

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

**Veränderungen im Metabolismus und Inflammation der Leber unter  
Herzinsuffizienz in kardiomyozytenspezifischen p38MAP Kinase KO  
Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Jana Maria Nemmer

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachterin: PD Dr. Julia Reifenberger

*Für meine Mutter*

## Zusammenfassung

Herzinsuffizienz als eine der häufigsten internistischen Erkrankungen ist trotz therapeutischer Beeinflussung neuroendokriner Signalwege mit einer deutlich erhöhten Mortalität sowie Morbidität der Patienten vergesellschaftet. Dabei wird diese sowohl durch neuroendokrine Signale, als auch durch Veränderungen in Inflammation und Metabolismus charakterisiert und beeinflusst als systemische Erkrankung andere Organe. Nun stellt sich die Frage, inwiefern die Genexpression in der Leber als zentrales Stoffwechselorgan von der Herzinsuffizienz betroffen ist. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit in einem Mausmodell analysiert, inwiefern es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer ‚Interorgankommunikation‘ im Sinne eines kardiiohepatischen Syndroms kommt.

Um das Zusammenspiel des Herzens und der Leber zu untersuchen wurde ein Mausmodell mit einem Tamoxifen-induzierbaren kardiomyozytenspezifischen KO der Proteinkinase p38MAPK $\alpha$  (iCMp38MAPK $\alpha$  KO) verwendet. Dabei wurde die Linksherzinsuffizienz innerhalb von 48h durch die Gabe von Angiotensin II erzeugt. Es stellte sich rasch eine stark eingeschränkte systolische Pumpfunktion und eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels sowie histologisch eine Lipidakkumulation und Infiltration von neutrophilen Granulozyten dar (Bottermann et al.). Darüber hinaus zeigte sich in früheren Arbeiten, dass eine Interaktion zwischen Herzen und Skelettmuskel mit einer Zunahme von pro-inflammatorischen Signalen und einem atrophischen Genexpressionsprogramm einhergeht (Leitner et al.).

In dieser Arbeit wurde trotz ausgeprägter kardialer Dysfunktion der iCMp38MAPK $\alpha$  KO Mäuse nach 48h AngII Behandlung in der Leber nur geringe Unterschiede hinsichtlich inflammatorischer Signale und Stoffwechselveränderungen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Eine Microarray-Analyse ergab jedoch 2194 unterschiedlich exprimierte hepatische Transkripte ( $p < 0,05$ ) in einem Vergleich von Kontrolle und iCMp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII Behandlung. Unter den am stärksten betroffenen Stoffwechselwegen (*Ingenuity Pathway Analysis*) waren inflammatorische und wichtige Stoffwechselwege nur geringfügig vertreten, welches sich durch die Ergebnisse der rt-PCR für ausgewählte Transkripte bestätigen ließ. Die 12 am stärksten veränderten Signalwege umfassten Wege des Tryptophan-, Nikotin- und Melatoninabbaus. Allerdings war nur ein geringer Teil der Gene dieser Stoffwechselwege betroffen und es gab keinen eindeutigen Hinweis auf eine Aktivierung oder Hemmung.

Aufgrund der ektopischen Lipidakkumulation im Herzen, die vermutlich aus der Lipolyse des Fettgewebes bereitgestellt wird, wurde die Lipolyse mit Acipimox gehemmt. Diese Behandlung in Kombination mit der durch 48h AngII-induzierten Herzinsuffizienz führte zu einer signifikanten Hochregulation von Transkripten, die an inflammatorischen Signalen, Gluconeogenese und Glykogenabbau beteiligt sind sowie zu einer reduzierten Expression von Genen, die in die Fettsäuresynthese involviert sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zum Skelettmuskel, der eine deutliche Aktivierung eines atrophischen Genexpressionsprogramms in einem frühen Stadium der Entwicklung der Herzinsuffizienz zeigt, Veränderungen in der hepatischen Genexpression zu diesem Zeitpunkt geringer ausgeprägt sind. Wenn jedoch die Lipolyse gehemmt wird, verändert sich die Interorgankommunikation zwischen der Herzinsuffizienz und der Leber hinsichtlich des Stoffwechsel und der inflammatorischen Antwort.

## Summary

Heart failure as one of the most common internal diseases is associated with a significantly increased morbidity and mortality of patients. Heart failure is characterized by elevated neuroendocrine signals as well as by changes in cardiac inflammation and metabolism. However, heart failure is not an isolated disease of the heart, but rather a systemic disease as the failing heart also affects the function of remote organs. This raises the question to what extent gene expression in the liver as the central metabolic organ is affected by heart failure. Accordingly, this thesis analyses in a mouse model if cardiac insufficiency leads to 'interorgan communication' in the sense of a cardiohepatic syndrome.

As heart failure model a tamoxifen inducible cardiomyocyte-specific KO of the protein kinase p38MAPK $\alpha$  (iCMp38MAPK $\alpha$  KO) was used to investigate the interaction of the heart and the liver. In these mice a left heart failure was induced was generated within 48h by the administration of Angiotensin II. A highly compromised systolic pump function and an extensive dilatation of the left ventricle as well as a lipid accumulation and infiltration of neutrophil granulocytes are hallmarks of this model. Moreover, it earlier work showed, that an interaction between heart and skeletal muscle with an increase of pro-inflammatory signals and an atrophic gene expression program occurred.

Using this model, this work demonstrates that despite the pronounced cardiac dysfunction of iCMp38MAPK $\alpha$  KO mice in the liver 48h AngII treatment induced only minor differences to controls regarding inflammatory signals and metabolism. A microarray analysis, however, revealed 2194 differently expressed hepatic transcripts ( $p < 0.05$ ) in a comparison of control and iCMp38MAPK $\alpha$  KO. Among the most affected canonical pathways (Ingenuity Pathway Analysis), inflammatory and major metabolic pathways were only slightly affected, which was confirmed by rt-PCR for selected transcripts. The 12 most strongly altered signaling pathways included pathways for tryptophan, nicotin and melatonin degradation. However, only a small fraction of genes assembled under these terms were affected and there was no clear direction towards activation or inhibition of these pathways.

Due to the ectopic lipid accumulation in the heart which might be derived from adipose tissue lipolysis, lipolysis was inhibited using Acipimox. This treatment in combination with AngII-induced heart failure led to a significant upregulation of transcripts involved in inflammatory signals, gluconeogenesis and glycogen degradation and a to reduced expression of genes involved in fatty acid synthesis.

In summary, in contrast to the skeletal muscle, which shows a clear activation of an atrophic gene expression program at an early stage of heart failure development, alterations in hepatic gene expression are less well defined. However, when lipolysis is blocked, the inter-organ communication between the failing heart and the liver changes hepatic metabolism and inflammation.

## Abkürzungsverzeichnis

ACACA	.....	<i>acetyl CoA carboxylase A</i>
ACACB	.....	<i>acetyl CoA carboxylase B</i>
ACLY	.....	<i>ATP citrate lyase</i>
ADH	.....	<i>Antidiuretisches Hormon</i>
AngII	.....	<i>Angiotensin II</i>
Angptl4	.....	<i>Angiopoietin-like 4</i>
APS	.....	<i>Ammoniumpersulfat</i>
ATGL	.....	<i>Adipöse Triglycerid-Lipase</i>
BMFZ	.....	<i>Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum</i>
BSA	.....	<i>bovines Serumalbumin</i>
cDNA	.....	<i>komplementäre Desoxyribonukleinsäure</i>
CRP	.....	<i>C-reaktives Protein</i>
Ct	.....	<i>cycle treshold</i>
DAPI	.....	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DNA	.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DTT	.....	<i>Dithiothreiol</i>
EF	.....	<i>Ejektionsfraktion</i>
FASN	.....	<i>fatty acid synthase</i>
Fwd	.....	<i>forward</i>
GS	.....	<i>Glykogensynthase</i>
GSK3 $\beta$	.....	<i>Glykogensynthasekinase3<math>\beta</math></i>
Hnf4a	.....	<i>hepatocyte nuclear factor 4a</i>
iCM	.....	<i>induzierbarer kardiomyozytärer</i>
IDO1	.....	<i>Indoleamine 2,3-Dioxygenase</i>
Il	.....	<i>Interleukin</i>
IPA	.....	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
KO	.....	<i>Knockout</i>
KYN	.....	<i>Kynurenin</i>
MAPK	.....	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ml	.....	<i>Milliliter</i>
NGS	.....	<i>Normal Goat Serum</i>
nm	.....	<i>Nanometer</i>

NUDC	<i>Nuclear migration protein nuDc</i>
PBS	<i>Odyssey Blocking Puffer</i>
Pck1	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>
PCX	<i>pyruvate carboxylase</i>
PDH	<i>Pyruvatdehydrogenase</i>
PDK4	<i>Pyruvatdehydrogenase-Kinase</i>
Pdp2	<i>Phosphopyruvatdehydrogenase-Phosphatase 2</i>
Rbp1	<i>retinol binding protein 1</i>
Rbp2	<i>retinol binding protein 2</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
Rev	<i>Reverse</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
rt-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
sec.	<i>Sekunde</i>
Srebf2	<i>sterol regulatory element-binding protein 2</i>
SREBP1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumornecrosis factor <math>\alpha</math></i>
Tris	<i>Trishydroxymethylaminomethan</i>
ZVD	<i>zentralvenösen Druck</i>
$\beta$ -ME	<i><math>\beta</math>-Mercaptoethanol</i>
$\mu$ g	<i><math>\mu</math>gramm</i>

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Herzinsuffizienz.....	1
1.2	Leberdysfunktion unter Herzinsuffizienz.....	3
1.3	iCMp38 MAPK $\alpha$ KO Mäuse als Herzinsuffizienz Modell.....	6
1.4	Ziele der Arbeit.....	8
2	Material und Methoden .....	10
2.1	Geräte .....	10
2.2	Antikörper .....	11
2.3	Größenstandard.....	11
2.4	Gele .....	11
2.5	Eindeckmittel.....	11
2.6	Chemikalien.....	11
2.7	Färbungen.....	12
2.8	Hormone und Medikamente.....	12
2.9	Kits.....	12
2.10	Mastermix.....	12
2.11	Oligonukleotide .....	12
2.12	Puffer.....	15
2.13	p38iCM-KO Mäuse .....	15
2.14	Arbeit mit RNA .....	17
2.14.1	Gewinnung der Template RNA .....	17
2.14.2	Umschreibung in cDNA .....	17
2.14.3	Realtime-qPCR .....	18
2.14.4	Analyse der Genexpression .....	18
2.14.5	$\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode .....	19
2.14.6	X <sub>0</sub> – Methode .....	19
2.14.7	Microarray Analyse.....	20
2.15	Arbeit mit Proteinen.....	20

2.15.1	Proteinisolierung aus Lebergewebe .....	20
2.15.2	Konzentrationsbestimmung .....	20
2.15.3	Elektrophoretische Auftrennung der Proteine mit SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE) .....	21
2.15.4	Übertragung des Gels und Antikörperzugabe.....	21
2.16	Glykogenbestimmung .....	22
2.17	Histologie .....	22
2.17.1	Anfertigung der Gewebeblöcke und Schnitte.....	22
2.17.2	Ölrot-O-Färbung .....	23
2.17.3	Immunfluoreszenzfärbung (Ly6G, SMA, WGA) .....	23
2.17.4	Mikroskopie .....	24
2.18	Statistik.....	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Proteinexpression der p38MAPK $\alpha$ in der Leber .....	25
3.2	Analyse der Genexpression in der Leber nach 48h AngII .....	26
3.2.1	Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.....	26
3.2.2	Inflammatorische Antwort in der Leber nach 48h AngII.....	26
3.2.3	Metabolische Veränderungen in der Genexpression nach 48h AngII.....	28
3.2.4	Fettstoffwechsel .....	30
3.2.5	Glucosestoffwechsel.....	32
3.3	Analyse der Phosphorylierungsmuster wichtiger Enzyme nach 48h AngII ...	33
3.3.1	Glucosemetabolismus.....	33
3.3.2	Energiemetabolismus .....	34
3.4	Microarray Expressionsanalyse der Leber nach 48h AngII .....	35
3.5	Hemmung der peripheren Lipolyse .....	37
3.5.1	Genexpressionsanalyse der iCMp38MAPK $\alpha$ KO der Leber nach 48h AngII und Acipimox mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode .....	37
3.5.2	Inflammatorische Antwort der Leber der iCMp38MAPK $\alpha$ Kontrollen und KO nach 48hAngII und nach Behandlung unter Acipimox.....	38
3.5.3	Granulozyteninfiltration unter Hemmung der Lipolyse .....	41

3.5.4	Fettsäuremetabolismus der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox	42
3.5.5	Energiemetabolismus der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox	45
3.5.6	Synthesefähigkeit von Blutserumproteinen der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox	46
3.5.7	Glucosestoffwechsel der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox	47
3.5.8	Glykogengehalt der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox	49
4	Diskussion	51
4.1	iCMp38MAPK $\alpha$ KO als Modell der Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber	52
4.2	Zeitpunkt 48h der iCMp38MAPK $\alpha$ KO zur Beurteilung der Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber	53
4.3	Metabolischer und inflammatorischer Einfluss einer Herzinsuffizienz auf die Leber	53
4.4	Microarray Genexpressionsanalyse nach 48h Angiotensin II	54
4.5	Schlussfolgerung und weitere Konsequenzen	56
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	59

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Leber.....	4
Abbildung 2: iCMp38 MAPK $\alpha$ KO Mäuse als Herzinsuffizienz Modell.....	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interorgankommunikation .....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des induzierbaren Kardiomyozyten spezifischen KO der p38 MAPKinase $\alpha$ .....	15
Abbildung 5: Zeitliche Abfolge der Behandlung des induzierbaren Kardiomyozyten spezifischen KO der p38 MAPKinase $\alpha$ Mäuse .....	16
Abbildung 6: WBA der Proteinexpression der p38MAPKinase $\alpha$ in der Leber.....	25
Abbildung 7: Relative Quantifizierung der Genexpression von inflammatorischen Signalen .....	27
Abbildung 8: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen .....	28
Abbildung 9: Schematische Darstellung der regulierung der Pyruvatdehydrogenase ....	29
Abbildung 10: Relative Quantifizierung der Genexpression der Pdp2 und PDK4.....	29
Abbildung 11: Relative Quantifizierung der Gene des Fettsäuremetabolismus .....	31
Abbildung 12: Signalweg der Guconeogenese mit den geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen .....	32
Abbildung 13: Relative Quantifizierung eines geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Gluconeogenese auf Genexpressionsebene .....	33
Abbildung 14: WBA der Proteinexpression der Enzyme der Glykogensynthese .....	34
Abbildung 15: WBA des Phosphorylierungsmuster der PDH.....	35
Abbildung 16: Microarray Expressionsanalyse der Leber nach 48hAngII .....	36
Abbildung 17: Zeitliche Abfolge der Behandlung des induzierbaren iCMp38MAPK $\alpha$ KO .....	37
Abbildung 18: Vergleich des fold change der Genexpression der inflammatorischen und metabolischen Gene .....	38
Abbildung 19: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen .....	39
Abbildung 20: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen .....	40
Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahme von neutrophilen Granulozyten in der Leber .....	41

Abbildung 22: Signalweg der Fettsäuresynthese mit Ergebnissen der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode..	43
Abbildung 23: Relative Quantifizierung der Genexpression der Fettsäuresynthese .....	44
Abbildung 24: Relative Quantifizierung der Genexpression des Fettstoffwechsels.....	45
Abbildung 25: Relative Quantifizierung der Genexpression des Energiemetabolismus	46
Abbildung 26: Relative Quantifizierung der Genexpression der Serumproteine .....	47
Abbildung 27: Signalweg der Gluconeogenese mit Ergebnissen der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode....	48
Abbildung 28: Relative Quantifizierung der Genexpression der Gluconeogenese .....	49
Abbildung 29: Glykogengehalt der Leber .....	49
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Interorgankommunikation unter Hemmung der peripheren Lipolyse.....	58

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen mit einer 5-Jahres-Sterblichkeit von über 50% und ist durch Leitsymptome wie Dyspnoe und erhebliche Flüssigkeitseinlagerungen in den unteren Extremitäten sowie allgemeine Schwäche und Müdigkeit gekennzeichnet. Sowohl die chronische als auch die akute Manifestation sind mit einer deutlich erhöhten Mortalität sowie Morbidität der Patienten vergesellschaftet. Pathophysiologisch ist das Herz dabei nicht mehr in der Lage, die Organe mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, um den Gewebestoffwechsel zu gewährleisten. Der Organismus antwortet mit einer Aktivierung neuroendokriner Systeme, welches eine weitere Belastung des Herzens darstellt. (Perk u. a. 2012)

Unter hämodynamischen Gesichtspunkten kann die Herzinsuffizienz in eine systolische sowie diastolische Form unterschieden werden. Als systolische Herzinsuffizienz wird die Unfähigkeit des Herzens bezeichnet, durch Kontraktionsschwäche und erhöhte Wandspannung, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei ungestörter linksventrikulärer Relaxation des Herzmuskels zu fördern. Ursächlich kommen dafür koronare Herzkrankheit, Kardiomyopathie, Myokardits, Vitien und arterielle Hypertonie in Betracht. Als diastolische Herzinsuffizienz wird die gestörte Entspannung des Herzmuskels bei hypertrophiertem linken Ventrikel in der Diastole mit konsekutiv erniedrigtem enddiastolischem Füllungsvolumen definiert. Ätiologisch werden dabei arterielle Hypertonie, restriktive Kardiomyopathie und konstriktive Perikarditis genannt. (Herold und a. 2018)

Als Folge der Minderversorgung des Organismus mit ausreichend Sauerstoff kommt es zu einer Sympathikusaktivierung mit anfänglicher Steigerung der Kontraktionskraft sowie der Herzfrequenz. Mit der Zeit nimmt die Dichte der kardialen beta- Rezeptoren ab und eine gesteigerte Vasokonstriktion führt zu einer Nachlasterhöhung. Des Weiteren wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert. Unter anderem induziert die Ausschüttung von Aldosteron eine Fibrosierung des Herzmuskels und trägt so zu dem sogenannten *remodeling* bei und bewirkt letztendlich eine weitere Zunahme der Herzinsuffizienz (McMurray u. a. 2012). Dieses *remodeling* geht einher mit Fibrose, Apoptose und Veränderungen im kardialen Metabolismus (Heusch u. a.

