enzymatische Reduktion von Molekularem Sauerstoff nichtmehr an die Oxidation von L-Arginin gekoppelt ist, sondern unabhängig von dieser verläuft. Das führt zur Entstehung von ROS (Förstermann and Münzel, 2006b, Montezano and Touyz, 2012).

Es kommt folglich nicht zur Bildung des vasodilatativ, vasoprotektiv und antiatherogen wirkenden NO. Die dabei entstandenen ROS, haben einen gegenteiligen Effekt und beschleunigen die Pathophysiologie der jeweiligen Organfunktion (z.B. der Gefäße) (Li and Förstermann, 2013a).

#### **2.4.5 eNOS im PVAT**

Immunhistochemische Färbungen zeigen, dass eNOS im Endothel aber auch im PVAT exprimiert wird. Es ist also sowohl in der Tunica media als auch der Tunica adventitia vorhanden (Xia et al., 2016).

Soltis et al. sind zu dem Ergebnis gekommen, dass die kontraktile Reaktion der Aorta von Ratten auf die Gabe von Noradrenalin PVAT-vermittelt reduziert ist. Hierdurch ist

die Rolle von PVAT im Rahmen der Funktion von Gefäßen erstmals entdeckt worden. (Soltis and Cassis, 1991) Die Interaktionen zwischen PVAT und Gefäßfunktion sind durch eine Vielzahl an metabolischen Faktoren wie z.B. AMPK (5'AMP-aktivierte Protein Kinase) streng reguliert (Almabrouk et al., 2014) (Almabrouk et al., 2017).

Grundsätzlich hat man beobachten können, dass ein durch HFD induziertes Übergewicht die Produktion von NO im PVAT signifikant reduziert. Die HFD-Behandlung führte auch dazu, dass eNOS selektiv im PVAT aber nicht an der Aorta (dem Endothel) weniger phosphoryliert (eNOS-Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> führt zu Aktivierung) wird. Aus diesem Kontext hat man schließen können, dass Adipositas unterschiedliche Wirkungen auf das PVAT und auf die Aorta haben muss (Xia et al., 2017). Die chronische Administration von Adiponektin konnte eine entstandene endotheliale Dysfunktion normalisieren und führte zu einer eNOS-Phosphorylierung sowie reduziertem oxidativen Stress (Sena et al., 2017).

In Übereinstimmung mit den bereits genannten Erkenntnissen konnte bei Mäusen mit einer HFD eine vermehrte eNOS-Acetylierung (und somit eine Inhibition) im PVAT beobachtet werden. Im Gegensatz zur PVAT-freien Aorta ist die durch Acetylcholin induzierte vasodilatatorische Antwort nur in der PVAT-enthaltenden Aorta bei übergewichtigen Mäusen reduziert. Eine Stimulation mit Acetylcholin fördert die Produktion von NO im PVAT, welche durch den NOS-Inhibitor L-NAME verhindert werden kann (Xia et al., 2017). Bei einer diätinduzierten Gefäßdysfunktion und der damit einhergehenden Dysfunktion des PVAT ist eNOS entkoppelt.

Ein weiterer zugrundeliegender molekularer Mechanismus ist der durch Arginaseinduktion entstehende Mangel an L-Arginin. Daher kann durch eine Supplementation mit L-Arginin und eine gleichzeitige Inhibition der Arginase eine eNOS-Entkopplung im PVAT rückgängig gemacht werden (Xia et al., 2016).

Eine Arginin Defizienz, die Reduktion der eNOS-Phosphorylierung und eine erhöhte eNOS-Acetylierung sind folglich die zentralen Mechanismen, die zu einer reduzierten eNOS-Funktionalität im PVAT beitragen. Durch eine verbesserte eNOS-Funktion im PVAT kann die vaskuläre Dysfunktion normalisiert werden. Dieser kausale Zusammenhang ergibt sich durch das Ansprechen der drei zuvor genannten Mechanismen (Xia et al., 2017).

#### 2.4.6 Neuere Untersuchungen zu eNOS

Eine der neusten Untersuchungen in Bezug auf eine gewebespezifische eNOS wurde von Leo F. et al. (2021) durchgeführt. In dieser Studie hat man im Rahmen eines eNOS-KO und Knockin-Mausmodells, in welchem das Enzym gezielt in Erythrozyten induziert oder entfernt wurde, geforscht. Es konnte festgestellt werden, dass eNOS in Endothelzellen und eNOS in Erythrozyten unabhängig voneinander zu einer Regulation des Blutdruckes beitragen (Leo et al., 2021).

Außerdem konnte die Funktion der eNOS je nach Lokalisation (entweder in den Erythrozyten oder in den Endothelzellen) noch konkreter charakterisiert werden. Während ein eNOS-KO in den Erythrozyten mit einer erhaltenen Koronardilatation und linksventrikulärer kardialer Funktion einhergeht, wurde in Mäusen mit einem Endothelzellspezifischen eNOS-KO beobachtet, dass diese beiden Parameter pathologisch verändert waren. Zum einen kam es zu einer verringerten Koronarreakibilität, zum anderen beobachtete man eine Zunahme des linksventrikulären Drucks als Folge eines erhöhten arteriellen Drucks. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass eNOS in den Endothelzellen eine Kontrolle über die koronare Vasodilatation hat (Cortese-Krott et al., 2022).

#### 2.4.7 Regulation der eNOS-Expression

Die Expression der endothelialen NO-Synthase ist von der Aktivität der Promotorregion abhängig. Diese enthält bei konstitutionell exprimierten Genen üblicherweise eine sog. TATA-Box, welche es im eNOS-Promotor allerdings nicht zu finden ist. Stattdessen enthält er andere regulatorische Sequenzen. An diese können Transkriptionsfaktoren binden und zu einer Aktivierung der Promotorregion führen. Man weiß aus Untersuchungen, dass zu diesen Faktoren unter anderem das Aktivator Protein (AP)-1, (AP)-2, Myc-assoziierte Zinkfingerproteine (MAZ), Nuklearer Faktor (NF)-1, NF-IL6, NF- $\kappa$ B, p53, PEA3 (polyoma enhancer activator 3), und YY1 gehören (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999). In Experimenten konnte durch Deletion von Promotorsequenzen herausgefunden werden, dass besonders die Bindungsdomänen Sp1 und GATA essenziell für die Aktivität des eNOS-Promotors sind (German et al., 2000, Zhang et al., 1995).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Aktivitätsmuster je nach Geweberegion variieren und der Promotor einer Regulation durch diverse Multiproteinkomplexe unterliegt (Karantzoulis-Fegaras et al., 1999).

#### 2.4.8 Regulation von eNOS

Die Aktivität von eNOS wird von diversen Stimuli reguliert. Neben den in 2.4.7 beschriebenen transkriptionalen Mechanismen, gibt es auch posttranskriptionale Mechanismen. Dazu gehören z.B. die Schubspannung („shear stress“) und pulsatile Dehnung der Gefäßwand, 17- $\beta$ -Östradiol, Bradykinin, Histamin und Acetylcholin, Serotonin und Thrombin (Zhao et al., 2015a, Carr and Frei, 2000).

Um die maximale katalytische Funktion und einen Elektronentransfer zu ermöglichen, ist eine Bindung von Calmodulin an Position ~50 der Aminosäurendomäne notwendig. Sie befindet sich zwischen der Reduktase und der Oxygenase Domäne des Enzyms (Chen and Wu, 2000, Leber et al., 1999). Die intrazellulären Calciumspiegel stehen mit der Bindung von Calmodulin an diese im Zusammenhang. Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin und Histamin binden an spezifische Rezeptoren der endothelialen Zellmembran und führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Calcium. Dieses initiiert über eine Bindung von Calmodulin an die Calmodulinbindende Domäne der eNOS eine Produktion von NO.

Allerdings ist die alleinige Zunahme der Calciumkonzentration nicht ausreichend, um die Aktivität des Enzyms zu beeinflussen. Sie hängt insbesondere von der Protein Phosphorylierung und Dephosphorylierung inmitten der Calmodulin-bindenden Domäne ab. Diese findet calciumunabhängig statt. Hier sind vor allem 2 Aminosäurereste von besonderer Bedeutung, Serin (Ser<sup>1177</sup>) und Threonin (Thr<sup>495</sup>). Sie befinden sich in der Reduktasedomäne (Fleming and Busse, 2003).

Verschiedene Kinasen und Phosphatasen führen über eine komplexe Signalkaskade zu Änderungen des Phosphorylierungszustands. Dabei kommt es immer wieder zu einem Dis- und Assoziieren mit dem eNOS-Signalkomplex (Fleming and Busse, 2003).

Hierzu gehört z.B. die Proteinkinase A, welche am Ser<sup>1179</sup> und Ser<sup>635</sup> bindet und die Antwort auf hämodynamische Veränderungen und Hormone wie das 17- $\beta$ -Östradiol vermittelt (Boo et al., 2002a, Boo et al., 2002b). Eine gestörte eNOS-Phosphorylierung

konnte schon in einigen Krankheitsbildern beobachtet werden und unterstreicht damit dessen (patho-) physiologische Relevanz (Kolluru et al., 2010).

Auch die Proteinkinase C (PKC) spielt eine Rolle bei der Regulation von eNOS. Sie inhibiert, jedoch anders als die PKA, eNOS durch eine Phosphorylierung am Ser<sup>495</sup> (Lin et al., 2003).

Insgesamt werden in der Literatur sieben verschiedene Aminosäurereste beschrieben, an welchen eNOS durch Phosphorylierung in seiner Aktivität moduliert werden kann (Mount et al., 2007).

Ein Mechanismus, welcher invers zur Phosphorylierung zu einer Deaktivierung von eNOS führt, ist die kovalente Adduktion einer Nitrosylgruppe an die Thiolgruppen von Cystin. Dieser Zustand kann sich durch eNOS-Agonisten, wie den "vascular endothelial growth factor" (VEGF) wieder zurückbilden (Erwin et al., 2005).

Durch weitere post-translationale Modifikation wie der Acetylierung wird die eNOS-Aktivität ebenso reguliert. Eine Erhöhung der eNOS-Aktivität durch Deacetylierung konnte durch Mattagajasingh et al. beobachtet werden. Diese ist Folge der NAD<sup>+</sup>-abhängigen histon/protein-Deacetylase SIRT1 (Mattagajasingh et al., 2007).

Das Vorhandensein der Substrate und Cofaktoren von eNOS hat ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Sowohl der Mangel an seinem Cofaktor BH<sub>4</sub> als auch seines Substrats L-Arginin sind für eine eNOS-Entkopplung relevante Mechanismen (Li and Förstermann, 2014) (Li and Förstermann, 2013a).

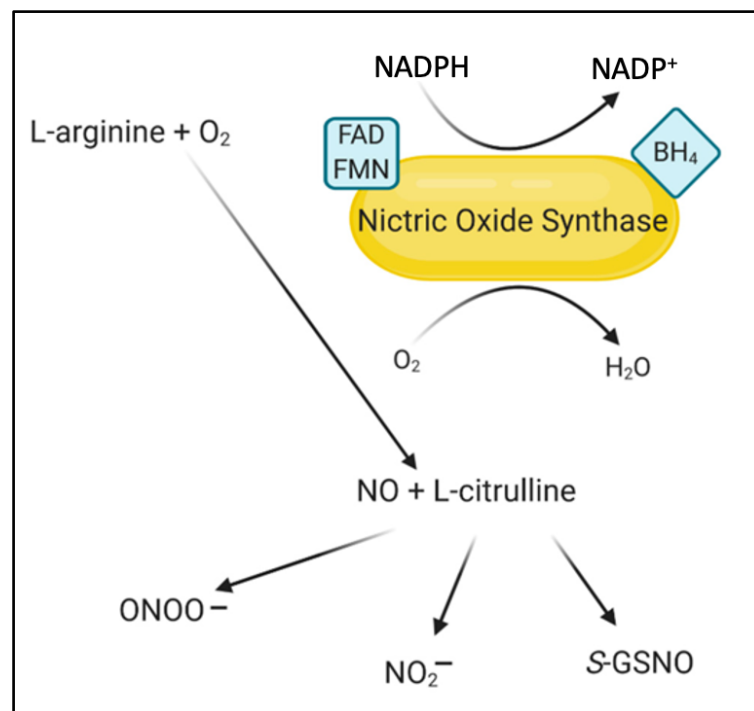
Besonders der Cofaktor BH<sub>4</sub> scheint ein sehr entscheidender Regulator für die eNOS-Funktion zu sein. Das Ausmaß seiner Bindung korreliert mit der Affinität des Enzyms zu den anderen Substraten und Cofaktoren, die für die RedOx-Reaktion relevant sind (Moens and Kass, 2006, Moens et al., 2008).

Freie Radikale wie Superoxide (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), die vermehrt bei Diabetes mellitus, Bluthochdruck und einem inaktiven Lebensstil hochreguliert werden, reagieren zusammen mit NO und formen Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>). Der Cofaktor BH<sub>4</sub> ist dem Peroxynitrit gegenüber sehr sensitiv und wird leicht von diesem oxidiert. Daraufhin kommt es zu einem Mangel an BH<sub>4</sub> und eNOS wird selbst zur Produktion von O<sub>2</sub><sup>·-</sup> angeregt. Dieser Zustand wird als eNOS-Entkopplung beschrieben. Das Enzym wird folglich zu einem Mitwirkenden Element bei der Entstehung von oxidativem Stress transformiert (Förstermann and Münzel, 2006a).

## 2.5 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein Gas, das von der NO-Synthase aus L-Arginin produziert wird. Es hat diverse biologische Funktionen und Aktivitäten (Robbins and Grisham, 1997).

Es entsteht aus einer sog. RedOx-Reaktion. Dabei werden Elektronen der Cofaktoren des Enzyms (s.o.) auf sein Substrat L-Arginin transferiert und zu L-Citrullin und NO oxidiert (Förstermann and Li, 2011).



**Abb. 8 Entstehung von NO durch die NO-Synthase mittels Redox-Reaktion aus L-Arginin und O<sub>2</sub>** Grafik modifiziert aus (Król and Kepinska, 2021)

Das aus der eNOS stammende NO ist ein physiologischer Vasodilatator, das seine vasoprotektiven Eigenschaften auf unterschiedlichen Wegen ausüben kann. Es wird auch als sog. second messenger oder als "endothelium-derived relaxing factor" bezeichnet (Montezano and Touyz, 2012).

Es verhindert das Anhaften der Plättchen an der Gefäßwand und das Aggregieren der Plättchen untereinander. Außerdem führt es zu einer Minimierung der Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die das Wachstum glatter Muskelzellen und ihre Produktion von Matrixmolekülen fördern (Förstermann and Sessa, 2012, Hong et al., 2019).

Des Weiteren konnte man beobachten, dass eine verminderte NO-Synthese, induziert durch die Gabe eines L-Arginin-Analogons, mit einer vermehrten Leukozytenanheftung und Einwanderung an mesenterialen Venen einhergeht. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass NO auch als endogener Inhibitor der Leukozytenanheftung am Endothel fungiert (Kubes et al., 1991).

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei NO um einen physiologischen Vasodilatator. Diese Eigenschaft erhält es durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zur Produktion von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände. Das so entstandene cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG). Die darauffolgende Kaskade führt zu einer Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum der glatten Muskelzellen der Gefäßwand, wodurch es zu einer Relaxation dieser kommt (Carvajal et al., 2000). Stickstoff induziert außerdem über einen cGMP-abhängigen Signalweg und den PPAR $\gamma$  Coaktivator 1-alpha die mitochondriale Biogenese in braunen Adipozyten wie auch weiteren Zellen und führt somit zu Veränderungen in der metabolischen Rate des Organismus (Nisoli et al., 2003).

## 2.6 Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion wird für gewöhnlich als reduzierte endothelabhängige Vasodilatation beschrieben. Sie ist für das Voranschreiten von atherosklerotischen Erkrankungen ein direkter Prädiktor. Zudem geht sie den bereits klinisch sichtbaren vaskulären Pathologien, wie z.B. der Plaqueformation, voraus.

Daher spielt die verminderte Bioverfügbarkeit oder Produktion von NO in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle, denn ein adäquater NO-Output ist ein essenzielles Charakteristikum eines gesunden und intakten Endothels (Zhao et al., 2015b, Deanfield et al., 2007).

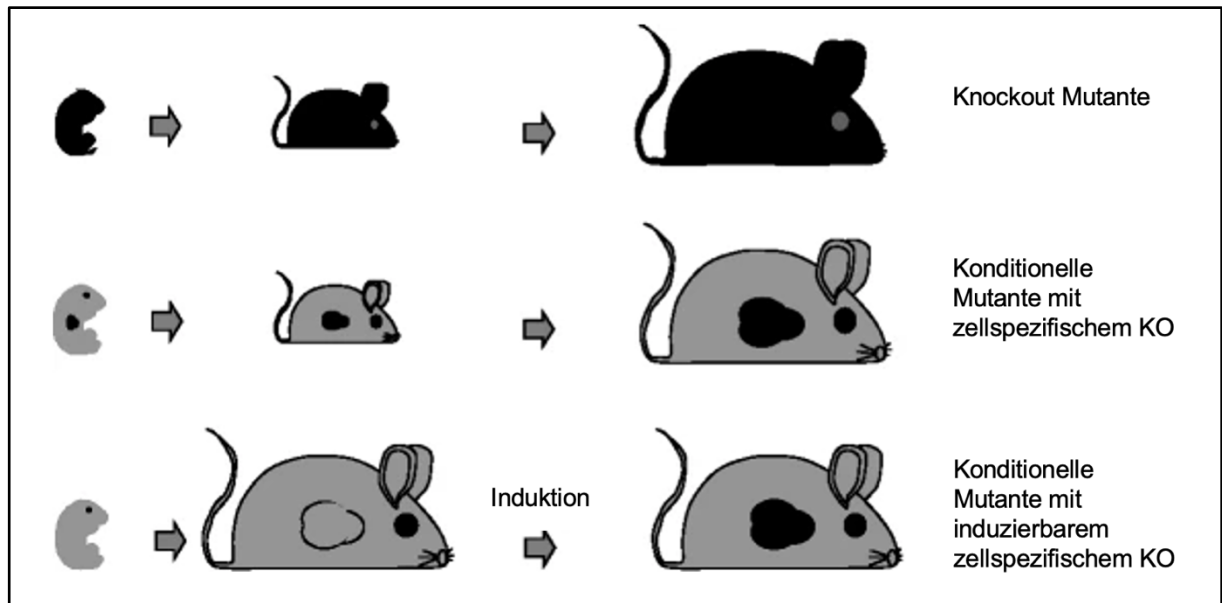
Damit geht einher, dass durch die endotheliale Dysfunktion die Kapazität der Endothelzellen eine Inflammation, oxidativen Stress oder eine Thrombose zu unterdrücken oder verhindern, überschritten bzw. ausgeschöpft wird. Dieser Prozess begünstigt die Atherogenese (Naseem, 2005).

Es kommt in diesem Zusammenhang zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand, einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, einer Migration von Immunzellen wie den Monozyten und Endothelin 1-Sekretion (Montezano and Touyz, 2012). Endothelin 1 wird oftmals in der Literatur als ein Kennzeichen für diverse Kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben (Sanni-Ajibaye et al., 2022).

Außerdem sind ein Mangel an Cofaktoren (BH<sub>4</sub>) und Substraten (L-Arginin), eine veränderte Aktivität der NO-Synthase, sowie die zunehmende Produktion von ROS, relevante Mechanismen, welche zur endothelialen Dysfunktion maßgeblich beitragen (Praticò, 2005, Gkaliagkousi and Ferro, 2011). Auch das Altern ist ein Faktor, welcher mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert ist (Herrera et al., 2010).

Weitere Quellen von ROS im Gefäßsystem sind u.a. die NADPH-Oxidase (Nox), Xanthinoxidase (XO), Lipoxygenase, Cytochrom-P450-Monooxygenase und Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (Daiber et al., 2020). Da eNOS regulierende Enzyme (wie die cGMP abhängige Kinase I) wiederum von RedOx Systemen abhängig sind, kommt es zu einer verminderten eNOS-Funktion bzw. Aktivität (Schulz et al., 2008).

## 2.7 Knockout Mausmodelle



**Abb. 9 Verschiedene KO-Verfahren im Überblick.** Die oberste Zeile zeigt eine Mutante mit einem globalen, also alle Zellen betreffenden KO (GKO). In der zweiten Zeile ist ein zellspezifisches KO-Modell abgebildet. Die unterste Zeile zeigt das induzierbare zellspezifische KO-Modell, welches auch für diese Arbeit genutzt wurde. Abbildung modifiziert aus (Friedel et al., 2011)

Transgene und Knockout Mausmodelle erlauben es, gezielt und kontrolliert DNA-Sequenzen, wie z.B. Gene in die Keimbahn von Mäusen zu integrieren oder zu entfernen und somit konkret deren Funktionen und Regulationsmechanismen zu untersuchen (Bouabe and Okkenhaug, 2013).

Traditionell wurden Floxmäuse durch Gen-Targeting embryonaler Stammzellen gewonnen. Die Erzeugung präziser Modifikationen in endogenen Genen ist jedoch sehr kompliziert. Darüber hinaus dauert es etwa ein Jahr oder länger, um die gewünschte Mauslinie zu erhalten.

Speziell dafür wurde ein System entwickelt, welches sich Cre/LoxP nennt. Es erlaubt sequenzspezifischen Rekombinationen durchzuführen und im Zusammenspiel mit einer fusionierten Cre Rekombinase eine Adressierung spezifischer Gewebetypen für das Knockout (oder Knockin).

## 2.8 Konditionelles KO

Das konditionelle KO ermöglicht im Gegensatz zum traditionellen/konventionellen KO einen gewebespezifischen Ansatz, ohne das gewünschte Gen in allen Geweben und Körperzellen zu eliminieren. So ist es möglich wie in diesem Fall seine Funktion spezifisch im Fettgewebe zu untersuchen. Außerdem kann eine zeitliche Kontrolle der Genexzision durch das Verwenden einer modifizierten Cre Rekombinase fusioniert mit einer mutierten Östrogenrezeptorbindungsdomäne (Cre/ER<sup>T2</sup>) ermöglicht werden. Dies geht über eine Regulation durch Promotor/Enhancer (in unserem Fall (Adipoq) hinaus. In dieser muss die Rekombinaseaktivität mittels einer Tamoxifen-Injektion induziert werden. In dieser Konstellation kann, anders als in der einfachen konditionellen KO-Variante, der Zeitpunkt zu welchem die Genrekombination/Exzision stattfinden soll durch den Untersucher manipuliert bzw. festgelegt werden. Er ist nichtmehr in demselben Ausmaß von einer durch die Entwicklung bedingte Aktivierung der Promotorregion abhängig.

Es bietet die Fähigkeit, ein einzelnes von tausenden von Genen im Körper präzise zu entfernen oder zu verändern. Die Defizite der Knockout-Maus können die Funktion des mutierten Gens offenbaren oder klären. Aus diesem Grund werden im Anschluss an ein suffizientes KO funktionelle Testungen an dem jeweiligen Modell durchgeführt. Das Ziel der Gen-Targeting-Methode (Knockout) ist es, das spezifische Gen zu inaktivieren, oder durch ein inaktives, verändertes oder irrelevantes Gen zu ersetzen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein solcher Ersatz auftritt, anstatt eine unspezifische zufällige Integration der DNA, werden beide Enden des Ersatzgens von langen DNA-Sequenzen flankiert, die homologe zu den Sequenzen sind, die das Zielgen flankieren. Sie nennen sich auch LoxP-Sequenzen und dienen als Erkennungssequenzen für die Rekombinase.

Ein Vorteil des konditionellen KOs gegenüber dem konventionellen Ansatz, ist die Reduktion der Rate embryonaler Letalität, die durch das Fehlen kompletter Gensequenzen häufiger bedingt wird.

Bei der Bewertung des Phänotyps einer konventionellen oder nicht-induzierbaren KO-Maus kommen weitere Erschwernisse hinzu. Die Tatsache, dass eine Mutation seit der Empfängnis vorhanden ist, kann es schwierig machen, phänotypische Veränderungen aufgrund der Mutation selbst von Veränderungen zu unterscheiden,

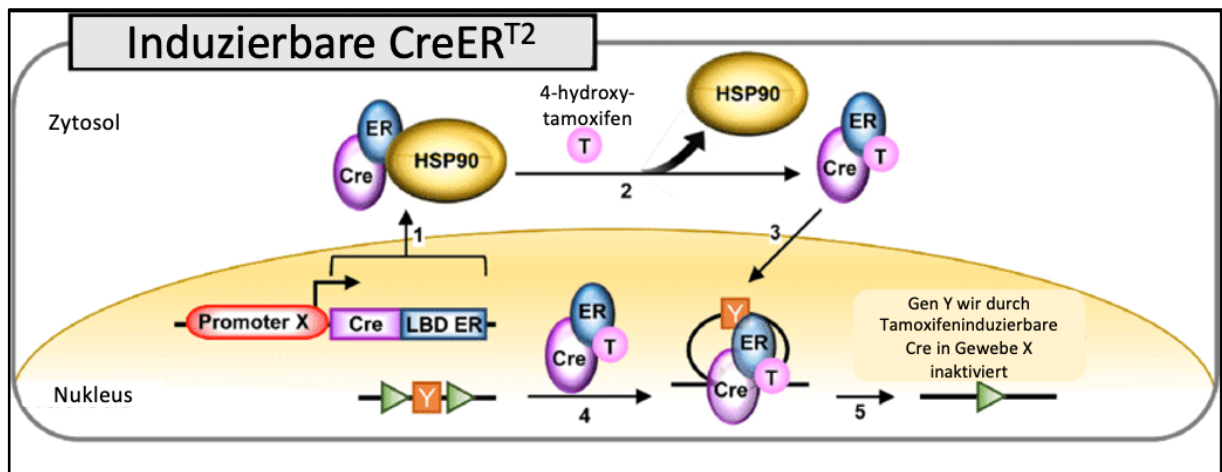
die durch physiologische Kompensation für die Mutation verursacht werden. Wenn ein Gen in verschiedenen Geweben exprimiert wird, wo es unterschiedliche Funktionen ausüben kann, kann seine Inaktivierung mehrere Folgen haben.

## 2.9 Mutierter Östrogenrezeptor (ER<sup>T2</sup>)

Die Fusion der Rekombinase mit dem mutierten Östrogenrezeptor ermöglicht, wie bereits beschrieben, eine zeitliche Kontrolle der Rekombinaseaktivität. Die zwei im Namen ist darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um eine Entwicklung des Rezeptors in der zweiten Generation handelt, welche spezifischer und sensitiver als der ursprüngliche Rezeptor sein soll (Jaisser, 2000). Seine Induktion ist genauer gesagt in der Zellkultur etwa 4-fach und in vivo etwa 10-fach effizienter als jene der Ursprungsform (Indra et al., 1999).

Der Östrogenrezeptor enthält eine mutierte Form der Ligandenbindungsdomäne. Das führt dazu, dass sie nur durch 4-hydroxy-tamoxifen (OHT), aber nicht durch die natürlichen ER-Liganden wie Östrogen aktiviert werden kann (Indra et al., 1999) Bis zu seiner Aktivierung durch OHT ist der Rekombinasekomplex im Zytosol mit dem Regulator- und Protektorprotein HSP90 (Hitzeschockprotein 90) assoziiert (Hoter et al., 2018) (siehe Abb.10).

Nach Bindung von OHT dissoziiert der Komplex und es kommt zur Einwanderung in den Zellkern, wo er an die das Zielgen flankierenden Sequenzen bindet und Rekombination stattfinden kann.



**Abb. 10 Wirkprinzip der induzierbaren Rekombinase.** Schritt 1 die Rekombinase (Cre) kombiniert mit dem mutierten Östrogenrezeptor (ER) wird transkribiert/translatiert und landet im Zytosol, wo sie mit dem Hitzeschockprotein (HSP90) einen Komplex bildet. Wird das 4-Hydroxytamoxifen (OHT) (Schritt 2) appliziert, löst sich HSP90 vom Komplex und Tamoxifen assoziiert mit diesem. Hierdurch kommt es zur Einwanderung in den Nucleus (Schritt 3) und im Verlauf durch die Rekombinaseaktivität (Schritt 4-5) zur gezielten Aktivierung/Inaktivierung eines geflochten (grüne Pfeile) Gens (Y) modifiziert aus (Kim et al., 2018)

## 2.10 Gewebespezifischer Promotor - Adiponektin

Das Adiponektin ist ein 30 kDa großes Protein, das spezifisch in differenzierten weißen und braunen Adipozyten exprimiert wird (Whitehead et al., 2006). Dies gilt allerdings noch nicht für sehr frühe Embryonalstadien, sondern beginnt etwa ab dem 17. Tag (Das et al., 2001). Man geht davon aus, dass das Expressionslevel von Adiponektin für differenzierte braune Adipozyten ein niedrigeres ist als für weiße Adipozyten (Fu et al., 2007, Fujimoto et al., 2005).

