

DISSERTATION

Adaptation und Validierung der Messung der mitochondrialen
Sauerstoffverbrauchsrate in Geweben und deren Einsatz zur
Evaluation metabolischer Stressoren

Adaptation and validation of mitochondrial oxygen consumption
rate measurement in tissues and its use for evaluation of
metabolic stressors

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Olena Mackert

Erstbetreuung: Prof. Dr. Joachim Spranger

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	iv
Abkürzungsverzeichnis.....	v
Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Mitochondrien.....	4
1.1.1 Mitochondriale Dysfunktion.....	4
1.2 Bestimmung mitochondrialer Funktion.....	5
1.2.1 Bestimmung mitochondrialer Funktion in Zellen	5
1.2.2 Bestimmung mitochondrialer Funktion im Gewebe	6
2 Methodik.....	7
2.1 Genehmigung der Studie	7
2.2 Tierversuche	7
2.3 Körpergewicht und Körperzusammensetzung	7
2.4 Diäten.....	7
2.5 Probenpräparation	8
2.6 Mikrosiebe.....	9
2.7 Bestimmung der OCR.....	10
2.8 Western Blot.....	10
2.9 qPCR.....	11
2.10 Elektronenmikroskopie	11
2.11 Statistik	12
3 Ergebnisse	13
3.1 Methodenetablierung zur Messung von OCR im Gewebe.....	13
3.1.1 Experimenteller Ablauf.....	13
3.1.2 Probemessungen unterschiedlicher Organe.....	16

3.1.3	Testung der Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methodik	17
3.2	Einfluss von metabolischem Stress auf die OCR.....	18
3.2.1	Diäteninterventionen	19
3.2.2	HFD in fortgeschrittenem Alter.....	22
3.2.3	Prolongiertes Altern	23
3.2.4	Fasten	26
4	Diskussion	29
4.1	Messung der OCR in Geweben	30
4.2	Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die mitochondriale Funktion.....	31
4.3	Einfluss von Altern auf die mitochondriale Atmung.....	31
4.4	Einfluss des Kurzzeitstressors Fasten	32
4.5	Limitationen.....	34
5	Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung.....	36
	Literaturverzeichnis	37
	Eidesstattliche Versicherung	43
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	44
	Druckexemplar der Publikation.....	45
	Lebenslauf.....	61
	Komplette Publikationsliste.....	62
	Danksagung	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Nährwertzusammensetzung der von Ssniff genutzten Diäten.....	8
---	---

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Darstellung der 3D-gedruckten Mikrosiebe	9
Abbildung 2. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) ex vivo im Gewebe	13
Abbildung 3. Evaluation unterschiedlicher Stanzgrößen	14
Abbildung 4. Basale Sauerstoffverbrauchsrate in Leber, linkem Ventrikel und weißem Fettgewebe	16
Abbildung 5. Testung der Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode.....	17
Abbildung 6. Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Diätinterventionen, des Alterns und des Fastens	18
Abbildung 7. Evaluierung verschiedener Diätinterventionen	21
Abbildung 8. Altern auf Hochfettdiät (HFD)	23
Abbildung 9. Analyse von prolongiertem Altern.....	25
Abbildung 10. Effekte von Kurzzeitfasten.....	27
Abbildung 11. Einfluss von Fasten auf die hepatischen Mitochondrien	28
Abbildung 12. Darstellung des experimentellen Ablaufes sowie der wichtigsten Ergebnisse.....	30

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe (brown adipose tissue)
eWAT	Epididymales weißes Fettgewebe (epididymal white adipose tissue)
FCCP	Fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone
HFD	Hochfettdiät
HSD	Hochzuckerdiät
LV	Linker Ventrikel
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate)
Opa1	Mitochondrial dynamin like GTPase
RD	Haltungsdiet
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SC	Spare capacity
STD	Standarddiät
Tfam/TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
Ucp1	Uncoupling protein 1
WD	Westerndiät

Zusammenfassung

Hintergrund: Mitochondrien sind überlebenswichtige Zellorganellen, die nicht nur für die Steuerung der zellulären Energieproduktion zuständig sind, sondern auch eine wichtige Bedeutung für diverse Prozesse wie Zellwachstum, Kontrolle des Zellzyklus und Zelltod haben. Veränderungen der mitochondrialen Funktion bis hin zur mitochondrialen Dysfunktion stehen im Zusammenhang mit diversen Krankheitsbildern wie Adipositas, Diabetes mellitus, nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD), nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH), Arteriosklerose und verschiedenen Krebserkrankungen. Das Verständnis und die Bestimmung der mitochondrialen Funktion ist daher von großem Interesse. Generell sind Messungen der mitochondrialen Funktion in isolierten Zellen und Mitochondrien möglich. Isolationsprozesse und anschließende Kulturbedingungen führen jedoch bislang zu erheblichen (metabolischen) Veränderungen. Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, die mitochondriale Funktion im Gewebe als Ganzes und nicht in isolierten Zellen bestimmen zu können, ohne methodenbedingt signifikante metabolische Veränderungen zu induzieren. Diese würde ein unverfälschteres Abbild der mitochondrialen Funktion erlauben.

Methoden: Um die mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) in Gewebebiopsien *ex vivo* bestimmen zu können, wurden Etablierungsschritte wie Evaluierung unterschiedlicher Biopsiestanzgrößen, Produktion von Mikrosieben mittels 3D-Druck, Titration von Inhibitoren, Anpassung der Versuchsdauer und Messzeiten sowie Versuche zur Testung der Reproduzierbarkeit und Robustheit durchgeführt. Die Messungen wurden für Leber, (weißes und braunes) Fettgewebe, Herz sowie Pankreas an murinen Gewebeproben etabliert und verifiziert. Anschließend wurde der Einfluss einer zwölfwöchigen Hochfett- (HFD), Hochzucker- (HSD) und Westerndiät (WD) in jungen Mäusen, einer HFD in gealterten Mäusen, zweijähriges Altern sowie nächtliches Fasten auf die OCR der unterschiedlichen Organe untersucht. Zur erweiterten Charakterisierung der mitochondrialen Funktion wurden zusätzliche Methoden wie Western Blot Analysen sowie Elektronenmikroskopie hinzugezogen.

Ergebnisse: Es konnte erfolgreich eine neue *ex vivo* Methode zur Bestimmung der mitochondrialen OCR in murinen Gewebebiopsien etabliert werden. Diese eröffnete die Möglichkeit, den Einfluss von metabolischem Stress, induziert durch Ernährung, Altern und Fasten, auf die OCR zu untersuchen. Eine dreimonatige Diätenintervention in

jungem Alter zeigte geringe Effekte auf die mitochondriale Atmung, führte jedoch zu einer Reduktion der Atmungskettenkomplexe II und IV im Fettgewebe. Im Gegensatz dazu, wiesen gealterte Mäuse, die einer HFD ausgesetzt waren, eine reduzierte hepatische metabolische Flexibilität auf und zeigten eine gesteigerte OCR in weißem (eWAT) und braunen Fettgewebe (BAT). Die Reduktion der hepatischen metabolischen Flexibilität konnte durch prolongiertes Altern ohne zusätzlichen metabolischen Stress nicht beobachtet werden. Stattdessen führte prolongiertes Altern zu einem Anstieg der OCR im braunen Fettgewebe (BAT). Der Stressor Fasten induzierte einen Anstieg der OCR in Leber- und Pankreasgewebe und reduzierte das Gewicht dieser beiden Organe.

Schlussfolgerung: Mithilfe der etablierten *ex vivo* Messungen war es möglich, die mitochondriale Funktion von Leber, braunem und weißem Fettgewebe, Pankreas und Herz umfassend zu bestimmen und die Auswirkungen der metabolischen Stressoren zu analysieren (1).

Abstract

Background: Mitochondria are pivotal cellular organelles that are not only responsible for controlling cellular energy production, but also play an important role in various processes such as cell growth, cell cycle control and cell death. Alterations in mitochondrial function up to mitochondrial dysfunction are associated with diverse disease patterns such as obesity, diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), atherosclerosis and a variety of malignancies. Thus, the assessment and comprehension of mitochondrial function assume paramount importance. Measurements of mitochondrial function have been conducted so far within isolated cells and mitochondria. However, isolation processes and subsequent culture conditions have exhibited a tendency to induce substantial (metabolic) alterations. The aim of the present dissertation was, therefore, to develop a method that enables the determination of mitochondrial function within intact tissue, rather than isolated cells, without method-induced metabolic alterations. Such an approach promises to provide a more unadulterated representation of mitochondrial function.

Methods: To determine the mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) *ex vivo* in tissue biopsies, a series of establishment steps were performed. These steps encompassed the assessment of various biopsy punch sizes, the production of microsieves using 3D printing technology, the precise titration of inhibitors, the adjustment of experiment duration and measurement intervals, and the execution of experiments to assess both reproducibility and robustness. The measurements were systematically established and validated for liver, (white and brown) adipose tissue, heart, and pancreas using murine tissue samples. Subsequently, an investigation was conducted to analyze the impact of dietary interventions, including a twelve-week high fat-diet (HFD), high-sucrose diet (HSD), and western diet (WD) in young mice, an HFD in matured mice, a two-year aging process, and overnight fasting on the OCR of these various organs. In order to provide a comprehensive characterization of mitochondrial function, supplementary techniques such as western blot analyses and electron microscopy were employed.

Results: A novel *ex vivo* method for the determination of the mitochondrial OCR in murine tissue biopsies was successfully established. This methodology provided the opportunity to investigate the impact of metabolic stress induced by dietary factors, aging, and fasting on OCR. A three-months dietary intervention at a young age showed minimal effects on mitochondrial respiration but did result in a reduction of respiratory chain complexes II and IV in adipose tissue. In contrast, aged mice exposed to HFD exhibited reduced hepatic metabolic flexibility and demonstrated an elevated OCR in both white adipose tissue (eWAT) and brown adipose tissue (BAT). The reduction in hepatic metabolic flexibility was not observed in the context of prolonged aging without additional metabolic stress; instead, prolonged aging led to an increase in OCR in brown adipose tissue (BAT). Fasting induced an increase in OCR in liver and pancreatic tissue while reducing the weight of these two organs.

Conclusion: Utilizing the established *ex vivo* measurements, we were able to comprehensively assess the mitochondrial function in the liver, brown and white adipose tissue, pancreas, and heart. Furthermore, this method allowed a thorough analysis of the effects induced by metabolic stressors (1).

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind membrangebundene Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie spielen eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung des Lebens. Einerseits sind sie für die Steuerung der zellulären Energieproduktion zuständig und andererseits für diverse Prozesse von Bedeutung, die für die Zellfunktion und -dysfunktion wichtig sind, darunter Zellwachstum und -differenzierung, Kontrolle des Zellzyklus bis hin zum Zelltod (2, 3). Die zelluläre Energieversorgung in den Mitochondrien findet durch die Umsetzung von Nahrungsbestandteilen (Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden) in zellulär nutzbare Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) statt (4). Hierbei werden Elektronen entlang der inneren Mitochondrienmembran von einem auf den nächsten Proteinkomplex der Atmungskette geleitet, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient gebildet wird. Dieser Protonengradient wird durch die ATP-Synthase zur Energieproduktion/ATP-Produktion genutzt. Zusätzlich sind Mitochondrien an der Produktion und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (5). Die mitochondriale Atmungskette stellt die Hauptquelle für die Produktion von ROS in der Zelle dar (6).

1.1.1 Mitochondriale Dysfunktion

Mitochondrien sind überlebenswichtig und haben die Fähigkeit, sich an veränderte physiologische Bedingungen, wie gesteigerten Energiebedarf oder veränderte Umgebungsbedingungen, z.B. erniedrigten Sauerstoffgehalt, anzupassen. Akute physiologische Anpassungsvorgänge der Mitochondrien können bei chronischer Überbelastung aber nachweislich zu fortschreitenden Erkrankungen führen. Pathologische Veränderungen, wie dauerhaft exzessiv zugeführte Nährstoffe, können nicht mehr kompensiert werden und führen durch fehlende Stoffwechselmetabolite, Verschiebungen in der Bilanz von Reduktionsäquivalenten, Mangel an ATP und Steigerung der ROS-Produktion, zur mitochondrialen Dysfunktion sowie zur Zellapoptose (7, 8). Die mitochondriale Dysfunktion steht aktuell im Fokus intensiver Forschung in diversen Krankheitsbildern, wie Adipositas, Diabetes mellitus, nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD), nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH), Arteriosklerose und diversen Krebserkrankungen (5, 7, 9-21). Prinzipiell können alle

Zellen von mitochondrialer Dysfunktion betroffen sein. Von besonderem Interesse sind aber diejenigen (metabolischen) Gewebe, für die eine adäquate Mitochondrienfunktion eine hohe Relevanz hat, wie z.B. Leber- und Fettgewebe. Ein Zusammenhang zwischen Adipositas, Diabetes mellitus und mitochondrialer Dysfunktion im Leber- und (weißem) Fettgewebe ist mehrfach beschrieben (22-24). Es wurde gezeigt, dass Adipositas im weißen Fettgewebe direkt zu einer eingeschränkten mitochondrialen Funktion sowie zu einer Reduktion der mitochondrialen Masse und der mitochondrialen DNA führt (25-28). In der Leber kann ein Überangebot von Nährstoffen eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) bis hin zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) verursachen (14, 15, 17, 18). Frühe Stadien der Adipositas, welche mit oder ohne Leberverfettung auftreten können, steigern zunächst die hepatische zelluläre Atmung (13). Hält das Überangebot von Nährstoffen an, kommt es zu einer Steigerung der ROS Produktion, Reduktion der mitochondrialen Funktion und somit auch der ATP-Produktion und schließlich zur Zellapoptose (13). Der Teufelskreis aus gestörter zellulärer Energiehomöostase und daraus resultierender Lipidakkumulation, gepaart mit erhöhten ROS-Konzentrationen, fördert die Entwicklung von Insulinresistenz und lokaler Inflammation (5, 7). Daher ist ein tiefgreifendes Verständnis der mitochondrialen Funktion, sowie die Bestimmung dieser, von sehr großem Interesse. Ein verbessertes Verständnis organ- und gewebespezifischer mitochondrialer Funktion und Dysfunktion bei verschiedenen (pathophysiologischen) Zuständen könnte die Grundlage für therapeutische Ansätze bei diesen Krankheitsbildern bilden. Die funktionelle Analyse von Mitochondrien, insbesondere in Geweben stellt jedoch nach wie vor eine Herausforderung dar.