2014). Eine zusätzliche Steigerung der Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH) führt zu vermehrter renaler Wasserretention. Durch die Volumenbelastung kann es zu einer exzentrischen Hypertrophie kommen, bei vermehrter Druckbelastung zur konzentrischen Hypertrophie, welche beide durch die Abnahme der Leistungsfähigkeit zu einer Dilatation des Herzens führen. (Herold und a. 2018)

In Verbindung mit einer erhöhten Ausschüttung von Katecholaminen und Inflammationssignalen tritt bei Herzinsuffizienzpatienten auch ein *remodeling* in den peripheren Organen auf. Die Herzinsuffizienz kann deshalb als Multiorganerkrankung bewertet werden, denn neben der Aussendung von Signalmolekülen kommt es auch aufgrund des erniedrigten Herzzeitvolumens zu einer chronischen Minderperfusion, die sich auch auf andere Organe auswirken kann.

Neuroendokrine Signalwege als therapeutisches Angriffsziel sind schon lange Standard in der Therapie der Herzinsuffizienz, aber dennoch sind die Mortalitätsraten mit einer 5-Jahres-Sterblichkeit von über 50% stetig hoch. Erschwert wird eine erfolgreiche Therapie der Herzinsuffizienz dadurch, dass sie einen komplexen Prozess darstellt, der neben neuroendokrinen Signalen auch durch Veränderungen in Inflammation und Metabolismus beeinflusst wird. Bereits 1990 entdeckten Levine et al, dass eine Herzinsuffizienz mit einer proinflammatorischen Antwort verbunden ist, die sie mit dem Vorkommen von *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) im Serum nachweisen konnten (Levine u. a. 1990). Folglich spielt neben den hämodynamischen Veränderungen auch die Inflammation eine Rolle bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz (Seta u. a. 1996). Die inflammatorische Antwort wird dabei als ‚sterile Inflammation‘ bezeichnet, da sie auch ohne den Nachweis von Mikroorganismen bei Gewebsuntergang unter myokardialer Minderversorgung durch koronare Minderperfusion erfolgt. Es kommt zur Sekretion von Zytokinen wie TNF $\alpha$  und Interleukin (IL)-1 und zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Chen und Nuñez 2010) sowie zur Ausschüttung von IL-6, wobei die Menge an IL-6 mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) korreliert (Lommi u. a. 1997). Diese proinflammatorischen Zytokine werden in diesem Zusammenhang auch als sogenannte ‚Cardiokine‘ bezeichnet, da sie vom Herzen in das Plasma ausgeschüttet werden (Doroudgar und Glembotski 2011). Dabei beeinflussen die proinflammatorischen Signale wie IL-1 $\beta$  und IL-18 die peripheren Organe wie Milz, Niere, Skelettmuskulatur und Fettgewebe im

Sinne einer Interorgankommunikation (Doroudgar und Glembotski 2011; Jahng, Song, und Sweeney 2016).

Neben der inflammatorischen Antwort des Herzens kommt es auch zu Veränderungen im metabolischen Profil. Veränderungen hinsichtlich des Energiemetabolismus sind nur wenig verstanden genauso wie deren Folgen hinsichtlich der Beeinflussung des Voranschreitens der Herzinsuffizienz. Bei fortgeschrittenen Stadien kommt es zu verringerter Fettsäureoxidation und vermehrten Glykolyse (Stanley, Recchia, und Lopaschuk 2005). Unter Herzinsuffizienz verändert sich jedoch nicht nur der Energiemetabolismus des Herzens selbst sondern auch extrakardiale Gewebe sind betroffen. Der gesamte Organismus geht im Endstadium der Herzinsuffizienz in eine katabole Stoffwechsellage über (Berry und Clark 2000).

Kardiale Kachexie ist dabei ein häufiges Syndrom unter Herzinsuffizienz, welche durch ein Ungleichgewicht zwischen Katabolismus und Anabolismus, ausgelöst von neuroendokrinen und inflammatorischen Veränderungen, entsteht (S. D. Anker u. a. 1997; S. D. Anker und Sharma 2002; Leitner 2017).

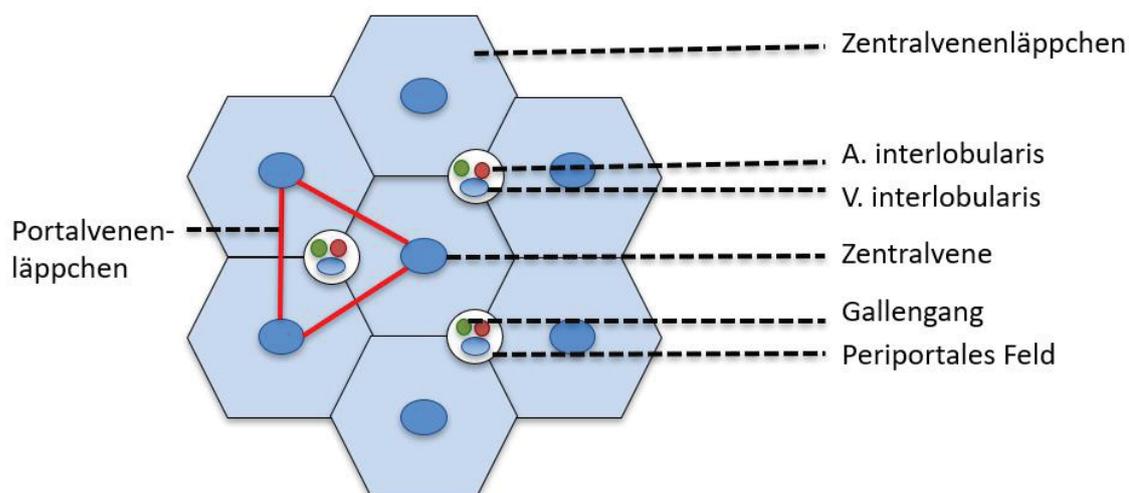
Ungefähr 40% der Patienten, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, weisen fünf oder mehr Komorbiditäten nicht-kardialen Ursprungs auf (Braunstein u. a. 2003). Dabei wurde das Vorkommen häufiger Begleiterkrankungen mit dem Auftreten bei Gesunden gleichen Alters verglichen. Hier wurde deutlich, dass renale Dysfunktion (35 vs. 5 %), Schlafapnoe (60 vs. 1 %), Anämie (50 vs. 15 %), Diabetes mellitus (20 vs. 13 %), Leberdysfunktion (40 vs. 10 %) und chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (40 vs. 30 %) gehäuft bei Herzinsuffizienz Patienten vorkommen (V. M. van Deursen u. a. 2014). Es tritt also neben dem kardioresalen auch ein kardiohepatisches Syndrom auf.

## **1.2 Leberdysfunktion unter Herzinsuffizienz**

Die Minderperfusion unter Herzinsuffizienz beeinflusst die Leber, da 25% des gesamten Herzzeitvolumens zur Versorgung dieses stoffwechselaktiven Organs dienen. Die Leber ist stark vaskularisiert und erhält arterielles Blut aus dem Hochdrucksystem über die A. hepatica propria sowie das venöse Blut des Gastrointestinaltraktes über die V. portae. Letztere führt ihr das Blut aus den Bauchorganen zu, welches sowohl mit Nährstoffen als auch mit Toxinen besetzt ist. Die Veränderungen des zentralvenösen Drucks (ZVD) und des rechten Herzens stehen auch in nahem anatomischen

Zusammenhang, da die Lebervenen in die V. cava inferior drainieren und damit zum rechten Herzen. (Welsch und a. 2003)

Aufgebaut ist die Leber aus ungefähr eine Millionen Zentralvenenläppchen. Diese enthalten radiär angeordnete Hepatozyten, die die 1µm breiten Gallenkanälchen umgeben, sowie Sinusoide, die sich daran anschließen. In diesen befinden sich die Kupffer-Sternzellen, welche als Makrophagen der Leber 80% bis 90% der Gewebsmakrophagen des menschlichen Organismus darstellen (Bilzer, Roggel, und Gerbes 2006). Sie spielen bei der proinflammatorischen Antwort der Leber auf Stressoren wie Ischämie, Infektionen und Toxine eine wichtige Rolle. Zwischen den beiden Strukturen befindet sich noch ein bindegewebiger Raum, der Disse-Raum, in welchem sich die hepatischen Sternzellen, die sogenannten Ito-Zellen, befinden. (Welsch u. a. 2003)



**Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Leber** (modifiziert nach Welsch, 2003, pp 349-360)

Wie in Abbildung 1 dargestellt liegt im Zentrum des Läppchens die Zentralvene, von welcher das Blut zu den Lebervenen fließt. Drei aneinandergrenzende Zentralvenenläppchen bilden dann das sogenannte Periportalfeld auch Glisson Trias genannt, das sich aus der A. interlobularis der V. interlobularis und dem Ductus biliferi interlobulares zusammensetzt.

Neben dieser Einteilung kann man die Leber auch unter dem Aspekt der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung einteilen. Die zentrale Achse wird dabei von der A. interlobularis und der V. interlobularis gebildet. (Welsch und a. 2003)

Die Leber stellt das zentrale Stoffwechselorgan des Menschen dar. Zu ihren Hauptaufgaben zählt neben der Erhaltung des Stoffwechselgleichgewichts, die Produktion von Galle, Entgiftungsfunktion, und die Synthese lebenswichtiger Proteine. Ein weiterer Funktionsbereich der Leber ist die Glykogenspeicherung. Die Hepatozyten nehmen Glucose aus der V. portae auf und speichern diese in Form von Glykogen. Bei Bedarf kann die Glucose wieder ins Blut abgegeben werden. Neben dem Glucosemetabolismus nimmt die Leber auch Einfluss auf den Lipidstoffwechsel. Sie synthetisiert Fettsäuren und liefert diese als *very low density lipoproteins* ins Blut. (Welsch u. a. 2003)

Obwohl bereits Mitte des 20. Jahrhunderts Veränderungen in der Leberfunktion unter Herzinsuffizienz festgestellt wurden (Sherlock 1951) sind die wissenschaftlichen Artikel zum cardiohepatischen Syndrom rar. Eine Beteiligung der Leber unter Herzinsuffizienz spricht für eine schlechtere Prognose des Patienten (V. M. van Deursen u. a. 2010; Sundaram und Fang 2016).

Chronische passive Stauung der Leber wird vor allem durch die Erhöhung des ZVD ausgelöst, wohingegen chronische lobuläre Nekrose durch verringerten arteriellen Druck entsteht (Arcidi, Moore, und Hutchins 1981). Aufgrund der veränderten hämodynamischen Versorgung durch ein erniedrigtes Herzzeitvolumen und gleichzeitige Erhöhung des ZVD, kann es durch die verminderte Oxygenierung zur Ausbildung einer ‚ischämischen Hepatitis‘ kommen (Seeto, Fenn, und Rockey 2000; Henrion u. a. 1994) sowie auch zur Fibrosierung der Leber im Sinne einer ‚*cirrhose cardiaque*‘ (Giallourakis, Rosenberg, und Friedman 2002). Jedoch ist diese hepatische Fibrose selten und korreliert nicht mit hämodynamischen Veränderungen (Myers u. a. 2003). Der Anstieg des ZVD führt histologisch auch zu einer Atrophie der Hepatozyten mit perisinusoidalem Ödem (Safran und Schaffner 1967).

Als prognostische Marker wurden biochemische Veränderungen im Serum von Patienten, die an einer chronischen Herzinsuffizienz erkrankt sind, untersucht. Probanden, die einen geringen kardialen Index haben, zeigten erhöhte Werte der Aspartat-Aminotransferase, der Alanin-Aminotransferase, der Laktat Dehydrogenase sowie des Gesamtbilirubins, wobei der Anteil der Patienten mit diesen Veränderungen zwischen 27%-80% lag (Kubo u. a. 1987). Zudem konnte gezeigt werden, dass erhöhtes Bilirubin vor allem bei rechtsventrikulären Einschränkungen gemessen wurde während erhöhte Transaminasen vor allem bei Verminderung der linksventrikulären

Leistung auftreten (Styczynski u. a. 2016). Des Weiteren besteht eine signifikante Korrelation zwischen rechts arteriellem Druck, abfallendem kardialen Index und biochemischen Veränderungen (Kubo u. a. 1987). Unter stabiler Herzinsuffizienz wird die Leberdysfunktion vor allem von einem cholestatischen Enzymprofil begleitet, das positiv mit Erkrankungsschwere und Stauung assoziiert ist (Poelzl u. a. 2012). Bei akuter Herzinsuffizienz sind vor allem die Transaminasen erhöht (Poelzl u. a. 2012).

