

**Untersuchungen zur Rolle der
Lipoxygenase und der
Interaktion des
epikardialen Fetts
mit dem Herzen im Menschen
und im Tiermodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Janine Swifka
aus Leverkusen

Düsseldorf, Mai 2011

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
des Deutschen Diabetes-Zentrums
- Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf -

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Peter Rösen
Koreferent: Prof. Dr. William Martin
Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2011

Meiner Familie

„Da es sehr förderlich für die Gesundheit ist, habe ich beschlossen glücklich zu sein.“
(Voltaire)

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von Herrn **Prof. Dr. Peter Rösen** im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie am Deutschen Diabetes-Zentrum

- Leibniz-Institut an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn Prof. Rösen gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses interessanten Themas, die intensive fachliche Betreuung und Unterstützung während des praktischen Teils und besonders während der Verfassung dieser Arbeit. Ich danke ihm für sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und konstruktiven Ideen sowie die stets vorhandene Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion. Ich danke ihm und **Prof. Dr. Jürgen Eckel** für die exzellenten Labormöglichkeiten sowie dass sie mir die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen ermöglicht haben, bei denen ich wertvolle Anregungen und Ideen für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit sammeln konnte.

Prof. Dr. Klaus Addicks aus dem Institut I für Anatomie der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln sowie **Dr. Jürgen Weiss** aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie am Deutschen Diabetes-Zentrum danke ich für Ihre Kooperationsbereitschaft und die histologische Analysen.

Dr. Zhaoping Ding aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie danke ich für seine Kooperationsbereitschaft und die echokardiographische Analyse der Meerschweinchen.

Mein besonderer Dank gilt **Daniella Herzfeld de Wiza**, die mir mit ihrer unvergleichlichen und liebenswerten Art den Laboralltag verschönert hat.

Prof. Dr. William Martin aus dem Institut für Botanik III an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, möchte ich herzlich für die Übernahme des Koreferates und das Interesse an der Arbeit danken.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.04.2011

Janine Swifka

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	x
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiv
Zusammenfassung	xv
Summary	xviii
1.0 Einleitung	1
1.1 Glukosemetabolismus.....	1
1.2 Typen des Diabetes mellitus	2
1.2.1 Diabetes mellitus Typ I	2
1.2.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II	3
1.2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus Typ II.....	4
1.3 Insulinsignaltransduktion	5
1.4 Energiemetabolismus des Herzens - Glukosemetabolismus	7
1.4.1 Glukosetransportproteine	8
1.4.2 Insulinsensitiver Glukosetransport - GLUT4.....	10
1.4.3 Rolle des Zytoskeletts in der GLUT4 Translokation	11
1.4.4 Lipoxygenasen	12
1.4.5 12-Lipoxygenase und Interaktion mit GLUT4	13
1.5 Energiemetabolismus des Herzens - Fettsäuremetabolismus	14
1.5.1 Randle Zyklus.....	15
1.6 Adipositas und dessen Rolle im Diabetes mellitus Typ II.....	15
1.6.1 Fettgewebe als endokrines Organ.....	16
1.6.2 Epikardiales Fettgewebe	16
1.6.3 Zytokinexpression im epikardialen Fettgewebe.....	17
1.6.4 Fettgewebsinflammation	17
1.7 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien, Fertigprodukte und Kits	19
2.1.1.1 Chemikalien	19

2.1.1.2 Fertigprodukte.....	21
2.1.1.3 Kits	22
2.1.2 Puffer und Medien	22
2.1.2.1 Molekularbiologische Puffer und Medien.....	22
2.1.2.2 Zellbiologische Puffer und Medien.....	24
2.1.2.3 Proteinanalytische Puffer	25
2.1.3 Fixative	27
2.1.4 Molekularbiologische Enzyme.....	27
2.1.5 Antikörper	28
2.1.6 Zellen	29
2.1.7 Radioisotope.....	29
2.1.8 Geräte.....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1 Ligation von PCR-Fragmenten mit linearisierten Vektoren.....	31
2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien	31
2.2.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA	32
2.2.4 Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen.....	32
2.2.6 Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen	33
2.2.7 Formalaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	33
2.2.8 Reverse Transkription von mRNA.....	33
2.2.9 Real-Time-PCR	34
2.2.9.1 Primer Design	34
2.2.9.2 Real-Time-PCR mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen.....	35
2.2.9.3 Reaktionsansätze und Real-Time-PCR-Lauf.....	36
2.3 Zellbiologische Methoden	37
2.3.1 Kultivierung von H9c2 und H9c2-E2 Zellen	37
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl	37
2.3.3 Transfektion.....	37
2.3.3.1 Transfektion von Plasmid-DNA.....	38
2.3.3.2 Transfektion von siRNA	38
2.3.4 Translokations-Messungen	39
2.3.4.1 GLUT4myc-Translokation	39

2.3.5.3 Messung des 12(S)-HETE Gehaltes	40
2.4 Proteinanalytische Methoden	40
2.4.1 Zelllyse	40
2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	41
2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.4.4 Western Blotting (Semi-Dry-Verfahren).....	42
2.4.5 Antikörperhybridisierung und ECL-Detektion	43
2.5 Isolierung von Fettgewebe aus Meerschweinchen	43
2.5.1 Entnahme und Aufarbeitung von Fettgewebe aus Meerschweinchen.....	44
2.5.2 Oraler Glukose-Toleranztest	44
2.5.3 Morphologie	44
2.6 Isolierung von humanem Fettgewebe	45
2.7 Statistische Auswertung.....	45
3. Ergebnisse - zellulärer Teil	46
3.1 Expressionsanalyse von 12-Lipoxygenase	47
3.2 TGF- β_1 reguliert den Gehalt von 12-Lipoxygenase in H9c2-E2.....	48
3.3 Die Produktion von 12- Hydroxyeicosatetraensäure wird durch TGF- β reguliert .	51
3.4 Glukosetransporter IV-Expression wird auf mRNA- und Proteinebene durch TGF- β reguliert	52
3.5 12-Lipoxygenase stabilisiert die Insulinwirkung in der GLUT 4-Translokation	55
4. Ergebnisse - humaner Teil.....	58
4.1 Patientenkollektiv	59
4.2 Expression proinflammatorischer Zytokine im EAT	60
4.3 Diabetes mellitus II hat keinen Einfluss auf die Expression von GLUT 1 und 4 ...	63
4.4 Diabetes mellitus Typ 2 hat keine Auswirkung auf die PPAR Expression im EAT	64
4.5 Die Änderung des Zytokinmusters im EAT ist nicht auf Hypoxie zurückzuführen	65
5. Ergebnisse - Tiermodell.....	67
5.1 Meerschweinchen entwickeln altersabhängig EAT	68
5.2 Das EAT beeinflusst das Myokard und die KoronargefäÙe.....	69
5.3 Der Release der Zytokine und Chemokine unterscheidet sich zwischen EAT und SAT	71
5.4 Die Zytokinexpression wird durch das Alter beeinflusst	72

5.5 Die Expression von 12-LO sowie Glukosetransportern im EAT wird alterungsbedingt reguliert.....	74
5.6 Einfluss von Diät auf EAT und Herz.....	74
5.7 Zusammensetzung der Diäten.....	75
5.8 Einfluss der Experimentaldiäten auf die Gewichtszunahme.....	77
5.9 Meerschweinchen entwickeln nach kohlenhydratreicher Diät Insulinresistenz ...	77
5.10 Fettreiche Diät bewirkt kardiale Dysfunktion.....	78
5.11 Fettreiche Diät steigert die Lipolyse im Herzen.....	80
5.12 Fettreiche Diät bewirkt Hypertrophie des Myokards und die Dezentralisierung des linken Ventrikels.....	81
5.13 Fettreiche Diät erzeugt Steatosis hepatis.....	82
5.14 Die Adiponektin Expression wird im EAT durch fettreiche Diät erhöht, jedoch nach kohlenhydratreicher Diät in EAT und Herz reduziert.....	83
5.15 Nach fettreicher Diät wird die GLUT4 Expression erhöht, während GLUT1 und GLUT4 nach kohlenhydratreicher Diät reduziert sind.....	85
5.16 PPAR γ und PPAR δ werden im Gegensatz zur kohlenhydratreichen Diät nicht durch fettreiche Diät reguliert.....	87
6. Diskussion.....	91
6.1 Allgemeine Diskussion.....	91
6.2 Diskussion der zellulären Ergebnisse.....	92
6.3 Diskussion der humanen Ergebnisse.....	95
6.4 Diskussion des Tiermodells.....	100
6.5 Diskussion der Auswirkungen der Diäten.....	103
6.6 Zusammenfassung und Schlußfolgerung.....	111
7. Referenzen.....	113

Abkürzungen

AC	Abdominales Fettgewebe
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
CD	Standarddiät
DM1	Diabetes mellitus Typ 1
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
EAT	Epikardiales Fettgewebe
et al.	et altera
FABP4	Fettsäurebindendes Protein 4
FITC	Fluorescein
G	Gefäß
GLUT	Glukosetransporter
GLUT1	Glukosetransporter I
GLUT4	Glukosetransporter IV
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HC	Kohlenhydratreiche Diät
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HF	Fetteiche Diät
IGFBP	Insulinähnliche Wachstumsfaktor-BP
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrate
LADA	latent autoimmune diabetes in adults
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MCP-1	Macrophage Chemotractant Protein 1
MIF	Makrophagen induzierender Faktor
MRI	Magnetische Kernresonanztomographie

PDK1	PI3K abhängige Serin-Threoninkinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
SAT	Subkutanes Fettgewebe
siRNA	small interfering RNA
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
12-HETE	12-Hydroxyeikosatetrensäuren
12-LO	12- Lipoxygenase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Insulinsignaltransduktion und Translokation des GLUT4	7
Abbildung 2: Dendrogramm der Glukosetransporterfamilie	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Stoffwechselweges der Lipoxygenasen...	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen 12-LO und GLUT4 ..	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Western Blotting	42
Abbildung 6: Expression von 12-Lipoxygenase	48
Abbildung 7: 12-Lipoxygenase Expression nach TGF- β Inkubation	49
Abbildung 8: Expression von 12-LO vitro gene knockdown.....	50
Abbildung 9: Gesamt-RNA aus H9c2-E2.....	51
Abbildung 10: Regulation der 12(S)-HETE Produktion in H9c2-E2	52
Abbildung 11: Regulation der GLUT IV-Expression inH9c2-E2	53
Abbildung 12: Regulation der GLUT IV-mRNA-Expression	54
Abbildung 13: Darstellung der Aktinmikrofilamente	56
Abbildung 14: H9c2-E2 GLUT IV-Translokation in H9c2-E2.....	57
Abbildung 15: Expression regulierter Zytokine	61
Abbildung 16: Expression proinflammatorischer Interleukine	61
Abbildung 17: Expression antiinflammatorischer Zytokine.....	62
Abbildung 18: Adiponektin Expression der Patienten.	63
Abbildung 19: Proteinogene Expression Arcp30	64
Abbildung 20: Proteinogene Expression der PPARs	65
Abbildung 21: Proteinogene HIF1 α Expression	66
Abbildung 22: EAT Entwicklung auf dem Myokard des Meerschweinchens.....	68
Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahme des EAT	69
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme des EAT	70
Abbildung 25: Expression der Zytokine und Chemokine im Meerschweinchen.....	72
Abbildung 26: Zytokinexpression im EAT	73
Abbildung 27: Proteinexpression von 12-LO im EAT.....	74
Abbildung 28: Proteinexpression von GLUT I und IV im EAT.....	74
Abbildung 29: Effekt der Experimentaldiäten auf die Gewichtszunahme.....	77

Abbildung 30: Optische Darstellung der Gewichts-zunahme nach Diät.....	77
Abbildung 31: Nüchtern-glukosegehalts	78
Abbildung 32: Makroskopische Darstellung eines Meerschweinchen	79
Abbildung 33: Darstellung des Kontaktbereichs zwischen EAT und Herzmuskel	79
Abbildung 34: Infiltration von Fettzellen in den Bereich der Koronararterien	80
Abbildung 35: Auflockerung der morphologischen Struktur des linken Ventrikels	80
Abbildung 36: Triglyceridgehalts im Gesamtherz	81
Abbildung 37: Echokardiographie.....	81
Abbildung 38: Darstellung der linken Ventrikel-wand.....	82
Abbildung 39: Steatosis hepatis im Meerschweinchen.....	83
Abbildung 40: Adiponektin Expression im EAT.....	84
Abbildung 41: Adiponektin Expression im Herzgewebe	84
Abbildung 42: Expression von Adiponectin in EAT und Herz	85
Abbildung 43: Expression der Glukosetransporter I und IV nach fettreicher Diät	86
Abbildung 44: Expression der Glukosetransporter I und IV nach HC Diät.....	87
Abbildung 45: PPAR γ und δ Expression im Herz nach HF Diät	88
Abbildung 46: PPAR γ und δ Expression im Herz und EAT HC Diät.....	89
Abbildung 47: Übersicht der durch die Diäten regulierten Funktionen und Proteine.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einordnung der Na ⁺ unabhängigen Glukosetransporter [v	10
Tabelle 2: Typischer Reaktionsansatz einer Ligation	31
Tabelle 3: Reaktionsansatz einer reversen Transkription mit Omniscript	34
Tabelle 4: Primer für Real-Time-PCR	35
Tabelle 5: Einfacher Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR	35
Tabelle 6: Schematischer Ablauf einer Real-Time-PCR mit TempRamp	36
Tabelle 7: Definition des BMI.....	59
Tabelle 8: Vergleich des Patientenkollektivs.....	60
Tabelle 9: Übersicht der Gewichtsentwicklung	69
Tabelle 10: Vergleich der verwendeten Diäten	76

Zusammenfassung

Diabetes mellitus stellt eine Volkskrankheit dar, bei der aufgrund der verbesserten Ernährungssituation seit Mitte des 20. Jahrhunderts steigende Inzidenzen in industrialisierten Ländern beobachtet werden. Im Hinblick auf die Tatsache, dass inzwischen häufig auch Jugendliche, bedingt durch Adipositas an Diabetes mellitus erkranken und dieser im Zeitablauf im sogenannten Metabolischen Syndrom sowohl das Herz und dessen Vaskulatur als auch die Nieren und das periphere Nervensystem schädigen kann, stellt die Therapie des Diabetes mellitus und dessen Folgeerkrankungen eine der größten Herausforderungen der Medizin dar. Laut WHO Angaben sind weltweit mehr als 220 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt und 3,4 Millionen Menschen starben 2004 an dessen Folgeerkrankungen. Weiterhin wird vermutet, dass sich die Zahl der durch Diabetes mellitus bedingten Todesfälle zwischen 2005 und 2030 verdoppelt.

Das Fettgewebe ist neben seiner Funktion als Energiespeicher ein endokrines Organ, das Zytokine und Adipokine sezerniert. So konnte gezeigt werden, dass die Menge des viszeralen Fetts positiv mit der Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus korreliert. Aufgrund epidemiologischer Beobachtungen wird ein enger Zusammenhang zwischen Adipositas und der koronaren Herzkrankheit vermutet. Dies hat dazu geführt, die Interaktion des epikardialen Fett als viszerales Fettdepot mit dem Herzen genauer zu untersuchen. Das epikardiale Fett liegt dem Herz faszienfrei auf, so dass sezernierte Zytokine und Adipokine durch das Interstitium auf den Herzmuskel wirken können.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass 1) unter dem Einfluss von Adipositas und Diabetes mellitus das epikardiale Fett vermehrt Zytokine sezerniert und sich das Muster in Richtung Proinflammation verschiebt. Da aus ethischen Gründen für die Analytik lediglich Proben von multimorbiden Patienten verwendet werden können, 2) haben wir mit dem Meerschweinchen ein Tiermodell entwickelt, das die Präparation von epikardialen Fettgewebe aus gesunden Tieren ohne Beeinflussung durch kardiale oder metabolische Erkrankungen erlaubt. So konnte unter experimentellen Bedingungen das epikardiale Fett detailliert untersucht und speziell der Einfluss von metabolischen

Veränderungen wie Insulinresistenz oder DM2 auf das Sekretom des epikardialen Fetts ermittelt werden. 3) Meerschweinchen entwickeln wie der Mensch und höhere Primaten altersabhängig epikardiales Fett und dessen Akkumulation speziell am Aortenbogen und entlang der Koronargefäße weisen große Ähnlichkeit mit Beobachtungen an erkrankten humanen Herzen auf. Um zu untersuchen, ob ähnlich wie in der humanen Situation auch im Tiermodell parallel zu den beobachteten anatomischen Veränderungen eine relevante Sekretion an proinflammatorischen Zytokinen nachzuweisen ist, wurde die Freisetzung aus dem EAT des Meerschweinchens durch Arraytechnik untersucht. 4) Wir konnten zeigen, dass sich die Menge der sezernierten Zytokine abhängig von Alter und Menge des epikardialen Fetts verändert und in Richtung Proinflammation verschiebt.

5) Nach Diätintervention mit einer fett- und cholesterinreichen sowie einer kohlenhydratreichen Fütterung konnten wir bei beiden Interventionen negative, aber divergente Auswirkungen auf den metabolischen Zustand und verschiedene Schädigungen der Endorgane beobachten. So entwickelten Meerschweinchen nach fettreicher Diät entgegen unserer Vermutung keine Adipositas oder Insulinresistenz. Die Tiere zeigten jedoch schon nach kurzer Zeit eine deutliche kardiale Dysfunktion und entwickelten eine Steatosis hepatis sowie unter anderem eine Dysregulation des PPAR Systems. 6) Nach kohlenhydratreicher Diät wurden die Meerschweinchen deutlich adipös und insulinresistent. Die kohlenhydratreiche Diät hatte keinen direkten Einfluss auf die Myokardfunktion. Sie führte hingegen zu einer massiven Ausdehnung des epikardialen Fetts und begünstigte die Entwicklung von Insulinresistenz. Dies konnte auch durch die Reduktion der Glukosetransporter Expression sowie der Einwanderung von Makrophagen gezeigt werden, was zur Entstehung einer ständigen Entzündungsreaktion führte, die wir als Ursache der Insulinresistenz interpretieren.

In zellulären Studien konnten wir zeigen, dass die gesteigerte Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TGF- β die Insulinsensitivität der Kardiomyozyten negativ beeinflusst. Dieser Effekt erfolgt über die Interaktion von TGF- β mit der Signalkaskade der Lipoxygenasen und deren Aktivierung nach Zytokininkubation. So konnte als Hinweis auf die kardioprotektive Funktion des TGF- β gezeigt werden, dass Hydroxyeikosatetraensäuren als Produkte der 12-Lipoxygenase das Aktinzytoskelett stabilisieren. Damit wird auch die Exozytose und Translokation des insulinabhängigen Glukosetransporters IV zur Plasmamembran nach Insulinstimulus

unterstützt. Jedoch führt die Inkubation mit dem proinflammatorischen Zytokin TGF- β auch zur Reduktion der Glukosetransporter Expression, was wiederum ein Hinweis auf die proinflammatorische und myokardpathogene Funktion ist. Dies bedeutet, dass die Effektivität des Transportsystemes zwar zunimmt, die Kapazität aber reduziert ist. Passend zu unseren Beobachtungen beim Menschen und im Tiermodell konnten wir im zellulären Modell nach TGF- β Inkubation den totalen Verlust der Insulinwirkung in Kardiomyozyten zeigen.

Summary

Diabetes mellitus is a widespread disease, which has been observed to show an increasing incidence in industrialized countries since the middle of the 20th century due to the improved alimentary situation. With regards to the fact, that often also adolescents are confirmed to have Diabetes mellitus as a result of morbid obesity and that they may develop indisposition of the heart and its vascular conditions as well as kidney or nervous system injury, rehabilitation of Diabetes mellitus and its derived diseases is by now a great challenge for medicine. Due to WHO interpretation by now 220 million people are diseased with Diabetes mellitus worldwide and in 2004 3.4 million people died due to Diabetes mellitus or the metabolic syndrome. This case number is estimated to be doubled in between 2005 and 2030.

Additional to its function as energy storage adipose tissue is discussed as an active endocrine organ that secretes cytokines and adipokines. The amount of visceral adipose tissue has been shown to correlate with the development of insulin resistance and Diabetes mellitus. Due to epidemiological surveys a close relationship of obesity and coronary artery disease is suspected but until now not approved. This assumption provoked further investigations regarding the interaction of epicardial adipose tissue as true visceral fat and the heart itself. Epicardial fat is located directly on the myocardium without any fascia, so cytokines and adipocines may have an immediate impact on the myocardium.

This investigation shows an increased secretion of cytokines under the impact of obesity and Diabetes mellitus as well as a proinflammatory shift. For ethical reasons human epicardial fat is only available from severely ill patients undergoing open heart surgery. With the guinea pig we established an animal model that allows the preparation of healthy epicardial fat without the interference of cardiac or metabolic disease. So we were able to analyze the epicardial fat under experimental conditions and quantify the impact of metabolic disease. In contrast to rodents the guinea pig develops abundant amounts of epicardial fat with age comparable to humans and higher apes. The accumulation of epicardial fat along the aortic branch has substantial similarities to the medical observation in the diseased human heart. To observe, whether the epicardial fat

of guinea pigs secretes an abundant amount of inflammatory cytokines comparable to the human situation, we analyzed its release by cytokine array technique. Our data show, that the release of cytokines is dependent on age, the amount of epicardial fat and is shifted to inflammatory state.

After dietary intervention using a high-fat or high carbohydrate diet we showed surprisingly different negative impacts on the metabolic situation or endorgan damage addicted to the used diet. So after high-fat diet guinea pigs did not get obese or insulin resistant, but develop cardiac dysfunction and steatosis hepatis. After high-carbohydrate diet guinea pig develop obesity and insulin resistance, but showed no effects on cardiac function although epicardial fat mass was augmented. Furthermore glucose transporter expression was reduced in epicardial fat and heart and as an indication of inflammation macrophages immigrated into the connecting area of heart and adipose tissue.

In our cellular study increased cytokine release e.g.. of TGF- β provoked insulin resistance in cardiomyocytes. This is effected by the interaction of TGF- β and lipoxygenase signaling. As an evidence for its cardioprotective potential TGF- β activates 12-lipoxygenase and augments their products – hydroxyeicosatetraenoic acids stabilizes the actin cytoskeleton in cardiomyocytes. Accordingly translocation of the insulin dependent glucose transporter 4 to the plasma membrane is supported. In contrast to this incubation with the inflammatory TGF- β provokes also the reduced expression of glucose transporter 4. Convenient to our observation in humans and in the animal model TGF- β incubation caused the total loss of insulin action in cardiomyocytes.

1.0 Einleitung

1.1 Glukosemetabolismus

Der Glukosestoffwechsel stellt in Mammalia die hauptsächliche Energiequelle dar und die gleichmäßige Versorgung des Organismus mit Glukose ist essentiell für die Organfunktion. Physiologisch liegt der Plasmaglukosespiegel beim Menschen, abgesehen von postprandialen Zuständen zwischen 4 - 7 mmol/L und wird durch das Zusammenspiel von Glukoseaufnahme aus der Nahrung und Verstoffwechslung durch periphere Organe reguliert (1). Die Entgleisung des Glukosemetabolismus in beide Richtungen hat schwerwiegende Folgen. So hat die Unterzuckerung oder Hypoglykämie des Körpers das Absterben verschiedener Zellkompartimente und im Extremfall den Tod zur Folge. Im Gegensatz dazu führt ein dauerhaft erhöhter Glukosegehalt des Blutes, auch Hyperglykämie genannt, zu langfristigen Organschäden und kann über unterschiedliche Folgeerkrankungen ebenfalls zum Tode führen.

Die Glukoseaufnahme und deren Verstoffwechslung sowie die Gewinnung von gespeicherter Energie aus Glykogen wird durch die Hormone Insulin, Glukagon und Katecholamine reguliert. Bei einem postprandial erhöhten Blutzuckerspiegel wird von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas Insulin ausgeschüttet. Dies steigert den insulinstimulierten Transport der Glukose in die Zelle. Bei niedrigem Glukosespiegel während einer Hungerphase oder körperlicher Aktivität wird aus den α -Zellen Glukagon ausgeschüttet, das die Spaltung des gespeicherten Glykogens in Glukose vermittelt (1).

Herz- und Skelettmuskel sowie das Fettgewebe und die Leber sind Primärziele der Insulinaktivität. In diesen Zielorganen erhöht sich nach Stimulus die Konzentration des insulinabhängigen Glukosetransporters IV (GLUT4) an der Zellmembran. Dadurch wird der limitierende Prozess der Glukoseaufnahme um ein Vielfaches über den Basalwert gesteigert (2). Nach Zelleintritt wird die Glukose entweder zur Energiegewinnung in der Glykolyse metabolisiert und zur Gewinnung von Phosphaten wie ATP verwendet. Im Gegensatz dazu wird Glukose in Adipozyten überwiegend als Fett gespeichert (1).

1.2 Typen des Diabetes mellitus

Als Diabetes mellitus wird eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen bezeichnet, die mit der unvollständigen Verwertung von Glukose einhergeht (3). Dieses Phänomen war schon in der Antike bekannt, wo das Hauptsymptom, eine zuckerähnliche Substanz im Urin als Diabetes mellitus, aus dem griechischen „honigsüßer Durchfluss“ beschrieben wurde. Als weiteres Symptom wurde ein unstillbarer Durst beschrieben, der später mit der durch osmotische Diurese bedingten Polyurie erklärt werden konnte (4). Glukose stellt einen schnellen Energielieferanten dar, der glomerulär flitriert ab etwa 180 mg/dl die tubuläre Rückresorptionskapazität übersteigt und osmotisch Wasser mit sich in den Urin zieht. Dies bewirkt durch Polyurie sowohl ein Flüssigkeitsdefizit als auch die schlechtere Energieversorgung der Zellen, was beim Menschen unter anderem Leistungsabfall oder Konzentrationsstörungen hervorrufen kann.

Die Deutsche Diabetes Gesellschaft bezeichnet den Diabetes mellitus als heterogene Stoffwechselerkrankung, die sich durch chronische Hyperglykämie, bedingt durch gestörte Insulinsekretion, Insulinwirksamkeit oder eine Kombination von beidem auszeichnet (3). Ein wiederholter Nüchternglukosewert von 7,0 mmol/L oder höher sowie ein Wert größer 11 mmol/L zwei Stunden nach oralem Glukosetoleranztest wurden hierfür als Diagnosekriterium angesetzt (5). Aufgrund der ätiologischen Unterschiede klassifiziert die WHO zwei Hauptformen; Typ I und Typ II Diabetes mellitus (6). Dazu kommen weitere spezifische Formen wie Gestationsdiabetes, das Cushing Syndrom, genetische Erkrankungen der β -Zellen oder exokrine Erkrankungen des Pankreas.

1.2.1 Diabetes mellitus Typ I

Typ I Diabetes mellitus (DM1) stellt eine Autoimmunerkrankung mit absolutem Insulinmangel dar, bei der es bedingt durch genetische Defekte oder exogen induziert zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas kommt. Die exogene Gabe von Insulin ist daher obligatorisch. Durch den absoluten Insulinmangel entfällt auch dessen antilipolytische Funktion, so dass Depotfett und Glykogen vermehrt mobilisiert werden. Die durch gesteigerte Lipolyse gebildeten Ketonkörper bewirken die beim DM1 gefürchtete Ketoazidose, die unbehandelt rasch

zum Tode führen kann. Die Übersäuerung des Blutes ist bei unerkannten oder schlecht eingestellten Diabetikern häufig an dem typischen Acetongeruch der Atemluft erkennbar. Typ1 Diabetes wurde auch als juveniler Diabetes Typ beschrieben, da die Zerstörung der β -Zellen häufig im jugendlichen Alter geschieht. Als LADA (latent autoimmune diabetes in adults) wird eine ebenfalls auf Autoimmunerkrankungen zurück zu führende Form des Diabetes mellitus bezeichnet, bei der zunächst noch eine Restfunktion der β -Zellen vorhanden ist und der DM1 sich erst ab dem 30. Lebensjahr manifestiert (7). Lediglich 10% der Diabetiker in industrialisierten Ländern sind Typ1 Diabetiker und auch der überwiegende Teil der LADA Diabetiker wird im frühen Stadium häufig fälschlicherweise dem Typ2 Diabetes zugeordnet.

1.2.2 Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ II

Diabetes mellitus Typ II (DM2) stellt eine primär nicht insulinabhängige Form des Diabetes dar. DM2 wurde bisher aufgrund der chronisch progredienten Entwicklung der Insulinresistenz und dessen Manifestation jenseits des 40. Lebensjahres, auch als Altersdiabetes bezeichnet. Pathogenetisch spielt sowohl die gestörte Insulinsekretion (8) wie auch die herabgesetzte Insulinwirkung eine Rolle bei der Manifestation. Im Gegensatz zu DM1 zeigen DM2 Patienten keine Neigung zur Ketoazidose und keinen absoluten Insulinmangel.

DM2 manifestiert sich häufig, kombiniert mit exogenen Faktoren wie mangelnder körperlicher Aktivität, einer Hyperalimentation im Metabolischen Syndrom oder der genetischen Prädisposition (8;9). Hanefeld et al. bezeichneten 1981 das Metabolische Syndrom als das gemeinsame Auftreten der Wohlstandskrankheiten wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ II, arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und Hyperurikämie (10;11). Die für DM2 beschriebene Insulinresistenz führt in erster Linie postprandial zu einer verlängerten Phase der Hyperglykämie. Dies hat eine Hyperinsulinämie, die verlängerte Insulinsekretion als Kompensationsmechanismus zur Folge (12). Die anfängliche Kompensation der Insulinresistenz bewirkt jedoch im Krankheitsverlauf die Verstärkung der Insulinresistenz aufgrund der verringerten Stimulierbarkeit der Rezeptoren und endet schließlich bedingt durch Erschöpfung der β -Zellen in einer Insulinpflicht (12;13). Etwa 85 - 90% aller Diabetiker sind dem Typ 2 zuzuordnen (14).

1.2.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus Typ II

Aufgrund der verbesserten Ernährungssituation werden seit Mitte des 20. Jahrhunderts steigende Inzidenzen der DM2 Erkrankung in industrialisierten Ländern beobachtet, jedoch liegen auch in Europa hinsichtlich der epidemiologischen Situation nur lückenhafte Angaben zur Häufigkeit von Diabetes mellitus und dessen assoziierten Krankheiten vor (5). Aus der evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft Version 2004 geht hervor, dass Ende der 1980er Jahre in Deutschland zwischen 3,5 und 4 Millionen Menschen an DM2 erkrankt waren, was 4-5% der Gesamtbevölkerung entspricht (5). Im Bundesgesundheitsurvey 1997/98 wurde bekanntgegeben, dass 4,7% der Männer und 5,6% der Frauen zwischen 18 und 79 Jahren an DM2 erkrankt waren (5;15;16). Das relative Risiko Diabetes mellitus zu entwickeln variiert mit der sozialen Situation. So war die Wahrscheinlichkeit an DM2 zu erkranken in der Unterschicht (5,6%) im Vergleich zu Mittel- und Oberschicht (3,5 bzw. 2,5%) nahezu verdoppelt (5). In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr Männer häufiger von DM2 betroffen sind als Frauen. Ab dem 60. Lebensjahr kehrt sich dieses Verhältnis jedoch um (5;17;18). Mittlerweile erkranken auch häufig Jugendliche bedingt durch frühe Adipositas an DM2, so dass der Anteil in dieser Altersgruppe deutlich ansteigt. Laut WHO Angaben (Fact Sheet N°312, Januar 2011) sind weltweit mehr als 220 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. 3,4 Millionen Menschen starben 2004 an den Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus, wobei etwa 80% der Todesfälle in Ländern mit geringen bis mittleren Einkommen auftraten. Laut WHO Vermutungen wird sich die Zahl der durch Diabetes mellitus bedingten Todesfälle zwischen 2005 und 2030 verdoppeln.

Im Zeitablauf kann Diabetes mellitus im sogenannten Metabolischen Syndrom das Herz, die Blutgefäße, folglich damit auch die Augen aber auch das periphere Nervensystem und die Nieren schädigen. DM2 steigert das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen oder das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden um 50%. Die diabetische Neuropathie betrifft etwa 50% aller Diabetiker und ist in Kombination mit verringertem Blutfluss das höchste Risiko für Extremitätenamputationen infolge peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK). 10-20% der diabetischen Patienten sterben aufgrund von

Nierenversagen und das allgemeine Risiko aufgrund von Diabetes und dessen Folgeerkrankungen zu sterben ist im Vergleich zu Nichtdiabetikern verdoppelt.

Neben dem individuellen Leid der erkrankten Personen haben Diabetes mellitus und dessen Komplikationen einen signifikanten sozioökonomischen Einfluss auf Familien, Gesundheitssysteme und ganze Länder (19). Die Kosten für die Behandlung von Diabetes mellitus und dessen Folgeerkrankungen betragen zur Zeit etwa 30 Milliarden Euro, was etwa 15% des Gesamtetats der deutschen Krankenkassen ausmacht (19). Die WHO prognostiziert zum Beispiel, dass China zwischen 2006 und 2015 558 Milliarden Dollar an vorangegangenem nationalem Einkommen bedingt durch Herzerkrankungen, Schlaganfall oder die Behandlung von Diabetes mellitus aufwenden müssen. Diese 2011 aktualisierten Zahlen bestätigen die Relevanz des Diabetes mellitus in der heutigen Zeit und belegen die Notwendigkeit, die pathophysiologischen Mechanismen des DM2 genauer zu erforschen, um die Interaktion der beteiligten Gewebe bei Hyperglykämie besser charakterisieren zu können. Diese Erkenntnisse könnten die sozioökonomischen Kosten durch frühe Diagnose und moderate „Lifestyle“ Intervention sowie Vorsorge - um Komplikationen zu vermeiden - deutlich verringern.

1.3 Insulinsignaltransduktion

Insulin ist ein Polypeptidhormon, das aus zwei Ketten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (5,8 kDa). Die A-Kette mit 21 Aminosäuren und die B-Kette mit 30 Aminosäuren, sind durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken an C7 der A-Kette mit C7 der B-Kette sowie C20 der A-Kette und C19 der B-Kette miteinander verbunden. Zusätzlich ist die A-Kette an C6 und C11 durch eine intramolekulare Disulfidbrücke verbunden.

In den β -Zellen des Pankreas wird zunächst eine einkettige Vorstufe, das Präproinsulin gebildet. Bei dieser Verbindung wird die Insulinsequenz durch einen hydrophoben Peptidrest abgeschirmt, so dass der Transport durch die Lipidmembran der Zellorganellen erleichtert wird. Mit dem Transport in das endoplasmatische Retikulum entsteht durch Abspaltung der Signalsequenz Proinsulin. Dies wird in den Vesikeln des Golgi Apparates gespeichert; in diesen Vesikeln wird bei Bedarf das verbindende C-Peptid abgespalten und es entsteht freies Insulin.

Insulin wurde erstmals 1921 isoliert und dessen antihyperglykämische Wirkung beschrieben (20;21). Die Insulinsignalkaskade ist essentiell, um die Glukosehomöostase zu gewährleisten und den Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus zu regulieren. Schon kurz nach der Entdeckung von Insulin wurde es als antidiabetisches Agens eingesetzt (20;21). Seitdem wird Insulin und dessen biochemische Eigenschaften intensiv in der diabetischen Forschung untersucht, deren Ergebnisse maßgeblich zum Verständnis des Diabetes mellitus sowie der Verbesserung der möglichen Therapien beitragen.

Die Bestimmung der Aminosäuresequenz erfolgte zwischen 1951 - 1953 von Sanger et al. (22;23). Meienhofer gelang 1963 die chemische Totalsynthese des Insulins (24), die dreidimensionale Strukturaufklärung erfolgte kristallographisch 1969.

Insulin wird postprandial aufgrund des erhöhten Blutzuckerspiegels ausgeschüttet, blockiert die Glukoneogenese in der Leber und stimuliert die Glycogensynthese. Im Fettgewebe reduziert Insulin die Lipolyse und verstärkt die Lipogenese. Zusammen mit dem antagonistisch wirkenden Glukagon reguliert Insulin somit den Glukose- und Fettmetabolismus, indem glukoseverbrauchende Prozesse gesteigert und die Freisetzung von Glukose aus der Leber verringert werden (1).

Im Herz- und Skelettmuskel sowie im Fettgewebe wird die Verstoffwechslung der Glukose durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / Akt Signalweg reguliert (25-27).

In einem ersten Schritt bindet Insulin an seinen spezifischen, zur Tyrosinkinasefamilie gehörenden Rezeptor. Der Insulinrezeptor (IR) wird in allen Chordata exprimiert und besteht aus zwei Transmembranuntereinheiten und zwei extrazellulären Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (28;29). Der IR ist in nahezu allen Zelltypen exprimiert, jedoch am stärksten in Fettgewebe und der Leber vertreten (30;31). Durch Bindung des Insulins an die α -Untereinheiten ändert sich deren Konformation und die β -Untereinheiten werden phosphoryliert. Diese Autophosphorylierung erlaubt durch Kinaseaktivität die Interaktion mit Insulinrezeptorsubstraten wie der PI3 Kinase.

PI3 Kinase wird phosphoryliert und aktiviert und Akt, das die Freisetzung von GLUT4 aus den endosomalen Speicherkompartimenten bewirkt.

Die Insulinrezeptorsubstrate (IRS) IRS1 und IRS2 sind essenziell für die insulin-stimulierte Translokation des GLUT4. Der Glukosemetabolismus wird überwiegend durch IRS1/2 und nachgeschaltet durch den Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAP Kinase) und PI3 Kinase Signalweg reguliert (32). Die PI3K besteht aus einer katalytischen p110 Untereinheit und einer regulatorischen p85 Untereinheit. Die allosterische Regulation der p85 Untereinheit bewirkt die Translokation der PI3K zu den spezifischen Substraten in der Plasmamembran. Als „second messenger“ bewirkt die PI3K abhängige Serin-Threoninkinase (PDK1) die Aktivierung von Akt und Proteinkinase B (PKB). Dies führt zur Konformationsänderung und vollständigen Aktivierung der Akt (33). Akt phosphoryliert nachfolgend die endosomalen GLUT4 Speicherkompartimente und bewirkt dessen Translokation zur Plasmamembran. Zusätzlich wird durch Phosphorylierung der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) die der Glykogensynthese aktiviert (Abb. 1).

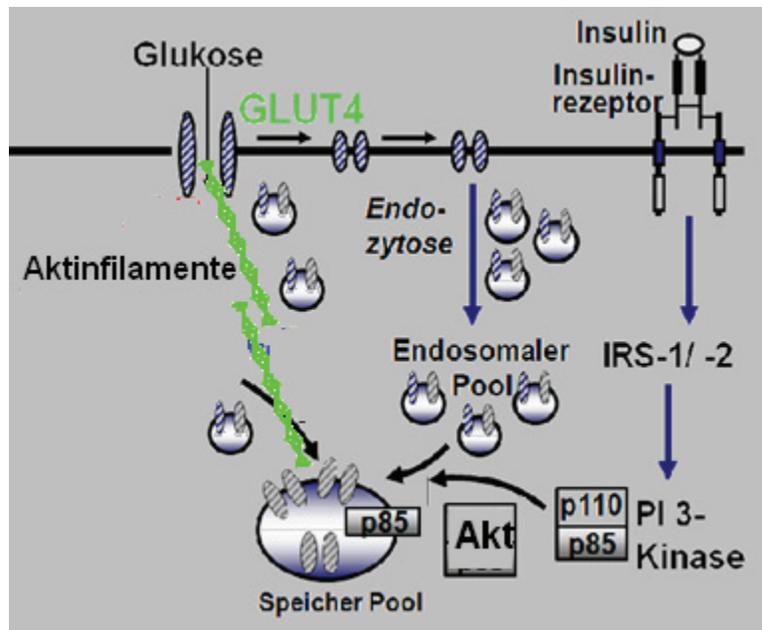


Abbildung 1: Insulinsignaltransduktion und Translokation des GLUT4

1.4 Energiemetabolismus des Herzens - Glukosemetabolismus

Kaum ein anderes Organ ist stärker auf eine kontinuierliche Energie- und Sauerstoffversorgung angewiesen als das Herz. Trotzdem ist das Herz fähig, den Energiefluss mit minimalen Änderungen der Metabolitenkonzentration, die für die Energieversorgung zuständig sind, drastisch zu regulieren (34). Aktomyosin-ATPase, Ca²⁺-ATPase und Na⁺-K⁺-ATPase sind die hauptsächlichen Enzyme, die den

Energieverbrauch und die Energiebereitstellung, durch oxidative Phosphorylierung regulieren. Wenn sich die Energieversorgung des Herzens verschlechtert, also die ADP Konzentration zulasten der ATP Konzentration ansteigt, wird kompensatorisch die Pumpleistung des Herzens reduziert, aber auch die Blutzufuhr durch die Koronarien erhöht.