1.2 Bestimmung mitochondrialer Funktion

1.2.1 Bestimmung mitochondrialer Funktion in Zellen

Die direkte Bestimmung der mitochondrialen Funktion wurde ursprünglich mittels isolierter Mitochondrien durchgeführt. Der Isolationsprozess der Mitochondrien gestaltete sich aufwändig und führte zu Änderungen der *in vivo* Zustände. Studien an isolierten Zellen lieferten bereits besseren Aufschluss über die mitochondriale Funktion. Vorerst wurden Messungen des Sauerstoffverbrauchs mit Clark-Elektroden durchgeführt. Limitierend hierfür ist die große Menge an Zellen, die benötigt wird und die ständig gerührt und suspendiert werden muss, um adäquate Messungen durchführen zu können. Mit der

Entwicklung von Sauerstoffsensoren auf Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzbasis konnte eine deutliche Reduktion des Probenmaterials erreicht werden. Basierend auf der Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate; OCR) ermöglichen sie bioenergetische Messungen in adhärennten Monolayern (29-31). Messungen mit Sauerstoffsensoren mit dem Seahorse XFe96 Flux Analyzer (Agilent) erlauben es außerdem die mitochondriale Funktion in Echtzeit zu analysieren. Für Primärzellen und unterschiedliche Zelllinien sind Messungen mit dieser Methodik gut etabliert und werden in der aktuellen Forschung vielfach genutzt. Der Isolationsprozess und die anschließende Kultivierung der Zellen induzieren jedoch substanzielle (metabolische) Veränderungen, auch innerhalb der Mitochondrien (32). Somit spiegeln die Messungen nicht die *in vivo* Situation wider und es können keine korrekten Aussagen über den Einfluss experimenteller Interventionen, wie beispielsweise Diäteninterventionen, auf die mitochondriale Funktion getroffen werden.

1.2.2 Bestimmung mitochondrialer Funktion im Gewebe

Um die *in vivo* Situation im Zellverband bei ungestörter zellulärer Interaktion analysieren zu können, scheinen Messungen anhand von Gewebe sinnvoll. Die Bestimmung der mitochondrialen Funktion durch Analyse der Sauerstoffverbrauchskonzentration in Gewebeprobe stellt aber nach wie vor eine Herausforderung dar und war bisher nur mit Hilfe des Oroboros-Systems möglich, welches nur eine sehr geringe Probenzahl zulässt (33). Interessanterweise entwickelten Neville und Kollegen kürzlich eine vielversprechende Technik zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion in isoliertem Gehirngewebe der *Drosophila* Fliege *ex vivo* durch Messung des Sauerstoffverbrauchs mit einem Seahorse XFe96 Flux Analyzers (Agilent) (34). Das veröffentlichte experimentelle Vorgehen zeigte eine potenzielle Möglichkeit zur Bestimmung der OCR im Gewebe auf (33). Im ersten Abschnitt des Projektes soll daher inspiriert durch diese Veröffentlichung von Neville und Kollegen, eine neue Methode zur Bestimmung der mitochondrialen Atmung in murinen Gewebeprobe etabliert werden, um die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) *ex vivo* in einem 96-Well-Durchsatzverfahren direkt in Echtzeit analysieren zu können (34). Damit sollen zunächst Messungen für die metabolisch relevanten Gewebe Leber, braunes und weißes Fettgewebe, Pankreas- und Herzgewebe ermöglicht werden. Anschließend soll der Einfluss von metabolischen Stressfaktoren, induziert durch Diäten (Hochfett-, Hochzucker- und Westerndiät), Altern und Fasten, auf die mitochondriale Funktion anhand dieser Methodik untersucht werden.

2 Methodik

2.1 Genehmigung der Studie

Alle Tierversuche wurden von den institutionellen und nationalen Behörden (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Deutschland) in mehreren Anträgen (G0242/15, T0180/16, G0028/17, G0219/17, T-CH0019/21) genehmigt und in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien der Charité und der EU-Richtlinie 10/63/EU sowie der ARRIVE Richtlinien durchgeführt.

2.2 Tierversuche

Alle Versuche wurden an männlichen Mäusen durchgeführt. Die genutzten Versuchstierlinien hatten einen C57BL/6J Hintergrund, abgesehen von einer Linie auf C57BL/6N Hintergrund (Kcnk16), die zum Vergleich der Hintergrund-Unterschiede untersucht wurde. Die Mäuse wurden über Charles River erworben oder stammten aus der eigenen Zucht (FEM). Nach Transfer in unsere Tierhaltung, wurden die Mäuse mindestens eine Woche an die neue Umgebung akklimatisiert, bevor mit der jeweiligen Intervention begonnen wurde. Alle Mäuse wurden in IVC-Käfigen (2-3 Mäuse/Käfig) mit einem 12 Stunden Hell/Dunkel-Zyklus und *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

2.3 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Während der Interventionen wurden die Mäuse wöchentlich gewogen und gescored. Zusätzlich wurden die Fett- und fettfreien Körpermasse der Mäuse mittels 1H-Magnetresonanzspektroskopie mit einem Minispec LF50 Body Composition Analyzer (Bruker) bestimmt.

2.4 Diäten

Um metabolischen Stress zu induzieren, wurde eine Diätenintervention durchgeführt. Ab einem Alter von 6 Wochen erhielten die Mäuse für eine Dauer von 12 Wochen entweder eine Standarddiät (STD, S8090-E050; Ssniff Spezialdiäten GmbH), eine Hochzuckerdiät (HSD, S8090-E052; Ssniff), eine Hochfett diät (HFD, D1249; Ssniff) oder eine Western diät (WD), bestehend aus einer HFD und 6% Saccharose im Trinkwasser (Tab. 1).

Zur Untersuchung des Einflusses von Altern in Kombination mit metabolischem Stress, wurden 5 Monate alte Mäuse für 12 Wochen mit einer HFD gefüttert. Die Mäuse der prolongierten Altersgruppe erhielten für 2 Jahre eine Haltungsdiät (RD). In Tabelle 1 ist die Nährwertzusammensetzung der jeweiligen Diäten dargestellt.

Tabelle 1. Nährwertzusammensetzung der von Ssniff genutzten Diäten.

Name	Haltung (RD)	Standard (STD)	Hochzucker (HSD)	Hochfett (HFD)
Nummer	V1124-300	S8090-E050	S8090-E052	E15742
Protein (kcal%)	24	20	20	20
Kohlenhydrate (kcal%)	67	65	65	20
Saccharose (kcal%)		7	58	9,4
Fett (kcal%)	9	15	15	60
Total (kcal%)	100	100	100	100
Metabolisierbare Energie (kcal/kg)	3225	3680	3752	5150
Metabolisierbare Energie (MJ/kg)	13,5	15,4	15,7	21,6

(Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1))
Modifizierung: Tabelle in deutscher Sprache dargestellt

Für den Fastenversuch wurden 2 Jahre alte Mäuse auf RD randomisiert in zwei Gruppen unterteilt. Die gefütterte (fed) Gruppe erhielt *ad libitum* Zugriff auf die Nahrung, wohingegen die gefastete (fasted) über Nacht keinen Zugriff auf Futter hatte.

2.5 Probenpräparation

Die Probenpräparation erfolgte nach dem ausgearbeiteten, standardisierten Protokoll und jeweils zur gleichen Tageszeit mit den gleichen Rahmenbedingungen. Hierbei wurde jeweils eine Maus aus der Interventionsgruppe und eine Maus aus der Kontrollgruppe simultan seziiert, um identische Konditionen sicherzustellen. Die relevanten Organe wurden nach der Tötung unverzüglich entnommen, gewogen und direkt Gewebeproben mit Hilfe von Stanzen (Biopsy punch, plunger type; KAI medical) für die Messungen mit

dem Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (XFe96; Agilent, Deutschland) angefertigt. Um die geeignete Stanzgröße für jedes Gewebe zu identifizieren, wurden im Vorfeld unterschiedliche Stanzgrößen mit einem Durchmesser von 1, 1,5, und 2 mm getestet. Alle Stanzen eines Organs wurden, nach den Vorversuchen identisch mit folgenden Größen angefertigt: Leber: 1 mm, linker Ventrikel (LV): 1 mm, Pankreas: 1 mm, epididymales weißes Fettgewebe (eWAT): 1,5 mm, braunes Fettgewebe (BAT): 1,5 mm. Die frisch gestanzten Biopsien, eine Stanze pro Well und 3 bis 5 Replikate pro Gewebe pro Maus, wurden in eine 96-Well-Platte mit Assay Medium (DMEM 5030, Sigma) mit 10 mM Glucose und 2 mM Glutamin überführt und bei 37°C bis zur Messung gelagert. Um die Gewebebiopsien im Well in Position zu halten, wurden Mikrosiebe im 3D-Druck angefertigt. Der genaue Produktionsprozess dieser Mikrosiebe ist in 2.6. dargestellt. Nach der Biopsieentnahme wurden weitere Proben entnommen und entsprechend für Folgeversuche aufbereitet (Lipolyse, Histologie, Elektronenmikroskopie), für RNA- und Proteinextraktion oder zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

2.6 Mikrosiebe

Die Mikrosiebe wurden mittels SLA-3D-Drucktechnologie (Stereolithographie) produziert (Abbildung 1).

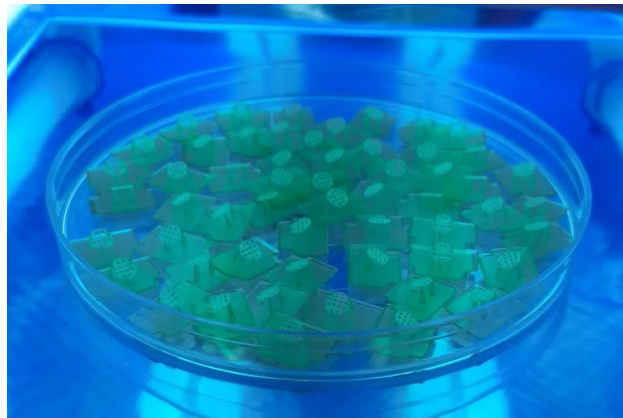


Abbildung 1. Darstellung der 3D-gedruckten Mikrosiebe
(Modifizierung des Supplements nach Mackert et al., 2022 (1))
Modifizierung: Ausschnitt der Originalabbildung im Supplement der Publikation

Basierend auf den von Neville und Kollegen (34) zur Verfügung gestellten Messangaben, wurde ein vereinfachtes Modell mit Hilfe von Computer Aided Design (CAD) entwickelt, und anschließend eine Druckdatei mit einer proprietären Slicing-Software erstellt, die vom Hersteller des 3D-Druckers (Anycubic) bereitgestellt wurde. Der Druck erfolgte in

höchster Auflösung (25 µm) mit einem Anycubic Photon 3D-Drucker unter Verwendung von UV-empfindlichem Harz des Typs "Basic" (grün, Anycubic). Im Anschluss an den Druckvorgang wurden die Mikrosiebe in einem Ultraschallbad mit Isopropanol gewaschen und durch UV-Bestrahlung gehärtet. Vor Verwendung wurden die Mikrosiebe von ihrem Druckträger abgetrennt, auf Unversehrtheit geprüft und mindestens 48 Stunden lang in destilliertem Wasser gelagert. Um sicherzustellen, dass das Material der Mikrosiebe die OCR-Messungen nicht beeinträchtigt, wurden verschiedene Druckharze vorab mit primären Hepatozyten in Seahorse-Messungen untersucht (1).

2.7 Bestimmung der OCR

Nach Präparation der Gewebestanden erfolgte die Echtzeit-Bestimmung der OCR mit einem Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (XFe96; Agilent, Deutschland) bei 37°C. Nach Analyse der basalen OCR mit einer Mindestaufzeichnung von 6 Zyklen, erfolgte die Injektion von 5 mM FCCP (Sigma) als Entkoppler und die Messung für 3 Zyklen, um die maximale OCR zu bestimmen, und schließlich wurden 2,5 mM Antimycin A (Sigma) und 2,5 mM Rotenon (Sigma) injiziert, um eine Hemmung der Atmungskette zu induzieren, und für weitere 6 Zyklen gemessen. Durch vorangehende Titrationsexperimente wurde die geeignete FCCP-Konzentration ermittelt.

Zur Normalisierung der Messungen wurde im Anschluss die Gewebestanze mechanisch in Homogenisierungspuffer (250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,4) lysiert und der Proteingehalt mittels Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher) bestimmt.

2.8 Western Blot

Gefrorene Gewebeproben von den gleichen Mäusen, wie in den Seahorse-Versuchen, wurden in Homogenisierungspuffer mit einem Proteaseinhibitor lysiert (cOmplete™, Roche). Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels BCA (ThermoFisher) bestimmt. Die Lysate wurden in Laemmli-Puffer mit 10% β-Mercaptoethanol für 5 Minuten auf 50°C erhitzt. Gleiche Mengen an Gesamtproteinlysaten (15 mg Leber und eWAT bzw. 5 mg BAT) wurden mit SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und eine Stunde lang bei Raumtemperatur geblockt (5% Magermilch/TBST). Für das Immunoblotting wurden die folgenden primären Antikörper verwendet: Total

OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (ab110413, Abcam), rabbit anti-mouse GAPDH (2118, Cell Signaling) und rabbit anti- mouse TFAM (22586, proteintech). Nach der Inkubation der primären Antikörper wurden die Membranen 3 Mal 5 Minuten mit TBST gewaschen, bevor sie mit den HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern anti-rabbit IgG (7074, Cell Signaling) oder anti-mouse IgG (7076, Cell Signaling) inkubiert wurden. Für die Detektion wurde ein ChemiDoc XRSp (Bio-Rad) verwendet und die optische Dichte wurde mit GAPDH als Ladekontrolle für jedes Gewebe mit Image Lab (Bio-Rad) quantifiziert.

2.9 qPCR

Aus den tiefgefrorenen Gewebeproben wurde die gesamte RNA mittels TRIzol (Ambion) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde 1 mg RNA mit DNase (ThermoFisher) verdaut und via RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher) in cDNA transkribiert. Die quantitative real-time PCR wurde mit einem LightCycler96 (Roche) mit GoTaq qPCR Master Mix (Promega) durchgeführt. Die Auswertung zur Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte mittels der $2^{\Delta\Delta CT}$ Methode. Die relative Genexpression von *G6pc*, *Acaca*, *Fasn*, *Ppara α* , *Cd36*, *Ucp1*, *Tfam* und *Opa1* wurde auf *18S* mRNA als Haushaltsgen normalisiert. Die verwendeten Primer Sequenzen können der Publikation entnommen werden (1).

2.10 Elektronenmikroskopie

Es wurden 1 mm³ große Proben aus dem frisch entnommenen Lebergewebe gestanzt und direkt in 2% (w/v) Paraformaldehyd und 2,5% (v/v) Glutataldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C fixiert. Zur Langzeitlagerung bei 4°C wurden die Proben zunächst in 1% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer überführt. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur nacheinander mit 1% (w/v) Gerbsäure, 1% (v/v) Osmiumtetroxid und 2% (w/v) Uranylacetat nachfixiert und gefärbt, in einer abgestuften Ethanolreihe dehydriert und in PolyBed® 812 (Polysciences) eingebettet. 60 - 80 nm dünne Schnitte wurden angefertigt, mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt und bei 80 kV mit einem Zeiss EM 910 Elektronenmikroskop (Zeiss) analysiert. Die Aufnahmen wurden mit einer Quemesa CCD-Kamera unter Verwendung der iTEM-Software (Emsis GmbH) bei einer 5000-fachen Vergrößerung und einem Sichtfeld von 11,2 mal 7,4 µm pro Bild gemacht. Auswertung und Quantifizierung der Mitochondrien

erfolgte anhand von 9 unabhängigen Bildern pro Maus an verschiedenen Positionen der Leberschnitte.