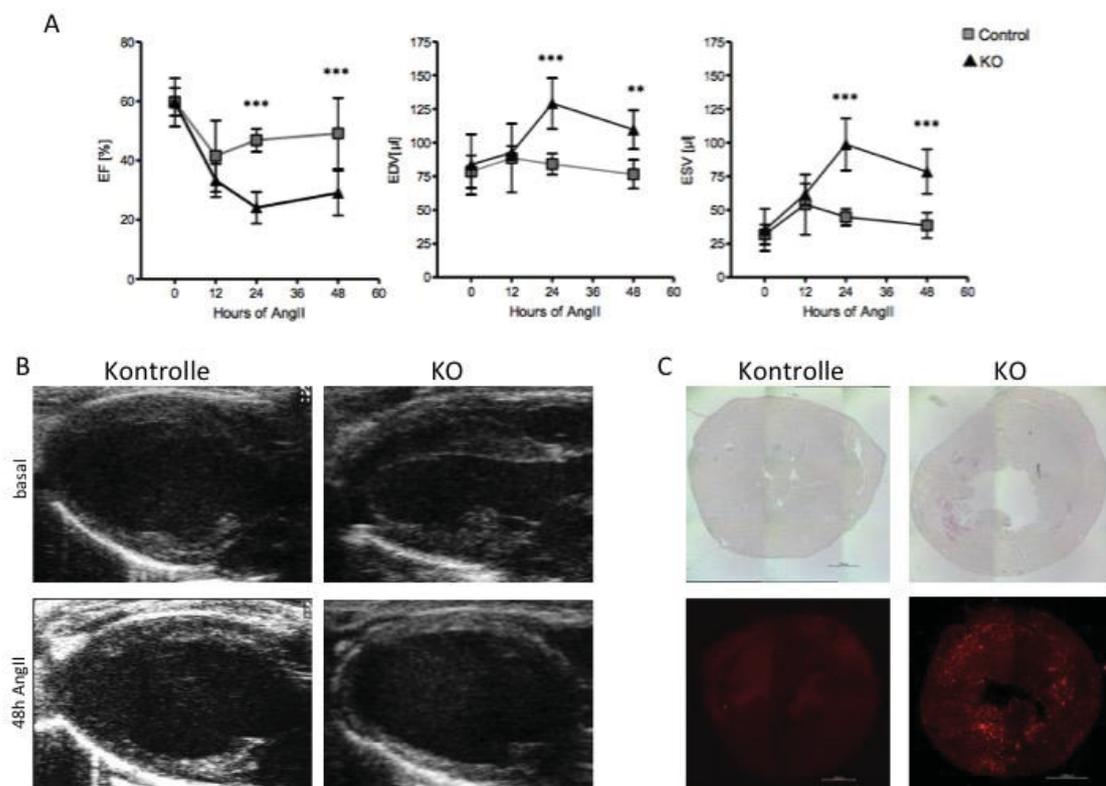
Kato u. a. 2012 betrachteten die Leberfunktion erstmals unter dem Aspekt der Inflammation und des Metabolismus unter Herzinsuffizienz in einem Tiermodell. Sie untersuchten Dahl-Ratten, die eine kardiale Kachexie unter einer *high-salt* Diät entwickelten. Die Autoren fanden eine erhöhte Aufnahme von Glucose gekoppelt mit einer verringerten Expression von Genen der Gluconeogenese und erhöhten Expression von lipogenetischen Genen in der Leber. Des Weiteren stellten sie erhöhte Triglycerid Werte im Serum sowie der Leber fest, erhöhte Akute-Phase-Proteine und eine verstärkte Genexpression von inflammatorischen Signalen in der Leber. Somit scheint es in der Leber unter Herzinsuffizienz zu Veränderungen in Inflammation und Metabolismus zu kommen. (Kato u. a. 2012)

### **1.3 iCMp38 MAPK $\alpha$ KO Mäuse als Herzinsuffizienz Modell**

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Leberfunktion im Rahmen der Herzinsuffizienz das im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie etablierte Herzinsuffizienzmodell des herzspezifischen *Knockouts* (KO) der p38 MAPK $\alpha$  genutzt. Die p38 *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) hat verschiedene Unterformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ , wobei die  $\alpha$  Unterform die höchste Relevanz für die Herzfunktion hat. Die p38 MAP Kinasen gehören zur Gruppe der Stress aktivierten Kinasen, die z.B durch osmotischen Stress, Zytokine, Toxine und mechanische Schäden aktiviert werden und unter anderem relevante Transkriptionsfaktoren wie c-jun, ATF2, Elk-1 and CREB phosphorylieren (Paul u. a. 1997). Die p38 MAPK $\alpha$  ist in den ‚*remodeling*‘ Prozess bei kardialer Belastung involviert (Bao u. a. 2007).

Das Modell eignet sich insbesondere zur Erforschung von herzinsuffizienzabhängigen Prozessen, da es durch Behandlung mit Angiotensin II zu einer schnellen Induktion einer systolischen Herzinsuffizienz kommt. Unter basalen Bedingungen sind keine signifikanten Unterschiede in den kardialen Funktionsparametern zwischen den Kontrollen und den iCMp38MAPK $\alpha$  KO Mäusen zu erkennen. Jedoch kommt es nach

Applikation von Angiotensin II als Druckbelastungsmodell innerhalb von 24 bis 48h zu einer stark eingeschränkten systolischen Pumpfunktion und einer deutliche linksventrikulären Dilatation in den iCmp38MAPK $\alpha$  KO Mäusen sowie zu einem Anstieg des enddiastolischen und endsystolischen Volumen (Abb. 2 A und B). Des Weiteren konnte in den Herzen histologisch nach der Gabe von Angiotensin II (AngII) über 48h eine Lipidakkumulationen und Infiltration von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 2C). Die Analyse der Genexpression nach Induktion der Herzinsuffizienz zeigte mehr als 4000 veränderte Transkripte (*fold change* >2). (Bottermann u.a. unveröffentlichte Daten)



**Abbildung 2: iCmp38 MAPK $\alpha$  KO Mäuse als Herzinsuffizienz Modell**

**A** Ejektionsfraktion (EF), enddiastolisches Volumen, endsystolisches Volumen des Herzens der iCmp38 MAPK $\alpha$  Kontrollen (grau) und KO (schwarz) unter basalen Bedingungen sowie nach 12h, 24h und 48h AngII Behandlung. MW $\pm$ SD; \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001; n=4-6

**B** Ultraschall Bild der parasternalen langen Achse im B-Mode von Kontrollen und iCmp38 MAPK $\alpha$  KO unter basalen Bedingungen (oben) und unter 48h AngII Behandlung (unten).

**C** Ölrot- (oben) und Ly6G- (unten) Färbung der iCmp38 MAPK $\alpha$  KO und Kontrollen des Herzens nach 48h AngII.

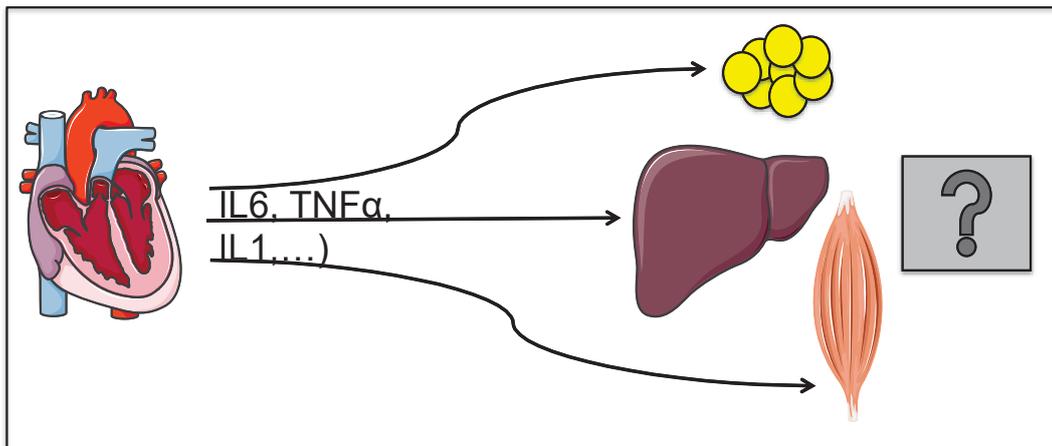
Des Weiteren fiel auf, dass es bei den Mäusen zu einem Gewichtsverlust im Sinne einer kardialen Kachexie (Kontrolle  $95.39\% \pm 2.10$ ; KO  $86.27\% \pm 3.18$ ) kam.

In einem weiteren Projekt konnte in diesem Modell schon die Interaktion zwischen Herzen und Skelettmuskel untersucht werden (Leitner 2017). Dabei wurden bei der Genexpressionsanalyse des *Musculus plantaris* mehr als 3000 unterschiedlich exprimierte Transkripte mit einem Anstieg von proinflammatorischen Signalen wie Il-6, Il-1b, Il-6ra und Il-1r2 sowie ein atrophisches Genexpressionprogramm mit Anstieg von Faktoren wie Foxo1, Foxo3, Murf1 und Atrogin1 gefunden. Dies lies sich auch histologisch bestätigen mit einer Abnahme an glykolytischen Fasern im *Musculus plantaris*. Zusammenfassend weist dies auf ein ablaufendes Kachexie Programm hin, das durch eine Erhöhung der Gene für Inflammation und Proteindegradation des Skelettmuskels gekennzeichnet ist. (Leitner 2017)

Dies spricht für eine Interorgankommunikation zwischen dem Herzen und der Skelettmuskulatur im Rahmen der Herzinsuffizienz. Die vorliegenden Daten zeigen, dass das kardiale p38 MAPK $\alpha$  KO Mausmodell ein interessantes Modell zur Analyse weiterer Interorgankommunikationswege, wie z.B. des kardiohepatischen Syndroms darstellt.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Die Leber als zentraler Regulator von Katabolismus und Anabolismus ist vor allem für den Stoffwechsel und mit ihrer großen Anzahl an Makrophagen auch für inflammatorische Prozesse des Organismus von erheblicher Bedeutung. Unter Herzinsuffizienz kommt es durch die Ausschüttung von ‚Cardiokinen‘ zu einer Veränderung des Metabolismus in der Leber (Nakamura und Sadoshima 2014). Jedoch ist unbekannt, welche Faktoren an dieser Kommunikation beteiligt sind. Dabei stellt sich nun die Frage, inwiefern es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer ‚Interorgankommunikation‘ zwischen der Leber und dem Herzen durch Inflammationssignale und Veränderungen im Metabolismus kommt. Dabei eignet sich das iCmp38MAPK $\alpha$  KO Modell insbesondere zur Erforschung von herzinsuffizienzabhängigen Prozessen, da es durch die Behandlung mit Angiotensin II zu einer raschen Induktion einer systolischen Herzinsuffizienz kommt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interorgankommunikation** (Interorgankommunikation zwischen inflammatorischen Signalen des dilatierten Herzens und peripheren Organen)

Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob das iCMp38MAPK $\alpha$  KO Modell zur Analyse der Herz-Leber-Interorgankommunikation bei Herzinsuffizienz im Sinne eines cardio-hepatischen Syndroms genutzt werden kann. Dabei soll zunächst ein Effekt der Herzinsuffizienz auf die Leber selbst durch Analyse metabolischer Veränderungen sowie die Signaltransduktion im Rahmen einer Interorgankommunikation durch inflammatorische Signale analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

- Analysewaagen: PE 3600 (Mettler-Toledo), Feinanalysewaage BP121S (Sartorius)
- Gelkammern: Biorad Mini Protean Tetra System, Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience/GE Healthcare)
- Kyromikrotom: Kyrostat (Leica)
- Magnetrührer: IKA-RH basic 2 (Klees)
- Mikroskope: Lichtmikroskop DM (Leica), Fluoreszenzmikroskop Keyence BZ 9000 (Keyence)
- Pipetten: *Pipetman 10-1000 $\mu$ l* (Gilson), Pipettierhilfe *Pipetus 0,1-200ml* (Hirschmann)
- Plattenphotometer: *Spectra Count* (Packart)
- RT-qPCR Maschine: StepOne Plus Real-Time PCR System Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
- Schüttler: Drehschüttler *Roto-shake Genie* (Scientific Industries), Wippschüttler (neoLab),
- Spektralphotometer: *Nanodrop ND 1000* (peqlab)
- Stromquellen: *Power 608* (Fisher Scientific), *Power Pack P25* (Biometra), *PS 500XT DC Power Supply* (Hoefer Scientific Instruments)
- Stickstofftank: *Arpege 110* (Air Liquide)
- Vortexer: *Vortex-Genie 2* (Scientific Industries)
- Westernblotting-Zubehör: *Semidry Blot-Kammer* (Biometra), *Infrared Imaging System Odyssey* (LI-COR), Nitrozellulosemembran Protran (Whatman), *LICOR Blocking Solution* (LI-COR)
- Wasserreinigung: *Milli-Q plus* (Millipore)
- Zentrifugen: *Centrifuge 5417R, 5810R* (Eppendorf), Minizentrifuge (Roth), Spectrafuge Mini Zentrifuge (Corning Labnet)

## 2.2 Antikörper

### *Primäre Antikörper*

- Acris: Actin polycl. smooth muscle specific, rabbit (#SP6341P)
- Abcam: Phospho-Pyruvatdehydrogenase E1 alpha SU rabbit Antibody (#ab92696)
- BD-Pharming: Ly-6G granulocyte marker rat antibody (#551461)
- Cell Signaling Technology: eEF2- rabbit Antibody (#2332), GAPDH rabbit Antibody (#2118), GSK-3B rabbit Antibody (9315, Phospho Glykogen-Synthase rabbit Antibody (#3891), Phospho-GSK3B rabbit Antibody (#9336), Pyruvatdehydrogenase rabbit Antibody (#3205)

### *Sekundäre Antikörper*

- LI-COR Odyssey: IRDye 680CW Goat Anti-Mouse IgG, IRDye 800CW Goat Anti-Rabbit IgG
- Jackson IR: Alexa WGA Fluor 488 (#W11261), Rhodamine Red X Goat-Anti-Rat, Cy3 Goat Anti-Rabbit

## 2.3 Größenstandard

- *PageRule Prestained Protein Ladder* in Kilodalton: 170 – 130 – 100 – 70– 55 – 40 – 35 – 25 – 15 - 10

## 2.4 Gele

Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Acrylamidgel:

- Sammelgel: 2,5%: 1,25 ml 40% Acrylamid, 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8, 100 µl 10% SDS, 20 µl TEMED, 30 µl 10% APS, 7,4 ml H<sub>2</sub>O
- Trenngel 10%: 5 ml Acrylamid 40%, 5 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 200 µl SDS 10%, 50 µl APS 10%, 40µl TEMED, 10 ml H<sub>2</sub>O

## 2.5 Eindeckmittel

ProLong Gold with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Thermo Scientific #P36935),

## 2.6 Chemikalien

2-Methylbutan, Ammoniumpersulfat (APS) (Roth), Acrylamid 40% (Roth), bovines Serumalbumin (BSA) (Merck), Dithiothreiol (DTT) (Sigma), β-ME (Sigma),

Formaldehyd (Merck), SDS (Sodiumdodecylsulfat) (Roth), TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin) (Roth) , Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (MP Biomedicals), Tween (Sigma)

## 2.7 Färbungen

Formol-Calcium nach Baker: 3,6% Formol, 1% Ca Cl<sub>2</sub> über CaCO<sub>3</sub> aufbewahrt

Ölrot-Gebrauchslösung: 0,3% Fat red 7B (#201618 Sigma) in 80% Isopropanol

## 2.8 Hormone und Medikamente

Acipimox (Sigma #A7856) , Angiotensin II (Sigma, #A9525), 4OH-Tamoxifen (Sigma #H6278)

## 2.9 Kits

- BCA-Protein-Assay Kit (Thermo Scientific)
- QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen)
- Glykogen Assay Kit (Sigma)
- RNeasy Mini Kit (Quiagen)

## 2.10 Mastermix

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Life Technologies)

## 2.11 Oligonukleotide

Sigma:

Oligonukleotid		Sequenz 5'→ 3'
IL6	Fwd	AAGAAATGATGGATGCTACC
	Rev	GAGTTTCTGTATCTCTCTGAAG
IL6ra	Fwd	AAAGTTCTACAGAAGCAACG
	Rev	TTGAGTCTCAGGATGATGAAG
IL1b	Fwd	GGATGATGATAACCTGC
	Rev	CATGGAGAATATCACTTGTGG
IL1r2	Fwd	AAAACATATGTGGAAGTGTCG
	Rev	GAAGAGACTTCTTTGACTGTG

Cxcl5	Fwd	TGTTTGCTTAACCGTAACTC
	Rev	CAGTTTAGCTATGACTTCCAC
Cxcl1	Fwd	AAAGATGCTAAAAGGTGTCC
	Rev	GTATAGTGTTGTCAGAAGCC
Ccl2	Fwd	CAAGATGATCCCAATGAGTAG
	Rev	TTGGTGACAAAACTACAGC
Ccr2	Fwd	ACCACATGTGCTAAGAATTG
	Rev	CTGGTTTTATGACAAGGCTC
Cxcr2	Fwd	CTACTGCAGGATTAAGTTTACC
	Rev	GACGTATATTACAACCACAGC
NUDC	Fwd	AGAACTCCAAGCTATCAGAC
	Rev	CTTCAGGATTTCTGTTTCTTC
Angptl4	Fwd	ATGGAGTAGACAAGACTTCG
	Rev	TCACAGTTGACCAAAAATGG
PDK4	Fwd	ACAATCAAGATTTCTGACCG
	Rev	TCTCCTTGAAAATACTTGGC
Pdp2	Fwd	TCTCCAGGGAAGTAAAACC
	Rev	TTTTCAGCCTCGTATCCTC
PCX	Fwd	AGAATGTTCTCAACAACCAG
	Rev	ACATGTCCGAGGTAATGTAG
G0S2	Fwd	AGCTGAGGGAAGAAGAAC
	Rev	TATAGCTTCACTAGCTTCCC
Ly6G	Fwd	CCCTTCTCTGATGGATTTTG
	Rev	AGTATTGTCCAGAGTAGTGG
ACLY	Fwd	CTCCAAGAAGCCAAATCTTATC
	Rev	ATATTCATCAGCTTCTCCC
ACACA	Fwd	CTGTATGAGAAAGGCTATGTG