Adiponektin antwortet auf die Erhöhung von Sauerstoffradikalen, indem es die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) steigert. Dadurch bewirkt es eine Senkung von Oxidationsprodukten der Gefäßwand und dient somit als Schutzmechanismus gegenüber einer endothelialen Dysfunktion (Margaritis et al., 2013, Baltieri et al., 2018, Greenstein et al., 2009).

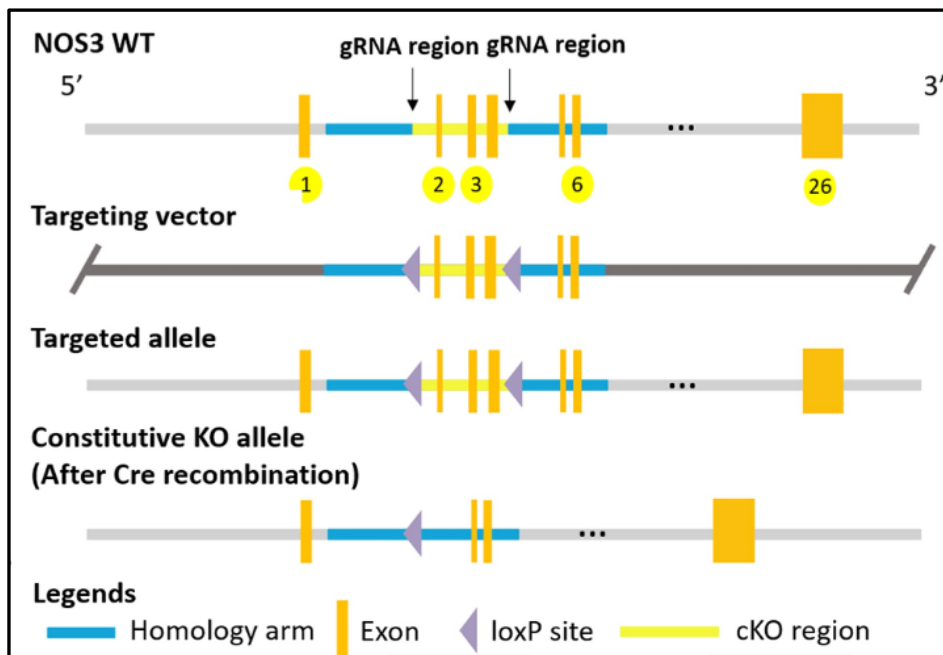
## 2.11 CRISPR/Cas9

Durch die Entwicklung des mittlerweile weit verbreiteten Systems, dem "clustered regularly interspaced short palindromic repeats" (CRISPR/Cas9) wurde die Genombearbeitung und somit die Produktion von genmodifizierten Tieren stark beschleunigt.

Das System funktioniert mittels direkter Injektion von technischen Endonukleasen oder RNA-geführten Nukleasen in Zygoten. Seine wesentlichen Bestandteile sind zum einen die Endonuklease Cas9 bzw. dessen "messenger" RNA (mRNA) und eine zielspezifische Führungs-RNA (gRNA). Gezielte Mutationen können mithilfe dieser Instrumente induziert werden. Dies geschieht über die Entstehung sog. DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) an den gewünschten Zielsequenzen und darauffolgender nicht-homologer oder homologer Endverbindungen (Cho et al., 2013, Cong et al., 2013, Jinek et al., 2013, Mali et al., 2013).

Die Koinjektion einer ein- oder doppelsträngigen Spender-DNA, kann präzise Punktmutationen oder DNA-Insertionen erzeugen. Sie ist homolog zu den Sequenzen, die die DSB-Stelle flankieren. Ein erschwerender Faktor ist, dass zwei unabhängige aber miteinander verknüpfte "template-guided repair events" auftreten müssen. Ein konditionelles KO-Allel besteht aus zwei LoxP-Stellen, die das kritische, also gewünschte Exon, ein Gen oder einen Gencluster flankieren (Pritchard et al., 2017). Diese Methode ist ein leistungsfähiges Werkzeug, um Floxmäuse zu erzeugen, da es nicht notwendig ist, einen Knock-in-Vektor über einen komplizierten Prozess zu konstruieren. Somit können Floxmäuse in kurzer Zeit (z. B. in einem Monat) generiert werden (Horii et al., 2017).

Abbildung 11 zeigt wie mithilfe der gRNA-Regionen gezielt die beiden LoxP-Sequenzen um das gewählte Target-Gen inseriert werden. Dadurch entsteht das mit LoxP flankierte Gen, welches nach Aktivierung der Rekombinase von dieser entfernt wird.



**Abb. 11 Targeting Strategie zur Generierung von  $NOS3^{(flox/flox)}$  Mäusen mithilfe von gRNA.** Die schwarzen Pfeile markieren die Punkte, an denen die gRNA ansetzt und die LoxP Sequenzen inseriert werden. Der gelbe Abschnitt welcher von den grauen Pfeilen (LoxP Sequenzen) flankiert wird, stellt das Target-Gen dar. Im untersten Teil der Grafik ist die Situation nach einer Cre vermittelten Rekombination bzw. Exzision dargestellt. Grafik aus (Man et al., 2023)

# Material und Methoden

## 3.1 Material

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog- Nummer</b>
<b>Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2</b>	GE Healthcare	10600006
<b>Methanol</b>	Honeywell	32213
<b>Bicinchoninic Acid solution</b>	Sigma-Aldrich	B9643
<b>Copper (II) sulfate solution</b>	Sigma-Aldrich	C2284
<b>Glycine</b>	AppliChem	A1067
<b>Milchpulver</b>	Roth	T145.3
<b>Natriumchlorid</b>	Roth	3957.2
<b>Triton X 10%</b>	Sigma-Aldrich	T8787
<b>Proteinase-Phosphatase-Inhibitor</b>	Thermo Scientific	REF1861280
<b>Tween 20</b>	Roth	9127.2
<b>Ponceau S</b>	Roth	5938.1
<b>Tris for molecular biology</b>	AppliChem	A2264,1000
<b>TRIS</b>	Roth	4855.5
<b>Natrium Flourid</b>	AppliChem	A3904.0100
<b>SDS, ultra pure</b>	Roth	2326.2
<b>EGTA</b>	Roth	3054.1
<b>EDTA</b>	AppliChem	A3553.1000
<b>NaCl</b>	Roth	3957.2
<b>APS</b>	AppliChem	A2941.0100
<b>Bromphenol Blau</b>	Sigma-Aldrich	B 8026
<b>Glycerol anhydrous</b>	AppliChem	A1123,1000
<b>β-Mercaptoethanol</b>	AppliChem	A1108,0025
<b>Albumin Fraktion V</b>	Roth	8076.4
<b>Page Ruler, Prestained Protein Ladder</b>	Thermo Scientific	26616
<b>Essigsäure</b>	Roth	3738.1
<b>Rapid Fixer</b>	Agfa	2828Q
<b>Developer and Replenisher</b>	Carestream Health	515 8621

<b>Amersham Hyperfilm ECL</b>	GE Healthcare	28906837
<b>Western Lightning Plus-ECL</b>	PerkinElmer	NEL105001EA
<b>Acrylamid 4K - Lösung (30%)</b>	AppliChem	A1672
<b>Mini-PROTEAN Tetra Cell</b>	BioRad	1658006FC
<b>Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell</b>	BioRad	1703930
<b>Tamoxifen</b>	Sigma-Aldrich	T5648
<b>Pentobarbital</b>	Sigma-Aldrich	P3761

Tabelle 1 Auflistung der Materialien

### 3.1.1 Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nummer</b>
<b>Centrifuge</b>	Eppendorf	5417K
<b>Waage</b>	Sartorius analytic	30153
<b>Adventurer Pro (Waage)</b>	OHAUS	AV2101
<b>Rotamax120</b>	Heidolph	54441200003
<b>Vortex-Genie2</b>	Scientific Industries	G-560E
<b>Thermoschüttler PRO</b>	CellMedia	112000
<b>Quick Cookmate (Mikrowelle)</b>	DAEWOO	KOR 6105
<b>pH Level1</b>	inoLab	160028
<b>PCR-Gerät</b>	BioRad	
<b>Pipetten</b>	Eppendorf	
<b>Wärmeschrank</b>	Binder	9010-0002
<b>SUPER Homogenizer, Precellys Evolution</b>	Bertin Technologies	P000062-PEVO0-A
<b>Royal Bio-Imaging System-Intas Gel iX Imager</b>	Intas Science Imaging Instruments	-
<b>SpectraMax iD3</b>	Molecular Devices	37 370-3264
<b>Mini Centrifuge</b>	BioRad	

Tabelle 2 Auflistung der Geräte

### 3.1.2 Herkunft der Mäuse

Die eNOS<sup>(flox/flox)</sup> Mäuse wurden durch Cyagen Biosciences generiert (Cyagen US Inc., Santa Clara, CA, USA). Sie wurden mithilfe der CRISPR/Cas9-Genomtechnik wie bereits oben beschrieben modifiziert. Exon 2–4 mit 1384 Basenpaaren (bp) wurde aus dem eNOS Gen deletiert und führte konsekutiv zu einem sog. "frameshift".

Die Adipoq-iCreER<sup>T2</sup> Mäuse wurden aus dem Jackson Laboratory eingekauft (Stamm 025124). Sie erlaubten die durch Tamoxifen induzierte Cre-vermittelte Adipozytenspezifische genetische Rekombination.

Der Tierversuch wurde von der zuständigen Behörde (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz; 23 177-07/G 17-1-020 und G 22-1-039) genehmigt und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

### 3.1.3 Haltung und Zucht der Mäuse

Die Mäuse wurden in Käfigen gehalten, die den Anforderungen des Tierschutzes entsprechen. Es waren nach Geschlecht und Genotyp sortiert maximal 4 Tiere in einem Käfig untergebracht. Die Zuteilung in die endgültigen Käfige konnte nach der Genotypisierung mittels PCR erfolgen.

Die Tiere hatten keine Trinkmengenbegrenzung und erhielten normales Nager- und Kleintierfutter.

### 3.1.4 Kreuzung

Um die Adipozyten-spezifischen eNOS-KO-Mäuse zu generieren, wurde das zuvor genannte CRISPR/Cas9-System in Kombination mit injizierten Loxp-Sequenzen, wie oben beschrieben, verwendet. Damit die Mäuse den von uns erwünschten Genotypen (Adipoq-Cre<sup>+</sup>eNOS<sup>fl/fl</sup>) erhalten, ist eine Kreuzung über vier Mausgenerationen notwendig (siehe Abb.8). Wenn die gewebespezifische Rekombinase dann durch die Gabe von Tamoxifen aktiviert wird, erlaubt sie eine gezielte Deletion von eNOS in den Adipozyten. Dies funktioniert dadurch, dass die von uns genutzte Rekombinase

Adipoq-CreER<sup>T2</sup> über einen Tamoxifensensitiven Adiponektinpromotor aktiviert bzw. seine Expression initiiert wird.

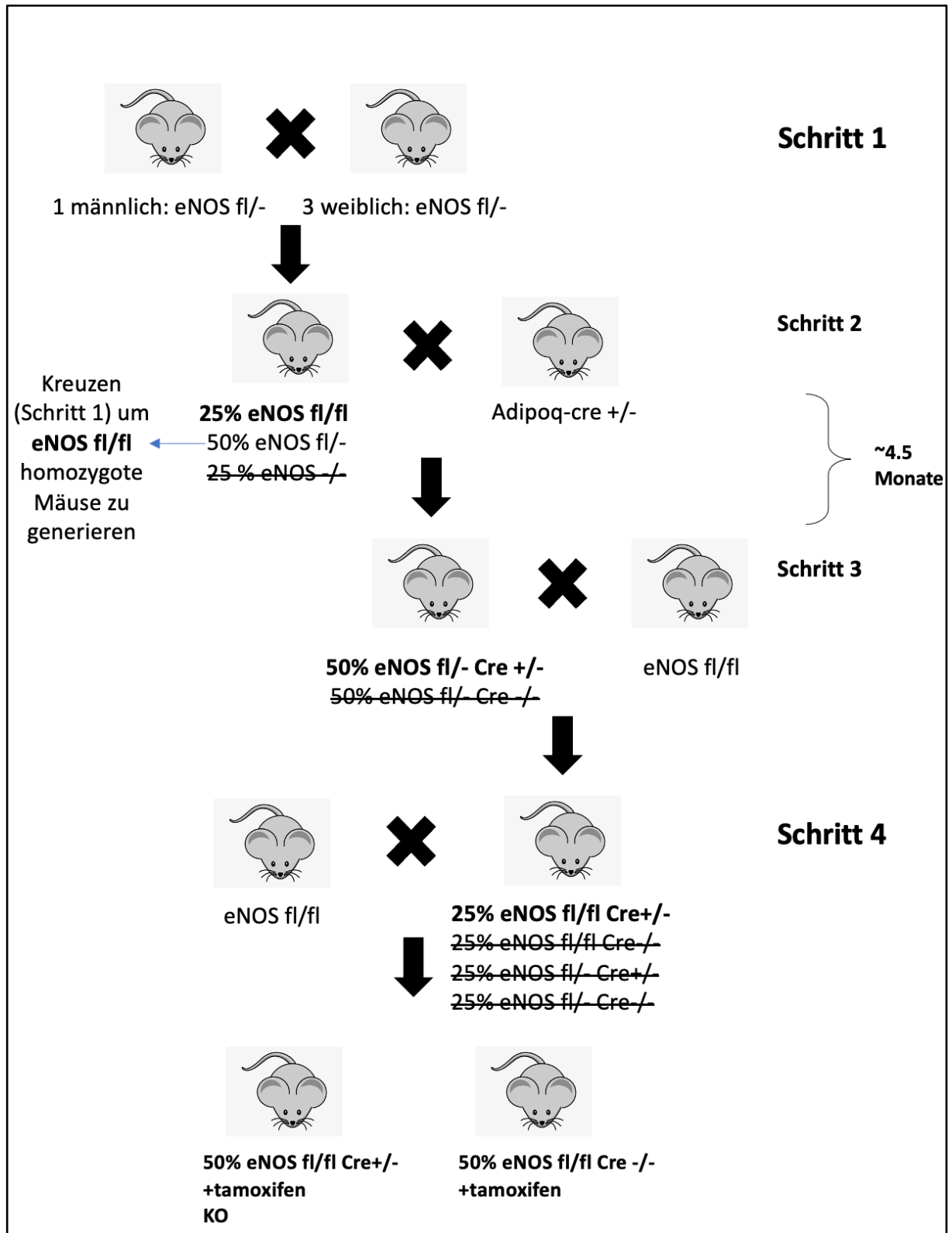


Abb. 12 Schema des Kreuzungsvorganges der Mäuse über vier Generationen hinweg. Begonnen mit den eNOS<sup>fl/-</sup> und den Adipoq-Cre<sup>+</sup> Mäusen bis zu den eNOS<sup>fl/fl</sup>-Cre<sup>+</sup> und eNOS<sup>fl/fl</sup>-Cre<sup>-</sup> Mäusen

Im ersten Schritt (Schritt 1) werden 2 für die Floxallele heterozygote Mäuse miteinander gepaart, um eine flox/flox-homozygote Tochtergeneration (25%) zu erhalten. Diese wiederum werden mit einer Cre<sup>+</sup> Maus gekreuzt (Schritt 2). Die darauffolgende Tochtergeneration ist nun zu 50% mit dem Cre-Lokus ausgestattet, ist aber wiederum heterozygot für das Floxallel. Aus diesem Grund wird diese Generation ein weiteres Mal mit einer für das Floxallel homozygoten Maus gekreuzt (Schritt 3). Daraus erhält man in 25% der Fälle eine Maus mit sowohl homozygoten Floxallelen als auch der Rekombinase in den Adipozyten. Um nun eine Generation zu erzeugen, welche alle gewünschte Genotypen also sowohl Cre<sup>+</sup> als auch Cre<sup>-</sup> aber jeweils mit homozygoten Floxallelen vereint, wird die dritte Generation im letzten Schritt (Schritt 4) ein weiteres Mal mit einer Flox-homozygoten Maus gekreuzt.

### 3.1.5 Expression von Cre

Eine unterschiedliche Zahl an Kopien bei der Genexpression und die Variabilität der Genomintegration an der gewünschten Stelle haben einen wesentlichen Einfluss darauf, wie das Muster der Expression von Transgenen aussieht. Daher kann es bei sich unabhängig voneinander entwickelten transgenen Mausallelen mit Cre oder Cre/ER<sup>T2</sup> mit identischen Sequenzen für die Regulation, relevante Unterschiede im Cre-Expressionsmuster geben (Chandler et al., 2007).

Ein generationenübergreifender Gendrift kann einen weiteren großen Einfluss auf das Expressionsmuster von Cre haben. Die Expression kann so über viele Generationen entlang des Stammbaumes verändert werden oder verloren gehen. Alle diese Variablen führen dazu, dass Ergebnisse schwierig zu interpretieren oder manchmal scheinbar paradox sind. Um fundierte Daten zu generieren, ist daher eine gründliche Charakterisierung der Cre-Expression in jedem einzelnen Mausmodell essenziell (Payne et al., 2018). Zudem ist zu beachten, dass die Cre-Expression auch in einer kleinen Anzahl an Zellen binnen einer theoretisch Cre-positiven Population mangelhaft sein (Heffner et al., 2012).

### 3.1.6 Gentergeting mittels Rekombinase

Ein erfolgreiches Gentergeting mit Cre bzw. Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup>-LoxP ist abhängig von den präzisen Expressionsmustern der Cre-Rekombinase.

Eine einzige Cre-vermittelte Exzision bzw. Rekombination wird während der Zellteilung an alle folgenden Tochterzellen weitergegeben. Auf diesem Weg ist es möglich ganze Zelllinien zu markieren und verändern. Es ist daher auch möglich, dass eine fehlerhafte Exzision oder Expression in einer unerwünschten Zellart weitreichende Konsequenzen hat, da sie sich auf die darauffolgenden Zellgenerationen übertragen kann. Dies trifft insbesondere dann zu, wenn sie früh in der Entwicklung geschieht (Heffner et al., 2012). Daher ist eine Geno- und Phänotypisierung, wie sie für die vorliegende Arbeit mittels PCR und Western Blot gemacht wurde, zu Beginn einer Untersuchungsreihe unerlässlich, um verlässliche Daten aus darauffolgenden Experimenten liefern zu können.

### 3.1.7 Intraperitonealinjektion

Die Intraperitonealinjektion mit Tamoxifen dient der Aktivierung der gewebespezifischen Rekombinase (Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup>). In unserem Fall speziell in den Adipozyten. Die Rekombinase ist mit einer mutierten Östrogenrezeptorligandenbindungsdomäne fusioniert (ER<sup>T2</sup>). Dadurch ist die Rekombinase allerdings nur aktiv, wenn man sie per Tamoxifeninjektion aktiviert. Das 4-Hydroxytamoxifen (OHT) ist der entsprechende Ligand, welcher an die oben genannte Domäne binden kann. Als Trägersubstanz wird das Tamoxifen in Maisöl gelöst (20mg/ml) und appliziert. Unsere Mäuse bekamen für diesen Prozess im Alter von etwa 6 Wochen über 5 konsekutive Tage eine Intraperitonealinjektion mit Tamoxifen (2mg/Maus/Tag). Im Anschluss an die letzte Injektion wurde mindestens eine Periode von 7 Tagen abgewartet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Western Blot

Der Western Blot ist eine seit vielen Jahren etablierte Methode zum selektiven Nachweis von Proteinen. Hierfür wird als Reagenz ein zuvor aufbereitetes Proteinlysate mit genau bestimmter Proteinkonzentration benötigt.

Er beinhaltet sowohl eine Gelelektrophorese (PAGE) zur Auftrennung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht, als auch eine Fixierung und Markierung dieser mittels spezifischer Antikörper. Die Auswahl der Antikörper richtet sich nach dem gesuchten und zu untersuchenden Antigen.

Zum einen werden die Proben nach photometrischer Quantifizierung zum Housekeeping-Gen ( $\beta$ -Tubulin) ins Verhältnis gesetzt und zum anderen in ein Verhältnis zueinander. Dadurch kann die Methode auch als qualitative und semi-quantitative Nachweismethode beschrieben werden (Hnasko and Hnasko, 2015).

### 3.2.2 Ziel des Western Blottings

Der Western Blot dient dem Zweck der Darstellung des Phänotyps der Mäuse. Er soll verifizieren, ob und in welchem Ausmaß die entsprechenden Knockout-Mäuse das eNOS-Protein exprimieren. Konkret geht es darum zu zeigen, inwiefern das von uns eingesetzte Mausmodell mit einem fettgewebsspezifischen Promotor für die Expression der Rekombinase, zu einer Reduktion der eNOS-Expression im entsprechenden Gewebe geführt hat. Da der Nachweis in verschiedenen zuvor isolierten Geweben (z.B. Gefäße, PVAT, inguinales Fettgewebe), also auch anderen Gewebe, die nicht Fettgewebe sind, geschieht, ist ein Vergleich mit diesen möglich. Es kann festgestellt werden, ob ein unbeabsichtigtes KO an einem anderen Ort stattgefunden hat. Außerdem ist es möglich im Sinne einer semiquantitativen Analyse, das erreichte Ausmaß der eNOS-Reduktion zu bestimmen.

### 3.2.3 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser ddH<sub>2</sub>O verwendet.

<b>Puffer</b>	<b>Rezept</b>
<b>1x Transferpuffer:</b>	100ml Transferpuffer 700ml Wasser 200ml Methanol
<b>10x Transferpuffer:</b>	1L Wasser 144g Glycine 30.2g Trisbase
<b>10x Laufpuffer:</b>	1L Bidest-Wasser 144g Glycine 30.2g Trisbase for molecular biology 10g SDS
<b>TBST:</b>	900ml Wasser 100ml TBS (10x) 1ml Tween
<b>TBS:</b>	900ml Wasser 100ml TBS (10x)
<b>10x TBS:</b>	61g Tris (normal) 90g Natriumchlorid 1L Wasser evtl. pH einstellen mit HCL auf 7,6
<b>Lysepuffer (für 1ml):</b>	100ul 10% Triton X 200ul 5x TBS 10ul Proteinase-Phosphatase-Inhibitor 690ul Milipore Wasser
<b>Blottingpuffer (für 4l):</b>	9,7g Tris (normal) 45g Glycin 800ml Methanol mit destilliertem Wasser auf 4 L auffüllen

<b>RIPA-Puffer (Ph 7,4):</b>	1Mm NaF
	1% TriX100
	0,1% SDS
	0,5mM EGTA
	1mM EDTA
	25mM Tris
	140mM NaCl
<b>Tris 1.0 M:</b>	12,114g Tris
	100ml Bidestwasser
	pH mit HCL einstellen
<b>Tris 1.5 M:</b>	18,17g Tris
	100ml Bidestwasser
	pH mit HCL einstellen
<b>Laufpuffer:</b>	0,25M Tris HCL pH 6.8
	10% SDS
	50% Glycerol
	0,5% Bromophenol Blau
	5% $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Western Blot Lysepuffer:</b>	100ul Proteinase-Phosphatase-Inhibitor
	10ml RIPA-Puffer
<b>Ponceau S:</b>	0,5g Ponceau S
	1ml Essigsäure
	mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen
<b>Fixierer:</b>	800ml Wasser
	200ml Fixierlösung
<b>Entwickler:</b>	800ml Wasser
	200ml Entwicklerlösung

Tabelle 3 Auflistung der Puffer und Lösungen für den Western Blot

Gelkomponente	Rezept
<b>Trenngel:</b>	4ml Wasser
	3,3ml 30% acrylamide mix
	2,5ml 1,5M Tris pH8,8
	0,1ml 10% SDS
	0,1ml 10% APS
	0,004ml TEMED
<b>Sammelgel:</b>	1,4ml Wasser
	0,33ml 30% acrylamide mix
	0,25ml 1,0M Tris pH6,8
	0,02ml 10% SDS
	0,02ml 10% APS
	0,002ml TEMED

**Tabelle 4** Rezepte für Western Blot Gele

### 3.2.4 Gewebebegewinnung

Um die einzelnen Organgewebe aus den Mäusen zu extrahieren waren mehrere Schritte notwendig. Zunächst wurden die Mäuse mit einem inhalativen Narkotikum Isofluran (100%) in einer Luftdichten Kammer sediert und bekamen direkt im Anschluss eine intraperitoneale gewichtsadaptierte Injektion von Pentobarbital (150mg/kg). Hierzu war eine vorherige Messung des Körpergewichts notwendig.

Im Anschluss daran wurde den Mäusen mittels Herzpunktion das Blut aus dem Kreislauf extrahiert. Die Entnahme der Organe (eWAT, iWAT, Herz, Leber, Gehirn, Darm, BAT und der Gefäße mitsamt dem umliegenden Fettgewebe) erfolgte nach einer festgelegten Reihenfolge. Zunächst wurden die Fettgewebe eWAT und iWAT von den umliegenden Strukturen getrennt und entnommen. Daraufhin folgte die Entnahme der Leber (hier wurde jeweils immer aus dem größten Leberlappen ein

zentral liegendes Stück herausgeschnitten), der Nieren, des Herzens (mitsamt Aorta), Darm (mitsamt der mesenterialen Gefäße), des Gehirns und zum Schluss noch die des BAT aus der Nackenregion der Maus. Die Organe wurden im Anschluss gewogen und mithilfe von flüssigem Stickstoff in den dafür vorgesehenen Röhren konserviert.

### **3.2.5 Präparation des PVAT und m-PVAT**

Sowohl das PVAT als auch das m-PVAT muss gesondert unter dem Mikroskop mit einer kleinen Gewebeschere von den jeweiligen Gefäßen isoliert werden.

### **3.2.6 Erstellung des Proteinlysats**

Zunächst werden die Proben gemörsert oder im Homogenisator in Lysepuffer gelöst. Dies geschieht für die kleinen Gewebe, wie etwa der Aorta, dem PVAT, der Mesenterialarterie und dem M-PVAT unter flüssigem Stickstoff manuell, während die anderen Gewebe in einem Homogenisator zerkleinert werden. Im Anschluss werden die Proben bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 13000rpm 10 Minuten lang zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wird in neue Reagenzbehältnisse überführt. Bis sie für den Western Blot verwendet werden, lagern die Lysate bei -70° bis -80°C.

### **3.2.7 Bicinchoninic Acid Assay (BCA)**

Für das darauffolgende BCA Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung wird ein Reagenz aus BCA und Kupfer(II)Sulfat-Lösung benötigt. Die Messung basiert im Wesentlichen auf einer chemischen Reaktion, der sog. Biuret-Reaktion. Die Kupferionen, die unter alkalischen Bedingungen an die Peptidbindungen von den Proteinen binden, bilden in der Anwesenheit von BCA einen lilafarbenen Farbkomplex (Walker, 1994). Die BCA Assay Platte muss 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Dann kann das Protein entsprechend der Konzentration mit Wasser verdünnt werden. Der Probenpuffer wird hinzugegeben und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren.

### **3.2.8 Gelelektrophorese**

In Vorbereitung für die Gelelektrophorese werden die Gele gegossen. Diese werden nach Rezept (siehe Tab.4) zubereitet. Hierzu muss ein Sammelgel, in dem sich die Taschen für die Proben befinden und ein Trenngel, in dem sich die Proteine der Größe nach auftrennen, nacheinander in die dafür vorgesehene Schablone gegossen werden.

Anschließend wird das Gel mit den einzelnen Proben beladen und 15 Minuten bei 80 Volt, dann ca. 1 ½ Stunden bei 110-130 Volt in dem entsprechenden Laufpuffer laufen gelassen.

### **3.2.9 Blotting**

Wenn dieser Vorgang abgeschlossen ist, wird das Gel herausgenommen und zusammen mit dem Filterpapier, der Nitrocellulose, und Schwämmen im Blottingrahmen verschlossen. Dieser Prozess findet im Blottingpuffer statt, sodass die jeweiligen Komponenten nicht austrocknen. Bei 90 mA blottet das Gel im Blottingpuffer über Nacht im Kühlraum. Dabei werden die Proteine vom Gel durch das erzeugte Spannungsfeld auf die Blottingmembran (die Nitrocellulose) übertragen.

### **3.2.10 Anfärben**

Am darauffolgenden Tag wird die Nitrocellulosemembran 5 Minuten in Ponceau S angefärbt und anschließend in Wasser und TBS wieder entfärbt. Dies dient dem Sichtbarmachen der Proteinbanden.

### **3.2.11 Blockieren**

Der folgende Schritt, das Blockieren, wird mit 5%-iger Milchlösung in TBST für 1 Stunde vollzogen. Dabei werden Bindungsstellen an Proteinen blockiert, um späteres unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern.

### **3.2.12 Primärer Antikörper**

Nach dem Blockieren und dreimal 10-minütigem Waschen mit TBST kann der primäre Antikörper (eNOS AK 1:2000 in BSA 1%) (Tubulin AK 1:100.000 in 5% Milch/TBST)

appliziert werden und über Nacht inkubieren. Zur Vorbereitung wird die Membran in zwei Teile geschnitten, damit der Antikörper getrennt auf die jeweilige Höhe der zu erwartenden Bande (eNOS 133kDA, Tubulin 55kDA) appliziert werden kann.