2.11 Statistik

Die statistische Analyse und Erstellung der Graphen wurde mit Prism 9 (GraphPad) durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung normalverteilter Daten erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test, einseitiger ANOVA mit Tukeys multiplem Vergleichstest für die Post-hoc-Analyse und zweiseitiger (wiederholte Messungen) ANOVA mit Bonferronis multiplem Vergleichstest. Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und Kruskal Wallis-Test mit Dunns multiplem Vergleichstest analysiert. Hierfür wurden im Vorfeld Normalverteilungstests durchgeführt. Bei allen Auswertungen wurde die statistische Signifikanz mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ angegeben.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden als Erstautorenschaft in der Fachpublikation mit dem Titel: „Impact of metabolic stress induced by diets, aging and fasting on tissue oxygen consumption“ im Fachjournal *Molecular Metabolism* veröffentlicht (1).

Der erste Abschnitt der Ergebnisse widmet sich der Etablierungsarbeit der angewandten Methode. Im zweiten Abschnitt erfolgt die Analyse des Einflusses von metabolischem Stress, induziert durch Diät, Altern und Fasten, auf die Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) der Mitochondrien. Dabei werden zusätzlich zu der etablierten Seahorse-Gewebemessung weitere Methoden zur Ergänzung herangezogen.

3.1 Methodenetablierung zur Messung von OCR im Gewebe

3.1.1 Experimenteller Ablauf

Für einen besseren Überblick und Verständnis der Methode ist das experimentelle Verfahren und der Aufbau zur Messung der OCR anhand von Gewebebiopsien in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

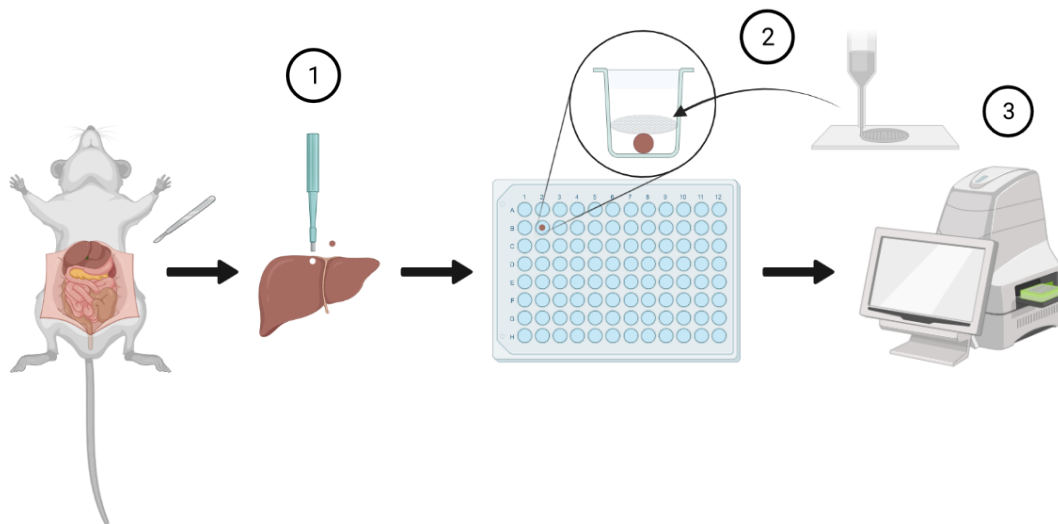


Abbildung 2. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes der Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) ex vivo im Gewebe

Nach Euthanasie wird das Gewebe, hier für die Leber dargestellt, aus dem Tier entnommen und es werden unverzüglich Gewebebiopsien mit Hilfe von Stanzen angefertigt (①). Die frisch gestanzten Biopsien werden direkt in die, mit Assay Medium gefüllte und auf 37°C erwärmte, 96-Well Platte überführt. Damit sich die Biopsien in korrekter Position für die Messungen befinden, wurden im Vorfeld Mikrosiebe im 3D-Druck gefertigt (②). Diese werden direkt auf die Gewebebiopsie gegeben und im Anschluss werden die Messungen mittels Seahorse XF Flux Analyzer durchgeführt. Um die mitochondriale Funktion genauer charakterisieren zu können, werden nach der Messung der basalen OCR Messung Entkoppler und Inhibitoren appliziert (③). (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1))

Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Einfügen eingekreist Nummerierungen

Im Rahmen der Etablierung der Methode, wurden an verschiedenen Arbeitsschritten des experimentellen Ablaufes Vorversuche durchgeführt, um adäquate Messungen gewährleisten zu können. Diese wichtigen Schlüssel- sowie Etablierungsschritte sind in Abbildung 2 mit einer eingekreisten Nummerierung gekennzeichnet und auf diese wird im Folgenden genauer eingegangen.

① Stanzgröße

Neville und Kollegen etablierten die OCR Messungen für das Gehirngewebe der *Drosophila* Fliege, welches sehr klein ist und somit als Ganzes ins Well überführt werden kann (34). Bei murinen Organen, wie Leber-, Fett-, Pankreas- und Herzgewebe, die deutlich größer und voluminöser sind, ist dies nicht möglich. Daher wurden in der vorliegenden Dissertation die Gewebeproben mittels Stanzen (Biopsy punch, plunger type; KAI medical) angefertigt, um eine identische Probengröße des gleichen Organs sicherzustellen. Zur Identifizierung der passenden Stanzgröße, wurden während des Etablierungsprozesses verschiedene Stanzgrößen mit einem Durchmesser von 1, 1,5 und 2 mm für die jeweiligen Gewebe getestet und nach der basalen Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) bewertet. In Abbildung 3 ist beispielhaft die Evaluation unterschiedlicher Stanzgrößen für das weiße Fettgewebe (eWAT) dargestellt. Für jedes Gewebe wurde die kleinste geeignete Stanzgröße der Gewebebiopsie gewählt, die eine ausreichende OCR ergab. Daher wurden für die verschiedenen Organe folgende unterschiedliche Stanzgrößen nach den durchgeführten Vorversuchen etabliert: Leber: 1 mm, linker Ventrikel (LV): 1 mm, Pankreas: 1 mm, epididymales weißes Fettgewebe (eWAT): 1,5 mm und braunes Fettgewebe (BAT): 1,5 mm.

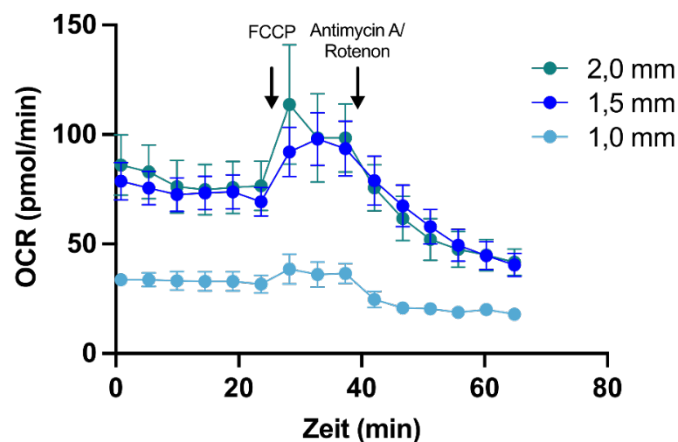


Abbildung 3. Evaluation unterschiedlicher Stanzgrößen

Für die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) wurden unterschiedliche Stanzgrößen mit einem Durchmesser von 1,0, 1,5 und 2,0 mm, hier für epididymales weißes Fettgewebe (eWAT) dargestellt, getestet. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; n=8. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1))

Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

② Mikrosiebe

Die Gewebebiopsien werden für die Messung unmittelbar nach dem frischen Stanzen in die 96-Well-Platte überführt, die mit Assay Medium befüllt ist. Hierbei befindet sich eine Gewebestanze in einem Well. Im Gegensatz zu adhärenen Zellen, welche am Boden der 96-Well-Platte fixiert sind, bewegen sich die Gewebebiopsien frei im Assaymedium. Um sicherzustellen, dass sich die Gewebeprobe korrekt im Messbereich des Gerätes befindet, wurden die Biopsien mithilfe von Mikrosieben in Position am Boden der Platte gehalten. Diese Mikrosiebe wurden vor der Messung mit einer Pinzette auf die Biopsien gegeben und fixieren diese somit. Zur Bewältigung der von Neville und Kollegen beschriebenen Produktionseinschränkungen (da handgefertigt) und um eine schnelle Herstellung der Mikrosiebe ermöglichen zu können, wurden diese mittels SLA-3D-Drucktechnologie (Stereolithographie) gefertigt (1, 34). In Abschnitt 2.6. des vorliegenden Manteltextes ist die Produktion der Mikrosiebe genauer dargestellt.

Für 3D-Drucker gibt es mehrere, unterschiedliche Harze. Um sicherzustellen, dass die benötigten Mikrosiebe die Gewebemessungen nicht verfälschen, wurden im Vorfeld Seahorse-Messungen an murinen primären Hepatozyten mit und ohne 3D-gedruckten Mikrosieben aus unterschiedlichen Harzen durchgeführt und verglichen. Einige Harze waren für die Messungen ungeeignet, es konnte jedoch ein Harz des Typs "Basic" (grün, Anycubic) identifiziert werden, welches die Messung nicht beeinflusste. Mit diesem Harz wurden die Mikrosiebe für alle folgenden Versuche hergestellt.

③ Entkoppler und Inhibitoren

Der Seahorse XFe96 verfügt über die Möglichkeit, Substanzen nach der Messung der basalen OCR zu applizieren, welche die Atmungskette beeinflussen und somit zur weiteren Charakterisierung der mitochondrialen Funktion dienen. In den Messungen von Zellen finden der Entkoppler FCCP und die Inhibitoren der Atmungskette Antimycin A und Rotenon bereits Anwendung. Um eine geeignete Konzentration dieser Substanzen für die Gewebemessungen zu definieren, wurden Titrationsexperimente durchgeführt (1). Die Konzentrationen des Entkopplers FCCP und der Inhibitoren Antimycin und Rotenon wurden deutlich höher gewählt als die Konzentrationen in Zelllinien-Messungen, da die Organbiopsie eine andere Permeabilität für die Substanzen als ein Monolayer kultivierter Zellen aufweist. Aus Literatur und eigenen Vorerfahrung wurden Anfangskonzentrationen gewählt und in Titrationsexperimenten getestet, um die Konzentration für das endgültige Protokoll zu definieren (34). Es wurde jeweils die niedrigste Konzentration der Substanz

gewählt, die einen stabilen Effekt bewirkte. Anhand der Titrationsversuche entschieden wir uns für eine FCCP (Sigma) Konzentration von 5 mM und eine Antimycin A (Sigma) und Rotenon (Sigma) Konzentration von jeweils 2,5 mM (1).

Nach Durchführung der oben beschriebenen Etablierungsschritte wurde ein für alle Gewebe verwendetes standardisiertes Laborprotokoll für die Seahorse-Gewebe-Messungen festgelegt (1). In den Folgeversuchen wurde strikt nach diesem standardisierten Protokoll vorgegangen.

3.1.2 Probemessungen unterschiedlicher Organe

Mithilfe des standardisierten Protokolls für die Seahorse-Gewebe-Messungen wurde die Methode zunächst an Leber-, Herz- (LV) und eWAT, als Gewebe mit höchster Relevanz im Hinblick auf ihre zelluläre Stoffwechselaktivität unter (patho-)physiologischen Bedingungen, getestet (Abbildung 4) (1).

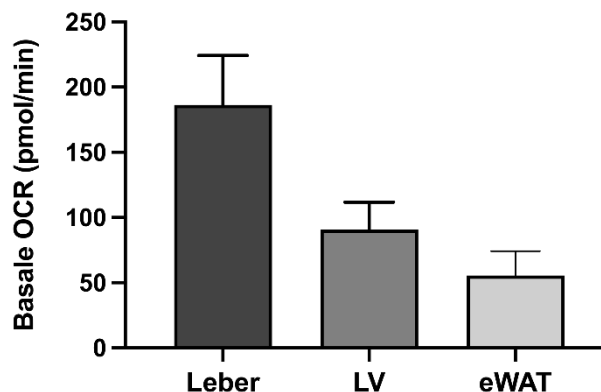


Abbildung 4. Basale Sauerstoffverbrauchsrate in Leber, linkem Ventrikel und weißem Fettgewebe

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; n=5. OCR, Oxygen consumption rate; LV, linker Ventrikel, eWAT, epididymales weißes Fettgewebe. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1))
Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

Da OCR Messungen in kultivierten Zellen, z. B. Hepatozyten, Adipozyten, Immunzellen oder Neuronen bereits gut etabliert sind und regelmäßig Anwendung finden, konnten die OCR Verhältnisse der Gewebe untereinander mit denen von Zellen verglichen werden. Die Messungen der Gewebebiopsien ergaben vergleichbare OCR Verhältnisse, wie sie für den jeweiligen Zelltyp (Hepatozyten, Kardiomyozyten oder Adipozyten) bereits beschrieben wurden (35-37).

Die etablierten Stanzgrößen bieten bereits eine gute Vergleichbarkeit für das jeweilige Gewebe. Um aber eine noch genauere Analyse der experimentellen Gruppen untereinander gewährleisten zu können, wurde in den folgenden Versuchen zusätzlich der Proteingehalt der Biopsien bestimmt und eine Normalisierung auf Proteingehalt

vorgenommen. Diese Normalisierung auf Proteingehalt wurde in allen folgenden OCR-Daten angewandt.

3.1.3 Testung der Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methodik

Im Anschluss an die Etablierungsarbeit, sowie nach erfolgreicher Testung unterschiedlicher Organgewebe und der Validierung der OCR Verhältnisse der Organe untereinander, wurde eine Basisreferenz bestimmt, indem die OCR in einigen stoffwechselrelevanten Organen ohne metabolischen Stress gemessen wurde.

Hierfür wurde eine Gruppe (1st group) junger, männlicher BL/6J Mäuse mit STD gefüttert und anschließend die OCR in Leber-, Fett- und Herzgewebe untersucht (Abbildung 5). 3 Monate später wurden die Messungen in einer weiteren Gruppe (2nd group) unter vergleichbaren Bedingungen (Alter, Ernährung, Zuchthintergrund) zur Untersuchung der Robustheit und Reproduzierbarkeit der Methode wiederholt. Beide Gruppen wiesen ein ähnliches Körpergewicht sowie ähnliche Körperzusammensetzung auf (1). In den Seahorse-Gewebe-Messungen zeigte sich in beiden Gruppen eine nahezu identische basale OCR in allen Geweben (Abbildung 5A). Nach Bestimmung der basalen OCR, wurde eine Entkopplung der Atmungskette durch FCCP induziert und somit die maximale OCR gemessen. Hierdurch kam es in allen untersuchten Geweben zu einem Anstieg der OCR (Abbildung 5B). Dieser durch FCCP stimulierte Anstieg der OCR zeigte sich aber interessanter Weise nicht so ausgeprägt, wie es von Messungen anhand von Zellen bekannt ist.