	Rev	AACCTGTCTGAAGAGGTTAG
ACACB	Fwd	GCATGAAGGACATGTATGAG
	Rev	AGGGATGTAGATGAGAATGG
Fasn	Fwd	GATTCAGGGAGTGGATATTG
	Rev	CATTCAGAATCGTGGCATAG
Srebfl	Fwd	AATAAATCTGCTGTCTTGCG
	Rev	CCTTCAGTGATTTGCTTTTG
Sreb2	Fwd	TGGTAAATGGTGTGATTGTC
	Rev	GATAAGCAGGTTTGTAGGTTG
Pck1	Fwd	AATATGACAACCTGTTGGCTG
	Rev	AATGCTTTCTCAAAGTCCTC
Rbp2	Fwd	CCTAGATATTGATTTTGCCACC
	Rev	GTCTTGAAGTTATCACCGTC
Rbp1	Fwd	GATGAACTTACCTGGAAATG
	Rev	AAGACCAAGTTATCTCCTC
Hnf4a	Fwd	TCCTAGGCAATGACTACATC
	Rev	CTGGATCAAAGAAGATGATGG
CRP	Fwd	TTTCAGACAAAACACTGTCC
	Rev	TGTCTTCATGACCAAAGTC
Ttr	Fwd	AGTGTTCAAAAAGACCTCTG
	Rev	GTGTCTTCCAGTACGATTTG
Tnr	Fwd	CTATGTCTCAGCCTCTTCTC
	Rev	CATTTGGGAACCTTCTCATCC

## 2.12 Puffer

- Anodenpuffer: 300mM Tris, 100 mM Tricin, pH 8,8
- Fixativ: 4%Paraformaldehyd, 0,1 M Natriumphosphat
- Kathodenpuffer: 300mM Aminocaprinsäure, 30mM Tris, pH 8,7
- Lysispuffer: 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% IGEPAL, pH 7,4
- Laemmli-Probenpuffer (4fach): 250 mM Tris-Cl, 8% SDS, 50 mM DTT, 20% Glycerol, 0,1 mg/ml Bromphenolblau
- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1% (w/v) SDS
- TBS: 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7,4
- TBST: TBS, 0,1% Tween

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den nationalen Richtlinien und durch das lokale Tierschutzkommittee des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unter dem Aktenzeichen LANUV, Recklinghausen, Lizenz Nr. AZ: 84-02.04.2014.A220 genehmigt. Die operativen Eingriffe wurden von Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie durchgeführt (Dr. Bottermann, Dr. Leitner)

## 2.13 p38iCM-KO Mäuse

Für die Experimente wurde ein gentechnisch veränderter Mausstamm mit einem induzierbaren, kardiomyozytenspezifischen Knockout der p38MAPKinase $\alpha$  (iCMp38 MAPK $\alpha$  KO) verwendet.

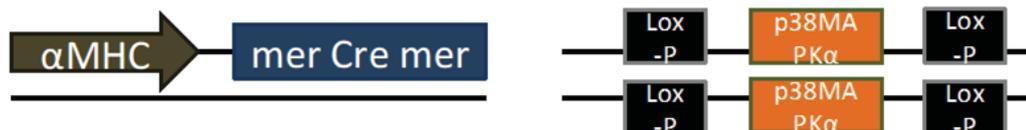
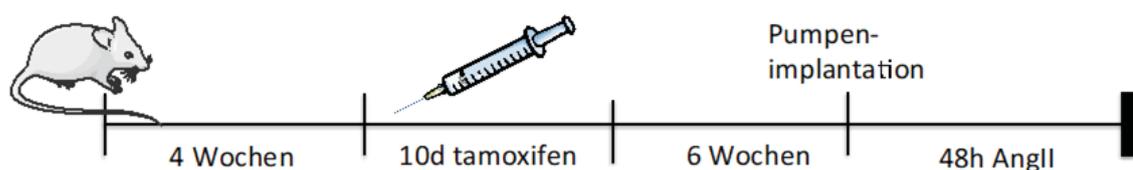


Abbildung 4: Schematische Darstellung des induzierbaren Kardiomyozyten spezifischen KO der p38 MAPKinase $\alpha$

Für die Inaktivierung der p38MAPKinase $\alpha$ , den sogenannten KO, wurden Tiere, die heterozygot die modifizierte Cre-Rekombinase *merCermer* (Verrou u. a. 1999; Sohal u. a. 2001) unter Kontrolle des kardiomyozytenspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors (ein für das Herz spezifischer Promoter der *alpha myosin-leichte Kette*) exprimieren, mit Mäusen gekreuzt, welche ein modifiziertes p38MAPK $\alpha$  p38<sup>flox/flox</sup> Gen tragen. Wie in Abbildung 4 dargestellt sind bei diesem Gen die Exons 2 und 3 Schnittstellen für die Cre-Rekombinase (LoxP-Stellen) flankiert und dienen somit als Angriffspunkt für die Cre-Rekombinase. Die p38<sup>flox/flox</sup> Mäuse wurden dabei von M. Pasperakis aus dem Institut für Genetik der Universität Köln bereitgestellt.



**Abbildung 5: Zeitliche Abfolge der Behandlung des induzierbaren Kardiomyozyten spezifischen KO der p38 MAPKinase $\alpha$  Mäuse**

Die Inaktivierung der p38MAPKinase $\alpha$  wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 500 $\mu$ g 4OH-Tamoxifen (5mg/ml in Erdnußöl) über zehn Tage im Alter von sechs Wochen induziert.

Als Kontrolle dienten p38<sup>flox/flox</sup> Mäuse, die keine durch Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase *merCermer* enthielten. Diese wurden ebenfalls für 10d mit 500 $\mu$ g 4OH-Tamoxifen behandelt.

Nach erfolgreicher Induktion des KOs wurde in den zwölf Wochen alten Männchen eine systolische Herzinsuffizienz durch die Gabe von 1,5mg/kg/d AngII über subkutane osmotische Minipumpen (*Alzet*) für verschieden Zeitperioden (12h, 24h und 48h) ausgelöst. Angiotensin II bindet dabei an den G-Protein-gekoppelten AT1-Rezeptor und führt zu Vasokonstriktion und führt dadurch zu einer mechanischen Belastung des Herzens.

Bei der Organentnahme wurde das Lebergewebe in PBS gewaschen, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die weitere Protein- und RNA-Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

## 2.14 Arbeit mit RNA

### 2.14.1 Gewinnung der Template RNA

Die Gewinnung der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte mit dem *RNeasy Mini KIT* von QIAGEN. Zunächst wurde das Lebergewebe auf eine Größe von  $\leq 30$ mg zugeschnitten und mit 600 $\mu$ l RNeasy Lysis Puffer (RLT) (*Quiagen*) und 6 $\mu$ l beta-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versehen. Diese Lösung wurde daraufhin mit einem Gewebemixstab (*Quiagen*) homogenisiert und für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 600 $\mu$ l 70% Ethanol versehen. 700 $\mu$ l der Lösung wurden auf die *RNeasy Mini spin* Säule gegeben und für 20 sec. zentrifugiert. Dies wurde anschließend mit der Restmenge wiederholt. Danach wurden 700 $\mu$ l vom Waschpuffer RW1 (*Quiagen*) hinzugefügt und für 20 sec. bei 10000 ref zentrifugiert. Dies wurde mit der Menge von 500 $\mu$ l Waschpuffer RPE (*Quiagen*) wiederholt. Darauffolgend wurde nochmals die gleiche Menge an Waschpuffer RPE (*Quiagen*) hinzugefügt und für 2 min bei 10 000 ref zentrifugiert. Zum Trocknen wurde die Säule anschließend in ein 2ml Reaktionsgefäß platziert und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die getrocknete Säule wurde wiederrum in ein 1,5ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und die RNA mit 80 $\mu$ l *RNase freiem Wasser* eluiert.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop Spektralphotometer ND-1000 von Thermo Scientific. Dabei wurden sowohl die Extinktion bei 260nm (E260) für die Konzentrationsbestimmung als auch der Quotient von E260/280 und E260/230 zur Beurteilung der Reinheit der RNA bestimmt.

### 2.14.2 Umschreibung in cDNA

Zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus der gewonnenen Template RNA musste aus dieser zunächst die genomische DNA eliminiert werden. Im ersten Schritt der Umschreibung wurden hierfür 2 $\mu$ l gDNA Puffer zur Eliminierung der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA), 1 $\mu$ g/ $\mu$ l Template RNA sowie eine variable Menge von RNase-freiem Wasser (Gesamtvolumen 14 $\mu$ l) gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde zur Umschreibung der RNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase ein Mastermix hinzugegeben. Dieser setzte sich aus 1 $\mu$ l *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 6 $\mu$ l *Quantiscript RT Puffer* und 1 $\mu$ l *Primer Mix* zusammen und wurde für 15 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde zur Inaktivierung des Enzyms die hergestellte cDNA für 3 min bei 95°C erhitzt. Die neu

synthetisierte cDNA konnte nun direkt für eine rt-qPCR verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

### 2.14.3 Realtime-qPCR

Für den Transkriptionsnachweis mittels quantitativer realtime PCR wurden der *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* von *Thermo Scientific* (#K0223) verwendet. Zu 10µl MasterMix wurden 7,2µl *RNase freies Wasser* hinzugefügt. Der Master Mix beinhaltet dabei *Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase* und *dNTPs*. Zu diesem Volumen von 17,2µl wurde 1µl der hergestellten cDNA in der Konzentration 20ng/µl hinzugefügt. Es wurden 1,8µl Primermix (0,9µl *forward* und 0,9µl *reverse primer*) für das zu untersuchende Transkript (siehe Primerliste Abschnitt 2.11) hinzugegeben. Die Analyse erfolgte in der Regel auf 96-well Platten.

Für alle Experimente wurde das StepOne Plus Real-Time PCR Detection System von Applied Biosystems verwendet. Zunächst wurde bei 95°C für 10 min die taq-Polymerase aktiviert und darauf folgten 40 Zyklen mit 15 sec. bei 95°C zur Denaturierung der DNA und 60 sec. bei 60°C zur Amplifizierung. Dabei wurde die zunehmende Fluoreszenz durch SYBR Green 1, welches an doppelsträngige DNA bindet, detektiert. Die Spezifität wurde durch die Schmelzpunktkurve analysiert, indem das Reaktionsgemisch am Ende des Programms zunächst für 15 sec. auf 95°C und anschließend für 60 sec. auf 60°C erhitzt wurde. Für die Ermittlung des Schmelzpunktes wurde die Temperatur pro 15 sec. um 0.3°C bis 90°C erhöht. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Platten zu gewährleisten, wurde auf jeder 96-well-Mikrotiterplatte ein Kalibrator analysiert. Dabei handelt es sich um cDNA, die aus der Leber zweier Mäuse gewonnen wurde und auf allen qPCR Platten zum Vergleich eingesetzt wurde.

Als Referenzgen wurde das durch *Microarray analysis* ermittelte *Nuclear migration protein nudC* (NUDC) verwendet, da dieses in der DNA-Microarray Analyse von Skelettmuskulatur und Herz bei unterschiedlichen Bedingungen eine stabile Expression mit nur geringen Expressionsunterschieden aufwies. Nach der Analyse verschiedener Referenzgene in der Leber durch Mirjam Pfeffer hat sich dies auch dort für NUDC bestätigt.

### 2.14.4 Analyse der Genexpression

Zur Analyse der Genexpression wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die  $\Delta\Delta C_t$ - Methode sowie die  $X_0$  – Methode. Für beide Analysen wurde ein

Referenzgen benötigt, um verschiedene Zeitpunkte sowie Bedingungen vergleichbar zu machen. Während mit dem  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert nur der *fold change* betrachtet werden kann, werden bei der  $X_0$  – Methode auch das Expressionsniveau sowie Standardabweichungen berechnet. Es wurden immer beide Analysen angefertigt.

#### 2.14.5 $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode

Zur Auswertung der RT-qPCR wurde die relative Quantifizierung mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewendet (Livak und Schmittgen 2001). Mit Hilfe der StepOne Software v2.2.2 wurde der Ct-Wert bei *threshold*=1 ermittelt. Daraufhin wurde der Ct-Wert des Referenzgens (NUDC) vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen. Aus den erhaltenen Differenzen wurde ein Mittelwert der beiden Gruppen (KO und Kontroll-Gruppe) berechnet und anschließend voneinander subtrahiert um den  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu erhalten. Dieser wurde dann zur relativen Berechnung der Zu- beziehungsweise Abnahme der Genexpression in die Gleichung  $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  eingesetzt. Dabei wurden Veränderungen der mRNA-Expression  $\geq 2$  als relevanter Unterschied gewertet.

#### 2.14.6 $X_0$ – Methode

Des Weiteren wurde die  $X_0$  -Methode zur relativen Quantifizierung der PCR angewendet (Thomsen u. a. 2010). Die exponentielle Amplifikation wird dabei mit der Gleichung  $X_n = X_0 \times (1+E_{\text{amp}})^n$  beschrieben. Dabei ist  $X_0$  die Ausgangsmenge der *target* Moleküle,  $E_{\text{amp}}$  die Effizienz der Amplifikation,  $n$  die Zykluszahl und  $X_n$  die Anzahl an Target Molekülen bei dem Zyklus  $n$  darstellt.

Der Ct-Wert definiert dabei den Zyklus, bei welchem die amplifizierte *target*-Molekülmenge  $X_n$ , einen bestimmten *threshold* erreicht. Der Wert  $X_n(\text{Ct-Wert})$  wurde mittels eines manuell gesetzten  $n$  in der linearen Phase der Gentranskriptionsexpression bestimmt. Für  $E_{\text{amp}}$  wurde 1 gewählt(= 100% Effizienz der qPCR), wodurch mit dem gemessenen Ct der Wert für  $X_0$  mit folgender Gleichung berechnet werden kann:

$$X_0 = (1 + E_{\text{amp}})^{-\text{Ct}}$$

$X_0$  wurde im Anschluss wiederum auf den  $X_0$ -Wert von NUDC bezogen und die KO- und Kontrollgruppen miteinander verglichen.

### 2.14.7 Microarray Analyse

Für die *microarray* Analyse wurden iCmp38MAPK $\alpha$  KO Mäuse nach 48h AngII verwendet (n=4 pro Gruppe (Kontrolle 48h AngII, KO 48h AngII)). Diese waren zum Zeitpunkt der Analyse fünf Monate alt. Die mRNA wurde wie in Abschnitt 2.14.1 gewonnen und zusätzlich mit DNase behandelt um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Anschließend wurde die mRNA auf eine Konzentration von 100ng/ $\mu$ l gebracht und zu Dr. Patrick Petzsch ins Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich Heine Universität gegeben. Dieser überprüfte die Integrität der RNA durch die Messung der *RNA integrity number* (RIN), indem er die RNA Qualität durch Messung ihres ribosomalen 18S zu 28S Verhältnisses prüfte. Der RIN- Wert nimmt dabei Zahlen von 1 bis 10 an, wobei 1 die höchste Degradierung und 10 für intakte RNA steht (Schroeder u. a. 2006). Für die Analyse selbst ist ein RIN Wert zwischen 8 und 10 erstrebenswert. Im Anschluss wurde die mRNA von Dr. Patrick Petzsch für die *microarray* Analyse verwendet.

Deren Ergebnisse wurden im Anschluss mit dem *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) Programm untersucht. Damit wurde eine Signalweganalyse mit signifikant veränderten Genen ( $p < 0,05$ ) der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO nach 48h AngII angefertigt.