### **3.2.13 Sekundärer Antikörper**

Nun wird die Nitrocellulosemembran erneut dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen, um Rückstände sicher zu entfernen. Daraufhin wird die Membran in der Lösung, die den sekundären Antikörper enthält (1:5000 5% Milch/TBST) für 1 Stunde inkubiert. Im folgenden Schritt wird sie wieder dreimal 10 Minuten in TBST und zweimal 5 Minuten in TBS gewaschen.

### **3.2.14 Chemiluminescence und Fotoentwicklung**

Nun wird die Membran mit einer ECL-Lösung (enhanced luminol-based chemiluminescent) für eine Minute beladen. Diese ermöglicht das Übertragen des Blotting Ergebnisses von der Nitrocellulosemembran auf einen entsprechenden Röntgenfilm in einer Dunkelkammer. Abschließend muss der Film noch kurz in einer Entwicklerlösung und einer Fixationslösung inkubieren, sodass das Ergebnis sichtbar und fixiert wird.

### **3.2.15 Auswertung der Western Blots**

Die Fotofilme der Western Blots werden nach Fixation und Trocknung eingescannt und können nun digital ausgewertet werden. Dieser Vorgang der Auswertung bzw. Quantifizierung der einzelnen Banden wurde mithilfe des Programms ImageJ (image processing and analysis in java, Open Source) vollzogen. Hierbei wird die Dicke der Banden zunächst graphisch dargestellt und berechnet. Als erstes wird die eNOS-Bande in Relation zum Housekeeping-Gen, welches in diesem Fall das  $\beta$ -Tubulin ist, gesetzt. Entsprechend der Relation der Spuren von Experimental und Kontrollgruppen zueinander, kann daraufhin eine Aussage über die Reduktion oder Zunahme der eNOS-Expression der entsprechend untersuchten Gewebetypen getätigt werden.

### 3.2.16 Genotypisierung und PCR

### 3.2.17 Probengewinnung

Einige Tage nach der Geburt werden die Mäuse durch Ohrlochung markiert. Das dabei entstandene Probenmaterial wird zur Genotypisierung genutzt.

### 3.2.18 Isolation der DNA

Daraufhin folgt die Isolation der DNA aus dem gewonnenen Probenmaterial. Dies erfolgt mithilfe eines DNA-Isolations-Kits von GENEKAM absolviert:

#### Zubereitungsprotokoll

1. 100 µl der Lösung Z in ein 1.5 ml Gefäß mit der enthaltenen Gewebeprobe hinzufügen
2. Dieses Gefäß für 20 Minuten bei 88°C in einen Wärmeblock inkubieren, in dieser Zeit die Proben 5 Mal vortexen.
3. In die Gefäße jeweils 100 µl der Lösung B hinzufügen und 5-10 s vortexen
4. In jedes Gefäß 200 µl der Lösung C hinzufügen
5. Für 5 Minuten bei 11 000g zentrifugieren
6. 290 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß füllen. Dieser enthält die DNA

Material	Hersteller	Katalognummer
	GENEKAM	
<b>KDNA-Isolation Kit</b>		SB0071-74
<b>Primer</b>	Eurofins genomics	
<b>PCR Master Mix</b>	Thermo Scientific	00890758
<b>DNA-Ladder</b>	Thermo Scientific	SM0613
<b>Agarose</b>	Carl Roth GmbH	227.4
<b>Tris</b>	Carl Roth GmbH	4855.5

<b>EDTA-Na2-Salz</b>	AppliChem	1A006033,1000
<b>Essigsäure</b>		
<b>Wasser, nucleasefrei</b>	Thermo Scientific	00787195
<b>Roti-Gelstain</b>	Carl Roth GmbH	3865.1

Tabelle 5 Auflistung Material für die PCR

<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' - 3'</b>
<b>Internal Positive Control Forward:</b>	CCG CAT CTT CTT GTG CAC T
<b>Internal Positive Control Reverse:</b>	ATC ACG TCC TCC ATC ATC C
<b>Transgene Forward</b>	GAG TCT GCC TTT CCC ATG AC
<b>Transgene Reverse</b>	TCC CTC ACA TCC TCA GGT TC

Tabelle 6 Auflistung der PCR-Primer

## Schritt 2 Mix PCR Lösung

<b>PCR Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup></b>	<b>Menge</b>
Master Mix	10 µl
Primer Set 1	1 µl
Primer Set 2	1 µl
Wasser	7 µl
DNA	1 µl

Tabelle 7 PCR Mix AdipoqCre/ER<sup>T2</sup>

<b>PCR fl/fl</b>	<b>Menge</b>
Master Mix	10 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Backward	1 µl
Wasser	7 µl
DNA	1ul

Tabelle 8 PCR Mix fl/fl

### Schritt 3 PCR

#### Ablaufprotokoll fl/fl

---

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	4min
2	94°C	30s
3	65°C	30s pro Zyklus um 0,5°C weniger
4	68°C	30s
5	-	- Schritte 2-4 wiederholen für 10 Zyklen
6	94°C	
7	60°C	30s
8	72°C	30s
9	-	- Schritte 6-8 wiederholen für 28 Zyklen
10	72°C	7min

---

**Tabelle 9** Ablaufprotokoll PCR fl/fl

#### Ablaufprotokoll Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup>

---

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	3min
2	94°C	30s
3	60°C	35s
4	72°C	35s
5	72°C	5min

---

**Tabelle 10** Ablaufprotokoll PCR Adipoq-Cre/ER<sup>T2</sup>

Reagenz	Rezept
<b>TAE-Puffer</b>	Tris
	EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz
	Essigsäure
<b>Gel</b>	2g Agarose
	100 ml Wasser
	5 µl Gelfarbe

**Tabelle 11** Reagenzien für die PCR

### 3.2.19 Elektrophorese

Das Gel für die Elektrophorese wird nach Rezept und Anleitung zubereitet und gegossen. Wenn dies ausgehärtet ist, werden die aus dem PCR-Gerät entnommenen Proben in die Geltaschen pipettiert und bei etwa 120 Volt für ca. 1h laufen gelassen.

### 3.2.20 Visualisierung der Bande

Um die Banden der PCR zu visualisieren wurde dem Gel ein Nukleinsäurefärbemittel zugefügt. So werden die DNA-Banden mithilfe eines Gelimagingsystems unter UV-Licht sichtbar und mit einer hochauflösenden Kamera fotografiert.

## 3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde für Gruppen von n= 4-6 absolviert. Dabei sind die N-Werte eine Angabe für die Gruppengröße, also die Anzahl analysierter Tiere einer Gruppe. Die Ergebnisse wurden dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Die einzelnen individuellen Werte sind in den Balkendiagrammen als Punkte dargestellt.

Der ungepaarte t-Test wurde für den Vergleich zweier Gruppen zueinander genutzt. P Werte von  $< 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Werte, die mehr als das 1,5-fache

des Quartilsabstandes außerhalb des Intervalls lagen, wurden als Ausreißer angesehen und sind daher nicht mit in die Statistik eingeflossen. Um die Graphen zu generieren und die statistische Analyse durchzuführen wurde das Programm GraphPad Prism 9.0.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet.

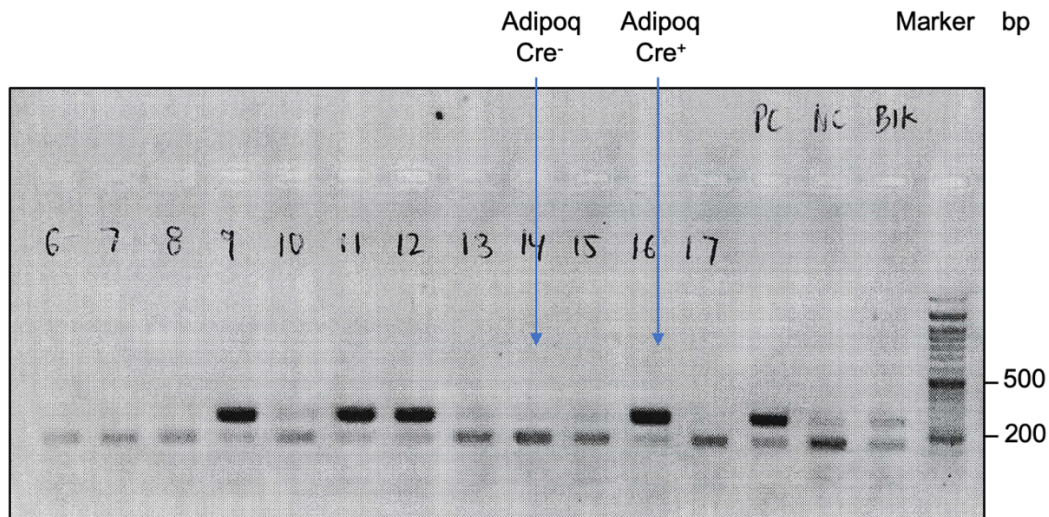
## Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der PCR

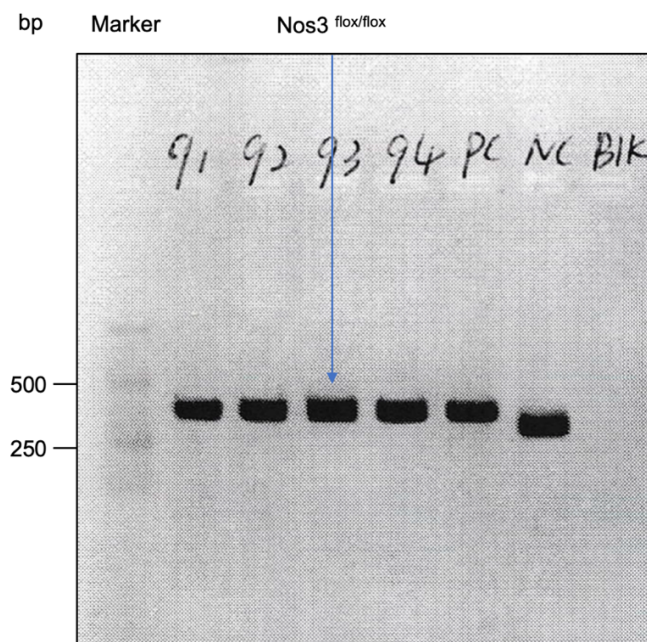
Die PCR-Analysen wurden mit Ohrlochungsmaterial der Maus absolviert. Sie ermöglichten die eindeutige Genotypisierung der Mäuse. In den folgenden Abbildungen (13 und 14) sind exemplarisch zwei der durchgeführten PCR-Analysen dargestellt. Jede Spalte repräsentiert dabei das Ergebnis von einer einzelnen untersuchten Maus. Die Mäuse, bei denen nur eine Bande erscheint (Abbildung 10), besitzen einen homozygoten Genotyp (Cre  $-/-$ ). Dahingegen entsprechen die zwei übereinanderliegenden Banden dem Vorliegen eines heterozygoten (Cre  $+/-$ ) Genotyps.

Es wurden zwei verschiedene PCR-Protokolle verwendet (s.o.). Eins diente dem Nachweis bzw. Vorliegen eines Cre<sup>+</sup> Genotyps, das andere sollte das Vorliegen eines flox/flox Genotyps belegen.

Der heterozygote Genotyp (Abbildung 13) entspricht dabei einem Cre positiven Genotyp. Es konnte somit dargestellt werden, ob die Tochtergeneration, die Mäuse die für diese Arbeit verwendet wurden, das Gen für die Rekombinase (Cre) vererbt bekommen haben (heterozygote) oder nicht. Somit kamen diese dann entweder für Kontrollgruppen oder Experimentalgruppen bei der darauffolgenden Western Blot-Analyse infrage. Außerdem wurden die Mäuse mit beiden Floxallelen identifiziert.



**Abb. 13 Genotypisierung mittels PCR mit dem Protokoll für den Nachweis der Cre Rekombinase.** Die Banden in den untersten rechten Spalten stellen den DNA-Marker dar, welcher eine Spannbreite von 50-1.000 Basenpaaren abdeckt. Der Cre<sup>+</sup> Genotyp stellt sich als Doppelbanden bei 272 bp und 175 bp dar, während die Cre<sup>-</sup> Mäuse eine Bande bei 175 bp besitzen; PC: Positive Control; NC: Negative Control (Wildtyp/B6); Blk: Blank (nur Wasser); Nummerierung: Tiernummern



**Abb. 14 Genotypisierung mittels PCR mit dem Protokoll für den Nachweis des flo/flo Genotyps.** Die Banden in der linken Spalte stellt den DNA-Marker dar, welcher eine Spannbreite von 50-1.000 Basenpaaren abdeckt. Der Nos3<sup>flox/flox</sup> Genotyp hat eine einzelne Bande bei 340 bp PC: Positive Control; NC: Negative Control (Wildtyp/B6); Blk: Blank (Wasser); Nummerierung: Tiernummern

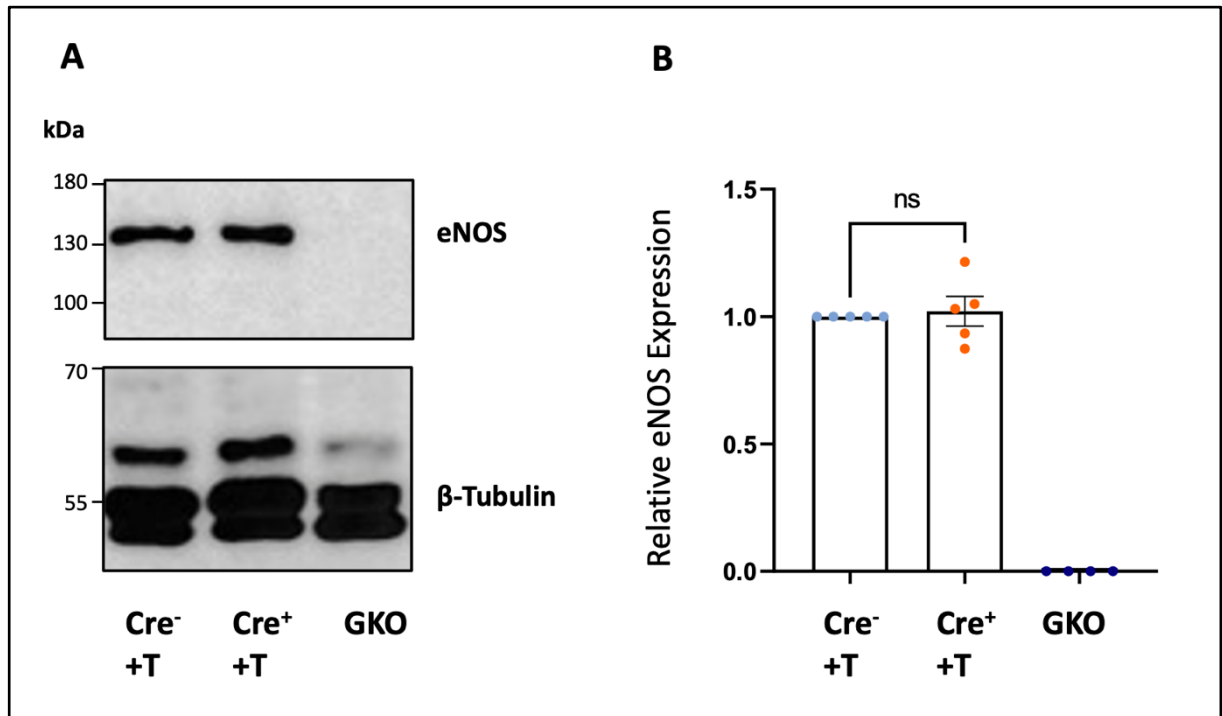
## 4.2 Western Blot Ergebnisse

### 4.2.1 Allgemein

Für die Analyse der Western Blots wurden sowohl die einzelnen Gewebetypen gruppiert als auch die Mäuse dem Geschlecht nach zugeordnet. Dementsprechend finden sich Graphen, welche die Veränderungen der eNOS-Expression in weiblichen (w) und männlichen (m) Mäusen gleichermaßen dokumentieren. In den Western Blots wurde als Vergleichsgruppe zur Cre<sup>+</sup> Maus mit Tamoxifeninjektion (NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>+</sup> +T) die Cre<sup>-</sup> Maus mit Tamoxifeninjektion (NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>-</sup> +T) gewählt. Hier (Cre<sup>-</sup> +T) sollte also kein KO trotz einer Injektion von Tamoxifen stattgefunden haben, weswegen der Wert für eNOS als 1 oder 100% angenommen wird. Das Gen ist folglich noch vorhanden und wird exprimiert.

Als weitere Vergleichs-/Kontrollgruppe wurden Mäuse mit einem globalen (alle Zellen betreffend) eNOS-KO (GKO) hinzugezogen, die in keinem der Gewebe eNOS exprimieren sollen. Bei Ihnen ist dementsprechend ein Wert von 0 (%) zu erwarten. Diese beiden Gruppen sind in allen der Blots dargestellt. Es war zudem auch möglich für einige der Blots ein paar weitere Vergleichsgruppen als Kontrollen hinzuzuziehen. Dazu gehören die Wildtypmaus; die Cre<sup>-</sup> Maus ohne Tamoxifeninjektion (NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>-</sup> -T), die Cre<sup>+</sup> Maus ohne Tamoxifeninjektion (NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>+</sup> -T) und die GKO-Maus (siehe Anhang). Allerdings sind für diese Arbeit die Cre<sup>-</sup> und Cre<sup>+</sup> Maus mit Tamoxifeninjektion von zentralem Interesse, daher werden die weiteren Vergleichsgruppen im Anhang ergänzend dargestellt. Außerdem standen für die Menge an durchgeführten Experimenten aus den anderen Vergleichsgruppen nicht genügend Tiere zur Verfügung. Bei den meisten der Blots gab es je 5-6 Repräsentantenmäuse für die 2 relevanten Gruppen (NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>-</sup> +T; NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>+</sup> +T). Diese sind als farbige Punkte in den einzelnen Balken dargestellt. Die Balkenhöhe der Graphen repräsentiert demnach den gemittelten Wert der relativen eNOS-Expression. Sie stellt die links von Ihnen abgebildeten Ausschnitte der Western Blots, welche ihre Analyse am präzisesten bildlich widerspiegeln, dar. Das für diese Arbeit relevante Ergebnis ist das Verhältnis der Gruppen NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup>+T und NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup>+T zueinander, so dass auch nur sie im ungepaarten t-Test miteinander verglichen wurden.

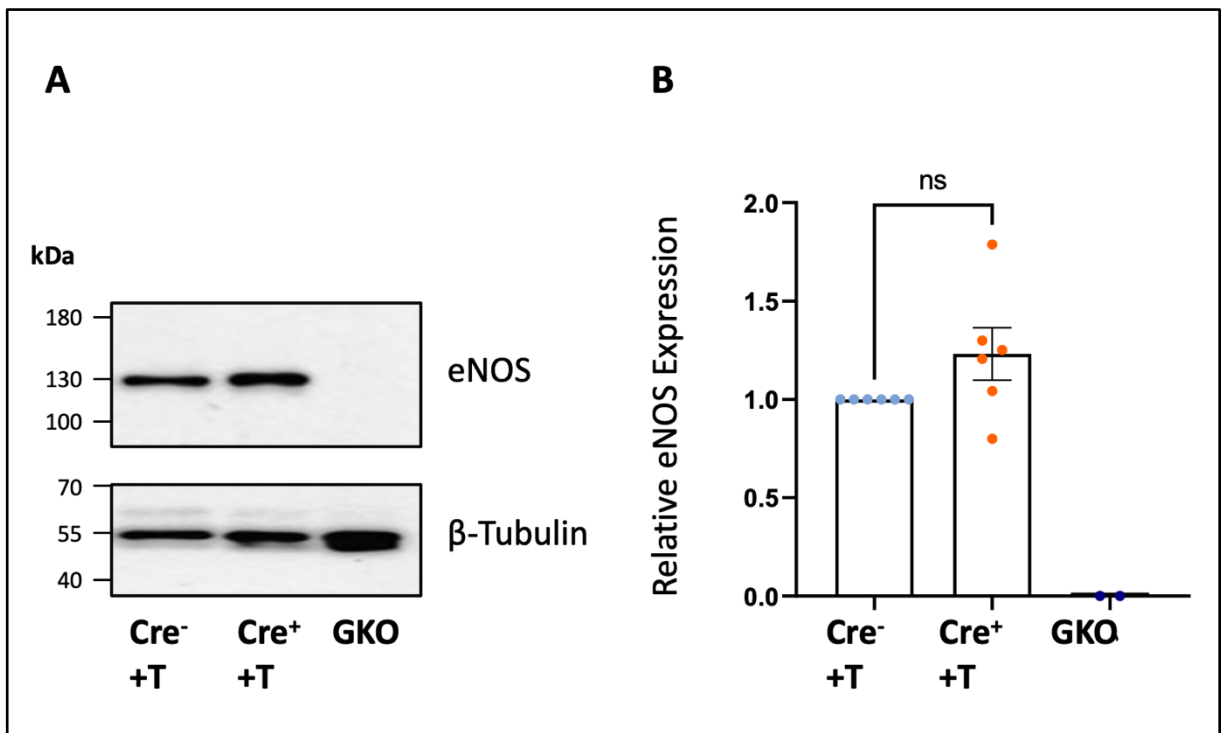
## 4.2.2 Braunes Fettgewebe (BAT)



**Abb. 15 eNOS-Expression im BAT der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. BAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup> Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den GKO-Mäusen isoliert und die eNOS-Expression mittels Western-Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup>+T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse der 5 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

In der Cre<sup>+</sup> Gruppe kann im Verhältnis zur Cre<sup>-</sup> Gruppe im BAT kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von eNOS bei männlichen Mäusen festgestellt werden (Abbildung 15). Eine geringfügige Streuung der Werte ist zu beobachten.

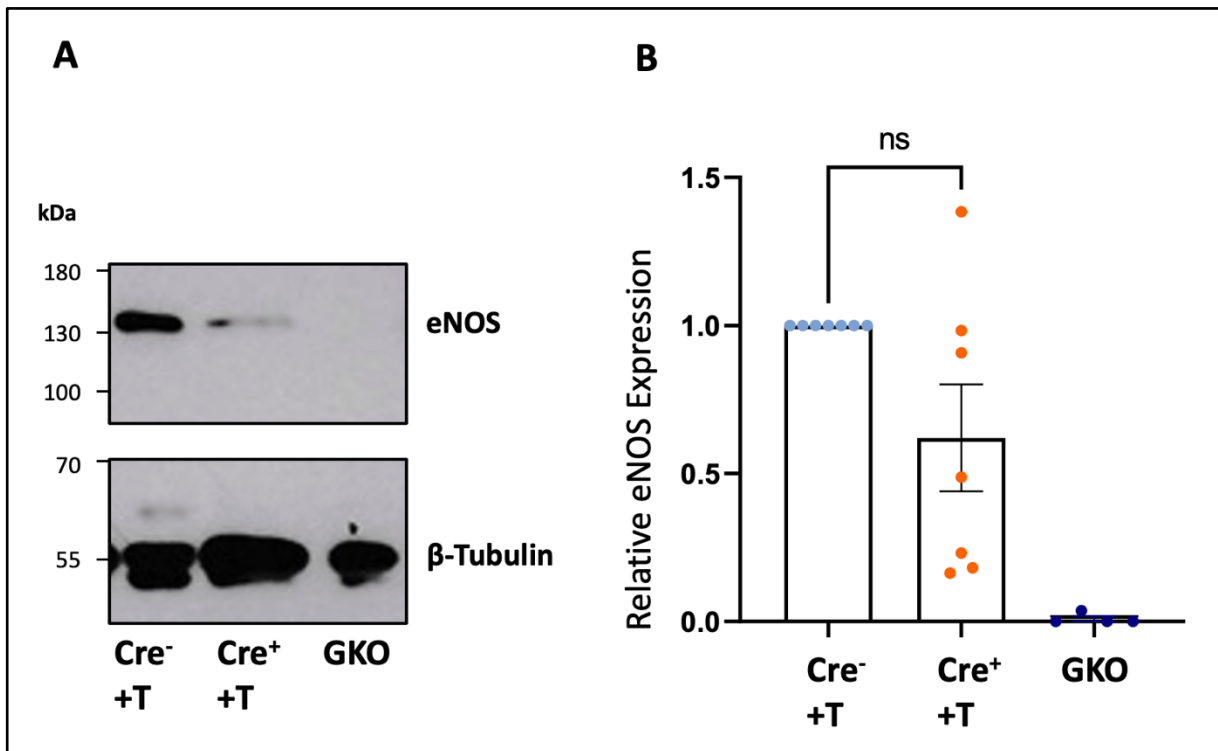


**Abb. 16 eNOS-Expression im BAT der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. BAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup>+T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant;

Analog zu den Ergebnissen der männlichen Mäuse ist im braunen Fettgewebe der weiblichen Mäuse kein signifikanter Unterschied in der Expression von eNOS zu verzeichnen (Abbildung 16). Hier ist die Streuung etwas breiter.

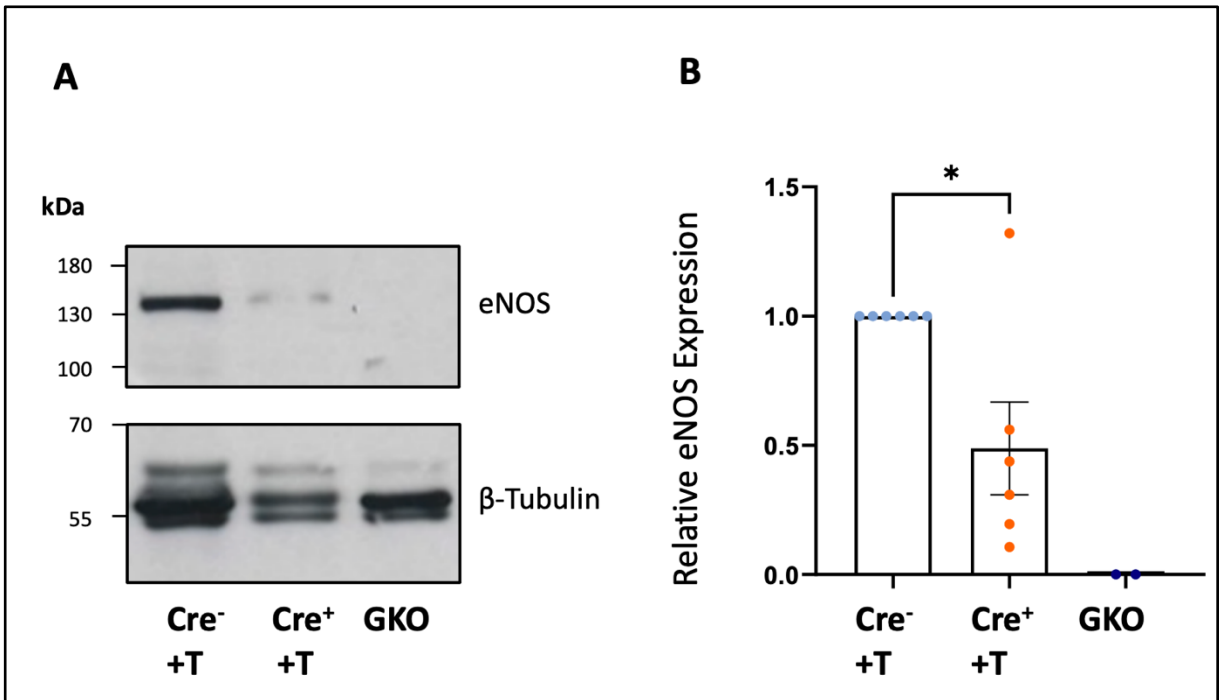
### 4.2.3 Epididymales Fettgewebe (eWAT)



**Abb. 17 eNOS-Expression im eWAT der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. eWAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 7 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigen eine tendenzielle Reduktion der eNOS Expression im eWAT der männlichen Mäuse (Abbildung 17). Diese ist in der relativen Skalierung bei etwa 40% geringer für die Cre<sup>+</sup> Mäuse im Verhältnis zu den Cre<sup>-</sup> Mäusen. Das Ergebnis ist jedoch aufgrund der breiten Streuung statistisch nicht signifikant.