Aus der basalen und maximalen OCR wurde die Reservekapazität (*spare capacity*, SC) berechnet, welche die Anpassungsfähigkeit des Gewebes an Situationen mit erhöhtem ATP-Bedarf oder metabolischem Stress darstellt [34]. Es zeigte sich in allen untersuchten Geweben kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 5C).

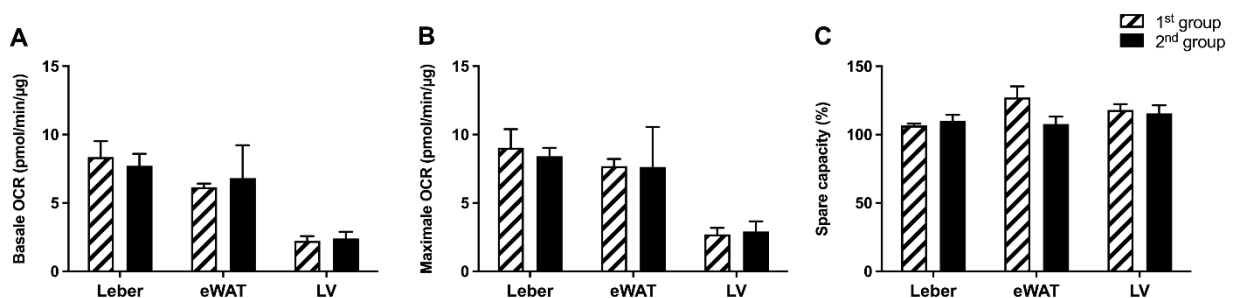


Abbildung 5. Testung der Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode.

(A) Basale Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate; OCR) in Leber, weißem Fettgewebe (eWAT) und linkem Ventrikel (LV). (B) Maximale OCR nach FCCP Applikation in Leber, eWAT und LV. (C) Reservekapazität (*Spare capacity*) in Leber, eWAT und LV. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; n=7 1st, n=5 2nd group. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1)) Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere OCR Messungen anhand von Gewebebiopsien die gleichen Verhältnisse widerspiegeln, wie sie von Zellen aus der Literatur bekannt sind. Die Gewebemessungen sind unabhängig von Umgebungsbedingungen und Zeitpunkt der Messung, methodisch reproduzierbar und liefern zuverlässige Ergebnisse.

Als nächstes untersuchten wir, ob Unterschiede im Zuchthintergrund zwischen BL/6J und BL/6N Einfluss auf die OCR haben. Hierbei wurden unter vergleichbaren Bedingungen keine Unterschiede in basaler und maximaler OCR, sowie SC im eWAT und Lebergewebe festgestellt (34). Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurde in den folgenden Versuchen mit zu Übergewicht neigenden BL/6J Mäusen gearbeitet, welche häufig Anwendung in metabolischen Studien finden.

3.2 Einfluss von metabolischem Stress auf die OCR

Nach erfolgreicher Etablierung der Methode, war das Ziel der Studie, den Einfluss von metabolischem Stress, induziert durch Diäten, Altern und Fasten, auf die OCR und somit die mitochondriale Funktion zu untersuchen (Abbildung 6). Hierfür wurde einerseits die neu etablierten Seahorse-Gewebe-Messungen durchgeführt und andererseits die mitochondriale Funktion mittels weiterer Methoden, wie Bestimmung der Atmungskettenkomplexe auf Proteinebene (OXPHOS Western Blot), Bestimmung wichtiger Faktoren der mitochondrialen Funktion (TFAM, OPA1) und der Elektronenmikroskopie charakterisiert.

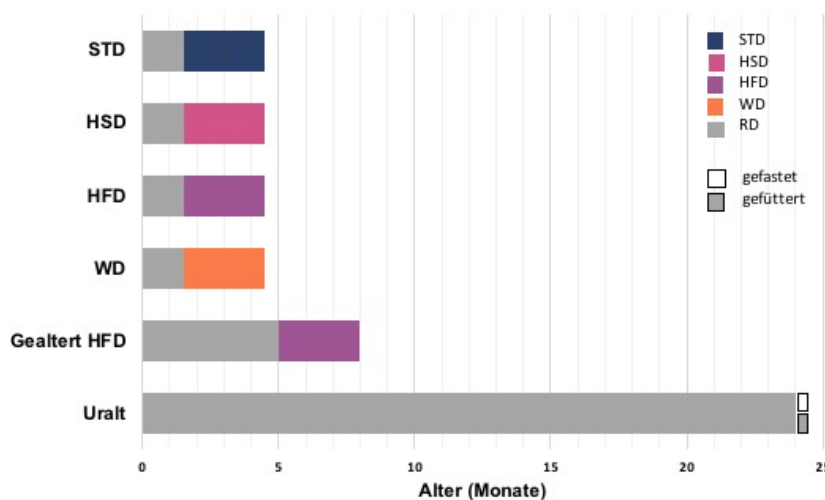


Abbildung 6. Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Diätinterventionen, des Alterns und des Fastens
 STD, Standarddiät; HSD, Hochzuckerdiät; HFD, Hochfettdiät; WD, Westerndiät; RD, Haltdiät.
 (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1)) Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

3.2.1 Diäteninterventionen

Ernährungsinterventionen wie HFD und WD werden häufig verwendet, um metabolischen Stress bei Mäusen auszulösen, der zu einer Reihe von Effekten führt, darunter Gewichtszunahme, Fettakkumulation, Insulinresistenz, Inflammation und/oder Fibrose. Wie erwartet, zeigten HFD-Mäuse bereits nach 8 Wochen und WD-Mäuse schon nach 7 Wochen ein erhöhtes Körpergewicht (Abbildung 7A). Darüber hinaus wurde während der HFD und WD eine signifikante Zunahme der Körperfettmasse beobachtet, während es keine Unterschiede in der fettfreien Körpermasse gab (Abbildung 7B). Vor der Entnahme der Gewebebiopsien wurden die einzelnen Organe gewogen. Die mit HFD gefütterten Mäuse wiesen ein erhöhtes Gewicht des eWAT auf ($p=0,008$), während die mit WD gefütterten Mäuse ein erhöhtes Gewicht von eWAT und BAT aufwiesen ($p=0,030$ bzw. $p=0,025$, Abbildung 7C). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Gewichten von Pankreas, Niere, Milz und Herz festgestellt, und überraschenderweise zeigten auch die Lebergewichte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 7C und Daten nicht dargestellt) (1). Nach Abschluss der Diätenintervention wurde die OCR in einigen stoffwechselrelevanten Geweben untersucht. Hierbei wurde interessanterweise kein Einfluss der Diäten auf die hepatische OCR festgestellt (Abbildung 7D-F). Im eWAT hingegen wurde ein Trend zu einer reduzierten, basalen und maximalen OCR in allen Diätgruppen im Vergleich zur STD beobachtet, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 7G, H). Im BAT zeigten die HSD gefütterten Mäuse eine signifikant höhere OCR im Vergleich zur HFD-Gruppe ($p=0,042$, Abbildung 7J). Der gleiche Trend wurde bei der maximalen OCR beobachtet, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0.056$; Abbildung 7K). Anschließend wurde untersucht, inwieweit die verschiedenen Diäten die Zusammensetzung der Mitochondrien beeinflussen. Dazu wurde die Expression verschiedener repräsentativer Proteine der Atmungskettenkomplexe mittels OXPHOS Western Blot Analysen bestimmt. Diese Daten bestätigten unsere OCR Ergebnisse. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in der Zusammensetzung der mitochondrialen Komplexe in der Leber (1). Im eWAT hingegen wurde eine reduzierte Expression von Komplex II und Komplex IV der Atmungskette in allen Diätengruppen im Vergleich zur STD beobachtet ($p\leq 0,001$). Die WD führte außerdem zu einer Reduktion von Komplex I ($p=0,007$, Abbildung 7M, N). Ähnliche Ergebnisse wurden in unseren OCR Messungen festgestellt, jedoch ohne statistische Signifikanz. Interessanterweise beobachteten wir im BAT einen signifikanten Anstieg des

Komplex-IV-Proteins bei den mit HSD und WD gefütterten Mäusen. Zusätzlich wurde bei den WD gefütterten Mäusen auch ein Anstieg des Komplex-III-Proteins festgestellt (beide $p < 0,001$; Abbildung 7O, P). Unsere Messungen der OCR im BAT zeigten einen ähnlichen Trend bei den Mäusen, die mit HSD und WD gefüttert wurden (Abbildung 7J, K).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die dreimonatige Diäteninterventionen in jungem Alter nur eine geringe Auswirkung auf die OCR im Gewebe hatten. Allerdings konnten einige strukturelle Anpassungen in der Leber, dem eWAT und BAT festgestellt werden.

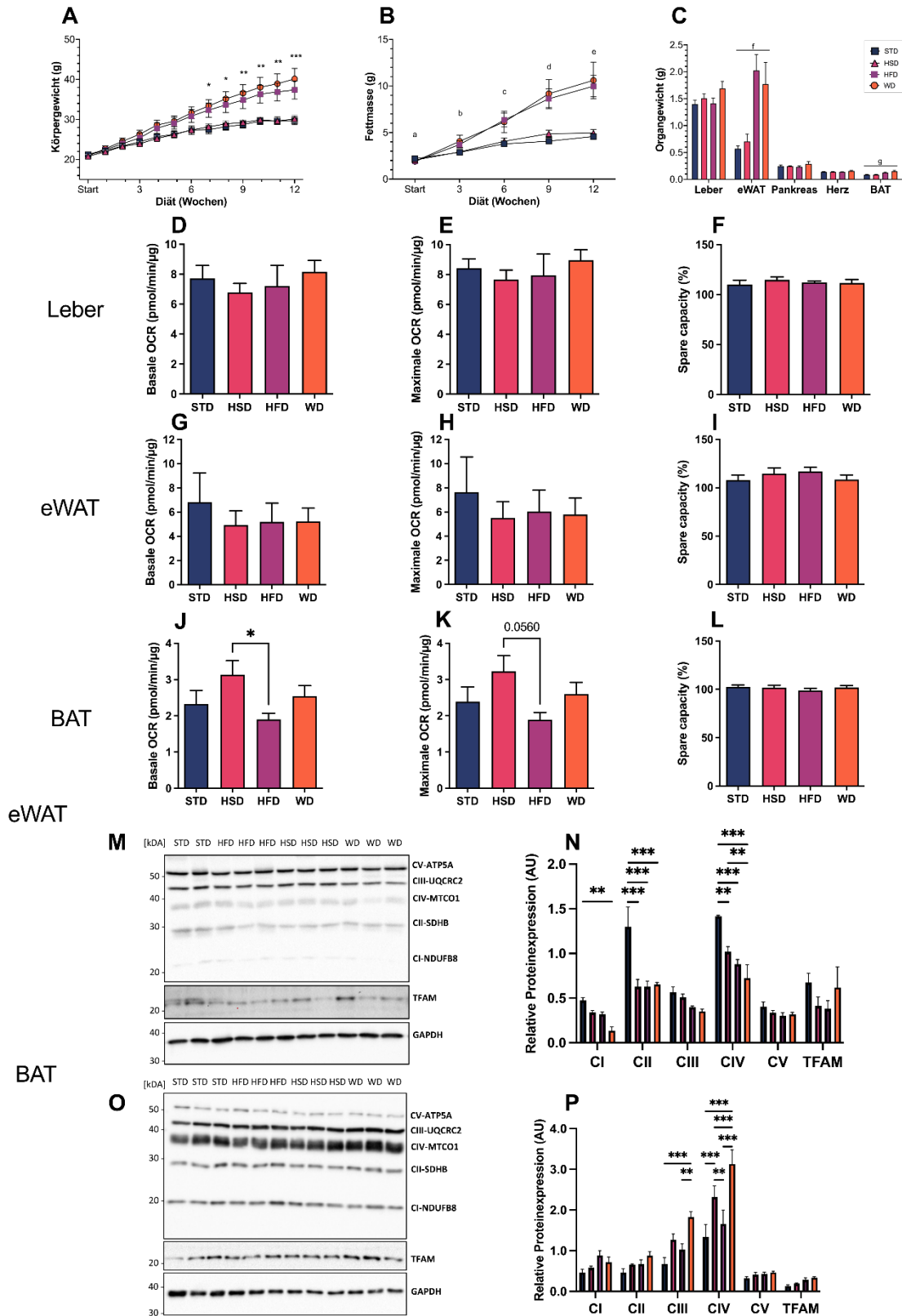


Abbildung 7. Evaluierung verschiedener Diätinterventionen

Körperparameter, OCR, OXPHOS und TFAM in Geweben nach 12 Wochen Standarddiät (STD), Hochzuckerdiät (HSD), Hochfettdiät (HFD) oder Westerndiät (WD). **(A)** Gewichtsverlauf. **(B)** Fettmasse; a-c, nicht signifikant (ns), d, STD vs. HFD $p = 0.001$, STD vs. WD $p = 0.0002$, STD vs. HSD ns, HSD vs. HFD $p = 0.006$, HSD vs. WD $p = 0.0011$, HFD vs. WD ns; e, STD vs. HFD $p < 0.0001$, STD vs. WD $p < 0.0001$, STD vs. HSD ns, HSD vs. HFD $p < 0.0001$, HSD vs. WD $p < 0.0001$, HFD vs. WD ns. **(C)** Organengewichte nach Diätintervention; f, STD vs. HFD $p = 0.008$, STD vs. WD

$p = 0.03$, HSD vs. HFD $p = 0.011$, HSD vs. WD $p = 0.001$. g, STD vs. WD $p = 0.025$, HSD vs. WD $p = 0.0181$. **(D-F)** Basale (D), maximale OCR (E) und *spare capacity* (SC) (F) von der Leber. **(G-I)** Basale (G), maximale OCR (H) und SC (I) vom epididymalem weißen Fettgewebe (eWAT). **(J-L)** Basale (J), maximale OCR (K) und SC (L) von braunem Fettgewebe (BAT). **(M)** Repräsentativer Blot der OXPHOS Komplexe I-V, TFAM und GAPDH in eWAT. **(N)** Quantifizierung der Western Blot Analyse der Atmungskettenkomplexe und TFAM in eWAT. **(O)** Repräsentativer Blot der OXPHOS Komplexe I-V, TFAM und GAPDH in BAT. **(P)** Quantifizierung der Western Blot Analyse der Atmungskettenkomplexe und TFAM in BAT. **(N, P)** Relativer Proteingehalt von Komplex I (CI: NDUF8), Komplex II (CII: SDHB), Komplex III (CIII: MTCO1), Komplex IV (CIV: UQCRC2), Komplex V (CV: ATP5A) und TFAM auf GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle normalisiert. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Statistische Signifikanz wurde mit einer einfachen ANOVA mit Tukeys multiplen Vergleichstest (C (getestet pro Gewebe), D, E, I, P-R) or Kruskal-Wallis Test by ranks mit Dunns multiplen Vergleichstest (F-H) oder zweifacher ANOVA mit Bonferronis multiplen Vergleichstest (A, B, N, P) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n = 5$ STD, $n = 6$ HSD/HFD/WD (A-R). AU, arbitrary units; BAT, braunes Fettgewebe; eWAT, epididymales weißes Fettgewebe; TFAM, Transcription Factor A, Mitochondrial. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1)) Modifizierung: Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

3.2.2 HFD in fortgeschrittenem Alter

Nachdem eine Diätenintervention mit unterschiedlichen Nährstoffen in jungem Alter nur marginalen Einfluss auf die mitochondriale Funktion zeigte, wurde der Einfluss einer HFD in Kombination mit fortgeschrittenem Alter untersucht. Hierfür wurden 30 Wochen alte Mäuse (gealtert) mit 18 Wochen alten Mäusen verglichen. Beide Gruppen erhielten eine HFD über 12 Wochen. Die gealterten Mäuse wiesen sowohl ein erhöhtes Körpergewicht als auch eine erhöhte Fettmasse, aber keine Unterschiede in der fettfreien Körpermasse auf ($p=0,013$ und $p=0,019$; Abbildung 8A, B). Außerdem wurde in den gealterten Mäusen ein erhöhtes Leber-, eWAT- und BAT-Gewicht festgestellt ($p=0,023$, $p=0,031$ und $p=0,037$; Abbildung 8C). Trotz der erhöhten Lebermasse zeigte sich kein Unterschied in der basalen und maximalen OCR zwischen den Gruppen (Abbildung 8D, E). Die gealterten Mäuse wiesen jedoch eine reduzierte hepatische SC auf, was einen Hinweis auf eine reduzierte metabolische Flexibilität geben könnte ($p < 0,001$, Abbildung 8F). In den Fettgeweben, eWAT und BAT, wurden hingegen eine signifikante Zunahme der basalen und maximalen OCR festgestellt ($p=0,007$, $p=0,008$; Abbildung 8G, H und $p=0,001$, $p=0,011$; Abbildung 8J, K). Die SC unterschied sich im eWAT und BAT in den beiden Gruppen nicht (Abbildung 8I, L). Im LV zeigten sich weder Unterschiede in der OCR noch in der SC (Daten nicht dargestellt) (1).