1.4.1 Glukosetransportproteine

Der Energiemetabolismus in Mammalia ist maßgeblich durch die Zufuhr, Verteilung und Speicherung von Glukose bestimmt. Diese wird in Form von Polysacchariden über die Nahrung aufgenommen oder auch beispielsweise durch die Leber aus anderen Substraten wie Stoffwechselprodukten aus der Fettsäureverwertung synthetisiert. Der Austausch von Metaboliten zwischen den Geweben und der Transport in die Zelle erfordert Transportmechanismen, die diese Verbindungen in die Zellen aber auch wieder heraus transportieren. In Mammalia stehen zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Gruppen von Transportproteinen zur Verfügung.

Zur SGLT Familie (sodium dependent glucose transporters) gehören die Na⁺abhängigen Proteine, die überwiegend in der apikalen Membran von Nierenepithelzellen und dem Dünndarm exprimiert sind (35). Der Transport erfolgt unter Aufwendung von Energie mithilfe der Na⁺-K⁺ ATPase entgegen dem Konzentrationsgradienten (36).

Die Na⁺unabhängigen Glukosetransporter (GLUT) gewährleisten im Gegensatz dazu eine thermodynamisch begünstigte Bewegung von Glukose durch die Plasmamembran mit dem Konzentrationsgradienten (37). Es sind bisher zwölf Isoformen dieses Typs bekannt (Tab. 1), die nach Sequenzalignment in drei phylogenetische Klassen einzuordnen sind. (Abb. 2) (38). Zur Klasse I gehören die Glukosetransporter 1-4. Sie zeigen eine Sequenzhomologie von bis zu 65% und unterscheiden sich überwiegend durch ihren Expressionsort (39;40). GLUT1 ist ubiquitär in allen Mammalia exprimiert und basal an der Plasmamembran lokalisiert. GLUT1 gewährleistet somit die Basalversorgung mit Glukose (41-43). GLUT1 zeigt trotz hoher Substratspezifität zu Glukose ein breites Substratspektrum, so dass neben Glukose auch andere Hexosen und Pentosen umgesetzt werden können (43;44).

GLUT2 wird bevorzugt in der Leber und den pankreatischen β -Zellen exprimiert. Der relativ hohe K_M Wert von 60 mM bewirkt, dass Glukose linear mit der Glukosekonzentration in die Zelle und aus dieser raus transportiert werden kann und damit niemals limitierend für die Transportgeschwindigkeit ist.

Die Fruktosetransporter GLUT5 und GLUT11 sowie GLUT7 und GLUT9 bilden die Klasse II der Glukosetransporter, deren Funktion bisher weitestgehend unbekannt ist (38). Für GLUT11 sind zwei Splicevarianten bekannt, von denen die kürzere in Herz- und Skelettmuskel exprimiert ist und eine sehr geringe Affinität zu Glukose jedoch durch eine größere Affinität zu Fruktose hat. Die längere Splicevariante wird dagegen in Gehirn, Leber und Lunge exprimiert (38;45).

GLUT6, 8, 10 und 12 bilden Klasse III der den Transport erleichternden Proteine. Sie zeigen eine typische Glykosylierungsstelle auf Schleife 9 der in allen GLUT Transportern vorhandenen 12 Transmembranschleifen, ebenso wie ein spezifisches Zielmotiv. Die Signifikanz dieser Motive und die Abhängigkeit von einer hormonellen Regulation muss noch weiter untersucht werden.

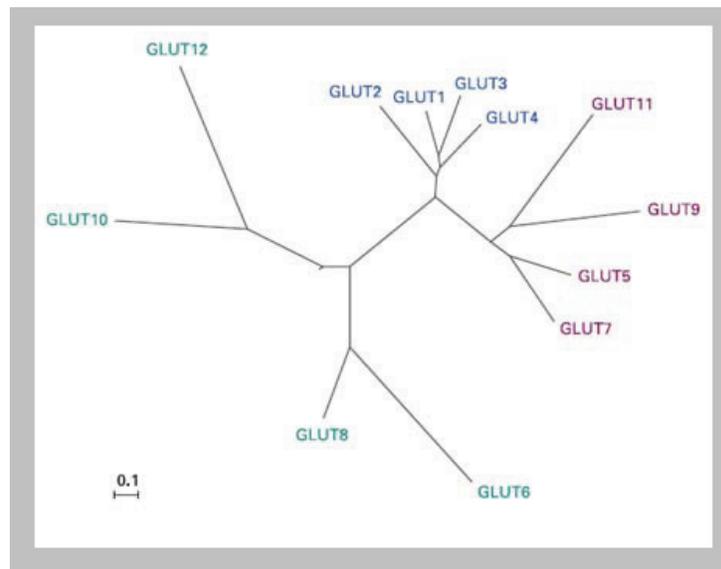


Abbildung 2: Dendrogramm der Glukosetransporterfamilie.

. Phylogenetische Einordnung der humanen Glukosetransporter nach multiplem Sequenz Alignment in drei Klassen [variiert nach Wood & Trayhurn (38)]

Isoform	Klasse	Expressions Ort	Insulin Sensitivität	Funktionaler Transport	Expression im WAT	Erst beschreibung
GLUT1	I	ubiquitär, Gehirn, Erythrozyten	nein	Glukose	ja	Mueckler [1985] Gould [1991]
GLUT2	I	Leber, Pankreas, Niere, Darm	nein	Glukose < Fruktose	nein	Fukumoto [1988] Gould [1991]
GLUT3	I	Gehirn	nein	Glukose	ja	Kayano [1988] Gould [1991]
GLUT4	I	Herz-, Skelettmuskel, Fettgewebe	ja	Glukose	ja	Fukumoto [1989] James [1989]
GLUT5	II	Darm, Niere, Hoden	nein	Glukose << Fruktose	ja	Kayano [1990] Davidson [1992]
GLUT6	III	Gehirn, Leukozyten, Milz	nein	Glukose	nicht bekannt	Doege [2000] Lisinski [2001]
GLUT7	II	unbekannt	unbekannt	unbekannt	nicht bekannt	Joost & Thorens [2001]
GLUT8	III	Gehirn, Fettgewebe, Hoden	nein	Glukose	ja	Doege [2000] Lisinski [2001] Ibberson [2000]
GLUT9	II	Leber, Niere	unbekannt	unbekannt	nicht bekannt	Phay [2000]
GLUT10	III	Leber, Pankreas	nein	Glukose	nicht bekannt	Dawson [2001] McVie-Wylie [2001]
GLUT11 2 Spliceformen	II	Herz-, skelettmuskel, Gehirn, Leber, Lunge	nein	Glukose < Fruktose	nein	Doege [2001] Sasaki [2001]
GLUT12	III	Herz-, Skelettmuskel, Prostata, Dünndarm, Fettgewebe	ja	unbekannt	ja	Rogers [2002]

Tabelle 1: Einordnung der Na⁺ unabhängigen Glukosetransporter [variiert nach Wood & Trayhurn (38)]

1.4.2 Insulinsensitiver Glukosetransport - GLUT4

Die metabolische Funktion von Insulin, die Stimulation der Glukoseaufnahme bei postprandial erhöhtem Blutzuckerspiegel ist seit mehr als 50 Jahren bekannt (44;46;47). GLUT4 ist überwiegend in Herz- und Skelettmuskel sowie dem Fettgewebe exprimiert, so dass in diesen Geweben nach Insulinstimulus verstärkt Glukose aufgenommen wird. Mechanistisch wird der GLUT4 nach Insulinstimulus aus intrazellulären Speichern

verstärkt zur Plasmamembran transloziert (42;48-50). Insulin koordiniert neben der Translokation zur Plasmamembran auch den intrinsischen Transport (51). Trotz des konstitutiven Transports des GLUT4 im Basalzustand befinden sich etwa 90% des GLUT4 in intrazellulären Speichersegmenten. Dies wird durch die verstärkte Endozytose bei verringerter Exozytose gewährleistet (52;53).

Die Charakterisierung der GLUT Expression in Muskelzellen der Mammalia führte neben GLUT4 auch zur Identifikation von GLUT1 (48;54;55). Die Expression von GLUT1 und GLUT4 ist abhängig vom Entwicklungsstand des Organismus. So steigt die Menge an GLUT4 erst in der perinatalen Phase an und beträgt bei adulten Ratten im Skelettmuskel etwa 90% (56). Im Gegensatz dazu ist im Herzmuskel das Verhältnis von GLUT1 zu GLUT4 auf 40% zu 60% verschoben (57). Dieses dynamische Verhältnis ist jedoch modulierbar und kann bei Denervation des Muskels zu einer verstärkten Expression von GLUT1 unter Reduktion des GLUT4 Anteils führen (58;59). Wie auch im Tiermodell gezeigt, (60) ist entgegen vorheriger Vermutung das Verhältnis von GLUT1 zu GLUT4 bei insulinresistenten oder diabetischen Patienten nicht verändert (61;62). Jedoch konnte beim Menschen ebenso wie im Tiermodell (63) gezeigt werden, dass körperliche Aktivität den GLUT4 Anteil im Muskel erhöhen kann (64;65). Dies bildet die Grundlage für den häufigen Befund, dass Insulinresistenz bei Aufnahme von Sport reversibel ist und 80% der frisch manifestierten Typ2 Diabetiker therapierbar sind.

1.4.3 Rolle des Zytoskeletts in der GLUT4 Translokation

Die Beteiligung des Aktinzytoskeletts an der Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran nach Insulinstimulus wurde bereits in mehreren Studien beschrieben und ist mittlerweile anerkannt (66). So konnte nach chemischer Zerstörung der Mikrotubuli oder Aktinfilamente gezeigt werden, dass die hormonstimulierte Aufnahme von Glukose und die Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran signifikant verschlechtert wurde (67-69). Nach Insulinstimulus wird das Zytoskelett umformiert und GLUT4 entlang des Zytoskeletts zur Plasmamembran transloziert. Zusammen mit der faltenförmigen Straffung der Plasmamembran begünstigt es als zelluläre Gerüststruktur den Transport für Signalmoleküle der Insulinkaskade (69). Zur Zeit sind mehr als 150 Proteine inklusive verschiedener Arachidonsäuremetaboliten bekannt, die mit Aktin interagieren oder die Organisation des Zytoskeletts direkt beeinflussen (69-71).

1.4.4 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen gehören zu einer heterogenen Gruppe der Nicht-Häm-eisenhaltigen Enzyme (72;73). Als sogenannte Dioxygenasen katalysieren sie die Peroxydation mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie Arachidon- oder Linolsäure, die eine cis,cis-1,4-Pentadien Struktur aufweisen (74). Lipoxygenasen sind sowohl in Pflanzen als auch in verschiedenen Tieren exprimiert und dort unter anderem in die Pathogenese der Inflammation, Wundheilung und in Pflanzen auch in die Pestizidresistenz involviert (75). Lipoxygenasen konnten auch in niederen Tieren wie Korallen (76) und bestimmten Bakterien nachgewiesen werden (77;78). Die Primärprodukte der Lipoxygenasen in Mammalia sind Prostaglandine, Leukotriene und Hydroxyeicosatetraensäuren (79). Es sind drei verschiedene Lipoxygenasen bekannt, die jeweils Arachidon- und Linolsäure umsetzen. Das Produkt der 5-Lipoxygenase sind Leukotriene. Das Produkt der 12/15 Lipoxygenase sind 12/15 Hydroxyeicosatetraensäuren (Abb.3). Cyclooxygenasen, die die gleichen Substrate umsetzen bilden Prostaglandine.

Die katalytische Bindungsdomäne weist in Mammalia etwa 600 Basenpaare auf und ist damit deutlich kürzer als in pflanzlichen Lipoxygenasen, die eine etwa 150 Basenpaare längere Zusatzschleife aufweisen. Die dreidimensionale Struktur in Mammalia zeigt eine überwiegend α -helicale Struktur der katalytischen Domäne und ist in der aktiven Bindungsstelle mit Eisen gekoppelt. Das Zentrum der Bindungsdomäne besteht aus zwei langen α -helicalen Strängen, die vier, überwiegend aus Histidinen bestehende Bindungsstellen für Eisen enthalten. An der carboxyterminalen Seite, die die Nicht-Häm-Eisen katalytische Bindungsposition bildet, ist Isoleucin enthalten (76;80;81).

In der Sequenz der Lipoxygenasen sind sechs Histidine hochkonserviert. Zum einen enthalten sie zwei der drei Eisenliganden und zum anderen konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle für die Funktion der Lipoxygenasen spielen (82).

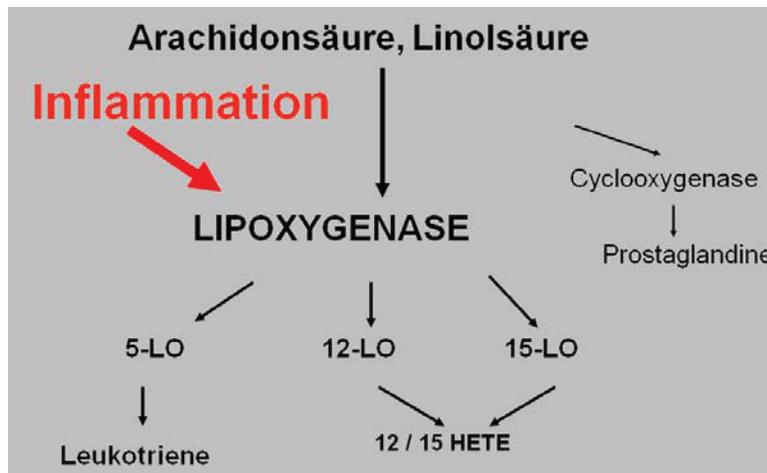


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Stoffwechselweges der Lipoxygenasen

1.4.5 12-Lipoxygenase und Interaktion mit GLUT4

12-Lipoxygenase (12-LO) ist ein hochgradig reguliertes Lipide peroxydierendes Enzym, das freie Polyenolfettsäuren oxidiert, aber auch Lipide und komplexe Lipidproteine wie Biomembranen verestert. Die Expression der 12-LO ist in verschiedenen Zelltypen wie Retikulozyten, Eosinophilen, Makrophagen und anderen Zellsystemen und Geweben beschrieben (72;83;84). Das Produkt der 12-LO und Arachidonsäure sind 12-Hydroxyeicosatetraensäuren (12-HETE). HETEs sind in verschiedene biologische Effekte involviert, unter anderem Chemotaxis, Ionentransport, Hormonsekretion und Zellproliferation (85;86). 12-LO wird ebenso wie die Metaboliten der Arachidonsäure mit verschiedenen inflammatorischen Prozessen unter anderem Artherosklerose in Verbindung gebracht (87). Wen et al. wiesen auf die prominente Rolle des 12/15-Lipoxygenase Signalweges in der Zytokinproduktion, insbesondere von IL-1 β , IL-6, TNF- α und MCP-1 hin (88). Andere Daten aus unserem Labor weisen 12-HETE zwei unterschiedliche Funktionen zu. Zusätzlich zu ihrer Eigenschaft als proinflammatorischer Faktor schützen 12-HETE gegen Auswirkungen hoher Glukosekonzentrationen, indem sie die Expression des Glukosetransporter I (GLUT1) in Mesangialzellen reduzieren (89). Weiterhin konnten wir zeigen, dass 12-LO und 12-HETE die insulinabhängige Translokation des Glukosetransporters IV (GLUT4) zur Plasmamembran unterstützen (Abb. 4), indem sie das Aktinzytoskelett stabilisieren (89-91). In der Literatur konnte in Adipozyten nach Inkubation mit hohen Glukosekonzentrationen gezeigt werden, dass die GLUT4 mRNA reduziert wurde

(92;93). Jedoch wurde die Rolle der verstärkten Produktion von 12-HETE bei der kardialen GLUT4 Expression noch nicht eingehend untersucht.

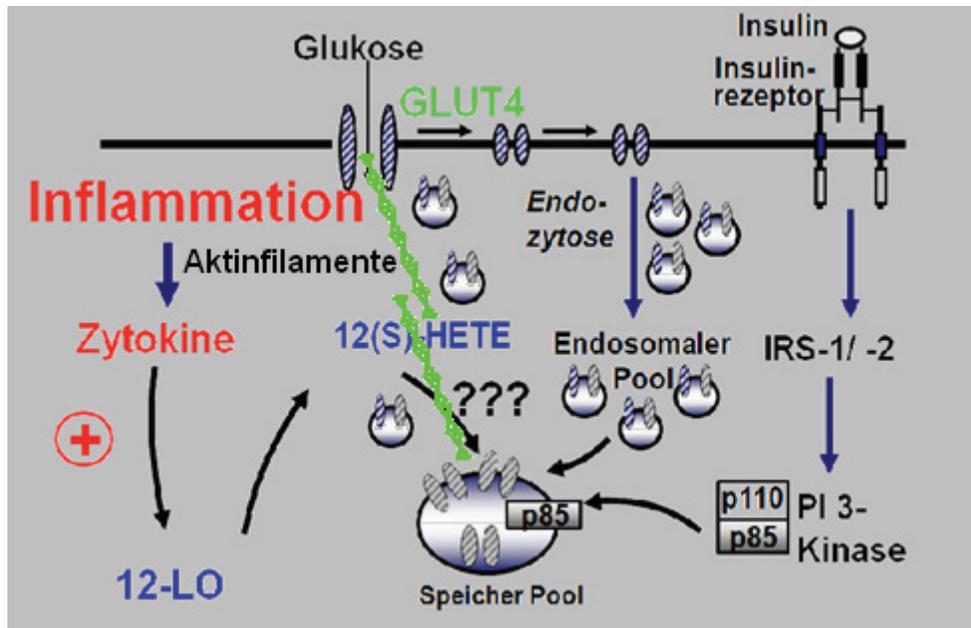


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen 12-LO und GLUT4

1.5 Energiemetabolismus des Herzens - Fettsäuremetabolismus

Neben der Energiegewinnung aus Glukose kann das Herz auch ATP über den enzymatischen Fettsäureabbau der β -Oxidation generieren. Hierzu werden die chemisch reaktionsträgen Fettsäuren durch Acetyl-CoA aktiviert und mittels Carnitin als „Carrier“ Molekül in die Mitochondrien eingeschleust. In der anschließenden β -Oxidation werden zum Beispiel aus Palmitinsäure 13 Moleküle ATP gebildet, die der Energieversorgung des Herzens zugeführt werden können.

Bei gesteigerten Mengen freier Fettsäuren im Blut infolge Insulinmangels wird das Verhältnis der Energiegewinnung zu Gunsten der Fettsäureverwertung verschoben. Die gleichzeitige Hemmung der Glukoseveresterung bewirkt, dass es zu einem Mangel an C_3 Metaboliten kommen kann. Gleichzeitig steht weniger glykolytisch gewonnenes ATP zur Verfügung.

Aus metabolischer Sicht ist das Fettgewebe ein endokrin aktives Organ, das freie Fettsäuren in relevanter Menge in den systemischen Kreislauf abgibt. Bei Adipositas ist die Regulation der Triglyzerid- und Energiesynthese dysreguliert, so dass eine massive

„Überschwemmung“ mit freien Fettsäuren des Plasmas zur ektopen Speicherung von Fettsäuremetaboliten und demnach zur Verfettung von Leber, Pankreas und Muskel führt (94).

1.5.1 Randle Zyklus

Freie Fettsäuren und deren Metabolite agieren auch als Signalmoleküle, die mit der Insulinsignalkaskade interagieren (95). Demnach beeinflussen freie Fettsäuren und Glukose im Plasma gegenseitig den Stoffwechsel. Nach dem Randle Zyklus kommt es postprandial zu einer Hemmung der Fettsäurefreisetzung durch erhöhte Glukosewerte im Plasma. Gegensätzlich kann die erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren auch den Glukosemetabolismus im Herzen verringern (96;97). Die im Randle Zyklus beschriebene Substratkonkurrenz bewirkt bei gesteigerter Fettsäureoxidation eine entsprechende Reduktion des Glukoseabbaus, was einen ungünstigen Zustand für diabetische Patienten darstellt (94).

1.6 Adipositas und dessen Rolle im Diabetes mellitus Typ II

Adipositas tritt häufig zusammen mit kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen wie Bluthochdruck, Hyperlipoproteinämie, Typ II Diabetes im so genannten Metabolischen Syndrom auf (98;99). Obwohl Adipositas generell sowohl das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse als auch die Entwicklung eines Diabetes mellitus erhöht, gibt es deutliche Hinweise, dass speziell die Subgruppe der viszeral adipösen Patienten häufig unter besonders schweren Formen des metabolischen Syndrom leiden (100), während auch extrem adipöse Patienten ein durchschnittliches metabolisches Risiko aufweisen, wenn sie einen geringen Anteil an viszeralem Fettgewebe haben. Desweiteren gibt es Hinweise, dass bei Gewichtsreduktion und vor allem der Verlust von viszeralem Fett zu einer signifikanten Verbesserung in Bezug auf das kardiovaskuläre und metabolische Risikoprofil führt. Folglich ist es speziell der viszerale Anteil des Fettgewebes, welcher mit der Steigerung des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit metabolischem Syndrom einher geht (101-103).

Es ist weitgehend akzeptiert, dass speziell viszerales Fettgewebe nicht nur ein lipid-speicherndes Depot ist, sondern auch ein aktives, endokrines Organ darstellt und inflammatorische Zytokine und Chemokine sezerniert (104;105). Viszerales Fett ist eine aktive Quelle für eine Vielzahl bioaktiver Faktoren (106), welche zur subklinischen

Inflammation im Rahmen einer Adipositas beisteuern. Es wird vermutet, dass viszerale Adipositas einen unabhängigen Faktor für die Steigerung des kardiovaskulären Risikos darstellt (99;100;107;108).

1.6.1 Fettgewebe als endokrines Organ

Experimentelle und klinische Studien lassen vermuten, dass viszerale Adipositas mit einer subklinischen Inflammation assoziiert ist. Die Produktion von Zytokinen durch das viszerale Fettgewebe ist deshalb von besonderem Interesse, da bedingt durch die parakrine Sekretion ein direkter Crosstalk zwischen Fettgewebe und den umgebenden Organen vermutet werden kann. Dies könnte einen mechanistischen Link zwischen viszeraler Adipositas verbunden mit Insulinresistenz und dem kardiovaskulären Risiko darstellen (109-111).

1.6.2 Epikardiales Fettgewebe

Während abdominales viszerales Fettgewebe eingehend untersucht wurde, stand extraabdominelles Fettgewebe, wie zum Beispiel epikardiales Fett nicht im Brennpunkt des Interesses, obwohl schon William Harvey 1847 als erster auf die Menge des epikardialen Fettes in Obduktionen hinwies (112) und später die „*Adipositas cordis*“ als häufige Ursache für den plötzlichen Herztod in Betracht zog (113).

Epikardiales Fett wurde bisher noch nicht eingehend wie viszerales abdominales oder subkutanes abdominales Fettgewebe studiert. Jüngst konnte durch neue Darstellungsmethoden das epikardiale Fettgewebe *in vivo* eingehender analysiert werden (114-117). Humanes epikardiales Fettgewebe stellt ein viszerales Fettdepot dar, welches eng mit dem Myokard verbunden ist (106;114;118).

Annehmend, dass epikardiales Fett ähnliche metabolische und sekretorische Eigenschaften aufweist, wie für das viszerale abdominale Fettgewebe bekannt und unter Beachtung der ausgeprägten Nähe zu den Koronargefäßen und dem Myokard, könnte vermutet werden, dass epikardiales Fettgewebe eine Rolle in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und speziellen Formen der Kardiomyopathie spielt. In neueren Studien wird ein enger Zusammenhang zwischen Adipositas bestimmt über Body-Mass-Index, Bauchumfang, dem Anteil des viszeralen Fettes bestimmt durch Magnet-Resonanz-Tomographie und epikardialem Fett vermutet. Zusätzlich wurde kürzlich die Manifestation von Insulinresistenz sowie die Entwicklung kardialer Erkrankungen wie

Myokardhypertrophie und Bluthochdruck in direkte Abhängigkeit mit der Menge des epikardialen Fettgewebes gestellt (114;116;119).

1.6.3 Zytokinexpression im epikardialen Fettgewebe

Da epikardiales Fettgewebe und das darunterliegende Myokard nicht durch eine Faszie getrennt sind, haben Fettsäuren und Chemokine entweder direkten Kontakt zum Myokard durch Diffusion durch den interstitiellen Raum oder durch Abgabe in die Koronarzirkulation. Diese anatomische Nähe steht in Einklang mit der Annahme einer direkten regulatorischen Interaktion zwischen epikardialem Fett und dem Myokard. Allerdings konnte ein kausaler Zusammenhang bisher nicht bewiesen werden. Die primäre Funktion des Fettgewebes ist die Speicherung von Fettsäuren, jedoch gibt es als endokrines Organ auch häufig als Adipokine bezeichnete Faktoren in die peripheren Organe ab. Die Synthese und Sekretion dieser Faktoren variiert zwischen den verschiedenen Typen des Fettgewebes.

1.6.4 Fettgewebsinflammation

Neben der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen aus aktivierten Makrophagen bei Adipositas bewirkt die übermäßige Akkumulation von Lipiden in Adipozyten potenziert. Die Aktivierung von proinflammatorischen Prozessen und somit ebenfalls die Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen. Diese sogenannte Inflammation des Fettgewebes bewirkt die gesteigerte Verstoffwechselung von Fettsäuren zur Energiegewinnung und somit wie vorab beschrieben die Reduktion des Glukosemetabolismus. Die nicht enzymatische Peroxydation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und deren durch 12/15 Lipoxygenasen hydroxylierten Peroxydmetaboliten bewirkt die Anreicherung von reaktiven Hydroxyalkenen. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass bei Adipositas die vermehrte Produktion von Hydroxyalkenen zu einem entzündlichen Phänotyp des Fettgewebes führt (75).

1.7 Ziel der Arbeit

Unsere Ausgangshypothese war es, dass *in vitro* die Funktion von Kardiomyozyten, deren Insulinsensitivität und Glukosemetabolismus maßgeblich durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden kann, die durch das epikardiale Fett gebildet werden. Um die Relevanz der ermittelten Daten zu belegen, sollte die Situation *in vivo* untersucht werden. 1) Wir haben analysiert welche Zytokine epikardiales Fett produziert und auch ob DM2 einen signifikanten Einfluss hat. Dies sollte an epikardialem Fett von Patienten untersucht werden, das wir in einer Kooperation mit der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Universität Düsseldorf Prof. Dr. E. Gams und Dr. F. Ruppe erhalten haben. Hierzu war es notwendig herauszustellen, ob Diabetes mellitus Typ II die Eigenschaften und die Sekretion von Adipokinen in humanem epikardialen Fettgewebe beeinflussen kann.

Da der Zugang zu humanem epikardialem Fettgewebe aus ethischen Gründen nur sehr eingeschränkt möglich ist und meist lediglich Gewebe von multimorbiden Patienten verwendet werden konnte, war die Etablierung eines Tiermodells notwendig.

2) Daher sollte das Meerschweinchen als Modell validiert werden, um die parakrine Interaktion zwischen dem gesunden Herzmuskel und epikardialem Fettgewebe zu untersuchen. In weitergehenden Studien sollte der Einfluss von Adipositas und Diabetes mellitus auf das Sekretom des epikardialen Fetts und somit dessen Auswirkungen auf den Herzmuskel untersucht werden.

Abschließend sollte eruiert werden, ob die unterschiedliche Zusammensetzung einer fettreichen und einer kohlenhydratreichen „western style“ ähnlichen Diät unterschiedliche Auswirkungen auf das Sekretom des epikardialen Fetts und die Herzfunktion hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Fertigprodukte und Kits

2.1.1.1 Chemikalien

Agarose SeaKem LE	Biozym, Oldendorf
Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA fettsäurefrei	Serva, Heidelberg
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchloriddihydrat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Hyaluronidase	AppliChem, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Insulin (Schwein)	Sigma-Aldrich, Seelze
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase	Serva, Heidelberg
LB-Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen, Karlsruhe

LB-Broth base (Lennox L Broth base)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchloridhexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Morpholinpropanschwefelsäure, MOPS	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Fluka, Seelze
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Seelze
TGF – β 1 rekombinant human	R&D systems, Minneapolis, USA
Tetramethylethylendiamin, TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypan-Blau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Trypsin Inhibitor	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.1.1.2 Fertigprodukte

Aquasafe 300 plus	Zinsser, Frankfurt
Bio-Rad Reagenz, Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Complete Proteasen-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytochalasin B	Sigma, München
DMEM mit 1 g/l D-Glucose, 25 mM HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenstandards (100 bp und 1 kb)	New England Biolabs, Frankfurt
ExcelGel SDS Buffer Strips	GE Healthcare, Uppsala/SE
Fötales Kalberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
FuGene 6	Roche Diagnostics, Mannheim
G418	Calbiochem, Darmstadt
GelBond PAGfilm	GE Healthcare, Uppsala/SE
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	BD Biosciences, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Saline, PBS	Invitrogen, Karlsruhe
PBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+}	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Größenstandard (7-175 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
RNA-Größenstandard	New England Biolabs, Frankfurt
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe

Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Uptilight HRP Blot Reagent	InterchimChemicals, Mannheim

2.1.1.3 Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
12(S)Hete ELISA	assay designs, Ann Arbor, USA

Omniscript Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QuantiTect™ SYBR Green Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Human Cytokine Array	Raybiotech, Norcross, USA

2.1.2 Puffer und Medien

2.1.2.1 Molekularbiologische Puffer und Medien

TAE-Puffer	40 mM Tris- (hydroxymethyl)amino- methan 0,11 % (v/v) Essigsäure konz. 1 mM EDTA in H ₂ O gelöst
------------	---

10x DNA-Probenpuffer	0,05 % (w/v) Bromphenolblau 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat 30 % (w/v) Glycerol in TAE-Puffer gelöst
Ethidiumbromid-Färbelösung	2,5 µg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O gelöst
FA-Gelpuffer	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA 0,74 % (v/v) Formaldehyd pH 7,0, gelöst in RNase freiem H ₂ O
5x RNA-Probenpuffer	0,2 % (v/v) Bromphenolblau, gesättigt 4 mM EDTA 9,5 % (v/v) Formaldehyd 20 % (v/v) Glycerol 30 % (v/v) Formamid 40 % (v/v) 10x FA- Gelpuffer gelöst in H ₂ O

2.1.2.2 Zellbiologische Puffer und Medien

Kulturmedium H9c2

500 ml DMEM m. 1 g/l
D-Glucose
25 mM HEPES
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1x nicht-essentielle
Aminosäuren NEAA10
% (v/v) FCS (inaktiviert)

Kulturmedium H9c2-E2

500 ml DMEM m. 1 g/l
D-Glucose,
25 mM HEPES
100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1x nicht-essentielle
Aminosäuren NEAA
10 % (v/v) FCS
(inaktiviert)
0,6 mg/ml G418

Transportpuffer	134 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,8 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 0,8 mM MgSO ₄ · 7 H ₂ O 20 mM HEPES 0,2 % BSA gelöst in H ₂ O
-----------------	---

2.1.2.3 Proteinanalytische Puffer

TBS	10 mM Tris- (hydroxymethyl)aminom ethan 0,1 M NaCl gelöst in H ₂ O, pH 7,4
-----	---

TBS-T	0,25 % (v/v) Tween 20 gelöst in TBS, pH 7,4
-------	--

PBS	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O, pH 7,4
-----	---

6x Laemmli	0,375 M Tris-HCl, pH 6.8 12 % (w/v) Na-Dodecyl- sulfat 47,5 % (v/v) Glycerin 15 % (v/v) Mercapto- ethanol 0,3 % (w/v) Bromphenolblau
Lysepuffer Triton	50 mM Tris- (hydroxymethyl)amino- methan 0,5 % (v/v) Triton X-100 2 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 150 mM NaCl 2 % (v/v) Complete Proteasen-Inhibitor- Cocktail 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF 1 mM DTT gelöst in H ₂ O
Anodenpuffer I	300 mM Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan 20 % Methanol gelöst in H ₂ O

Anodenpuffer II	25 mM Tris(hydroxymethyl)- aminomethan 20 % Methanol gelöst in H ₂ O
Kathodenpuffer	40 mM Aminohexansäure 0,01 % Natriumdodecylsulfat 20 % Methanol gelöst in H ₂ O
Blockier-Lösung	2,5 % Magermilchpulver + 2,5 % (w/v) BSA gelöst in TBS-T, pH 7,4

2.1.3 Fixative

Krebs-Henseleit Puffer
modifiziert 5,000IE/L,
Procain 5g/L, pH 7,35

Fixative
2% Paraformaldehyd,
2% Glutaraldehyd,
0,2 % Pikrinsäure in
0,07 M
Kakodylsäure, pH 7,4

2.1.4 Molekularbiologische Enzyme

Omniscript Reverse Transcriptase
T4 DNA Ligase
QIAGEN, Hilden
New England Biolabs,
Frankfurt a.M.

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

12- Lipoxygenase	Cayman, Ann Arbor, USA
Adiponectin	Abcam, Cambridge, UK
Akt	New England Biolabs, Frankfurt
phospho-Akt (Ser473)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
GAPDH	Abcam, Cambridge, UK
GLUT1	mit freundlicher Genehmigung Prof. S.Sasson, Hebrew University, School of Medicine, Jerusalem
GLUT4 (C-20)	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
HIF1 α	Abcam, Cambridge, UK
MCP-1	Abcam, Cambridge, UK
c-Myc (9E10)	Calbiochem, Darmstadt
α -Tubulin	Calbiochem, Darmstadt
PPAR α	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
PPAR γ	Santa Cruz, Santa Cruz/USA
PPAR δ	Cayman, Ann Arbor, USA

Sekundäre Antikörper

Kaninchen IgG-HRP (Ziege)

Promega, Mannheim

Maus IgG-HRP (Ziege)

Promega, Mannheim

Maus Ig, [125I]-markiert

GE Healthcare,
München

Ziege IgG-HRP (Esel)

Promega, Mannheim

Armenischer Hamster IgG-HRP (Ziege)

Santa Cruz, Santa
Cruz/USA

2.1.6 Zellen

Eukaryotische Zelllinien

H9c2

Ratten-
Kardiomyoblasten-
Zelllinie

H9c2-E2

Ratten-Kardio-
myoblasten Zelllinie
basierend auf H9c2-
Zellen, in deren Genom
cDNA für den humanen
Insulinrezeptor stabil
integriert wurde (120)

2.1.7 Radioisotope

125I-Protein A

Amersham,
Braunschweig
spez. Aktivität 2000
Ci/mmol

2.1.8 Geräte

Blotting-Apparatur LKB-Novablot,	Amersham Biosciences, Freiburg
Brutschrank 6000	Heraeus, Hanau
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad
Filmremover LKB	Amersham Biosciences, Freiburg
Geldokumentationssystem	LTF, Wasserburg
Horizontal-Elektrophoresekammer Multiphor	Amersham Biosciences, Freiburg
Kippschüttler Duomax 1000	Heidolph, Schwabach
Lumi-Imager	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR-System Trio-ThermoblockTM	Biometra, Göttingen
Realtime-PCR-System	ABI PRISM® 7700 Thermocycler
Schüttelinkubator KS-15	Bühler, Tübingen
Spektrophotometer DU 650 / DU 7400	Beckman, München
Transmissionselektronenmikroskop	902A, Zeiss, Oberkochem
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Schwabach
Ultramikrotom	Leica, Wetzlar
Universal-Gamma-Zähler	LKB, Wallac, Turku (FIN)
1282 Compugamma CS	
LS 6000 IC	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge RC 5B plus (Rotor: GSA / SS34)	DuPont, Bad Homburg
Zentrifuge RotantaR (Rotor: 5094)	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 30 RF (Rotor: 1412)	Hettich, Tuttlingen

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Ligation von PCR-Fragmenten mit linearisierten Vektoren

Die Verknüpfung eines DNA-Fragmentes mit einer linearisierten Plasmid-DNA wird Ligation genannt. Das verwendete Enzym, die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe.

Reagenz	→	Endkonzentration
T4-DNA-Ligase	→	400-U
Linearisierte Plasmid-DNA	→	50-ng
cDNA	→	entsprechend-Formel

Tabelle 2: Typischer Reaktionsansatz einer Ligation

.Die linearisierte Plasmid DNA wurde mit T4-DNA-Ligase 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine 20 minütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert. Zur Berechnung der einzusetzenden Menge an cDNA in der Ligrationsreaktion wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{cDNA [ng]} = (\text{cDNA [bp]} / \text{Vektor [bp]}) \times 50 \text{ ng Vektor}$$

Zur Amplifikation der ligierten Plasmid-DNA wurden 1-5 µl der Ligrationsreaktion in *E. coli* Top10 Zellen transfiziert.

2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Das Einbringen von artfremder Plasmid-DNA in Bakterien wird Transformation genannt. Diese Technik wird angewandt, um Plasmid-DNA nach einer Ligrationsreaktion zu amplifizieren und später aufzureinigen.

Transformation in *E.coli* Top10

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot *E.coli* Top10 Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend 1-5 µl des Ligrations ansatzes zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 30 Sekunden in einem Wasserbad mit 42°C Hitzeschock inkubiert und anschließend kurz auf Eis platziert. Danach wurden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und eine Stunde lang unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 % und 90 % des

Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und zur Koloniebildung 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-Minipräparation

Zur Aufreinigung geringer Mengen Plasmid-DNA zur Identifikation positiver Klone nach einer Transformation wurden mehrere Kolonien einer LB-Agar-Platte gepickt und in jeweils 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker gegeben. Die Ansätze wurden 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend wurde die Zellmasse aus 2 ml Kultur durch fünf Minuten Zentrifugation bei 6.000 x g gewonnen. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl destilliertem H₂O aufgenommen. Die hieraus gewonnene Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse analysiert. Bei Identifikation eines positiven Klons wurde mit 10 µl des entsprechenden Ansatzes eine größere Kultur angeimpft.

Plasmid-Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation dient zur Aufreinigung von Plasmid-DNA in Mengen von mehr als 300 µg aus 100-200 ml Kulturansätzen. Hierfür wurde 100 bzw. 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker mit 10 µl einer 5 ml Minipräparationskultur angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellmasse 15 Minuten lang bei 6.000 x g bei 4°C abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und in 400 µl endotoxinfreiem TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.4 Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen

Bedingt durch die aromatischen Purin- und Pyrimidinringsysteme besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine dagegen durch die Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren, beispielsweise von Tryptophan, ein Maximum bei 280 nm. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurden Aliquote mit H₂O verdünnt und die Absorptionen bei 260 und 280 nm im Vergleich zu einer Referenzprobe ohne DNA bestimmt. Das Verhältnis der Absorption 260/280 nm ermöglicht die Reinheitsabschätzung der Probe. Bei einer proteinfreien DNA-Probe

sollte der Wert einen Betrag zwischen 1,8 und 1,9 ergeben. RNA-Proben wurden in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 verdünnt und auf die gleiche Weise vermessen, hierbei sollte das Verhältnis der Absorption 260/280 nm zwischen 1,9 und 2,1 liegen.

2.2.6 Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen

Zur Aufreinigung von RNA aus H9c2-hIR Zellen wurden 7×10^6 Zellen mit 600 μ l RLT Puffer lysiert und mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 μ l RNase-freiem H₂O. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit wurden die Eluate 1:20 und 1:50 mit 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 verdünnt. Die Absorption wurde bei 260 und 280 nm gemessen.

2.2.7 Formalaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Um die Integrität und die Größenverteilung von isolierter Gesamt-RNA abschätzen zu können, wird eine Probe mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Entsprechend der Spezies sollen in diesem Gel die Banden der ribosomalen RNAs als distinkte Banden erscheinen. Dabei sollte am Beispiel bei der Spezies Ratte die 28S rRNA mit einer etwa doppelt so starken Intensität auftreten wie die Bande der 18S rRNA. Zur Vorbereitung eines 1,2 %igen Formaldehyd-Agarose-Gels (FA-Gels) wurde 1,2 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml FA-Gelpuffer gelöst. Nach Abkühlen auf 60°C in einem Wasserbad wurden 1,8 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung und 1 μ l einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung zur Agarose-Lösung hinzugegeben, gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Vor Start des Gellaufs, wurde das ausgehärtete Gel 30 Minuten lang in FA-Gelpuffer äquilibriert. Die RNA-Proben wurden mit 5x RNA-Probenpuffer versetzt, drei bis fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf das FA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung im FA-Gel erfolgte in einem elektrischen Feld bei fünf bis sieben Volt pro cm in 1x FA-Laufpuffer

2.2.8 Reverse Transkription von mRNA

Durch reverse Transkription lässt sich isolierte mRNA in cDNA umschreiben um in einem folgenden Schritt, beispielsweise mittels Real-Time-PCR, spezifisch amplifiziert zu werden. Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des Omniscript Reverse Transkription Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Mit der dabei verwendeten Omniscript Reversen Transkriptase kann cDNA aus RNA-Mengen zwischen 50 ng und 2

μg amplifiziert werden. Um aus der Gesamt-RNA selektiv alle mRNAs zu amplifizieren, wurde ein Oligo(dT)-Primer verwendet, der das Poly(A)-Ende am 3'-Ende der mRNA bindet. Zur Bestimmung der Konzentration der transkribierten DNA wurden die Proben 1:50 und 1: 100 verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen.