## 2.15 Arbeit mit Proteinen

### 2.15.1 Proteinisolierung aus Lebergewebe

Die Gewinnung der Proteine aus dem Lebergewebe erfolgte durch die Zugabe von 1ml Lysispuffer pro Gewebeprobe. Der Proteinextrakt wurde davor mit einem Protease- sowie einem Phosphataseinhibitormix im Verhältnis 1:100 versehen. Bei einer Gesamtmenge von 10ml Lysispuffer wurden die Protease-(*complete tablets mini*) und Phosphataseinhibitoren (*PhosSTOP*) von Roche in Tablettenform zugesetzt. Danach wurde das Gewebe mit einem Gewebemixstab homogenisiert. Der Proteinrohextrakt wurde bei 4°C für 10min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Gewebereste abzutrennen.

### 2.15.2 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der Proteine wurde mit dem *BCA-Protein-Assay Kit* von Thermo-Scientific durchgeführt. Dabei wurde als Standard eine aufsteigende Vergleichsreihe, die sich aus 9 verschiedenen BSA-Konzentrationen (0-2000 $\mu$ l/ml) in

Lysispuffer zusammensetzt, aufgetragen. Im Anschluss wurden die homogenisierten Proben im Verhältnis 1:5 (5µl Probe und 20µl Lysispuffer) und 1:10 (2,5µl Probe und 22,5µl Lysispuffer) auf eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Proben wurden mit 200µl Reagenzlösung versehen und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption bei 577 nm wurde im Elisa-Reader SpectraCount mit dem Computerprogramm PlateReader V3.0 gemessen. Anschließend wurden die hergestellten Proteinlösungen auf eine Konzentration von 2µg/µl gebracht. Zudem wurden sie für 5 min bei 95°C in Laemmli-puffer erhitzt, um die Proteine mit dem darin enthaltenen Dithiotreitol (DTT) zu denaturieren und mit SDS (Natriumdodecylsulfat) eine negative Ladung zu erzeugen. Durch diesen Schritt wurde sichergestellt, dass die darauffolgende Auftrennung der Proteine von ihrem Molekulargewicht abhängig ist.

### **2.15.3 Elektrophoretische Auftrennung der Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Das SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus einem 2,5% Sammelgel (pH 6,8) zur Stappellung der Proteine („*stacking*“-Effekt) zu einer schmalen Bande und dem 10% Trenngel (pH 8,8) zur Auftrennung der Proteine entlang ihres Molekulargewichts zusammen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem *BIO-RAD Mini-Protean Tetra System* in SDS-PAGE-Laufpuffer bei 200V. Die Geltaschen wurden abhängig vom eingesetzten primären Antikörper mit 20-100µg Protein beladen. Als Vergleichsstandard für die Proteingröße diente der *PageRuler Prestained Protein Ladder* von Thermo Scientific (10-170kD).

### **2.15.4 Übertragung des Gels und Antikörperzugabe**

Die Proteine, die durch die Gelelektrophorese entlang ihrer Größe aufgetrennt wurden, wurden mit Hilfe des *PIERCEG2 Fast Blotter* von Thermo Scientific nach dem Semi-dry Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Es wurde ausgehend von der Anodenplatte 2 Gel-Blotting-Papiere mit Anodenpuffer, die Nitrozellulosemembran (*Whatman*), das hergestellte Gel und 2 Gel-Blotting-Papiere mit Kathodenpuffer gestapelt und die Proteine bei 25V und 1,3 A für eine Dauer von 7 min übertragen. Danach wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in eine 1:1 Lösung aus TBS und *Odyssey Blocking Puffer* von LI-COR zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen gegeben. Der primäre Antikörper wurde im vom Hersteller vorgegeben Verhältnis in 5% BSA und TBST auf die Membran pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden drei Waschschrte in TBST für je 10 min durchgeführt und

anschließend der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben. Dabei handelt es sich um Antikörper gegen Maus oder Kaninchen. Zur Detektion waren diese Antikörper mit Fluorophor markiert. Darauf folgten zwei Waschschrte für die Dauer von 5min in TBST und einer in TBS.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit dem LI-COR Odyssey-Gerät und dem Programm Odyssey 2.1 und V3.0. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm Image Studio Lite 5.0 von LICOR.

## **2.16 Glykogenbestimmung**

Die Bestimmung des Glykogengehalts erfolgte mit einem kommerziellen Kit von Sigma. Zunächst wurde 10mg Lebergewebe in 100µl Wasser homogenisiert, und anschließend für 5 min zur Inaktivierung von Enzymen erhitzt. Die Proben wurden dann für 5 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Anschließend wurde der Glykogenstandard in eine 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Darauf folgten die zu messenden Proben. Um ein Probenvolumen von 50µl zu erreichen wurde ein *Hydrolysis Buffer* hinzugefügt. Im Anschluss wurde zu diesem Volumen von 50µl 1µl *Hydrolysis Enzyme Mix* pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurde 50µl *Master Reaction Mix* in jedes *well* gegeben und erneut 30 min bei Raumtemperatur abgewartet. Dabei hydrolysiert die Glucoseamylase Glykogen zu Glucose, welches anschließend oxidiert und mit OxiRed reagiert. Hierzu wurde die kolorimetrische Absorption bei 577nm im Elisa-Reader SpectraCount mit dem Computerprogramm PlateReader V3.0 gemessen. Diese ist proportional zum Glykogengehalt. Die Glykogenkonzentration konnte mithilfe einer Eichgerade ermittelt werden.

## **2.17 Histologie**

### **2.17.1 Anfertigung der Gewebeblöcke und Schnitte**

Die Gewinnung des Gewebes für die Histologie erfolgte durch die Entnahme von Gewebe des rechten Leberlappens. Das entnommene Gewebe wurde zunächst in *Odyssey Blocking Puffer* (PBS) gewaschen und anschließend in eine Aluminium-Form mit *TissueTek Compound Einbettmedium (Weckert)* gegeben, wobei die Orientierung durch die Markierung der Seite der Schnittkante immer gleich war. Anschließend wurde

die Form in -30 bis -40°C gekühltes 2-Methylbutan zur Schockgefrierung gegeben. Bis zur weiteren Verarbeitung des Gewebes wurde dieses bei -80°C gelagert.

Die Gewebeblöcke wurden vor der Aufarbeitung mit dem Kyoostat auf -20°C erwärmt. Anschließend wurden bei -22°C im Kyromikrotom 8µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Es wurden zwei Schnitte pro Objektträger aufgezogen. Die Objektträger wurden bei -20°C mit Trockenperlen bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### **2.17.2 Ölrot-O-Färbung**

Die Ölrot-O-Färbung wurde zur Darstellung der Lipide nach „Romeis“ 16. Auflage 1968 (#1056.) angefertigt. Die getrockneten Gefrierschnitte wurden zunächst für 10min mit Formol-Calcium nach Baker fixiert und daraufhin dreimal für 10 min in Aqua bidest gewaschen. Die gewaschenen Schnitte wurden nun für 5 min in 60% Isopropanol gegeben und anschließend für 10 min in die filtrierte Ölrot-O- Gebrauchslösung gestellt. Daraufhin wurden sie dreimal für 5 min in Aqua bidest gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel (Aquamount) eingedeckt.

### **2.17.3 Immunfluoreszenzfärbung (Ly6G, SMA, WGA)**

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden dabei nach Emde et al 2014 angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden zunächst mit einem PAP-Pen Fettstift umrandet und anschließend mit 100µl 4% PFA pro Schnitt für zehn min fixiert. Nach der Fixierung wurden diese dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden eine h bei Raumtemperatur mit 100µl PBS mit 10% Normal Goat Serum (NGS) zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen und 0,2% Saponin für die Permeabilisierung der Zellmembran inkubiert. Darauf folgte die Zugabe des primären Antikörpers. Von diesem wurden 100µl in der vorgegebenen Verdünnung in 2% NGS und 0,2% Saponin in PBS auf einen der beiden Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der zweite Schnitt wurde als Negativkontrolle verwendet und weiterhin mit der Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für zehn min mit 0,2% Saponin in PBS gewaschen. Nun folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers. Von diesem wurde 100µl in der vorgegebenen Verdünnung (WGA 1:100, SMA 1:400 und Ly6G 1:50) in 2%NGS und 0,2% Saponin in PBS auf beide Schnitte gegeben und für 3-4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Schnitte wurden dann dreimal für je 15 min in PBS/0,2% Saponin und

einmal in PBS ohne Detergenz gewaschen. Das Eindecken erfolgte mit *Pro Long Gold antifade* Reagenz mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne.

#### **2.17.4 Mikroskopie**

Die Gewebeschnitte wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Keyence BZ 9000 mikroskopiert. Bei diesem konnten vier verschiedene Filter (blau- (340nm), grün- (488nm), rot- (590nm) fluoreszierend und Hellfeld) eingestellt werden. Zudem wurde die Auszählung und Ausmessung der Schnitte mit der Analysesoftware ImageJ durchgeführt.

#### **2.18 Statistik**

All Daten wurden mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Zur Auswertung wurden dabei die Programme Microsoft Office Professional Plus 2013 Excel und Graph Pad Prism 5 benutzt. Die Analyse zweier Gruppen wurde dabei mit dem t-Test ausgewertet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der *one-way-ANOVA* gefolgt von *Tukey post test* angewendet. Unterschiede von  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant gewertet (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.3) beschrieben ist die Herzinsuffizienz der iCmp38MAPK $\alpha$  KO Mäuse bereits nach einer frühen Zeitperiode von 48h AngII stark ausgeprägt sowie eine Interorgankommunikation mit dem *Musculus plantaris* eingetreten. Deshalb wurde diese Zeitperiode gewählt, um den Einfluss des Herzphänotyps auf die Leber Im Sinne eines cardiohepatischen Syndroms zu analysieren. Hierzu wurde eine molekulare Analyse angefertigt, sowie die Proteinexpression regulatorischer Enzyme und morphologische Veränderungen nach 48h Angiotensin II untersucht.

#### 3.1 Proteinexpression der p38MAPKinase $\alpha$ in der Leber

Zunächst wurde eine Proteinexpressionsanalyse angefertigt, um einen möglichen Effekt das induzierbaren Kardiomyozyten spezifischen KO auf die Expression der p38MAPKinase $\alpha$  in der Leber auszuschließen. Abbildung 6 zeigt dabei das Ergebnis der Westernblotanalyse von Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO des Herzens und der Leber unter basalen Bedingungen. Die Proteinexpression der p38MAPKinase $\alpha$  ist in der Leber im Gegensatz zum Herzen nicht beeinträchtigt, da es keinen Expressionsunterschied zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO gibt. Dadurch wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der p38MAPKinase $\alpha$  nicht die Leber betrifft und somit mögliche Veränderungen in der Leber als Folge einer Interorgankommunikation zwischen Herzphänotyp und Leber zu betrachten sind.

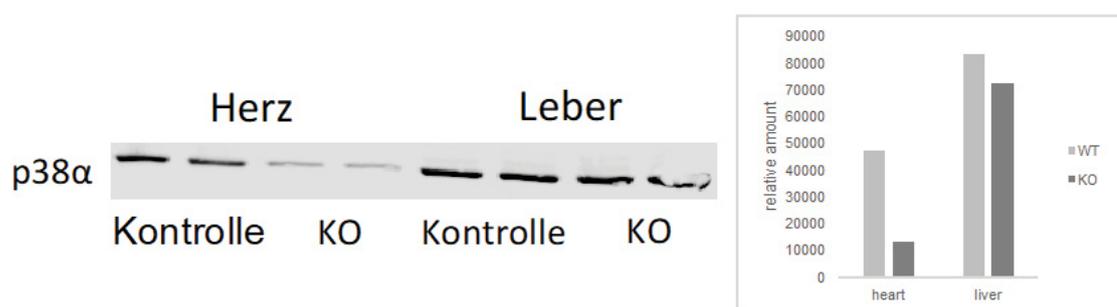


Abbildung 6: Westernblotanalyse der Proteinexpression der p38MAPKinase $\alpha$  in der Leber (Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO des Herzens und der Leber unter basalen Bedingungen)

### 3.2 Analyse der Genexpression in der Leber nach 48h AngII

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die beschriebene Herzinsuffizienz und die damit verbundene inflammatorische Antwort des Herzens (Bottermann et al., unveröffentlichte Daten) einen Einfluss auf die Genexpression der Leber nach 48h AngII hat. Dabei wurden die Unterschiede auf Ebene der Genexpression der Kontrolltiere zu den iCmp38MAPK $\alpha$  KO mittels RT-qPCR analysiert. Es wurden verschiedene inflammatorische Gene und solche, die in den Glucose- und Fettsäuremetabolismus involviert sind, auf mRNA Ebene analysiert. Die Ergebnisse wurden im Zeitverlauf mit der X<sub>0</sub> – Methode dargestellt und Basaltiere, die keiner 48h AngII Gabe ausgesetzt waren, mit Mäusen, die 48h AngII erhalten haben, verglichen.

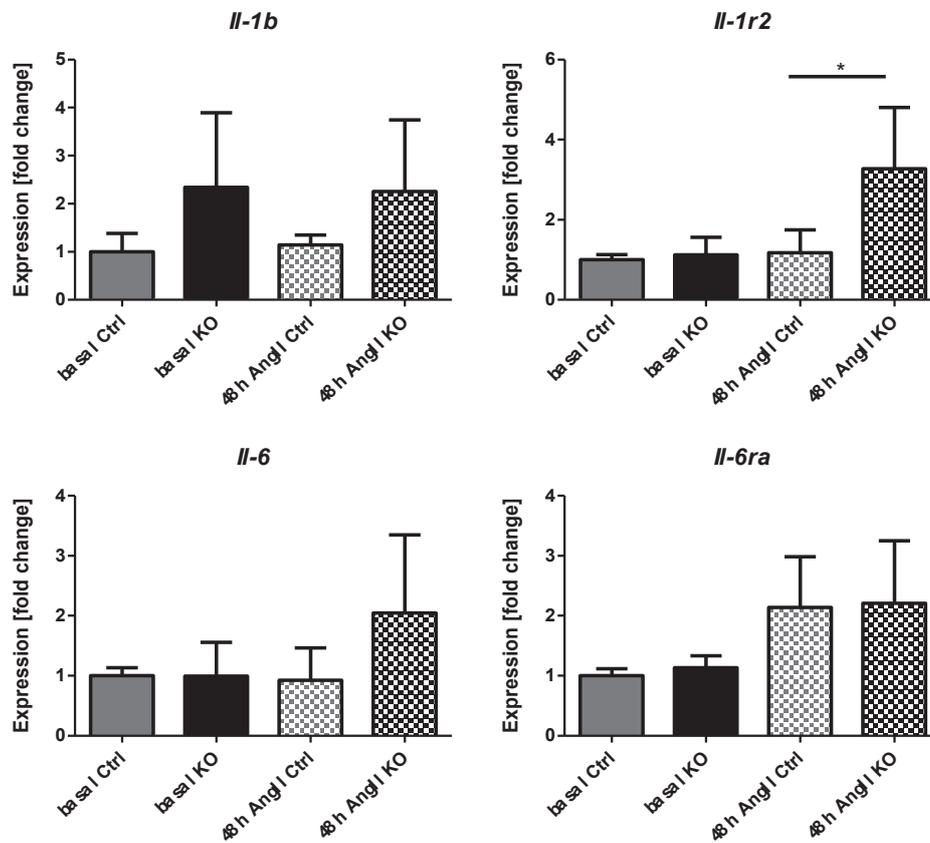
#### 3.2.1 Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Als Referenzgen für die Genexpressionanalyse diente dabei NUDC, welches unter verschiedenen Bedingungen sowohl in den Kontrollen als auch den iCmp38MAPK $\alpha$  KO unverändert exprimiert wurde. Um die Platten miteinander vergleichbar zu machen, wurde ein Kalibrator auf jede Platte gegeben. Dabei handelt es sich um RNA, die aus verschiedenen Mäusen unter unterschiedlichen Bedingungen isoliert wurde. Diese wurde in 1ml cDNA umgeschrieben und anschließend in 20 $\mu$ l Proben aliquotiert. Der Kallibrator wurde auf jeder Platte und für jedes Gen gemessen, um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu ermitteln. Die Analyse von 18 verschiedenen Platten für das Referenzgen NUDC ergab eine durchschnittliche Abweichung von 1,9% ( $C_t = 22,92 \pm 0,43, n = 18$ ). Diese geringe Abweichung lässt sich durch Pipettierfehler erklären. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit zwischen den Platten wurde das Ergebnis aus der Kalibrator-Messung nicht zur Berechnung der Expressionswerte herangezogen.