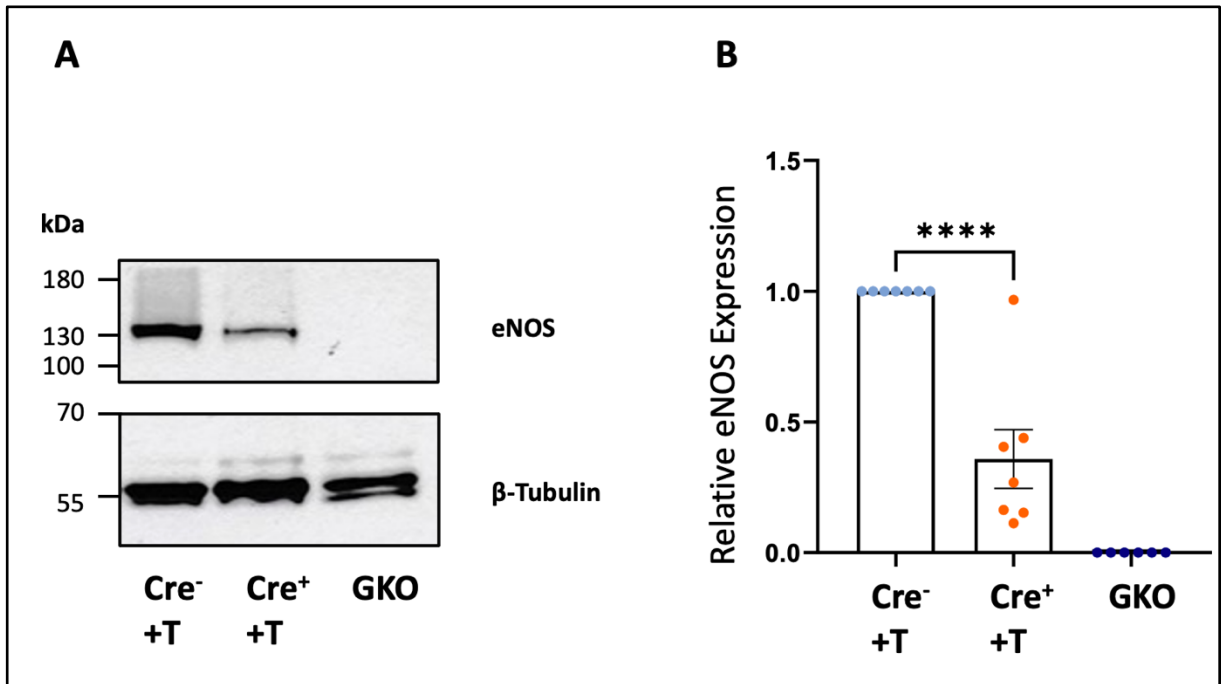


**Abb. 18 eNOS-Expression im eWAT der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. eWAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben \* P<0,05.

Die eNOS-Expression im eWAT bei weiblichen Mäusen ist in der Experimentalgruppe (Cre<sup>+</sup>) im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert (Abbildung 18). Die relative Reduktion beträgt mehr als 50%. Trotz einer gewissen Streuung der Werte ist das Ergebnis signifikant.

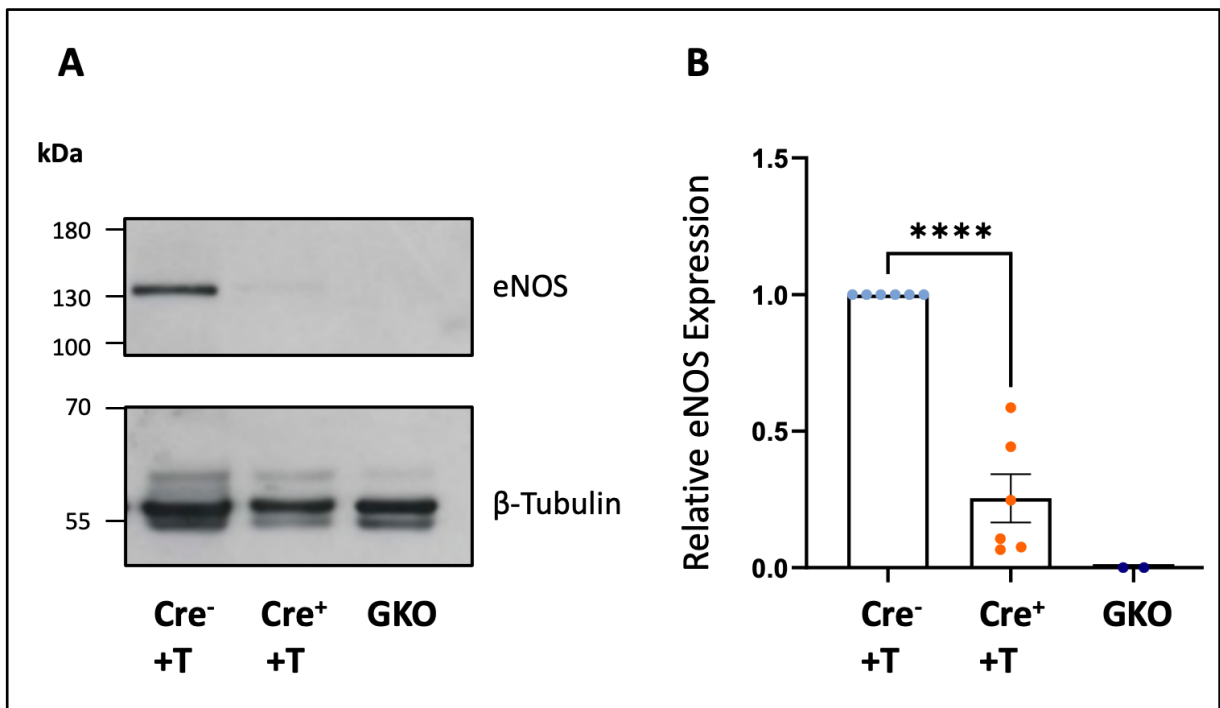
## 4.2.4 Inguinales weißes Fettgewebe (iWAT)



**Abb. 19 eNOS-Expression im iWAT der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. iWAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western-Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 7 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*\*\*\* P<0,0001.

Im Western Blot in Teilabbildung A zeigt sich eine deutliche Reduktion der Expression von eNOS im inguinalen Fettgewebe der männlichen Mäuse (Cre<sup>+</sup>+T) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Cre<sup>-</sup>+T). Dieses Ergebnis bestätigt sich in der Statistischen Analyse, welche eine Reduktion auf etwa 40% des Vergleichswertes ergibt (Abbildung 19 B). Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant.

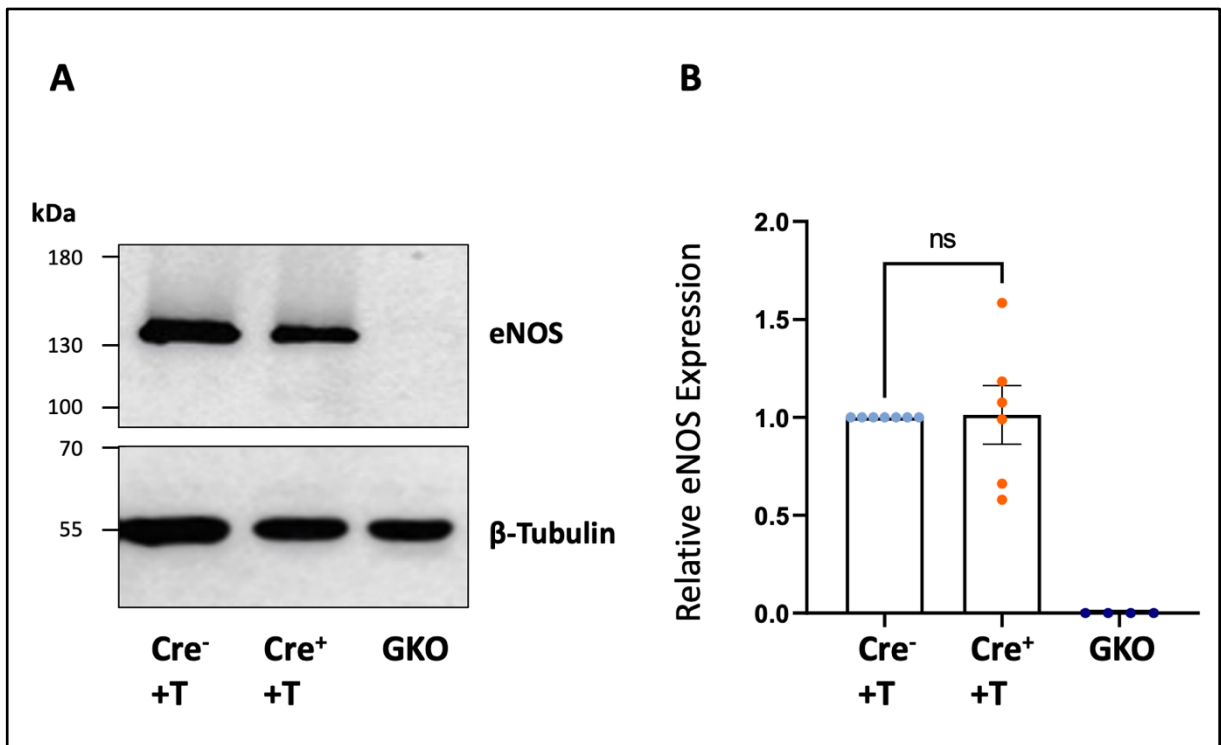


**Abb. 20 eNOS-Expression im iWAT der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. iWAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. \*\*\*\* P<0,0001.

Wie die Abbildung des Western Blots (Teilabbildung A) repräsentiert, ist im inguinalen Fettgewebe der weiblichen KO-Mäuse eine deutliche und ebenfalls signifikante Reduktion der eNOS-Expression festzustellen (Abbildung 20). Der Wert für die relative Expression in der statistischen Auswertung ist auf etwa 25% des Vergleichswertes gesunken. Das Ergebnis ist wiederum analog zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit den männlichen Mäusen.

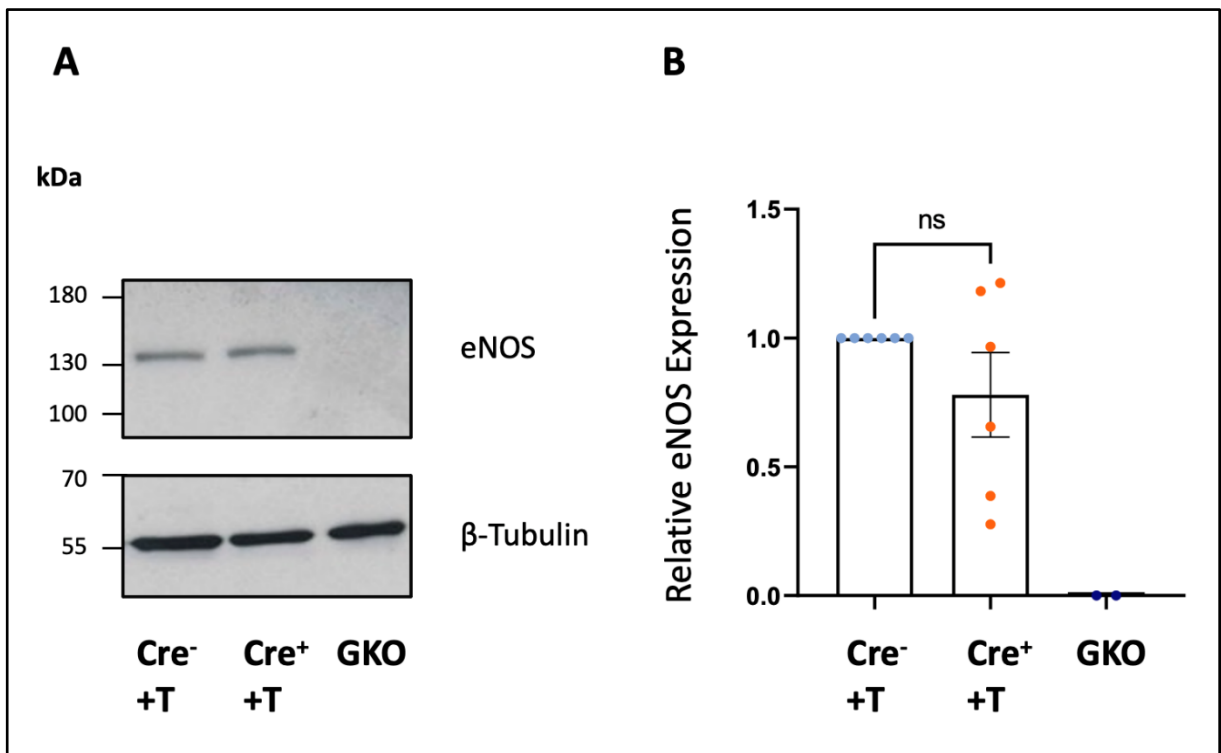
#### 4.2.5 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT)



**Abb. 21 eNOS-Expression im PVAT der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. PVAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten  $NOS3^{fl/fl}Adipoq-Cre^{-}$  ( $Cre^{-}+T$ ),  $NOS3^{fl/fl}Adipoq-Cre^{+}$  ( $Cre^{+}+T$ ), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der  $Cre^{-} +T$ -Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Das PVAT der männlichen Mäuse zeigt in den Western Blots kaum einen Unterschied in der eNOS-Expression zwischen Experimental- und Kontrollgruppe. In der statistischen Auswertung wird zudem nicht das Signifikanzniveau erreicht (Abbildung 21). Wie aus der Teilabbildung B hervorgeht, ist auch die Streuung der Werte relativ breit und inkonstant.

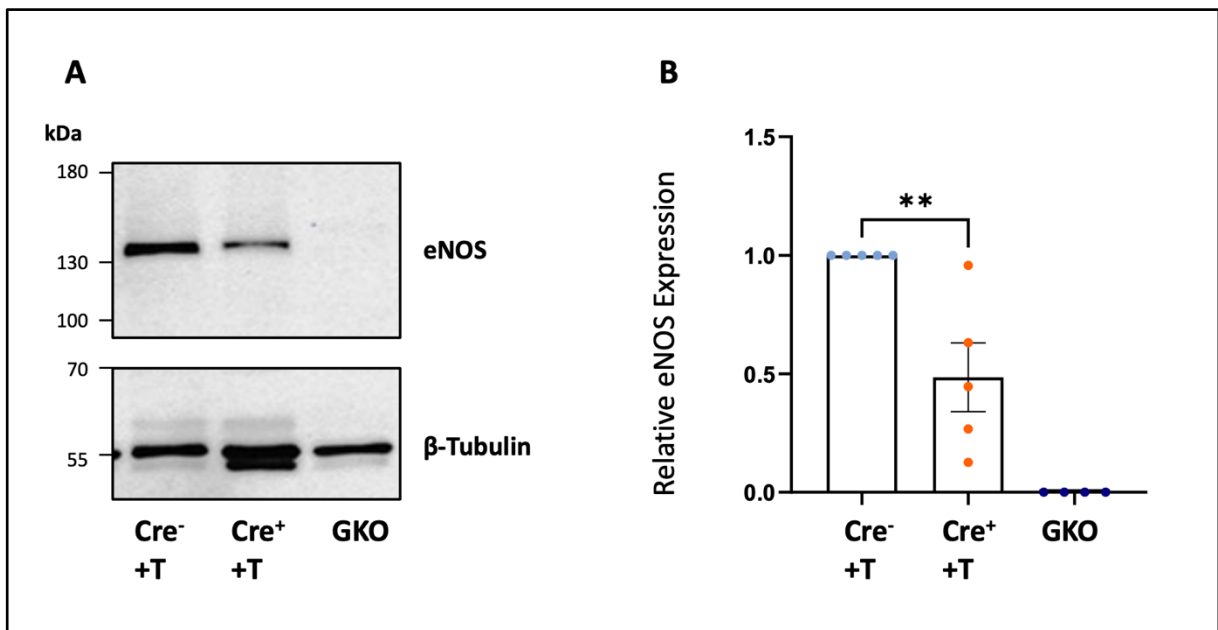


**Abb. 22 eNOS-Expression im PVAT der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. PVAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Grafisch verzeichnet sich im PVAT der weiblichen Mäuse eine geringfügige Reduktion der eNOS-Expression (Abbildung 22) in der Experimentalgruppe auf etwa 80%. Diese weist jedoch keine statistische Signifikanz auf. Analog zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit männlichen Mäusen ist auch hier für das PVAT eine breitere Streuung der Ergebnisse zu verzeichnen.

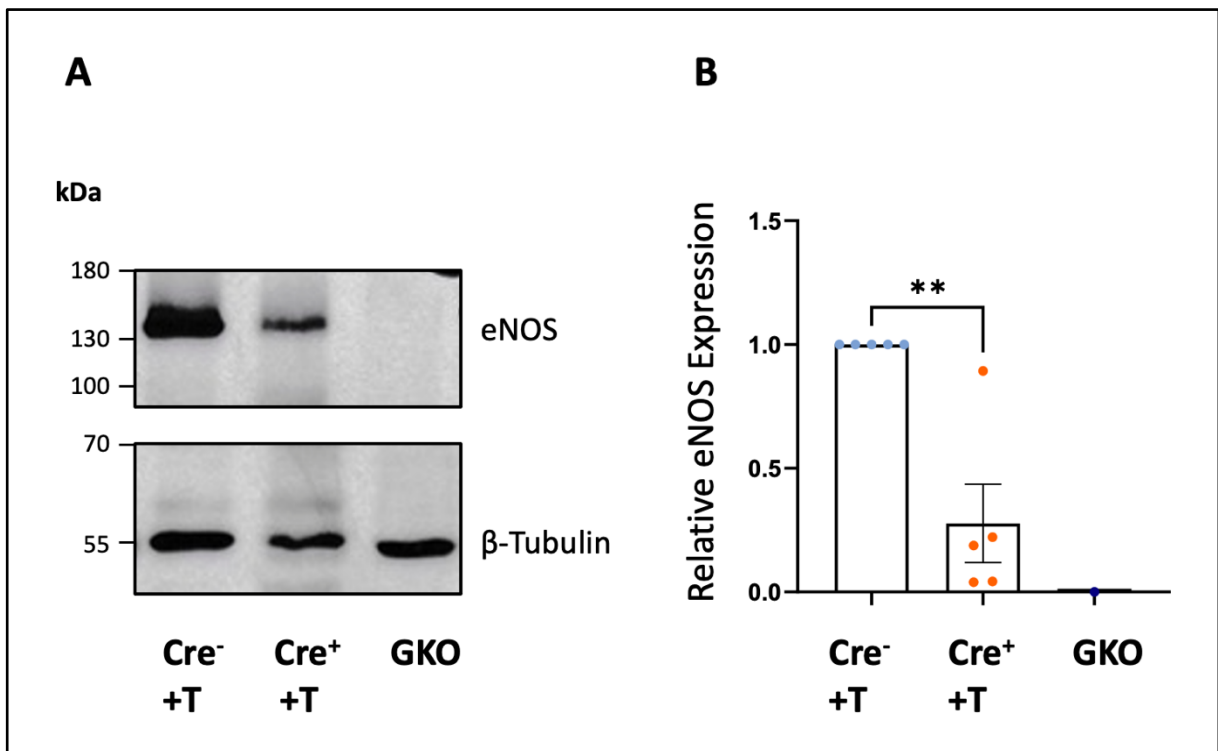
## 4.2.6 Mesenterial-arterielles Perivaskuläres Fettgewebe (m-PVAT)



**Abb. 23 eNOS-Expression im m-PVAT der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. MA-PVAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup>+T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 5 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben \*\* P=0,0035.

Im PVAT der mesenterialen Arterie bei männlichen Mäusen ist ein Rückgang der eNOS-Expression auf etwa 50% des Vergleichswertes zu beobachten (Abbildung 23). Das Ergebnis weist trotz einer gewissen Streuung der Werte eine deutliche statistische Signifikanz auf. Der abgebildete Western Blot (Teilabbildung A) stellt dies exemplarisch dar.

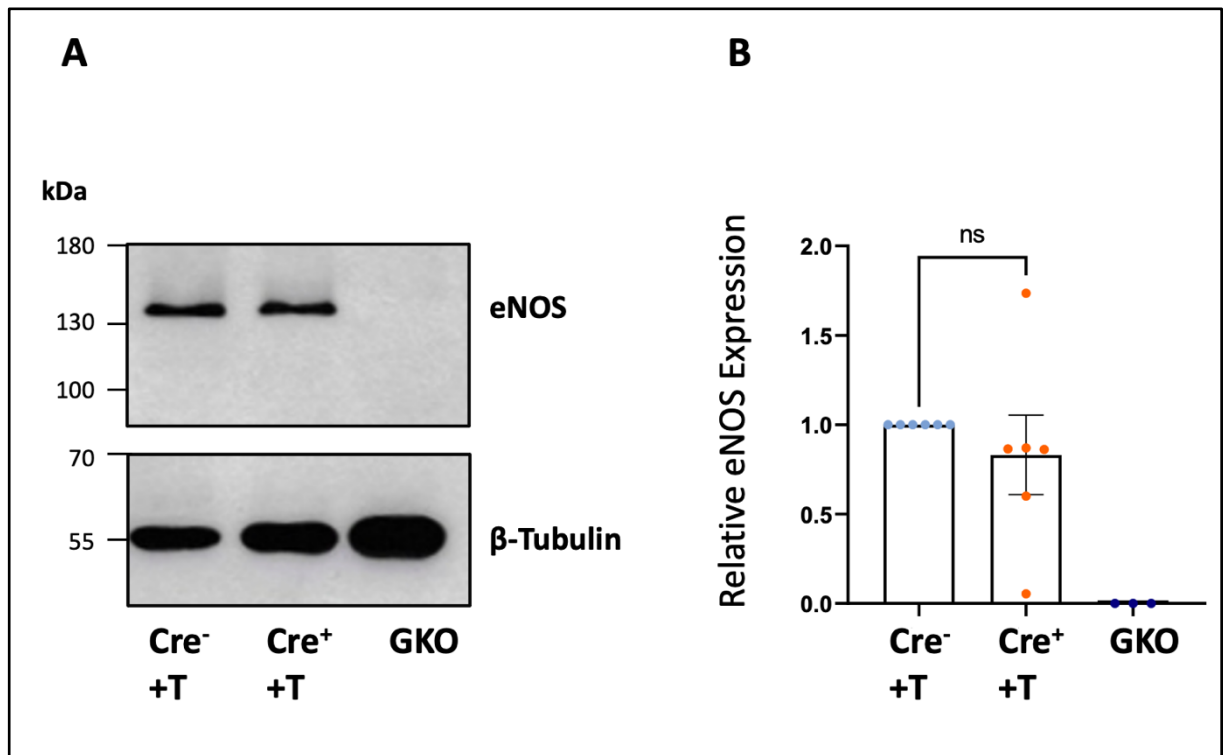


**Abb. 24 eNOS-Expression im m-PVAT der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. MA-PVAT wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western-Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 5 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant; \*\* P=0,0035.

Im Western Blot (Teilabbildung A der Abbildung 24) des M-PVAT weiblicher Mäuse ist eine deutliche Reduktion der eNOS-Expression im Vergleich zur Experimentalgruppe zu erkennen. In der statistischen Auswertung mehrerer Vergleichsgruppen zeigt sich eine relative Reduktion, welche etwa 75% entspricht und zudem hochsignifikant ist.

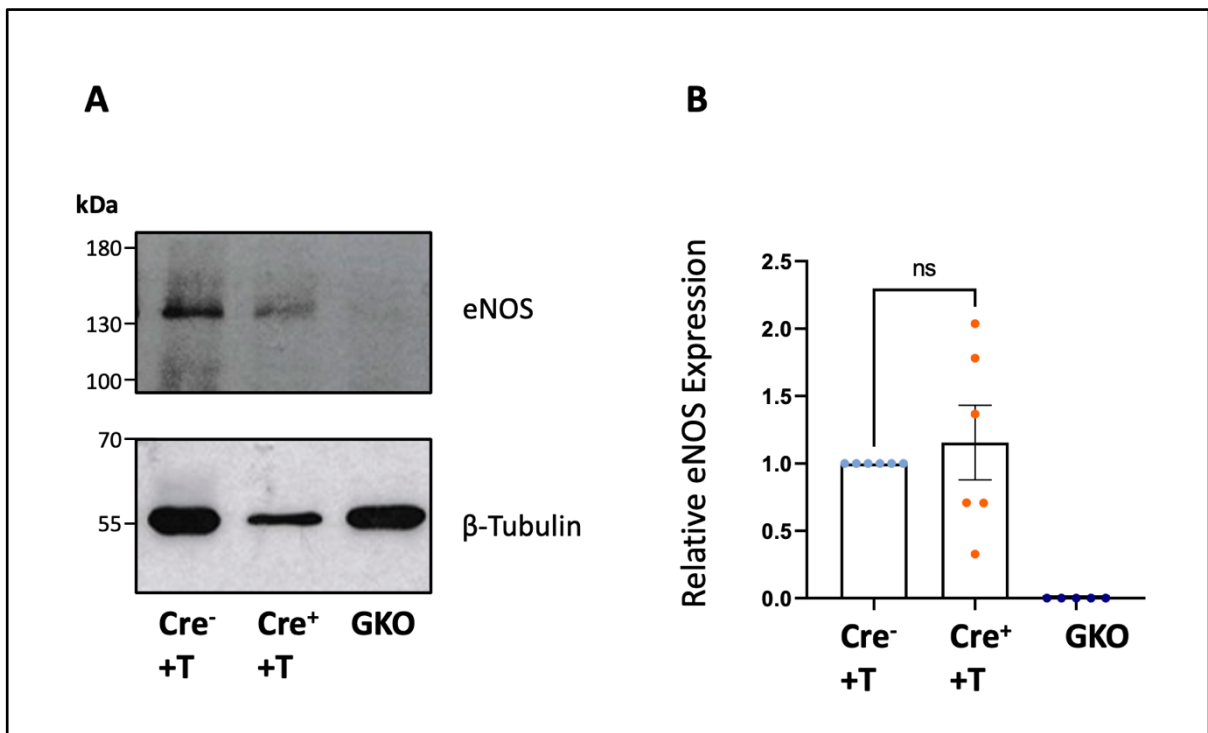
## 4.2.7 Aorta



**Abb. 25 eNOS-Expression in der Aorta der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Die Aorta wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS- Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup>+T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die Expression von eNOS in der Aorta bei männlichen KO-Mäusen hat sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert (Abbildung 25). Es finden sich sowohl nach oben als auch nach unten wenige Ausreißer, welche sich jedoch in Gesamtbetrachtung gegenseitig zu einem Ausgleich führen.

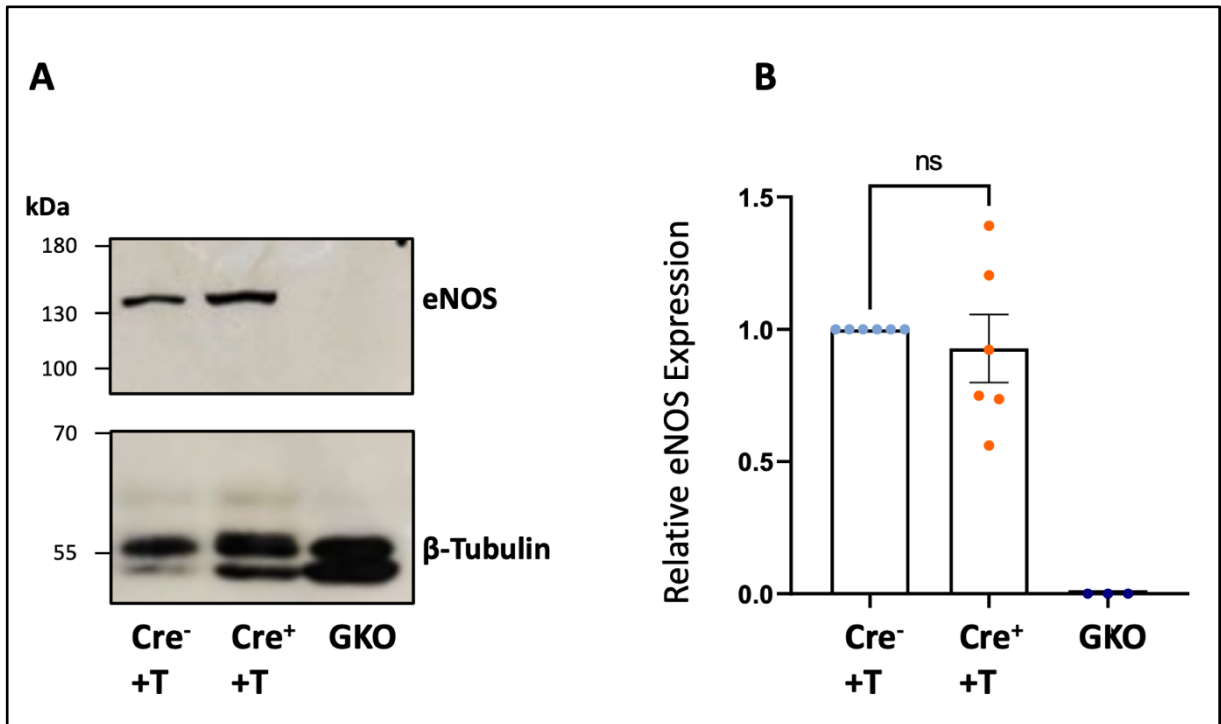


**Abb. 26 eNOS-Expression in der Aorta der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Die Aorta wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Wie bereits bei den männlichen Mäusen zu beobachten, zeigen die weiblichen KO-Mäuse keine signifikante Reduktion der eNOS-Expression in der Aorta (Abbildung 26). Die Streuung der Werte in der Cre<sup>+</sup> Gruppe ist groß. Der gezeigte Blot für die Cre<sup>+</sup> Gruppe, deutet eine Reduktion der eNOS-Expression an. Anhand der  $\beta$ -Tubulin-Bande lässt sich jedoch vermuten, dass dies auf eine geringere Proteinladung zurückzuführen ist.