Reagenzien	→	Endkonzentration
10x-Reaktionspuffer	→	1x
dNTP-Mix	→	je-0,5-mM
oligo-(dT)-Primer	→	1- μM
RNAse-Inhibitor	→	10-U
Omniscrypt-Reverse-Transkriptase	→	4-U
RNA-Template	→	variabel
RNAse-freies-H ₂ O	→	ad-20- μl

Tabelle 3: Reaktionsansatz einer reversen Transkription mit Omniscrypt

2.2.9 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Ausgangsmenge einer spezifischen mRNA-Sequenz. Dazu wird die während der reversen Transkription in RNA/DNA-Hybridstränge umgeschriebene mRNA in einer PCR eingesetzt und die Bildung neuer DNA-Stränge durch sequenzspezifische Fluoreszenzsonden oder DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe quantitativ erfasst.

2.2.9.1 Primer Design

Um spezifisch nur cDNA von prozessierter mRNA und nicht genomische DNA zu amplifizieren, werden Primer für die Real-Time-PCR entsprechend entworfen, so dass die eine Hälfte des Primers an das 3'-Ende eines Exons und die andere Primer-Hälfte an das 5'-Ende des angrenzenden Exons -intronüberspannend- bindet. Der Primer kann dadurch nicht an genomische DNA binden. Um passende Primer-Sequenzen in der Ziel-RNA zu finden, wurde die Software Primer Express 1.5 von ABI PRISM[®] verwendet. Dabei ist darauf zu achten, einen GC-Gehalt von 40-60 %, eine Primer-Länge von 20-30 bp, einen gleichen Schmelzpunkt T_m und eine PCR-Produkt von etwa 100 bp Länge zu erhalten.

Gen	Primer	Sequenz	GC(%)	T _m (C°)	Länge
GAPDH	forward	CA-ATG-CAT-CCT-GCA-CCA-C	56	56	18-bp
	reverse	TG-GTC-ATG-AGC-CCT-TCC	59	54	17-bp
12-LO	forward	CAG-GAC-AGA-GGC-TTC-CCT-ACC	62	68	21-bp
	reverse	CAC-GTG-AAG-ATG-CAC-ATG-GTG	52	64	21-bp
GLUT4	forward	GGG-CTG-TGA-TGT-AGT-GCT-TTC	52	64	21-bp
	reverse	CAG-CGA-GGC-AAG-GCT-AGA	61	55	18-bp
Akt	forward	TCC-CTT-CCT-TAC-AGC-CCT-CAA	52	64	21-bp
	reverse	GGC-GTA-CTC-CAT-GAC-AAA-GCA	52	64	21-bp

Tabelle 4: Primer für Real-Time-PCR

2.2.9.2 Real-Time-PCR mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen

SYBR Green I bindet hoch sensitiv an doppelsträngige DNA während der Real-Time-PCR und ist daher als Farbstoff besonders gut geeignet. Aus diesem Grund wurde das QuantiTect™ SYBR Green Kit von QIAGEN verwendet. Allerdings bindet SYBR Green I an alle DNA-Doppelstränge, also auch an Primer-Dimere oder nicht spezifische DNA Produkte. Dieses Kit enthält eine für die Hot-Start-PCR optimierte Taq-DNA-Polymerase (HotStartTaq DNA-Polymerase), die die Bildung von Primer-Dimeren und nicht spezifischen PCR-Produkten minimiert und dadurch die Spezifität der Reaktion erhöht. Alle Real-Time-PCRs wurden an einem ABI PRISM® 7700 Thermocycler durchgeführt.

Komponente		Endkonzentration
2x-SYBR-Green-PCR-Master-Mix	→	1x
Primer-forward	→	0,3-µM
Primer-reverse	→	0,3-µM
RNAse-freies-H ₂ O	→	ad-20-µl

Tabelle 5: Einfacher Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR

Schritt	→	Bezeichnung	→	Temperatur (°C)	→	Zeit	→	Zyklen
1	→	initiale-Denaturierung	→	95	→	15-min	→	¶
2	→	Denaturierung	→	95	→	30-sek	→	¶
3	→	Primer-Hybridisierung	→	55	→	30-sek	→	¶
4	→	Polymerisation	→	72	→	45-sek	→	¶
Schritte 2-4		→	→	→	→	→	→	40-Zyklen
5	→		→	25	→	2-min	→	¶
6	→	TempRamp	→	95	→	15-sek	→	¶
7	→		→	50	→	20-sek	→	¶
8	→	Denaturierung	→	95	→	15-sek	→	¶
9	→	Datensammlung	→	25	→	90-min	→	¶

Tabelle 6: Schematischer Ablauf einer Real-Time-PCR mit TempRamp

2.2.9.3 Reaktionsansätze und Real-Time-PCR-Lauf

Die Real-Time-PCR Ansätze wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. Als interne Kontrolle wurde GAPDH als housekeeping gene amplifiziert und als Negativkontrolle für jedes Primerpaar ein Ansatz ohne cDNA verwendet. Alle Ansätze (mit und ohne cDNA) wurden in Triplikaten amplifiziert. Um die optimale Menge an Ausgangsmaterial zu bestimmen, wurden Ansätze mit 1, 50 und 250 ng cDNA durchgeführt. Um eine möglichst geringe interne Varianz der einzelnen Reaktionsansätze zu erhalten, wurde für alle Ansätze einer Replikation ein Mastermix vorbereitet. 60 µl des Mastermixes wurden zu 15 µl zu amplifizierender cDNA einer Konzentration gegeben und davon dreimal 25 µl in die Reaktionsgefäße für die Real-Time-PCR aliquotiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von H9c2 und H9c2-E2 Zellen

Die adhärenente Rattenkardiomyoblastenzelllinie H9c2-hIR geht aus der Zelllinie H9c2 hervor, in deren Genom die kodierende cDNA des humanen Insulinrezeptors integriert wurde, welche durch G418 Selektion stabil überexprimiert wird. H9c2 selbst ist ein Subklon der ursprünglichen Zelllinie BD1X aus embryonalem Rattenherzgewebe. Die Kultivierung zur Stammhaltung erfolgte in T175-Kulturflaschen in 30 ml H9c2 oder H9c2-hIR Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂. Die beiden Zelllinien wurden im Abstand von drei oder vier Tagen passagiert. Hierzu wurden sie mit 13 ml PBS gewaschen und über drei Minuten mit 5 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und anschließend fünf Minuten lang bei 800 rpm zentrifugiert. Nach Abzug des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml H9c2-hIR-Kulturmedium resuspendiert und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung verwendet. Je nach Passagierzeitraum wurden 800.000 Zellen (bei vier Tagen) bzw. 1.200.000 Zellen (bei drei Tagen) in 30 ml Kulturmedium resuspendiert und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde von den Zellen in Suspension ein Aliquot abgenommen und davon 20 µl mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung versetzt. Nach einer kurzen Inkubation wurde gemischt, ca. 20 µl der Zellsuspension in Trypan-Blau wurden auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und vier Großquadrate ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter in Suspension zu erhalten, wurde die gezählte Zellzahl mit zwei multipliziert (Verdünnung in Trypan-Blau), durch vier geteilt (vier Großquadrate gezählt) und wiederum mit 10⁴ multipliziert (Volumen eines Großquadrates entspricht 0,1 µl).

2.3.3 Transfektion

Transfektion bedeutet das Einbringen artfremder DNA bzw. RNA in eukaryotische Zellen. Übliche Methoden sind die Calciumphosphat-Transfektion, die Elektroporation und die Lipofektion. Bei der Lipofektion wird DNA bzw. RNA vor der Transfektion durch die Zugabe eines Lipid-Gemisches in Micellen komplexiert, so dass sie damit leichter während des Transfektionsvorgangs in die Wirtszelle eingeschleust werden kann.

2.3.3.1 Transfektion von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofektion in H9c2-hIR Zellen wurde das FuGene6 Transfektions-Reagenz verwendet. Transfiziert wurden Zellen, die zu 40 % bis 60 % konfluent den Boden des Kultivierungsgefäßes bedeckten und über 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert worden waren. Zur Kultivierung der zu transfizierenden H9c2-hIR-Zellen wurden 12-Kavitäten-Platten mit 1 ml H9c2-hIRKulturmedium pro Kavität verwendet. FuGene 6 wurde im Verhältnis 1:35 (v/v) mit DMEM vorverdünnt. Anschließend wurde die Plasmid DNA in einem Verhältnis von 1:3 (w/v) zum vorverdünnten FuGene6 pipettiert und gemischt. Dabei wurde in einem 12-Kavitäten-Ansatz 0,5 µg Plasmid DNA verwendet. Der Ansatz wurde 15 Minuten lang inkubiert und anschließend wurden 55 µl des Ansatzes tropfenweise zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. 24 bis 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert bzw. weiter bearbeitet.

2.3.3.2 Transfektion von siRNA

Durch Einbringen doppelsträngiger RNA-Oligonukleotide in eukaryotische oder pflanzliche Zellen lässt sich die Expression eines oder mehrerer Proteine spezifisch hemmen. Dabei wird die eingebrachte dsRNA in einem ersten Schritt durch Dicer-Enzyme in Oligonukleotide mit 19 bis 21 bp geschnitten um anschließend an einen Nukleasen-Komplex zu binden. In diesem Komplex wird die dsRNA (double stranded RNA) in ssRNA (single stranded RNA) entwunden wodurch der gesamte Komplex über die ssRNA spezifisch an eine komplementäre mRNA Sequenz binden kann und diese etwa 12 Nukleotide abwärts des 3'-Endes der ssRNA schneidet. Der Prozess der posttranskriptionalen Genrepression wird RNA-Interferenz genannt. Die für eine mRNA-Sequenz spezifische inhibitorische RNA, welche in die Zelle eingebracht wird, wird siRNA (small interfering RNA) genannt. Doppelsträngige siRNA wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 in H9c2-hIR-Zellen eingebracht. Transfiziert wurden 40 bis 60 % konfluente Zellen. Zur Kultivierung der zu transfizierenden H9c2-hIR-Zellen wurden 30.000 Zellen in 12-Kavitäten-Platten mit 1 ml H9c2-hIR-Kulturmedium pro Kavität ausgesät. Zur Transfektion wurde die siRNA in 125 µl DMEM verdünnt, so dass sie später in einem Gesamtvolumen von 1 ml eine Endkonzentration

von 100 nM hatte. Pro Ansatz wurden 2 µl Lipofectamine 2000 in 125 µl DMEM verdünnt und 5 min inkubiert. Danach wurde der siRNA-Ansatz mit dem Lipofectamine Ansatz gemischt und 20 min inkubiert. Währenddessen wurde ein Medienwechsel mit 750 µl DMEM + 10 % FCS durchgeführt. Anschließend wurde auf jede zu transfizierende Kavität 250 µl des siRNA Lipofectamine Komplexes gegeben und 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. 48 h Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert bzw. weiter bearbeitet.

2.3.4 Translokations-Messungen

2.3.4.1 GLUT4myc-Translokation

Um in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2-hIR die insulinstimulierte Translokation des Glucosetransporters GLUT4 aus intrazellulären Speicherkompartimenten hin zur Plasmamembran untersuchen zu können, wurde in dieser Zelllinie GLUT4 mittels Plasmidtransfektion überexprimiert, welches an der ersten extrazellulären Schleife ein humanes myc-Epitop (AEEQKLISEEDLLK) trägt. Durch dieses extrazelluläre myc-Epitop kann das in der Plasmamembran integrierte GLUT4myc detektiert werden. Dazu wurden 30.000 Zellen pro Kavität in einer 12-Kavitäten-Platte ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die versuchsimmanente Streuung auszugleichen, wurden alle Versuchsbedingungen in Triplettansätzen durchgeführt. Pro Kavität wurden anschließend 0,5 µg pCMV-GLUT4myc bzw. pCMVβ als Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion 48 h kultiviert und dann zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Danach wurde FCS-freies DMEM mit 1 % BSA zugegeben und zwei Stunden lang bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit Transportpuffer gewaschen worden waren, wurden sie 30 min lang mit Transportpuffer ohne bzw. mit 1 µM Insulin bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 %igem Paraformaldehyd 15 min lang fixiert und viermal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Zellen eine Stunde mit PBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Danach wurde 2 µg/ml anti-myc-Antikörper in PBS mit 5 % Magermilchpulver zugegeben und zwei Stunden unter Schütteln inkubiert. Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde viermal mit 5 % Magermilchpulver in PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper diente ein ¹²⁵Iod-markierter anti-Maus-Antikörper, mit dem die Zellen (0,1 µCi pro Kavität in PBS mit 5 % Magermilchpulver)

eine Stunde lang inkubiert wurden. Nicht gebundener Zweitantikörper wurde durch intensives Waschen mit 5 % Magermilchpulver in PBS und PBS mit 0,05 % Tween20 entfernt. Zur Zellsolubilisierung wurde 1 ml 1 %iges Natriumdodecylsulfat zugeben und eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in Sarstedt-Röhrchen überführt, die Kavitäten mit PBS nachgespült und der Überstand in die gleichen Sarstedt-Röhrchen gegeben. Die Messung der Gammastrahlung erfolgte in einem Gamma-Counter 1282 COMPUGAMMA CS.

2.3.5.3 Messung des 12(S)-HETE Gehaltes

Die Bestimmung des 12(S) Hydroxyeicosatetraensäuregehaltes wurde mithilfe des 12(S)-HETE ELISA Assays durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und die erhaltenen Proben nach Herstellerangaben prozessiert. Konzentrationen in Proben mit unbekanntem 12(S)-HETE Gehalt wurden über eine Standardkurve mit bekannten 12(S)-HETE Mengen ermittelt. Ungebundenes Material wurde durch Waschen entfernt und die Reaktion gestoppt. Die 12(S)-HETE Menge konnte indirekt über die Absorption bei $\lambda = 405$ nm gemessen werden und wurde nach Korrelation mit der Standardkurve berechnet.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Zellyse

Zur Lyse wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe eines detergenshaltigen Lysepuffers auf Eis fünf Minuten lang solubilisiert. Zur vollständigen Ablösung wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vom Gefäßboden entfernt und danach in 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Rohlysate 60 Minuten bei 4°C über Kopf rotiert. Zur Abtrennung nicht gelöster Zellfragmente wurden die Rohlysate anschließend 20 Minuten lang mit 14.000 x g bei 4°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Zur Proteinbestimmung wurden von den Überständen jeweils 20 µl abgenommen und die Proben bei -20°C eingefroren.

2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford erfolgt durch Messung der Extinktion einer Proteinlösung im Vergleich zu einer Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) bekannter Konzentrationen. Diese gehorcht einer linearen Funktion (im Absorptionsbereich von 0 bis 0,6 Absorptionseinheiten) mit folgender Annäherungsformel:

$$c = (x - 0,0126) / 0,0501 \times VF$$

Dabei ist c die Proteinkonzentration in µg/ml, x die Absorption bei 595 nm und VF der Verdünnungsfaktor. Zur Bestimmung der Konzentration einer Proteinprobe wurden 80 µl einer Vorverdünnung hergestellt und davon 10, 20 und 40 µl zu 790, 780 bzw. 760 µl H₂O gegeben, 200 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben und gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm im Vergleich zu der Eichreihe gemessen und die Proteinmenge berechnet.

2.4.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Wechselwirkung von Proteinen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) entstehen negativ geladene Komplexe, welche anhand ihrer unterschiedlichen Größe durch Elektrophorese in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt werden können. Die Menge an gebundenem SDS ist proportional zur molaren Masse der Polypeptide. Die generelle negative Ladung der SDS-Protein-Komplexe lässt diese beim Einbringen in ein elektrisches Feld in die Richtung der Anode wandern. Die SDS-PAGE wurde in einer Horizontal-Elektrophoresekammer (Multiphor II) mit 0,5 mm dicken, auf Folie fixierten SDS-Gelen durchgeführt. Verwendet wurden dabei entweder Gradientengele (7,5-15 % SDS) oder homogene Gele (10 % bzw. 15 % SDS). Zwischen Kathode bzw. Anode und dem SDS-Gel waren Pufferstreifen mit entsprechendem Ionengehalt aufgelegt. Um eine Erhitzung des Gels während des Laufs zu vermeiden, wurde die SDS-PAGE Platte wassergekühlt. Zur Probenvorbereitung wurden definierte Proteinmengen aus Zelllysaten mit 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt und mit H₂O auf gleiche Volumina gebracht. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten lang bei 95°C denaturiert und

anschließend auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung von Proteingrößen wurden parallel Größenstandards mit Proteinen bekannter Größe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 50 mA mit maximal 600 V und 30 W bis zur optimalen Proteinauftrennung durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine wurde diese durch Western Blotting weiter analysiert.

2.4.4 Western Blotting (Semi-Dry-Verfahren)

Beim Western Blotting werden Proteine, die in einem SDS-Gel aufgetrennt wurden, auf eine Membran (z.B. PVDF [Polyvinylidendifluorid]) elektrophoretisch übertragen, auf der sie dann durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden. Zur Vorbehandlung wurde die PVDF-Membran 30 Sekunden in Methanol äquilibriert und danach bis zur Verwendung in Anodenpuffer II geschüttelt. Das SDS-Gel wurde kurz mit Anodenpuffer II inkubiert. Die Blot Apparatur wurde nach dem in Abb.5 dargestellten Schema angeordnet und das Blotting eine Stunde bei 150 mA und mit maximal 60 V und 30 W durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockier-Lösung inkubiert.

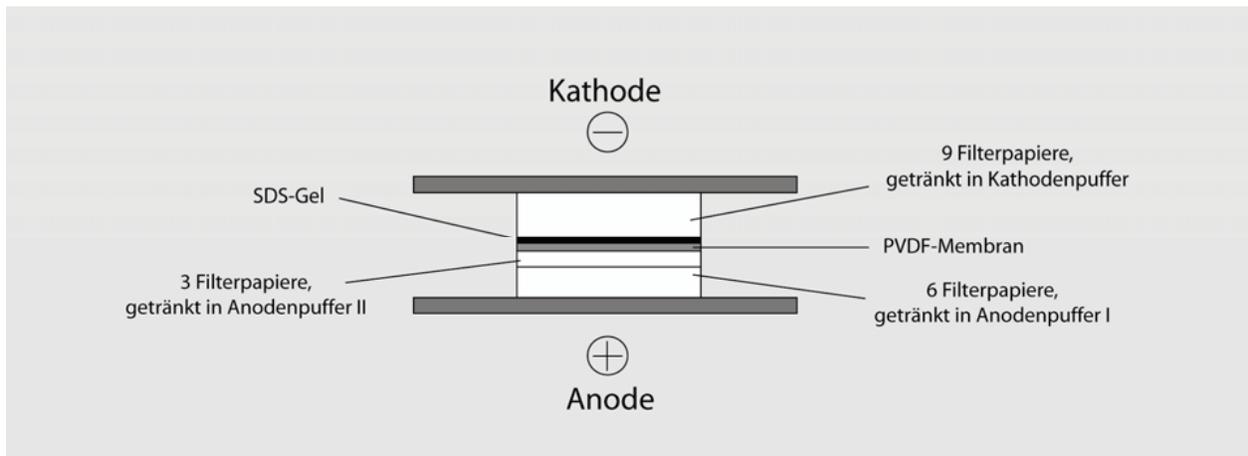


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Western Blotting nach dem Semi-Dry-Verfahren

2.4.5 Antikörperhybridisierung und ECL-Detektion

Beim Hybridisierungsverfahren bindet im ersten Schritt ein für eine bestimmte Aminosäuresequenz (Epitop) spezifischer Antikörper über Nacht bei 4°C an das auf die PVDF-Membran übertragene Protein. Nach intensivem Waschen mit TBS-T erfolgt im Anschluss eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem sekundären Antikörper, welcher spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Dieser zweite Antikörper trägt neben der Erkennungssequenz kovalent gebunden Meerrettich-Peroxydase. Danach wird intensiv gewaschen. Während und nach der anschließenden einminütigen Inkubation der Membran in einem ECL-Substrat (ECL: „enhanced chemoluminescence“, enthält Luminol), oxidiert die kovalent gebundene Meerrettich-Peroxydase dieses Substrat unter Lichtemission. Diese wird mittels Lumineszenz-Messgerät (Lumi-Imager) detektiert und mithilfe der Software Lumi-Analyst ausgewertet.

2.5 Isolierung von Fettgewebe aus Meerschweinchen

Es ist bekannt, dass das Fettgewebe als endokrines Organ signifikant an der inflammatorischen Belastung beteiligt ist (109). Neueste Untersuchungen deuten an, dass das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung ebenso wie eines Typ-2-Diabetes durch abdominales Fettgewebe verstärkt wird. Die depotspezifische Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine ist hierbei nach neuen Erkenntnissen von herausragender Bedeutung (121). Epikardiales Fettgewebe, das fast ausschließlich am rechten Ventrikel bzw. am Apex angelagert ist, stellt eine Art von viszeralem Fett dar. Epikardiales Fettgewebe wird lediglich beim Menschen, höheren Affen und Meerschweinchen gebildet, so dass murine Tiermodelle für diese Studien nicht verwendet werden konnten.

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Vorgaben für die Versuchstierbehandlung (Laboratory animal welfare) (122) und geltendem deutschen Recht zum Schutz von Tieren durchgeführt. Dem Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes zur Durchführung der nachfolgend beschriebenen Studien wurde unter der Nummer 50.05-230-74/06 stattgegeben.

Weibliche Meerschweinchen im Alter von sechs Wochen bis zwei Jahren wurden von Charles River, Kisslegg bezogen und unter Standardbedingungen bei einer

Temperatur von 18-20°C und einen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere erhielten Spezialdiäten für Meerschweinchen, und zwar eine Standarddiät (Sniff, EF Kontrolle mit 18 MJ/kg und 3,6 % Rohfett) eine fettangereicherte Spezialdiät (Sniff EF Ms Fett- und Cholesterinreich mit 20,6 MJ/kg und 14,4 % Rohfett) (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) oder eine kohlenhydratreiche Diät C1010 mit einem Gehalt von 640 000 mg/kg Disaccharide und 44 000 mg/kg Polysaccharide (Kontrolldiät C3000 mit 220 000 mg/kg) (Altromin Spezialfutter GmbH, Lage) und Leitungswasser ad libitum.

2.5.1 Entnahme und Aufarbeitung von Fettgewebe aus Meerschweinchen

Nach Töten der Meerschweinchen mittels CO₂ und Überprüfen der Vitalzeichen und Schmerzreflexe wurde subkutanes, viscerales und epikardiales Fettgewebe entnommen. Dies wurde umgehend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und entweder bei -80°C gelagert oder über Gefrierbruch aufgeschossen. Die so erhaltenen Gewebe wurden analog der Proteinaufarbeitung mittels Tritonaufschluss extrahiert.

2.5.2 Oraler Glukose-Toleranztest

Im Hungerzustand (Entzug des Futters für 20 Stunden, aber Trinkwasser ad libitum) wurde ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt. Dazu wurden entweder 2g/kg Körpergewicht Glukose gelöst in PBS oder dieselbe Menge PBS wurden über eine Schlundsonde appliziert (< 2ml). Der Blutglukosespiegel wurde unmittelbar vor Glukosegabe (0 min) und danach (30, 60, 120, 180 min) nach Applikation in 0,3 µl Blut, entnommen aus der Ohrvene, gemessen.

2.5.3 Morphologie

Nach Sternotomie in tiefer Narkose wurden die Meerschweinchen über die Aorta mit einem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer für 15 Minuten unter einem konstanten Druck von 120mmHg perfundiert. KHB-Puffer wurde vor Gebrauch mit 95% O₂ / 5% CO₂ äquilibriert. Anschließend wurden die Tiere mit Fixativen (siehe Material Methoden) für 30 Minuten perfundiert. Die Herzen wurden entnommen und einen Tag lang in den gleichen Fixativen gelagert. Die Proben wurden in 1mm³ große Blöcke geschnitten, mit 2% Osmiumtetroxid in 0,07 M Kakodylpuffer für drei Stunden nachfixiert und en-bloc mit Uranylacetat in 70% Ethanol über Nacht gefärbt. Die Probenblöcke wurden über eine Ethanolreihe dehydriert und in Epon eingebettet. Für lichtmikroskopische Analysen

wurden histologische Schnitte mittels Ultramikrotom (Leica, Wetzlar) erstellt und mit Methylenblau/AzurII angefärbt. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat doppelgefärbt und am Transmissionselektronenmikroskop analysiert (123-125).

2.6 Isolierung von humanem Fettgewebe

Nicht diabetischen und Typ II diabetischen männlichen Kaukasiern zwischen 40 und 85 Jahren, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypass-Operation unterzogen, wurde während der Operation bis zu 5g subkutanes und epikardiales Fettgewebe steril entnommen. Diese Gewebeproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Zu einem geeigneten Zeitpunkt wurden die Proben analog den für die tierischen Fettgewebeproben beschriebenen Verfahren aufgearbeitet.

Die Entnahme der Fettgewebsbiopsien sowie ein vor der Operation durchgeführter Glukose-toleranztest mit 75 g Glukose peroral erfolgte mit schriftlicher Einwilligung der Patienten. Diese Studie wurde unter der Nummer 2858 „Untersuchung zur Aktivität des epikardialen Fettgewebes im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe des Menschen“ von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, genehmigt.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Prism Grappad Version 4 durchgeführt. Alle dargestellten Versuche wurden $n \geq 3$ durchgeführt. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3. Ergebnisse - zellulärer Teil

Es wird vermutet, dass proinflammatorische Zytokine wie Transforming Growth Factor β (TGF- β) die Expression des Glukosetransporters IV (GLUT4) in Kardiomyozyten beeinflussen und dass dies durch Aktivierung der 12-Lipoxygenase (12-LO) Signalkaskade bewirkt wird. Durch die Reduktion der Expression von GLUT4 in Kardiomyozyten soll TGF- β zur Ausprägung der Insulinresistenz beitragen. TGF- β gilt als entscheidender Entzündungsmediator für den Beginn renaler und endothelialer Dysfunktion bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (DM2). Der bei diabetischen Patienten erhöhte TGF- β Serumlevel könnte als Hinweis auf den engen Zusammenhang zwischen TGF- β , der Insulinresistenz und vaskulärer Komplikation angesehen werden (1).

Die hier gezeigten Daten könnten zum besseren Verständnis zu der Wirkung von Zytokinen auf Kardiomyozyten beitragen und die Bedeutung von TGF- β als kritische Determinante für die kardiale Insulinabhängigkeit identifizieren. Dies könnte für das Verständnis der Mechanismen der Insulinwirkung, der Entstehung von DM2 und des kardiometabolischen Syndrom von Bedeutung sein. Das Ziel des zellulären Teils dieser Arbeit war es, die Ausgangshypothese zu überprüfen, ob TGF- β die Lipoxygenasen in Kardiomyozyten aktiviert und dadurch einen Einfluss auf die Expression von GLUT4 ausübt.

Hierzu wurden folgende Fragen untersucht:

1. Wird 12 - LO in den verwendeten Zellsystemen exprimiert?
2. Wird 12-LO durch TGF- β und 12-LO spezifische siRNA moduliert?
3. Synthetisieren Kardiomyozyten 12-HETE und wird die Synthese durch TGF- β beeinflusst?
4. Hat die Ausschaltung der 12-LO Folgen für die Wirkung von Zytokinen auf die GLUT4 Expression und die GLUT4 Translokation?

3.1 Expressionsanalyse von 12-Lipoxygenase

Lipoxygenasen stellen eine große Familie Lipide peroxydierender Enzyme dar, die unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, Linolensäure oder Linolsäure, wie sie in Biomembranen und Lipoproteinen vorliegen, zu entsprechenden Peroxiden oxidiert. Obwohl mehrere Isoformen seit längerem bekannt sind, ist ihre biologische Funktion unzureichend geklärt (72;126). Die Expression von 12-LO wurde in unterschiedlichen Zelltypen wie Retikulozyten, einer Vorstufe der Erythrozyten, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und in verschiedenen Geweben gezeigt (83;84). Metabolite der 12-LO werden als wichtige Mediatoren von inflammatorischen Zuständen diskutiert (87), da sie für die Synthese von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie TGF- β und anderen Zytokinen wie IL-1 β , IL6, TNF- α und MCP-1 eine wichtige Rolle spielen (88).

Um zu prüfen, ob Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und verschiedene Typen von Fettgewebe 12-LO exprimieren, wurde der Gehalt der 12-LO in unterschiedlichen Gewebelysaten von Mensch und Meerschweinchen und Lysaten der Rattenkardiomyoblastenzelllinie H9c2-E2 mittels Western Blot bestimmt. Wie in Abb. 6 dargestellt ist, wird 12-LO sowohl in H9c2-E2 (A), in menschlichen Skelettmuskelzellen (B) als auch in subkutanem (C, SAT) und epikardialem (C, EAT) Fettgewebe exprimiert. Die valide Expression von 12-LO in der H9c2-E2 Zelllinie zeigt, dass die Zelllinie grundsätzlich geeignet ist, um die Regulation von 12-LO genauer zu untersuchen.

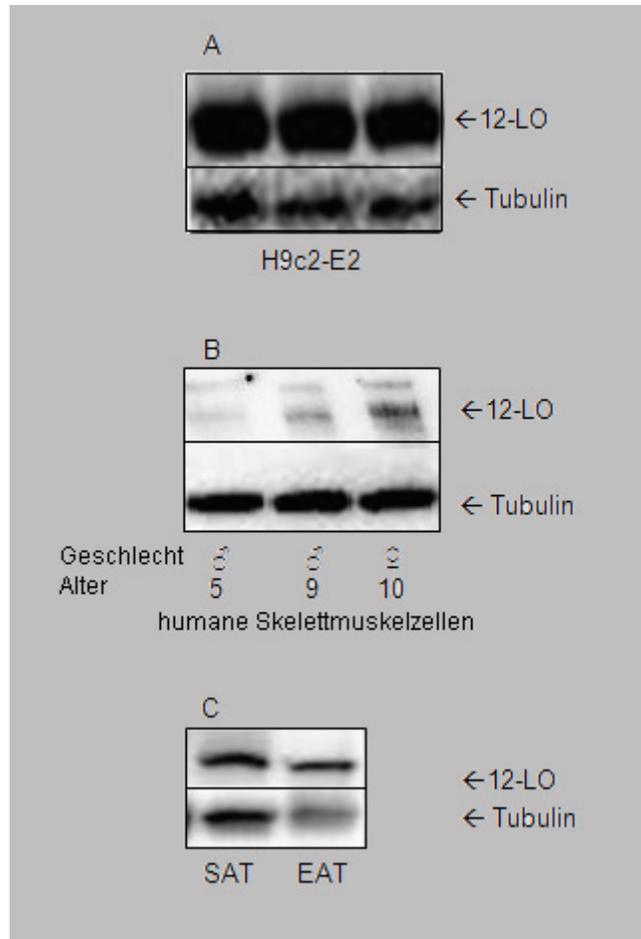


Abbildung 6: Expression von 12-Lipoxygenase A) Kardiomyoblasten B) humane Skelettmuskelzellen C)Fettgewebe des Meerschweinchens jeweils 10 µg Protein

3.2 TGF- β_1 reguliert den Gehalt von 12-Lipoxygenase in H9c2-E2

Kim et al. konnten in Mesangialzellen zeigen, dass sowohl die Synthese von 12-HETEs als auch die Expression der 12/15 - LO bedingt durch TGF- β signifikant steigt (127). Um zu prüfen, ob auch in Kardiomyozyten dieser Zusammenhang besteht und TGF- β die Expression der 12-LO stimuliert, wurden H9c2-E2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen TGF β_1 inkubiert und der Gehalt an 12-LO mittels Western Blot bestimmt (Abb. 7).

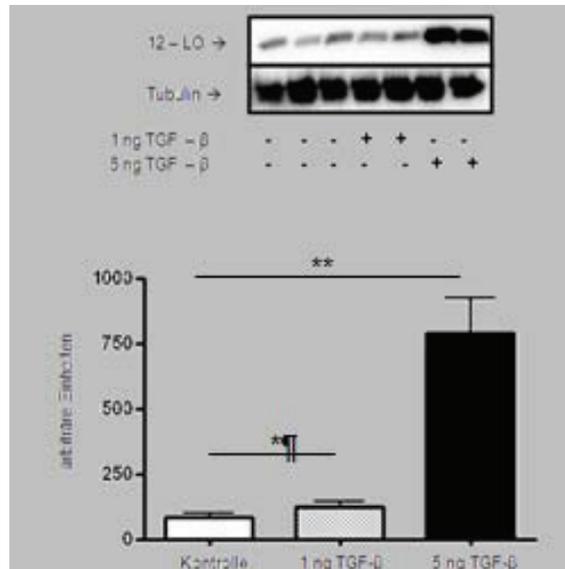


Abbildung 7: H9c2-E2 wurden für 24 Stunden mit 0; 1 und 5 ng/ml Medium TGF-β

Wie Abb.7 zeigt verursacht die Inkubation mit 5 ng/ml TGF-β₁ eine konzentrationsabhängige Steigerung des 12-LO Gehalts.

Aus der Literatur sind verschiedene Inhibitoren der Lipoxygenasen bekannt, jedoch zeigen Esculetin und Baicalein, teils bedingt durch das zu verwendende Lösungsmittel, negative Auswirkungen auf die Morphologie (90) und Proliferationseigenschaften der Zellen. Zudem ist Esculetin ein unspezifischer Lipoxygenase Inhibitor, der auch die 5-Lipoxygenase adressiert (128). Aus diesem Grund wurde die Neubildung des 12-LO Genproduktes durch Inkubation mit kurzen RNA Fragmenten reduziert. So genannte small interfering RNA (siRNA) bindet komplementär an der Ziel RNA und bewirkt dadurch deren Entwindung und Spaltung. Die ungeschützt vorliegende RNA wird analog eingedrungener Fremd-RNA durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut. Die synthetisch hergestellte, 12-LO spezifische siRNA wurde eingesetzt, um durch RNA Interferenz die Expression des Zielgens für 12-LO zu verringern.

Parallel zur Expression des 12-LO Proteins wurde die Expression des Enzyms auf mRNA Ebene untersucht. Zusätzlich wurde die Spezifität der siRNA und der Einfluss des Prozesses untersucht. In Abb. 8 wird gezeigt, dass 12-LO spezifische siRNA konzentrationsabhängig sowohl die Expression der mRNA (A), als auch des Zielproteins

reduziert. Als Kontrolle wurde negativ control siRNA (Qiagen) eingesetzt, deren Sequenz keine Homologie zu Säuger RNA aufweist und demnach keinen durch RNA Interferenz induzierten Abbau bewirken kann.

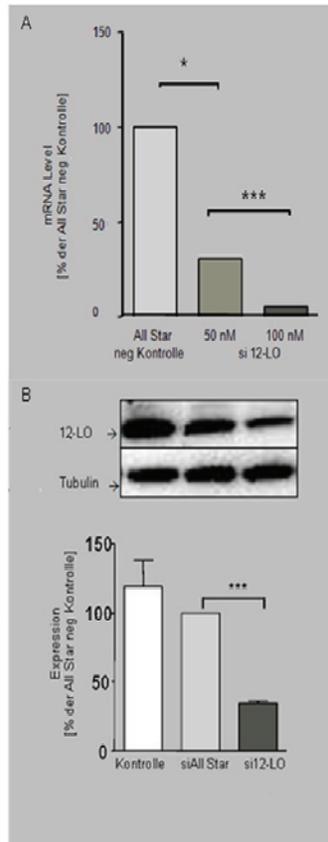


Abbildung 8: Expression von 12-LO vitro gene knockdown A) mRNA Gehalt (Auswertung REST©, Pfaffl et al. (129;130)

Um die Qualität der isolierten RNA zu bestimmen und demnach ein Aussage über die Validität der Ergebnisse zu erhalten wurde 0,5 und 1 µg RNA aus zwei verschiedenen Präparationen in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und die für Eukaryoten spezifischen 18S und 28S rRNA-Banden detektiert. Anschließend wurden bis zu 2 µg RNA in cDNA transkribiert.

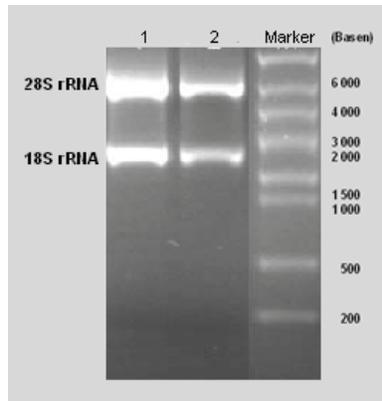


Abbildung 9: Gesamt-RNA aus H9c2-E2

Die Gesamt-RNA wurde aus H9c2-E2 Zellen in unterschiedlichen Ansätzen aufgereinigt und in einem 1,2%igem Formaldehyd-Agarosegel (FA) aufgetrennt. Parallel zu einem RNA Größenstandard (Marker) wurden 0,5 µg (1), 1 µg (2,3) aufgetragen. In eukaryotischen Zellen weist die 18S rRNA eine Größe von etwa 1,8 kb auf und sie 28S rRNA eine Größe von etwa 4,8 kb.

In Abb. 9 wird gezeigt, dass der Vorgang der RNA Aufarbeitung wie in Material und Methoden beschrieben intakte RNA liefert. Eukaryotische RNA weist, in einem Formaldehyd Agarosegel aufgetrennt eine 18S Bande mit etwa 1,8 kb Größe und 28S Bande mit etwa 4,8 kb Größe auf. Dies konnte in Abb.9 im Vergleich zu einem Standardmarker gezeigt werden. Dieser Befund belegt, dass die zuvor gezeigte Reduktion von mRNA und Protein nicht auf degradierte RNA sondern auf spezifische RNA Interferenz zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in den eingesetzten Rattenkardiomyozyten 12-LO exprimiert und funktionell aktiv ist. Die Aktivität wird durch TGF-β gesteigert, jedoch durch siRNA inhibiert. Das heißt, die 12-LO liegt in modulierbarer Form in Rattenkardiomyozyten vor. In weiteren Ansätzen wird untersucht, ob die zuvor durch TGF-β gezeigte Aufregulation der 12-LO funktionelle Auswirkungen sowohl auf die Produktion der 12-HETEs als auch die Stimulation der Glukosetransporter induziert hat.

3.3 Die Produktion von 12- Hydroxyeicosatetraensäure wird durch TGF-β reguliert

In vorausgehenden Untersuchungen konnten Sasson et al. (89) und Kim et al. (127) zeigen, dass hohe Glukosekonzentrationen, wie sie beispielsweise bei Diabetes

mellitus auftreten und TGF- β zur Steigerung des mRNA-Gehalts von 12-LO sowie deren Produkten, den 12-HETEs führen (127). Auch konnten sie zeigen, dass durch Reduktion der 12-LO der Anstieg von 12-HETE nach Stimulation mit TGF- β blockiert ist.

Um zu prüfen, ob sich die vorab untersuchte Expression der 12-LO in Kardiomyozyten auch funktionell auf die Produkte der 12-LO, die 12-HETEs auswirkt, wurde deren Gehalt mittels 12(S)-HETE ELISA bestimmt. Die Inkubation von H9c2-E2 mit 5 ng/ml TGF- β erzeugte eine Verdopplung der 12(S)-HETE Produktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb.10). Dieser TGF- β abhängige Effekt wurde durch den spezifischen „gene knock down“ der 12-LO komplett inhibiert.