#### 3.2.2 Inflammatorische Antwort in der Leber nach 48h AngII

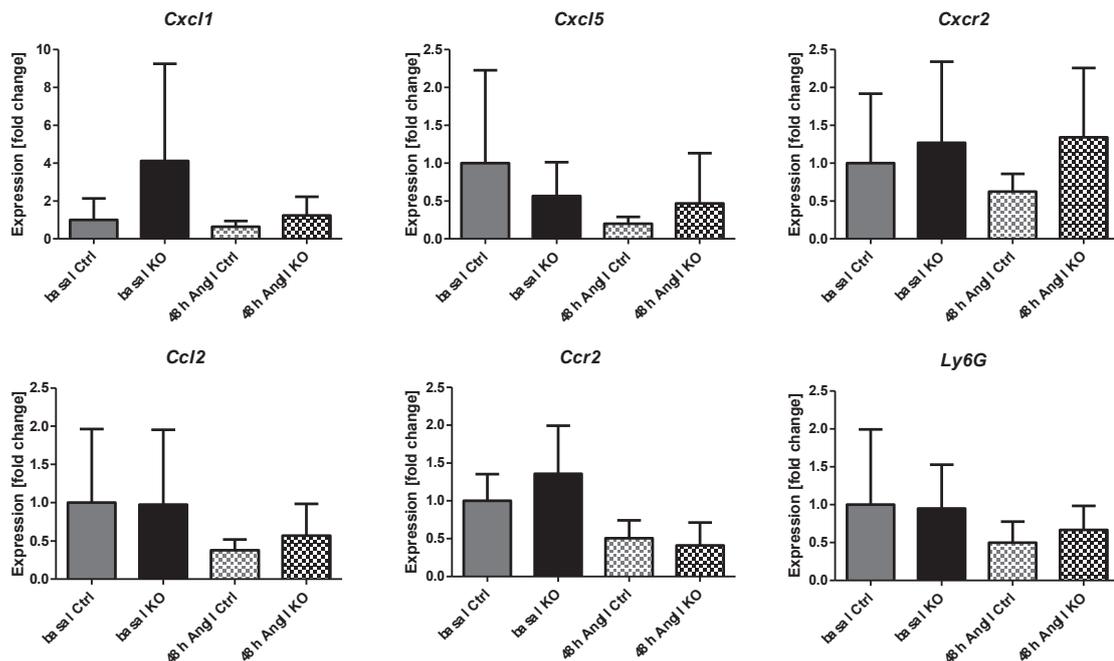
Zunächst wurden proinflammatorische Gene untersucht, um eine mögliche systemische Auswirkung der systolischen Herzinsuffizienz der iCmp38MAPK $\alpha$  KO in Hinblick auf erhöhte Entzündungssignale im Lebergewebe zu sehen. Dabei wurden jene betrachtet, die im Herzen (Bottermann et al., unveröffentlichte Daten) sowie im Skelettmuskel (Leitner, 2017) signifikant hochreguliert waren. Abbildung 7 zeigt dabei die Analyse der Interleukine Il6 und Il1a als Induktoren einer lokalen Entzündungsreaktion sowie deren Rezeptoren Il6ra und Il1r2. Hier zeigte der Rezeptor Il1r2 in den iCmp38MAPK $\alpha$

KO nach 48h AngII eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen nach 48h AngII.



**Abbildung 7:** Relative Quantifizierung der Genexpression von inflammatorischen Signalen (IL6, IL1b, IL6ra und IL1r2) in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO basal und nach 48hAngII. X0 – Methode, n=4, \*p< 0,05)

Abbildung 8 stellt die Ergebnisse der Chemokine Cxcl1, Cxcl5 und Ccl2 als auch deren Rezeptoren Cxcr2 und Ccr2 dar. Als weiterer Entzündungsmarker wurde die Expression von *lymphocyte antigen 6 complex* (Ly6G) als Marker für neutrophile Granulozyten betrachtet.



**Abbildung 8: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen** (Cxcr2, Ccr2, Ccl2, Cxcl5, Cxcl1 und Ly6G in der Leber der Kontrolle und iCMp38MAPK $\alpha$  KO basal und nach 48hAngII. X<sub>0</sub> – Methode, n=4, \*p<0,05)

Die Auswertung der proinflammatorischen Signale ergab bis auf den Rezeptor Il1r2, welcher bei den 48h iCMp38MAPK $\alpha$  KO um den Faktor  $\Delta\Delta Ct = \pm 2,77$  signifikant hochreguliert war, keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der inflammatorischen Signale.

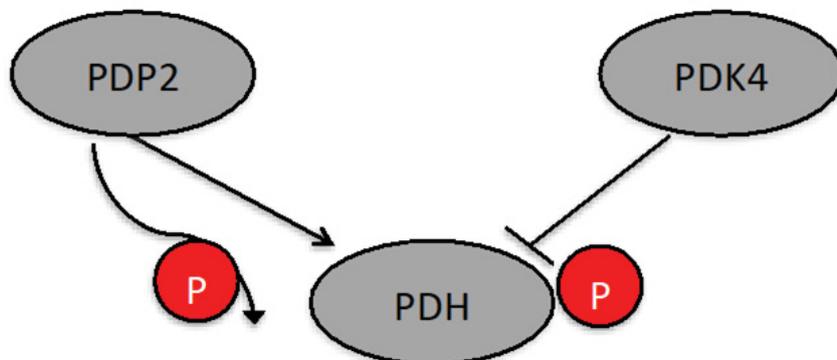
Daraus konnte gefolgert werden, dass nach einer Zeitperiode von 48h AngII in der Leber im Gegensatz zum Herzen, in welchem bereits nach 24h AngII ein Unterschied auf Ebene der Genexpression zu sehen ist, noch keine inflammatorischen Veränderungen eingetreten sind.

### 3.2.3 Metabolische Veränderungen in der Genexpression nach 48h AngII

Unter dem Zustand der kardialen Kachexie, welcher nach 48h AngII in den iCMp38MAPK $\alpha$  KO eingetreten ist (Leitner, 2017), würde man zunächst erwarten, dass der Stoffwechsel des Organismus von Anabolismus zu Katabolismus umstellt (Strassburg, Springer und Anker 2005).

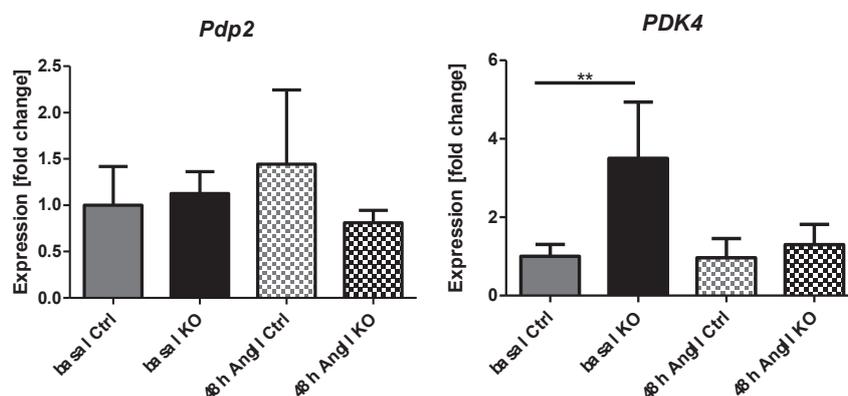
Diesbezüglich wurde analysiert, ob in der Leber nach 48h AngII auch Veränderungen in den iCMp38MAPK $\alpha$  KO ersichtlich sind, die auf eine Umstellung von Anabolismus zu

Katabolismus deuten lassen. Dabei wurden zunächst metabolische Enzyme betrachtet. Die Pyruvatdehydrogenase (PDH) (Abb. 9) ist in die Energiegewinnung aus Glucose involviert, indem sie eine Verbindung zwischen Citratcyclus und Glykolyse herstellt.



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Regulation der Pyruvatdehydrogenase (Beeinflussung durch die Pyruvatdehydrogenasephosphatase 2 sowie die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4)

Für die Regulation dieses Enzyms (Abb. 9) ist die Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK4) verantwortlich, indem sie diese phosphoryliert und damit inaktiviert. Die Phosphopyruvatdehydrogenase-Phosphatase 2 (Pdp2) wirkt dem entgegen, indem sie die reversible Phosphorylierung der PDH rückgängig macht und sie somit wieder in einen aktiven Zustand versetzt.



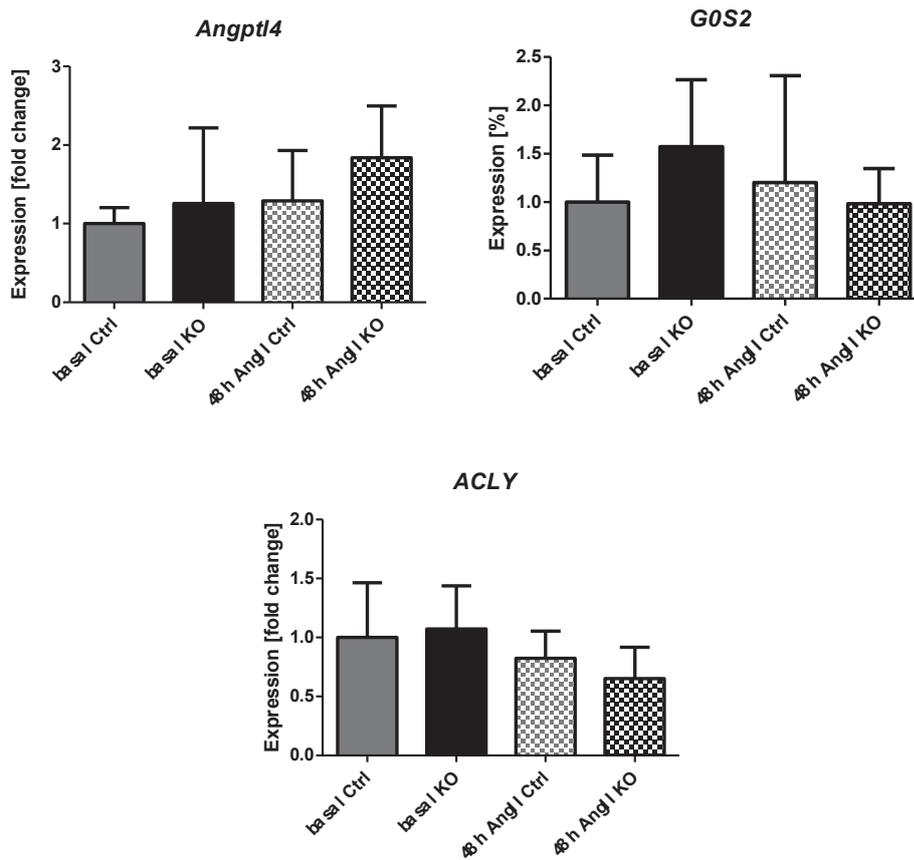
**Abbildung 10:** Relative Quantifizierung der Genexpression der Pdp2 und PDK4 (In der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO basal und nach 48hAngII. X0 – Methode, n=4, \*\*p<0,01)

Bis auf das Enzym PDK4, das unter basalen Bedingungen signifikant hochreguliert war, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen der Regulatorenzyme der PDH auf Ebene der Genexpression festgestellt werden (Abb. 10).

### 3.2.4 Fettstoffwechsel

Hinsichtlich einer Umstellung von Anabolismus zu Katabolismus würde man auch metabolische Veränderungen der Genexpression des Fettstoffwechsels erwarten. Kato u. a. 2012 betrachteten die Leberfunktion erstmals unter dem Aspekt des veränderten Metabolismus unter Herzinsuffizienz in einem Tiermodell. Sie sahen eine erhöhte Expression von lipogenetischen Genen. Des Weiteren stellten sie erhöhte Triglycerid Werte fest. (Vgl. Kato u. a. 2012)

Ebenso wurde in dieser Arbeit der Fettstoffwechsel der iCmp38MAPK $\alpha$  KO und ihn beeinflussende Faktoren untersucht. Die Veränderungen, die in der Skelettmuskulatur beobachtet wurden (Leitner, 2017), gleichen dabei Hungerbedingungen. Diesbezüglich wurden die in den Hungerstoffwechsel involvierten Faktoren *Angiopoietin-like 4* (Angptl4) und G0S2 betrachtet. Zunächst wurde Angptl4 analysiert, welches im Hungerzustand in Leber und Fettgewebe vermehrt exprimiert wird (Yoshida u. a. 2002). Es nimmt auf den Fettstoffwechsel Einfluss, indem es die Lipoproteinlipase (LPL) hemmt. Als weiteres wurde die Expression des Proteins G0S2 betrachtet. Dieses wird im Fettgewebe im Hungerzustand vermindert exprimiert, da es die Adipozyten Triglycerid-Lipase (ATGL) hemmt (Yang u. a. 2010). Die ATGL ist für den ersten Schritt der Lipolyse verantwortlich. In der Leber wird G0S2 im Hungerzustand und unter dem Transkriptionsfaktor PPAR  $\alpha$  (*peroxisome-proliferator-activated receptor*) hingegen hochreguliert (Zandbergen u. a. 2005). Folglich würde man unter Herzinsuffizienz eine vermehrte Expression von Angptl4 und G0S2 erwarten. Zudem wurde auch eine Genexpressionsanalyse der ATP-Citrat-Lyase (ACLY) durchgeführt. Diese ist für die Bereitstellung von Acetyl-CoA für die Lipogenese verantwortlich.

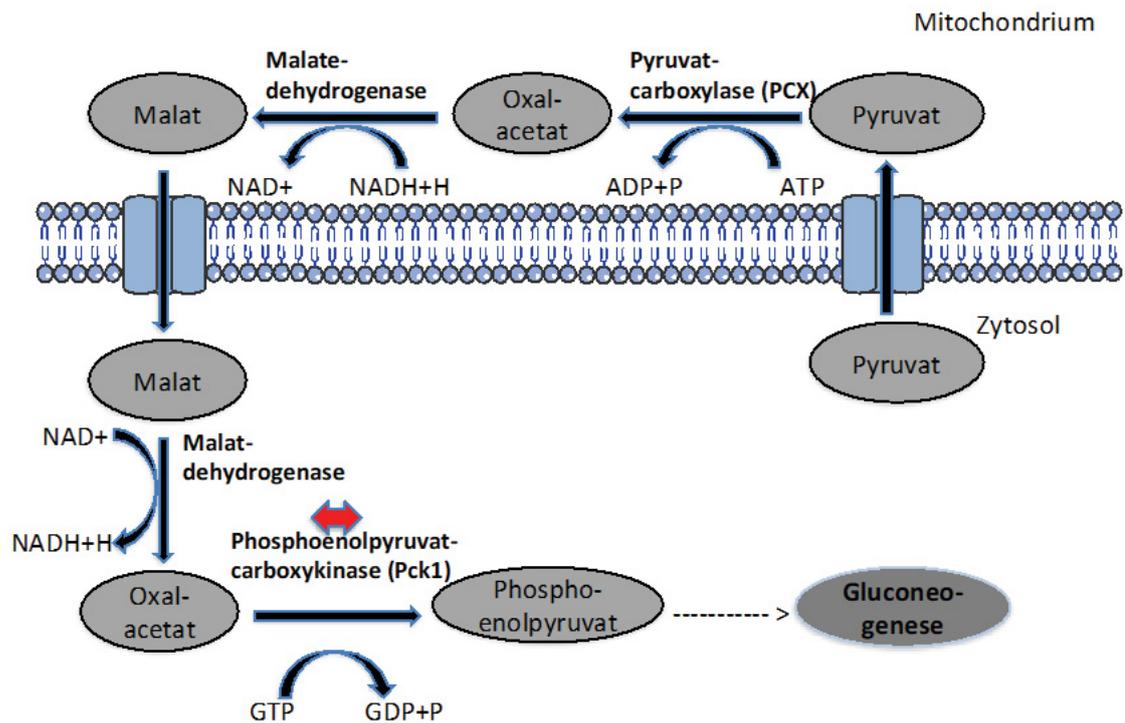


**Abbildung 11: Relative Quantifizierung der Gene des Fettsäuremetabolismus (Angptl4, G0S2 und ACLY in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO basal und nach 48hAngII. X<sub>0</sub> – Methode, n=4)**

In Abbildung 11 wird die Genexpressionsanalyse von Angptl4, G0S2 und ACLY dargestellt, wobei alle drei Gene des Fettstoffwechsels, sowohl die Marker für den Hungerzustand als auch die Lipogenese, keine Veränderung zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII zeigten.