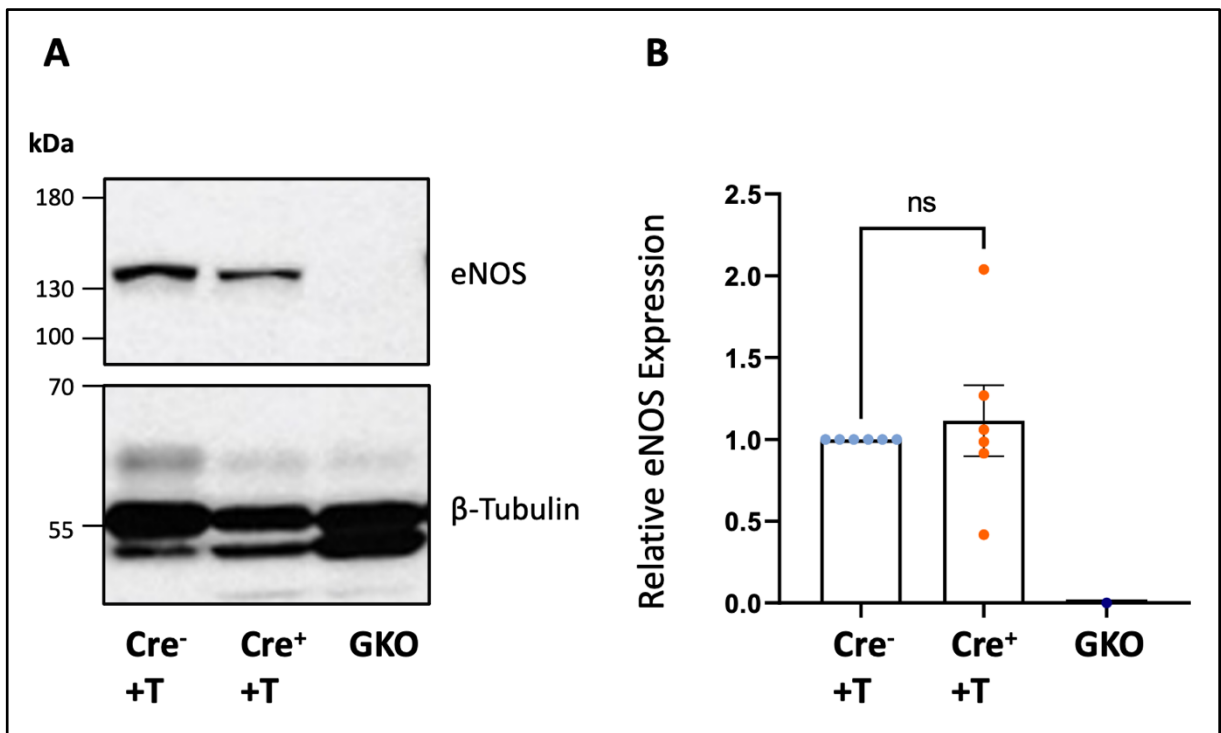
## 4.2.8 Leber



**Abb. 27 eNOS-Expression in der Leber der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Die Leber wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die relative eNOS-Expression in der Leber männlicher Mäuse ist für die Cre<sup>+</sup> Gruppe nach der Tamoxifeninjektion nicht signifikant verändert (Abbildung 27). Dies wird durch den Western Blot repräsentativ abgebildet (Teilabbildung A). Hier hat folglich kein KO stattgefunden.

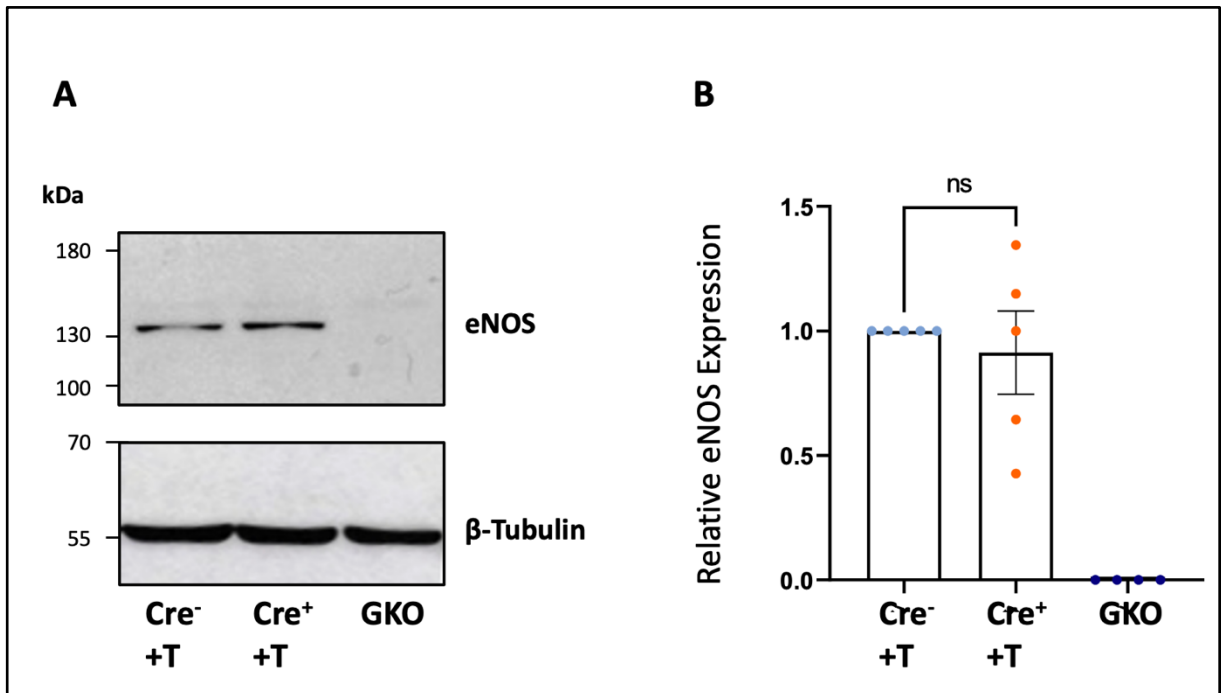


**Abb. 28 eNOS-Expression in der Leber der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Die Leber wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die relative eNOS-Expression im Lebergewebe weiblicher Cre<sup>+</sup> Mäuse ist nicht signifikant zur Kontrollgruppe verändert (Abbildung 28). Der Western Blot bildet dieses Ergebnis repräsentativ ab (Teilabbildung A).

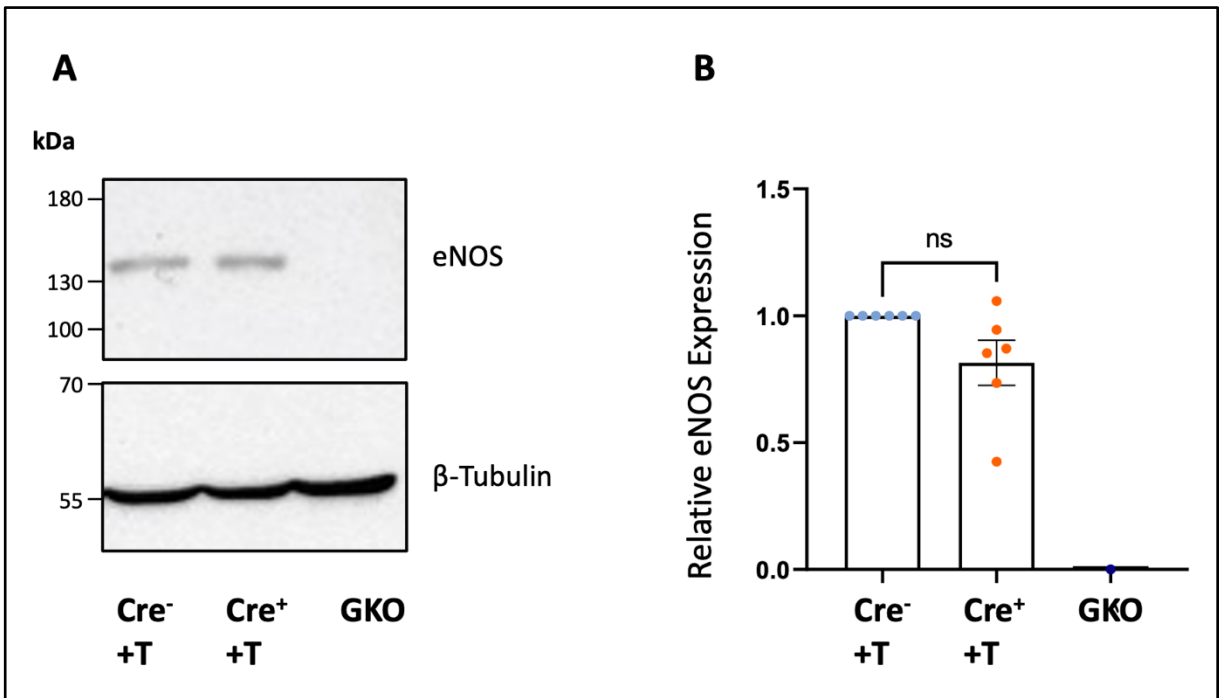
## 4.2.9 Gehirn



**Abb. 29 eNOS-Expression im Gehirn der männlichen Mäuse im Alter von 8 – 10 Wochen.** Das Gehirn wurde aus den mit Tamoxifen behandelten  $NOS3^{fl/fl}$ Adipoq- $Cre^{-}$  ( $Cre^{-}+T$ ),  $NOS3^{fl/fl}$ Adipoq- $Cre^{+}$  ( $Cre^{+}+T$ ), sowie den globalen eNOS- Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der  $Cre^{-}+T$ -Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 5 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Wie der Western Blot in Teilabbildung A darstellt, ist die relative eNOS-Expression im Gehirn der männlichen  $Cre^{+}$  Mäuse im Mittel unverändert zu jener der  $Cre^{-}$  Mäuse (Abbildung 29). Der Unterschied in der Expression ist auch statistisch gesehen nicht signifikant.

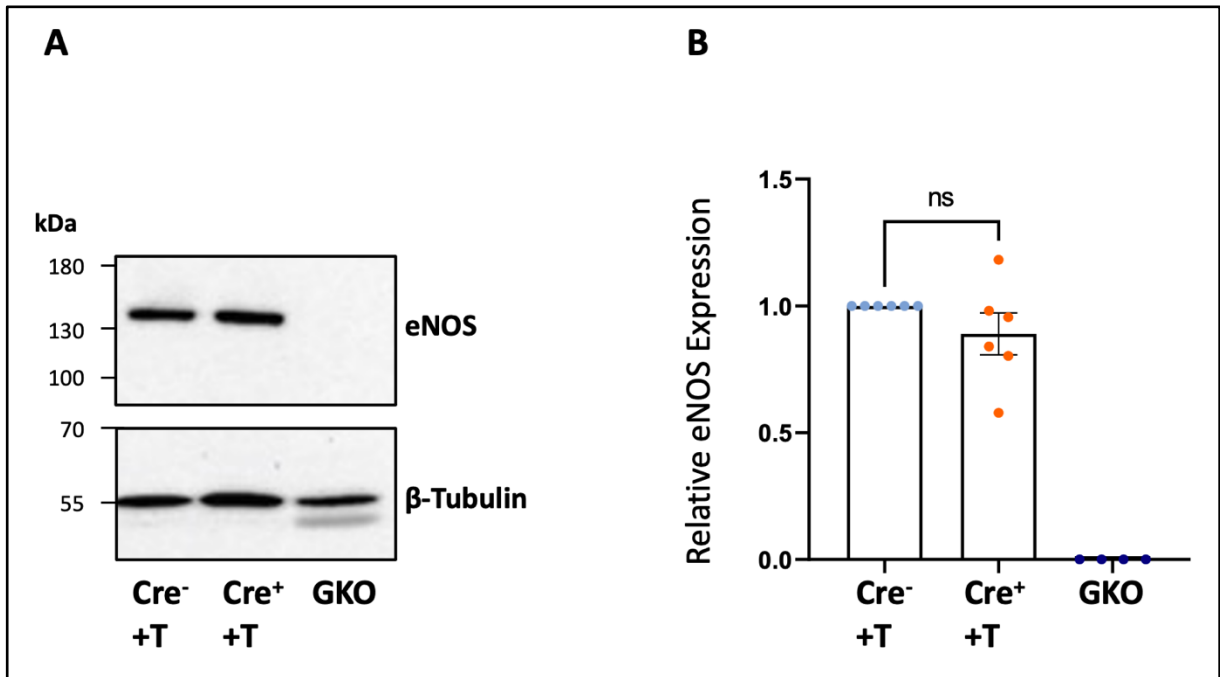


**Abb. 30 eNOS-Expression im Gehirn der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Das Gehirn wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die relative eNOS-Expression ist im Gehirn weiblicher Mäuse, wie bereits bei den männlichen Mäusen beobachtet werden konnte, in der Experimentalgruppe nicht reduziert (Abbildung 30). Der Western Blot (Teilabbildung A) spiegelt selbiges Ergebnis wider. Im Gehirn hat bei den Cre<sup>+</sup> Mäusen mit einer Tamoxifeninjektion folglich kein eNOS KO stattgefunden.

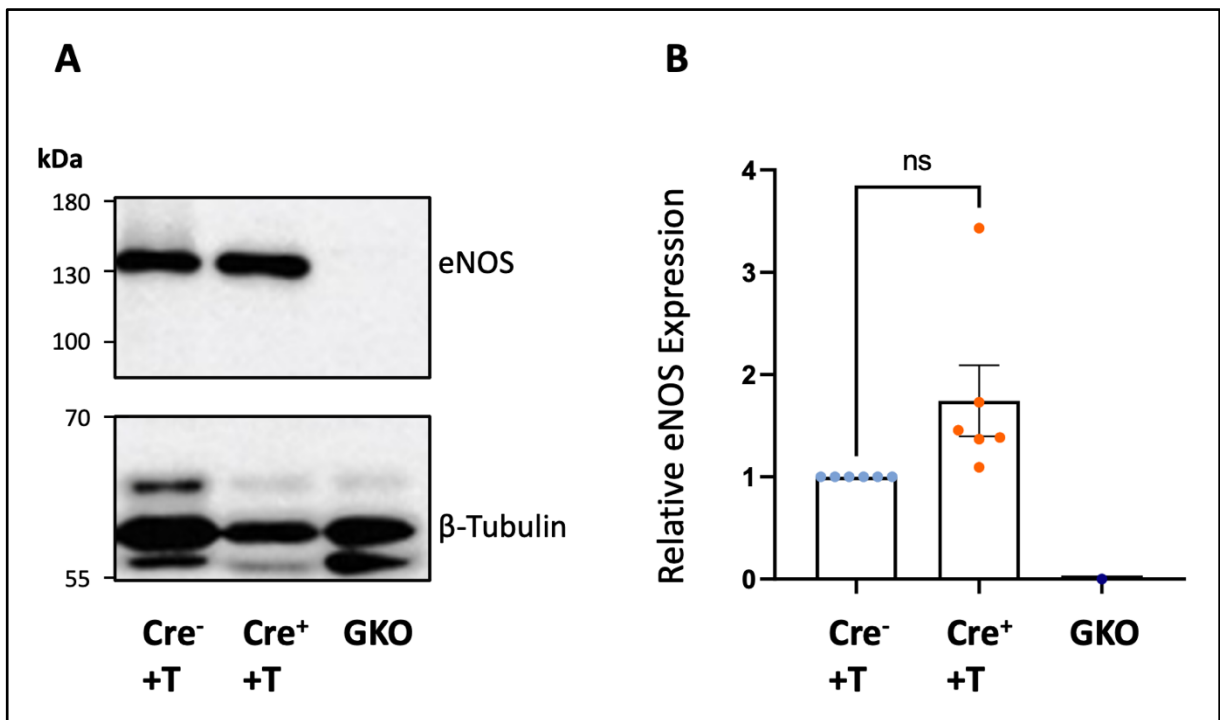
## 4.2.10 Herz



**Abb. 31 eNOS-Expression im Herz der männlichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Das Herz wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup>+T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Im Herzgewebe männlicher Mäuse lässt sich sowohl in der Quantifizierung (Teilabbildung B) als auch im Western Blot (Teilabbildung A) kein signifikanter Unterschied der relativen eNOS-Expression feststellen (Abbildung 31). Es hat demnach kein KO von eNOS stattgefunden.



**Abb. 32 eNOS-Expression im Herz der weiblichen Mäuse** im Alter von 8 – 10 Wochen. Das Herz wurde aus den mit Tamoxifen behandelten NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>-</sup> (Cre<sup>-</sup>+T), NOS3<sup>fl/fl</sup>Adipoq-Cre<sup>+</sup> (Cre<sup>+</sup>+T), sowie den globalen eNOS-Knockout-Mäusen (GKO) isoliert und die eNOS-Expression mittels Western Blot analysiert.

In jedem Versuch wurde die eNOS-Expression auf die des  $\beta$ -Tubulins normiert und zur Berechnung der relativen eNOS-Expression der normierte Wert der Cre<sup>-</sup> +T-Maus auf 1,0 festgelegt. Teilabbildung A zeigt Ausschnitte aus einem repräsentativen Experiment. Teilabbildung B stellt die Quantifizierungsergebnisse aus 6 Experimenten dar. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. ns, nicht signifikant

Die relative Expression von eNOS im Herzgewebe der weiblichen KO-Mäuse ist wie auch bei den männlichen Mäusen nicht signifikant verändert (Abbildung 32). Die im Vergleich zu den Cre- Mäusen grafisch sichtbare Erhöhung in Teilabbildung B kommt aufgrund eines Ausreißers nach oben zustande, ist in der Statistik jedoch nicht signifikant.

## 4.3 Körpergewicht

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 33) zeigt die Messungen der Körpergewichte der Mausgruppen im Vergleich. Hier lassen sich keine relevanten Unterschiede feststellen. Im Durchschnitt liegt das Körpergewicht der männlichen Tiere bei ca. 27 Gramm und das der weiblichen Mäuse bei etwas über 20 Gramm.

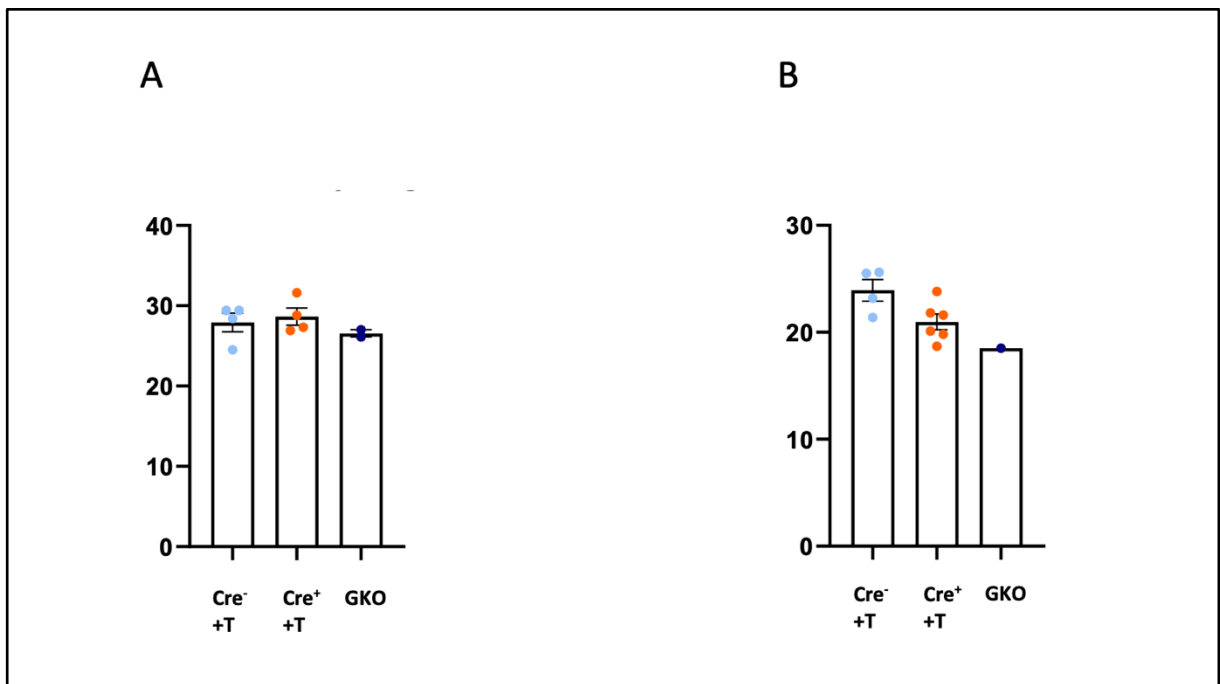


Abb. 33 Körpergewicht der männlichen (A) und weibliche (B) Mäuse. Angaben in Gramm

## 4.4 Gewebe

Die Gewichte der einzelnen Gewebe gemittelt und aufgeteilt in die Geschlechtergruppen wurden ebenfalls ermittelt. Dies diente zum einen der Kontrolle und Entdeckung etwaiger Unregelmäßigkeiten. Zum anderen sollte somit eine Standardisierung erfolgen, sodass nur Mäuse ähnlicher Reife, und somit ähnlicher Organausbildung miteinander verglichen werden. Außerdem war es so möglich, eventuelle Unterschiede v.a. hinsichtlich des Fettgewebes der Experimental- und Kontrollgruppen zu erfassen und gegebenenfalls deren Ursprung zu diskutieren.

Die folgenden Tabellen geben die Gewichtsmessungen der einzelnen Organgewebe direkt nach deren Entnahme wider. Sie zeigen, dass die Gewebe im Durchschnitt gleiche bzw. vergleichbare Werte aufweisen. In der statistischen Analyse waren die Unterschiede nicht signifikant. Wie aus der Tabelle 12 hervorgeht, konnten für die Messungen der weiblichen Mäuse der GKO-Gruppe jeweils nur ein Tier als Vergleich genutzt werden. Die Werte sollten lediglich als grobe Orientierung und Dokumentation etwaiger großer Unregelmäßigkeiten bzw. zur Feststellung möglicher bereits makroskopisch erkennbarer Unterschiede oder Tendenzen dienen. Systematische Unterschiede der Gruppen zueinander konnten allerdings nicht festgestellt werden.

	<b>Cre<sup>-</sup> +T (n=4)</b>	<b>Cre<sup>+</sup> + T (n=6)</b>	<b>Global KO (n=1)</b>
iWAT (mg)	193,9 (±19,84)	170,4 (± 29,95)	136 (± 0)
eWAT (mg)	303,6 (± 50,17)	193,4 (± 40,32)	136 (± 0)
BAT (mg)	58,35 (± 11,59)	43,58 (± 2,83)	33 (± 0)
Gehirn (mg)	463,1 (± 53,59)	445,7 (± 15,48)	418 (± 0)
Herz (mg)	132,8 (±19,86)	113,2 (± 4,8)	117 (± 0)
Leber (g)	0,89 (± 0,047)	1,085 (± 0,039)	1,039 (± 0)

**Tabelle 12 Gewichte der Organe von weiblichen Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM

	<b>Cre<sup>-</sup> +T (n=4)</b>	<b>Cre<sup>+</sup> + T (n=4)</b>	<b>Global KO (n=2)</b>
iWAT (mg)	225,3 (± 13,5)	252,6 (± 28,8)	133 (± 11,0)
eWAT (mg)	273,6 (± 16,23)	307,1 (± 53,61)	202 (± 2,0)
BAT (mg)	74,4 (± 9,325)	68,15 (± 4,751)	40,5 (± 4,5)
Gehirn (mg)	455 (± 8,95)	476,1 (± 4,25)	456 (± 4,0)
Herz (mg)	143,2 (± 5,37)	164 (± 7,4)	153,5 (± 11,5)
Leber (g)	1,581 (± 0,064)	1,501 (± 0,061)	1,496 (± 0,07)

**Tabelle 13 Gewichte der Organe von männlichen Mäusen.** Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM

# Diskussion

## 5.1 Einführung

Adipositas wird als Epidemie des 21. Jahrhunderts beschrieben. Sie hat viele relevante gesundheitliche Konsequenzen, wie die Entstehung chronischer Erkrankungen und Folgeerkrankungen (z.B. Hypertonie, Diabetes mellitus, koronare Herzerkrankungen etc.). Es ist eine große Herausforderung unserer Zeit die Konsequenzen, aber insbesondere die Ursachen zu bekämpfen. Dafür ist es von zentraler Bedeutung die genauen pathophysiologischen Mechanismen und Zusammenhänge zu verstehen, um Angriffspunkte für mögliche Therapien ausfindig zu machen.

Das Fettgewebe nimmt als Regulationsorgan im Rahmen kardiovaskulärer Gesundheit eine entscheidende Funktion ein (Oikonomou and Antoniades, 2019). Da die von ihm sezernierten Hormone und Zytokine sowohl metabolische als auch immunologische Effekte erzielen (Torres et al., 2019), bietet es in diesem Kontext einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt.

In der Vergangenheit hat es einige Untersuchungen zur Rolle der endothelialen NO-Synthase im oben genannten Kontext gegeben. Man weiß bereits, dass sie durch das von ihr produzierte NO in vielerlei Hinsicht einen Beitrag zum Schutz der Gefäße bietet. Dazu gehört der protektive Effekt auf die Intima durch seine antihypertensive, antithrombotische und antiatherosklerotische Wirkung (Förstermann et al., 2017).

Gegenstand der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit ist der Nachweis und die Charakterisierung einer Reduktion der eNOS-Expression im Modell der induzierbaren Adipozyten-spezifischen-eNOS-Knockout Mäuse. Zur Analyse dieses Sachverhaltes wurden etablierte Laborverfahren wie die PCR-Analyse und der Western Blot genutzt. Es wurde ein Mausmodell mit einer induzierbaren Form der Rekombinase gewählt, um eine örtliche (gewebespezifische) und zeitliche Kontrolle des Knockouts gewährleisten zu können. Das Ziel war das gewebespezifische eNOS-KO genauer zu charakterisieren. Dies impliziert seine Spezifität in Bezug auf das Fettgewebe. Des weiteren seine Selektivität bezogen auf die verschiedenen Arten von Fettgewebe und das Ausmaß, also die Effektivität des KOs, das im Vergleich zu einem globalen bzw. keinem KO erreicht werden kann.

Sowohl die Quantifizierung der Western Blots für die männlichen als auch die weiblichen KO-Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion der relativen eNOS-Expression in einigen der untersuchten Gewebetypen. Dies trifft in einem relevanten Maß auf die untersuchten Fettgewebe zu. Hier konnte vor allem im eWAT, iWAT und m-PVAT ein solches signifikantes Ergebnis belegt werden. Für die anderen Adipozyten enthaltenden Gewebe wie das BAT und auch das PVAT der Aorta war keine signifikante Reduktion zu verzeichnen.

## 5.2 Spezifität des Modells

*Das eNOS-KO mittels Adipo-Cre/ER<sup>T2</sup> ist ein Mausmodell mit einer sehr hohen Gewebespezifität*

Die Spezifität beschreibt die Genauigkeit bzw. Zielgerichtetheit des eNOS-KOs in Adipozyten, ohne dass es in den anderen Gewebetypen zu einem KO kommt.

Die generierten Daten und Ergebnisse lassen hierzu eine sehr eindeutige und klare Aussage zu. In keinem der Organe außerhalb des Fettgewebes konnte ein KO von eNOS beobachtet werden (Abb. 25-32). Das heißt die eNOS-Expression ist in Nicht-Adipozyten Zellen wie dem Gehirn, der Leber, dem Herz und der Aorta im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

Es ist daher von einer sehr hohen Gewebespezifität auszugehen.

In unserem Modell haben wir zur Insertion des Rekombinase-Transgens die Promotorregion des Adiponektin-Gens gewählt. Diese wird ausschließlich in Adipozyten aktiviert, was die hohe Spezifität erklärt (Das et al., 2001). Zu demselben Ergebnis kommen auch andere Untersuchungen, die eine adipozyten-spezifische Aktivität der Cre/ER<sup>T2</sup> getestet haben. Auch in diesem Modell konnte keine ektopische Rekombinaseaktivität beobachtet werden (Sassmann et al., 2010).

### 5.3 Selektivität des Modells

*Das induzierbare Adipozyten-spezifische KO-Modell weist eine vornehmlich die weißen Adipozyten betreffende Selektivität auf.*

Ein KO ließ sich nicht in allen Adipozyten bzw. Fettgeweben beobachten. Ursächlich dafür kann eine die Adipozyten betreffende unterschiedliche Selektivität sein. Dies würde zu der Feststellung passen, dass die Adipozyten je nach Lokalisierung oder Fettgewebstyp (siehe BAT, eWAT, iWAT, PVAT etc.) andere genetische Expressionsmuster besitzen.