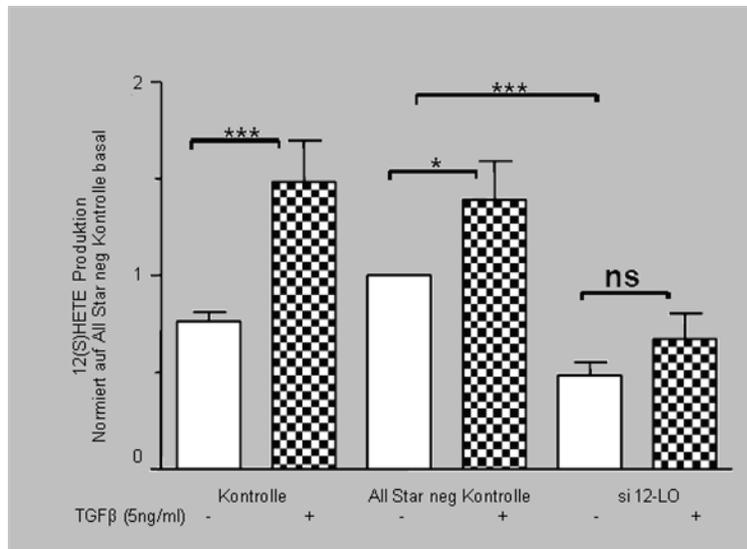


Abbildung 10: Regulation der 12(S)-HETE Produktion in H9c2-E2. TGF- β Stimulus

Nach 24h wurden 5ng/ml TGF- β zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und der 12(S)-HETE-Gehalt bestimmt. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Dies lässt vermuten, dass TGF- β und nicht nur die Expression sondern auch die Aktivität der 12-LO beeinflusst und diese mit kausaler Interaktion reguliert.

3.4 Glukosetransporter IV-Expression wird auf mRNA- und Proteinebene durch TGF- β reguliert

Ein erster Hinweis darauf, dass Arachidonsäuremetaboliten die Expression von GLUT4 beeinflussen folgt aus Untersuchungen von Tebbey et al.. Sie zeigten, dass hohe Arachidonsäurekonzentrationen die GLUT4 mRNA Menge in Adipozyten reduziert

(92;93). Im Gegensatz dazu zeigten allerdings Sasson et al., dass 12-LO und 12-HETE das Aktinzytoskeletts in Kardiomyozyten stabilisieren und den insulinabhängigen Transport von GLUT4 zur Plasmamembran beeinflussen (89). Allerdings ist der direkte Nachweis zur Rolle der gesteigerten HETE Produktion auf die Regulation der kardialen GLUT4 Menge bisher nicht erbracht worden. Um dies zu untersuchen und mögliche Auswirkungen der 12-LO Regulation auf die Expression des GLUT4 nachweisen zu können, ist eine stabile Expression von GLUT4 im zellulären Testsystem notwendig. Da Kardiomyoblasten erst mit fortgeschrittener Differenzierung einen nachweisbaren endogenen Gehalt an GLUT4 entwickeln und die hier verwendeten H9c2-E2 sich nach stabiler Überexpression des humanen Insulinrezeptors nicht mehr differenzieren lassen, exprimieren die Zellen kein GLUT4 (Daten nicht gezeigt).

Um trotzdem den Einfluss von 12-HETE auf die GLUT4 Expression in diesem Zellsystem untersuchen zu können, haben wir myc-Epitop-markiertes GLUT4 in H9c2-E2 Zellen transient überexprimiert (129), um auf diese Weise eine valide Expression von GLUT4 erhalten. Die Inkubation von TGF- β vermindert die Expression von GLUT4 in H9c2-E2 auf die Hälfte (Kontrolle, All Star neg Kontrolle). Andererseits steigerte die Hemmung der HETE Synthese durch siRNA wie erwartet den GLUT4 Gehalt (4,2fach; Abb.11).

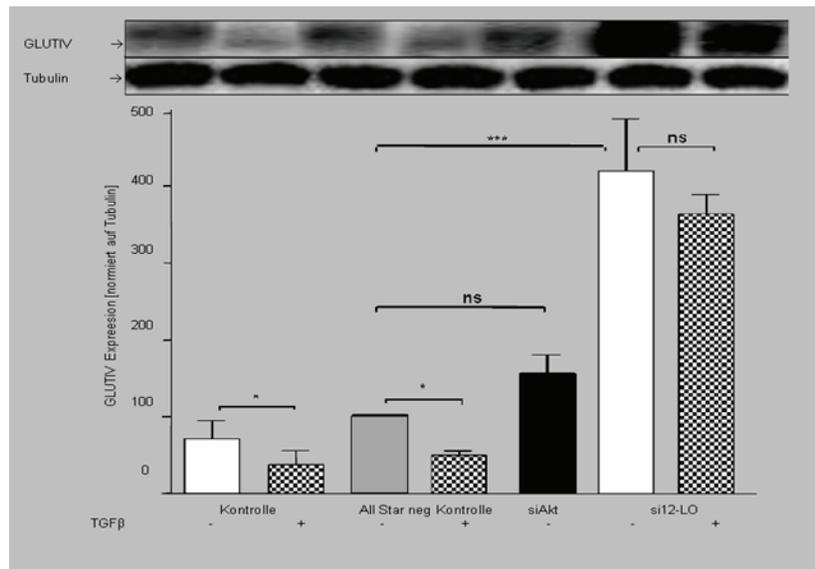


Abbildung 11: Regulation der GLUT IV-Expression in H9c2-E2 durch TGF- β und 12-LO

H9c2-E2 wurden transient mit GLUT IVmyc transfiziert und nach 24 Stunden mit siRNA gerichtet gegen 12-LO, Akt und den entsprechenden Kontrollen behandelt (untransfiziert und All Star neg Kontrolle). Nach weiteren 24 Stunden wurde mit TGF- β stimuliert. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns nicht signifikant. Dieser Effekt ist nicht auf *off-target*-Effekte oder Nebenwirkungen der Transfektion zurück zu führen, sondern spezifisch für den 12-LO gene knock down. Dies wird dadurch belegt, dass ein gene knockdown der Akt keine Auswirkungen auf die GLUT4 Expression zeigte (Abb.11).

Wie zu erwarten, führte auch die Inkubation der Zellen mit TGF- β zu einer signifikant veränderten Expression der GLUT4 mRNA in nicht transfizierten Zellen oder Zellen, die mit nicht kodierender siRNA behandelt wurden. In ähnlicher Weise verursacht auch die Reduktion der 12-HETE Synthese eine massive Kumulation der GLUT4 mRNA (Abb. 12). Wir konnten zeigen, dass die GLUT4 Expression in H9c2-E2 durch die 12-HETE Menge bilateral reguliert wird.

Passend zu unserer Hypothese, dass der Crosstalk zwischen GLUT4 und TGF- β die 12-LO beinhaltet, konnten wir zeigen, dass der die GLUT4 Expression regulierende Effekt von TGF- β über 12-HETE nach gene knockdown der 12-LO deutlich reduziert wurde. Nach 12-LO Reduktion bewirkte die Inkubation mit TGF- β keine signifikante Reduktion der GLUT4 Expression mehr, wie es in untransfizierten Zellen und mit nicht kodierender siRNA behandelten Zellen zu beobachten war.

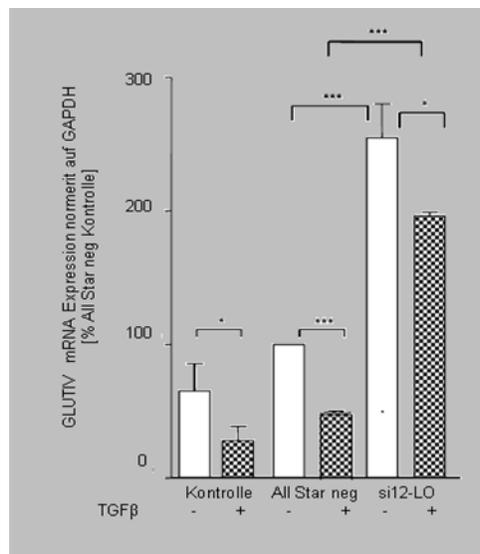


Abbildung 12: Regulation der GLUT IV-mRNA-Expression

H9c2-E2 wurde wie vorab beschrieben mit spezifischer siRNA gegen 12-LO oder den entsprechenden Kontrollen behandelt und teils mit TGF- β inkubiert. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$
Wir konnten somit zeigen, dass TGF- β eine markante Reduktion von GLUT4 auf mRNA- und Proteinebene bewirkt. Wir vermuten, dass die durch TGF- β unterstützte Aktivierung der 12-LO die GLUT4 mRNA destabilisiert und hierdurch die GLUT4 Proteinmenge reduziert wird. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen von Totary - Jain et al. gestützt, die bei hohem Glukosegehalt in vaskulären Zellen eine Aktivierung des 12-LO Signalweges mit einer Destabilisierung der GLUT1 mRNA unter Beteiligung von Calreticulin als Kofaktor nachgewiesen haben (130).

Somit konnten wir erfolgreich einen Crosstalk zwischen TGF- β und GLUT4 in H9c2-E2 zeigen. In weitergehenden Untersuchungen sollte deshalb eruiert werden, ob nur die Menge von GLUT4 moduliert oder auch die Wirkung von Insulin auf die Translokation von GLUT4 beeinflusst wird. Hierzu wurden sowohl histologische Untersuchungen des Zytoskeletts, das die Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran umsetzt ausgeführt, als auch die Translokation des GLUT4 selbst untersucht.

3.5 12-Lipoxygenase stabilisiert die Insulinwirkung in der GLUT 4-Translokation

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass 12-LO eine essentielle Rolle in der Organisation und Stabilisierung des Aktinzytoskeletts spielten (84;90;91). Um die Verbindung der Wirkung von TGF- β auf die GLUT4 Translokation nachzuweisen, sollte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, ob und welche Effekte die Reduktion der 12-LO mittels „gene knock down“ auf das Zytoskelett zeigt. Und wie sich die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren der 12-LO auf die Translokation zur Plasmamembran auswirkt. Um den Einfluss auf das Zytoskelett durch spezifische 12-LO Reduktion zu untersuchen, wurden H9c2-E2 wie im Material und Methodenteil beschrieben transfiziert und nach 48 h fixiert. Zur Visualisierung des Zytoskeletts wurden die Zellen mit einem FITC gekoppelten Phalloidin- antikörper oder einer Isotypkontrolle (Daten nicht gezeigt) inkubiert. Die kernspezifische Gegenfärbung erfolgte mit Propidiumiodid. Wie in Abb.13 dargestellt, induziert der „gene knockdown“ der 12-LO in H9c2-E2 einen fatalen Abbau und die totale Desorientierung der Aktinfilamente im Vergleich zu den Kontrollsituationen.

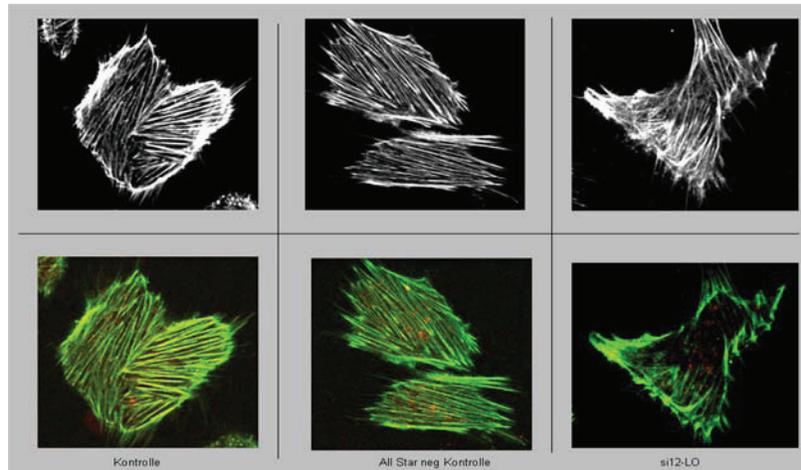


Abbildung 13: Darstellung der Aktinmikrofilamente

Darstellung der Aktinmikrofilamente von nicht transfizierten, kontroll-transfizierten und mit si12-LO transfizierten Zellen (obere Reihe) Färbung der Aktinmikrofilamente in H9c2-E2 mit FITC-Phalloidin/ PI in den entsprechenden Transfektionssituationen

Aus den immunhistologischen Befunden folgern wir, dass der Verlust von 12-LO eine völlige Desorganisation der Aktinfilamente bewirkt. Diese Effekte waren in stark abgeschwächter Form auch nach Transfektion mit nicht kodierender siRNA und sehr ausgeprägt nach 12-LO knockdown zu beobachten. Ob die Desorganisation des Zytoskeletts auch Effekte auf die Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran hat, vergleichbar der Beobachtungen von Totary-Jain et al. (131), sollte durch Translokationsexperimente analysiert werden.

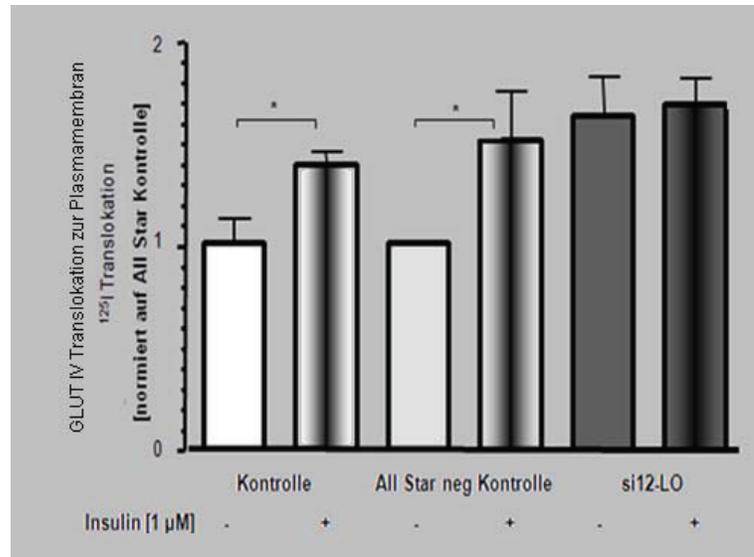


Abbildung 14: H9c2-E2 ¹²⁵I GLUT IV-Translokation in H9c2-E2

12-LO gene knockdown bewirkt in H9c2-E2 den totalen Verlust des Insulineffekts
*p<0.05

In Kontrollen konnten wir nach Insulinstimulus eine signifikante Steigerung der Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran gegenüber der nicht durch Insulin stimulierten Kontrolle zeigen. Dies wurde, wie in Material und Methoden beschrieben durch die Menge des ¹²⁵I markierten GLUT4 an der Plasmamembran bestimmt. Dieser insulinstimulierte Effekt wurde nach 12-LO Reduktion aufgehoben (Abb.14). Die basale Translokation von GLUT4 wird jedoch gesteigert, was möglicherweise auf die zuvor gezeigte Steigerung der GLUT4 Menge nach 12-LO gene knockdown zurückzuführen ist. Wir konnten zeigen, dass die 12-LO auch in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2-E2 wesentlich an der insulinstimulierten Translokation des Glukosetransporters GLUT4 beteiligt ist. Dies ist vermutlich, wie in Abb.13 dargestellt, auf die Stabilisierung des Zytoskeletts durch 12-HETE zurückzuführen. Hier scheint 12-HETE als Regulator der GLUT4 Menge zu fungieren. Der mit Inflammation verbundene Anstieg der HETEs würde somit eine Downregulation von GLUT4 erklären.

4. Ergebnisse - humaner Teil

TypII-Diabetes beeinflusst die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in humanem epikardialem Fettgewebe

Adipositas tritt häufig zusammen mit kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen wie Bluthochdruck, Hyperlipoproteinämie, TypII-Diabetes im so genannten Metabolischen Syndrom auf (99;132). Obwohl Adipositas generell sowohl das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse, als auch die Entwicklung eines Diabetes mellitus erhöht, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass speziell die Subgruppe der viszeral adipösen Patienten häufig unter besonders schweren Formen des metabolischen Syndrom leiden (133). Experimentelle und klinische Studien lassen vermuten, dass viszerale Adipositas mit einer subklinischen Inflammation assoziiert ist (134-136).

Es ist weitgehend akzeptiert, dass speziell viszerales Fettgewebe nicht nur ein lipid-speicherndes Depot ist, sondern auch ein endokrines Organ darstellt, das inflammatorische Zytokine und Chemokine sezerniert (105;137). Annehmend, dass epikardiales Fett (EAT) ähnliche metabolische und sekretorische Eigenschaften aufweist, wie für das viszerale abdominale Fettgewebe bekannt ist und unter Beachtung der ausgeprägten Nähe zu den Koronargefäßen und dem Myokard, wird vermutet, dass epikardiales Fettgewebe eine Rolle in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und speziellen Formen der Kardiomyopathie spielt.

EAT könnte das Herz und dessen vaskuläres Bett durch parakrine Sekretion von Zytokinen beeinflussen. Proinflammatorische Zytokine spielen eine große Rolle in der Entwicklung von Inflammation und Artherosklerose, bedingt durch Adipositas. Ziel dieses Teils war es deshalb zu prüfen, ob Diabetes mellitus Typ II (DM2) die Eigenschaften und die Sekretion von Adipokinen in humanem epikardialem Fettgewebe beeinflusst und ob sich dies auf die Expression funktioneller Proteine auswirkt.

Hierzu sollte untersucht werden:

Ist die Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine unterschiedlich?

Hat das unterschiedliche Sekretionsmuster der Zytokine Auswirkungen auf die Expression funktioneller Proteine?

4.1 Patientenkollektiv

Die Analyse des humanen epikardialen Fettes ist eingeschränkt durch den limitierten Zugang zu diesem Gewebe. In der Regel ist nur Gewebe von schwer kranken Patienten zugänglich, welche sich einer Operation am offenen Herzen unterziehen müssen, da eine Gewinnung dieses Untersuchungsmaterials von gesunden Probanden sich wegen des erheblichen Risikos aus ethischen Gründen verbietet. Es ist bisher nicht bekannt, ob dieser Krankheitszustand Funktion und biochemische Eigenschaften des epikardialen Fetts beeinflusst oder in welcher Weise die beobachteten sekretorischen Funktionen des epikardialen Fettgewebes durch den Operations-stress oder die zugrunde liegende Herzerkrankung beeinträchtigt wird.

In unseren Untersuchungen wurden epikardiales Fettgewebe oberhalb des Auris cordis und zu Vergleichszwecken subkutanes Fettgewebe oberhalb des Sternums entnommen. Die Gewebe wurden uns mit freundlicher Unterstützung durch Prof. Dr. E. Gams und Dr. F. Ruppe der Klinik für Herz und Thoraxchirurgie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Sofort nach der Entnahme wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C oder das Gewebe wurde wie unter Material und Methoden beschrieben aufgearbeitet. In unseren Untersuchungen wurden gepaarte Fettgewebsbiopsien von zwanzig nicht diabetischen und neunzehn Typ 2 diabetischen, teilweise insulinpflichtigen, männlichen Kaukasiern verwendet. Die Patienten unterschieden sich zum Zeitpunkt der Operation nicht in ihrem Alter. Die diabetischen Patienten wiesen einen etwas höheren Body Mass Index (BMI) ($26,25 \pm 0,64$ vs. $29,74 \pm 1,14$) auf und waren nach WHO Maßgaben leicht übergewichtig (Tab.7).

Klassifikation	männlich	weiblich
Untergewicht	<20	<19
Normalgewicht	20-25	19-24
Übergewicht	25-30	24-30
Adipositas	30-40	30-40
massive Adipositas	>40	>40

Tabelle 7: Definition des BMI (DGE Ernährungsbericht 1992)

Der Nüchternblutglukosewert der diabetischen Patienten war signifikant erhöht ($5,7 \pm 0,2$ vs $8,2 \pm 0,5$ mM/L $p < 0,002$) (Tab. 8); der postoperative Insulinbedarf war bei den diabetischen Patienten verdoppelt.

Der postoperative Insulinbedarf, aber auch die Erhöhung des Insulinbedarfs bei diabetischen Patienten erklärt sich mit dem nach größeren Operationen auftretenden Postaggressions-stoffwechsel (138).

Die Patientenkollektive werden als vergleichbar angesehen, da sie sich im wesentlichen nur beim Nüchtern-glukosespiegel unterscheiden. Der jeweils überwiegende Teil der Patienten wurde mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) behandelt, wodurch auch in den Signalweg der Lipoxygenase eingegriffen wird (139;140). Zusätzlich wurden die Patienten mit verschiedenen β -Blockern, ACE-Inhibitoren und Statinen in Bezug auf die kardiovaskuläre Erkrankung behandelt (Tab.8). Die Masse des EAT war bei DM2 Patienten deutlich vergrößert, stand aber in keinem direkten Zusammenhang mit den ermittelten BMI Werten.

	Kontrollen (n=20)	Diabetes mellitus II (n=19)	p
Alter (Jahre)	67.5 \pm 2.6	72.4 \pm 1.8	p > 0.05
Body mass index (kg/m ²)	26.25 \pm 0.64	29.74 \pm 1.14	p < 0.01
Nüchtern Glukose (mM/L)	5,7 \pm 0.2	8.2 \pm 0.5	p < 0.002
post OP Insulin Bedarf (U/24 hrs)	48.5 \pm 7.4	104.6 \pm 15.2	p < 0.001
Acetylsalicylsäure (n)	10	9	p > 0.05
Beta-Blocker (n)	10	10	p > 0.05
ACE- Hemmer (n)	9	12	p > 0.05
Statine (n)	10	9	p > 0.05
Insulin	0	6	p < 0.001

Tabelle 8: Vergleich des Patientenkollektivs

4.2 Expression proinflammatorischer Zytokine im EAT

EAT und SAT wurde von diabetischen und nicht diabetischen Patienten gewonnen, die sich einer elektiven koronaren Bypass Operation unterzogen. Nach

Aufschluss des Fettgewebes haben wir dieses mittels Zytokinarray Technik, wie in Material und Methoden beschrieben, analysiert. Es konnten nahezu 120 Zytokine detektiert werden, von denen sich mehrere signifikant im Vergleich zu den Kontrollpatienten unterschieden (Abb.15/16)

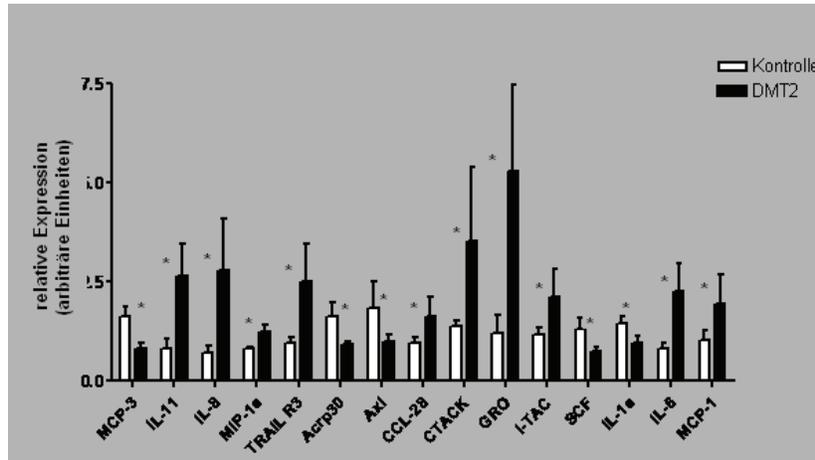


Abbildung 15: Expression regulierter Zytokine EAT normiert auf SC. $p < 0,05$

Es ergaben sich Unterschiede sowohl zwischen der Menge der anti- wie auch der proinflammatorischen Zytokine. Die dargestellten Unterschiede waren spezifisch für das EAT und unterschieden sich deutlich von den Veränderungen, die im SAT beobachtet wurden. Die Expression der Zytokine im EAT wurde auf die im SAT exprimierte Menge normiert, um nur die Unterschiede zum SAT darzustellen. Dadurch wird die qualitative Betrachtung der Expression ermöglicht.

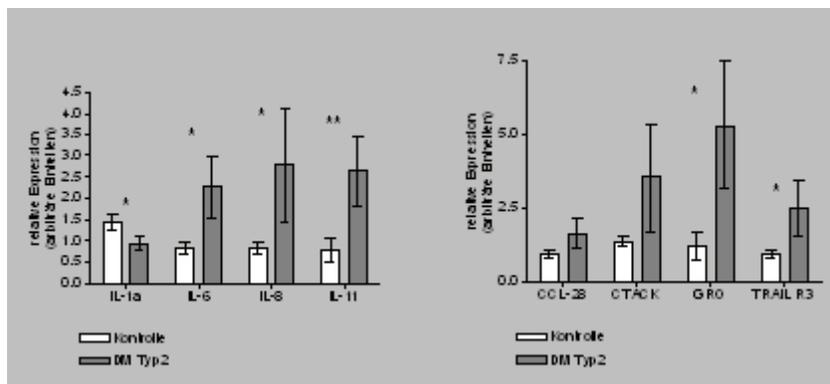


Abbildung 16: Expression proinflammatorischer Interleukine im EAT normiert auf SAT

Wie in Abb.16 gezeigt, wurde die Expression der Interleukine IL-6, IL-8 und IL-11 sowie der proinflammatorischen Chemokine CCL-28, CTACK, des proinflammatorischen Zytokins GRO α und des Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) signifikant gesteigert, während die Expression von IL-1 α leicht reduziert wurde. Diese Untersuchungen belegen, dass DM2 die Aktivierung inflammatorischer Zytokine spezifisch im EAT bewirkt. Zudem war die Expression des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins Adiponektin (Arcp30) im EAT bei diabetischen Patienten reduziert; wogegen das ebenfalls antiinflammatorisch wirkende IL-10 nicht reguliert wurde (Abb. 17).

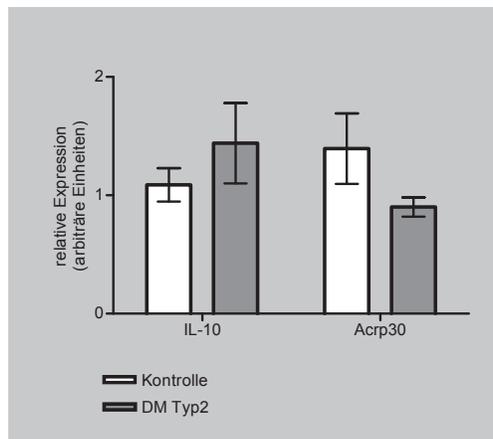


Abbildung 17. Expression antiinflammatorischer Zytokine

Diese erhobenen Befunde stellen eine relative Analyse der Zytokinexpression dar und können als erste Hinweise dafür gedeutet werden, dass der Diabetes mellitus Typ 2 spezifisch die Sekretion von Zytokinen beeinflusst und einhergehend mit der Inflammation das entstehende vaskuläre Risiko erhöht. Da die Arraytechnik nur eine relative Analyse erlaubt, wurden die Ergebnisse am Beispiel des Adiponektin mit Western Blot Analysen überprüft. Auch bei Verwendung dieser Technik ergab sich, dass der Gehalt von Adiponektin im EAT bei diabetischen Patienten deutlich vermindert war. Die Reduktion des Adiponektin Gehalts im EAT bei DM2 Patienten ist ein deutlicher Hinweis auf die entstehende Entgleisung des Stoffwechsels, da Adiponektin auch mit der Regulation der Nahrungsaufnahme in Verbindung gebracht wird.

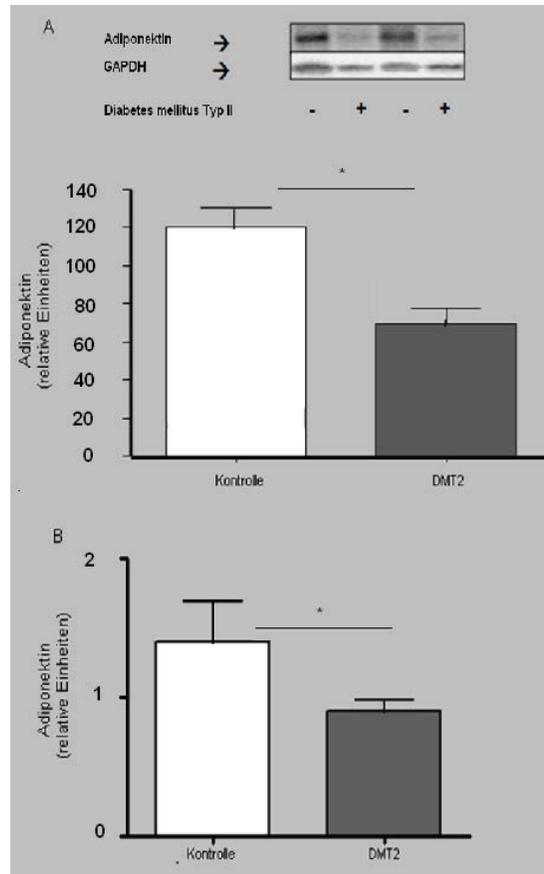


Abbildung 18: Adiponektin Expression der Patienten. A) Proteinexpression von Arpc30 normiert auf GAPDH B) Zytokin Array Analyse EAT normiert auf SC

Es wird vermutet, dass die gesteigerte Zytokinexpression Auswirkungen auf die Expression funktioneller Zielproteine wie die Glukosetransporter oder das PPAR System beeinflusst.

4.3 Diabetes mellitus II hat keinen Einfluss auf die Expression von GLUT 1 und 4

Um diesen Einfluss zu erfassen, wurde die Expression von GLUT1 und GLUT4 im EAT untersucht. (Abb.19) Entgegen unserer Vermutung war die Expression der Glukosetransporter auf Proteinebene von GLUT1 und GLUT4 unverändert.

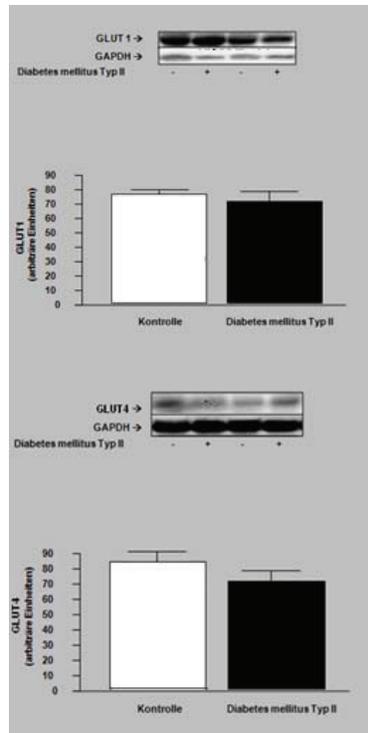


Abbildung 19: Proteinogene Expression

4.4 Diabetes mellitus Typ 2 hat keine Auswirkung auf die PPAR Expression im EAT

Als weiteres Zielsystem wurde die PPAR Expression untersucht. Peroxysom Proliferator aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind in der Literatur als Lipidsensoren beschrieben und werden mit der Regulation verschiedener Proteine in Verbindung gebracht (141). Sie interagieren mit dem Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel (142-145) und spielen eine Schlüsselrolle in der Abgrenzung von Fettgewebe. Im EAT von diabetischen Patienten wurden alle drei Isoformen deutlich nachgewiesen (Abb. 20), jedoch war die Expression von PPAR α , PPAR γ noch PPAR δ im EAT von diabetischen Patienten im Vergleich zu Kontrollproben nicht modifiziert.

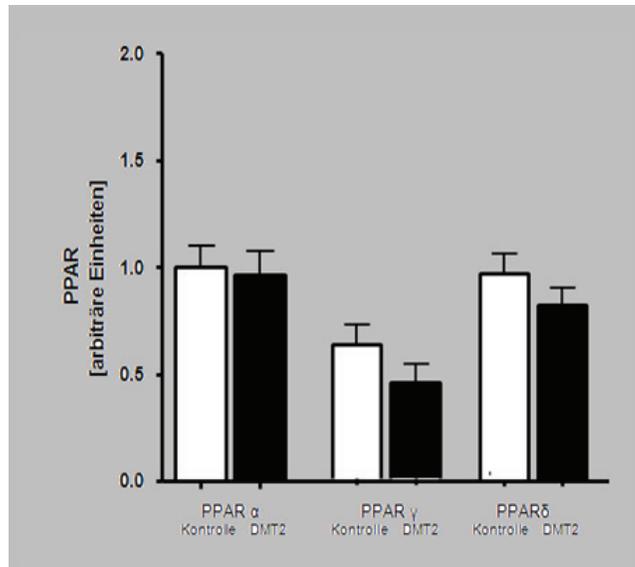


Abbildung 20: Proteinogene Expression der PPARs im EAT

4.5 Die Änderung des Zytokinmusters im EAT ist nicht auf Hypoxie zurückzuführen

Hypoxie stellt einen Sauerstoffmangelzustand dar, der auftritt, sobald Gewebe in einem Durchmesser von mehr als 2 mm nicht mit Gefäßen versorgt ist. Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport der Stoffwechselprodukte kann nicht mehr gewährleistet werden, wodurch das Gewebe hypoxisch wird und nekrotisch werden kann. HIF1 α mRNA wird unter Hypoxie stabilisiert; das Protein bewirkt die Aktivierung verschiedenster physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. So bewirkt es im positiven Sinne die Neubildung von Erythrozyten nach starkem Blutverlust durch Bildung von körpereigenem EPO und initiiert im negativen Sinne die Inflammation und Immunantwort (146). Mittels Echokardiographie konnte eine Vergrößerung des EAT gemessen werden. Um zu untersuchen, ob die für das EAT gezeigten Veränderungen des Zytokinmusters auf durch Hypoxie induzierte inflammatorische und damit zytokinaktivierende Prozesse zurück zu führen ist, haben wir die Expression des Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF1 α) bestimmt.

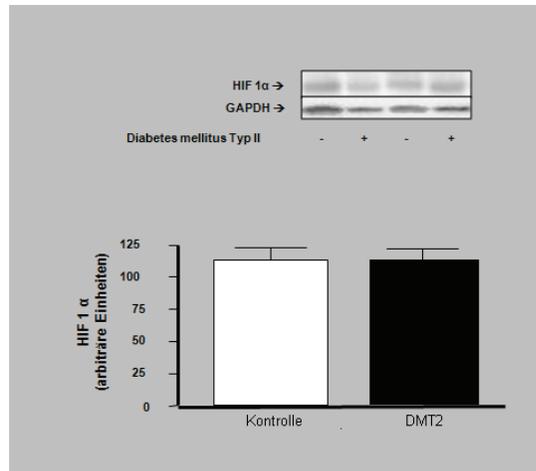


Abbildung 21: Proteinogene HIF1 α Expression im EAT normiert auf GAPDH

HIF1 α war sowohl im EAT von Kontrollen wie auch DM2 Patienten nur sehr schwach detektierbar. Ein Unterschied im EAT von diabetischen Patienten und Kontrollen war nicht darstellbar. Somit konnte die Hypothese, dass die modulierte Zytokinexpression im EAT mit Hypoxie assoziiert ist nicht bestätigt werden. Die dargestellten Befunde legen nahe, dass Diabetes mellitus Typ 2 den Zustand des EAT spezifisch beeinflusst. Das Verhältnis von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im EAT könnte die Entwicklung einer entzündlichen Reaktion und der Insulinresistenz fördern. Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten anhand der zur Verfügung stehenden Analyten nicht dargestellt werden.

Als Ursache könnte postuliert werden, dass es nicht die generelle Adipositas ist, die das kardiovaskuläre Risiko bestimmt, sondern dass ein spezifisches Fettdepot hierfür entscheidend ist. Als ein dazu geeignetes Fettdepot wird das EAT angesehen, neuere Untersuchungen insbesondere von Jacobellis et al. belegen, dass speziell das EAT eine wichtige Rolle als parakrines Organ, das Zytokine sezerniert, spielen könnte.

5. Ergebnisse - Tiermodell

Epikardiales Fettgewebe des Meerschweinchens: Entwicklung eines Tiermodells zur Darstellung der parakrinen Interaktion zwischen epikardialem Fettgewebe und dem Myokard.

Ziel der Untersuchungen ist es nicht eine Hypothese zu belegen, sondern zu prüfen, ob das Meerschweinchen ein geeignetes Tiermodell darstellt, um die parakrine Funktion des EAT als dem Myokard direkt aufliegendes Fettdepot (147;148) zu zeigen. Und um zu untersuchen, ob Fettsäuren und Chemokine wie in der Literatur beschrieben per Diffusion durch das Interstitium oder durch Abgabe in den Koronarkreislauf direkt auf das Myokard wirken.

Aufgrund epidemiologischer Beobachtungen wurde eine generelle enge Assoziation zwischen Adipositas und der koronaren Herzkrankheit vermutet (149), bisher konnte aber kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden. Wie bereits angedeutet, ist der Zugang zu humanem EAT aus ethischen Gründen limitiert und meist kann lediglich Fettgewebe von erheblich vorerkrankten Patienten gewonnen werden, die sich einer offenen Herzoperation unterziehen müssen. Ob der multimorbide Zustand der Patienten, die Polypharmakotherapie oder der erhebliche Operationsstress die Funktion und die biochemischen Eigenschaften des EAT beeinflusst oder dessen sekretorische Eigenschaften verändert, ist ungeklärt und schränkt die Aussagekraft von klinischen Betrachtungen des EAT ein.

Daher liegt es nahe, ein Tiermodell zu entwickeln, das die Präparation von EAT aus gesunden Tieren ohne Beeinflussung durch kardiale oder metabolische Erkrankungen erlaubt. Unter experimentellen Bedingungen kann das EAT detailliert untersucht und speziell der Einfluss von metabolischen Veränderungen wie Insulinresistenz oder DM2 auf das Sekretom des EAT ermittelt werden. Es gibt neben dem Menschen und höheren Primaten wenige Spezies, die EAT in substanzieller Menge entwickeln (150). Etablierte und leicht zu haltende Tiermodelle wie Maus und Ratte entwickeln nahezu kein EAT, anders als Meerschweinchen, die ebenso wie der Mensch, reichlich EAT entwickeln.

Das Ziel des tierexperimentellen Teils war es deshalb, zu überprüfen, ob das Meerschweinchen ein geeignetes Modell darstellt, um die parakrine Interaktion zwischen Herzmuskel und EAT zu untersuchen.

Hierzu wurden folgende Fragen untersucht:

Meerschweinchen entwickeln substantielle Mengen an EAT

Beeinflusst EAT die Funktion des Myokards und der Koronargefäße?

Exprimiert EAT Zytokine und Chemokine; und wenn ja welche?

Sind im EAT funktionelle Proteine wie Glukosetransporter exprimiert und diese durch Zytokine reguliert?

Schließlich sollte untersucht werden, ob eine fett- oder kohlenhydratreiche Diät Auswirkungen auf EAT und Myokard hat.

5.1 Meerschweinchen entwickeln altersabhängig EAT

Bei Meerschweinchen konnte altersabhängig eine massive Steigerung des EAT beobachtet werden. Während im juvenilen Stadium bis zu fünf Wochen nahezu kein EAT nachgewiesen werden konnte, zeigten die Tiere im zuchtreifen Alter von drei Monaten deutliche Anzeichen der EAT Ablagerung (Abb.22). Die epikardialen Fettdepots nehmen augenfällig mit steigendem Alter zu.

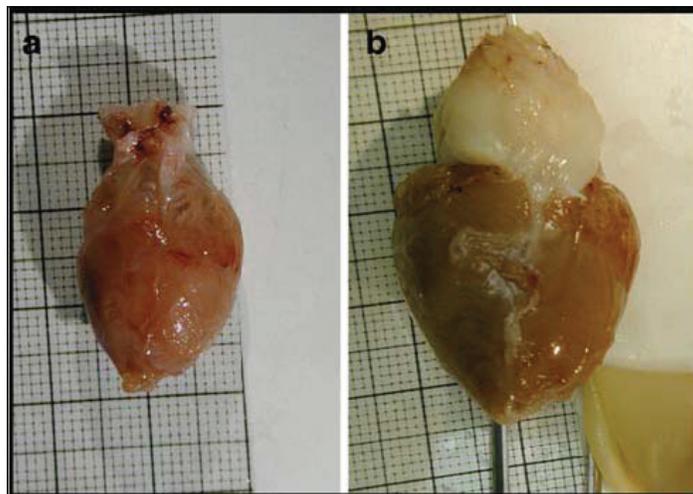


Abbildung 22: EAT Entwicklung auf dem Myokard des Meerschweinchens A) isoliertes Herz eines 3 Monate alten Meerschweinchens B) isoliertes Herz eines 12 Monate alten Meerschweinchens

Das relative Herzgewicht (Herz / KG) änderte sich mit dem Alter nicht signifikant. Im Gegensatz dazu verdoppelte sich das Verhältnis von EAT zum Herzgewicht deutlich ($0,17 \pm 0,06$ vs $0,37 \pm 0,05$ AU) (Tab. XX).