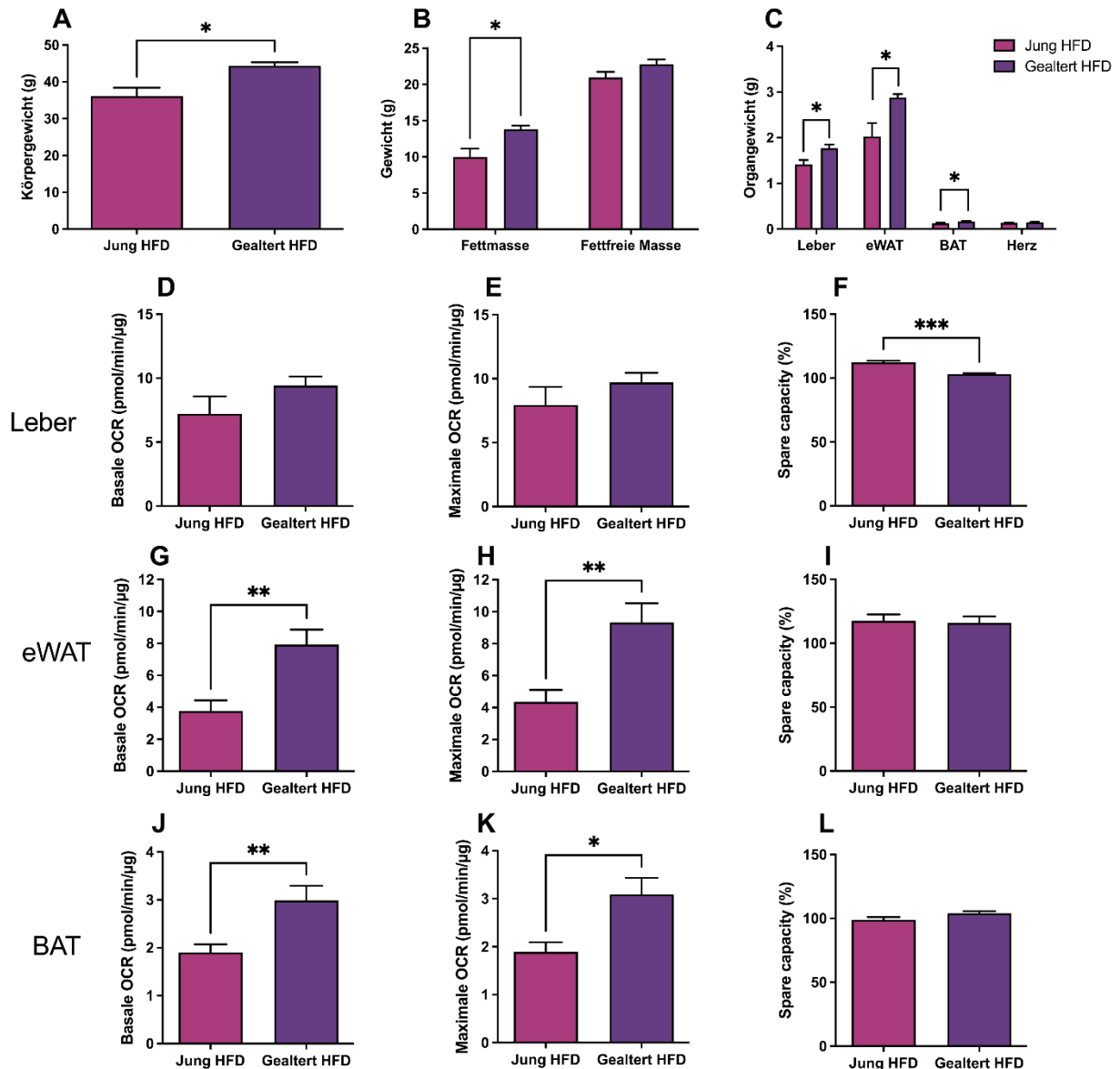


Abbildung 8. Altern auf Hochfett-diät (HFD)

Körpergewicht, Körperzusammensetzung und OCR in Geweben von jungen (18 Wochen) vs. gealterten (30 Wochen) männlichen Mäusen nach 12 Wochen Hochfett-diät (HFD). **(A)** Körpergewicht nach 12 Wochen HFD. **(B)** Fett- und fettfreie Masse. **(C)** Finale Organgewichte. **(D-F)** Basale (D), maximale OCR (E) und *spare capacity* (SC) (F) von der Leber. **(G-I)** Basale (G), maximale OCR (H) und SC (I) von epididymalem weißen Fettgewebe (eWAT). **(J-L)** Basale (J), maximale OCR (K) und SC (L) von braunem Fettgewebe (BAT). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test (A, B, C (getestet pro Gewebe), E-J, L) oder einem Mann-Whitney-U-Test (K) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=12$ (A-C); $n=6$ Jung HFD, $n=5$ Gealtert HFD. BAT, braunes Fettgewebe; eWAT, epididymales weißes Fettgewebe. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1))
 Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

3.2.3 Prolongiertes Altern

Nachdem bei der Kombination aus HFD und fortgeschrittenem Alter Effekte auf die mitochondriale Atmung festgestellt wurden, erfolgte eine vertiefte Untersuchung des Einflusses von prolongiertem Altern. Zu diesem Zweck wurde die mitochondriale Funktion in verschiedenen Geweben von prolongiert gealterten Mäusen (uralt) analysiert. Die

Mäuse wurden für 96 Wochen auf RD gealtert und mit 18 Wochen jungen Mäusen verglichen. In den uralten Mäusen wurde eine signifikante Gewichtszunahme festgestellt, sowohl in Bezug auf das Körpergewicht ($p=0,006$; Abbildung 9A) als auch hinsichtlich der Fett- und fettfreien Masse ($p=0,016$ und $p=0,001$; Abbildung 9B). Bezüglich der Organengewichte wurden bei den uralten Mäusen erhöhte Werte für Leber, Herz, Niere (alle $p<0,001$), Pankreas ($p=0,0014$) und Tendenzen beim eWAT ($p=0,053$) beobachtet, während keine Gewichtsunterschiede von BAT und Milz festgestellt wurden (Abbildung 9C).

Das Leber- und Pankreasgewebe zeigte keine Unterschiede in der OCR (Abbildung 9D-F und Daten nicht gezeigt). Hingegen wurden im LV der uralten Mäuse eine signifikant erhöhte basale ($p=0,037$) und maximale OCR ($p=0,029$) sowie SC ($p=0,029$) beobachtet (Abbildung 9G-I). Im eWAT der uralten Mäuse wurde eine erhöhte SC detektiert ($p=0,042$), während es keine Unterschiede in der basalen und maximalen OCR gab (Abbildung 9J-L). Im BAT wiesen die uralten Tiere erhöhte Werte für die basale als auch die maximale OCR sowie die SC auf ($p=0,009$, $p=0,005$ und $p=0,009$; Abbildung 9M-O). Zusammenfassend zeigen die Auswirkungen des Alterns, dass sowohl das Altern unter metabolischem Stress durch eine HFD als auch das prolongierte Altern über 2 Jahre zu einer erhöhten basalen und maximalen OCR im BAT führen. Interessanterweise lässt sich eine Reduktion der metabolischen Flexibilität der Leber durch Altern auf HFD beobachten, während dieser Effekt nach prolongiertem Altern nicht auftrat.

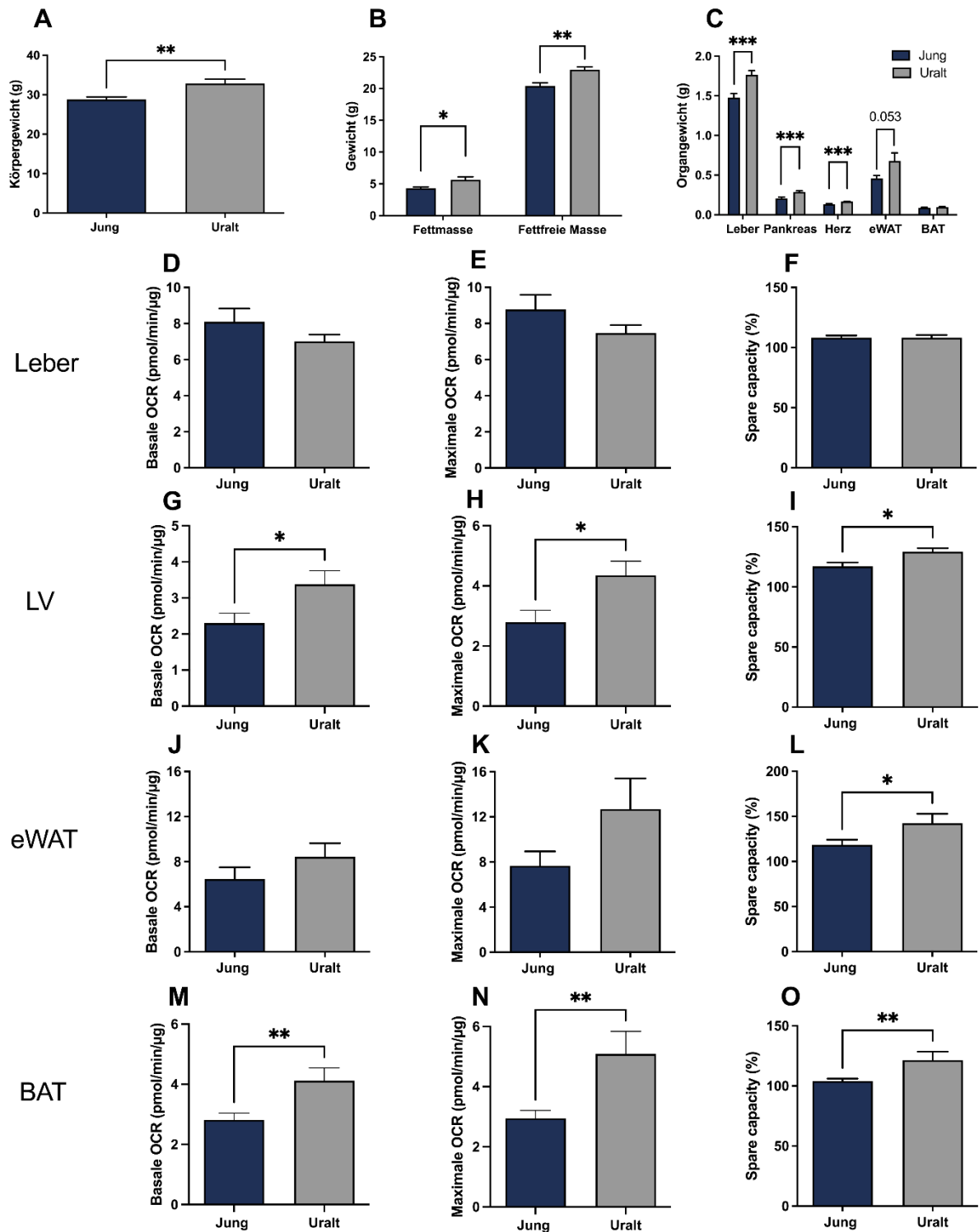


Abbildung 9. Analyse von prolongiertem Altern

Körpergewicht, Körperzusammensetzung und OCR in Geweben von jungen (18 Wochen) vs. uralten (2 Jahre) männlichen Mäusen. **(A)** Körpergewicht. **(B)** Fett- und fettfreie Masse. **(C)** Organgewichte. **(D-F)** Basale (D), maximale OCR (E) und *spare capacity* (SC) (F) von der Leber. **(G-I)** Basale (G), maximale OCR (H) und SC (I) von Pankreas. **(J-L)** Basale (J), maximale OCR (K) und SC (L) vom linken Ventrikel (LV). **(M-O)** Basale (M), maximale OCR (N) und SC (O) von epididymalem weißem Fettgewebe (eWAT). **(P-R)** Basale (P), maximale OCR (Q) und SC (R) vom braunen Fettgewebe (BAT). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test bestimmt (A-O, C (getestet pro Gewebe)). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=12$ (A-C); $n=12$ Jung, $n=6$ Uralt (D-O). BAT, braunes Fettgewebe; eWAT, epididymales weißes Fettgewebe. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1)) Modifizierung: Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

3.2.4 Fasten

Der kurzzeitige, jedoch intensive Stressor Fasten stellt eine große Herausforderung für den Gesamtorganismus dar. Um den Einfluss des Fastens auf die mitochondriale Funktion genauer zu untersuchen, wurde eine Gruppe männlicher BL/6J Mäuse über Nacht gefastet, während die Kontrollgruppe uneingeschränkt Zugang zur Nahrung hatte. Nach der Fastenperiode zeigten die Mäuse im Vergleich zu den gefütterten Tieren eine leichte Verringerung des Körpergewichts und der Fettmasse bei gleichbleibender fettfreier Körpermasse ($p=0,0519$, $p=0,004$; Abbildung 10A, B). Die Mäuse der Fastengruppe wiesen zudem ein reduziertes Leber- und Pankreasgewicht auf ($p<0,0001$, $p=0,027$; Abbildung 10C). Andere Organe, wie das Fettgewebe, zeigten hingegen keine signifikanten Gewichtsunterschiede (Abbildung 10C) (1).