So ist es sehr wahrscheinlich, dass der gewählte Promotor nicht in allen Adipozyten gleichermaßen aktiviert ist und daher auch im Zuge der Aktivierung bzw. Transkription der Rekombinase nicht als solcher detektiert wird. Diese These wird durch die Studien von Fu et al. und Fujimoto et al. untermauert. Hier wurden für das Adiponektin unterschiedliche Expressionslevels in braunen und weißen Adipozyten nachgewiesen. So wird es z.B. im BAT in geringerer Menge exprimiert als im WAT (Fu et al., 2007, Fujimoto et al., 2005).

Dies erklärt, warum vor allem im BAT kaum ein KO von eNOS zu beobachten war. Das KO-Modell weist demnach das WAT betreffende Selektivität auf.

Zu diesem Ergebnis kam eine andere Forschungsgruppe, die die Rekombination nach Einführung der fusionierten Cre mit dem ER<sup>T2</sup> unter der Kontrolle des Adiponektinpromotors dokumentiert hat. Hier betrug die maximal erreichte Rekombinationsrate im BAT ca. 15%, während andere Organe und Gewebe keinerlei Rekombination vorwiesen (Sassmann et al., 2010).

Es können folglich im Hinblick auch zukünftige Untersuchungen mit diesem Modell hinsichtlich der Funktion von eNOS im Fettgewebe keine generalisierten Aussagen getätigt werden. Sie schließen vor allem Fettgewebe wie das BAT aus.

Wie in den Ergebnissen beschrieben wurde, war im PVAT der Aorta von weiblichen Mäusen (Abb.26) eine Tendenz zur Reduktion der eNOS im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar. Diese erreichte jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau. Es lässt allerdings darauf schließen, dass ein KO zumindest in geringem Maß stattgefunden haben muss.

Daher ist es denkbar, dass eine Reduktion mit statistischer Signifikanz durch eine größere Gruppengröße und einer daraus resultierenden höheren Zahl von

Vergleichswerten erreicht werden könnte. Dies wurde im Rahmen der Vorveröffentlichung der hier präsentierten Daten durch unsere Forschungsgruppe entsprechend getan und konnte belegt werden (Man et al., 2023).

Wie bereits aus der Literaturdiskussion hervorgeht, ist man zu der Erkenntnis gekommen, dass die Aorta (v.a. thorakal) größtenteils von BAT umgeben ist. Seine Progenitorzellen sind andere als die des WATs (Sassmann et al., 2010, Darlington et al., 1998) (Qi et al., 2018). Sie stammen aus den PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/Myf5<sup>+/-</sup> Zellen. Geht man folglich davon aus, dass auch die Expression bzw. Aktivität des Adiponektinpromotors im PVAT dem BAT ähnelt, erklärt sich aus diesem Zusammenhang die beobachtete fehlende bis geringfügige Reduktion von eNOS im PVAT.

Die unterschiedliche Zusammensetzung des t-PVAT im Vergleich zum a-PVAT ist ein weiterer Faktor, welcher bei der Bewertung der Ergebnisse zu betrachten ist. Da es keine strikte Trennlinie zwischen diesen beiden Abschnitten des PVATs gibt, sondern einen fließenden Übergang gibt, ist es denkbar, dass bei der Gewebeaufbereitung Anteile der beiden PVATs der Aorta in die Analytik mit eingeflossen sind. Da das t-PVAT eher aus BAT besteht und das abdominale PVAT aus BAT und WAT würde dies erklären, warum das KO nicht in so eindeutigem Ausmaß wie im eWAT oder iWAT stattgefunden hat.

Das m-PVAT zeigte, wie bereits das eWAT und iWAT eine im Western Blot eindeutig erkennbare und ebenfalls statistisch signifikante Reduktion der eNOS-Expression (Abb. 23/24). Dieses Ergebnis unterstreicht und erhärtet die Erkenntnis, dass es sich beim m-PVAT um eine Form von WAT handelt (Gálvez-Prieto et al., 2008) und spricht des weiteren für die Selektivität in Bezug auf weiße Adipozyten.

## 5.4 Effektivität

*Im WAT betrug die durchschnittliche Reduktion der eNOS-Expression 55% und im m-PVAT 63%*

Die Effektivität beschreibt das Ausmaß bzw. den Faktor, um welchen es zu einem KO in den einzelnen Zelltypen gekommen ist. Für das braune Fettgewebe ist dies nur minimal, da das BAT nicht oder nur in sehr geringem Umfang vom Adipozyten-spezifischen KO erfasst wurde. Im Gegensatz dazu konnte ein sehr effektives KO in den Geweben mit weißen oder beigen Adipozyten beobachtet werden. Hier hat das KO bspw. im eWAT eine Reduktion von eNOS um 40 bis 50% betragen (Abb. 17/18). Im iWAT war die deutlichste Reduktion mit 60-75% (Abb. 19/20) zu verzeichnen, während im m-PVAT die Expression von eNOS sogar um 50-75% reduziert werden konnte.

Warum das KO von eNOS im braunen Fettgewebe nicht signifikant und effektiv erreicht werden konnte, ist vermutlich auf verschiedene Gründe zurückzuführen. Bereits zu Beginn wurde in der Literatur diskutiert, dass das braune Fettgewebe anderen Vorläuferzellen entstammt, als die weißen Adipozyten und eine engere Verwandtschaft zu den Eigenschaften und damit auch dem Expressionsprofil einer Muskelzelle hat (Saely et al., 2012). Daraus ergibt sich die in 5.3 beschriebene Selektivität des Modells zugunsten weißer Adipozyten.

Im PVAT konnte keine effektive Reduktion von eNOS nachgewiesen werden. Im Unterschied zum BAT ist visuell in den Ergebnissen der Western Blots hingegen eine Reduktion erkennbar. Es wird aufgrund seiner Ähnlichkeit (wie aus 2.3.4 und 5.3 hervorgeht) mit dem BAT, nicht oder nur in geringem Maß vom KO erfasst. Da in den weiteren Untersuchungen unserer Forschungsgruppe jedoch ein KO im PVAT nachgewiesen werden konnte (Man et al., 2023), ist zumindest von einer geringeren Effektivität des KO im PVAT der Aorta auszugehen.

Im Unterschied dazu ist eNOS im m-PVAT mit 50% bei den männlichen Tieren und über 75% bei den weiblichen Tieren deutlich und signifikant reduziert.

Die Effektivität des eNOS-KOs korreliert demnach vermutlich mit der unterschiedlichen prozentualen Gewichtung bzw. Zusammensetzung von braunen und weißen

Adipozyten der verschiedenen PVATs (siehe Abb.5) (Pfeifer and Hoffmann, 2015). Je höher der Anteil weißer Adipozyten ist, desto effektiver ist das KO in diesem Gewebe. Die Ergebnisse stehen daher in Einklang mit den Erkenntnissen über die PVATs und deren unterschiedliche Vorläuferzellen und Differenzierungsstimuli, da diese wiederum zu verschiedenen genetischen Expressionsmustern (u.a. des Adiponektins) führen. Auch die Erkenntnis, dass die Gruppe der PVATs relevante Unterschiede in ihrer physiologischen Aktivität aufweisen (van Dam et al., 2017), untermauert diese These.

Das Fettgewebe besteht außerdem neben den Adipozyten aus anderen Zellen wie der SVF zu denen auch Immunzellen gehören. Ein weiterer Einflussfaktor, der die Effektivität des KO bedingt, kann daher auch ein unterschiedliches Verhältnis von Adipozyten zu den Zellen der SVF sein. Letztere werden nicht durch das adipozyten-spezifische KO erfasst (Man et al., 2023). Anzunehmen ist, dass der Grund hierfür ebenso in der fehlenden Expression des Adiponektinpromotors liegt.

## 5.5 Gewicht der eNOS KO-Mäuse

*eNOS außerhalb der Adipozyten hat einen entscheidenderen Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts als die Adipozyten-spezifische eNOS*

Eine weitere Frage, welche von großem Interesse für die zukünftigen Untersuchungen sein wird, ist unsere Beobachtung, dass die Adipozyten-spezifischen eNOS-KO-Mäuse bei ein und derselben Diät (HFD) deutlich weniger an Gewicht im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne KO zunehmen (Man et al., 2023). Es ist anzunehmen, dass eNOS nicht nur die diversen bereits diskutierten Aufgaben erfüllt, sondern zudem einen prominenten bisher unbekanntem Beitrag zur Regulation des Körpergewichts leistet. Insbesondere ist die Frage zu klären, inwiefern sich die Rolle von eNOS in den Adipozyten von eNOS anderer Zelltypen in Bezug auf die Regulation des Körpergewichts unterscheidet und welche genauen molekularen Mechanismen diesen zugrunde liegen.

Aus der Literatur geht hervor, dass es bei Mäusen mit einem globalen eNOS KO zu einer reduzierten metabolischen Rate und damit einhergehend zu einer stärkeren Zunahme von Gewicht kommt (Nisoli et al., 2003). Der Grund dafür ist, dass das von

eNOS produzierte NO einen Einfluss auf die mitochondriale Biogenese hat. Es führt konsekutiv dazu, dass eNOS GKO-Mäuse neben einer reduzierten Mitochondrienzahl, einem geringeren Energieumsatz, einer höheren Insulinresistenz und Gewichtszunahme auch einen Bluthochdruck entwickeln (Nisoli et al., 2003, Shankar et al., 2000, Huang et al., 1995).

Fasst man die oben genannten Beobachtungen zusammen, lässt sich die These aufstellen, dass besonders eNOS außerhalb der Adipozyten der entscheidende Faktor für eine Reduktion bzw. Regulation des Körpergewichts ist und Adipozyten-eNOS sogar einen gegenteiligen Effekt ausübt.

Da die von eNOS modulierten bzw. beeinflussten Faktoren für viele prominente bzw. prävalente Erkrankungen unserer Gesellschaft (s.o.) eine Rolle spielen, sollte es von besonderem Interesse sein, die konkrete Funktion der Adipozyten-eNOS in diesem Kontext zu untersuchen.

Nicht zuletzt gibt es Hinweise auf relevante Unterschiede in der Wirkung von adipozyten-spezifischer eNOS und eNOS anderer Gewebe, die im Hinblick auf mögliche zukünftige Therapien im Bereich Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Adipositas und metabolischem Syndrom einen differenzierten und damit effektiveren Ansatz zulassen würden.

Weitere Erkenntnisse dürften außerdem einen fundamentaleren Einblick in die Pathogenese dieser und einiger weiterer Erkrankungen bieten und für ein umfassenderes Verständnis dieser sorgen. Hier liegt also sehr wahrscheinlich ein äußerst wichtiger Baustein für die weitere wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet vor, den man in folgenden Studienmodellen als Objekt unbedingt beachten sollte.

## 5.6 Limitationen und Fazit

Für manche der Gewebe, vor allem die Adipozyten enthaltenden Gewebe, mussten die Western Blots vielfach wiederholt werden, da die Ergebnisse teilweise inkonstant waren. Aus vorherigen Studien ist diese Problematik beim Western Blot mit Fettgewebe bereits bekannt.

Als interne Kontrolle und Vergleichswert beim Western Blot diente das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Tubulin. In jeder Zelle sollten diese internen Kontrollen in demselben Maß vorhanden sein. Ist dies der Fall, bieten sie einen recht zuverlässigen Indikator dafür, dass die Ergebnisse für das zu untersuchende Protein (in diesem Fall eNOS) vergleichbare Werte liefern. Die Gründe warum die inkonstanten Ergebnisse im Western Blot bevorzugt bei den Adipozyten zu beobachten waren, können divers sein.

Bei der BCA-Messung der Fettgewebe war zu beobachten, dass die Konzentrationen an Protein deutlich stärker schwankten als bei den anderen Geweben. Zudem gab es ein standardisiertes Protokoll für die Verarbeitung und Messung der Vergleichsgewebe, allerdings nicht für das Fettgewebe.

Es ist bekannt, dass die optimale Probenvorbereitung sehr stark abhängig von ihrer biologischen Herkunft, dem Gewebe oder zu untersuchenden Zellkompartiment variiert (Hnasko and Hnasko, 2015). Obwohl unsere Arbeitsgruppe seit einigen Jahren Untersuchungen an Adipozyten unternimmt, scheint die Konstanz der Ergebnisse gerade im Western Blot bei diesen Geweben eine Herausforderung darzustellen. Bereits die Herstellung des Proteinlysats der Adipozyten enthaltenden Gewebe ist aufwändiger und bedarf mehrerer Schritte, im Vergleich zu anderen Geweben.

Ein denkbarer Erklärungsansatz bzgl. der Inkonzanz bei der BCA-Messung, ist die durch die Lipide entstehende veränderte Brechung des Lichts. Da die Messung auf einer spektrophotometrischen Erkennung der Dunkelheit bzw. Farbe des Proteinlysats beruht, ist der Brechindex der zu untersuchenden Substanz eine relevante Größe. Da die Referenzwerte und die Standardkurve auf Messungen mit Wasser beruhen, ist dies ein nicht zu vernachlässigender Faktor. Auch wenn die Ergebnisse der  $\beta$ -Tubulin-Bande nicht vollkommen identische Konzentrationen aufwiesen, habe ich versucht die Validität der Ergebnisse für den Vergleich der eNOS-Konzentration durch multiple Wiederholungen eine möglichst genaue Annäherung der Werte zu erreichen.

Ein weiterer Punkt, der zu bedenken ist, ist der geringe Erfahrungswert, welchen ich selbst mit der Methode habe. Vielfach mussten Experimente wiederholt werden, da es zu Ungenauigkeiten beim Pipettieren oder Messungen gekommen ist. Die Zeit zum Erlernen und auch die Anzahl an verfügbaren Tieren war begrenzt und stellt daher auch am Ende der Versuchsreihe eine weitere potenzielle Fehlerquelle dar. Dies wäre eine Stellschraube, durch welche sich noch eindeutiger und konstantere Ergebnisse (oder mit geringerer Streuung) produzieren ließen.

Die genannten Nachteile, die die Methode des Western Blots mit sich bringt, bieten immer auch Ansatzpunkte für mögliche Optimierungsvorschläge. Es wäre z.B. sinnvoll, ein separates Protokoll für die Untersuchungen von Fettgeweben zu etablieren, das für eine konstantere und dadurch verlässlichere Datengenerierung sorgen könnte.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit nahe, dass durch das Modell des induzierbaren Adipozyten-spezifischen eNOS-KOs eine signifikante und vor allem relevante, sowie spezifische Elimination von eNOS vorrangig in den weißen Adipozyten gewährleistet werden kann.

Die gewonnenen Ergebnisse offenbaren klare Tendenzen und in einigen Fällen eindeutige Aussagen zur Gewebeselektivität und Spezifität sowie zur Effektivität, welche das KO näher charakterisieren. Sie bieten in diesem Zuge eine gute Grundlage für funktionelle Tests.

## Zusammenfassung

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit hat sich mit der Charakterisierung der eNOS-Expression in verschiedenen Organen und Geweben der Adipozyten-spezifischen eNOS-Knockout-Mäuse auseinandergesetzt.

Mäuse mit geflochten eNOS-Allelen, sowie Mäuse mit einer fusionierten Cre Rekombinase wurden hierfür miteinander verpaart. So entstanden die eNOS<sup>fl/fl</sup> Cre<sup>+</sup> Mäuse, welche nach Induktion durch Tamoxifen im Alter von etwa 6 Wochen ein adipozyten-spezifisches KO ausbilden sollten.

Die Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt, Aufschluss über die Möglichkeit eines solchen KOs oder einer Reduktion der eNOS-Expression zu geben und diese genauer zu beschreiben und quantifizieren. In diesem Zuge wurde vor allem ein Augenmerk auf die Spezifität, Selektivität sowie Effektivität des Modells gelegt. Zum Vergleich und als Kontrolle dienten Mäuse mit einem globalen eNOS-Knockout und Mäuse, welche zwar geflocht waren und eine Tamoxifeninjektion erhielten, jedoch kein Gen für die Cre Rekombinase besaßen. Außerdem wurden Gewebe wie das Gehirn, das Herz, die Leber und die Aorta auch mittels Western Blot untersucht, um ein ektopes KO ausschließen zu können. Zu Beginn der Untersuchung wurde eine PCR-Analyse durchgeführt, um die Tiere zu genotypisieren.

Die Experimente haben gezeigt, dass es aufgrund der sehr hohen Gewebespezifität des gewählten Promotors nicht zu einem ektopem KO von eNOS gekommen ist. Die eNOS-Expressionsniveaus in den Geweben, die kein Fettgewebe sind, entsprachen jenen der Mäuse ohne Rekombinase. Demgegenüber stand eine die weißen Adipozyten betreffende Selektivität des KO-Modells. Im BAT wie auch im PVAT der Aorta konnten jeweils nur sehr geringe und nicht signifikante Unterschiede in der eNOS-Expression beobachtet werden.

Es wurde darüber diskutiert, wie mögliche Unterschiede in den Gewebetypen zustande kommen konnten. Zum Beispiel durch den unterschiedlichen Aktivitätszustand des Promotors von Adiponektin und in diesem Zusammenhang auch die Entwicklung der Zellen aus verschiedenen Vorläuferzellen.

Außerdem konnten bereits durch die Beobachtung der Körpergewichtsentwicklung von eNOS-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen Rückschlüsse auf dessen Funktion oder Einfluss auf die Regulation des Körpergewichts gezogen werden.

Die Ergebnisse lassen zu, dass das Modell sehr gut für eine spätere präzise Charakterisierung des Einflusses der Adipozyten-spezifischen eNOS auf bestimmte kardiovaskuläre sowie metabolische Funktionen und Prozesse, wie z.B. den Sauerstoffbedarf, die Glucosetoleranz oder die Relaxationsfähigkeit von Gefäßen, genutzt werden kann. Zudem lässt sich hiermit eine Differenzierung zur Funktion von eNOS, welche außerhalb der Adipozyten gelegen ist vornehmen und auch Rückschlüsse auf dessen Rolle vornehmen.

Die Erkenntnisse, welche durch dieses neue Mausmodell im weiteren Verlauf gewonnen werden können, liefern relevante Informationen und daraus resultierende Pharmakologische Targets für eine individualisiertere/spezialisiertere und zielgerichtete Therapie vieler v.a. kardiovaskulärer Erkrankungen, welche u.a. mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind.

## Danksagung

Ich danke zuallererst Prof. Huige Li für die außerordentliche Betreuung im Verlauf des Erstellens dieser Arbeit. Durch ihn habe ich sowohl hilfreiche Kritik, als auch spannende Ideen, zielführende Anregungen und stets ein mich begleitendes Korrektiv erhalten. Er hat mich durchweg für die Arbeit begeistert, motiviert und mir somit eine Freude und ein Interesse für den Bereich der Forschung mitgeben können.

Für die Betreuung möchte ich außerdem Andy und Eva danken, die mir durch ihre Fachexpertise, ihr schnelles und zielstrebiges Arbeiten sowie ihre praktische Unterstützung eine enorme Hilfe dargestellt haben.

Ebenfalls möchte ich Gisela Reifenberg für die geduldige Einführung in die zahlreichen praktischen Tätigkeiten und die vielen hilfreichen Tipps bei der Durchführung der Experimente bedanken. Ihre Unterstützung, Ermunterung, Motivation und Fachkenntnis waren für mich von enormer Bedeutung und haben die Arbeit sehr erleichtert und vorangetrieben.

Ich danke Dr. Ning Xia für die Begleitung bei der Organisation und dem Planen der Tierversuche.

Zu guter Letzt möchte ich gerne noch meinen Eltern danken, die mich fortwährend in jeglichen Situationen unterstützen und motivieren und in jeder Lage die engsten und vertrautesten Ansprechpartner sind und dies auch weiterhin sein werden. Sie ermöglichen mir meine Ressourcen zielführend und vielseitig einsetzen zu können und sind daher durchweg eine unverzichtbare Bereicherung für mich.

## Lebenslauf

**Name:** Alica Maria Helena Camp  
**Geburtstag, -Ort:** 15. Oktober 1998, Bonn

### Ausbildung

**2004 – 2008:** Maria-Montessori-Grundschule Bonn - Dottendorf  
**2008 – 2016:** Erzbischöfliche Liebfrauenschule Bonn Abschluss: allgemeine Hochschulreife  
**2017 SoSe – 2023/24 WiSe:** Johannes-Gutenberg-Universität Mainz Studium der Humanmedizin Abschluss: Staatsexamen

### Berufliche Laufbahn

**2016 Juni - 2016 August:** Schneiders Obsthof Verkaufsaushilfe  
**2018 April - 2020 Juni:** AHS Hochschulport Mainz (Tennisschule Ohanka) Tennistrainerin  
**2019 Oktober - 2020 Oktober:** Universitätsmedizin Mainz Pflegehelferin  
**2022 Mai – 2023 Mai:** TC Blau-Weiß Mainz Tennistrainerin

### Praktika

**Juni 2013:** Tierarztpraxis Dr. Guido Müller Bonn  
**Januar 2014:** Sozialpraktikum Kindertagesstätte Bonn  
**August 2016:** Deutsche Luft- und Raumfahrt (Abteilung Raumfahrtmedizin) Köln  
**August - Oktober 2016:** University of Toledo Medical College  
**November 2016 - Januar 2017:** Pflegepraktikum Petruskrankenhaus Bonn

<b>März 2017:</b>	Praxis Dr. Grüß, Allgemeinmedizin und TCM
<b>September 2019:</b>	Famulatur, University of Toledo Medical College, Notfallambulanz
<b>März 2020:</b>	Famulatur, Hausarztpraxis Dr. Vojdani, Bonn
<b>September 2020:</b>	Famulatur, Klinik Favoriten Wien, Station Gynäkologie
<b>Oktober 2020:</b>	Famulatur, Immanuelkrankenhaus Berlin, Station Naturheilkunde/ Rheumatologie
<b>Februar 2022:</b>	Famulatur, Immanuelkrankenhaus Berlin, Station Naturheilkunde/Innere Medizin
<b>November 2023 - März 2023:</b>	Praktisches Jahr Tertial Universitätsmedizin Mainz
<b>März 2023 – Juli 2023:</b>	Praktisches Jahr Tertial Kantonspital St.Gallen

## Projekte & Ehrenamtliche Tätigkeiten

<b>2010 – 2013:</b>	Klavierkonzerte in Altenheimen
<b>2012- 2016:</b>	Eine-Welt-AG der Liebfrauenschule Bonn
<b>2013 – 2016:</b>	Schulsanitätsdienst
<b>2015:</b>	Schülermanager des Jungen Beethovenfestes Bonn
<b>2017 – 2019:</b>	Fachschaft Medizin Vorklinik
<b>2019 – heute:</b>	Bvmd (Bundesvertretung der Medizinstudierenden Deutschlands) Projektleitung "Wissenshunger Mainz"
<b>2021 – 2023:</b>	Bundesleitung Wissenshunger

## Publikationen

1. Andy W C Man, Yawen Zhou, Gisela Reifenberg, Alica Camp, Thomas Münzel, Andreas Daiber, Ning Xia, Huige Li. **Deletion of adipocyte NOS3 potentiates high-fat diet-induced hypertension and vascular remodelling via chemerin** *Cardiovascular Research*, 2023; 119(17): 2755-69, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad164>

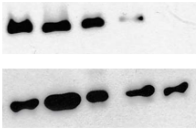
## Anhang

Originale Blots mit Proben der männlichen Mäuse gefolgt von denen der weiblichen Mäuse

# Ewat

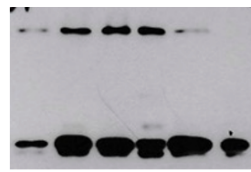
7861-7766-7706-7705-7839 (2.2.21.)

2 3 4 5 6



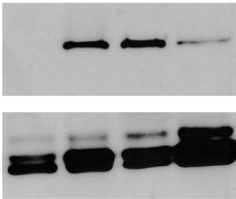
7858-7909-7907-7834 (9.3.21.)

2 3 4 5 6



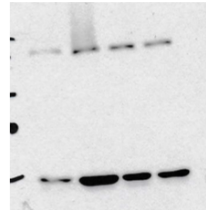
7838-7857-7906-7791 (1.3.21.)

6 3 4 5



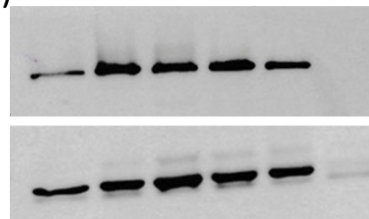
7861-7767-7012-7044 (8.2.21.)

2 3 4 5



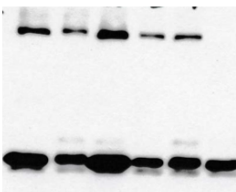
J3-7910-7856-7915-7916-7838 (1.3.21.)

1 2 3 4 5 6



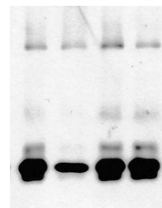
J4-7861-7766-7012-7044-7839 (17.3.21.)

1 2 3 4 5 6



7858-7768-7048-7093 (14.4.21.)

2 3 4 5

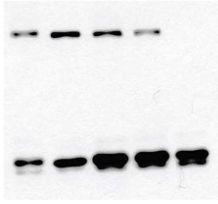


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Iwat

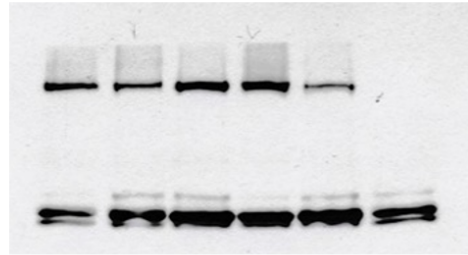
7861-7768-7048-7093-7838 (3.2.21.)

2 3 4 5 6



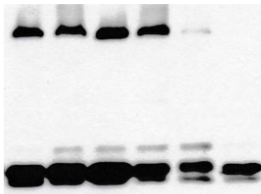
J3-7910-7767-7012-7044-7839 (31.3.21.)

1 2 3 4 5 6



J4-7858-7766-7706-7705-7839 (17.3.21.)

1 2 3 4 5 6



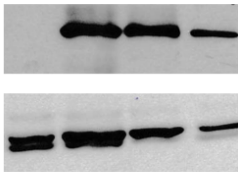
7768-7048-7093 (15.2.21.)

3 4 5



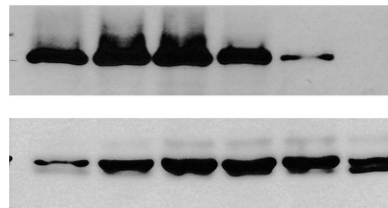
7838-7857-7906-7791 (1.3.21.)

6 3 4 5



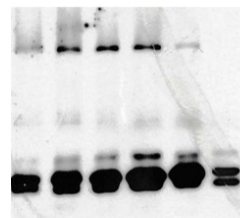
J3-7910-7856-7915-7916-7838 (1.3.21.)

1 2 3 4 5 6



J3-7858-7909-7907-7834-7839 (14.4.21.)

1 2 3 4 5 6

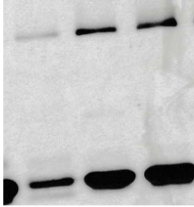


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Aorta

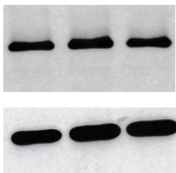
7857-7906-7791 (3.3.21)

3 4 5



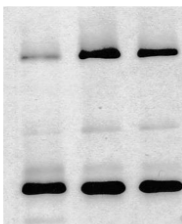
7767-7012-7044 (24.2.21.)

3 4 5



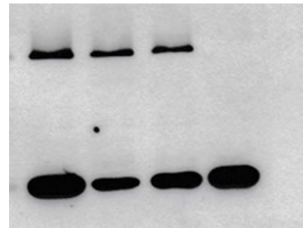
7856-7915-7916 (4.3.21)

3 4 5



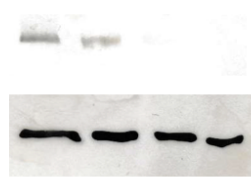
7766-7706-7705-7838 (24.2.21.)