Alter	3 Monate	12 Monate
Körpergewicht [g]	619±3	1057±87
Gesamtherz [g]	2,85±0,42	4,60±0,3
Epikardiales Fett [g]	0,43±0,13	1,73±0,27
EAT / Gesamtherz [AU]	0,17±0,06	0,37±0,05
Gesamtherz / KG [AU]	0,0046±0,0006	0,0045±0,0004

Tabelle 9: Übersicht der Gewichtsentwicklung von KG, Gesamtherz, EAT und den Verhältnissen von EAT / Herz sowie Herz / KG (n=10) bei drei und 12 Monate alten Tieren

Somit konnte gezeigt werden, dass Meerschweinchen vergleichbar dem Menschen EAT entwickeln, dass die Menge des EAT altersabhängig signifikant zunimmt und sich das Verhältnis von EAT zu Gesamtherz deutlich verschiebt.

5.2 Das EAT beeinflusst das Myokard und die KoronargefäÙe

Die genauere Untersuchung des Herzens zeigte, dass das EAT entlang des Aortenbogens akkumuliert und sich entlang der großen Koronarien ausdehnt. Zusätzlich reichert sich das Fettgewebe zwischen den epikardialen Schichten des Myokards und entlang des Ramus interventricularis anterior (RIVA) an (Abb.23).

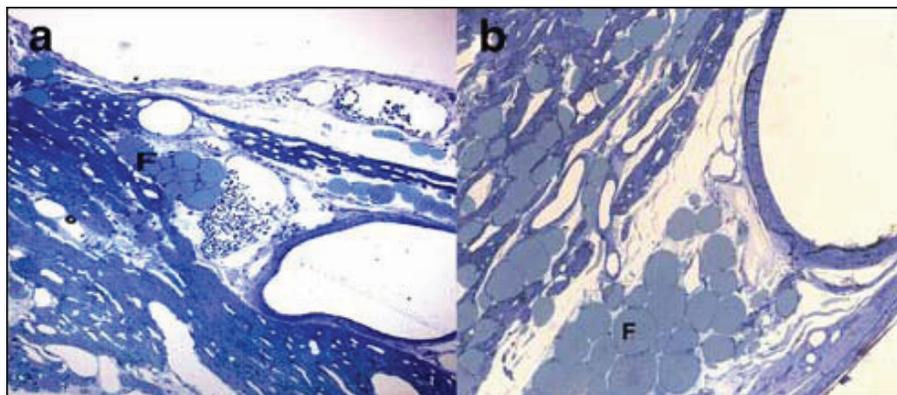


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahme des EAT (40fach vergrößert) eines a) 3 Monate alten und b) 12 Monate alten Meerschweinchen

Wie in der lichtmikroskopischen Darstellung des Herzens eines a) drei Monate alten und b) eines zwölf Monate alten Meerschweinchens gezeigt, infiltrierten die Fettzellen des EAT die Koronarien und das Epikard. Während bei drei Monate alten Tieren einzelne und lediglich kleine Fettzellen (F) im RIVA nachgewiesen werden konnten, ist bei den zwölf Monate alten Tieren eine massive Fettinfiltration erkennbar. Die Ablagerung der Fettzellen zwischen den Sarkomeren bewirkt eine optische Auflockerung des Myokards und könnte die umliegenden Kapillaren beeinflussen. Diese These unterstützend konnte im Gesamtherzlysat der zwölf Monate alten Tiere eine nahezu vierfach gesteigerte Menge an Triglyceriden nachgewiesen werden (47 vs 173 nmol/g Feuchtgewicht).

Bei rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden viele Fettzellen subepikardial beidseitig der Gefäße beobachtet, desweiteren waren Fettzellen zwischen die Sarkomere in tiefere Schichten des Myokards eingewandert (Abb. 24).

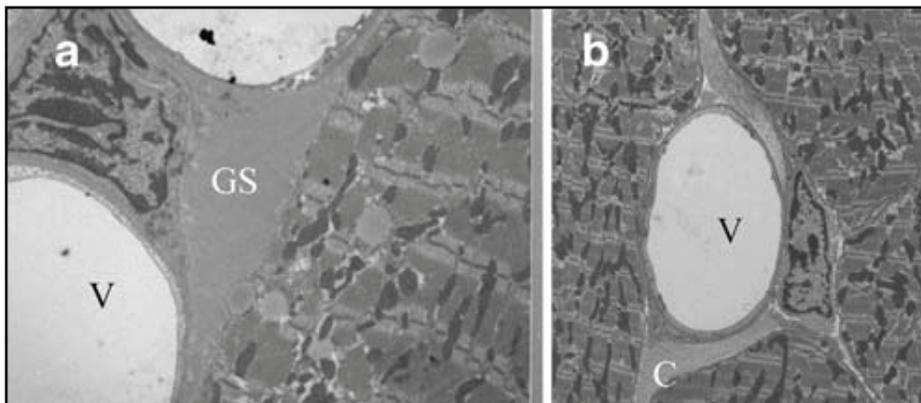


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahme des EAT beim a) 3 Monate alten und b) 12 Monate alten Meerschweinchen a) 4400fach, b) 3000fach vergrößert

Altersunabhängig wurden meist einvakuolige Zellen entdeckt, die in direktem Kontakt mit den Herzmuskelzellen oder den umliegenden Gefäßstrukturen standen. Auch gibt es Hinweise, dass die eingewanderten Fettzellen die Entwicklung von bindegewebsähnlicher Grundsubstanz (GS) nach sich ziehen, die zu einem späteren Zeitpunkt durch Kollagen (C) oder andere bindegewebige Strukturen ersetzt wurde. Bei jungen Tieren konnten nur geringe Mengen, die Venolen und Arteriolen umgebende Grundsubstanz elektronenmikroskopisch dargestellt werden, während bei älteren Tieren massive Einlagerung von Grundsubstanz entlang der Gefäße nachgewiesen wurde. Die

Akkumulation des EAT speziell am Aortenbogen und entlang der Koronargefäße weisen große Ähnlichkeit mit Beobachtungen an erkrankten humanen Herzen auf, was als ein Hinweis auf die Validität des Tiermodells gedeutet werden kann (151).

Um zu untersuchen, ob ähnlich wie im humanem EAT auch im Tiermodell parallel zu den gezeigten anatomischen Veränderungen eine relevante Sekretion an proinflammatorischen Zytokinen nachzuweisen ist, wurde die Freisetzung aus dem EAT des Meerschweinchens durch Arraytechnik untersucht.

5.3 Der Release der Zytokine und Chemokine unterscheidet sich zwischen EAT und SAT

Das EAT ist altersunabhängig eine reiche Zytokinquelle. So konnten wir die Freisetzung von mehr als einhundert verschiedenen Zytokinen zeigen, die im EAT synthetisiert werden (Daten nicht gezeigt). Um den Unterschied zwischen SAT und EAT herauszustellen wurde die Expression der einzelnen Zytokine im EAT jeweils auf SAT normiert. So werden lediglich die Unterschiede zwischen den beiden Fettdepots dargestellt. Die deutlichsten Veränderungen zwischen SAT und EAT bei zwölf Monate alten Meerschweinchen sind als Quotient in Abb. 25 dargestellt.

Wie gezeigt, wurde eine große Bandbreite an Zytokinen und Chemokinen sowohl im EAT als auch im SAT exprimiert. Aus Abb. 25 wird deutlich, dass viele Zytokine bis zu 10fach stärker im EAT exprimiert wurden als im SAT. Die auffälligsten Veränderungen wurden für NT-4, IL-6Ra, MIF, EGF, Eotaxin und die den Insulin like Growth Faktor bindenden Proteine gefunden. Im Gegensatz dazu war im Vergleich zum SAT der Gehalt an IL-17, IL2 α R, Eotaxin2, CCL-28 und HFG im EAT deutlich reduziert. Der Befund deutet darauf hin, dass das Muster der Zyto- und Chemokine spezifisch für EAT ist und sich deutlich von dem für das SAT beobachtete unterscheidet.

dass die Menge an EAT sich mit dem Alter verdreifacht, sich das Verhältnis von Herz zu EAT im Alter deutlich verschoben hat. Dementsprechend ist die Masse des EAT für den gesteigerten Release der Zytokine maßgeblich.

Wie Abb.26 zeigt, wird TGF- β auch durch das EAT des Meerschweinchens synthetisiert. Die Arrayanalyse erlaubt keine Angabe der absoluten Menge an TGF- β . Obwohl die Mengen an TGF- β bezogen auf das Protein sich nicht wesentlich unterscheiden, muss jedoch aufgrund der mehrfach gesteigerten absoluten Menge an EAT davon ausgegangen werden, dass mit zunehmendem Alter mehr TGF- β exprimiert wird. Dies hat damit zunehmend Bedeutung für die Expression des TGF- β und daraus folgernd auch für die Expression der Glukosetransporter.

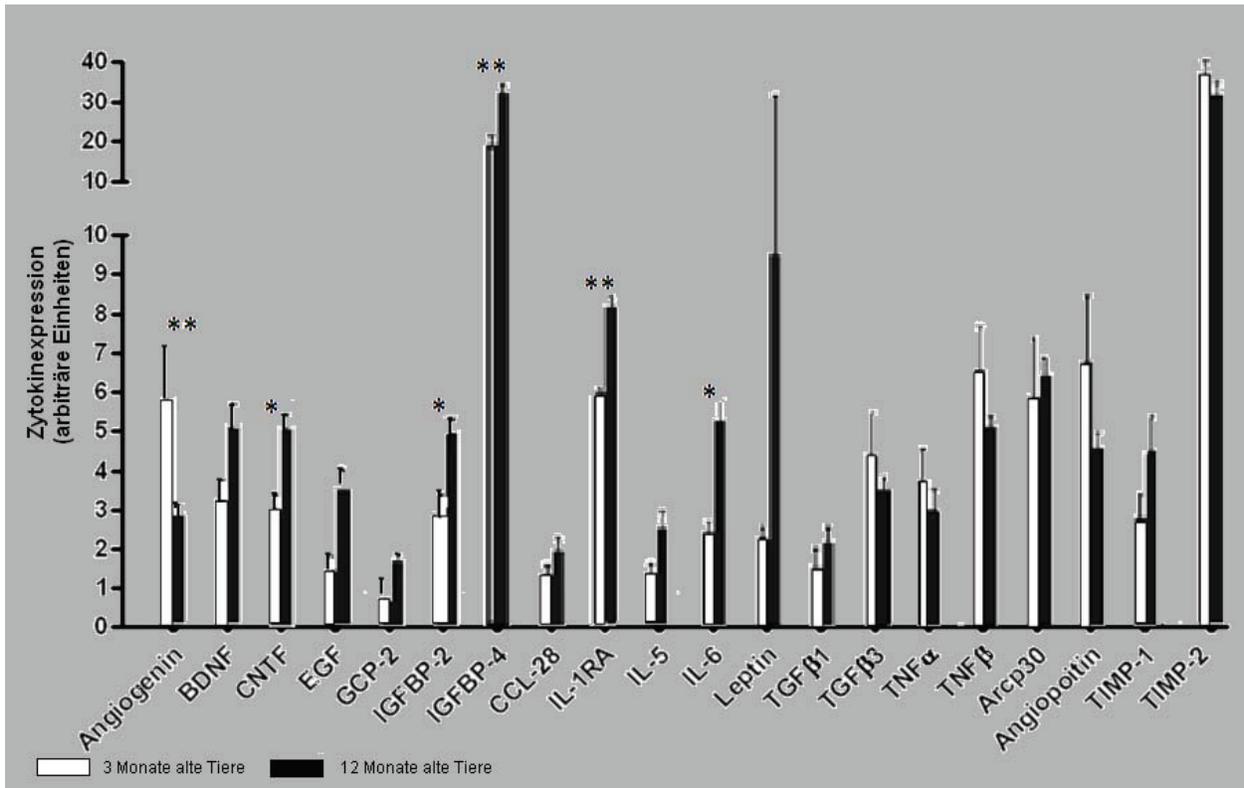


Abbildung 26: Zytokinexpression in EAT aus 250 ng Proteinlysat von 3 Monate (offene Balken) und 12 Monate alten Meerschweinchen

Zytokinexpression in EAT aus 250 ng Proteinlysat von 3 Monate (offene Balken) und 12 Monate alten Meerschweinchen bestimmt durch Zytokinarray normiert auf eine interne Kontrolle * <0.05 ; ** $p<0.01$ Arbiträre Einheiten Wert über Hintergrund

5.5 Die Expression von 12-LO sowie Glukosetransportern im EAT wird alterungsbedingt reguliert

Die Untersuchungen an H9c2-E2 legen nahe, dass die Signalwege der 12-LO und TGF- β miteinander verknüpft sind. Es war deshalb zu untersuchen, ob sich die Expression von 12-LO in EAT verändert.

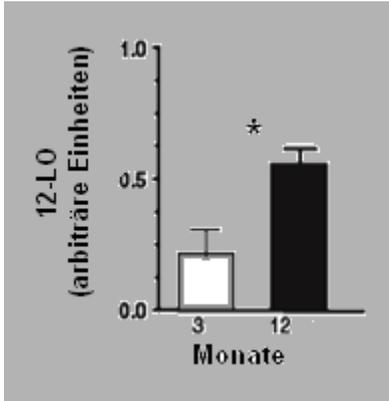


Abbildung 27: Proteinexpression von 12-LO im EAT von 3 und 12 Monate alten Meerschweinchen (* $p < 0,05$)

Wie in Abb. 27 dargestellt, kommt es im EAT der drei und zwölf Monate alten Meerschweinchen altersabhängig zu einer gesteigerten 12-LO Expression, während parallel GLUT1 und GLUT4 in diesem Gewebe vermindert exprimiert wurden (Abb.28).

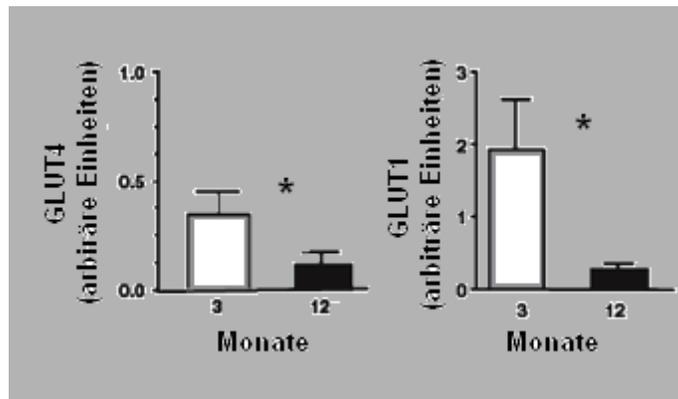


Abbildung 28: Proteinexpression von GLUT I und IV im EAT von 3 und 12 Monate alten Meerschweinchen (* $p < 0.05$)

5.6 Einfluss von Diät auf EAT und Herz

Adipositas geht häufig mit der Entstehung von Insulinresistenz einher (152). Um zu überprüfen, ob die Akkumulation von EAT auch metabolische Auswirkungen hat, haben einen Glukosetoleranztest durchgeführt. Trotz der deutlich erhöhten Menge EAT

zeigten die Tiere keine Anzeichen einer Insulinresistenz. Wir konnten weder Unterschiede im Nüchternzuckergehalt noch nach Belastung der Tiere zeigen. Die Fläche unter der Kurve nach Glukosegabe war nicht signifikant unterschiedlich (47,631 vs 31,346 AU).

Um den Einfluss einer Diät auf die Entwicklung des EAT zu untersuchen wurden Meerschweinchen für drei Monate mit einer Hochfettdiät (HF) und einer kohlenhydratreichen Diät (HC) behandelt. Anschließend wurde bei beiden Gruppen im Vergleich zu einer mit Standarddiät gefütterten Kontrollgruppe die Insulinsensitivität, die kardiale Funktion und das Sekretom des EAT untersucht.

Der Einfluss der Diäten auf folgende Parameter wurde untersucht.

- das Körpergewicht als Maß für Adipositas,
- die Insulinsensitivität,
- die Entstehung morphologischer Veränderungen,
- die Herzfunktion,
- die Zytokinsekretion und
- die Expression von funktionellen Proteinen

5.7 Zusammensetzung der Diäten

Sechs Wochen alte weibliche Dinkin Hartley Meerschweinchen (Charles River, Kisslegg) wurden für drei Monate mit einer fettreichen (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) oder einer kohlenhydrat-reichen (Altromin Spezialfutter GmbH, Lage) Diät im Vergleich zu einem Standardhaltungsfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum und wurden abgesehen von der Diät unter Standardbedingungen gehalten. Beide Spezialdiäten waren explizit für Meerschweinchen geeignet. Der Nährstoffgehalt und die genaue Aufschlüsselung der eingesetzten Fettsäuren wird in Tab. 10 dargestellt.

Sowohl die fettreiche als auch die kohlenhydratreiche Diät verfügten über den 1,5fachen Gehalt an verwertbarer Energie (10,5 vs 16 vs 15,5 MJ/ kg) Der Gehalt an Rohfett war in der fettreichen Diät 4,3fach, in der kohlenhydratreichen Diät 5fach erhöht (30 vs 130,2 vs 148,8 g/kg). Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren war in beiden Experimentaldiäten signifikant gegenüber der Standarddiät erhöht (5,3 vs 78,6 vs 82,2 g/kg), jedoch in der fettreichen Diät reduziert gegenüber der kohlenhydratreichen Diät.

Bei der fettreichen Diät ist das Muster der verwendeten Fettsäuren deutlich in Richtung kurzkettige, gesättigte Fettsäuren verschoben.

	Haltung (CD)	Hochfett (HF)	Hochkohlenhydrat (HC)
Umsetzbare Energie	10,5 MJ/ kg = 2509,5 kcal/kg	16,0 MJ/kg = 3824 kcal/kg	15,5 MJ/kg 3701,175 kcal/kg
Rolfett	30 g/kg	130.2 g/kg	148.8 g/kg
C 8:0	-	5.4 g/kg	
C 10:0	-	4.1 g/kg	4.6 g/kg
C12:0	-	31.6 g/kg	33.4 g/kg
C14:0	0.1 g/kg	14.5 g/kg	15.8 g/kg
C16:0	5.2 g/kg	23.7 g/kg	28.4 g/kg
C16:1	0.2 g/kg	1.7 g/kg	2.6 g/kg
C17:0	-	0.9 g/kg	0.375 g/kg
C18:0	0.9 g/kg	14.3 g/kg	19.2 g/kg
C18:1	5.1 g/kg	30.5 g/kg	29.0 g/kg
C18:2	15.1 g/kg	2.9 g/kg	11.2 g/kg
C18:3	3.2 g/kg	0.3 g/kg	2.5 g/kg
C20:0	0.1 g/kg	0.1 g/kg	0.45 g/kg
C20:1	0.1 g/kg	0.2 g/kg	0.9 g/kg
C20:4			0.375 g/kg
Rohprotein	170 g/kg	185 g/kg	170.1 g/kg
Rohfaser	130 g/kg	130 g/kg	104.1 g/kg
Zucker	294 g/kg	415 g/kg	275.9 g/kg

Tabelle 10: Vergleich der verwendeten Diäten

5.8 Einfluss der Experimentaldiäten auf die Gewichtszunahme

Entgegen unserer Erwartungen hatte die fettreiche Diät keinen Einfluss auf das Gewicht der Tiere, wohingegen die kohlenhydratreiche Diät eine $6,2 \pm 1,0$ fache Steigerung des Gewichts bewirkte (Abb.29/ 30).

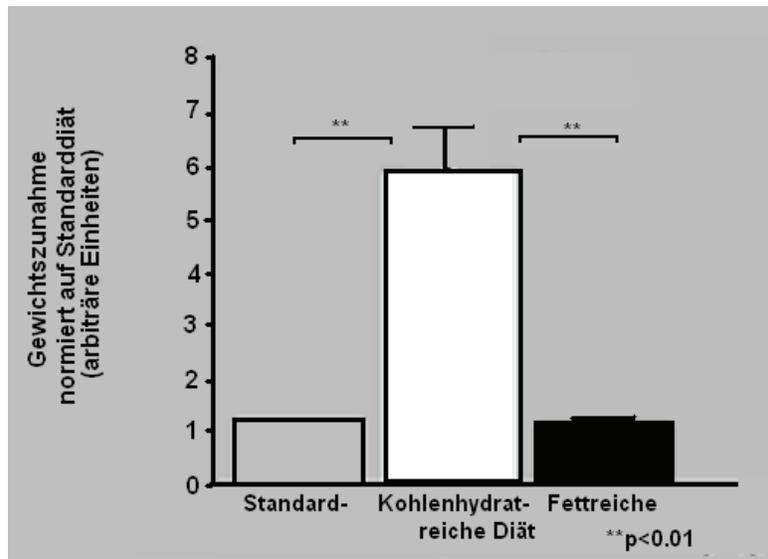


Abbildung 29: Effekt der Experimentaldiäten auf die Gewichtszunahme



Abbildung 30: Optische Darstellung der Gewichtszunahme nach Diät

5.9 Meerschweinchen entwickeln nach kohlenhydratreicher Diät Insulinresistenz

Im Gegensatz zur Fütterung mit der fettreichen Diät war der Nüchternblutglukosegehalt bei Tieren, die eine kohlenhydratreiche Diät erhalten hatten, signifikant erhöht (89 ± 3 vs 94 ± 4 pg/ml $***p < 0,001$) im Vergleich zu Tieren, die die Standarddiät erhalten hatten (Abb.31). Desweiteren wurde die Glukosetoleranz negativ

beeinflusst, worauf die Fläche unter der Kurve nach kohlenhydratreicher Diät signifikant erhöht (36 ± 2 vs 41 ± 2 AUC, $p < 0,01$)

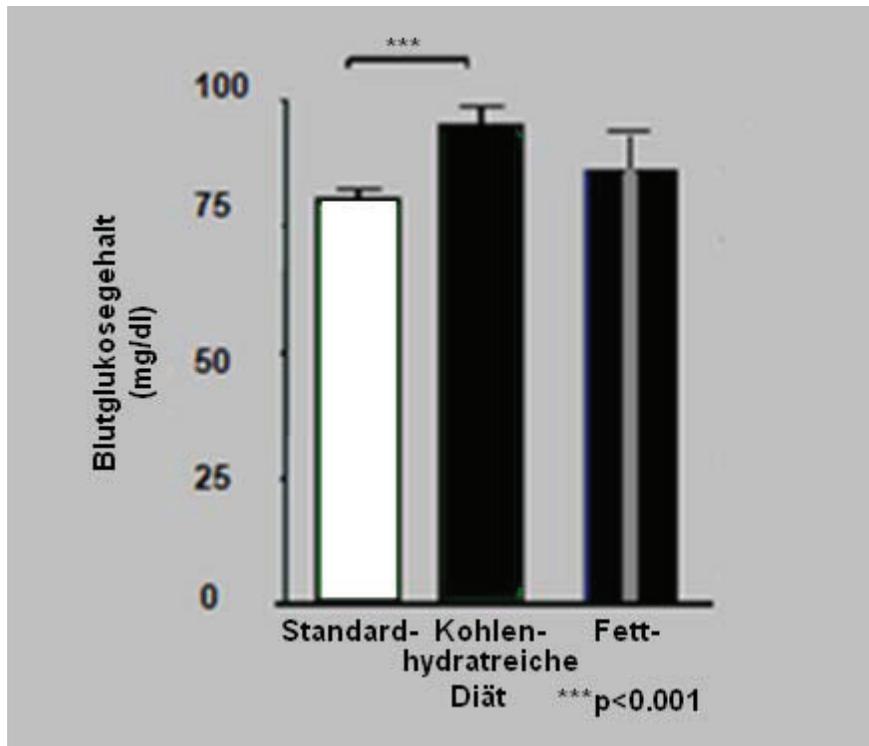


Abbildung 31: Darstellung des Nüchternblutglukosegehalts nach kohlenhydrat- oder fettreicher Diät
*** $p < 0.001$

Ähnlich dem Menschen bewirkt die erhöhte Kalorienzufuhr bei Meerschweinchen über einen längeren Zeitraum die Entwicklung eines deutlich erhöhten Nüchternblutzuckers und eine verschlechterte Glukosetoleranz sowie Insulinresistenz.

5.10 Fettreiche Diät bewirkt kardiale Dysfunktion

Während kohlenhydratreiche Diät keinen Einfluß auf die kardiale Funktion, wie Auswurfraction, linksventrikulärer Druck oder die Wandstärke hatte, zeigten fettreich ernährte Tiere deutliche Veränderung der Funktion. Nach kohlenhydratreicher Diät war die Menge an EAT 1,5fach erhöht (Abb. 32). Zusätzlich wurde eine Anreicherung von Makrophagen beobachtet, was als Hinweis auf den Beginn eines inflammatorischen Prozesses gewertet werden könnte. Allerdings waren nach HE und Azanfärbung (Abb.33) keine histologischen Auffälligkeiten zu beobachten.

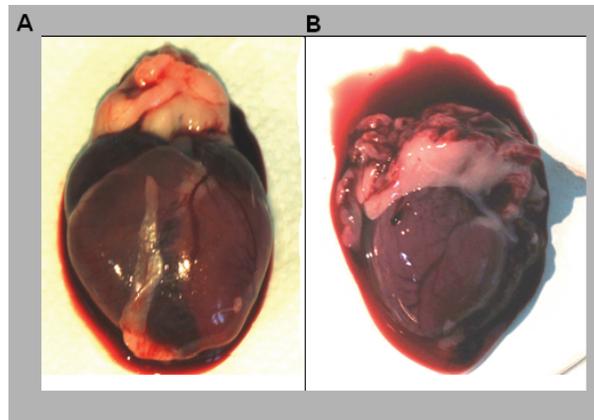
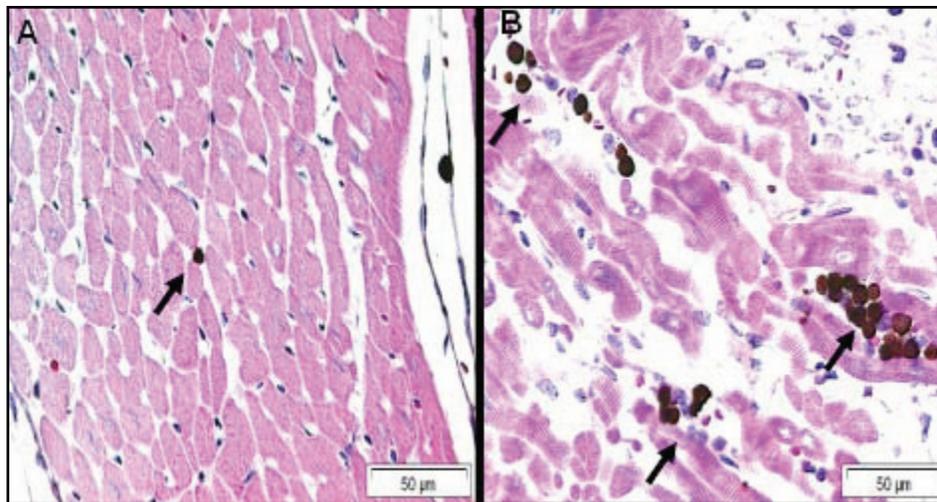


Abbildung 32: Makroskopische Darstellung eines Meerschweinchen Herzens nach A) Standard B) kohlenhydratreicher Diät



**Abbildung 33: Lichtmikroskopische Darstellung des Kontaktbereichs zwischen EAT und Herzmuskel Übersichtfärbung mit HE; Makrophagenspezifische MAC 387 Färbung
A) Standarddiät B) kohlenhydratreiche Diät**

Nach fettreicher Diät erschien die Menge des EAT unverändert, tendenziell eher reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sein. Aus lichtmikroskopischen Untersuchungen folgt, dass die Infiltration von Fettzellen in den Bereich der Koronarien auffällig verringert war (Abb. 34).

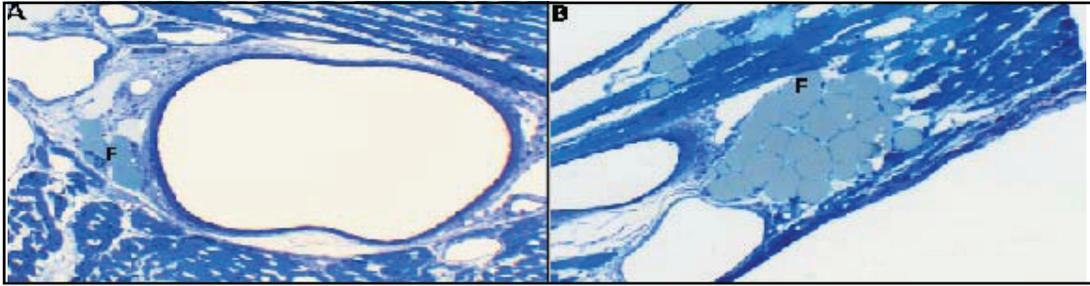


Abbildung 34: Infiltration von Fettzellen in den Bereich der Koronararterien A) Hochfettdiät B) Kontrolldiät 10fach vergrößert

Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung wurde erkennbar, dass die Struktur des linken Ventrikels vergrößert war (**Pfeile** in Abb.35) und Grundsubstanz und Kollageneinlagerungen eine Auflockerung der morphologischen Struktur bewirkten.

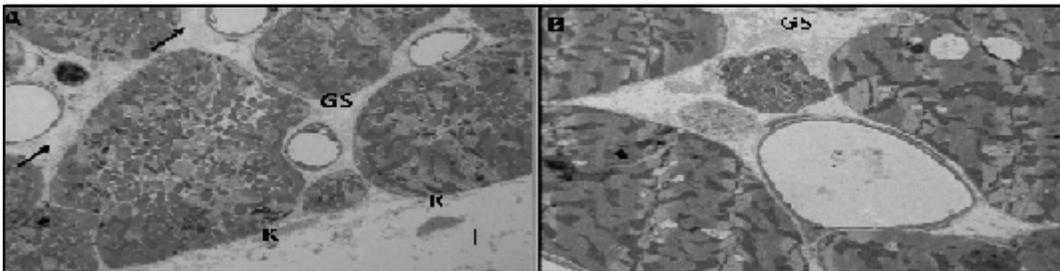


Abbildung 35: Auflockerung der morphologischen Struktur des linken Ventrikels

5.11 Fettreiche Diät steigert die Lipolyse im Herzen

Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass im Fettgewebe gespeicherte Triglyceride durch hydrolytische Spaltung sehr schnell mobilisiert werden können und dadurch Fettsäuren und freies Glycerin in das umgebende Gewebe abgegeben werden (153). Um zu prüfen, ob der überraschende Befund, dass es in den Herzen trotz fettreicher Diät nicht zur Akkumulation und Expansion von Fettgewebe kommt, möglicherweise bedingt durch einen gesteigerten Verbrauch von Fett durch das Herz ist, wurde der freie Glyceringehalt im Herzgewebe bestimmt.

Die Herzen der fettreich gefütterten Tiere wiesen einen nahezu verdoppelten Gehalt an freiem Glycerin auf (6.2 ± 1.3 vs $3.9 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$; $p < 0.05$; Abb.36) so dass von einer unter diesen Diätbedingungen exzessiv gesteigerten Lipolyse auszugehen ist.

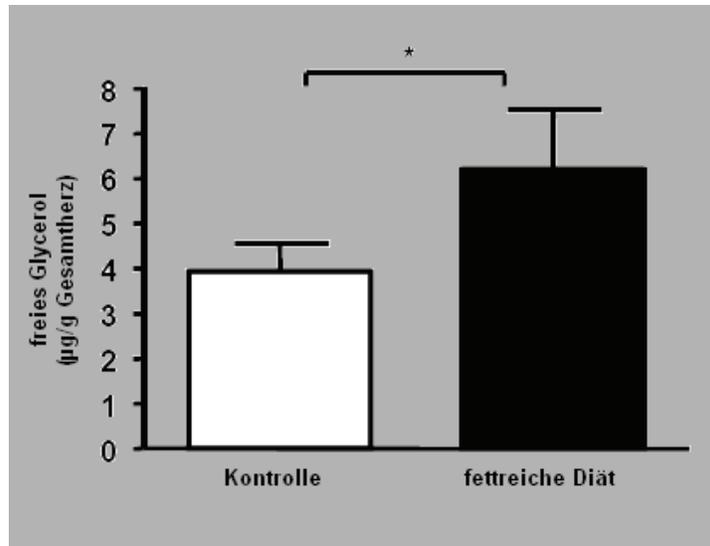


Abbildung 36: Darstellung des Triglyceridgehalts im Gesamtherz anhand Bestimmung des freien Glycerols im Feuchtgewicht *p<0.05

5.12 Fettreiche Diät bewirkt Hypertrophie des Myokards und die Dezentralisierung des linken Ventrikels

Ausgehend von den lichtmikroskopischen Befunden nach kohlenhydratreicher Diät haben wir bei den fettreich gefütterten Tieren mittels Echokardiographie die Funktion des Herzens näher untersucht (Abb.37). Wir konnten eine deutliche Verdickung des Myokardwandbereichs (0.47 ± 0.02 vs 0.3625 ± 0.02 cm; $p < 0.05$) nach fettreicher Diät nachweisen (Abb. 38). Zusätzlich war eine leichte Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Volumens nachweisbar.

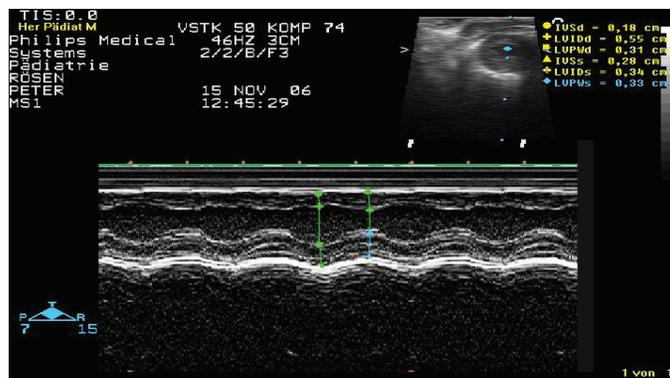


Abbildung 37: M - Mode Echokardiographie zur Darstellung von Wandkinetik und Schichtdicken - exemplarische Darstellung

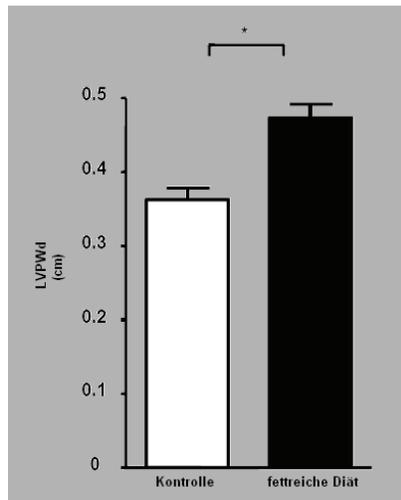


Abbildung 38: Darstellung der linken Ventrikelwand, Wertermittlung mittels Echokardiographie
*p<0,05

5.13 Fettreiche Diät erzeugt *Steatosis hepatis*

Während der Organentnahme konnten wir in allen Tieren der fettreich gefütterten Gruppe makroskopisch eine deutliche Veränderung der Leber beobachten (Abb.39 A/C). Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, haben wir perfundierte und fixierte Leber-gewebeschnitte mittels Oil Red angefärbt. Wie in Abb.39 B/D gezeigt, konnte eine massive Einlagerung von Fetttropfen nach fettreicher Diät (B) nachgewiesen werden. In Proben von Tieren, die mit der Standarddiät gefüttert wurden (D), war dies nur vereinzelt nachweisbar.

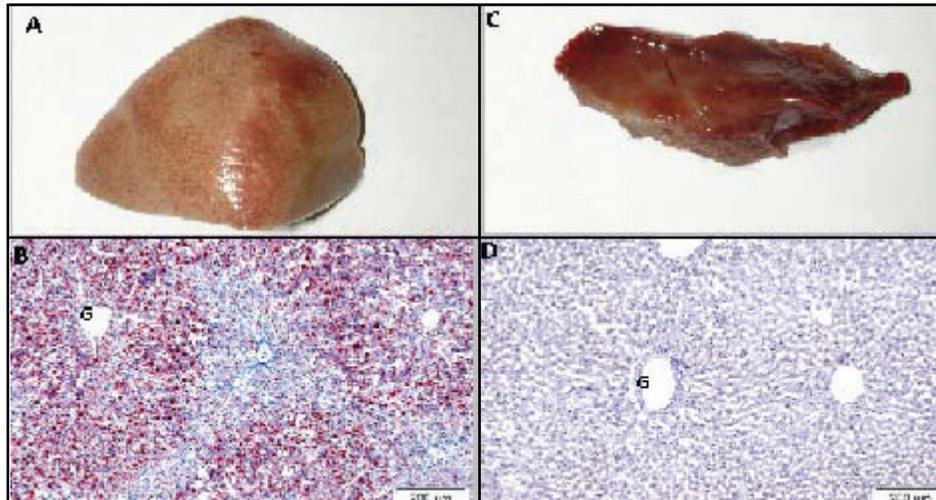


Abbildung 39: Hochfettdiät erzeugt Steatosis hepatis im Meerschweinchen A) Makroskopische Aufnahme eines Leberlappens nach Hochfettdiät B) Oil red Färbung der Leber nach Hochfettdiät C) Makroskopische Aufnahme eines Leberlappenstückes nach Kontrolldiät D) Oil red Färbung der Leber nach Kontrolldiät

5.14 Die Adiponektin Expression wird im EAT durch fettreiche Diät erhöht, jedoch nach kohlenhydratreicher Diät in EAT und Herz reduziert

Um zu untersuchen, ob die Diäten sich auch auf die Sekretion von Adiponektin auswirken, wurde die Menge dieser Zytokine in SAT und EAT bestimmt, da sie eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Hungergefühls und der Nahrungsaufnahme spielt. Wie in Abb. 40 dargestellt hatte die fettreiche Diät einen 1,5fachen Anstieg der Adiponektin Expression im EAT ($86.9 \pm 19,8$ vs $172 \pm 33,4$ $p < 0,05$) zur Folge, während Adiponektin im Herzgewebe zwar stark exprimiert aber nicht signifikant durch die Diät beeinflusst wurde (Abb.41).

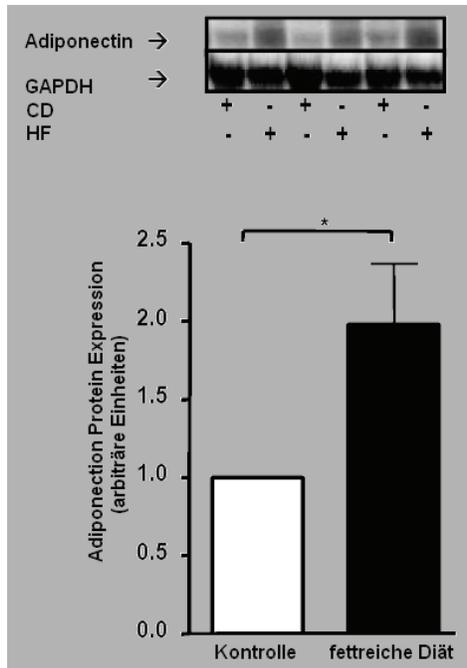


Abbildung 40: Adiponektin Expression im EAT normiert auf Kontrolldiät * $p < 0.05$

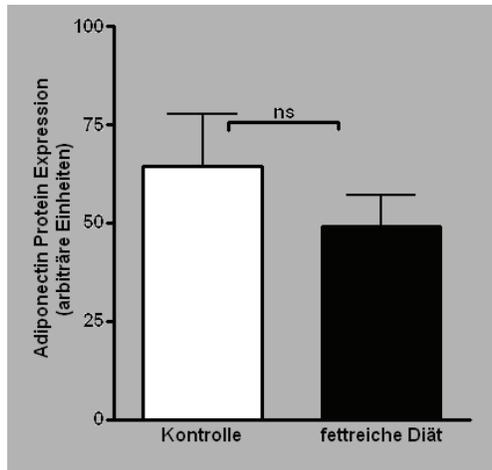


Abbildung 41: Adiponektin Expression im Herzgewebe

Interessanterweise ist die Adiponektin Menge sowohl im EAT und auch im Herzen bei Meerschweinchen, die eine kohlenhydratreiche Diät erhalten haben und dadurch insulinresistent werden reduziert (Abb. 42 Herz (A) 0.55 ± 0.11 fach ($p < 0.01$); EAT (B) auf $0,2 \pm 0.07$ fach ($p < 0,001$)).