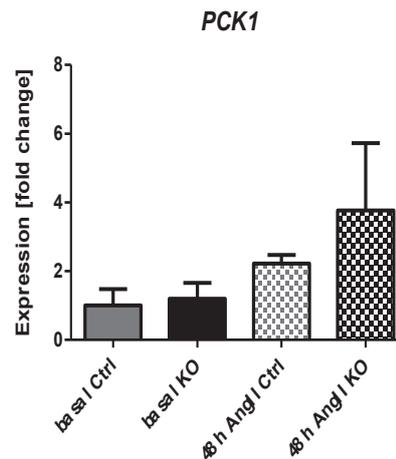
### 3.2.5 Glucosestoffwechsel

Im Anschluss wurden Veränderungen im Glucosestoffwechsel betrachtet. Dabei würde man unter dem Zustand der Herzinsuffizienz vermehrte Gluconeogenese in der Leber zur Energiegewinnung erwarten. Um dies zu beurteilen, wurde ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Gluconeogenese die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase 1 (Pck1) betrachtet (siehe Abb.12).



**Abbildung 12:** Signalweg der Gluconeogenese mit den geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen (modifiziert nach Biochemie und Pathobiochemie, Löffler/Petrides 2014, p 195)

Jedoch konnte auch hier kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII gemessen werden (Abb.13). Es wurde jedoch eine tendenzielle Expressionserhöhung der Phosphopyruvatcarboxykinase 1 der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nachgewiesen.



**Abbildung 13: Relative Quantifizierung eines geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Gluconeogenese auf Genexpressionsebene** (Pck1 in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO basal und nach 48hAngII. X<sub>0</sub> – Methode, n=4)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach 48h AngII kein signifikanter Einfluss des Herzphänotyps auf die Genexpression der untersuchten Gene in der Leber, sowohl hinsichtlich einer inflammatorischen Antwort als auch in der Umstellung des Organismus von Anabolismus zu Katabolismus festgestellt werden konnte.

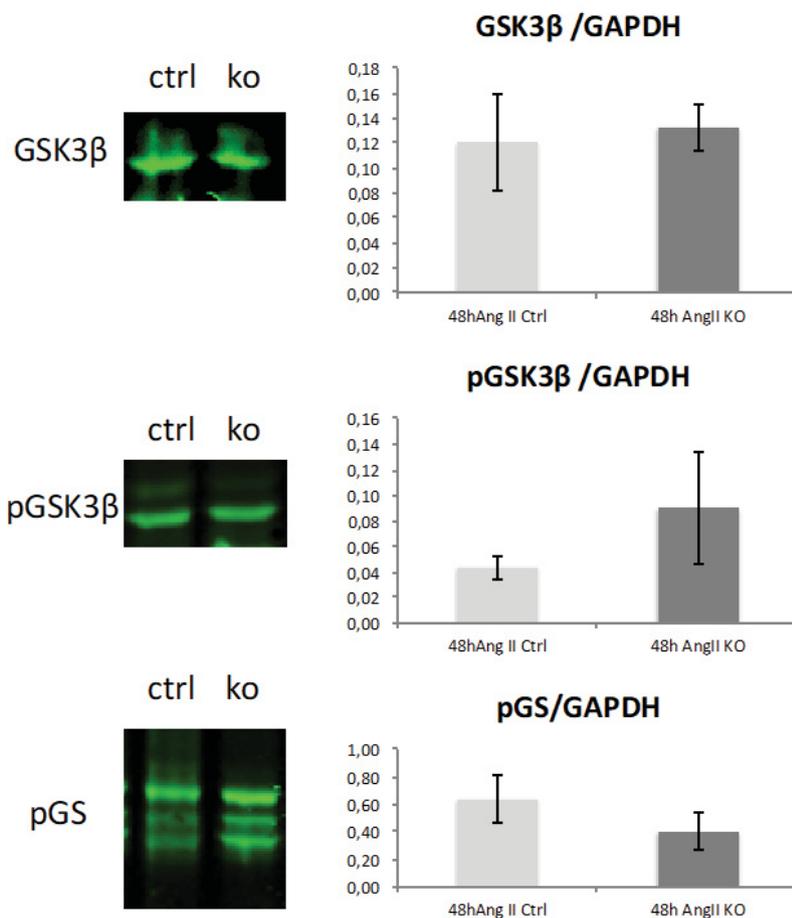
### 3.3 Analyse der Phosphorylierungsmuster wichtiger Enzyme nach 48h AngII

Die Stoffwechselwege und der Energiemetabolismus der Leber wurde neben der mRNA- auch auf Proteinebene untersucht, indem eine Westerblotanalyse zu Enzymen und deren Phosphorylierungsmuster bei den 48h AngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO angefertigt wurden.

#### 3.3.1 Glucosemetabolismus

Dabei wurde diesmal nicht wie auf der Genexpressionsebene die Gluconeogenese (Vgl. Abschnitt 3.2.4), sondern die Glykogensynthese analysiert. Diese würde man unter dem Zustand des vermehrten Energieverbrauchs herunterreguliert erwarten. Abbildung 14 zeigt dabei die Untersuchung des Phosphorylierungsmusters des Regulatorenzym Glykogensynthasekinase3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Dieses ist im phosphorylierten Zustand inaktiv und im unphosphorylierten Zustand aktiv, in welchem es die Glykogensynthase (GS) inaktiviert. Diese ist folglich im phosphorylierten Zustand inaktiv. Unter Energieverbrauch würde man eine vermehrte Expression der unphosphorylierten

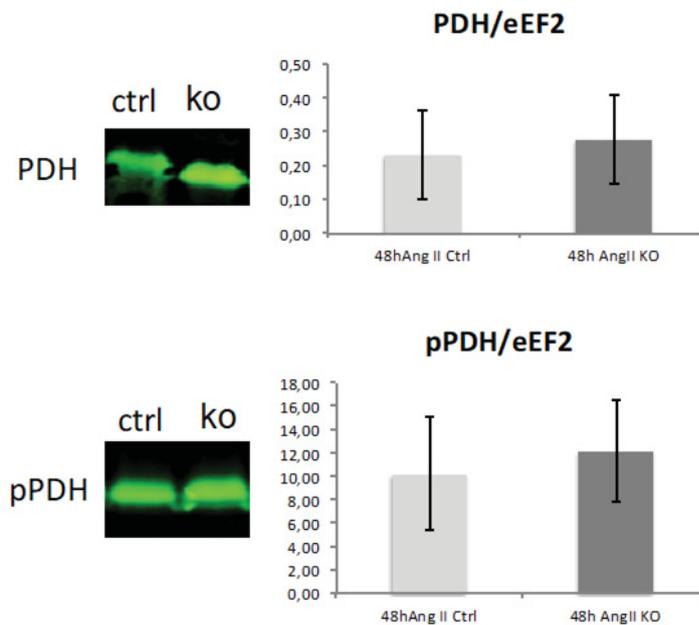
GSK3 $\beta$  und der phosphorylierten GS in der Leber der iCMp38MAPK $\alpha$  KO erwarten. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (Abb.14).



**Abbildung 14: Westernblotanalyse der Proteinexpression der Enzyme der Glykogensynthese (GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$  und pGS in der Leber der Kontrolle und iCMp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII. Als Standard diente GAPDH, n=5-6)**

### 3.3.2 Energiemetabolismus

Im Folgenden wurde das Phosphorylierungsmuster der Pyruvatdehydrogenase (PDH) analysiert. Deren Regulatorenzyme PDK4, welche die PDH phosphoryliert und somit inaktiviert, und Pdp2, die dieser entgegenwirkt, wurden bereits auf Genexpressionsebene analysiert (vgl. Abschnitt 3.2.2). Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Phosphorylierungsmusters der PDH in der Leber der iCMp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII festgestellt werden (Abb.15).



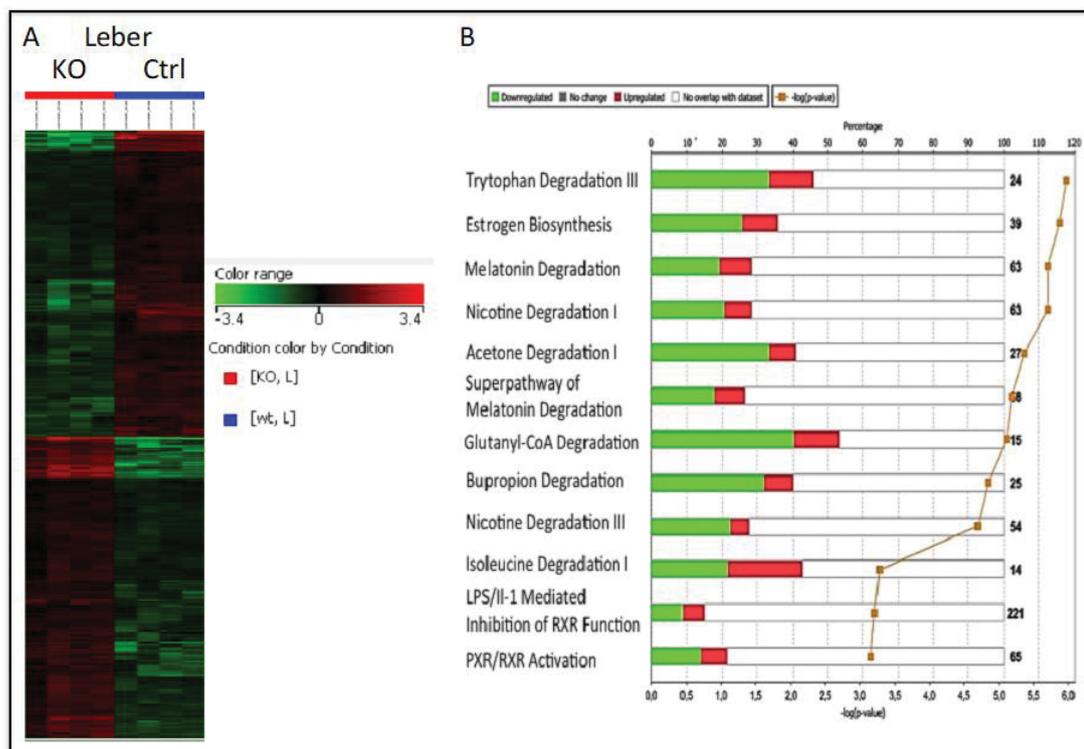
**Abbildung 15: Westernblotanalyse des Phosphorylierungsmuster der PDH** (PDH und pPDH in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII. Als Standard diente eEF2, n=5-6)

Daraus lässt sich schließen, dass auf Proteinebene kein signifikanter Einfluss der Herzinsuffizienz nach 48h AngII auf das Phosphorylierungsmuster der Enzyme in der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO besteht.

### 3.4 Microarray Expressionsanalyse der Leber nach 48h AngII

Aufgrund der geringen Veränderungen der bisherigen Analyse der Gen- und Proteinexpression der Leber der Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII stellte sich die Frage, ob die Leber nicht auf die Herzinsuffizienz reagiert oder ob zunächst die falschen Signalwege und Faktoren betrachtet wurden. Um dies zu beantworten, wurde eine *microarray* Genexpressionanalyse der Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO der Leber nach derselben Zeitperiode von 48h AngII angefertigt. Dies wurde mit dem Agilent 8x60K *Mouse Array* von Dr. Patrick Petzsch aus dem BMFZ angefertigt, welcher 60 000 verschiedene Transkripte detektiert.

Diese Analysen ergaben, dass die Herzinsuffizienz einen erheblichen Einfluss auf das Genexpressionsprofil der Leber hat, 2194 ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich exprimierte Transkripte zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO in der Leber nach 48h AngII gemessen wurden. Dieser Unterschied wird in Abbildung 16A deutlich. Die ‚heatmap‘ belegt ausgeprägte Unterschiede in der Genexpression zwischen Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII.



**Abbildung 16: Microarray Expressionsanalyse der Leber nach 48hAngII**

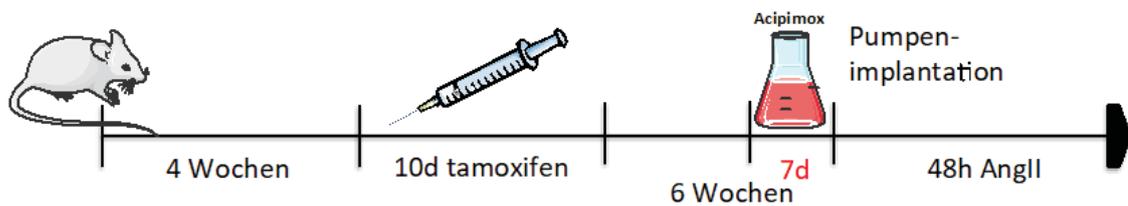
**A** Heatmap des Microarray der Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO der Leber nach 48h AngII **B** Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software Analyse der 12 am stärksten veränderten Stoffwechselwege der iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO der Leber nach 48h AngII

Um nun genauere Aussagen zu treffen welche Signal- und Stoffwechselwege dabei verändert sind, wurde mit Hilfe der IPA Software (*Qiagen*) eine Netzwerkanalyse angefertigt. In Abbildung 16B sind dabei die 12 Signalwege dargestellt, die die stärksten Veränderungen aufzeigen. Die zwei am meisten veränderten Signalwege stellen beispielsweise der Tryptophan Degradationsweg III und die Östrogen Biosynthese dar. Bei genauerer Analyse dieser Wege stellt sich heraus, dass vor allem unspezifische Monooxygenasen und CYP-Enzyme verändert sind. Es konnte in der IPA Analyse hinsichtlich inflammatorischen und metabolischen Stoffwechselwegen jedoch keine Veränderungen gezeigt werden.

Zu erwähnen ist zudem, dass die inflammatorischen und metabolischen Gene, die zuvor keinen Unterschied in der angefertigten qPCR zeigten (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2), auch in der *microarray* Analyse keinen Expressionsunterschied zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO in der Leber aufwiesen, so dass die erhobenen Daten mit einer unabhängigen Methode bestätigt wurden.

### 3.5 Hemmung der peripheren Lipolyse

Das Herz der iCmp38MAPK $\alpha$  KO zeigte nach 48hAngII neben der raschen Dilatation im Zeichen einer Herzinsuffizienz und der Veränderung der Genexpression auch morphologische Unterschiede (Bottermann et. al, unveröffentlichte Daten). Dabei sah man histologisch eine Lipidakkumulation mit einer sich anschließenden Infiltration von neutrophilen Granulozyten an derselben Lokalisation (Abb.2 C in Abschnitt 1.3). Diesbezüglich sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die *lipid droplets* am Herzen lokal synthetisiert werden oder von der Peripherie zum Herzen gelangen.



**Abbildung 17: Zeitliche Abfolge der Behandlung des induzierbaren iCmp38MAPK $\alpha$  KO (Hemmung der Lipolyse durch Acipimox und Behandlung mit 48hAngII)**

Dafür wurden die iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO mit dem Niacinderivat Acipimox behandelt, welches die periphere Lipolyse hemmt (Fuccella u. a. 1980). Dieses wurde 7 Tage vor Pumpenimplantation in einer Konzentration von 0,05% in das Trinkwasser der Mäuse gegeben (Abb.17).

Im Anschluss wurde untersucht, ob diese Hemmung der peripheren Lipolyse unter weiterhin rascher Entwicklung eines Herzinsuffizienz- Phänotyps nach 48hAngII auch einen Einfluss auf die Genexpression und den Metabolismus der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO hat.

#### 3.5.1 Genexpressionsanalyse der iCmp38MAPK $\alpha$ KO der Leber nach 48h AngII und Acipimox mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Es wurde auf Genexpressionsebene die Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII Behandlung ohne Behandlung unter Acipimox mit denen nach Behandlung unter Acipimox verglichen. Bei der Auswertung der Genexpressionsanalyse wird in Tabelle 1 deutlich, dass die 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox signifikante Unterschiede hinsichtlich Inflammationssignalen, Fettstoffwechsel, Gluconeogenese und Syntheseproduktion im Vergleich mit ihren Kontrollen aufwiesen. Als signifikante Veränderung mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde dabei ein *fold change* größer gleich zwei gewertet.