3 4 5 6



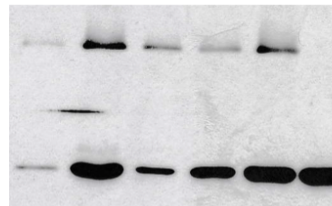
7768-7915-7916-KO (27.4.21)

3 4 5 6



J3-7858-7909-7907-7834-7839 (10.3.21)

1 2 3 4 5 6

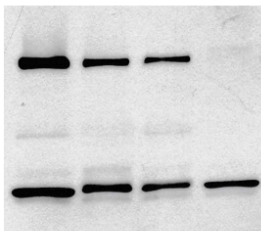


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# MA-PVAT

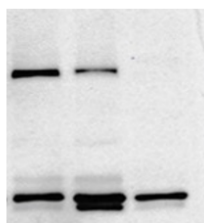
7861-7915-7834-7839 (8.4.21)

2 4 5 6



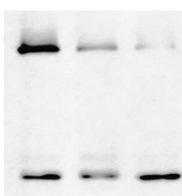
7915-7791-7839 (8.4.21)

4 5 6



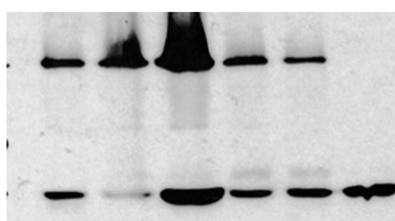
7856-7915-7916 (4.3.21)

3 4 5



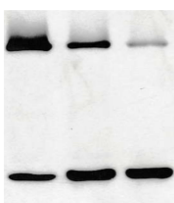
J4-7858-7766-7706-7705-7838 (24.2.21)

1 2 3 4 5 6



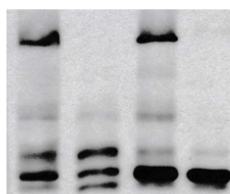
7768-7048-7093 (4.3.21)

3 4 5



7909-7907-7834-7839 (10.3.21)

3 4 5 6



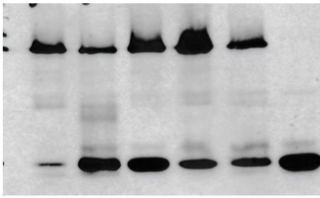
- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# PVAT

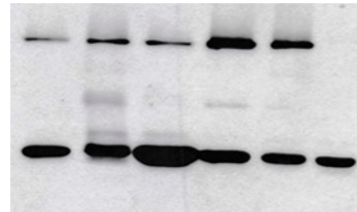
J3-7858-7909-7907-7834-7839 (10.3.21)

J4-7858-7766-7706-7705-7838 (24.2.21)

1 2 3 4 5 6

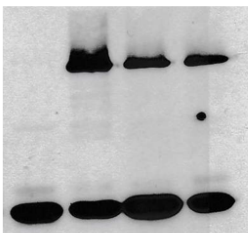


1 2 3 4 5 6



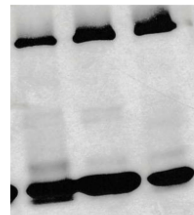
7838-7767-7012-7044 (24.2.21)

6 3 4 5



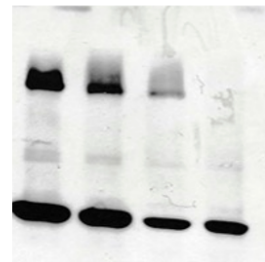
7857-7906-7791 (3.3.21)

3 4 5



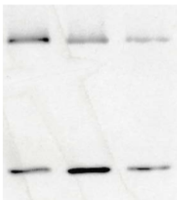
(6.4.22)

3 4 5 6



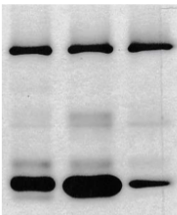
7768-7048-7093 (4.3.21)

3 4 5



7856-7915-7916 (4.3.21)

3 4 5

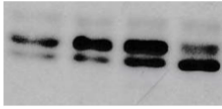
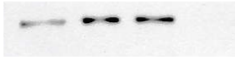


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ + Tam
- 6: eNOS Global KO

# Liver

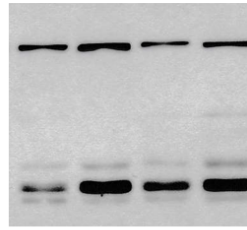
7768-7048-7093-7838 (3.2.21)

3 4 5 6



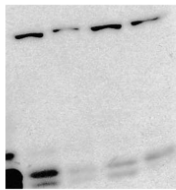
7910-7857-7915-7916 (2.3.21)

2 3 4 5



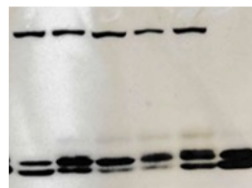
7861-7767-7012-7044 (8.2.21)

2 3 4 5



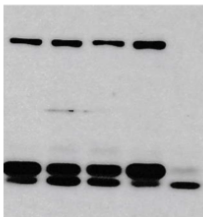
J4-7858-7766-7706-7705-KO (3.5.21)

1 2 3 4 5 6



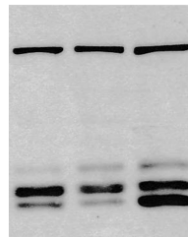
7858-7909-7907-7834-7839 (9.3.21)

2 3 4 5 6



7857-7906-7791 (2.3.21)

3 4 5

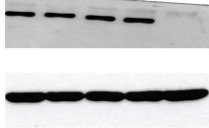


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Brain

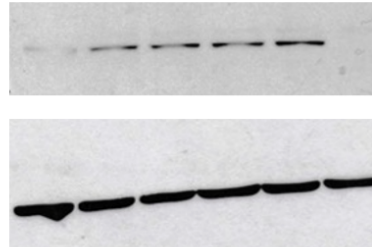
7861-7768-7048-7093-7838 (3.2.21)

2 3 4 5 6



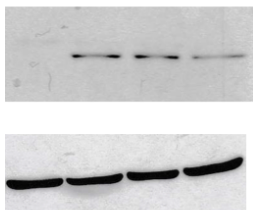
J3-7910-7857-7915-7916-7838 (2.3.21)

1 2 3 4 5 6



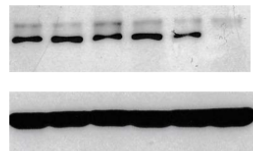
7838-7857-7906-7791 (2.3.21)

6 3 4 5



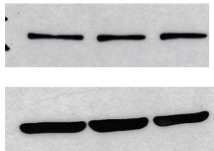
J3-7858-7766-7706-7705-7838 (17.2.21)

1 2 3 4 5 6



7909-7907-7834 (9.3.21)

3 4 5

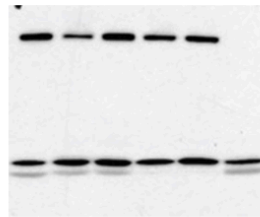


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Heart

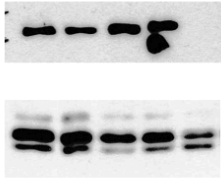
J4-7861-7766-7012-7044-7838 (17.3.21)

1 2 3 4 5 6



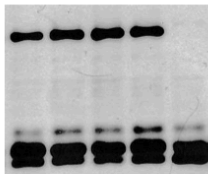
7861-7768-7048-7093-7838 (2.2.21)

2 3 4 5 6



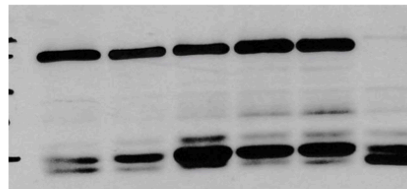
7858-7766-7706-7705-7838 (17.2.21)

2 3 4 5 6



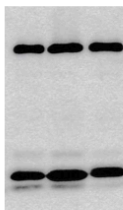
J3-7910-7856-7915-7916-7838 (1.3.21)

1 2 3 4 5 6



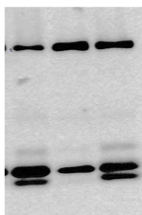
7909-7907-7834 (23.3.21)

3 4 5



7857-7906-7791 (23.3.21)

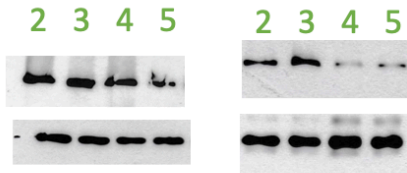
3 4 5



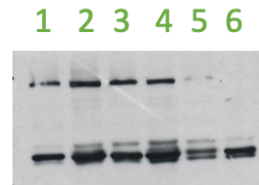
- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Ewat

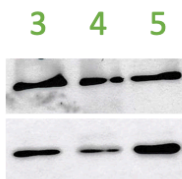
7761-7762-7681-7682 (21.1./27.1.21)



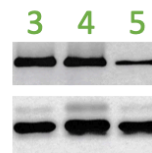
WT-7-28-9-30-KO (3.11.21)



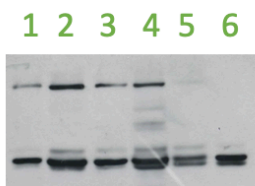
7858-7681-7805 (16.3.21)



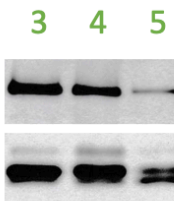
7757-7681-7995 (15.3.21)



WT-12-23-14-25-KO (4.11.21)



7859-7681-7994 (15.3.21)

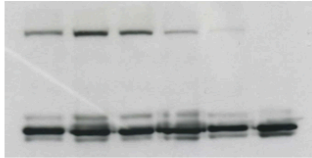


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Iwat

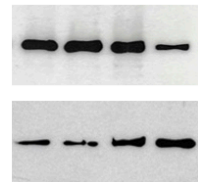
WT-7-28-9-30-KO (3.11.21)

1 2 3 4 5 6



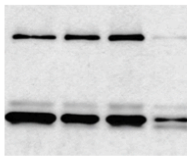
7761-7762-7681-7682 (21.1.21)

2 3 4 5



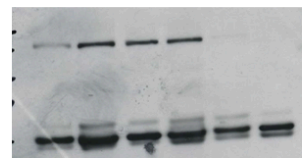
7761-7757-7681-7995 (15.3.21)

2 3 4 5



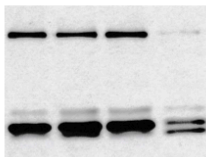
WT-12-23-14-25-KO (4.11.21)

1 2 3 4 5 6



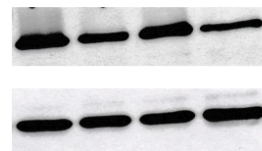
7761-7859-7681-7994 (15.3.21)

2 3 4 5



7761-7858-7681-7805 (16.3.21)

2 3 4 5

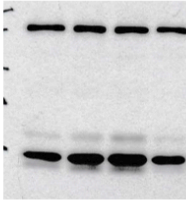


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# BAT

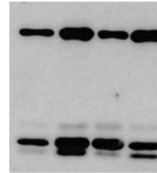
7761-7762-7681-7682 (25.1.21)

2 3 4 5



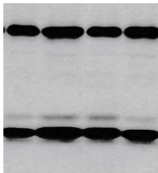
7761-7859-7681-7994 (15.3.21)

2 3 4 5



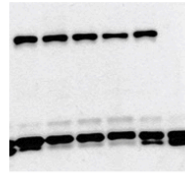
7761-7757-7681-7995 (15.3.21)

2 3 4 5



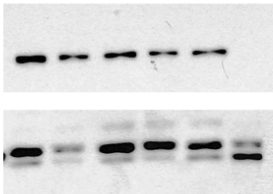
8133-7761-7836-7681-8056-KO (12.4.21)

1 2 3 4 5 6



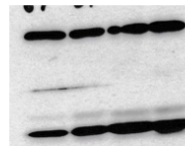
8134-7761-7837-7681-8057-Ko (13.4.21)

1 2 3 4 5 6



7761-7681-7858-7805 (16.3.21)

2 4 3 5



1: WT: (C57B16/J)

2: Exp-control: (fl/fl) Cre-

3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+

4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam

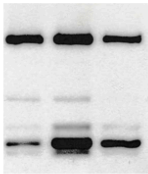
5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam

6: eNOS Global KO

# MA-PVAT

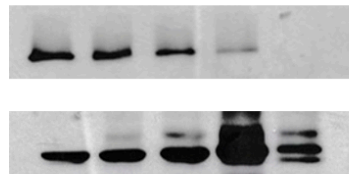
7762-7681-7682 (21.1.21)

3 4 5



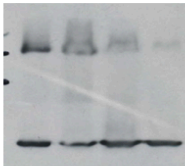
WT-17-29-25 (9.3.22)

1 2 4 5 6



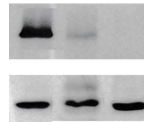
7-8-9-10 (10.11.21)

2 3 4 5



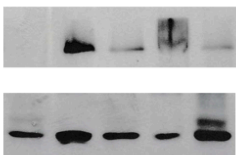
28-30-KO (9.3.22)

3 5 6



15-WT-17-18-19 (9.3.22)

5 1 2 3 4

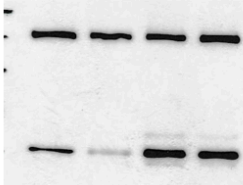


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# PVAT

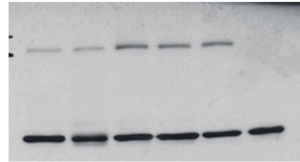
7761-xx-7681-7682 (21.1.21)

2 xx 4 5



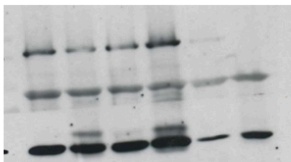
J3-2-3-29-30-KO (3.11.21)

1 2 3 4 5 6



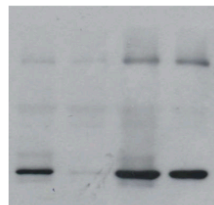
WT-12-13-14-15-KO (9.11.21)

1 2 3 4 5 6



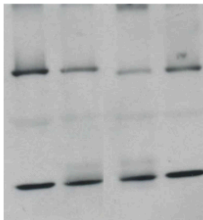
12-xx-14-25 (10.11.21)

2 xx 4 5



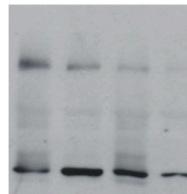
WT-7-30-9 (9.11.21)

1 2 5 4



7-8-9-10 (10.11.21)

2 3 4 5

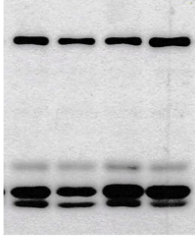


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Heart

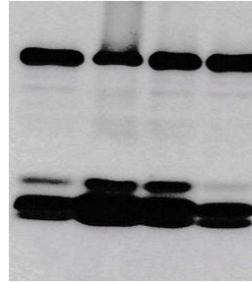
7761-7762-7681-7682 (25.1.21)

2 3 4 5



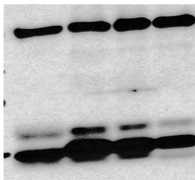
7761-7859-7681-7994 (15.3.21)

2 3 4 5



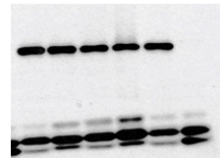
7761-7858-7681-7805 (16.3.21)

2 3 4 5



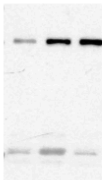
8133-7761-7836-7681-8056-KO (12.4.21)

1 2 3 4 5 6



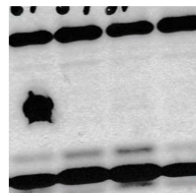
7837-7681-8057 (13.4.21)

3 4 5



7761-7957-7681-7995 (16.3.21)

2 3 4 5

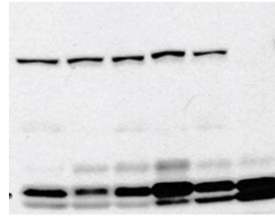


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Liver

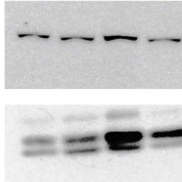
8133-7761-7836-7681-8056-KO (12.4.21)

1 2 3 4 5 6



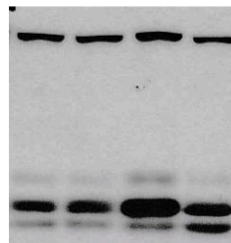
7761-7762-7681-7682 (25.1.21)

2 3 4 5



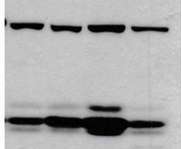
7761-7859-7681-7994 (15.3.21)

2 3 4 5



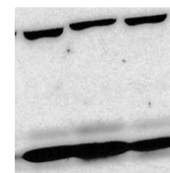
7761-7757-7681-7995 (15.3.21)

2 3 4 5



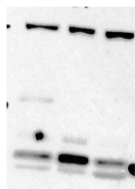
7858-7681-7805 (16.3.21)

3 4 5



7837-7681-8057 (13.4.21)

3 4 5

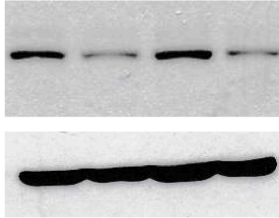


- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Brain

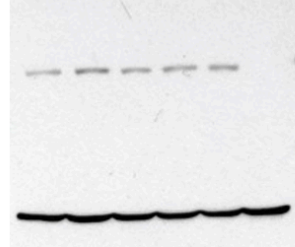
7761-7762-7681-7682 (25.1.21)

2 3 4 5



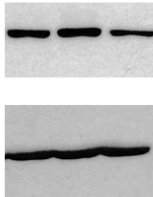
8134-7761-7836-7681-8056-Ko (13.4.21)

1 2 3 4 5 6



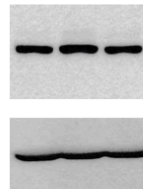
58-81-05 (23.3.21)

3 4 5



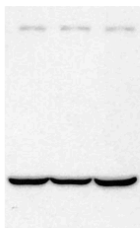
57-81-95 (23.3.21)

3 4 5



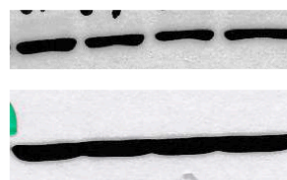
7837-7681-8057 (13.4.21)

3 4 5



7761-7859-7681-7994 (16.3.21)

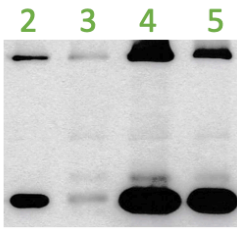
2 3 4 5



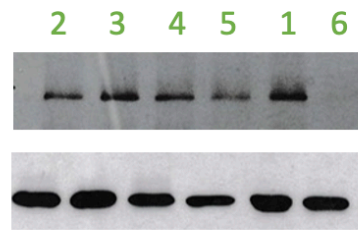
- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# Aorta

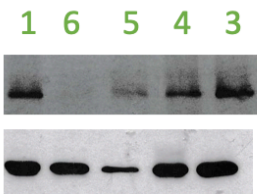
7761-7762-7681-7682 (8.3.21)



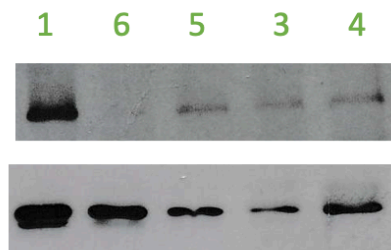
12-13-14-15-WT-KO (10.3.22)



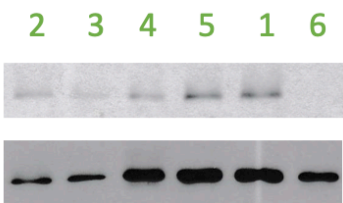
WT-KO-20-19-18 (10.3.22)



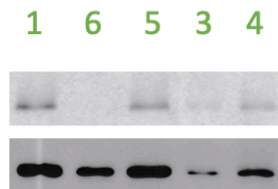
WT-KO-25-8-14 (10.3.22)



7-28-9-30-WT-KO (10.3.22)



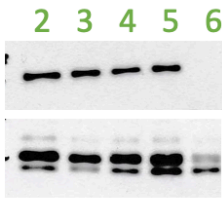
WT-KO-10-8-14 (10.3.22)



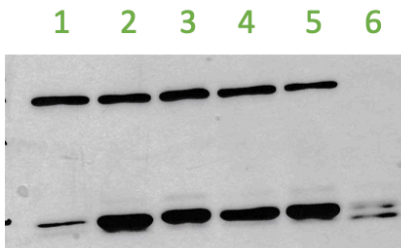
- 1: WT: (C57B16/J)
- 2: Exp-control: (fl/fl) Cre-
- 3: eNOS KO: (fl/fl) Cre+
- 4: Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam
- 5: eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam
- 6: eNOS Global KO

# BAT

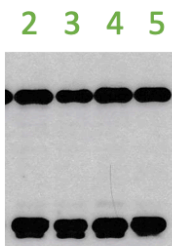
7861-7768-7048-7093-7838 (3.2.21.)



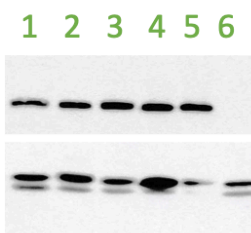
7910-7856-7916-7838 (1.3.21.)



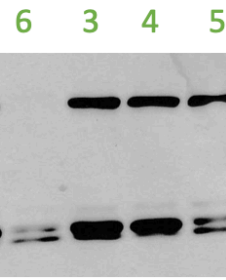
7858-7909-7907-7834 (9.3.21.)



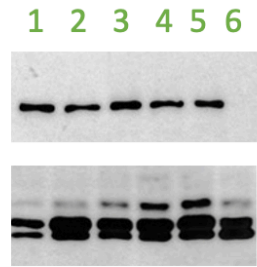
J4-7861-7766-7012-7044-7839 (17.3.21.)



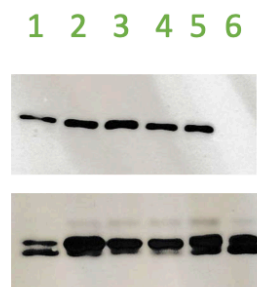
7838-7857-7906-7791 (1.3.21.)



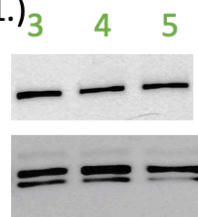
J3-7858-7766-7706-7705-7838 (17.2.21.)



J4-7858-7766-7706-7705-KO (3.5.21.)



7767-7048-7044 (31.3.21.)



- |    |                                 |
|----|---------------------------------|
| 1: | WT: (C57B16/J)                  |
| 2: | Exp-control: (fl/fl) Cre-       |
| 3: | eNOS KO: (fl/fl) Cre+           |
| 4: | Exp-control: (fl/fl) Cre- + Tam |
| 5: | eNOS KO: (fl/fl) Cre+ +Tam      |
| 6: | eNOS Global KO                  |

## Referenzen

- AHIMA, R. S. & LAZAR, M. A. 2008. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol*, 22, 1023-31.
- AHMADIEH, S., KIM, H. W. & WEINTRAUB, N. L. 2020. Potential role of perivascular adipose tissue in modulating atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*, 134, 3-13.
- AKOUMIANAKIS, I., TARUN, A. & ANTONIADES, C. 2017. Perivascular adipose tissue as a regulator of vascular disease pathogenesis: identifying novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol*, 174, 3411-3424.
- ALEXOPOULOS, N., KATRITSIS, D. & RAGGI, P. 2014. Visceral adipose tissue as a source of inflammation and promoter of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 233, 104-12.
- ALMABROUK, T. A., EWART, M. A., SALT, I. P. & KENNEDY, S. 2014. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *Br J Pharmacol*, 171, 595-617.
- ALMABROUK, T. A. M., UGUSMAN, A. B., KATWAN, O. J., SALT, I. P. & KENNEDY, S. 2017. Deletion of AMPK $\alpha$ 1 attenuates the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and reduces adiponectin release. *Br J Pharmacol*, 174, 3398-3410.
- ANGHEL, S. I. & WAHLI, W. 2007. Fat poetry: a kingdom for PPAR $\gamma$ . *Cell Research*, 17, 486-511.
- ANGUEIRA, A. R., SAKERS, A. P., HOLMAN, C. D., CHENG, L., ARBOCCO, M. N., SHAMSI, F., LYNES, M. D., SHRESTHA, R., OKADA, C., BATMANOV, K., SUSZTAK, K., TSENG, Y. H., LIAW, L. & SEALE, P. 2021. Defining the lineage of thermogenic perivascular adipose tissue. *Nat Metab*, 3, 469-484.
- ANTONOPOULOS, A. S., LEE, R., MARGARITIS, M. & ANTONIADES, C. 2011. Adiponectin as a regulator of vascular redox state: therapeutic implications. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 6, 78-88.
- ANTONOPOULOS, A. S., MARGARITIS, M., COUTINHO, P., SHIRODARIA, C., PSARROS, C., HERDMAN, L., SANNA, F., DE SILVA, R., PETROU, M., SAYEED, R., KRASOPOULOS, G., LEE, R., DIGBY, J., REILLY, S., BAKOGIANNIS, C., TOUSOULIS, D., KESSLER, B., CASADEI, B., CHANNON, K. M. & ANTONIADES, C. 2015. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes*, 64, 2207-19.
- ATIT, R., SGAIER, S. K., MOHAMED, O. A., TAKETO, M. M., DUFORT, D., JOYNER, A. L., NISWANDER, L. & CONLON, R. A. 2006.  $\beta$ -catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Developmental Biology*, 296, 164-176.
- BALTIERI, N., GUIZONI, D. M., VICTORIO, J. A. & DAVEL, A. P. 2018. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. *Front Physiol*, 9, 229.
- BARQUISSAU, V., BEUZELIN, D., PISANI, D. F., BERANGER, G. E., MAIRAL, A., MONTAGNER, A., ROUSSEL, B., TAVERNIER, G., MARQUES, M. A., MORO, C., GUILLOU, H., AMRI, E. Z. & LANGIN, D. 2016. White-to-brite conversion in human adipocytes promotes metabolic reprogramming towards fatty acid anabolic and catabolic pathways. *Mol Metab*, 5, 352-365.
- BARTELT, A. & HEEREN, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 24-36.
- BENSON, M. A., BATCHELOR, H., CHUAIPHICHA, S., BAILEY, J., ZHU, H., STUEHR, D. J., BHATTACHARYA, S., CHANNON, K. M. & CRABTREE, M. J. 2013. A pivotal role for tryptophan 447 in enzymatic coupling of human endothelial nitric oxide synthase (eNOS): effects on tetrahydrobiopterin-dependent catalysis and eNOS dimerization. *J Biol Chem*, 288, 29836-45.