Die Messung der Gewebe OCR zeigte, dass die gefasteten Tiere nicht nur eine erhöhte hepatische basale OCR aufwiesen, sondern auch eine erhöhte hepatische maximale OCR ($p<0,005$, $p=0,027$; Abbildung 10D, E). Die SC, die Aufschluss über die Anpassungsfähigkeit des Organgewebes in Situationen mit erhöhtem ATP-Bedarf oder metabolischem Stress gibt (38), war hingegen in der Leber der gefasteten Tieren verringert ($p=0,003$; Abbildung 10F).

Interessanterweise zeigte auch das Pankreasgewebe der Fastengruppe eine erhöhte basale und maximale OCR (beide $p=0,001$; Abbildung 10G, H), die SC unterschied sich jedoch nicht (Abbildung 10I). Messungen des LV detektierten eine vergleichbare basale OCR, jedoch eine verringerte maximale OCR und, wie auch in der Leber, eine reduzierte SC in der Fastengruppe ($p=0,018$, $p=0,001$; Abbildung 10J-L). Diese Reduktion der SC konnte ebenfalls im eWAT der gefasteten Gruppe detektiert werden ($p=0,040$), während im BAT keine Unterschiede in der OCR oder SC beobachtet wurden (Daten nicht dargestellt).

Zusammenfassend wurde in den OCR Messungen eine signifikante Fasten-induzierte Hochregulierung in Leber- und Pankreasgewebe anhand unserer Gewebemessungen festgestellt.

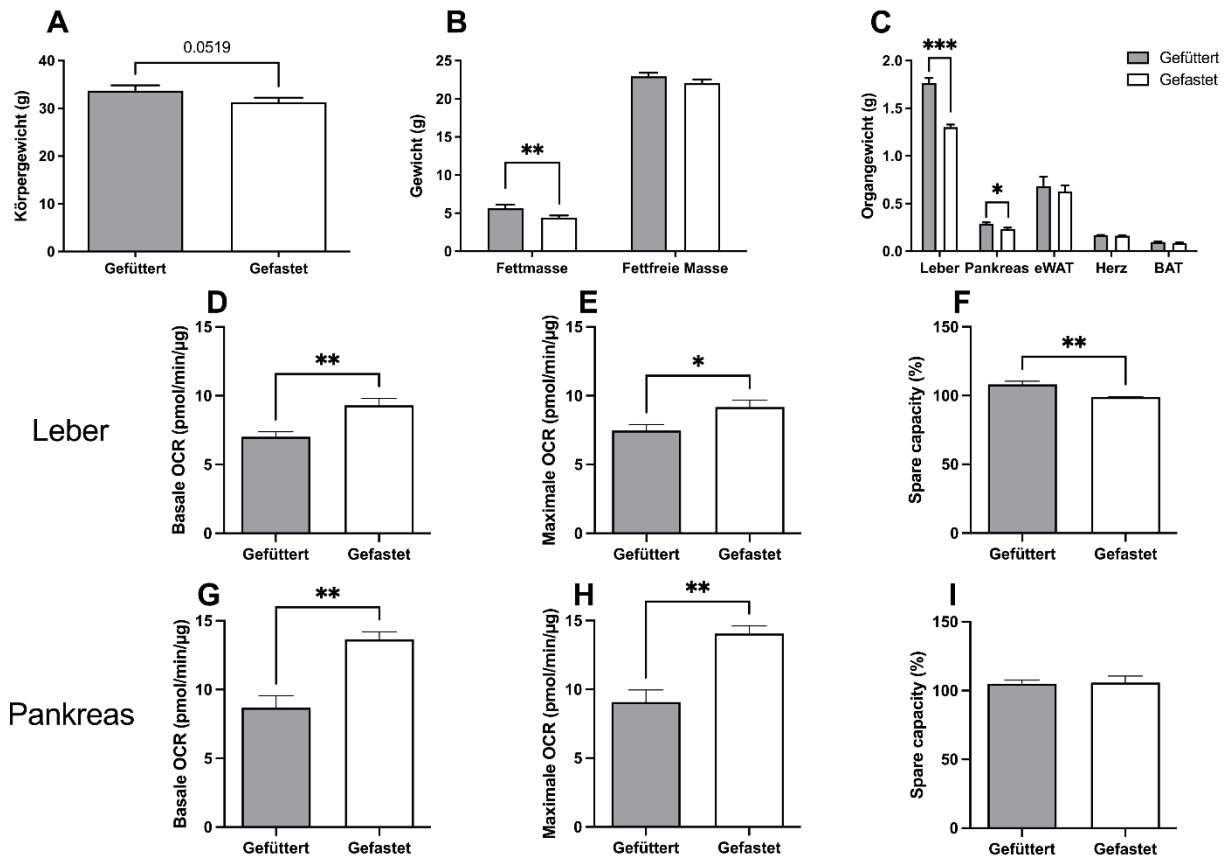


Abbildung 10. Effekte von Kurzzeitfasten

Körperparameter und OCR Messungen von gefütterten vs. über Nacht gefasteten männlichen Mäusen. **(A)** Körpergewicht. **(B)** Fett- und fettfreie Masse. **(C)** Organgewichte. **(D-F)** Basale (D), maximale OCR (E) und *spare capacity* (SC) (F) von der Leber. **(G-I)** Basale, maximale OCR und SC von Pankreas. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test (B (fettfreie Masse), C (Leber, Herz, eWAT, Pankreas), D-L, P, Q) oder Mann-Whitney-U-Test (A, B (Fettmasse), C (BAT)) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=12$ (A, B, C); $n=6$ (D-I); BAT, braunes Fettgewebe; eWAT, epididymales weißes Fettgewebe. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1)) Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

Ergänzend wurden weitere Analysen durchgeführt, um zu untersuchen, inwiefern diese Hochregulation der OCR nach Fasten auch auf RNA- und Proteinebene nachweisbar ist. Hierfür wurde die Expression von *Tfam* (mitochondrialen Transkriptionsfaktors A), der als Aktivator der mitochondrialen Transkription fungiert, sowie *Opa1* (mitochondrial dynamin like GTPase) untersucht. Es wurde ein Trend zur Hochregulation der hepatischen *Tfam* und *Opa1* Expression bei den gefasteten Tieren beobachtet (Abbildung 11A). Auf Proteinebene waren diese Effekte jedoch (noch) nicht nachweisbar, auch nicht bei den verschiedenen Atmungskettenkomplexen (Fig. 11B, C). Aufgrund der geringen Größe der mitochondrialen Strukturen ist die Elektronenmikroskopie der Goldstandard für deren Analyse. Daher wurden die Hepatozyten der gefasteten und gefütterten Gruppen mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Dabei wurde eine signifikant erhöhte Mitochondrienanzahl in den Hepatozyten der gefasteten Mäuse festgestellt ($p=0,006$).

Gleichzeitig war die mitochondriale Fläche signifikant reduziert ($p=0,015$; Abbildung 11E). Es wurden jedoch keine weiteren offensichtlichen, strukturellen Unterschiede oder Veränderungen in den Mitochondrien festgestellt (1).

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass bei Fastenbedingungen eine spezifische Hochregulation der mitochondrialen Atmung und eine Verringerung des Organgewichts in energieproduzierenden Geweben wie Leber und Pankreas stattfindet. Gleichzeitig wurde jedoch auch ein Verlust an metabolischer Flexibilität in Organen wie der Leber beobachtet, was wahrscheinlich auf einen Mangel an Energieressourcen während des Fastens zurückzuführen ist. Diese durch das Fasten vermittelten Effekte, die auch durch die elektronenmikroskopische Analyse bestätigt wurden, konnten bereits durch unsere OCR-Gewebe-Messungen nachgewiesen werden (1).

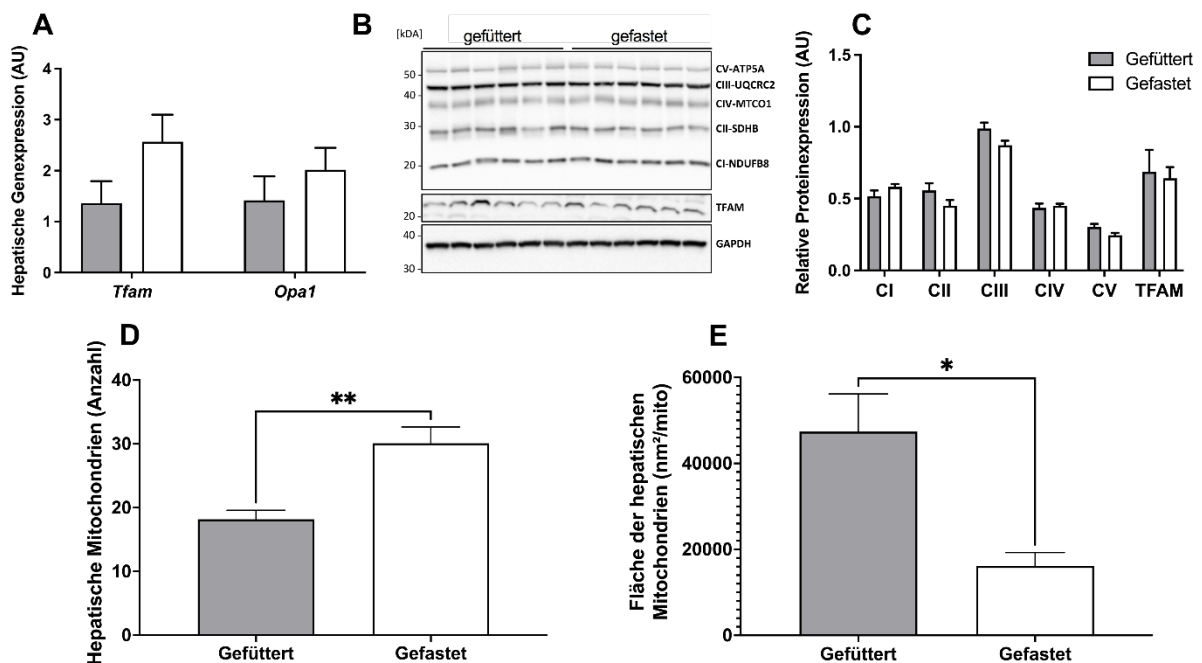


Abbildung 11. Einfluss von Fasten auf die hepatischen Mitochondrien

(A) Hepatische Genexpression von *Tfam* and *Opa1*. (B) Repräsentativer Blot von den OXPHOS Komplexen I-V, TFAM und GAPDH in der Leber. (C) Western Blot Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe in der Leber. Relativer Proteingehalt von Komplex I (CI: NDUFB8), Komplex II (CII: SDHB), Komplex III (CIII: MTCO1), Komplex IV (CIV: UQCRC2), Komplex V (CV: ATP5A) und TFAM auf GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle normalisiert. (D) Auswertung der elektronenmikroskopischen Analyse der Mitochondrienanzahl in den Hepatozyten. (E) Berechnung der durchschnittlichen Fläche pro Mitochondrium. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Statistische Signifikanz wurde mit einer zweifachen ANOVA mit Bonferronis multiplen Vergleichstest oder zweiseitigen ungepaarten t-Test (D, E) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. $n=12$ (A-C); $n=6$ (A, B), $n=4$ (D, E); mito, Mitochondrium; AU, arbitrary units; *Opa1*, mitochondrial dynamin like GTPase; TFAM, Transcription Factor A, Mitochondrial. (Modifiziert nach Mackert et al., 2022 (1) Modifizierungen: Ausschnitt der Originalabbildung, Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde eine neue Methode zur Bestimmung mitochondrialer Atmung im Gewebe weiterentwickelt (1). Inspiriert durch die Arbeit von Neville und Kollegen, die die mitochondriale Funktion direkt im Gehirn der *Drosophila* Fliege bestimmten, wurde die Analyse der OCR für murine Gewebebiopsien etabliert (1, 34). Mit einem optimierten Protokoll, definierten Biopsiestanzen (1-1,5 mm Durchmesser) und einer verbesserten Produktion der Mikrosiebe mithilfe von 3D-Druck-Technik war es möglich, die mitochondriale Funktion in diversen (murinen) Geweben im 96-Well-Format zu analysieren. Die Messungen wurden für einige metabolisch relevanten Gewebe, wie Leber, weißes und braunes Fettgewebe, Pankreas und Herzmuskel (LV) standardisiert. Anschließend wurden hiermit Messung der OCR in Gewebebiopsien durchgeführt, um den Einfluss wichtiger metabolischer Stressoren auf die mitochondriale Funktion zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss verschiedener Nährstoffe in Form von Diäten (STD, HSD, HFD, WD), sowie Effekte des Alterns und des Fastens analysiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach 12 Wochen Diätenintervention (HSD, HFD, WD) in jungem Alter nur geringe Effekte (HFD und WD) auf die mitochondriale Funktion festgestellt wurden, da möglicherweise eine physiologische Gegenregulation als Kompensationsmechanismus stattfindet. Im Gegensatz zu den jungen Mäusen, reduzierte eine HFD bei gealterten Mäusen die hepatische metabolische Flexibilität, wohingegen sie im eWAT und BAT, einen Anstieg der OCR induzierte. Erstaunlicherweise konnte solch eine Reduktion der metabolischen Flexibilität der Leber durch einen prolongierten Altersprozess von 2 Jahren ohne zusätzlichen metabolischen Stress nicht beobachtet werden. Nach dem prolongierten Alterungsprozess wurde jedoch ebenfalls eine Hochregulation der OCR im BAT festgestellt.