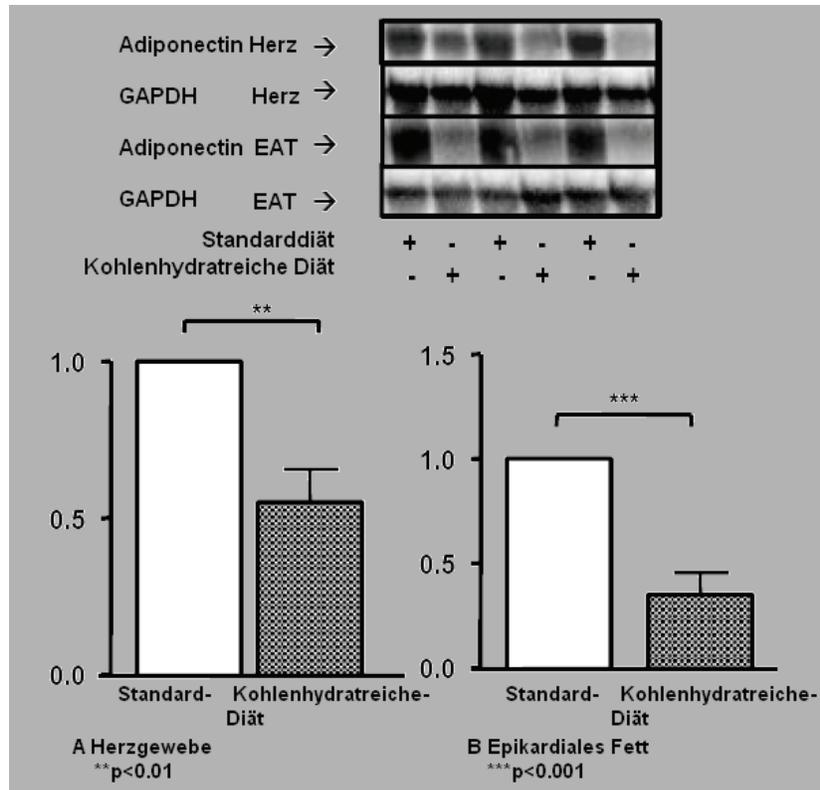


Abbildung 42: Expression von Adiponectin in EAT und Herz nach kohlenhydratreicher Diät, Darstellung normiert auf Kontrolldiät **p<0.01; ***p<0.001

5.15 Nach fettreicher Diät wird die GLUT4 Expression erhöht, während GLUT1 und GLUT4 nach kohlenhydratreicher Diät reduziert sind

Um zu untersuchen, ob und inwieweit sich die beiden Diäten auf die Expression der Glukosetransporter auswirken, wurden diese in Herzen von Meerschweinchen nach fettreicher bzw. kohlenhydratreicher Diät bestimmt.

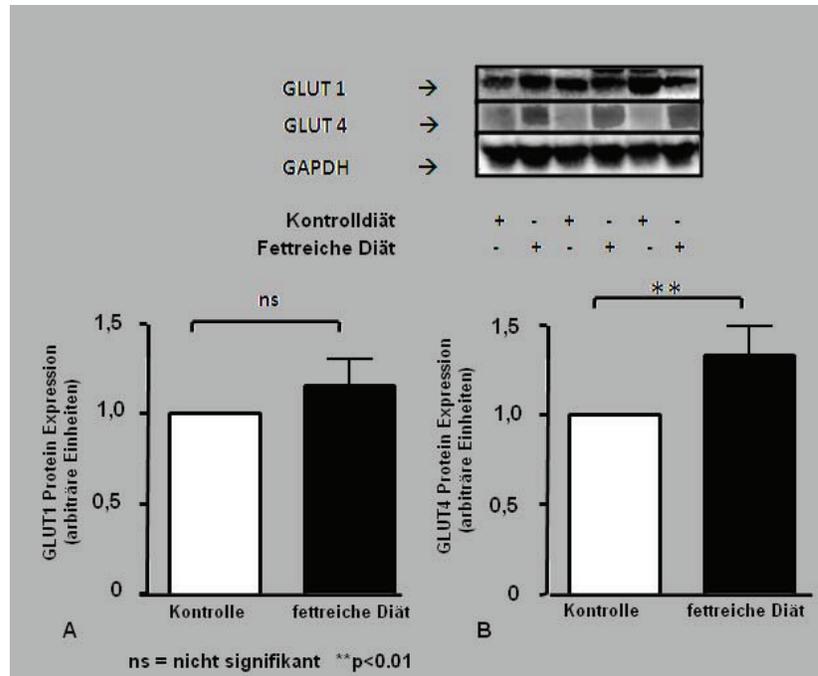


Abbildung 43: Expression der Glukosetransporter I (A) und IV (B) nach fettreicher Diät ns= nicht signifikant; **p<0.01

Wie in Abb.43 dargestellt ist, der für die insulinabhängige Glukoseaufnahme verantwortliche Glukosetransporter IV im Herzen deutlich erhöht (1,3fach; B). Die Expression von GLUT1 (A) wurde nicht beeinflusst. Die GLUT1 Expression wurde auf den $0,35 \pm 0,1$ fachen ($p < 0,001$) Wert reduziert, während die GLUT4 Expression halbiert wurde ($0,5 \pm 0,09$ fach; $p < 0,001$).

Im Gegensatz zu den Folgen der fettreichen Diät wurde die Expression der Glukosetransporter im Herzen von Meerschweinchen nach kohlenhydratreicher Diät signifikant vermindert. Die beiden Diäten verhalten sich somit bezüglich der Expression von GLUT4 im Herzen antagonistisch.

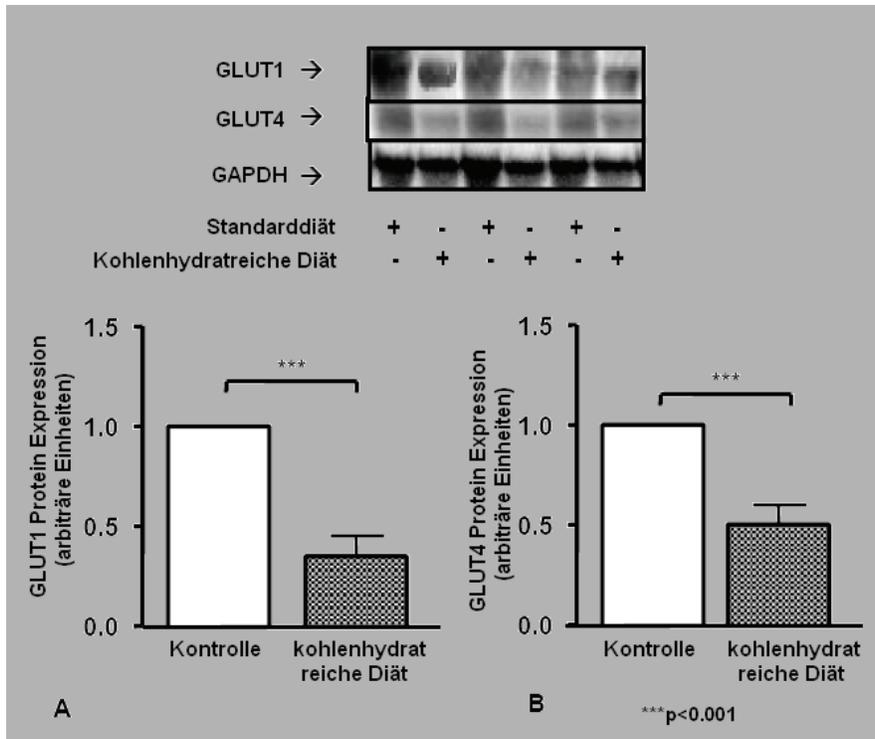


Abbildung 44: Expression der Glukosetransporter I (A) und IV (B) nach kohlenhydratreicher Diät; ***p<0.001

5.16 PPAR γ und PPAR δ werden im Gegensatz zur kohlenhydratreichen Diät nicht durch fettreiche Diät reguliert

Die Familie der Peroxysom Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPAR) fungieren als Lipidsensoren (141). Sie modulieren den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel, sowie deren Speicherung in höheren Organismen (142-145). PPAR γ wird nahezu in jedem Gewebe exprimiert, jedoch ausgesprochen stark in Herz-, Muskel- und Fettgewebe. Im Gegensatz dazu wird PPAR δ überwiegend im Gehirn, Fettgewebe und der Haut exprimiert.

Da vermutet wird, dass PPARs an der Genexpression von GLUT4 beteiligt sind (154), haben wir deren Expression bestimmt, um zu untersuchen, ob die für GLUT4 gezeigten Veränderungen möglicherweise mit einer modifizierten Expression von PPAR verbunden sind. Wir konnten zeigen, dass PPAR γ und PPAR δ im Herzgewebe exprimiert werden (Abb. 45), jedoch konnten modulierende Befunde nicht gezeigt werden.

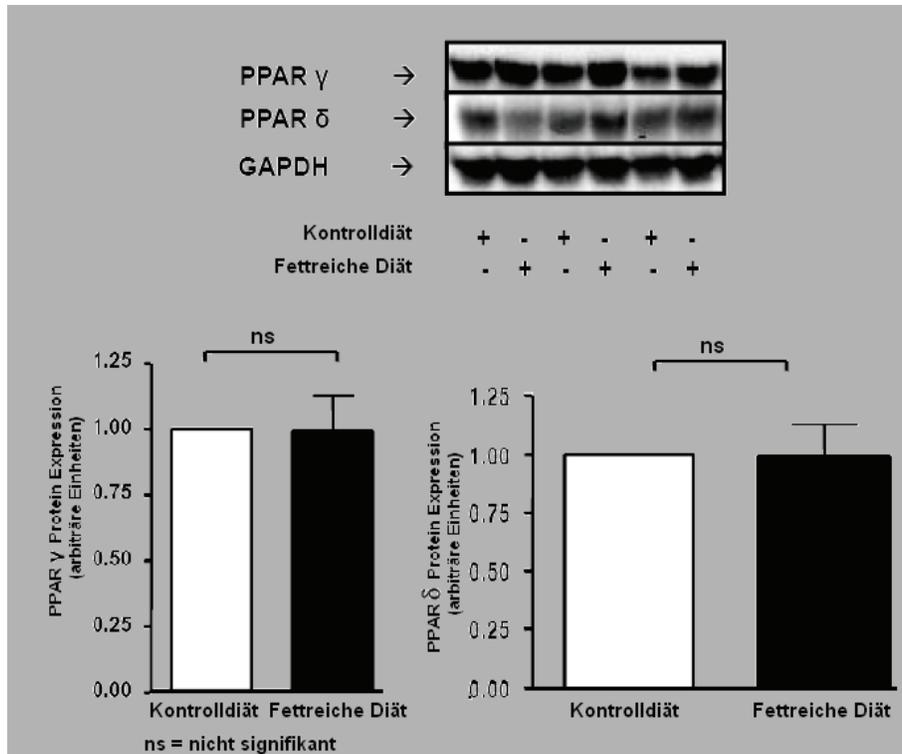


Abbildung 45: PPAR γ und δ Expression im Herzen nach fettreicher Diät; ns = nicht signifikant

Ähnlich wie im Herzen wurden beide Isoformen auch im EAT exprimiert (Abb.45), aber auch in diesem Gewebe nicht durch die fettreiche Diät beeinflusst. Im Gegensatz zur fettreichen Diät war die Expression von PPAR γ als Target der Insulinsensibilisierung im Herzen nach kohlenhydratreicher Diät deutlich verändert ($0,4 \pm 0,1$ fach; $p < 0.001$) (Abb.46 A), während im EAT keine Veränderung nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

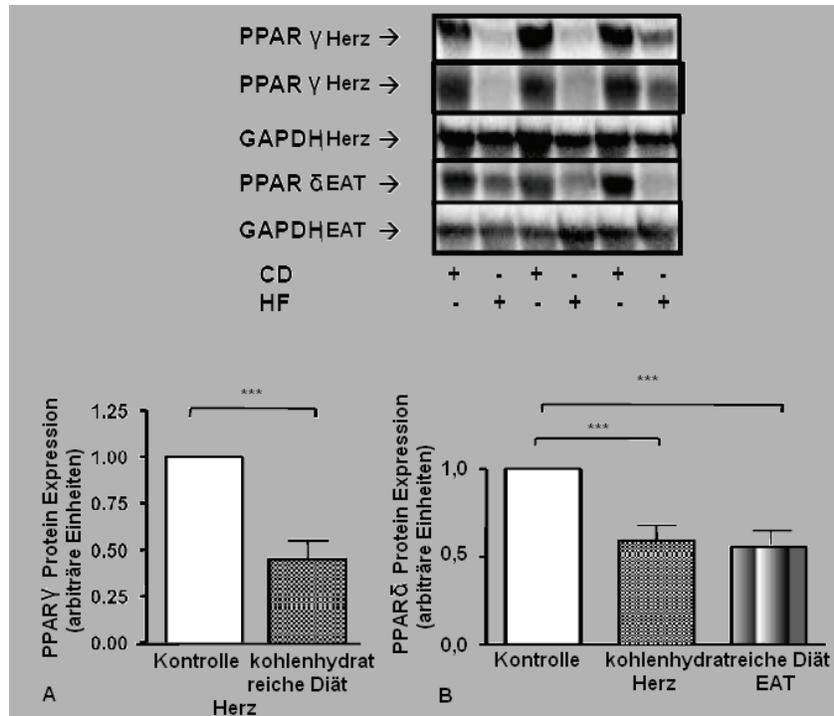


Abbildung 46: PPAR γ und δ Expression im Herz und EAT nach kohlenhydratreicher Diät; *p<0.001**

PPAR δ war anders als PPAR γ nach kohlenhydratreicher Diät sowohl im Herzen ($0,59 \pm 0,09$ fach; $p < 0,05$) (Abb.46 B), aber auch im EAT ($0,62 \pm 0,14$; $p < 0,001$; Abb.46 B) reduziert.

Die gezeigten Daten belegen, dass beide Diäten das Myokard negativ beeinflussen, aber auf unterschiedliche Weise. Während die fettreiche Diät das Myokard schädigt und die kardiale Dysfunktion schon nach sehr kurzem Fütterungszeitraum von drei Monaten nachweisbar ist -also eine direkte Herzwirkung zeigt - hat die kohlenhydratreiche Diät keinen direkten Einfluss auf die Myokardfunktion. Sie führt dagegen zu einer massiven Ausdehnung des EAT und begünstigt die Entwicklung von Insulinresistenz. Die Einwanderung der Makrophagen in das EAT deuten auf die Entstehung inflammatorischer Prozesse hin.

	Kohlenhydratreiche Diät		Fetteiche Diät	
Gewichtssteigerung	6,2±1,0		-	
EAT Menge	1,5 fach		-	
Nüchternblukose	? 94,4±4 vs 89±3 p<0,002		-	
Fläche unter der Kurve nach OGTT	? 41,2± vs 36,2 p<0,01			
Steatosis hepatis			?	
	Herz	EAT	Herz	EAT
Struktur	Makrophageninfiltration		Fettzelleninfiltration Strukturauflockerung	
Funktion			Hypertrophie	
			Myokardverdickung	
LVEDP	-		?	
GLUT1	? 0,35±0,1 p<0,001	-	-	-
GLUT4	? 0,5±0,09 p<0,001	-	? 1,3±0,14 p<0,01	-
PPAR γ	? 0,4±0,1 p<0,001	-	-	-
PPAR δ	? 0,59±0,09 p<0,05	?	-	-
Adiponektin	? 0,55±0,11 p<0,01	? 0,2±0,07 p<0,001	-	? 1,5fach±0,3 P<0,05
freies Glycerin	-	-	? 6,2±1,3 vs 3,9±0,6 p<0,05	-

Abbildung 47: Übersicht der durch die Diäten regulierten Funktionen und Proteine

6. Diskussion

6.1 Allgemeine Diskussion

In den entwickelten Ländern stellt der Diabetes mellitus Typ II eine der häufigsten Erkrankungen dar. Die Prävalenz beträgt etwa 2-3 % während in nicht industrialisierten Staaten die Diabetes mellitus Häufigkeit, bedingt durch das verminderte Vorkommen von Adipositas wesentlich geringer ist. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Umgebungsfaktoren essentiell an der Entstehung des Metabolischen Syndrom und von Diabetes mellitus beteiligt sind. Diese häufig mit Adipositas assoziierten Komplikationen stellen ein großes sozioökonomisches Problem dar. In den westlichen Industrieländern werden etwa 14% der finanziellen Aufwendungen des Gesundheitssystems für die Behandlung von wohlstandsbedingtem DM2 und dessen Folgeerkrankungen aufgewendet (155). Die Morbidität des DM2 ist weitestgehend auf Hyperglykämie und die mit der Insulinresistenz assoziierten Dyslipidämie und Endothelfunktionsstörung zurückzuführen. Durch irreversible Glykosylierung bei unzureichender Einstellung des DM2 entstehen inflammationsbedingt Endorganschäden. Typische Spätfolgen sind Nephropathie, Ophthalmopathie, aber auch Kardiomyopathie. In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk besonders auf die Auswirkungen der durch Hyperalimentation bedingten Entstehung von Diabetes mellitus Typ II bei Adipositas und dessen Endorganschäden am Herzen gelegt.

Da die Expansion des Fettgewebes mit einer subklinischen Inflammation und dysregulierten Zytokinexpression einhergeht, haben wir in einem zellulären Teil die Auswirkung von proinflammatorischen Zytokinen am Beispiel von TGF- β auf Kardiomyozyten untersucht. Da wir zeigen konnten, dass Zytokine maßgeblich an der Verschlechterung des metabolischen Zustands in Kardiomyozyten beteiligt sind, haben wir in einer diskriptiven Studie die Zytokinexpression in epikardialem Fett beim Menschen unter dem Einfluss von Diabetes mellitus Typ 2 analysiert. Hier konnte gezeigt werden, dass sich das Sekretom des dem Herzen fasziefrei aufliegenden epikardialen Fettgewebes signifikant und spezifisch für EAT in Richtung einer gesteigerten Inflammation verschiebt. Da aus ethischen Gründen lediglich Fettgewebsbiopsien von multimorbiden Patienten zugänglich waren, haben wir mit dem

Meerschweinchen ein Tiermodell entwickelt und validiert, das vergleichbar dem Menschen altersabhängig größere Mengen an EAT entwickelt. So konnten wir die Einflüsse der Pharmakotherapie und präexistenter kardialer Morbidität auf das Sekretom des EAT ausschließen und zusätzlich dessen Auswirkung auf den Herzmuskel und die Herzfunktionsparameter bestimmen. Weitergehend haben wir den Einfluss einer mit Fett und Cholesterin angereicherten Diät sowie kohlenhydratreichen „Westernstyle“ ähnlichen Diät auf das Sekretom des EAT und die Herzfunktionsparameter untersucht.

6.2 Diskussion der zellulären Ergebnisse

Zytokine wie zum Beispiel TGF- β zeigen einen großen Rahmen an diversen, teils kontroversen biologischen Funktionen zu denen auch pro- und antiinflammatorische Effekte gehören (156;157). Bedingt durch die plaquestabilisierende Funktion gilt TGF- β als für das kardiovaskuläre System protektives Zytokin (156;158;159), jedoch ist deutlich weniger über die Funktion von TGF- β in Kardiomyozyten bekannt. In der Literatur wird TGF- β als Schutzfaktor vor Schädigung der Kardiomyozyten durch Hypoxie beschrieben (160;161). Der potentielle Crosstalk zwischen TGF- β und der Insulinwirkung allerdings konnte bisher nicht genau gezeigt werden. Im zellulären Teil dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass TGF- β in Kardiomyozyten

- die Lipoxigenase Signalkaskade aktiviert
- als Negativregulator der GLUT4 Expression fungiert
- und die insulinstimulierte GLUT4 Translokation inhibiert

Jedoch könnte TGF- β und die zur TGF- β -Familie gehörenden Aktivine durch diese negative Auswirkung auf den Glukosemetabolismus unter hoher Glukose die Arbeitsleistung der Kardiomyozyten positiv beeinflussen (162). Die im zellulären Teil gezeigten Daten unterstreichen das komplexe und teils kontroverse Aktionspotential von TGF- β im Herzen.

Um die funktionellen Konsequenzen der Steigerung oder Inhibition des 12/15 Lipoxigenasesignalweges in Kardiomyozyten zu untersuchen haben wir als zelluläres Testsystem die insulinresistente, embryonale Rattenkardiomyoblastenzelllinie H9c2-E2 verwendet, die den humanen Insulinrezeptor stabil überexprimiert (163). GLUT4 wurde unterhalb des Cytomegalievirus Minimalpromotors überexprimiert und bewirkt die konstitutive Überexpression des Glukosetransporters. Bedingt dadurch muss die nach

12-LO Aktivierung beobachtete Reduktion des GLUT4 auf posttranslationaler Ebene bewirkt werden. Um zu untersuchen, ob TGF- β mit dem 12/15 Lipoxygenase Signalweg interagiert, haben wir die Expression von 12-LO sowie die Menge deren Produkte, der 12-HETE nach Stimulus mit TGF- β bestimmt. Durch 12-LO Genregulation konnten wir zeigen, dass TGF- β spezifisch die Proteinmenge der 12-LO und die Produktion der 12-HETE in Kardiomyozyten beeinflusst. Diese Daten stehen im Einklang mit Erkenntnissen von Kim et al. (127) wonach TGF- β und der 12/15-LO Signalweg miteinander interagieren und sich gegenseitig aktivieren. Konform zu unseren Befunden zeigten Chem et al. (164), dass proinflammatorische Zytokine wie TGF- β die rapide Aktivierung des 12-LO Signalweges bewirken können. Wir zeigen zum ersten Mal, dass TGF- β eine signifikante Reduktion von GLUT4 sowohl auf mRNA Ebene wie auf dem Proteinlevel bewirkt.

Es könnte spekuliert werden, dass die GLUT4 mRNA als Antwort auf das TGF- β Signal destabilisiert wird und dies die Reduktion der GLUT4 Menge hervorruft. Diese These wird durch neuere Beobachtungen in vaskulären Zellsystemen bestätigt. Hierbei führt die Inkubation mit hohen Glukosekonzentrationen zum einen zur Aktivierung des 12-LO Signalweges und zum anderen wird die GLUT1 mRNA destabilisiert. Diese Untersuchungen schließen Calretikulin als Transaktionsfaktor ein (165). In späteren Arbeiten soll die Destabilisierung der GLUT4 mRNA in primären Kardiomyozyten gezeigt und der zugrundeliegende Mechanismus analysiert werden.

Um die These, dass 12-LO die GLUT4 Expression reguliert weiter zu erhärten, haben wir spezifische Genregulationsexperimente durchgeführt. Unter diesen Konditionen konnten wir die substantielle Steigerung der GLUT4 Menge auf mRNA- und Proteinbasis in Kardiomyozyten nachweisen. Ähnliche Effekte wurden auch in primären, frisch isolierten adulten Kardiomyozyten gefunden. Wir folgern daher, dass die GLUT4 Expression in Kardiomyozyten irreversibel mit der Menge der 12-LO und dem der intrazellulären Eikosanolipidmediators verbunden ist.

In der Literatur wurde gezeigt, dass TGF- β die Glukoseaufnahme beeinflusst. So war in Mesangialzellen nach TGF- β Inkubation die GLUT1 Menge dreifach gesteigert (166;167). Dennoch muss beachtet werden, dass TGF- β auch die 12-LO Signalkaskade in Mesangialzellen aktiviert (127) und dass dieser Signalweg in vaskulären Zellen mit der Reduktion von GLUT1 in Verbindung gebracht wird (89). Wie im zellulären Teil

gezeigt, modifiziert TGF- β aber nicht die basale Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran oder die basale Glukoseaufnahme. Folglich agiert TGF- β sehr zellspezifisch und bewirkt gegensätzliche Effekte auf die Glukoseaufnahme und GLUT4 Translokation. Unsere Daten weisen eindeutig auf die Beteiligung von TGF- β an der Induktion kardialer Insulinresistenz hin. Dies könnte Folge der Reduktion des GLUT4 sein, könnte aber auch auf einen Crosstalk von TGF- β und der Insulinsignalkaskade hindeuten, wie es für MCP-1, TNF- α und andere Zytokine beschrieben wurde (168). In weiterführenden Studien soll die Wechselwirkung und der genaue Interaktionspunkt der durch TGF- β induzierten Insulinresistenz untersucht werden.

Unsere Daten implizieren, dass durch TGF- β bedingt das Angebot an insulinstimulierter Glukoseverfügbarkeit reduziert ist und dies möglicherweise eine substantielle Einschränkung des kardioprotektiven Effekts dieses Zytokins darstellt. Zusätzlich zur 12-LO wurde auch für smad Proteine eine essentielle Rolle als interzelluläre Mediatoren der Inflammation beschrieben (169). Smad Proteine agieren als Transkriptionsfaktoren (127;170) unterhalb von TGF- β und regulieren das Transkriptom der TGF- β Zielproteine nach Translokation in den Kern (171). Über die Tatsache hinausgehend, dass 12-LO ein Zielprotein von TGF- β ist und gegenläufig auch die Synthese von TGF- β durch 12-LO und deren Produkte, den 12 HETEs reguliert wird, könnte diese Regulationsschleife zwischen 12-LO und TGF- β eine kritische Rolle für die kardioprotektive Funktion von TGF- β spielen (127). In der Tat bewirkt die Reoxygenierung nach Hypoxie den Anstieg von TGF- β in Kardiomyozyten (161) und die transiente Überexpression von TGF- β wurde protektiv gegenüber Reperfusionsschädigung im Herzgewebe beschrieben, möglicherweise bedingt durch einen Antioxidationsmechanismus (172). Dennoch sollte, wie anhand der zellulären Daten beschrieben, dem metabolischen Störeinfluss in Kardiomyozyten nach TGF- β Inkubation zumindest in Langzeitbedingungen Rechnung getragen werden.

Zusammenfassend konnten wir im zellulären Teil zeigen, dass Zytokine wie TGF- β den proinflammatorischen 12-LO / 12-HETE Signalweg in Kardiomyozyten aktivieren. Dieser Prozess ist mit einer signifikanten Reduktion des GLUT4 verbunden und bewirkt den Zustand der Insulinresistenz. Daher vermuten wir, dass das kardioprotektive Merkmal von Zytokinen am Beispiel von TGF- β auf die Reduktion der Glukosezufuhr in Herzmuskelzellen beschränkt ist.

6.3 Diskussion der Ergebnisse der klinischen Studie

Hypothetisch hat das epikardiale Fett als weißes Fettdepot die Funktion der Lipidspeicherung für den myokardialen Energiebedarf, als mechanischer Puffer der Koronargefäße gegen arterielle Torsion sowie gegen das Remodeling der Koronararterien. Desweiteren schützt es die autonome Innervierung des Herzens und dessen vasa nervorum (117). Die Speicherfunktion des Fettgewebes und dessen Abgabe von freien Fettsäuren zur Energiegewinnung ist seit längerem anerkannt. Fettgewebe, speziell dessen Hauptbestandteil Adipozyten haben neben der Energiespeicherfunktion aber auch sekretorische Eigenschaften. Die endokrine Funktion von viszeralem Fettgewebe rückte allerdings erst mit der Entdeckung von Leptin in den frühen 1990er Jahren in den Fokus. Seitdem wurde in mehreren Studien belegt, dass Adipozyten Adipokine, Wachstumsfaktoren, Koagulationsfaktoren sowie pro- und antiinflammatorische Zytokine exprimieren und sezernieren (106;118;173). Inzwischen ist es weitgehend akzeptiert, dass speziell viszerales Fettgewebe nicht nur ein lipidspeicherndes Depot ist, sondern auch ein endokrines Organ darstellt, das inflammatorische Zytokine und Chemokine sezerniert (105;174).

EAT als ein relativ neu als viszerales Fett erkanntes Depot ist Quelle verschiedenster Zytokine unter anderem von Adiponektin, fettsäurebindenden Protein 4 (FABP4), Interleukinen, Leptin, Resistin und Tumornekrose Faktor α (175-177). Viszerales Fett bei Adipositas zeichnet sich meist durch die verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen einhergehend mit einer reduzierten Adiponektinsekretion aus. Viszerales Fett beeinflusst besonders bei Adipositas auch den metabolischen Zustand, da es aktiv freie Fettsäuren in den Metabolismus abgibt (75) und insofern vermutet wird, dass EAT in die Pathophysiologie der adipositasbedingten Herzerkrankung involviert ist (178;179). Aus der Literatur ist bekannt, dass neben dem Herzen auch andere Organe wie Leber und Gehirn bedingt durch das Zusammenspiel von Glukosemetabolismus und Fettsäureverwertung durch Adipokine beeinflusst werden können (180).

Experimentelle und klinische Studien lassen vermuten, dass viszerale Adipositas mit einer subklinischen Inflammation assoziiert ist (181-183). Proinflammatorische Zytokine spielen dadurch eine große Rolle in der Entwicklung von Inflammation und Atherosklerose bedingt durch Adipositas. Annehmend, dass epikardiales Fett ähnliche

metabolische und sekretorische Eigenschaften aufweist, wie für das viszerale abdominale Fettgewebe bekannt ist, und unter Beachtung der ausgeprägten Nähe zu den Koronargefäßen und dem Myokard, wird vermutet, dass epikardiales Fettgewebe eine Rolle in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und speziellen Formen der Kardiomyopathie spielt. EAT könnte das Herz und dessen vaskuläres Bett durch parakrine Sekretion von Zytokinen beeinflussen.

Obwohl verschiedene Studien eine Verbindung zwischen den Sekretionsprodukten des EAT, den durch DM2 bedingten Veränderungen im Sekretom und der Pathogenese des kardiovaskulären Syndroms andeuten, ist die Datenlage stark eingeschränkt. Wir haben daher gepaarte Biopsien aus EAT und SAT von neunzehn Typ 2 diabetischen und zwanzig nicht diabetischen Patienten, die sich einer elektiven Operation am offenen Herzen unterzogen, miteinander verglichen. Die Rationale war, gepaarte Fettgewebsbiopsien mittels Zytokinarraytechnik auf deren Expression von Zytokinen und den Auswirkungen des DM2 zu untersuchen. Diese Befunde wurden zweidimensional validiert und ebenso wie die Expression funktionaler Zielproteine mittels Westernblot Technik eruiert. Meist ist lediglich Gewebe von multimorbiden Patienten zugänglich, bei welchen bedingt durch notwendige Operationen Zugang zu EAT entsteht, da sich der Zugang zu EAT von gesunden Menschen aus ethischen Gründen verbietet.

Das Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus männlichen Kaukasiern zwischen 36 und 85 Jahren, so dass geschlechtsspezifische Unterschiede ebenso ausgeschlossen werden konnten wie Unterschiede aufgrund der ethnischen Zugehörigkeit. Desweiteren wurden ausschließlich definiert an DM2 erkrankte, teils insulinpflichtige Patienten und nicht diabetische Patienten als Kontrollkollektiv eingeschlossen, um potentielle Effekte, bedingt durch den Untergang der β -Zellen bei Typ I Diabetikern, auszuschließen. Die Patienten unterschieden sich signifikant in ihrem metabolischen Status, so war der Nüchtern glukosewert bei den diabetischen Patienten 1,4fach erhöht und auch der postoperative Insulinbedarf, bedingt durch den Postaggressionsstoffwechsel war nahezu verdoppelt (138). Der Body Mass Index war bei den diabetischen Patienten gegenüber den Kontrollpatienten nur leicht erhöht und lag bei beiden Gruppen im Bereich von Übergewicht bis zu geringeren Formen von Adipositas. Die Menge des EAT war bei den diabetischen Patienten deutlich vergrößert

ohne jedoch einen Zusammenhang zum BMI darzustellen. In der Literatur wird die Menge des EAT mit dem Grad der Adipositas in Verbindung gebracht (184;185) und in neueren Studien auch mit dem Schweregrad von koronaren Herzerkrankungen assoziiert (185). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten bei der hier gezeigten Studie auf die relativ geringe Probandenanzahl zurück zu führen sein. In Bezug auf die kardiovaskulären Erkrankungen war die medikamentöse Behandlung vergleichbar, so dass durch diese zwar generelle Einflüsse auf das Sekretom des EAT zu erwarten sind, die Effekte aber, aufgrund der ähnlichen medikamentösen Einstellung zu vernachlässigen sind.

Das EAT ist eine reiche Quelle an Adipokinen sowie pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (176;186). Die hier verwendete Zytokinarraytechnik erlaubt eine rein qualitative Analyse der Expression, ohne Aussagen über die Menge zu ermöglichen. In den dargestellten Analysen wurde die Expression des EAT jeweils auf Expression des SAT eines Patienten normiert, so dass lediglich die unterschiedliche Expression im EAT betrachtet wird und interindividuelle Schwankungen keinen verzerrenden Einfluss auf die Gesamtanalyse haben können. Wir konnten für 23 verschiedene Zytokine eine unterschiedliche Expression bedingt durch DM2 beobachten. Es konnte bei Patienten mit DM2 oder koronarer Herzerkrankung analog zur Literatur erhöhte Zytokinplasmaspiegel und die veränderte Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine im EAT beobachtet werden (187;188). So konnte passend zu unseren Beobachtungen, dass das Muster der exprimierten Zytokine deutlich in Richtung Proinflammation verschoben war, weiterhin in der Literatur gezeigt werden, dass DM2 einen hochsignifikanten Einfluss auf die Variation der inflammatorischen Marker hat (189).

Speziell im Menschen wird weißes Fett wie EAT als zentraler Ausgangspunkt der geringgradigen Inflammation angesehen, die für Adipositas charakteristisch ist (190), jedoch konnte der grundsätzliche Zusammenhang zwischen Zytokinexpression und DM2 noch nicht dargestellt werden (187;190;191). Unsere Beobachtungen lassen vermuten, dass DM2 die Eigenschaften des EAT schwerwiegend und spezifisch beeinflusst. Die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, die das EAT exprimiert und sezerniert, mag die Entwicklung eines Zustandes verstärkter Inflammation und der Insulinresistenz des Herzen begünstigen. In Ermangelung einer

Faszie zwischen EAT und dem Myokard, kann angenommen werden, dass durch das EAT sezernierte Moleküle die Koronarwand von außen nach innen permeieren können. Vergleichbar mit dem Zustand der Atherosklerose könnten die Moleküle mit Adventitia und Media des Herzens interagieren (192). Bei Schweinen bewirkt zum Beispiel IL-1 β *in vivo* auf der Oberfläche der Koronarien die Bildung signifikanter Läsionen (193).

Mittels Arraytechnik konnten wir auch zeigen, dass der Adiponektin Gehalt im EAT von diabetischen Patienten verringert war. Um dies genauer zu untersuchen haben wir die quantitative Expression von Adiponektin mittels Western Blot bestimmt und konnten vergleichbare Effekte beobachten. Es ist anerkannt, dass die Adiponektinmenge negativ mit Adipositas verbunden ist (194). Dies bestätigt die hier dargestellten Beobachtungen. Passend dazu konnte bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gezeigt werden, dass die Expression und die zirkulierende Menge protektiver Faktoren wie Adiponektin oder IL-10 deutlich reduziert sind (176). In den hier dargestellten Daten konnten wir anders als für Adiponektin keine signifikante Regulation des antiinflammatorisch und kardioprotektiv wirkenden IL-10 zeigen. Diese Beobachtungen könnten ebenfalls bedingt durch die relativ geringe Probandenzahl verzerrt sein, so dass in weitergehenden Studien mit größerer Probandenzahl ein besonderes Augenmerk auf die IL-10 Expression gelegt werden sollte.

Es gibt Hinweise aus der Literatur, die das dysregulierte Sekretionsmuster der Zytokine bei DM2, aber auch die erhöhte Menge zirkulierender freier Fettsäuren bei Adipositas als Kompetitor des Glukosemetabolismus im Randle Zyklus (94;195) ansehen. Dies könnte auch Auswirkungen auf die Expression funktioneller Zielproteine wie der Glukosetransporter oder das PPAR System haben. Aus diesem Grund haben wir die Expression von GLUT1 und GLUT4 im EAT mittels Western Blot bestimmt. Entgegen unserer Hypothese waren weder GLUT1 noch GLUT4 bedingt durch DM2 verändert.

Wie zuvor beschrieben, ist Adipositas mit chronischer Inflammation des Fettgewebes mit gesteigerter Makrophageninfiltration assoziiert. Die Inflammation scheint dabei essentiell für die Entstehung von Insulinresistenz bei Adipositas zu sein (196). Entgegen unseren Beobachtungen konnte in unterschiedlichen Studien bei Patienten und im Nagermodell gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine mit der Insulinsignalkaskade interagieren, als Effekt funktionelle Proteine wie den GLUT4

Gehalt reduzieren oder dessen Translokation reduzieren (101;101;197-199). Olliver et al. zeigten aber auch, dass die Genexpression des GLUT4 durch langkettige, mehrfach ungesättigte ω 3 Fettsäuren beeinflusst werden kann. Da die Ernährungsrichtlinien schon in den letzten Jahrzehnten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie sie vielfach in einer mediterranen Diät verwendet werden empfiehlt, könnten unsere Befunde unter Umständen auf die Ernährung der Patienten zurück zu führen sein.

In weitergehenden Studien sollte zusätzlich zu den persönlichen Parametern der Patienten auch die Ernährungsgewohnheiten analysiert werden, um etwaige Effekte besser deuten zu können. Da PPAR als Lipidsensoren in der Literatur auch mit der Regulation verschiedener Proteine unter anderem von GLUT4 in Verbindung gebracht werden, haben wir deren Expression im EAT bestimmt. Vergleichbar zu unseren Befunden bei den Glukosetransportern waren alle drei Isoformen deutlich im EAT exprimiert aber im Vergleich zu den Kontrollpatienten nicht durch DM2 modifiziert. Generell wird vermutet, dass bei Menschen die verbesserte Glukosetoleranz nach Thiazolidin- oder Statingabe durch deren antiinflammatorisches Potential bedingt ist, was als weiterer möglicher Grund für die gleichmäßige Expression von GLUT4 und dadurch bedingt verbesserten Glukosemetabolismus gedeutet werden könnte. Diese synthetischen PPAR γ Agonisten werden bei Therapie von DM2 als „Insulin Sensitiser“ verwendet (200).

Zusammenfassend stehen unsere Arbeiten in Übereinstimmung mit der Beobachtungen, die EAT mit der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung in Verbindung bringen (201-203). Unsere Daten bestätigen dagegen nicht die Hypothese, dass der beobachtete Shift der Zytokinexpression des EAT auf den Ausbau der epikardialen Masse bedingt durch DM2 und daraus folgernde Hypoxie zurück zu führen ist. Zwar konnte mittels Echokardiographie die Expansion des EAT bei diabetischen Patienten gezeigt werden, jedoch war die Expression des unter hypoxischen - also Sauerstoffmangelzuständen stabilisierte- HIF1 α sowohl bei Patienten aus der Kontrollgruppe wie auch aus der DM2 Gruppe nur sehr schwach exprimiert. Hypoxie wird in verschiedenen Fettgewebetypen als Schlüsselspieler der adipositasbedingten chronischen Inflammation und Insulinresistenz gewertet (204). HIF1 α mRNA als Signalmediator wird bei Hypoxie stabilisiert und wird bei Adipositas im Fettgewebe als

erhöht beschrieben. Trotz dieser Befunde konnte die genaue Rolle von HIF1 α in der Adipositas bedingten Pathophysiologie noch nicht genau bestimmt werden (204).

6.4 Diskussion des Tiermodells

Die Akkumulation von Fett inmitten und auf der Oberfläche des Herzens bei Meerschweinchen deutet an, dass Fett eine wichtige Rolle in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt (100;205;206). Aus der Literatur ist bekannt, dass die gesteigerte direkte Aufnahme von freien Fettsäuren durch Kardiomyozyten und die daraus resultierende Diskrepanz zwischen Fettsäureaufnahme und -oxidation den kardialen Metabolismus verändert. Die Produktion von Fettsäurezwischenprodukten wird angeregt, was wiederum die massive Einlagerung von Triglyceriden in den Herzmuskel bewirkt. Dadurch werden Apoptose, oxidativer Stress und schließlich die Verschlechterung der kardialen Funktion induziert (207-209). In neueren Studien wurde gezeigt, dass die vermehrt aufgenommenen Fettsäuren nicht nur als Triglyceride in den Kardiomyozyten gespeichert werden, sondern auch die Expansion des EAT bewirken (106;114;118;119;207;210-212). Obwohl die Beobachtung, dass Fett sich auf dem Herzen anreichert altbekannt ist und schon 1847 durch William Harvey als „Adipositas cordis“ oder das „fettige Herz“ beschrieben wurde (106;112;113;213), erscheint diese jetzt in einem neuen Licht.