- BOO, Y. C., HWANG, J., SYKES, M., MICHELL, B. J., KEMP, B. E., LUM, H. & JO, H. 2002a. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283, H1819-H1828.
- BOO, Y. C., SORESCU, G., BOYD, N., SHIOJIMA, I., WALSH, K., DU, J. & JO, H. 2002b. Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase at Ser1179 by Akt-independent Mechanisms: ROLE OF PROTEIN KINASE A\*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 3388-3396.
- BOSTRÖM, P., WU, J., JEDRYCHOWSKI, M. P., KORDE, A., YE, L., LO, J. C., RASBACH, K. A., BOSTRÖM, E. A., CHOI, J. H., LONG, J. Z., KAJIMURA, S., ZINGARETTI, M. C., VIND, B. F., TU, H., CINTI, S., HØJLUND, K., GYGI, S. P. & SPIEGELMAN, B. M. 2012. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481, 463-8.
- BOUABE, H. & OKKENHAUG, K. 2013. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*, 1064, 315-36.
- BRITTON, K. A., PEDLEY, A., MASSARO, J. M., CORSINI, E. M., MURABITO, J. M., HOFFMANN, U. & FOX, C. S. 2012. Prevalence, distribution, and risk factor correlates of high thoracic periaortic fat in the Framingham Heart Study. *J Am Heart Assoc*, 1, e004200.
- BROWN, N. K., ZHOU, Z., ZHANG, J., ZENG, R., WU, J., EITZMAN, D. T., CHEN, Y. E. & CHANG, L. 2014a. Perivascular Adipose Tissue in Vascular Function and Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34, 1621-1630.
- BROWN, N. K., ZHOU, Z., ZHANG, J., ZENG, R., WU, J., EITZMAN, D. T., CHEN, Y. E. & CHANG, L. 2014b. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34, 1621-30.
- BUEMANN, B., ASTRUP, A., PEDERSEN, O., BLACK, E., HOLST, C., TOUBRO, S., ECHWALD, S., HOLST, J. J., RASMUSSEN, C. & SØRENSEN, T. I. 2006. Possible role of adiponectin and insulin sensitivity in mediating the favorable effects of lower body fat mass on blood lipids. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 1698-704.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2004a. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, 84, 277-359.
- CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2004b. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84, 277-359.
- CARR, A. & FREI, B. 2000. The role of natural antioxidants in preserving the biological activity of endothelium-derived nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 28, 1806-14.
- CARVAJAL, J. A., GERMAIN, A. M., HUIDOBRO-TORO, J. P. & WEINER, C. P. 2000. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of cellular physiology*, 184, 409-420.
- CAWTHORN, W. P., SCHELLER, E. L. & MACDOUGALD, O. A. 2012. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, 53, 227-46.
- CHANDLER, K. J., CHANDLER, R. L., BROECKELMANN, E. M., HOU, Y., SOUTHARD-SMITH, E. M. & MORTLOCK, D. P. 2007. Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression. *Mammalian Genome*, 18, 693-708.
- CHANG, L., GARCIA-BARRIO, M. T. & CHEN, Y. E. 2020. Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40, 1094-1109.
- CHANG, L., VILLACORTA, L., LI, R., HAMBLIN, M., XU, W., DOU, C., ZHANG, J., WU, J., ZENG, R. & CHEN, Y. E. 2012. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation*, 126, 1067-78.
- CHEN, J., KUHNLENCORDT, P. J., ASTERN, J., GYURKO, R. & HUANG, P. L. 2001. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development

- of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation*, 104, 2391-4.
- CHEN, P. F. & WU, K. K. 2000. Characterization of the roles of the 594-645 region in human endothelial nitric-oxide synthase in regulating calmodulin binding and electron transfer. *J Biol Chem*, 275, 13155-63.
- CHO, S. W., KIM, S., KIM, J. M. & KIM, J.-S. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31, 230-232.
- CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A. & ZHANG, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-23.
- CONTRERAS, G. A., THELEN, K., AYALA-LOPEZ, N. & WATTS, S. W. 2016. The distribution and adipogenic potential of perivascular adipose tissue adipocyte progenitors is dependent on sexual dimorphism and vessel location. *Physiol Rep*, 4.
- CORTESE-KROTT, M. M., SUVORAVA, T., LEO, F., HEUSER, S. K., LOBUE, A., LI, J., BECHER, S., SCHNECKMANN, R., SRIVRASTAVA, T., ERKENS, R., WOLFF, G., SCHMITT, J. P., GRANDOCH, M., LUNDBERG, J. O., PERNOW, J., ISAKSON, B. E., WEITZBERG, E. & KELM, M. 2022. Red blood cell eNOS is cardioprotective in acute myocardial infarction. *Redox Biol*, 54, 102370.
- CUSHMAN, S. W. 1970. Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell. *J Cell Biol*, 46, 326-41.
- DAIBER, A., STEVEN, S., VUJACIC-MIRSKI, K., KALINOVIC, S., OELZE, M., DI LISA, F. & MÜNDEL, T. 2020. Regulation of Vascular Function and Inflammation via Cross Talk of Reactive Oxygen and Nitrogen Species from Mitochondria or NADPH Oxidase- Implications for Diabetes Progression. *Int J Mol Sci*, 21.
- DARLINGTON, G. J., ROSS, S. E. & MACDOUGALD, O. A. 1998. The Role of C/EBP Genes in Adipocyte Differentiation\*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30057-30060.
- DAS, K., LIN, Y., WIDEN, E., ZHANG, Y. & SCHERER, P. E. 2001. Chromosomal Localization, Expression Pattern, and Promoter Analysis of the Mouse Gene Encoding Adipocyte-Specific Secretory Protein Acrp30. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 1120-1129.
- DE JONG, J. M., LARSSON, O., CANNON, B. & NEDERGAARD, J. 2015. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 308, E1085-105.
- DEANFIELD, J. E., HALCOX, J. P. & RABELINK, T. J. 2007. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*, 115, 1285-1295.
- DIXON, T. M., DANIEL, K. W., FARMER, S. R. & COLLINS, S. 2001. CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\alpha$  Is Required for Transcription of the  $\beta$ 3-Adrenergic Receptor Gene during Adipogenesis\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 722-728.
- DUNCAN, R. E., AHMADIAN, M., JAWORSKI, K., SARKADI-NAGY, E. & SUL, H. S. 2007. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annual Review of Nutrition*, 27, 79-101.
- ENGIN, A. 2017. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 960, 1-17.
- ERWIN, P. A., LIN, A. J., GOLAN, D. E. & MICHEL, T. 2005. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 280, 19888-94.
- ESTEVE RÀFOLS, M. 2014. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinol Nutr*, 61, 100-12.
- FÈVE, B., EMORINE, L. J., BRIEND-SUTREN, M. M., LASNIER, F., STROSBURG, A. D. & PAIRAULT, J. 1990. Differential regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *J Biol Chem*, 265, 16343-9.
- FITZGIBBONS, T. P., KOGAN, S., AOUADI, M., HENDRICKS, G. M., STRAUBHAAR, J. & CZECH, M. P. 2011. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1425-37.

- FLEGAL, K. M., KIT, B. K., ORPANA, H. & GRAUBARD, B. I. 2013. Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 309, 71-82.
- FLEMING, I. & BUSSE, R. 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284, R1-R12.
- FÖRSTERMANN, U. & LI, H. 2011. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *Br J Pharmacol*, 164, 213-23.
- FÖRSTERMANN, U. & MÜNDEL, T. 2006a. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*, 113, 1708-1714.
- FÖRSTERMANN, U. & MÜNDEL, T. 2006b. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113, 1708-14.
- FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W. C. 2011. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33, 829-837.
- FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33, 829-37, 837a-837d.
- FÖRSTERMANN, U., XIA, N. & LI, H. 2017. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*, 120, 713-735.
- FRIEDEL, R. H., WURST, W., WEFERS, B. & KÜHN, R. 2011. Generating Conditional Knockout Mice. In: HOFKER, M. H. & VAN DEURSEN, J. (eds.) *Transgenic Mouse Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- FRONTINI, A. & CINTI, S. 2010. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metabolism*, 11, 253-256.
- FU, L., ISOBE, K., ZENG, Q., SUZUKAWA, K., TAKEKOSHI, K. & KAWAKAMI, Y. 2007. beta-adrenoceptor agonists downregulate adiponectin, but upregulate adiponectin receptor 2 and tumor necrosis factor-alpha expression in adipocytes. *Eur J Pharmacol*, 569, 155-62.
- FUJIMOTO, N., MATSUO, N., SUMIYOSHI, H., YAMAGUCHI, K., SAIKAWA, T., YOSHIMATSU, H. & YOSHIOKA, H. 2005. Adiponectin is expressed in the brown adipose tissue and surrounding immature tissues in mouse embryos. *Biochim Biophys Acta*, 1731, 1-12.
- GÁLVEZ-PRIETO, B., BOLBRINKER, J., STUCCHI, P., DE LAS HERAS, A. I., MERINO, B., ARRIBAS, S., RUIZ-GAYO, M., HUBER, M., WEHLAND, M., KREUTZ, R. & FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. 2008. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *Journal of Endocrinology*, 197, 55-64.
- GAO, Y. J. 2007. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Curr Pharm Des*, 13, 2185-92.
- GERMAN, Z., CHAMBLISS, K. L., PACE, M. C., ARNET, U. A., LOWENSTEIN, C. J. & SHAUL, P. W. 2000. Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J Biol Chem*, 275, 8183-9.
- GIRALT, M. & VILLARROYA, F. 2013. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology*, 154, 2992-3000.
- GKALIAGKOUSI, E. & FERRO, A. 2011. Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1873-97.
- GRANNEMAN, J. G., LI, P., ZHU, Z. & LU, Y. 2005. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 289, E608-E616.
- GREENSTEIN, A. S., KHAVANDI, K., WITHERS, S. B., SONOYAMA, K., CLANCY, O., JEZIORSKA, M., LAING, I., YATES, A. P., PEMBERTON, P. W., MALIK, R. A. & HEAGERTY, A. M. 2009. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*, 119, 1661-70.
- HEFFNER, C. S., HERBERT PRATT, C., BABIUK, R. P., SHARMA, Y., ROCKWOOD, S. F., DONAHUE, L. R., EPPIG, J. T. & MURRAY, S. A. 2012. Supporting conditional

- mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource. *Nature Communications*, 3, 1218.
- HEITZER, T., SCHLINZIG, T., KROHN, K., MEINERTZ, T. & MÜNDEL, T. 2001. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104, 2673-8.
- HERRERA, M. D., MINGORANCE, C., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. & ALVAREZ DE SOTOMAYOR, M. 2010. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev*, 9, 142-52.
- HILDEBRAND, S., STÜMER, J. & PFEIFER, A. 2018. PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. *Frontiers in Physiology*, 9.
- HNASKO, T. S. & HNASKO, R. M. 2015. The Western Blot. *Methods Mol Biol*, 1318, 87-96.
- HONG, F.-F., LIANG, X.-Y., LIU, W., LV, S., HE, S.-J., KUANG, H.-B. & YANG, S.-L. 2019. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. *Inflammation Research*, 68, 429-441.
- HORII, T., MORITA, S., KIMURA, M., TERAWAKI, N., SHIBUTANI, M. & HATADA, I. 2017. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Scientific Reports*, 7, 7891.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2017a. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity*, 47, 406-420.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2017b. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542, 177-185.
- HOTER, A., EL-SABBAN, M. E. & NAIM, H. Y. 2018. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. *Int J Mol Sci*, 19.
- HUANG, P. L., HUANG, Z., MASHIMO, H., BLOCH, K. D., MOSKOWITZ, M. A., BEVAN, J. A. & FISHMAN, M. C. 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377, 239-42.
- IBRAHIM, M. M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 11, 11-8.
- INDRA, A. K., WAROT, X., BROCARD, J., BORNERT, J. M., XIAO, J. H., CHAMBON, P. & METZGER, D. 1999. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res*, 27, 4324-7.
- JAISSER, F. 2000. Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, 11 Suppl 16, S95-s100.
- JINEK, M., EAST, A., CHENG, A., LIN, S., MA, E. & DOUDNA, J. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2, e00471.
- KARANTZOULIS-FEGARAS, F., ANTONIOU, H., LAI, S. L., KULKARNI, G., D'ABREO, C., WONG, G. K., MILLER, T. L., CHAN, Y., ATKINS, J., WANG, Y. & MARSDEN, P. A. 1999. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem*, 274, 3076-93.
- KERSHAW, E. E. & FLIER, J. S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 2548-56.
- KIM, H., KIM, M., IM, S. K. & FANG, S. 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34, 147-159.
- KOLLURU, G. K., SIAMWALA, J. H. & CHATTERJEE, S. 2010. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*, 92, 1186-1198.
- KRÓL, M. & KEPINSKA, M. 2021. Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 56.
- KUBES, P., SUZUKI, M. & GRANGER, D. N. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4651-5.
- LAMERS, D., SCHLICH, R., GREULICH, S., SASSON, S., SELL, H. & ECKEL, J. 2011. Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*, 15, 1177-88.
- LAVIE, C. J., MILANI, R. V. & VENTURA, H. O. 2009. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1925-32.

- LEAN, M. E. 1989. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc*, 48, 243-56.
- LEBER, A., HEMMENS, B., KLÖSCH, B., GOESSLER, W., RABER, G., MAYER, B. & SCHMIDT, K. 1999. Characterization of Recombinant Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Purified from the Yeast *Pichia pastoris* \*. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 37658-37664.
- LEE, Y.-H., PETKOVA, ANELIA P., MOTTILLO, EMILIO P. & GRANNEMAN, JAMES G. 2012. In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by  $\beta_3$ -Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metabolism*, 15, 480-491.
- LEE, Y. H., PETKOVA, A. P. & GRANNEMAN, J. G. 2013. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metab*, 18, 355-67.
- LEFER, D. J., JONES, S. P., GIROD, W. G., BAINES, A., GRISHAM, M. B., COCKRELL, A. S., HUANG, P. L. & SCALIA, R. 1999. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol*, 276, H1943-50.
- LEHMAN, S. J., MASSARO, J. M., SCHLETT, C. L., O'DONNELL, C. J., HOFFMANN, U. & FOX, C. S. 2010. Peri-aortic fat, cardiovascular disease risk factors, and aortic calcification: the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*, 210, 656-61.
- LEO, F., SUVORAVA, T., HEUSER, S. K., LI, J., LOBUE, A., BARBARINO, F., PIRAGINE, E., SCHNECKMANN, R., HUTZLER, B., GOOD, M. E., FERNANDEZ, B. O., VORNHOLZ, L., ROGERS, S., DOCTOR, A., GRANDOCH, M., STEGBAUER, J., WEITZBERG, E., FEELISCH, M., LUNDBERG, J. O., ISAKSON, B. E., KELM, M. & CORTESE-KROTT, M. M. 2021. Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure. *Circulation*, 144, 870-889.
- LI, H. & FORSTERMANN, U. 2014. Pharmacological prevention of eNOS uncoupling. *Curr Pharm Des*, 20, 3595-606.
- LI, H. & FÖRSTERMANN, U. 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*, 190, 244-54.
- LI, H. & FÖRSTERMANN, U. 2013a. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 13, 161-7.
- LI, H. & FÖRSTERMANN, U. 2013b. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 161-167.
- LI, X., MA, Z. & ZHU, Y. Z. 2021. Regional Heterogeneity of Perivascular Adipose Tissue: Morphology, Origin, and Secretome. *Frontiers in Pharmacology*, 12.
- LIN, A., DEY, D., WONG, D. T. L. & NERLEKAR, N. 2019. Perivascular Adipose Tissue and Coronary Atherosclerosis: from Biology to Imaging Phenotyping. *Curr Atheroscler Rep*, 21, 47.
- LIN, M. I., FULTON, D., BABBITT, R., FLEMING, I., BUSSE, R., PRITCHARD, K. A., JR. & SESSA, W. C. 2003. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem*, 278, 44719-26.
- LINHART, H. G., ISHIMURA-OKA, K., DEMAYO, F., KIBE, T., REPKA, D., POINDEXTER, B., BICK, R. J. & DARLINGTON, G. J. 2001. C/EBP $\alpha$  is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 12532-12537.
- LIU, V. W. & HUANG, P. L. 2008. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res*, 77, 19-29.
- ŁUCZAK, A., MADEJ, M., KASPRZYK, A. & DOROSZKO, A. 2020. Role of the eNOS Uncoupling and the Nitric Oxide Metabolic Pathway in the Pathogenesis of Autoimmune Rheumatic Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 1417981.
- MALI, P., YANG, L., ESVELT, K. M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J. E., NORVILLE, J. E. & CHURCH, G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823-6.
- MAN, A. W. C., ZHOU, Y., REIFENBERG, G., CAMP, A., MÜNZEL, T., DAIBER, A., XIA, N. & LI, H. 2023. Deletion of adipocyte NOS3 potentiates high-fat diet-induced hypertension and vascular remodelling via chemerin. *Cardiovascular Research*.

- MARGARITIS, M., ANTONOPOULOS, A. S., DIGBY, J., LEE, R., REILLY, S., COUTINHO, P., SHIRODARIA, C., SAYEED, R., PETROU, M., DE SILVA, R., JALILZADEH, S., DEMOSTHENOUS, M., BAKOGIANNIS, C., TOUSOULIS, D., STEFANADIS, C., CHOUDHURY, R. P., CASADEI, B., CHANNON, K. M. & ANTONIADES, C. 2013. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*, 127, 2209-21.
- MARLATT, K. L. & RAVUSSIN, E. 2017. Brown Adipose Tissue: an Update on Recent Findings. *Curr Obes Rep*, 6, 389-396.
- MATTAGAJASINGH, I., KIM, C. S., NAQVI, A., YAMAMORI, T., HOFFMAN, T. A., JUNG, S. B., DERICCO, J., KASUNO, K. & IRANI, K. 2007. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14855-60.
- MCCRACKEN, E., MONAGHAN, M. & SREENIVASAN, S. 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clinics in Dermatology*, 36, 14-20.
- MIKOLAJCZYK, T. P., NOSALSKI, R., SZCZEPANIAK, P., BUDZYN, K., OSMENDA, G., SKIBA, D., SAGAN, A., WU, J., VINH, A., MARVAR, P. J., GUZIK, B., PODOLEC, J., DRUMMOND, G., LOB, H. E., HARRISON, D. G. & GUZIK, T. J. 2016. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *Faseb j*, 30, 1987-99.
- MOENS, A. L. & KASS, D. A. 2006. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 2439-44.
- MOENS, A. L., TAKIMOTO, E., TOCCHETTI, C. G., CHAKIR, K., BEDJA, D., CORMACI, G., KETNER, E. A., MAJMUDAR, M., GABRIELSON, K., HALUSHKA, M. K., MITCHELL, J. B., BISWAL, S., CHANNON, K. M., WOLIN, M. S., ALP, N. J., PAOLOCCI, N., CHAMPION, H. C. & KASS, D. A. 2008. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation*, 117, 2626-36.
- MONTEZANO, A. C. & TOUYZ, R. M. 2012. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 110, 87-94.
- MOUNT, P. F., KEMP, B. E. & POWER, D. A. 2007. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 271-9.
- MURANO, I., BARBATELLI, G., GIORDANO, A. & CINTI, S. 2009. Noradrenergic parenchymal nerve fiber branching after cold acclimatisation correlates with brown adipocyte density in mouse adipose organ. *Journal of Anatomy*, 214, 171-178.
- NASEEM, K. M. 2005. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 33-65.
- NGUYEN, A., GUO, J., BANYARD, D. A., FADAVI, D., TORANTO, J. D., WIRTH, G. A., PAYDAR, K. Z., EVANS, G. R. & WIDGEROW, A. D. 2016. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 69, 170-9.
- NISHIMURA, S., MANABE, I. & NAGAI, R. 2009. Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med*, 8, 55-60.
- NISOLI, E., CLEMENTI, E., PAOLUCCI, C., COZZI, V., TONELLO, C., SCIORATI, C., BRACALE, R., VALERIO, A., FRANCOLINI, M., MONCADA, S. & CARRUBA, M. O. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 299, 896-9.
- NOSALSKI, R. & GUZIK, T. J. 2017. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol*, 174, 3496-3513.
- OIKONOMOU, E. K. & ANTONIADES, C. 2019. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol*, 16, 83-99.
- Ouwens, D. M., SELL, H., GREULICH, S. & ECKEL, J. 2010. The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med*, 14, 2223-34.

- PADILLA, J., JENKINS, N. T., VIEIRA-POTTER, V. J. & LAUGHLIN, M. H. 2013. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 304, R543-52.
- PAYNE, S., VAL, S. D. & NEAL, A. 2018. Endothelial-Specific Cre Mouse Models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38, 2550-2561.
- PFEIFER, A. & HOFFMANN, L. S. 2015. Brown, Beige, and White: The New Color Code of Fat and Its Pharmacological Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, 207-227.
- PHILIPSEN, A., JØRGENSEN, M. E., VISTISEN, D., SANDBAEK, A., ALMDAL, T. P., CHRISTIANSEN, J. S., LAURITZEN, T. & WITTE, D. R. 2015. Associations between Ultrasound Measures of Abdominal Fat Distribution and Indices of Glucose Metabolism in a Population at High Risk of Type 2 Diabetes: The ADDITION-PRO Study. *PLOS ONE*, 10, e0123062.
- POLICE, S. B., THATCHER, S. E., CHARNIGO, R., DAUGHERTY, A. & CASSIS, L. A. 2009. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1458-64.
- PRATICÒ, D. 2005. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*, 181, 215-24.
- PRITCHARD, C. E. J., KROESE, L. J. & HUIJBERS, I. J. 2017. Direct Generation of Conditional Alleles Using CRISPR/Cas9 in Mouse Zygotes. In: EROSHENKO, N. (ed.) *Site-Specific Recombinases: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York.
- QI, X. Y., QU, S. L., XIONG, W. H., ROM, O., CHANG, L. & JIANG, Z. S. 2018. Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. *Cardiovasc Diabetol*, 17, 134.
- QIAN, J. & FULTON, D. 2013. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol*, 4, 347.
- REYES-FARIAS, M., FOS-DOMENECH, J., SERRA, D., HERRERO, L. & SÁNCHEZ-INFANTES, D. 2021. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochem Pharmacol*, 192, 114723.
- ROBBINS, R. A. & GRISHAM, M. B. 1997. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 857-60.
- ROBERTO, C. A., SWINBURN, B., HAWKES, C., HUANG, T. T., COSTA, S. A., ASHE, M., ZWICKER, L., CAWLEY, J. H. & BROWNELL, K. D. 2015. Patchy progress on obesity prevention: emerging examples, entrenched barriers, and new thinking. *Lancet*, 385, 2400-9.
- ROBIDOUX, J., MARTIN, T. L. & COLLINS, S. 2004.  $\beta$ -Adrenergic Receptors and Regulation of Energy Expenditure: A Family Affair. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 297-323.
- ROSEN, E. D., HSU, C.-H., WANG, X., SAKAI, S., FREEMAN, M. W., GONZALEZ, F. J. & SPIEGELMAN, B. M. 2002. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : a unified pathway. *Genes & Development*, 16, 22-26.
- ROSENWALD, M., PERDIKARI, A., RÜLICHE, T. & WOLFRUM, C. 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, 15, 659-667.
- SACKS, H. & SYMONDS, M. E. 2013. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*, 62, 1783-90.
- SAELY, C. H., GEIGER, K. & DREXEL, H. 2012. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*, 58, 15-23.
- SANNI-AJIBAYE, A. A., BLANKS, A. M., DERELLA, C. C., SIMON, A. B., RODRIGUEZ-MIGUELEZ, P., LOONEY, J., JEONG, J., THOMAS, J., STEPP, D. W., WEINTRAUB, N. L., WANG, X. & HARRIS, R. A. 2022. Endothelin-1 response to whole-body vibration in obese and normal weight individuals. *Physiol Rep*, 10, e15335.
- SASSMANN, A., OFFERMANN, S. & WETTSCHURECK, N. 2010. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis*, 48, 618-25.
- SCHLECHT, I., GRONWALD, W., BEHRENS, G., BAUMEISTER, S. E., HERTEL, J., HOCHREIN, J., ZACHARIAS, H. U., FISCHER, B., OEFNER, P. J. & LEITZMANN,

- M. F. 2017. Visceral adipose tissue but not subcutaneous adipose tissue is associated with urine and serum metabolites. *PLOS ONE*, 12, e0175133.
- SCHLICH, R., WILLEMS, M., GREULICH, S., RUPPE, F., KNOEFEL, W. T., OUWENS, D. M., MAXHERA, B., LICHTENBERG, A., ECKEL, J. & SELL, H. 2013. VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue. *Mediators Inflamm*, 2013, 982458.
- SCHULZ, E., JANSEN, T., WENZEL, P., DAIBER, A. & MÜNDEL, T. 2008. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*, 10, 1115-26.
- SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., TRAN, T. T., ZHANG, H., TOWNSEND, K. L., SHADRACH, J. L., CERLETTI, M., MCDOUGALL, L. E., GIORGADZE, N., TCHKONIA, T., SCHRIER, D., FALB, D., KIRKLAND, J. L., WAGERS, A. J. & TSENG, Y.-H. 2011. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 143-148.
- SEALE, P., BJORK, B., YANG, W., KAJIMURA, S., CHIN, S., KUANG, S., SCIMÈ, A., DEVARAKONDA, S., CONROE, H. M., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., RUDNICKI, M. A., BEIER, D. R. & SPIEGELMAN, B. M. 2008. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454, 961-7.
- SEALE, P., KAJIMURA, S., YANG, W., CHIN, S., ROHAS, L. M., ULDRY, M., TAVERNIER, G., LANGIN, D. & SPIEGELMAN, B. M. 2007. Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metabolism*, 6, 38-54.
- SENA, C. M., PEREIRA, A., FERNANDES, R., LETRA, L. & SEIÇA, R. M. 2017. Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol*, 174, 3514-3526.
- SHANKAR, R. R., WU, Y., SHEN, H. Q., ZHU, J. S. & BARON, A. D. 2000. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*, 49, 684-7.
- SHIBUYA, M. 2006. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*, 39, 469-78.
- SHUSTER, A., PATLAS, M., PINTHUS, J. & MOURTZAKIS, M. 2012. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *The British journal of radiology*, 85, 1-10.
- SNIJDER, M. B., VISSER, M., DEKKER, J. M., GOODPASTER, B. H., HARRIS, T. B., KRITCHEVSKY, S. B., DE REKENEIRE, N., KANAYA, A. M., NEWMAN, A. B., TYLAVSKY, F. A. & SEIDELL, J. C. 2005. Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia*, 48, 301-8.
- SOLTIS, E. E. & CASSIS, L. A. 1991. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A*, 13, 277-96.
- SUN, Y., CHEN, S., ZHANG, X. & PEI, M. 2019. Significance of cellular cross-talk in stromal vascular fraction of adipose tissue in neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39, 1034-1044.
- SZASZ, T. & WEBB, R. C. 2012. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)*, 122, 1-12.
- TAKAOKA, M., NAGATA, D., KIHARA, S., SHIMOMURA, I., KIMURA, Y., TABATA, Y., SAITO, Y., NAGAI, R. & SATA, M. 2009. Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ Res*, 105, 906-11.
- TAKEMORI, K., GAO, Y. J., DING, L., LU, C., SU, L. Y., AN, W. S., VINSON, C. & LEE, R. M. 2007. Elevated blood pressure in transgenic lipotrophic mice and altered vascular function. *Hypertension*, 49, 365-72.
- TANAKA, K. & SATA, M. 2018. Roles of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Front Physiol*, 9, 3.
- TORRES, S., FABERSANI, E., MARQUEZ, A. & GAUFFIN-CANO, P. 2019. Adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. The proactive role of probiotics. *Eur J Nutr*, 58, 27-43.
- TRAJKOVSKI, M. & LODISH, H. 2013. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24, 442-450.

- TRAN, K. V., FITZGIBBONS, T., MIN, S. Y., DESOUZA, T. & CORVERA, S. 2018. Distinct adipocyte progenitor cells are associated with regional phenotypes of perivascular aortic fat in mice. *Mol Metab*, 9, 199-206.
- TSENG, Y. H., KOKKOTOU, E., SCHULZ, T. J., HUANG, T. L., WINNAY, J. N., TANIGUCHI, C. M., TRAN, T. T., SUZUKI, R., ESPINOZA, D. O., YAMAMOTO, Y., AHRENS, M. J., DUDLEY, A. T., NORRIS, A. W., KULKARNI, R. N. & KAHN, C. R. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454, 1000-4.
- VAN DAM, A. D., BOON, M. R., BERBÉE, J. F. P., RENSEN, P. C. N. & VAN HARMELEN, V. 2017. Targeting white, brown and perivascular adipose tissue in atherosclerosis development. *Eur J Pharmacol*, 816, 82-92.
- VAN MARKEN LICHTENBELT, W. 2012. Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 15, 547-552.
- VICTORIO, J. A. & DAVEL, A. P. 2020. Perivascular Adipose Tissue Oxidative Stress on the Pathophysiology of Cardiometabolic Diseases. *Curr Hypertens Rev*, 16, 192-200.
- VICTORIO, J. A., FONTES, M. T., ROSSONI, L. V. & DAVEL, A. P. 2016. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Front Physiol*, 7, 295.
- VILLARROYA, F. & VIDAL-PUIG, A. 2013. Beyond the Sympathetic Tone: The New Brown Fat Activators. *Cell Metabolism*, 17, 638-643.
- WALDEN, T. B., TIMMONS, J. A., KELLER, P., NEDERGAARD, J. & CANNON, B. 2009. Distinct expression of muscle-specific MicroRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 218, 444-449.
- WALKER, J. M. 1994. The biconchonic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 5-8.
- WANG, H., LI, J., WANG, Z., TIAN, Y., LI, C., JIN, F., LI, J. & WANG, L. 2022. Perivascular brown adipocytes-derived kynurenic acid relaxes blood vessel via endothelium PI3K-Akt-eNOS pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113040.
- WHITEHEAD, J. P., RICHARDS, A. A., HICKMAN, I. J., MACDONALD, G. A. & PRINS, J. B. 2006. Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*, 8, 264-80.
- XIA, N., HORKE, S., HABERMEIER, A., CLOSS, E. I., REIFENBERG, G., GERICKE, A., MIKHED, Y., MÜNDEL, T., DAIBER, A., FÖRSTERMANN, U. & LI, H. 2016. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36, 78-85.
- XIA, N., WEISENBURGER, S., KOCH, E., BURKART, M., REIFENBERG, G., FÖRSTERMANN, U. & LI, H. 2017. Restoration of perivascular adipose tissue function in diet-induced obese mice without changing bodyweight. *Br J Pharmacol*, 174, 3443-3453.
- YANG LOUREIRO, Z., SOLIVAN-RIVERA, J. & CORVERA, S. 2022. Adipocyte Heterogeneity Underlying Adipose Tissue Functions. *Endocrinology*, 163.
- YE, M., RUAN, C. C., FU, M., XU, L., CHEN, D., ZHU, M., ZHU, D. & GAO, P. 2019. Developmental and functional characteristics of the thoracic aorta perivascular adipocyte. *Cell Mol Life Sci*, 76, 777-789.
- ZHANG, R., MIN, W. & SESSA, W. C. 1995. Functional analysis of the human endothelial nitric oxide synthase promoter. Sp1 and GATA factors are necessary for basal transcription in endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 15320-6.
- ZHANG, Y., LI, R., MENG, Y., LI, S., DONELAN, W., ZHAO, Y., QI, L., ZHANG, M., WANG, X., CUI, T., YANG, L.-J. & TANG, D. 2014. Irisin Stimulates Browning of White Adipocytes Through Mitogen-Activated Protein Kinase p38 MAP Kinase and ERK MAP Kinase Signaling. *Diabetes*, 63, 514-525.
- ZHAO, Y., VANHOUTTE, P. M. & LEUNG, S. W. 2015a. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*, 129, 83-94.
- ZHAO, Y., VANHOUTTE, P. M. & LEUNG, S. W. S. 2015b. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, 129, 83-94.