Der metabolische Kurzzeitstressor Fasten führte zu einer Reduktion des Leber- und Pankreasgewichts und einer Steigerung der OCR in genau diesen Geweben. Darüber hinaus induzierte Fasten eine Reduktion der SC in Leber, eWAT und LV und damit eine verminderte Anpassungsfähigkeit an Situationen mit erhöhtem ATP-Bedarf (1). Für einen besseren Überblick sind die Ergebnisse in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

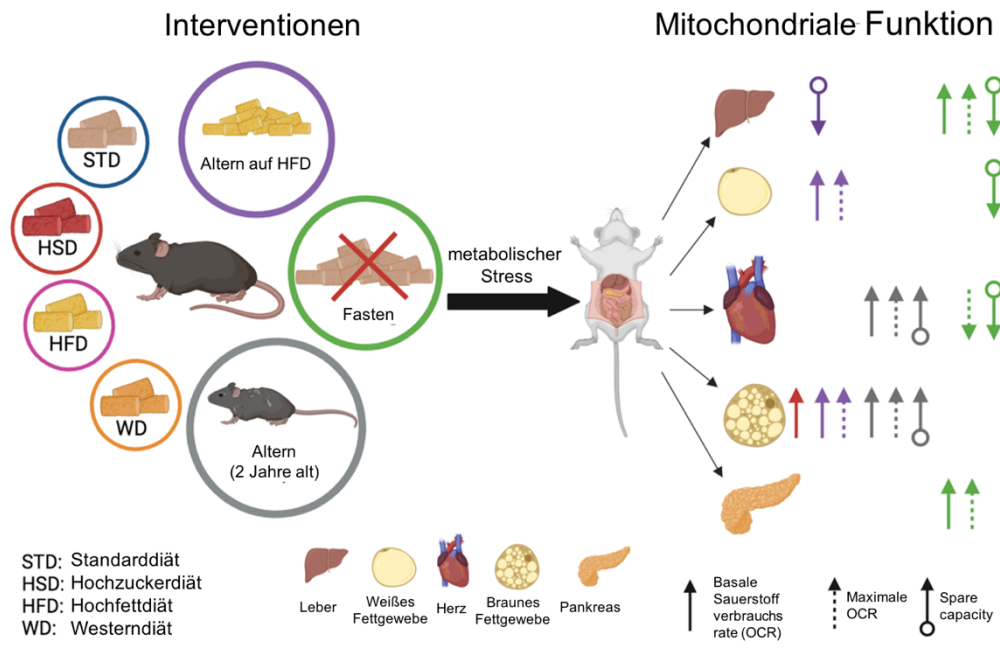


Abbildung 12. Darstellung des experimentellen Ablaufes sowie der wichtigsten Ergebnisse
 (Modifizierung des Graphical Abstracts nach Mackert et al., 2022 (1))
 Modifizierung: Abbildung in deutscher Sprache dargestellt

4.1 Messung der OCR in Geweben

Im Vergleich zu Messungen mit Zellen bietet die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Methodik den Vorteil *ex vivo* in Echtzeit die mitochondriale Funktion anhand OCR bestimmen zu können. Die Komplexität des Gewebes, die Mikroumgebung und die intakte parakrine Kommunikation verschiedener Zellgruppen können erhalten bleiben und erlauben somit eine physiologischere Darstellung der Organfunktion als in der Zellkultur.

Die Analyse von Funktionsparametern der Atmungskette war bisher nur an einer kleinen Anzahl von Proben möglich, da die Messungen mit dem Oroboros-System durchgeführt wurden (33). Studien an isolierten Zellen haben bereits bessere Informationen über die mitochondriale Funktion geliefert als isolierte Mitochondrien. Durch die Isolierung und Kultivierung von Zellen werden jedoch die Eigenschaften der Zellen und Mitochondrien selbst massiv verändert (32). Anhand der Messungen von murinen Gewebebiopsien ist der Kultivierungsprozess nicht notwendig und die Analyse der mitochondrialen Atmung kann *ex vivo* in Echtzeit stattfinden. Die Methode erlaubt es außerdem Inhibitoren und Entkoppler der Atmungskette einzusetzen. Dies war bisher jedoch nur für adhärente Zellen möglich (30, 39, 40).

4.2 Einfluss unterschiedlicher Diäten auf die mitochondriale Funktion

Nach 12 Wochen Diätintervention in jungem Alter konnten lediglich geringfügige Auswirkungen auf die OCR von Leber und eWAT beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Cummins und Kollegen, die keine signifikanten Auswirkungen einer 6 Wochen HFD auf die mitochondriale Funktion im WAT feststellten. Jedoch war eine Tendenz zu einer reduzierten mitochondrialen Funktion erkennbar (41). In unserer Studie zeigten sich ähnliches (1). Im Gegensatz zur OCR konnten auch wir, wie bereits von Cummins und Kollegen berichtet, eine Reduktion einiger Atmungskettenkomplexe auf Proteinebene im eWAT nach HFD detektieren. Interessanterweise zeigte sich diese Reduktion der Atmungskettenkomplexe sowohl nach HFD als auch nach HSD und WD. Es scheint daher, dass die Mitochondrien der jungen Tiere in der Lage sind, sich an den metabolischen Stress anzupassen und es somit trotz der verringerten Atmungskettenkomplexe zu (noch) keiner Veränderung der OCR kommt.

Eine HSD führte zu einer erhöhten OCR und einem Anstieg des Atmungskettenkomplexes IV im BAT. Interessanterweise wurde dieser Effekt nicht nur nach 12 Wochen HSD beobachtet. Auch nach der WD zeigte sich die gleiche Tendenz in Bezug auf die OCR, sowie ein signifikanter Anstieg der Atmungskettenkomplexe II und IV. Somit lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die Saccharose in der Nahrung als treibender Faktor für die Hochregulation der OCR fungiert.

4.3 Einfluss von Altern auf die mitochondriale Atmung

Um den Einfluss von Altern auf die mitochondriale Atmung zu untersuchen, wurden einerseits gealterte Mäuse mit zusätzlichem metabolischem Stress durch 12 Wochen HFD und andererseits uralte Mäuse nach 2 Jahren RD analysiert.

In unserer Studie konnten wir eine altersbedingte Steigerung der basalen und maximalen OCR im BAT in beiden Altersgruppen beobachten. Das BAT spielt eine entscheidende Rolle bei der Thermoregulation durch Thermogenese, der Hochregulation des Energiestoffwechsels und dem Schutz vor Kälte und Übergewicht (42). Einige Studien haben bereits eine verbesserte BAT-Aktivität bei gealterten Tieren beschrieben (43-46). Thermoregulatorische Prozesse, wie Vasokonstriktion, können im Alter abnehmen, wodurch das BAT umso mehr zur Wärmeerzeugung benötigt wird, wie durch die erhöhte OCR in unserer Studie bestätigt wird (1). Im Gegensatz zu metabolischem Stress im jungen Alter, bei dem die Mitochondrien scheinbar in der Lage sind, sich anzupassen,

führte eine HFD bei gealterten Mäusen zu einer verringerten SC in der Leber. Somit verfügt die Leber über eine reduzierte metabolische Flexibilität. Interessanterweise wurde diese Reduktion der metabolischen Anpassungsfähigkeit in der Leber nach 2 Jahren Altern nicht beobachtet. Es scheint also, dass ein ungesunder Lebensstil im Erwachsenenalter schwerwiegendere Folgen hat, während (langanhaltendes) Altern allein unter Norm-Bedingungen das Gewebe nicht in gleichem Maße beeinträchtigt, selbst wenn es zu anderen altersbedingten Veränderungen wie die Gewichtszunahme der Organe kommt. Dies wird auch durch die im Rahmen unserer Studie detektierte verstärkte Ansammlung von Lipiden bzw. Triglyceriden in der Leber nach HFD veranschaulicht, ein Effekt, der nach RD nicht zu beobachten war (1).

Die kardiale Funktion, insbesondere die ventrikuläre Kontraktion und diastolische Entspannung, nimmt mit dem Alter ab. Daher wird möglicherweise mehr Energie benötigt, um die kontraktile Funktion der Kardiomyozyten aufrechtzuerhalten und eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus über die Blutbahn zu gewährleisten. Unsere Messungen deuten darauf hin, dass die Mitochondrien im LV auf die anspruchsvolleren Bedingungen mit erhöhter Atmungsaktivität, erhöhter basaler und maximaler OCR sowie SC reagieren. Eine altersbedingte Hochregulation von Proteinen, die für den mitochondrialen Energiestoffwechsel entscheidend sind, wurde bereits beschrieben (47-49). Unter anderem wurde beobachtet, dass die Aktivität der Cytochrom-C-Oxidase, die eine wichtige regulatorische Funktion für die mitochondriale Atmung in Kardiomyozyten spielt, mit dem Alter in Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen ansteigt (50-52). Im Gegensatz dazu zeigten Diätinterventionen im jungen Alter und eine HFD bei gealterten Mäusen keine Auswirkungen auf die kardiale OCR. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Herzfunktion so lange wie möglich erhalten bleibt und direkte Auswirkungen (leichter) metabolischer Belastungen auf das Herz abgeschwächt werden, während der Alterungsprozess zwangsläufig die kardiale Funktion beeinflusst und eine Hochregulation der OCR zur Aufrechterhaltung der Herzleistung induziert

4.4 Einfluss des Kurzzeitstressors Fasten

Der Kurzzeitstressor Fasten führte einerseits zu einer signifikanten Reduktion des Leber- und Pankreasgewichts und andererseits zu einer deutlichen Steigerung der mitochondrialen OCR in genau diesen Geweben. Auf struktureller Ebene kann ein

ähnlicher Trend in der mRNA Expression beobachtet werden, während auf Proteinebene noch keine Veränderungen erkennbar waren.

Die durch Fasten induzierte Steigerung der OCR im Leber- und Pankreasgewebe könnte im Zusammenhang mit der Glukagonsekretion und daraus resultierendem Abbau von Glykogen stehen. Während des Fastenprozesses wird aufgrund des Abfalls des Blutglukosespiegels die Ausschüttung von Glukagon aus den pankreatischen alpha-Zellen induziert, um eine physiologische Blutglukosekonzentration gewährleisten zu können (53-55). Damit diese Glukagonausschüttung adäquat ablaufen kann, werden erhöhte Konzentrationen des "uncoupling protein 2" benötigt, welches wiederum zu einem erhöhten Protonentransport und einer erhöhten Netto-Protonenleitfähigkeit führt (56). Dies lässt vermuten, dass so eine Entkoppelung der Atmungskette induziert wird und es hierdurch ein Anstieg der pankreatischen OCR zu erwarten ist, was auch durch unsere Daten bestätigt wird. Wie bereits mehrfach beschrieben, führt eine Behandlung mit Glukagon zu einem Anstieg der hepatischen Atmung. Die meisten Studien arbeiteten bisher jedoch mit isolierten Mitochondrien, um den Einfluss von Glukagon oder Fasten auf die hepatische, mitochondriale Atmung zu untersuchen (57-62). Im Gegensatz dazu wurde in unserer Studie der Einfluss des Fastens auf die mitochondriale Funktion anhand der *ex vivo* Messungen im Gewebe untersucht und es wurde ebenfalls eine erhöhte hepatische basale und maximale OCR in gefasteten Mäusen detektiert. Analog zur Abnahme des Lebergewichts beobachteten wir im Elektronenmikroskop eine Verringerung der Mitochondriengröße in den Lebern der gefasteten Mäuse zusammen mit einer erhöhten Anzahl an Mitochondrien, während die Zusammensetzung der Atmungskomplexe der gefasteten Tiere unverändert blieb (1). Es scheint, dass die Mitochondrien an Größe verlieren, aber ihre Anzahl in gefasteten Hepatozyten zunimmt, möglicherweise aufgrund der Zellreduktion, und es somit zu einer verstärkten mitochondrialen Atmung kommt, wie in unseren Gewebemessungen beobachtet.

Außerdem wurden im Leber-, eWAT- und LV-Gewebe der gefasteten Tiere eine verringerte SC gemessen, die Aufschluss über die Anpassungsfähigkeit des Gewebes in Situationen mit erhöhtem ATP-Bedarf oder metabolischem Stress gibt (38). Die Daten weisen daher auf eine verringerte metabolische Flexibilität dieser Gewebe bei erhöhtem ATP-Bedarf hin, welche wahrscheinlich auf fehlende Energiereserven unter Fastenbedingungen zurückzuführen ist. Dadurch, dass das Gewebe durch den Fastenprozess die Energiereserven bereits verbraucht, die zur Kompensation des erhöhten ATP-Bedarfs notwendig wären, kommt es zu einer Reduktion der

metabolischen Flexibilität. Zusammenfassend nehmen wir an, dass Glukagon eine zentrale Rolle bei der durch Fasten vermittelten OCR Erhöhung in Leber und Pankreas spielt, und zwar nicht nur in isolierten Mitochondrien (57, 58, 60, 61), sondern auch *ex vivo* in Gewebebiopsien (1).

Interessanterweise verloren die Mäuse während der nächtlichen Fastenperiode nicht an eWAT-Gewicht, wie es zu erwarten wäre, sondern Leber- und Pankreasgewicht. Der Verbrauch von Leberreserven während prolongiertem Fasten durch Nutzung der hepatischen Glykogenspeicher für schnell verfügbare Energie, wurde bereits beschrieben (63). Die Reduktion des Pankreasgewichts hingegen könnte jedoch Folge der Fasten-induzierten Glukagonausschüttung aus den pankreatischen alpha-Zellen sein. Allerdings könnten auch exokrine Fettdepots des Pankreas als Energiereserve genutzt werden, um die gesteigerte mitochondriale Atmung ermöglichen zu können. Munhoz und Kollegen beschrieben eine Verkleinerung des Pankreas und eine Reduktion der Inselgröße nach 12 Wochen intermittierendem Fasten (63), während die Literatur zu den Auswirkungen von Fasten sehr begrenzt ist. Daher wäre es von besonderem Interesse, die Auswirkungen des Fastens in zukünftigen Studien genauer zu erforschen, z. B. durch die Untersuchung der histologischen Struktur und des pankreatischen Glukagongehalts in gefasteten Mäusen.

4.5 Limitationen

Bei der Anwendung von FCCP in unseren Gewebemessungen beobachteten wir einen Entkopplungseffekt wie in kultivierten Zellen, allerdings mit anderer Kinetik und Amplitude. Die Abschwächung des Entkopplungseffekts könnte darauf zurückzuführen sein, dass FCCP aufgrund der notwendigen Gewebediffusion die Mitochondrien im Gewebe nicht in gleichem Maße erreichen kann wie in Zellen. Da wir jedoch in jedem Gewebe mit identischen Gewebeständen gearbeitet haben, gehen wir davon aus, dass FCCP in jeder Biopsie gleichermaßen absorbiert wurde und somit eine relative Vergleichbarkeit innerhalb desselben Gewebes gegeben sein sollte. Die Inhibitoren Antimycin A und Rotenon dienen dazu, die mitochondriale Atmungskette abzuschalten. Da die Absorptionsprozesse der verwendeten Inhibitoren, Antimycin A und Rotenon, in den Gewebebiopsien nicht mit denen in Zellmonolayern vergleichbar waren, müssen die Protokolle für die Injektion der Inhibitoren in zukünftigen Studien weiter verfeinert und angepasst werden.

Eine Limitation dieser Studie war, dass die OCR Ergebnisse in kleinen Muskelbiopsien trotz zahlreicher Messversuche keine zufriedenstellenden Ergebnisse zur mitochondrialen Atmung lieferten. Dies beruht vermutlich auf Manipulationsschäden an der Faser- und Faszienintegrität während der Präparation und Stanzung des Muskels. Wir beabsichtigen daher, die Messungen im Muskelgewebe in folgenden Studien weiter zu untersuchen ohne dass die Integrität der Fasern und Faszien aufgrund von Schäden bei der Präparation verloren geht.