So konnte gezeigt werden, dass die Menge des EAT zum einen eng mit der mit Menge anderer Typen viszeralen Fetts, wie abdominalem Fett korreliert zum anderen mit der Insulinresistenz und weiteren Befunden des metabolischen Syndrom, aber auch der Herzhypertrophie und kardialen Dysfunktion in Verbindung gebracht wird (106;116;176;210-212;214;215). Ferner weist EAT unterschiedliche Funktionen auf, die ähnlich denen des abdominal viszeralen Fetts sind, wie beispielsweise die potenzierte Lipolyse (216). EAT liegt, vergleichbar der Situation in der Leber, faszienfrei und ohne physische Barriere dem Herzen auf und infiltriert die Kardiomyozyten (114). Desweiteren können Zytokine unabhängig von der Masse des EAT abgegeben werden (175;177). Fußend auf diesen Daten wurde gefolgert, dass EAT als Teil des viszeralen Fettnetzwerkes angesehen werden muss, das in die Beziehung von metabolischem Syndrom und kardiovaskulärer Erkrankung eingreift (100;205;206). Beweise der

Interaktion zwischen Fettgewebe und Skelettmuskel, wobei Mediatoren des Fettgewebes den Metabolismus des Skelettmuskels modifizieren (217), bringen die Hypothese auf, dass EAT den Herzmuskel ähnlich beeinflussen kann und dies zu Veränderungen der Herzstruktur und dessen Funktion führt (118).

In bisher durchgeführte Studien wurde aus ethischen Gründen stets EAT von Patienten mit schwerwiegenden Herzerkrankungen verwendet. Dieser Umstand macht es nahezu unmöglich zu beurteilen, ob die beobachteten Effekte bezeichnend für einen kausalen Zusammenhang oder lediglich eng assoziierte Begleiterscheinungen sind. Um diese grundlegende Fragestellung zu beantworten, benötigen wir ein experimentelles Modell, welches erlaubt

- EAT an gesunden Tieren zu untersuchen,
- unter definierten pathophysiologischen Bedingungen Veränderungen der biochemischen Eigenschaften des EAT zu analysieren,
- sowie deren Konsequenz für die Myokardstruktur und Funktion aufzuklären

Wir konnten den Nachweis erbringen, dass das Meerschweinchen ein geeignetes experimentelles Modell darstellt um speziell die diskutierten Interaktionen zwischen Herz und EAT zu betrachten. Wir beobachteten die Anhäufung von Fettgewebe, speziell am Aortenbogen, entlang der Koronarien und der Interventrikulartfurche. Dies hat große Ähnlichkeit mit Beschreibungen für das menschliche Herz, an welchem an der Basis des Herzens, entlang der Kranzfurche und den Koronarien Fett angelagert wird (118;218;219). Die Menge des EAT steigert sich beim Tiermodell Meerschweinchen ebenso wie es bei Menschen beobachtet wird (118). Das EAT beim Meerschweinchen ist eine reiche Quelle der Zytokine und Chemokine. Es sezerniert nicht nur die viel diskutierten Zytokine TNF α , Adiponektin, Leptin und IL-1 β (175;177), sondern eine breite Auswahl unterschiedlicher Mediatoren. Wir konnten über 120 Zyto- und Chemokine identifizieren, die in beachtlichen Mengen durch das EAT gesunder Herzen sezerniert wurden. Der Umfang der sezernierten Mediatoren stieg altersbedingt signifikant in Abhängigkeit von der Menge des am Herzen lokalisierten EAT an. Wir haben mit dem beschriebenen Tiermodell die Möglichkeit speziell den Einfluss von Diabetes mellitus oder Diät auf die Synthese und Sekretion von Zyto- und Chemokinen zu untersuchen. Unter Verwendung dieses Ansatzes könnten Induktoren der

Kardiomyopathie oder der Kombination von krankheitsspezifischen Mediatoren identifiziert werden.

Unsere Daten lassen die These zu, dass EAT eine vergleichbare Bandbreite an Zyto- und Chemokinen sezernieren wie sie für abdominal viszerales Fett beschrieben wird (104;105;220-224). Zusätzlich zu den häufig im Zusammenhang mit Insulinresistenz diskutierten Zytokinen wie IL-6, TNF- α , Adiponektin und anderen, konnten wir einen gewaltigen Anstieg anderer Zytokine wie des neurotrophen Faktors NT4, den insulinähnlichen Wachstumsfaktoren Bindungsproteinen (IGFBP), dem Makrophagen induzierenden Faktor (MIF) und ICAM-3 nachweisen. Diese Substanzen sind weniger in die Vermittlung des metabolischen Effektes eingebunden, sondern fördern hauptsächlich das Wachstum und die vaskuläre Vernetzung des Herzens. Darüber hinaus gibt es Anzeichen für einen intensiven Crosstalk zwischen Fettzellen, eingewanderten Makrophagen und dem umgebenden vaskulären Bett und Muskelgewebe, der nicht auf systemische Konzentrationsänderungen dieser Mediatoren zurück zu führen ist (111). Das hier beschriebene Tiermodell erlaubt die Analyse des spezifischen Einflusses der, auf dem Herzen und den Koronargefäßen akkumulierten Fettzellen, auf die kardiale Perfusion und den Metabolismus. Das Modell ermöglicht nicht nur die Darstellung der synthetischen Kapazität des EAT sondern auch die Analyse des Expressionsmusters und als besonderen Vorteil die proteinogene Expressionsanalyse des Herzens, beispielsweise für 12-LO.

Einhergehend mit unserer zuvor aufgestellten Hypothese konnten wir zeigen, dass die 12-LO Expression im EAT und Herzen alterungsbedingt und auch assoziiert mit der Expansion des EAT signifikant gesteigert wurde (84;89). Diese Daten lassen vermuten, dass die Insulinsensitivität des EAT und des Herzens schon in älteren Tieren beeinträchtigt sein könnte, obwohl wir zu diesem Zeitpunkt noch keine systemische Insulinresistenz nachweisen konnten. Dieser metabolische Status könnte mit den Befunden der Schweineadipositas verglichen werden, bei der keine systemische Insulinresistenz oder oxidativer Stress auftreten, wohl aber pathophysiologisch relevante Veränderungen im Herzen und besonders an den Koronarien nachweisbar sind (225). Das Tiermodell Meerschweinchen erlaubt die Analyse funktioneller Verknüpfungen. Durch die nicht invasive Echokardiographie ist es möglich direkt und fortlaufend

funktionelle Konsequenzen des akkumulierenden EAT auf die Myokardfunktion oder dessen sich ändernde synthetische Merkmale zu bestimmen.

6.5 Diskussion der Auswirkungen der Diäten

Wir haben die Auswirkungen einer dreimonatigen fettreichen oder kohlenhydratreichen Diät bei Meerschweinchen auf das Körpergewicht, das EAT, den Glukosemetabolismus und verschiedene funktionelle Proteine untersucht. Entgegen unserer Anfangshypothese entwickelten Meerschweinchen nach fettreicher Diät keine Adipositas. Das verwendete Futtermittel wurde auf Basis der Kontrolldiät für Meerschweinchen erstellt und mit Zucker sowie Fett aus verschiedenen Fettquellen angereichert. Hierfür wurden sowohl überwiegend mittel- und langkettige gesättigte Fettsäuren als auch Cholesterin verwendet. Damit sollte die Fütterung laut Herstellerangaben das metabolische Syndrom, Adipositas und DM2 zur Folge haben, was jedoch im Widerspruch zu unseren Beobachtungen steht. Die ausbleibende Adipositas oder Gewichtssteigerung könnte auf eine geringere Futteraufnahme zurückzuführen sein, was eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Kalorienaufnahme zur Folge haben könnte. Ähnliche Befunde sind in der Literatur auch für Ratten beschrieben, die mit einer Hochfettdiät gefüttert wurden (226;227). Nach siebenwöchiger Diät zeigten die Ratten einen nicht adipösen Phänotyp und die Gewichtszunahme über den Diätzeitraum unterschied sich nicht von dem der Kontrolltiere, zudem konnte die reduzierte Futteraufnahme ermittelt werden (228).

Im Gegensatz zu diesen Befunden entwickeln Meerschweinchen nach kohlenhydratreicher Diät eine deutliche Gewichtssteigerung und Adipositas. Das verwendete Futtermittel enthält ebenfalls hohe Konzentrationen an Zucker und freien Fettsäuren, jedoch wurden bei dieser „Westernstyle“ ähnlichen Diät auch vermehrt ungesättigte Fettsäuren eingesetzt, während der Cholesteringehalt vergleichbar der Kontrolldiät blieb. Laut Herstellerangaben ist dieses Futtermittel ebenfalls geeignet um Adipositas und als Folge das Metabolische Syndrom auszulösen. Ein entscheidender Faktor bei der Nahrungsaufnahme ist das Sättigungsgefühl, das unter anderem durch das Hungergefühl steuernde Zytokine und Hormone beeinflusst wird. Leite et al. konnten zeigen, dass Meerschweinchen, die mit einer kohlenhydratarmen Diät gefüttert wurden

im Diätverlauf mehr Gewicht zunahmten als Meerschweinchen, die mit einer fettarmen Diät versorgt wurden (229), obwohl sie die gleiche Menge an Futter aufgenommen hatten. Somit scheint neben der aufgenommenen Kalorienmenge auch die Dichte und Zusammensetzung des Futters sowie die Magendehnung Auswirkungen auf die Futteraufnahme zu haben. Dies würde auch die unterschiedlichen Effekte der von uns verwendeten Diäten erklären, ebenso wie Befunde, dass Diäten mit einem hohen Anteil an raffinierten Kohlenhydraten mit einem hohen „glykämischen Index“ das Hungergefühl steigern und zur Hyperalimentation führen können, was folglich Gewichtszunahme und Adipositas induziert (230;231)

Im Gegensatz zur Fütterung mit der fettreichen Diät war der Nüchternblutglukosegehalt bei Tieren, die eine kohlenhydratreiche Diät erhalten hatten, signifikant erhöht. Schon 1988 zeigten passend dazu Ræven und Farquhar, dass zentrale Adipositas und Insulinresistenz miteinander verknüpft sind (232). Die Beobachtung, dass die mit der fettreichen Diät gefütterten Meerschweinchen, bedingt durch geringere Kalorienaufnahme nicht adipös werden oder dieser Befund durch ein stärkeres Sättigungsgefühl, generiert durch eine dichtere Nahrungszusammensetzung bedingt ist, könnte erklären warum diese Tiere im Gegensatz zu den adipösen Tieren nach kohlenhydratreicher Diät keine Insulinresistenz oder einen erhöhten Nüchternblutglukosespiegel aufweisen. Zudem ist es in der Literatur anerkannt, dass die Verringerung des Körpergewichts eine deutliche Verbesserung des metabolischen Status bewirken kann (233-237) und Insulinresistenz und das metabolische Syndrom eng mit Fettleibigkeit verlinkt sind (238). Der metabolische Status der Tiere nach fettreicher Diät kann wie zuvor beschrieben ebenso wie bei älteren Meerschweinchen mit den Befunden der Schweineadipositas verglichen werden, bei der zwar noch keine systemische Insulinresistenz oder oxidativer Stress auftreten, jedoch pathophysiologische Veränderungen an Herz und dessen Gefäßen feststellbar sind (225). Andere Studien beschreiben nach fettreicher Diät bei Ratten einen metabolisch unauffälligen Zustand des DM2, der trotz der fehlenden oder geringgradigen Insulinresistenz zu Herzhypertrophie und kardialer Dysfunktion führen kann (226;239;240).

Nach kohlenhydratreicher Diät war die Menge des EAT 1,5fach vermehrt, jedoch konnten lichtmikroskopisch keine Veränderungen der Herzstruktur nach Hämatoxylin

/Eosin Färbung gezeigt werden. Auffällig war jedoch die durch MAC387 Färbung gezeigte Infiltration von Makrophagen in den Herzmuskel, die Anzeichen für eine mit Adipositas einhergehende Inflammation ist (241;242). Die histologischen Analysen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Klaus Addicks des Institutes für Anatomie der Universität zu Köln und Dr. Jürgen Weiss aus dem Deutschen Diabetes Zentrum erstellt. Ich danke Ihnen für die freundliche zur Verfügung Stellung der Daten. Übergewicht und Adipositas sind schon durch die frühen Arbeiten von William Harvey (113) mit der koronaren Herzerkrankung, Herzinsuffizienz und dem plötzlichen Herztod verbunden. Die „adipositas cordis“ - die Verfettung des Herzens bei Adipositas wird durch die Akkumulation des EAT zwischen den Herzmuskelfaser verursacht und bewirkt die Degeneration der Myozyten (242). Die mit kohlenhydratreicher Diät gefütterten Meerschweinchen zeigten im Gegensatz zu den publizierten Daten und trotz gesteigerter EAT Menge noch keine Einschränkungen der Herzfunktionsparameter, was durch den kurzen Zeitraum der Fütterung bedingt sein könnte. Die gezeigten echokardiographischen Analysen wurden in Kooperation mit Herr. Dr. Zhaoping Ding an der Heinriche Heine Universität erstellt. Ich danke ihm für die freundliche zur Verfügung Stellung der Daten. Die Einwanderung der Makrophagen in die Herzstruktur legen jedoch eine beginnende Schädigung des Herzens durch subklinische Inflammation nahe (243-245).

Ein weiterer Erklärungsansatz für das Ausbleiben von koronarer Herzerkrankung könnte die Fettsäurekomposition der kohlenhydratreichen Diät sein. Obwohl in den letzten Jahrzehnten Ernährungsvorgaben zur Prävention von chronischen Erkrankungen wie dem Metabolischen Syndrom die Reduktion des Fettkonsums und stattdessen die Steigerung des Kohlenhydratanteil beinhaltete, steht diese Empfehlung im Widerspruch zu Untersuchungen, dass ungesättigte Fettsäuren positive Effekte auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos haben (246). Desweiteren wurde bedingt durch den hohen Anteil von raffinerter Stärke und Kohlenhydraten das Risiko an DM2 oder langfristig an koronarer Herzkrankheit zu erkranken gesteigert (246). In epidemiologischen Studien wurde der qualitative Einfluss von Fettsäuren auf die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit untersucht. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch von gesättigten Fettsäuren durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie zum Beispiel ω 3 Fettsäuren deutlich effektiver das Risiko der koronaren Herzerkrankung

senkt als die generelle Reduktion der Fettaufnahme. Dieses Phänomen ist auch als Epidemiologie der mediterranen Diäten bekannt (230;247-250).

Da wir mit einer relativ kurzen dreimonatigen Diät schon die Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz zeigen konnten, sollte in weitergehenden Studien die langfristige Auswirkung einer kohlenhydratreichen Diät auch auf die Herzfunktionsparameter untersucht werden. Nach fettreicher Diät war ebenso wie für das Körpergewicht keine gesteigerte Menge an EAT nachweisbar und aus lichtmikroskopischen Untersuchungen folgt, dass die Infiltration von Fettzellen in den Bereich der Koronarien auch im Vergleich zur Kontrolldiät verringert war. Die Befunde der verminderten Fettakkumulation werden durch Thesen gestützt, dass das Herz bei hoher Belastung auch Fettsäuren zur Gewährleistung des Energiebedarfs verwenden kann (251). Bei zu hoher Fettbelastung, zum Beispiel durch eine fettreiche Diät wird das Gleichgewicht zwischen Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation massiv in Richtung Fettsäureverwertung verschoben (252), was häufig zu Herzfunktionsstörungen führt (236;253). Bei genauerer elektronenmikroskopischer Betrachtung wurde erkennbar, dass die Struktur des linken Ventrikels vergrößert war und die Einlagerung von Grundsubstanz und Kollagen eine Auflockerung der morphologischen Struktur bewirkte, was zu einer Versteifung des Herzens (254) vergleichbar der diastolischen Herzinsuffizienz führt. Studien mit Ratten zeigten analog zu unseren Befunden der Kollageneinlagerung in die Myokardstruktur, dass fettreiche Diät Veränderungen in der kardiovaskulären Struktur bewirken kann und zu Herzhypertrophie und Fibrose führt (255-259).

Die Meerschweinchen zeigten nach fettreicher Diät den nahezu kompletten Verlust des Fettgewebes. Diese Symptomatik wird in der Literatur auch als Lipodystrophie beschrieben (260). Patienten mit dieser Erkrankung zeigen ähnliche metabolische Evidenzen wie sie für Adipositas beschrieben sind, was ein deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des Fettgewebes als endokrin aktives Organ ist (261). Bedingt durch die ungünstige Anreicherung von gesättigten Fettsäuren in der Diät sind die beobachteten Auswirkungen insbesondere auf die Herzfunktion erklärbar. So konnte auch in neueren Studien gezeigt werden, dass eine fettreiche Diät bei Ratten kardiale Dysfunktion induziert (227). Übereinstimmend damit konnten wir bei mit fettreicher Diät gefütterten Meerschweinchen deutliche Veränderungen der linksventrikulären Funktion

mittels Echokardiographie nachweisen. Ebenfalls analog mit der Literatur (262) konnten wir die Hypertrophie der Ventikelwand ebenso darstellen wie die Reduktion der diastolischen Auswurfraction (263) zeigen.

Beim Menschen wird Lipodystrophie häufig auch mit einer erhöhten Triglyzeridbelastung beschrieben (260), konform dazu konnten wir nach fettreicher Diät nahezu eine Verdopplung des freien Glycerins im Herzen zeigen (242). Ähnliche Befunde wurden in neueren Studien auch bei Ratten gezeigt (264) und es wurde dem EAT beim Menschen eine hohe lipolytische Aktivität zugeschrieben. Diese wird in der Literatur mit der Freisetzung von Fettsäuren bei erhöhtem myokardialen Energiebedarf in Verbindung gebracht (114;153). Zusammenfassend deuten diese Befunde und die Datenlage bei Ratten darauf hin, dass die Akkumulation von Triglyzeridmetaboliten wie in unserem Tiermodell beobachtet ebenso wie die entstehende Insulinresistenz nach kohlenhydratreicher Diät eine Diabetes mellitus abhängige kardiale Dysfunktion begünstigen können (207;227;265;266).

Neben den morphologischen und funktionellen Veränderungen im Herzen konnten wir schon makroskopisch eine Verfettung der Leber nach fettreicher Diät feststellen, wohingegen nach kohlenhydratreicher Diät keine Veränderung der Lebermorphologie zu erkennen war. Unsere Vermutung einer massiven Fetteinlagerung, im Patienten auch als *steatosis hepatis* bekannt, konnte mittels Oilred Färbung bestätigt werden. Diese Daten sind konform zu der Annahme, dass die Meerschweinchen nach fettreicher Diät eine Form von Lipodystrophie entwickeln (260). Bei Patienten entsteht die nicht alkoholische Fettleber (NASH) durch Hyperalimentation oder durch erhöhte Plasmalevel freier Fettsäuren nach exzessiver Lipolyse des Fettgewebes (267), jedoch ist bisher unklar, ob die erhöhten Level der freien Fettsäuren unabhängig von Hyperglykämie und Insulinresistenz zu einer Verfettung der Leber führen können (267). Wang et al. konnten bei Ratten nach fettreicher Diät eine Verdopplung des freien Fettsäuregehalts bei normoglykämischem Zustand zeigen (267). Dies entspricht genau unseren Beobachtungen bei Meerschweinchen nach fettreicher Diät, jedoch zeigten die Ratten nach fettreicher Diät auch eine signifikante Steigerung des Körpergewichts im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Diese Daten und der Vergleich von Wang et al. mit Typ 1 diabetischen Tieren lassen den Schluss zu, dass erhöhte Mengen freier Fettsäuren als

entscheidende Determinante bei der Entwicklung von steatosis hepatis angesehen werden können.

Neben den morphologischen Veränderungen haben wir die Auswirkung der Diäten auf funktionelle Proteine im EAT wie auch im Herzgewebe untersucht. Für die Zytokine Adiponektin und Leptin ist bekannt, dass sie in die Steuerung des Hunger- und Sättigungsgefühls involviert sind (229;268). Adiponektin wird im Fettgewebe synthetisiert und hat im Gegensatz zu den meisten Zytokinen antidiabetische, insulinsensitivierende, ebenso wie antiinflammatorische Eigenschaften (269;270). Um unsere These zu erhärten, dass Meerschweinchen bei fettreicher Diät weniger Futter aufnehmen, haben wir den Adiponektin Gehalt in EAT und Herz bestimmt. Wir konnten nach fettreicher Diät einen signifikanten Anstieg von Adiponektin im EAT zeigen, wohingegen der Gehalt von Adiponektin im Herz zwar sehr hoch aber nicht durch die Diät beeinflusst war. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen wird in der Literatur meist der Abfall des Adiponektin Gehaltes mit zunehmender Adipositas bedingt durch fettreiche Diät beschrieben (270-273). Shao et al. zeigten aber auch, dass bei der Maus im Rahmen einer gematchten Kalorienaufnahme, wie wir sie bei unserem Tiermodell Meerschweinchen nach fettreicher Diät vermuten, eine fettreiche Diät weder die Genexpression noch den Adiponektin Plasmagehalt beeinflusst (270). Der Anstieg des Adiponektin Gehaltes nach fettreicher Diät im EAT könnte als kompensatorischer Effekt gedeutet werden, um weiteren Schädigungen des Herzens entgegenzuwirken. Im Gegensatz zu den Daten nach fettreicher Diät und übereinstimmend mit der Literatur (269) wurde die Adiponektin Expression nach kohlenhydratreicher Diät im EAT, wie auch im Herzgewebe deutlich reduziert (274). Geringe systemische Adiponektinlevel werden auch im Zusammenhang mit Adipositas und DM2 beschrieben (274;275), so dass dies unsere Befunde unterstützt, dass Meerschweinchen nach kohlenhydratreicher Diät insulinresistent werden. Trotz des engen Zusammenhangs von Adipositas und niedrigem Adiponektin Gehalt ist bisher nicht bekannt, ob schon die Expansion der Fettgewebe selbst zur Verringerung der Adiponektinlevel führt (270). In weitergehenden Studien mit längeren Fütterungszeiträumen sollte neben der Expression von Adiponektin in Fettgewebe und Herz auch die systemische Adiponektin Konzentration bestimmt werden, um besonders die potentiellen Auswirkungen auf das Hungergefühl genauer zu eruieren.

Im zellulären Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass die Expression des GLUT4 durch Zytokine wie TGF- β , bedingt durch dessen Interaktion mit der 12-Lipoxygenase Signalkaskade, reguliert werden kann. Dieser Signalweg wird in Mesangialzellen auch durch hohen Glukose Gehalt aktiviert. TGF- β ist deutlich im EAT von Meerschweinchen exprimiert, wurde aber nicht diätbedingt reguliert. Jedoch ist aufgrund der erhöhten Menge des EAT nach kohlenhydratreicher Diät eine gesteigerte Menge an TGF- β anzunehmen. Wir konnten nach fettreicher Diät zeigen, dass der für die insulinabhängige Glukoseaufnahme verantwortliche Glukosetransporter IV im Herzen deutlich erhöht ist, während die Expression von GLUT1 nicht beeinflusst wurde. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu unserer Hypothese, dass die funktionellen Veränderungen im Herzen nach fettreicher Diät auf eine gesteigerte Verwertung von freien Fettsäuren nach Lypolyse zurück zu führen sind. Jedoch wird die Steigerung des GLUT4 nach fettreicher Diät dennoch in der Literatur beschrieben. Ezaki et al. postulierten 1997, dass die Überexpression von GLUT4 bei Mäusen nach fettreicher Diät als Kompensationsmechanismus dienen könnte, um die Blutzuckerregulation zu verbessern. Übereinstimmend mit unseren Befunden, dass Meerschweinchen nach fettreicher Diät nicht insulinresistent werden, wurde die Überexpression von GLUT4 als Möglichkeit der effektiven Gegenregulation und Abmilderung der Insulinresistenz beschrieben (276).

Im Gegensatz zu den Folgen der fettreichen Diät wurde die Expression der Glukosetransporter im Herzen von Meerschweinchen nach kohlenhydratreicher Diät signifikant vermindert. Zusätzlich wurden die Meerschweinchen insulinresistent, was in der Literatur mit der Reduktion der GLUT4 Aktivität in Zusammenhang gebracht wird (277) und somit unsere Ergebnisse unterstützt. In neueren Studien konnte auch gezeigt werden, dass durch kohlenhydratreiche Diät die Verwertung von freien Fettsäuren reduziert wurde, ebenso wie die Zielenzyme der PPARs (278). Folglich wurde auch die GLUT4 Menge, sowie die Glukoseaufnahme und die Menge der glykolytischen Zwischenprodukte reduziert (278;279). Somit beeinflussen beide Diäten den Glukosemetabolismus im Herzen von Meerschweinchen jedoch auf unterschiedliche Weise. Während nach fettreicher Diät die Expression der Glukosetransporter gesteigert wird, um die Effekte der entstehenden Insulinresistenz abzumildern, werden bei Hyperglykämie nach kohlenhydratreicher Diät die GLUT4 Translokation und ebenso die

Mobilisierung der freien Fettsäuren zur Energiegewinnung reduziert. Die beobachteten Veränderungen in der GLUT4 Expression werden *in vivo* mit einer Verschlechterung der Herzfunktion in Verbindung gebracht (280) und stellen somit einen weiteren Beleg für den Zusammenhang zwischen Diät und den beobachteten Funktionsstörungen dar.

Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptoren sind in der Literatur als Lipidsensoren beschrieben und werden mit der Regulation verschiedener Proteine in Verbindung gebracht (141). Sie interagieren mit dem Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel (142-145) und spielen eine Schlüsselrolle in der Abgrenzung von Fettgewebe. PPAR γ und dessen Agonisten, die Thiazolidione werden als „Insulin Sensitiser“ zur klinischen Behandlung des DM2 verwendet (200). Neuere Studien haben gezeigt, dass PPAR γ sowohl in die Adipogenese involviert ist wie auch die Insulinsensitivität steigert (281). In der Literatur ist gezeigt, dass PPARs an der Genexpression von GLUT4 beteiligt sind (154) und speziell PPAR δ über Inhibition von NF- κ B Hypertrophie und Inflammation im Herzen reduzieren kann (265). Wir haben deren Expression in EAT und Herzmuskel bestimmt, um zu untersuchen, ob die für GLUT4 und den Glukosemetabolismus gezeigten Veränderungen möglicherweise mit einer modifizierten Expression von PPAR verbunden sind. Nach fettreicher Diät konnte weder im EAT noch im Herzmuskel eine Veränderung der PPAR γ oder PPAR δ Expression gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zu der Hypothese, dass bei Meerschweinchen nach fettreicher Diät, aufgrund der gezeigten Lipodystrophie ein gestörter Lipidstoffwechsel zugrunde liegt, obwohl PPAR δ neben anderen Funktionen in die Kontrolle der Lipidhomöostase involviert ist (282). Auch für PPAR γ selbst wird in der Literatur ein Insulin sensitivierender Effekt beschrieben (283). Da PPARs nach fettreicher Diät nicht reguliert sind, stützt dies unsere These, dass die gezeigten funktionellen Veränderungen nicht auf PPAR oder deren Effekte auf den Glukosemetabolismus zurückzuführen sind. Im Gegensatz dazu war nach kohlenhydratreicher Diät PPAR γ im Herzen und PPAR δ in EAT und Herz signifikant reduziert. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass mit der Makrophageninfiltration in das Herz nach kohlenhydratreicher Diät deutliche Hinweise für eine geringgradige Inflammation gegeben sind, werden durch Befunde in unterschiedlichen Geweben bestätigt, die sowohl für PPAR γ als auch PPAR δ eine antiinflammatorische Wirkung beschreiben (265;282;284).

Zusammenfassend beeinflussen beide Diäten den metabolischen Zustand der Meerschweinchen aber mit sehr unterschiedlichen Auswirkungen. Während nach kohlenhydratreicher Diät die klassische Symptomatik des durch Adipositas induzierten Diabetes mellitus Typ II mit subklinischer Inflammation des Herzmuskels entsteht, konnten wir nach fettreicher Diät keine Adipositas zeigen. Diese Tiere zeigten jedoch Endorganschäden wie die wahrscheinlich durch Lipodystrophie bedingte hochgradige Verfettung der Leber oder die signifikant gesteigerte Triglyzeridbelastung des Herzens, einhergehend mit deutlich verschlechterten Herzfunktionsparametern.

6.6 Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Wir konnten in der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass Zytokine schwerwiegende Auswirkungen auf die Funktion und Insulinsensitivität von Kardiomyozyten haben. Im zellulären Teil konnten wir darstellen, dass Zytokine wie TGF- β den proinflammatorischen 12-LO / 12-HETE Signalweg in Kardiomyozyten aktivieren, und dies maßgebliche Auswirkungen auf die Verstoffwechslung von Glukose hat, da eine massive Reduktion des GLUT4 bewirkt wird. Wir vermuten daher, dass die in der Literatur beschriebenen kardioprotektiven Merkmale von TGF- β auf die Reduktion der Glukosezufuhr in Herzmuskelzellen beschränkt sind.

Unsere Arbeiten am epikardialen Fettgewebe von diabetischen und nicht diabetischen Patienten stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtungen, die EAT mit der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung in Verbindung bringen (201-203). Jedoch konnten wir nicht die Hypothese belegen, dass die Zytokinexpression durch Hypoxie bedingt durch die Expansion des EAT verändert wird.

Mit dem Meerschweinchen haben wir ein Tiermodell validiert, das die Analyse funktioneller Verknüpfungen zwischen EAT, Zytokinexpressionmuster und der Kardiomyopathie erlaubt. Pharmakodynamische Einfüsse konnten im Tiermodell ebenso ausgeschlossen werden wie die Effekte der Comorbidität, die den Zugang zu humanem EAT erst ermöglicht haben. Wir konnten auch zeigen, dass speziell die Zusammensetzung von Diäten, neben der Begünstigung von Adipositas und folglich auch des Diabetes mellitus Typ II, einen wesentlichen Einfluss auf die entstehenden

Endorganschäden haben können. So könnte auch bei bestehender Vorerkrankung durch Lifestyle Intervention Einfluss auf den Krankheitsverlauf genommen werden.

7. Referenzen

1. **Saltiel,AR, Kahn,CR:** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806, 2001
2. **Holman,GD, Cushman,SW:** Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays* 16:753-759, 1994
3. **Craig,ME, Hattersley,A, Donaghue,KC:** Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr.Diabetes* 10 Suppl 12:3-12, 2009
4. **Ahmed,AM:** History of diabetes mellitus. *Saudi.Med.J* 23:373-378, 2002
5. **Kerner, W., Brückel, B., and Böhm, B. O:** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Scherbaum, W. A., Lauterbach, K. W., and Joost, H. G. Hrsg. Leitlinien DDG 1.Auflage 2001 . 2001.
6. **Alberti,KG, Zimmet,PZ:** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet.Med.* 15:539-553, 1998
7. **Naik,RG, Brooks-Worrell,BM, Palmer,JP:** Latent autoimmune diabetes in adults. *J Clin.Endocrinol.Metab* 94:4635-4644, 2009
8. **DeFronzo,RA:** Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth.J Med.* 50:191-197, 1997
9. **Miranda,PJ, DeFronzo,RA, Califf,RM, Guyton,JR:** Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am.Heart J* 149:33-45, 2005
10. **Eckel,RH, Grundy,SM, Zimmet,PZ:** The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415-1428, 2005

11. **Hanefeld,M, Kohler,C:** The metabolic syndrome and its epidemiologic dimensions in historical perspective. *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.* 96:183-188, 2002
12. **Goldstein,BJ:** Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev.Cardiovasc.Med.* 4 Suppl 6:S3-10, 2003
13. **Boitard,C:** Insulin secretion in type 2 diabetes: clinical aspects. *Diabetes Metab* 28:4S33-4S38, 2002
14. **Pellme,F, Smith,U, Funahashi,T, Matsuzawa,Y, Brekke,H, Wiklund,O, Taskinen,MR, Jansson,PA:** Circulating adiponectin levels are reduced in nonobese but insulin-resistant first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 52:1182-1186, 2003
15. **Janka,HU, Michaelis,D:** Epidemiology of diabetes mellitus: prevalence, incidence, pathogenesis, and prognosis. *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.* 96:159-165, 2002
16. **Thefeld,W:** Prevalence of diabetes mellitus in the adult German population. *Gesundheitswesen* 61 Spec No:S85-S89, 1999
17. **Adeghate,E, Schattner,P, Peter,A, Dunn,E, Donath,T:** Diabetes mellitus and its complications in a Hungarian population. *Arch.Physiol Biochem.* 109:281-291, 2001
18. **Hauner,H:** Occurrence of diabetes mellitus in Germany. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 123:777-782, 1998
19. **Köster, I, von Ferber, L, and Hauner, H:** Die Kosten des Diabetes mellitus – Ergebnisse der KoDiM-Studie. PMV Forschungsgruppe, Pressekonferenz . 28-6-2005.
20. **Banting,FG, Best,CH, Collip,JB, Campbell,WR, Fletcher,AA:** Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can.Med.Assoc.J* 12:141-146, 1922
21. **Banting,FG, Best,CH:** The internal secretion of the pancreas. 1922. *Indian J Med.Res.* 125:251-266, 2007

22. **Sanger,F, Tuppy,H:** The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem.J* 49:481-490, 1951
23. **Sanger,F, Thompson,EO:** The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. II. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem.J* 53:366-374, 1953
24. **Meienhofer,J, Schnabel,E, Bremer,H, Brinkhoff,O, Zabel,R, Sroka,W, Klostermayer,H, Brandenburg,D, Okuda,T, Zahn,H:** Synthesis of insulin chains and their combination to insulin active preparation. *Z.Naturforsch.B* 18:1120-1121, 1963
25. **Rudich,A, Konrad,D, Torok,D, Ben Romano,R, Huang,C, Niu,W, Garg,RR, Wijesekara,N, Germinario,RJ, Bilan,PJ, Klip,A:** Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. *Diabetologia* 46:649-658, 2003
26. **Watson,RT, Khan,AH, Furukawa,M, Hou,JC, Li,L, Kanzaki,M, Okada,S, Kandror,KV, Pessin,JE:** Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *EMBO J* 23:2059-2070, 2004
27. **Zorzano,A, Palacin,M, Guma,A:** Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 183:43-58, 2005
28. **Kasuga,M, Hedo,JA, Yamada,KM, Kahn,CR:** The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor. *J Biol.Chem.* 257:10392-10399, 1982
29. **Ullrich,A, Schlessinger,J:** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212, 1990
30. **White,MF:** The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17, 1997
31. **White,MF:** The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol.Cell Biochem.* 182:3-11, 1998

32. **White,MF:** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 283:E413-E422, 2002
33. **Czech,MP, Corvera,S:** Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol.Chem.* 274:1865-1868, 1999
34. **Balaban,RS:** Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol.Cell Cardiol.* 34:1259-1271, 2002
35. **Wright,EM:** Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am.J Physiol Renal Physiol* 280:F10-F18, 2001
36. **Koepsell,H, Spangenberg,J:** Function and presumed molecular structure of Na(+)-D-glucose cotransport systems. *J Membr.Biol.* 138:1-11, 1994
37. **Mueckler,M:** Facilitative glucose transporters. *Eur.J Biochem.* 219:713-725, 1994
38. **Wood,IS, Trayhurn,P:** Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br.J Nutr.* 89:3-9, 2003
39. **Joost,HG, Thorens,B:** The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol.Membr.Biol.* 18:247-256, 2001
40. **Joost,HG, Bell,GI, Best,JD, Birnbaum,MJ, Charron,MJ, Chen,YT, Doege,H, James,DE, Lodish,HF, Moley,KH, Moley,JF, Mueckler,M, Rogers,S, Schurmann,A, Seino,S, Thorens,B:** Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 282:E974-E976, 2002
41. **Birnbaum,MJ, Haspel,HC, Rosen,OM:** Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5784-5788, 1986
42. **Fukumoto,H, Kayano,T, Buse,JB, Edwards,Y, Pilch,PF, Bell,GI, Seino,S:** Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol.Chem.* 264:7776-7779, 1989

43. **Mueckler,M, Caruso,C, Baldwin,SA, Panico,M, Blench,I, Morris,HR, Allard,WJ, Lienhard,GE, Lodish,HF:** Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945, 1985
44. **Burant,CF, Bell,GI:** Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31:10414-10420, 1992
45. **Doege,H, Bocianski,A, Scheepers,A, Axer,H, Eckel,J, Joost,HG, Schurmann,A:** Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem.J* 359:443-449, 2001
46. **DeFronzo,RA, Ferrannini,E, Sato,Y, Felig,P, Wahren,J:** Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin.Invest* 68:1468-1474, 1981
47. **Park,CR, Johnson,LH:** Effect of insulin on transport of glucose and galactose into cells of rat muscle and brain. *Am.J Physiol* 182:17-23, 1955
48. **James,DE, Strube,M, Mueckler,M:** Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338:83-87, 1989
49. **Cushman,SW, Wardzala,LJ:** Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol.Chem.* 255:4758-4762, 1980
50. **Suzuki,K, Kono,T:** Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77:2542-2545, 1980
51. **Furtado,LM, Somwar,R, Sweeney,G, Niu,W, Klip,A:** Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem.Cell Biol.* 80:569-578, 2002
52. **Li,SH, McNeill,JH:** In vivo effects of vanadium on GLUT4 translocation in cardiac tissue of STZ-diabetic rats. *Mol.Cell Biochem.* 217:121-129, 2001

53. **Satoh,S, Nishimura,H, Clark,AE, Kozka,IJ, Vannucci,SJ, Simpson,IA, Quon,MJ, Cushman,SW, Holman,GD:** Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J Biol.Chem.* 268:17820-17829, 1993
54. **Charron,MJ, Brosius,FC, III, Alper,SL, Lodish,HF:** A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2535-2539, 1989
55. **Kahn,BB, Rossetti,L, Lodish,HF, Charron,MJ:** Decreased in vivo glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. *J Clin.Invest* 87:2197-2206, 1991
56. **Marette,A, Richardson,JM, Ramlal,T, Balon,TW, Vranic,M, Pessin,JE, Klip,A:** Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am.J Physiol* 263:C443-C452, 1992
57. **Fischer,Y, Thomas,J, Sevilla,L, Munoz,P, Becker,C, Holman,G, Kozka,IJ, Palacin,M, Testar,X, Kammermeier,H, Zorzano,A:** Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol.Chem.* 272:7085-7092, 1997
58. **Block,NE, Menick,DR, Robinson,KA, Buse,MG:** Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin.Invest* 88:1546-1552, 1991
59. **Coderre,L, Kandrор,KV, Vallega,G, Pilch,PF:** Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. *J Biol.Chem.* 270:27584-27588, 1995
60. **Shao,J, Yamashita,H, Qiao,L, Friedman,JE:** Decreased Akt kinase activity and insulin resistance in C57BL/KsJ-Leprdb/db mice. *J Endocrinol.* 167:107-115, 2000
61. **Handberg,A, Vaag,A, Damsbo,P, Beck-Nielsen,H, Vinten,J:** Expression of insulin regulatable glucose transporters in skeletal muscle from type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33:625-627, 1990

62. **Pedersen,O, Bak,JF, Andersen,PH, Lund,S, Moller,DE, Flier,JS, Kahn,BB:** Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes* 39:865-870, 1990
63. **Friedman,JE, Sherman,WM, Reed,MJ, Elton,CW, Dohm,GL:** Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett.* 268:13-16, 1990
64. **Houmard,JA, Egan,PC, Neuffer,PD, Friedman,JE, Wheeler,WS, Israel,RG, Dohm,GL:** Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. *Am.J Physiol* 261:E437-E443, 1991
65. **Ren,JM, Semenkovich,CF, Gulve,EA, Gao,J, Holloszy,JO:** Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol.Chem.* 269:14396-14401, 1994
66. **McCarthy,AM, Spisak,KO, Brozinick,JT, Elmendorf,JS:** Loss of cortical actin filaments in insulin-resistant skeletal muscle cells impairs GLUT4 vesicle trafficking and glucose transport. *Am.J Physiol Cell Physiol* 291:C860-C868, 2006
67. **Emoto,M, Langille,SE, Czech,MP:** A role for kinesin in insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol.Chem.* 276:10677-10682, 2001
68. **Kanzaki,M, Pessin,JE:** Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *J Biol.Chem.* 276:42436-42444, 2001
69. **Tong,P, Khayat,ZA, Huang,C, Patel,N, Ueyama,A, Klip,A:** Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin.Invest* 108:371-381, 2001
70. **Etienne-Manneville,S, Hall,A:** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635, 2002
71. **Jeng,RL, Welch,MD:** Cytoskeleton: actin and endocytosis--no longer the weakest link. *Curr.Biol.* 11:R691-R694, 2001
72. **Kuhn,H, Thiele,BJ:** The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 449:7-11, 1999