5 Implikationen für Praxis und zukünftige Forschung

Die von uns etablierte Methode erlaubt aktuell, die mitochondriale Funktion in murinen Geweben wie der Leber, dem Fettgewebe, Pankreas und Herz *ex vivo* detailliert zu untersuchen. Die Möglichkeit, pharmakologisch vielfältig mit dieser Methodik experimentell in die Mitochondrienfunktion einzugreifen, erlaubt die Grundlagen der mitochondrialen Funktion und Fehlfunktion in diversen Krankheitsbildern zu erforschen und pharmakologische Therapiekonzepte zu überprüfen. Das bessere Verständnis dieser mitochondrialen Dysfunktionen ermöglicht perspektivisch neue pharmakologische Interventionen bei Erkrankungen, wie Adipositas, Diabetes und Lebererkrankungen. Außerdem könnte die Methodik auf humanes Material, zum Beispiel aus chirurgischen Eingriffen und Biopsien angewandt werden und so die direkte Translation der Forschungsergebnisse auf das humane System ermöglichen. Basierend auf der Identifikation spezifischer Veränderungen in humanen Biopsien könnten als Ausblick potentiell individualisierte Patiententherapien eingeleitet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die etablierte Methodik im 96-Well-Format Messungen der organspezifischen OCR ermöglicht und zukünftig als artenunabhängiger, innovativer und relevanter Assay in allen Arten von explorativen, pharmakologischen oder sogar toxikologischen Studien dienen kann.

Literaturverzeichnis

1. Mackert O, Wirth EK, Sun R, Winkler J, Liu A, Renko K, Kunz S, Spranger J, Brachs S. Impact of metabolic stress induced by diets, aging and fasting on tissue oxygen consumption. *Mol Metab.* 2022;64:101563.
2. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999;397(6718):441-6.
3. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol.* 2000;529 Pt 1(Pt 1):57-68.
4. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(6):711-23.
5. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):446-52.
6. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:936486.
7. de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life sciences.* 2018;192:26-32.
8. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491-506.
9. Arruda AP, Pers BM, Parlakgul G, Guney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med.* 2014;20(12):1427-35.
10. Kusminski CM, Scherer PE. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):435-43.
11. Zorzano A, Liesa M, Palacin M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2009;41(10):1846-54.
12. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14809-18.

13. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, Jelenik T, Nowotny P, Jankowiak F, Herder C, Carstensen M, Krausch M, Knoefel WT, Schlensak M, Roden M. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab.* 2015;21(5):739-46.
14. Mansouri A, Gattolliat CH, Asselah T. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. *Gastroenterology.* 2018;155(3):629-47.
15. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14205-18.
16. Peng KY, Watt MJ, Rensen S, Greve JW, Huynh K, Jayawardana KS, Meikle PJ, Meex RCR. Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Lipid Res.* 2018;59(10):1977-86.
17. Sunny NE, Bril F, Cusi K. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(4):250-60.
18. Boland ML, Oldham S, Boland BB, Will S, Lapointe JM, Guionaud S, Rhodes CJ, Trevaskis JL. Nonalcoholic steatohepatitis severity is defined by a failure in compensatory antioxidant capacity in the setting of mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 2018;24(16):1748-65.
19. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res.* 2007;100(4):460-73.
20. Mercer JR, Cheng KK, Figg N, Gorenne I, Mahmoudi M, Griffin J, Vidal-Puig A, Logan A, Murphy MP, Bennett M. DNA damage links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis and the metabolic syndrome. *Circ Res.* 2010;107(8):1021-31.
21. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene.* 2006;25(34):4675-82.
22. Abdullah A, Peeters A, de Courten M, Stoelwinder J. The magnitude of association between overweight and obesity and the risk of diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes research and clinical practice.* 2010;89(3):309-19.
23. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society.* 2008;67(3):253-6.

24. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Annals of clinical and laboratory science*. 2011;41(2):107-21.
25. Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(2):E209-16.
26. Wessels B, Honecker J, Schottl T, Stecher L, Klingenspor M, Hauner H, Skurk T. Adipose Mitochondrial Respiratory Capacity in Obesity is Impaired Independently of Glycemic Status of Tissue Donors. *Obesity (Silver Spring)*. 2019;27(5):756-66.
27. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, Czech M, Corvera S. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*. 2003;23(3):1085-94.
28. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1281-9.
29. Dmitriev RI, Papkovsky DB. Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(12):2025-39.
30. Divakaruni AS, Paradyse A, Ferrick DA, Murphy AN, Jastroch M. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol*. 2014;547:309-54.
31. Gerencser AA, Neilson A, Choi SW, Edman U, Yadava N, Oh RJ, Ferrick DA, Nicholls DG, Brand MD. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal Chem*. 2009;81(16):6868-78.
32. Cassim S, Raymond VA, Lapierre P, Bilodeau M. From in vivo to in vitro: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLoS One*. 2017;12(12):e0190366.
33. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*. 2008;3(6):965-76.
34. Neville KE, Bosse TL, Klekos M, Mills JF, Weicksel SE, Waters JS, Tipping M. A novel ex vivo method for measuring whole brain metabolism in model systems. *Journal of neuroscience methods*. 2018;296:32-43.
35. Readnower RD, Brainard RE, Hill BG, Jones SP. Standardized bioenergetic profiling of adult mouse cardiomyocytes. *Physiol Genomics*. 2012;44(24):1208-13.

36. Takeichi Y, Miyazawa T, Sakamoto S, Hanada Y, Wang L, Gotoh K, Uchida K, Katsuhara S, Sakamoto R, Ishihara T, Masuda K, Ishihara N, Nomura M, Ogawa Y. Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor. *Diabetologia*. 2021;64(9):2092-107.
37. Oeckl J, Bast-Habersbrunner A, Fromme T, Klingenspor M, Li Y. Isolation, Culture, and Functional Analysis of Murine Thermogenic Adipocytes. *STAR Protoc*. 2020;1(3):100118.
38. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J*. 2020;34(10):13106-24.
39. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435(2):297-312.
40. Mookerjee SA, Nicholls DG, Brand MD. Determining Maximum Glycolytic Capacity Using Extracellular Flux Measurements. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152016.
41. Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, Shah J, Zafar N, Tang Y, Hellmann J, Rai SN, Spite M, Bhatnagar A, Hill BG. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(3):E262-77.
42. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2013;123(1):215-23.
43. Darcy J, McFadden S, Fang Y, Huber JA, Zhang C, Sun LY, Bartke A. Brown Adipose Tissue Function Is Enhanced in Long-Lived, Male Ames Dwarf Mice. *Endocrinology*. 2016;157(12):4744-53.
44. Li Y, Knapp JR, Kopchick JJ. Enlargement of interscapular brown adipose tissue in growth hormone antagonist transgenic and in growth hormone receptor gene-disrupted dwarf mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(2):207-15.
45. Ortega-Molina A, Efeyan A, Lopez-Guadamillas E, Munoz-Martin M, Gomez-Lopez G, Canamero M, Mulero F, Pastor J, Martinez S, Romanos E, Mar Gonzalez-Barroso M, Rial E, Valverde AM, Bischoff JR, Serrano M. Pten positively regulates brown adipose function, energy expenditure, and longevity. *Cell Metab*. 2012;15(3):382-94.
46. Vatner DE, Zhang J, Oydanich M, Guers J, Katsyuba E, Yan L, Sinclair D, Auwerx J, Vatner SF. Enhanced longevity and metabolism by brown adipose tissue with disruption of the regulator of G protein signaling 14. *Aging Cell*. 2018;17(4):e12751.

47. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(3):349-69.
48. Vitorica J, Cano J, Satrustegui J, Machado A. Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart. *Mech Ageing Dev*. 1981;16(2):105-16.
49. Lancaster TS, Jefferson SJ, Hunter JC, Lopez V, Van Eyk JE, Lakatta EG, Korzick DH. Quantitative proteomic analysis reveals novel mitochondrial targets of estrogen deficiency in the aged female rat heart. *Physiol Genomics*. 2012;44(20):957-69.
50. Cheng Z, Ito S, Nishio N, Thanasegaran S, Fang H, Isobe K. Characteristics of cardiac aging in C57BL/6 mice. *Exp Gerontol*. 2013;48(3):341-8.
51. Drahota Z, Milerova M, Stieglerova A, Skarka L, Houstek J, Ostadal B. Development of cytochrome-c oxidase activity in rat heart: downregulation in newborn rats. *Cell Biochem Biophys*. 2005;43(1):87-94.
52. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM. The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett*. 2000;466(2-3):323-6.
53. Bolli GB, Fanelli CG. Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(3):467-93, v.
54. MacDonald PE, De Marinis YZ, Ramracheya R, Salehi A, Ma X, Johnson PR, Cox R, Eliasson L, Rorsman P. A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biol*. 2007;5(6):e143.
55. Rizza RA. Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: implications for therapy. *Diabetes*. 2010;59(11):2697-707.
56. Allister EM, Robson-Doucette CA, Prentice KJ, Hardy AB, Sultan S, Gaisano HY, Kong D, Gilon P, Herrera PL, Lowell BB, Wheeler MB. UCP2 regulates the glucagon response to fasting and starvation. *Diabetes*. 2013;62(5):1623-33.
57. Halestrap AP. Glucagon treatment of rats activates the respiratory chain of liver mitochondria at more than one site. *Biochim Biophys Acta*. 1987;927(2):280-90.
58. Jensen CB, Sistare FD, Hamman HC, Haynes RC, Jr. Stimulation of mitochondrial functions by glucagon treatment. Evidence that effects are not artifacts of mitochondrial isolation. *Biochem J*. 1983;210(3):819-27.

59. LaNoue KF, Strzelecki T, Finch F. The effect of glucagon on hepatic respiratory capacity. *J Biol Chem.* 1984;259(7):4116-21.
60. Breton L, Clot JP, Baudry M. Effects of glucagon on basal metabolic rate and oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *Horm Metab Res.* 1983;15(9):429-32.
61. Yamazaki RK. Glucagon stimulation of mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 1975;250(19):7924-30.
62. Yamazaki RK, Mickey DL, Story M. Rapid action of glucagon on hepatic mitochondrial calcium metabolism and respiratory rates. *Biochim Biophys Acta.* 1980;592(1):1-12.
63. Munhoz AC, Vilas-Boas EA, Panveloski-Costa AC, Leite JSM, Lucena CF, Riva P, Emilio H, Carpinelli AR. Intermittent Fasting for Twelve Weeks Leads to Increases in Fat Mass and Hyperinsulinemia in Young Female Wistar Rats. *Nutrients.* 2020;12(4).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Olena Mackert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Adaptation und Validierung der Messung der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate in Geweben und deren Einsatz zur Evaluation metabolischer Stressoren“; „Adaptation and validation of mitochondrial oxygen consumption rate measurement in tissues and its use for evaluation of metabolic stressors“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1

Impact of metabolic stress induced by diets, aging and fasting on tissue oxygen consumption.

Mackert O, Wirth EK, Sun R, Winkler J, Liu A, Renko K, Kunz S, Spranger J, Brachs S.

Molecular Metabolism. 2022 Oct;64:101563. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101563. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35944898

Beitrag im Einzelnen:

Die Etablierungsarbeit der Methode „Erfassung der Sauerstoffverbrauchsrate/mitochondriellen Aktivität in Gewebebiopsien“, dafür Evaluation der Stanzgrößen, Titration der Inhibitoren, Versuchsdauer, Messzeiten, Normalisierung, die Erstellung des standardisierten Protokolls (Labor SOP) nach erfolgreicher Etablierungsarbeit erfolgte eigenständig durch mich. Dargestellt im Paper **Fig. 1**, und Supplement **S1, S6**.

Teilweise wurden die Kohorten verschiedener Tierversuche, die in das Paper eingeflossen sind, von mir betreut und folgende tierexperimentellen Arbeiten übernommen: wöchentliches Scoring und Überwachung des Tierwohls, Körpergewichtserfassung, Fütterung, Messung der Körperzusammensetzung, monatliche Blutentnahmen (Daten für **Fig. 2-4**, teilweise **6, S5A**). Ich habe die finalen *ex vivo* und *in vitro* Experimente gemeinsam mit S Brachs geplant und organisiert (**Fig. 1-7, S1, S3-S7**).

Vorbereitung der finalen Experimente (Beschriftung, Protokollführung, Probenaufteilung Organisation der Arbeitsplätze, Zuweisung der Mitarbeiter) mit Technischen Assistentinnen.

Durchführung der finalen Experimente mit S Brachs, EK Wirth, MC Gaerz, D Woellner, R Sun, A Liu und N Huckauf (Organentnahme, Präparation, Biopsien-Anfertigung, Vorbereitung und Messung) für **Fig. 2C, 4C, 5C, 6C, S5B, S6** sowie Western Blot Analysen in **Fig. 2M-P, S5C, D**.

Auswertung aller Seahorse Messungen erfolgte eigenständig, bei Fragen Rücksprache mit S Brachs (**Fig. 1C-G, 2D-L, 3D-L, 4D-O, 6D-L, 7A, C, D, S1, S4, S8A**)

Eigenständige Datenanalyse und anschließende statistische Auswertung aller Daten des Papers sowie die Anfertigung aller Tabellen und graphischen Abbildungen. Kritische Diskussion der Daten mit S Brachs.

Manuskriptentwurf und Bearbeitung der Revision zusammen mit S Brachs.

Aufschlüsselung der Beteiligung am Paper unter *Author contribution* aufgeschlüsselt

Berlin, den 11.07.23

Olena Mackert

Erstbetreuer: Prof. Dr. Joachim Spranger

Druckexemplar der Publikation

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(1/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(2/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(3/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(4/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(5/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(6/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(7/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(8/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(9/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(10/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(11/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(12/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(13/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(14/15)

<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101563>

(15/15)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Mackert, O., Wirth, E.K., Sun, R., Winkler, J., Liu, A., Renko, K., Kunz, S., Spranger, J., and Brachs, S. Impact of metabolic stress induced by diets, aging and fasting on tissue oxygen consumption. *Molecular Metabolism* 64. 2022 Oct;64:101563. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101563. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35944898
(Impact factor: 8.568)

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Spranger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die wissenschaftlichen Untersuchungen durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Sebastian Brachs, der mir über die gesamte Zeit ein sehr wichtiger Ratgeber war. Er führte mich an die verschiedensten Techniken heran, brachte immer konstruktive wissenschaftliche Kommentare mit ein, und unterstützte mich stets bei meinen Versuchen.

Dr. rer. nat. Eva Katrin Wirth danke ich für die Möglichkeit Techniken von ihr zu erlernen und diese weiterzuentwickeln. Kostja Renko danke ich für den 3D-Druck der Mikrosiebe.

Bei den technischen Assistentinnen, Marie-Christin Gaerz, Diana Woellner, Candy Kalischke und Nadine Huckauf, möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Sie haben mir das nötige Grundwissen für die Tierversuche, sowie wichtigen Methoden im Labor vermittelt. Bei Fragen hatten sie immer ein offenes Ohr für mich und waren für mich über die gesamte Zeit eine Hilfe.

Vielen Dank an Rongwan Sun, mit der ich mich bei Fragen immer konstruktiv austauschen konnte.

Meiner Familie danke ich für die Möglichkeit und den stetigen Ansporn eine experimentelle Doktorarbeit in der Grundlagenforschung durchführen zu können.