73. **Kuhn,H, Saam,J, Eibach,S, Holzhutter,HG, Ivanov,I, Walther,M:** Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 338:93-101, 2005
74. **Ivanov,I, Heydeck,D, Hofheinz,K, Roffeis,J, O'Donnell,VB, Kuhn,H, Walther,M:** Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch.Biochem.Biophys.* 503:161-174, 2010
75. **Cohen,G, Riahi,Y, Sasson,S:** Lipid peroxidation of poly-unsaturated fatty acids in normal and obese adipose tissues. *Arch.Physiol Biochem.* 2011
76. **Oldham,ML, Brash,AR, Newcomer,ME:** Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality. *J Biol.Chem.* 280:39545-39552, 2005
77. **Busquets,M, Deroncele,V, Vidal-Mas,J, Rodriguez,E, Guerrero,A, Manresa,A:** Isolation and characterization of a lipoxygenase from *Pseudomonas* 42A2 responsible for the biotransformation of oleic acid into (S)-(E)-10-hydroxy-8-octadecenoic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* 85:129-139, 2004
78. **Zheng,Y, Boeglin,WE, Schneider,C, Brash,AR:** A 49-kDa mini-lipoxygenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 retains catalytically complete functionality. *J Biol.Chem.* 283:5138-5147, 2008
79. **Needleman,P, Turk,J, Jakschik,BA, Morrison,AR, Lefkowitz,JB:** Arachidonic acid metabolism. *Annu.Rev.Biochem.* 55:69-102, 1986
80. **Boyington,JC, Gaffney,BJ, Amzel,LM:** The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* 260:1482-1486, 1993
81. **Gillmor,SA, Villasenor,A, Fletterick,R, Sigal,E, Browner,MF:** The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat.Struct.Biol.* 4:1003-1009, 1997
82. **Steczko,J, Donoho,GP, Clemens,JC, Dixon,JE, Axelrod,B:** Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry* 31:4053-4057, 1992

83. **Conrad,DJ:** The arachidonate 12/15 lipoxygenases. A review of tissue expression and biologic function. *Clin.Rev.Allergy Immunol.* 17:71-89, 1999
84. **Vahsen,S, Rakowski,K, Ledwig,D, Dietze-Schroeder,D, Swifka,J, Sasson,S, Eckel,J:** Altered GLUT4 translocation in skeletal muscle of 12/15-lipoxygenase knockout mice. *Horm.Metab Res.* 38:391-396, 2006
85. **Kang,LT, Vanderhoek,JY:** Mono (S) hydroxy fatty acids: novel ligands for cytosolic actin. *J.Lipid Res.* 39:1476-1482, 1998
86. **Spector,AA, Gordon,JA, Moore,SA:** Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). *Prog.Lipid Res.* 27:271-323, 1988
87. **Kuhn,H, O'Donnell,VB:** Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog.Lipid Res.* 45:334-356, 2006
88. **Wen,Y, Gu,J, Chakrabarti,SK, Aylor,K, Marshall,J, Takahashi,Y, Yoshimoto,T, Nadler,JL:** The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Endocrinology* 148:1313-1322, 2007
89. **Sasson,S, Eckel,J:** Disparate effects of 12-lipoxygenase and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular endothelial and smooth muscle cells and in cardiomyocytes. *Arch.Physiol Biochem.* 112:119-129, 2006
90. **Dransfeld,O, Rakatzi,I, Sasson,S, Gruzman,A, Schmitt,M, Haussinger,D, Eckel,J:** Eicosanoids participate in the regulation of cardiac glucose transport by contribution to a rearrangement of actin cytoskeletal elements. *Biochem.J.* 359:47-54, 2001
91. **Dransfeld,O, Rakatzi,I, Sasson,S, Eckel,J:** Eicosanoids and the regulation of cardiac glucose transport. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 967:208-216, 2002
92. **Long,SD, Pekala,PH:** Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2. *J.Biol.Chem.* 271:1138-1144, 1996
93. **Tebbey,PW, McGowan,KM, Stephens,JM, Buttke,TM, Pekala,PH:** Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in

- 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA turnover. *J.Biol.Chem.* 269:639-644, 1994
94. **Assimacopoulos-Jeannet,F:** Fat storage in pancreas and in insulin-sensitive tissues in pathogenesis of type 2 diabetes. *Int J Obes.Relat Metab Disord.* 28 Suppl 4:S53-S57, 2004
95. **Belfort,R, Mandarino,L, Kashyap,S, Wirfel,K, Pratipanawatr,T, Berria,R, DeFronzo,RA, Cusi,K:** Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 54:1640-1648, 2005
96. **Hue,L, Taegtmeyer,H:** The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 297:E578-E591, 2009
97. **Randle,PJ, Garland,PB, Hales,CN, Newsholme,EA:** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789, 1963
98. **Alexander,CM, Landsman,PB, Grundy,SM:** Metabolic syndrome and hyperglycemia: congruence and divergence. *Am.J Cardiol.* 98:982-985, 2006
99. **Grundy,SM, Brewer,HB, Jr., Cleeman,JI, Smith,SC, Jr., Lenfant,C:** Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:e13-e18, 2004
100. **Despres,JP:** Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann.Med.* 38:52-63, 2006
101. **Bastard,JP, Maachi,M, Lagathu,C, Kim,MJ, Caron,M, Vidal,H, Capeau,J, Feve,B:** Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur.Cytokine Netw.* 17:4-12, 2006
102. **Kaptoge,S, White,IR, Thompson,SG, Wood,AM, Lewington,S, Lowe,GD, Danesh,J:** Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am.J Epidemiol.* 166:867-879, 2007

103. **Karelis,AD, Faraj,M, Bastard,JP, St Pierre,DH, Brochu,M, Prud'homme,D, Rabasa-Lhoret,R:** The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin.Endocrinol.Metab* 90:4145-4150, 2005
104. **Wellen,KE, Hotamisligil,GS:** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J.Clin.Invest* 112:1785-1788, 2003
105. **Xu,H, Barnes,GT, Yang,Q, Tan,G, Yang,D, Chou,CJ, Sole,J, Nichols,A, Ross,JS, Tartaglia,LA, Chen,H:** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J.Clin.Invest* 112:1821-1830, 2003
106. **Sacks,HS, Fain,JN:** Human epicardial adipose tissue: a review. *Am.Heart J.* 153:907-917, 2007
107. **Despres,JP, Pascot,A, Lemieux,I:** Risk factors associated with obesity: a metabolic perspective. *Ann.Endocrinol.* 61 Suppl 6:31-38, 2000
108. **Grundy,SM, Cleeman,JI, Daniels,SR, Donato,KA, Eckel,RH, Franklin,BA, Gordon,DJ, Krauss,RM, Savage,PJ, Smith,SC, Jr., Spertus,JA, Fernando,C:** Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw.Cardiol.* 4:198-203, 2005
109. **Ahima,RS, Flier,JS:** Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol.Metab* 11:327-332, 2000
110. **Fruhbeck,G:** The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr.Med.Chem.Cardiovasc.Hematol.Agents* 2:197-208, 2004
111. **Yudkin,JS, Eringa,E, Stehouwer,CD:** "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* 365:1817-1820, 2005
112. **Willis, RA.** The anatomic examination of the body of Thomas Par. In the works of William Harvey. 587-592. 1847. London, Sydenham Society.
113. **Bedford,E:** The story of fatty heart. A disease of Victorian times. *Br.Heart J.* 34:23-28, 1972

114. **Iacobellis,G, Corradi,D, Sharma,AM:** Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 2:536-543, 2005
115. **Iacobellis,G:** Imaging of visceral adipose tissue: an emerging diagnostic tool and therapeutic target. *Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.* 5:345-353, 2005
116. **Iacobellis,G, Pellicelli,AM, Sharma,AM, Grisorio,B, Barbarini,G, Barbaro,G:** Relation of subepicardial adipose tissue to carotid intima-media thickness in patients with human immunodeficiency virus. *Am.J.Cardiol.* 99:1470-1472, 2007
117. **Sacks,HS:** Weight loss in obesity reduces epicardial fat thickness; so what? *J Appl.Physiol* 106:1-2, 2009
118. **Rabkin,SW:** Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes.Rev.* 8:253-261, 2007
119. **Iacobellis,G, Ribaud,MC, Assael,F, Vecci,E, Tiberti,C, Zappaterreno,A, Di Mario,U, Leonetti,F:** Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88:5163-5168, 2003
120. **Uhlig,M, Passlack,W, Eckel,J:** Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol.Cell Endocrinol.* 235:1-9, 2005
121. **Berg,AH, Scherer,PE:** Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ.Res.* 96:939-949, 2005
122. **Laboratory animal welfare;** U.S. government principles for the utilization and care of vertebrate animals used in testing, research and training; notice. *Fed.Regist.* 50:20864-20865, 1985
123. **Loud,AV, Beghi,C, Olivetti,G, Anversa,P:** Morphometry of right and left ventricular myocardium after strenuous exercise in preconditioned rats. *Lab Invest* 51:104-111, 1984
124. **Rösen,P, Kiesel,U, Reinauer,H, Boy,C, Addicks,K:** Cardiopathy in the spontaneously diabetic (BB) rat. Evidence for microangiopathy and autonomic

125. **Tomanek,RJ, Searls,JC, Lachenbruch,PA:** Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circ.Res.* 51:295-304, 1982
126. **Brash,AR:** Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J.Biol.Chem.* 274:23679-23682, 1999
127. **Kim,YS, Xu,ZG, Reddy,MA, Li,SL, Lanting,L, Sharma,K, Adler,SG, Natarajan,R:** Novel interactions between TGF- β 1 actions and the 12/15-lipoxygenase pathway in mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* 16:352-362, 2005
128. **Neichi,T, Koshihara,Y, Murota,S:** Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim.Biophys.Acta* 753:130-132, 1983
129. **Uhlig,M, Passlack,W, Eckel,J:** Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol.Cell Endocrinol.* 235:1-9, 2005
130. **Totary-Jain,H, Naveh-Many,T, Riahi,Y, Kaiser,N, Eckel,J, Sasson,S:** Calreticulin destabilizes glucose transporter-1 mRNA in vascular endothelial and smooth muscle cells under high-glucose conditions. *Circ.Res.* 97:1001-1008, 2005
131. **Totary-Jain,H, Naveh-Many,T, Riahi,Y, Kaiser,N, Eckel,J, Sasson,S:** Calreticulin destabilizes glucose transporter-1 mRNA in vascular endothelial and smooth muscle cells under high-glucose conditions. *Circ.Res.* 97:1001-1008, 2005
132. **Alexander,CM, Landsman,PB, Grundy,SM:** Metabolic syndrome and hyperglycemia: congruence and divergence. *Am.J Cardiol.* 98:982-985, 2006
133. **Despres,JP:** Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann.Med.* 38:52-63, 2006
134. **Bastard,JP, Maachi,M, Lagathu,C, Kim,MJ, Caron,M, Vidal,H, Capeau,J, Feve,B:** Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur.Cytokine Netw.* 17:4-12, 2006

135. **Kaptoge,S, White,IR, Thompson,SG, Wood,AM, Lewington,S, Lowe,GD, Danesh,J:** Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am.J Epidemiol.* 166:867-879, 2007

136. **Karelis,AD, Faraj,M, Bastard,JP, St Pierre,DH, Brochu,M, Prud'homme,D, Rabasa-Lhoret,R:** The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin.Endocrinol.Metab* 90:4145-4150, 2005

137. **Wellen,KE, Hotamisligil,GS:** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J.Clin.Invest* 112:1785-1788, 2003

138. **Heise,T, Heinemann,L, Starke,AA:** Simulated postaggression metabolism in healthy subjects: metabolic changes and insulin resistance. *Metabolism* 47:1263-1268, 1998

139. **Kozak,W, Kluger,MJ, Tesfaigzi,J, Kozak,A, Mayfield,KP, Wachulec,M, Dokladny,K:** Molecular mechanisms of fever and endogenous antipyresis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 917:121-134, 2000

140. **Vane,JR:** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat.New Biol.* 231:232-235, 1971

141. **Michalik,L, Auwerx,J, Berger,JP, Chatterjee,VK, Glass,CK, Gonzalez,FJ, Grimaldi,PA, Kadowaki,T, Lazar,MA, O'Rahilly,S, Palmer,CN, Plutzky,J, Reddy,JK, Spiegelman,BM, Staels,B, Wahli,W:** International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol.Rev.* 58:726-741, 2006

142. **Berger,J, Moller,DE:** The mechanisms of action of PPARs. *Annu.Rev.Med.* 53:409-435, 2002

143. **Feige,JN, Gelman,L, Michalik,L, Desvergne,B, Wahli,W:** From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog.Lipid Res.* 45:120-159, 2006

144. **Celi,FS, Shuldiner,AR:** The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and obesity. *Curr.Diab.Rep.* 2:179-185, 2002

145. **Kramer,DK, Al Khalili,L, Perrini,S, Skogsberg,J, Wretenberg,P, Kannisto,K, Wallberg-Henriksson,H, Ehrenborg,E, Zierath,JR, Krook,A:** Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Diabetes* 54:1157-1163, 2005
146. **Saini,Y, Greenwood,KK, Merrill,C, Kim,KY, Patial,S, Parameswaran,N, Harkema,JR, LaPres,JJ:** Acute cobalt-induced lung injury and the role of hypoxia-inducible factor 1alpha in modulating inflammation. *Toxicol.Sci.* 116:673-681, 2010
147. **Rabkin,SW:** Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes.Rev.* 8:253-261, 2007
148. **Sacks,HS, Fain,JN:** Human epicardial adipose tissue: a review. *Am.Heart J.* 153:907-917, 2007
149. **Gomes,F, Telo,DF, Souza,HP, Nicolau,JC, Halpern,A, Serrano,CV, Jr.:** Obesity and coronary artery disease: role of vascular inflammation. *Arq Bras.Cardiol.* 94:255-9, 260, 2010
150. **Marchington,JM, Mattacks,CA, Pond,CM:** Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp Biochem.Physiol B* 94:225-232, 1989
151. **Shin,SY, Yong,HS, Lim,HE, Na,JO, Choi,CU, Choi,JI, Kim,SH, Kim,JW, Kim,EJ, Park,SW, Rha,SW, Park,CG, Seo,HS, Oh,DJ, Kim,YH:** Total and Interatrial Epicardial Adipose Tissues Are Independently Associated With Left Atrial Remodeling in Patients With Atrial Fibrillation. *J Cardiovasc.Electrophysiol.* 2011
152. **Gaspar,L, Poliak,P, Makovnik,M, Hlinst'akova,S, Krahulec,B, Piskova,T, Bendzala,M:** Obesity and arterial hypertension. *Vnitr.Lek.* 56:1074-1077, 2010
153. **Jaworski,K, Sarkadi-Nagy,E, Duncan,RE, Ahmadian,M, Sul,HS:** Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 293:G1-G4, 2007

154. **Wu,Z, Xie,Y, Morrison,RF, Bucher,NL, Farmer,SR:** PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin.Invest* 101:22-32, 1998

155. **Berkova,M, Berka,Z:** Obesity, body mass index, waist circumference and mortality. *Vnitr.Lek.* 57:85-91, 2011

156. **Dabek,J, Kulach,A, Monastyrska-Cup,B, Gasior,Z:** Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine'. *Pharmacol.Rep.* 58:799-805, 2006

157. **Liao,XH, Wang,N, Liu,QX, Qin,T, Cao,B, Cao,DS, Zhang,TC:** Myocardin-related transcription factor-A induces cardiomyocyte hypertrophy. *IUBMB.Life* 63:54-61, 2011

158. **Bobik,A:** Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1712-1720, 2006

159. **Grainger,DJ:** Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24:399-404, 2004

160. **Chen,S, Hong,SW, Iglesias-de la Cruz MC, Isono,M, Casaretto,A, Ziyadeh,FN:** The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Ren Fail.* 23:471-481, 2001

161. **Mehta,JL, Yang,BC, Strates,BS, Mehta,P:** Role of TGF-beta1 in platelet-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion in isolated rat hearts. *Growth Factors* 16:179-190, 1999

162. **Hashimoto,O, Funaba,M:** Activin in glucose metabolism. *Vitam.Horm.* 85:217-234, 2011

163. **Uhlig,M, Passlack,W, Eckel,J:** Functional role of Rab11 in GLUT4 trafficking in cardiomyocytes. *Mol.Cell Endocrinol.* 235:1-9, 2005

164. **Chen,M, Yang,ZD, Smith,KM, Carter,JD, Nadler,JL:** Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity. *Diabetologia* 48:486-495, 2005

165. **Totary-Jain,H, Naveh-Many,T, Riahi,Y, Kaiser,N, Eckel,J, Sasson,S:** Calreticulin destabilizes glucose transporter-1 mRNA in vascular endothelial and smooth muscle cells under high-glucose conditions. *Circ.Res.* 97:1001-1008, 2005
166. **Inoki,K, Haneda,M, Maeda,S, Koya,D, Kikkawa,R:** TGF-beta 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 55:1704-1712, 1999
167. **Ricci,C, Iacobini,C, Oddi,G, Amadio,L, Menini,S, Rastaldi,MP, Frasheri,A, Pricci,F, Pugliese,F, Pugliese,G:** Role of TGF-beta/GLUT1 axis in susceptibility vs resistance to diabetic glomerulopathy in the Milan rat model. *Nephrol.Dial.Transplant.* 21:1514-1524, 2006
168. **Sell,H, Dietze-Schroeder,D, Eckel,J:** The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol.Metab* 17:416-422, 2006
169. **Groneberg,DA, Witt,H, Adcock,IM, Hansen,G, Springer,J:** Smads as intracellular mediators of airway inflammation. *Exp.Lung Res.* 30:223-250, 2004
170. **Watkins,SJ, Jonker,L, Arthur,HM:** A direct interaction between TGFbeta activated kinase 1 and the TGFbeta type II receptor: implications for TGFbeta signalling and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc.Res.* 69:432-439, 2006
171. **Shi,Y, Massague,J:** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700, 2003
172. **Dandapat,A, Hu,CP, Li,D, Liu,Y, Chen,H, Hermonat,PL, Mehta,JL:** Overexpression of TGFbeta1 by adeno-associated virus type-2 vector protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Gene Ther.* 15:415-423, 2008
173. **Swifka,J, Weiss,J, Addicks,K, Eckel,J, Rosen,P:** Epicardial Fat from Guinea Pig: A Model to Study the Paracrine Network of Interactions between Epicardial Fat and Myocardium? *Cardiovasc.Drugs Ther.* 2008
174. **Wellen,KE, Hotamisligil,GS:** Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J.Clin.Invest* 112:1785-1788, 2003
175. **Baker,AR, Silva,NF, Quinn,DW, Harte,AL, Pagano,D, Bonser,RS, Kumar,S, McTernan,PG:** Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile

- of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc.Diabetol.* 5:1, 2006
176. **Iacobellis,G, Pistilli,D, Gucciardo,M, Leonetti,F, Miraldi,F, Brancaccio,G, Gallo,P, di Gioia,CR:** Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 29:251-255, 2005
177. **Mazurek,T, Zhang,L, Zalewski,A, Mannion,JD, Diehl,JT, Arafat,H, Sarov-Blat,L, O'Brien,S, Keiper,EA, Johnson,AG, Martin,J, Goldstein,BJ, Shi,Y:** Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108:2460-2466, 2003
178. **Chess,DJ, Stanley,WC:** Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc.Res.* 79:269-278, 2008
179. **Poirier,P, Giles,TD, Bray,GA, Hong,Y, Stern,JS, Pi-Sunyer,FX, Eckel,RH:** Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 113:898-918, 2006
180. **Sethi,JK, Vidal-Puig,AJ: Thematic review series:** adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 48:1253-1262, 2007
181. **Bastard,JP, Maachi,M, Lagathu,C, Kim,MJ, Caron,M, Vidal,H, Capeau,J, Feve,B:** Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur.Cytokine Netw.* 17:4-12, 2006
182. **Kaptoge,S, White,IR, Thompson,SG, Wood,AM, Lewington,S, Lowe,GD, Danesh,J:** Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration. *Am.J Epidemiol.* 166:867-879, 2007
183. **Karelis,AD, Faraj,M, Bastard,JP, St Pierre,DH, Brochu,M, Prud'homme,D, Rabasa-Lhoret,R:** The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin.Endocrinol.Metab* 90:4145-4150, 2005

184. **Bettencourt,N, Toschke,AM, Leite,D, Rocha,J, Carvalho,M, Sampaio,F, Xara,S, Leite-Moreira,A, Nagel,E, Gama,V:** Epicardial adipose tissue is an independent predictor of coronary atherosclerotic burden. *Int J Cardiol.* 2011

185. **Park,JS, Ahn,SG, Hwang,JW, Lim,HS, Choi,BJ, Choi,SY, Yoon,MH, Hwang,GS, Tahk,SJ, Shin,JH:** Impact of body mass index on the relationship of epicardial adipose tissue to metabolic syndrome and coronary artery disease in an Asian population. *Cardiovasc.Diabetol.* 9:29, 2010

186. **Eiras,S, Teijeira-Fernandez,E, Salgado-Somoza,A, Couso,E, Garcia-Caballero,T, Sierra,J, Juanatey,JR:** Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression. *Cytokine* 51:207-212, 2010

187. **Iacobellis,G, Barbaro,G:** The double role of epicardial adipose tissue as pro- and anti-inflammatory organ. *Horm.Metab Res.* 40:442-445, 2008

188. **Karastergiou,K, Evans,I, Ogston,N, Miheisi,N, Nair,D, Kaski,JC, Jahangiri,M, Mohamed-Ali,V:** Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 30:1340-1346, 2010

189. **Figler,RA, Wang,G, Srinivasan,S, Jung,DY, Zhang,Z, Pankow,JS, Ravid,K, Fredholm,B, Hedrick,CC, Rich,SS, Kim,JK, LaNoue,KF, Linden,J:** Links between insulin resistance, adenosine A2B receptors, and inflammatory markers in mice and humans. *Diabetes* 60:669-679, 2011

190. **Fain,JN:** Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam.Horm.* 74:443-477, 2006

191. **Madani,R, Karastergiou,K, Ogston,NC, Miheisi,N, Bhome,R, Haloob,N, Tan,GD, Karpe,F, Malone-Lee,J, Hashemi,M, Jahangiri,M, Mohamed-Ali,V:** RANTES release by human adipose tissue in vivo and evidence for depot-specific differences. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 296:E1262-E1268, 2009

192. **Dutour,A, Achard,V, Sell,H, Naour,N, Collart,F, Gaborit,B, Silaghi,A, Eckel,J, Alessi,MC, Henegar,C, Clement,K:** Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease. *J Clin.Endocrinol.Metab* 95:963-967, 2010

193. **Shimokawa,H, Ito,A, Fukumoto,Y, Kadokami,T, Nakaike,R, Sakata,M, Takayanagi,T, Egashira,K, Takeshita,A:** Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin.Invest* 97:769-776, 1996

194. **Pyrzak,B, Ruminska,M, Popko,K, Demkow,U:** Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome in children and adolescents. *Eur.J Med.Res.* 15 Suppl 2:147-151, 2010

195. **Heather,LC, Clarke,K:** Metabolism, hypoxia and the diabetic heart. *J Mol.Cell Cardiol.* 50:598-605, 2011

196. **Oliver,E, McGillicuddy,F, Phillips,C, Toomey,S, Roche,HM:** The role of inflammation and macrophage accumulation in the development of obesity-induced type 2 diabetes mellitus and the possible therapeutic effects of long-chain n-3 PUFA. *Proc.Nutr.Soc.* 69:232-243, 2010

197. **Graham,TE, Kahn,BB:** Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm.Metab Res.* 39:717-721, 2007

198. **Shepherd,PR, Gnudi,L, Tozzo,E, Yang,H, Leach,F, Kahn,BB:** Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol.Chem.* 268:22243-22246, 1993

199. **Im,SS, Kwon,SK, Kim,TH, Kim,HI, Ahn,YH:** Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB.Life* 59:134-145, 2007

200. **Schmidt,MV, Brune,B, von Knethen,A:** The nuclear hormone receptor PPARgamma as a therapeutic target in major diseases. *ScientificWorldJournal.* 10:2181-2197, 2010

201. **Clement,K, Basdevant,A, Dutour,A:** Weight of pericardial fat on coronaropathy. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 29:615-616, 2009

202. **Greif,M, Becker,A, von Ziegler,F, Lebherz,C, Lehrke,M, Broedl,UC, Tittus,J, Parhofer,K, Becker,C, Reiser,M, Knez,A, Leber,AW:** Pericardial adipose tissue determined by dual source CT is a risk factor for coronary atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 29:781-786, 2009

203. **Silaghi,A, Piercecchi-Marti,MD, Grino,M, Leonetti,G, Alessi,MC, Clement,K, Dadoun,F, Dutour,A:** Epicardial adipose tissue extent: relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy. *Obesity.(Silver.Spring)* 16:2424-2430, 2008
204. **Zhang,X, Lam,KS, Ye,H, Chung,SK, Zhou,M, Wang,Y, Xu,A:** Adipose tissue-specific inhibition of hypoxia-inducible factor 1{alpha} induces obesity and glucose intolerance by impeding energy expenditure in mice. *J Biol.Chem.* 285:32869-32877, 2010
205. **Kankaanpaa,M, Lehto,HR, Parkka,JP, Komu,M, Viljanen,A, Ferrannini,E, Knuuti,J, Nuutila,P, Parkkola,R, Iozzo,P:** Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 91:4689-4695, 2006
206. **Sharma,AM, Chetty,VT:** Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol.* 42 Suppl 1:S3-S8, 2005
207. **Taegtmeyer,H, McNulty,P, Young,ME:** Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation* 105:1727-1733, 2002
208. **Young,ME, McNulty,P, Taegtmeyer,H:** Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. *Circulation* 105:1861-1870, 2002
209. **Zhou,YT, Grayburn,P, Karim,A, Shimabukuro,M, Higa,M, Baetens,D, Orci,L, Unger,RH:** Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:1784-1789, 2000
210. **Iacobellis,G, Ribaud,MC, Zappaterreno,A, Vecci,E, Tiberti,C, Di Mario,U, Leonetti,F:** Relationship of insulin sensitivity and left ventricular mass in uncomplicated obesity. *Obes.Res.* 11:518-524, 2003
211. **Iacobellis,G, Ribaud,MC, Zappaterreno,A, Iannucci,CV, Leonetti,F:** Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *Am.J.Cardiol.* 94:1084-1087, 2004
212. **Iacobellis,G, Leonetti,F:** Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 90:6300-6302, 2005

213. **Basso,C, Thiene,G:** Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Just a matter of fat? *Cardiovasc.Pathol.* 14:37-41, 2005
214. **Iacobellis, G., Leonetti, F., and Singh, N.:** Relationship of epicardial adipose tissue with atrial dimensions and diastolic function in morbidly obese subjects. *Int J Cardiol.* 15, 272-273. 2006.
215. **Iacobellis,G, Sharma,AM, Pellicelli,AM, Grisorio,B, Barbarini,G, Barbaro,G:** Epicardial adipose tissue is related to carotid intima-media thickness and visceral adiposity in HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome. *Curr.HIV.Res.* 5:275-279, 2007
216. **Marchington,JM, Mattacks,CA, Pond,CM:** Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp Biochem.Physiol B* 94:225-232, 1989
217. **Dietze,D, Koenen,M, Rohrig,K, Horikoshi,H, Hauner,H, Eckel,J:** Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes* 51:2369-2376, 2002
218. **Gabella, G.:** Cardiovascular system. In Gray's Anatomy 38th edn , 1445. 1995.
219. **Tansey,DK, Aly,Z, Sheppard,MN:** Fat in the right ventricle of the normal heart. *Histopathology* 46:98-104, 2005
220. **Grimble,RF:** Genotypic influences on metabolic alterations during inflammation and the nutritional outcome. *Nestle.Nutr.Workshop Ser.Clin.Perform.Programme.* 7:1-13, 2002
221. **Grimble,RF:** Inflammatory status and insulin resistance. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 5:551-559, 2002
222. **Hotamisligil,GS, Spiegelman,BM:** Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43:1271-1278, 1994

-
223. **Nguyen-Duy,TB, Nichaman,MZ, Church,TS, Blair,SN, Ross,R:** Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 284:E1065-E1071, 2003
224. **Scherer, P. E. :** Adipose tissue:from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55, 1537-1545. 2006.
225. **Galili,O, Versari,D, Sattler,KJ, Olson,ML, Mannheim,D, McConnell,JP, Chade,AR, Lerman,LO, Lerman,A:** Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 292:H904-H911, 2007
226. **Ouwens,DM, Boer,C, Fodor,M, de Galan,P, Heine,RJ, Maassen,JA, Diamant,M:** Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* 48:1229-1237, 2005
227. **Ouwens,DM, Diamant,M, Fodor,M, Habets,DD, Pelsers,MM, El Hasnaoui,M, Dang,ZC, van den Brom,CE, Vlasblom,R, Rietdijk,A, Boer,C, Coort,SL, Glatz,JF, Luiken,JJ:** Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia* 50:1938-1948, 2007
228. **Greulich,S, De Wiza,DH, Preilowksi,S, Ding,Z, Mueller,H, Langin,D, Jaquet,K, Ouwens,DM, Eckel,J:** Secretory products of guinea pig epicardial fat induce insulin resistance and impair primary adult rat cardiomyocyte function. *J Cell Mol.Med.* 2010
229. **Leite,JO, DeOgburn,R, Ratliff,JC, Su,R, Volek,JS, McGrane,MM, Dardik,A, Fernandez,ML:** Low-carbohydrate diet disrupts the association between insulin resistance and weight gain. *Metabolism* 58:1116-1122, 2009
230. **Hu,FB, Manson,JE, Willett,WC:** Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *J Am.Coll.Nutr.* 20:5-19, 2001
231. **Roberts,SB:** High-glycemic index foods, hunger, and obesity: is there a connection? *Nutr.Rev.* 58:163-169, 2000
232. **Reaven,GM:** Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607, 1988
233. **Chabot,V:** [Syndrome "X"]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 82:858-863, 1993

234. **Kosmala,W, O'Moore-Sullivan,T, Plaksej,R, Przewlocka-Kosmala,M, Marwick,TH:** Improvement of left ventricular function by lifestyle intervention in obesity: contributions of weight loss and reduced insulin resistance. *Diabetologia* 52:2306-2316, 2009
235. **Pavlic-Renar,I, Poljicanin,T, Metelko,Z:** [Metabolic syndrome: what, why, how and who?]. *Acta Med.Croatica* 61:335-337, 2007
236. **Klein,S, Sheard,NF, Pi-Sunyer,X, Daly,A, Wylie-Rosett,J, Kulkarni,K, Clark,NG:** Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies. A statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition. *Am.J Clin.Nutr.* 80:257-263, 2004
237. **De Luis,DA, Gonzalez,SM, Conde,R, Aller,R, Izaola,O, Castro,MJ, Romero,E:** Lack of effect of a moderate hypocaloric diet on visfatin levels in morbid obese patients: relationship with insulin resistance. *Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci.* 14:1031-1036, 2010
238. **Tesauro,M, Canale,MP, Rodia,G, Di Daniele,N, Lauro,D, Scuteri,A, Cardillo,C:** Metabolic syndrome, chronic kidney, and cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiol.Res.Pract.* 2011:653182, 2011
239. **Diamant,M, Lamb,HJ, Groeneveld,Y, Endert,EL, Smit,JW, Bax,JJ, Romijn,JA, de Roos,A, Radder,JK:** Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *J Am.Coll.Cardiol.* 42:328-335, 2003
240. **Vanninen,E, Mustonen,J, Vainio,P, Lansimies,E, Uusitupa,M:** Left ventricular function and dimensions in newly diagnosed non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am.J Cardiol.* 70:371-378, 1992
241. **Micic,D, Polovina,S:** Obesity and coronary heart disease: the mechanism of atherogenic impact. *Med.Pregl.* 62 Suppl 3:43-46, 2009
242. **Vijay-Kumar,M, Vanegas,SM, Patel,N, Aitken,JD, Ziegler,TR, Ganji,V:** Fish oil rich diet in comparison to saturated fat rich diet offered protection against

- lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in mice. *Nutr.Metab (Lond)* 8:16, 2011
243. **Dandona,P, Aljada,A, Bandyopadhyay,A:** Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25:4-7, 2004
244. **Ghanim,H, Aljada,A, Hofmeyer,D, Syed,T, Mohanty,P, Dandona,P:** Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 110:1564-1571, 2004
245. **Roche,HM:** Dietary lipids and gene expression. *Biochem.Soc.Trans.* 32:999-1002, 2004
246. **Willett,WC:** Overview and perspective in human nutrition. *Asia Pac.J Clin.Nutr.* 17 Suppl 1:1-4, 2008
247. **Hu,FB, Stampfer,MJ, Manson,JE, Rimm,E, Colditz,GA, Rosner,BA, Hennekens,CH, Willett,WC:** Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N.Engl.J Med.* 337:1491-1499, 1997
248. **Kushi,LH, Lew,RA, Stare,FJ, Ellison,CR, el Lozy,M, Bourke,G, Daly,L, Graham,I, Hickey,N, Mulcahy,R, .:** Diet and 20-year mortality from coronary heart disease. The Ireland-Boston Diet-Heart Study. *N.Engl.J Med.* 312:811-818, 1985
249. **McGee,DL, Reed,DM, Yano,K, Kagan,A, Tillotson,J:** Ten-year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program. Relationship to nutrient intake. *Am.J Epidemiol.* 119:667-676, 1984
250. **Shekelle,RB, Shryock,AM, Paul,O, Lepper,M, Stamler,J, Liu,S, Raynor,WJ, Jr.:** Diet, serum cholesterol, and death from coronary heart disease. The Western Electric study. *N.Engl.J Med.* 304:65-70, 1981
251. **Yan,J, Young,ME, Cui,L, Lopaschuk,GD, Liao,R, Tian,R:** Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. *Circulation* 119:2818-2828, 2009
252. **Stepien,M, Gaudichon,C, Fromentin,G, Even,P, Tome,D, Azzout-Marniche,D:** Increasing protein at the expense of carbohydrate in the diet down-regulates glucose utilization as glucose sparing effect in rats. *PLoS.One.* 6:e14664, 2011

253. **Zhang,L, Keung,W, Samokhvalov,V, Wang,W, Lopaschuk,GD:** Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim.Biophys.Acta* 1801:1-22, 2010
254. **Poudyal,H, Campbell,F, Brown,L:** Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr.* 140:946-953, 2010
255. **Iyer,A, Fairlie,DP, Prins,JB, Hammock,BD, Brown,L:** Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. *Nat.Rev.Endocrinol.* 6:71-82, 2010
256. **Panchal,SK, Poudyal,H, Iyer,A, Nazer,R, Alam,A, Diwan,V, Kauter,K, Sernia,C, Campbell,F, Ward,L, Gobe,G, Fenning,A, Brown,L:** High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 57:51-64, 2011
257. **Tarquini,R, Lazzeri,C, Pala,L, Rotella,CM, Gensini,GF:** The diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetol.* 2010
258. **Van Gaal,LF, Mertens,IL, De Block,CE:** Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-880, 2006
259. **Wang,CY, Chau,LY:** Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Chang Gung.Med.J* 33:13-24, 2010
260. **Agarwal,AK, Garg,A:** Genetic disorders of adipose tissue development, differentiation, and death. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 7:175-199, 2006
261. **Fiorenza,CG, Chou,SH, Mantzoros,CS:** Lipodystrophy: pathophysiology and advances in treatment. *Nat.Rev.Endocrinol.* 7:137-150, 2011
262. **Hecker,PA, O'Shea,KM, Galvao,TF, Brown,BH, Stanley,WC:** Role of adiponectin in the development of high fat diet-induced metabolic abnormalities in mice. *Horm.Metab Res.* 43:100-105, 2011
263. **Menard,SL, Croteau,E, Sarrhini,O, Gelinas,R, Brassard,P, Ouellet,R, Bentourkia,M, van Lier,JE, Des,RC, Lecomte,R, Carpentier,AC:** Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 298:E1049-E1057, 2010

264. **Amin,KA, Kamel,HH, Abd Eltawab,MA:** Protective effect of Garcinia against renal oxidative stress and biomarkers induced by high fat and sucrose diet. *Lipids Health Dis.* 10:6, 2011
265. **Alvarez-Guardia,D, Palomer,X, Coll,T, Serrano,L, Rodriguez-Calvo,R, Davidson,MM, Merlos,M, El,K, I, Michalik,L, Wahli,W, Vazquez-Carrera,M:** PPARbeta/delta activation blocks lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1811:59-67, 2011
266. **Fang,ZY, Prins,JB, Marwick,TH:** Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr.Rev.* 25:543-567, 2004
267. **Wang,S, Kamat,A, Pergola,P, Swamy,A, Tio,F, Cusi,K:** Metabolic factors in the development of hepatic steatosis and altered mitochondrial gene expression in vivo. *Metabolism* 2011
268. **Derdemezis,CS, Filippatos,TD, Voulgari,PV, Tselepis,AD, Drosos,AA, Kiortsis,DN:** Leptin and adiponectin levels in patients with ankylosing spondylitis. The effect of infliximab treatment. *Clin.Exp.Rheumatol.* 28:880-883, 2010
269. **Cui,J, Panse,S, Falkner,B:** The role of adiponectin in metabolic and vascular disease: a review. *Clin.Nephrol.* 75:26-33, 2011
270. **Qiao,L, Lee,B, Kinney,B, Yoo,HS, Shao,J:** Energy Intake and Adiponectin Gene Expression. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 2011
271. **Barnea,M, Shamay,A, Stark,AH, Madar,Z:** A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. *Obesity.(Silver.Spring)* 14:2145-2153, 2006
272. **Duval,C, Thissen,U, Keshtkar,S, Accart,B, Stienstra,R, Boekschoten,MV, Roskams,T, Kersten,S, Muller,M:** Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes* 59:3181-3191, 2010
273. **Naderali,EK, Estadella,D, Rocha,M, Pickavance,LC, Fatani,S, Denis,RG, Williams,G:** A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin.Sci.(Lond)* 105:403-408, 2003

274. **Lo,MM, Mitsnefes,M:** Adiponectin, cardiovascular disease, chronic kidney disease: emerging data on complex interactions. *Pediatr.Nephrol.* 2011
275. **Lau,W, Tao,L, Wang,Y, Li,R, Ma,XL:** Systemic Adiponectin Malfunction as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *Antioxid.Redox.Signal.* 2010
276. **Ezaki,O:** Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 241:1-6, 1997
277. **Petersen,KF, Shulman,GI:** Etiology of insulin resistance. *Am.J Med.* 119:S10-S16, 2006
278. **Porto,LC, Savergnini,SS, de Castro,CH, Mario,EG, Ferreira,AV, Santos,SH, Andrade,SP, Santos,RA, de Almeida,AP, Botion,LM:** Carbohydrate-enriched diet impairs cardiac performance by decreasing the utilization of fatty acid and glucose. *Ther.Adv.Cardiovasc.Dis.* 5:11-22, 2011
279. **Brandt,N, De Bock,K, Richter,EA, Hespel,P:** Cafeteria diet-induced insulin resistance is not associated with decreased insulin signaling or AMPK activity and is alleviated by physical training in rats. *Am.J Physiol Endocrinol.Metab* 299:E215-E224, 2010
280. **van den Brom,CE, Huisman,MC, Vlasblom,R, Boontje,NM, Duijst,S, Lubberink,M, Molthoff,CF, Lammertsma,AA, van,d, V, Boer,C, Ouwens,DM, Diamant,M:** Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovasc.Diabetol.* 8:39, 2009
281. **Demers,A, Rodrigue-Way,A, Tremblay,A:** Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR.Res.* 2008:364784, 2008
282. **Peters,JM, Hollingshead,HE, Gonzalez,FJ:** Role of peroxisome-proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) in gastrointestinal tract function and disease. *Clin.Sci.(Lond)* 115:107-127, 2008
283. **Kubota,N, Terauchi,Y, Miki,H, Tamemoto,H, Yamauchi,T, Komeda,K, Satoh,S, Nakano,R, Ishii,C, Sugiyama,T, Eto,K, Tsubamoto,Y, Okuno,A, Murakami,K, Sekihara,H, Hasegawa,G, Naito,M, Toyoshima,Y, Tanaka,S, Shiota,K, Kitamura,T, Fujita,T, Ezaki,O, Aizawa,S, Kadowaki,T, .:** PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol.Cell* 4:597-609, 1999

284. **Cabrero,A, Laguna,JC, Vazquez,M:** Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* 1:243-248, 2002

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Janine Swifka
Geburtsdatum	20.03.1978
Geburtsort	Leverkusen
Staatsangehörigkeit	deutsch

Universitäre Ausbildung

Studium der Biologie	Oktober 1997 - September 2003
Universität zu Köln	

Diplomarbeit

Molekulare Neurophysiologie	September 2003 - September 2004
AG Prof. Dr. Dr. Wilhelm Stoffel	

Thema: Erstellung, molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung des Steaoryl - CoA - Desaturase 3 defizienten Mausmodells.

Schulbildung

Grundschule Eikamp	August 1984 – Juli 1988
Dietrich Bonhoeffer Gymnasium	August 1988 – Juni 1997
Bergisch Gladbach	(Abschluss Abitur)