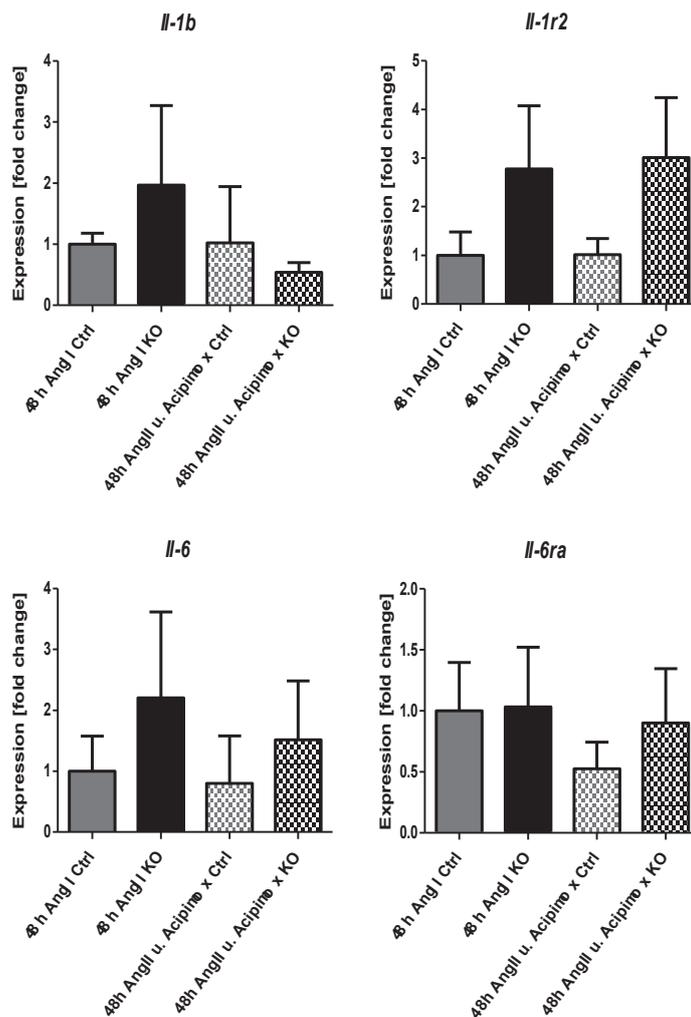
Glucose metabolism	fold change	
	48hAngII	48hAngII +Acipimox
	up/down	up/down
Pck1	-	2,0
PCX	-	-
<b>Fatty acid metabolism</b>		
G0S2	-	-
Angptl4	-	-
ACLY	-	2,6
Fasn	-	3,2
Srebf1	-	3,0
Srebf2	-	-
ACACA	-	-
ACACB	-	6,4
<b>Immune response</b>		
Il1b	-	-
Il1r2	-	2,8
Il6	-	2,2
Il6ra	-	-
Cxcr2	-	-
Cxcl5	-	2,9
Cxcl1	-	2,0
Ccr2	-	2,3

**Tabelle 1: Vergleich des *fold change* der Genexpression der inflammatorischen und metabolischen Gene (Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit (rechts) und ohne (links) Acipimox Behandlung.  $\Delta\Delta$ Ct-Methode, n=3-4); rot=hochreguliert, grün=herrunterreguliert**

### **3.5.2 Inflammatorische Antwort der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$ Kontrollen und KO nach 48hAngII und nach Behandlung unter Acipimox**

Um eine statistische Analyse durchführen zu können, wurden die erhobenen Daten auch mit der X<sub>0</sub> – Methode analysiert und ausgewertet.

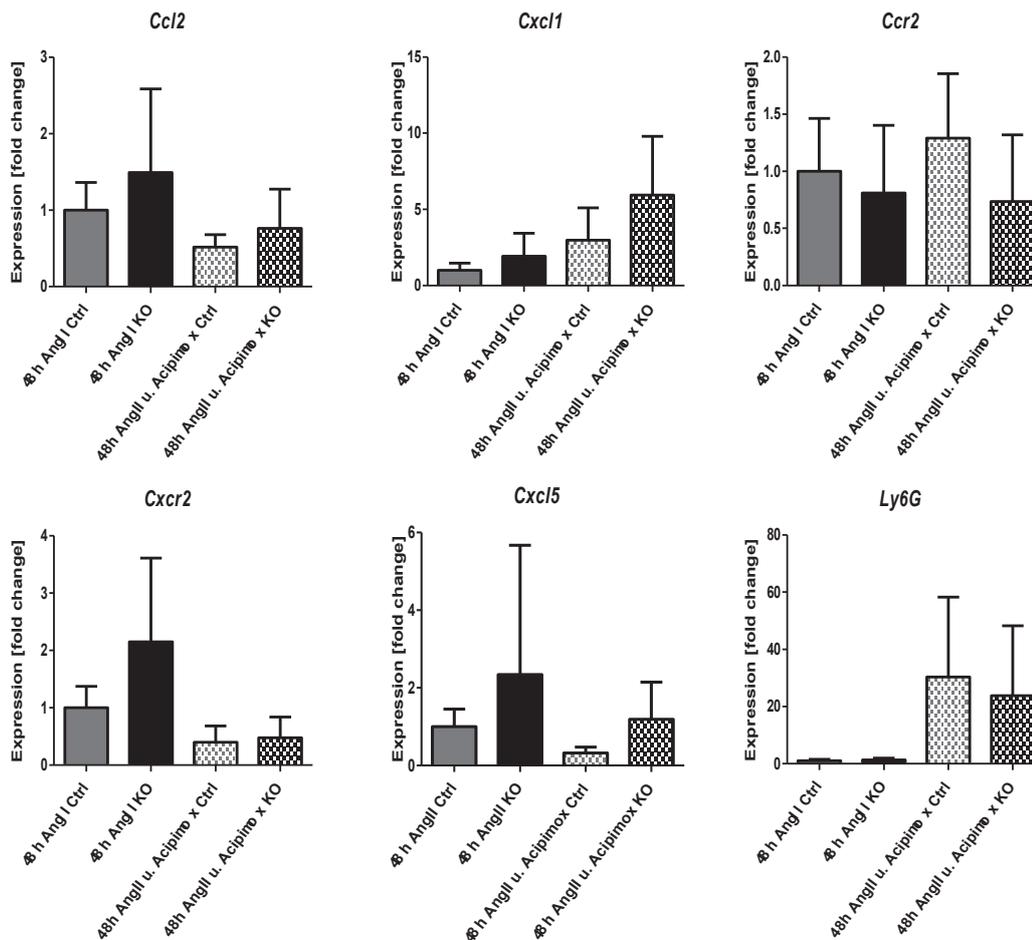
Dabei zeigt Abbildung 18 die Ergebnisse des Interleukin Il1 $\beta$  und dessen Rezeptor Il1r2, sowie Il6 und dessen Rezeptor Il6ra. Die Hochregulierung der Entzündungssignale IL1r2 und IL6 in den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox, die mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode (*fold change*  $\geq 2$ ) (Vgl. Abschnitt 3.5.1) festgestellt werden konnte, wurde auch für die entsprechenden Ergebnisse der X<sub>0</sub> – Methode in Abbildung 19 mit einer Steigerung der Expression gezeigt. Jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.



**Abbildung 18: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen (IL6, IL1b, Il6ra und Il1r2 in der Leber der Kontrolle und iCMp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Behandlung unter Axipimox. X0 – Methode, n 3-4)**

Abbildung 19 stellt die Analyse der Chemokine und deren Rezeptoren Cxcl5, Cxcl1, Ccl2, Ccr2 und Cxcr2, sowie den Granulozytenmarker Ly6G dar.

Die Hochregulation der Inflammationssignale Cxcl1 und Cxcl5 (Tabelle 1), die mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ( $fold\ change \geq 2$ ) gemessen wurde, erreicht auch hierbei mit der X0 – Methode nicht das Signifikanzniveau. Dennoch ist auch hier eine Erhöhung der Expression ersichtlich.

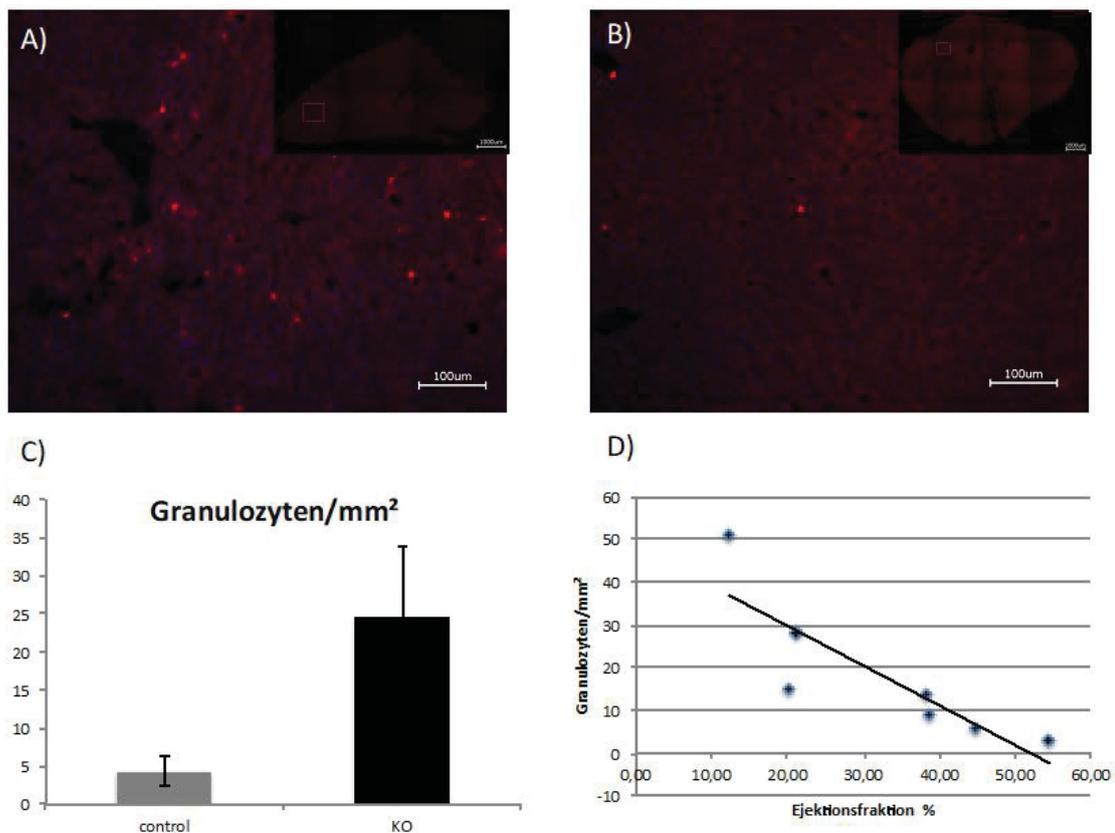


**Abbildung 19: Relative Quantifizierung der Genexpression von proinflammatorischen Signalen** (Cxcl1, Cxcl5, Ccl2, Ccr2, Cxcr2 und Ly6G in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X0 – Methode, n=3-4)

Aus den Ergebnissen, die in Abbildung 19 dargestellt sind, konnte jedoch ein weiterer Unterschied festgestellt werden. Verglichen mit den 48hAngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung ohne Acipimox ist der Granulozytenmarker Ly6G in Abbildung 19 in den 48hAngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox deutlich höher exprimiert. Dieser Befund deutet auf eine gesteigerte Infiltration der Leber mit neutrophilen Granulozyten unter Gabe von Acipimox hin. Dies wurde daraufhin histologisch analysiert.

### 3.5.3 Granulozyteninfiltration unter Hemmung der Lipolyse

In Abbildung 20B ist ein exemplarischer Schnitt eines Teils der Leber der 48hAngII Kontrolle zu sehen nach Behandlung unter Acipimox, der neben einem Schnitt eines 48hAngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO der Leber nach Behandlung unter Acipimox (Abb.20A) dargestellt wird. Die Granulozyten werden als rote Stellen mit stärkerer Signalanreicherung deutlich. Hier wird gezeigt, dass in den 48hAngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox der Leber eine höhere Anzahl an Granulozyten vorzufinden ist als in der Kontrolle.



**Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahme von neutrophilen Granulozyten in der Leber**

**A** 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung mit Acipimox. **B** 48h AngII Kontrolle nach Behandlung unter Acipimox. Färbung: Ly6G u. DAPI **C** Statistische Auswertung der neutrophilen Granulozyten/mm<sup>2</sup>, n=3-4 **D** Regressionsgerade der Granulozyten/mm<sup>2</sup> im Vergleich mit der EF der 48hAngII Mäuse mit Acipimox, n=7

Dies wird auch anhand der quantitativen Analyse in Abbildung 20C bestätigt, in welcher die iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO hinsichtlich ihrer Anzahl an neutrophilen Granulozyten verglichen wurden. Die vermehrte Infiltration mit Granulozyten in Form einer erhöhten inflammatorischen Antwort in den 48h AngII

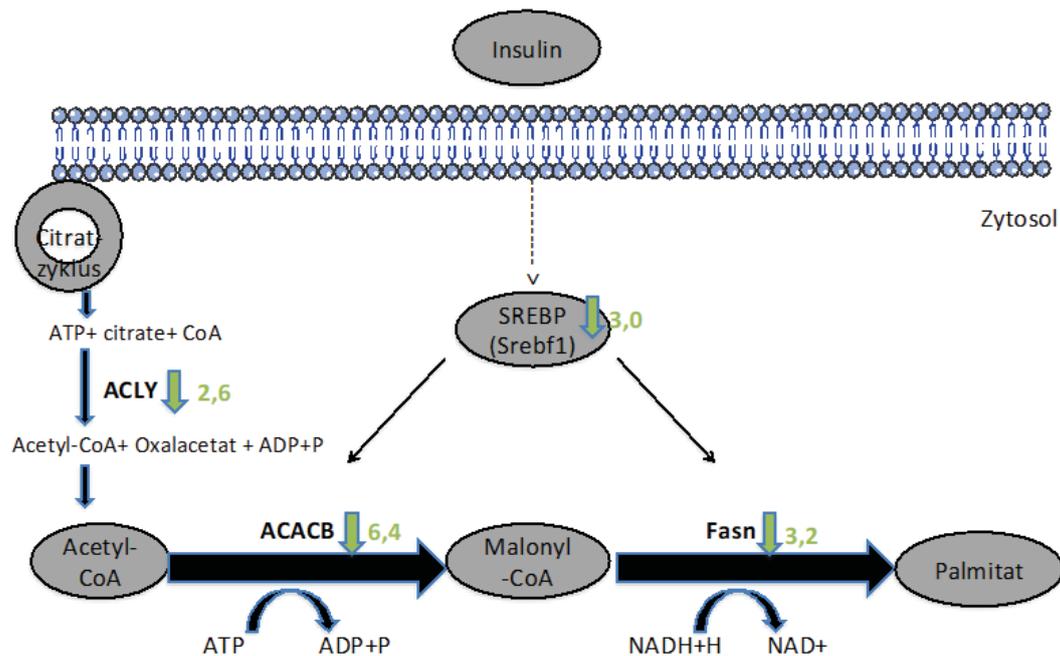
iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox lässt sich auch mit den Ergebnissen der rt-qPCR bestätigen (vgl. Abschnitt 3.5.2 Abb.20).

Des Weiteren zeigt die Regressionsgerade in Abbildung 20D, dass die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe mit der Pumpfunktion, angegeben als Ejektionsfraktion (EF) des Herzens, korreliert. Dabei geht eine hohe Anzahl an neutrophilen Granulozyten mit einer niedrigen EF und umgekehrt eine geringe Anzahl an neutrophilen Granulozyten mit einer höheren EF einher (Abb.20D). Die Daten der EF wurden dabei von Bottermann und a.( unveröffentliche Daten) bereitgestellt.

#### **3.5.4 Fettsäuremetabolismus der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox**

Anschließend wurde die Genexpression von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, die in die Fettsäuresynthese involviert sind, untersucht. Dazu wurde die Leber der 48h AngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO unter Behandlung mit Acipimox betrachtet, um einen Einfluss der Hemmung der peripheren Lipolyse auf diese zu untersuchen.

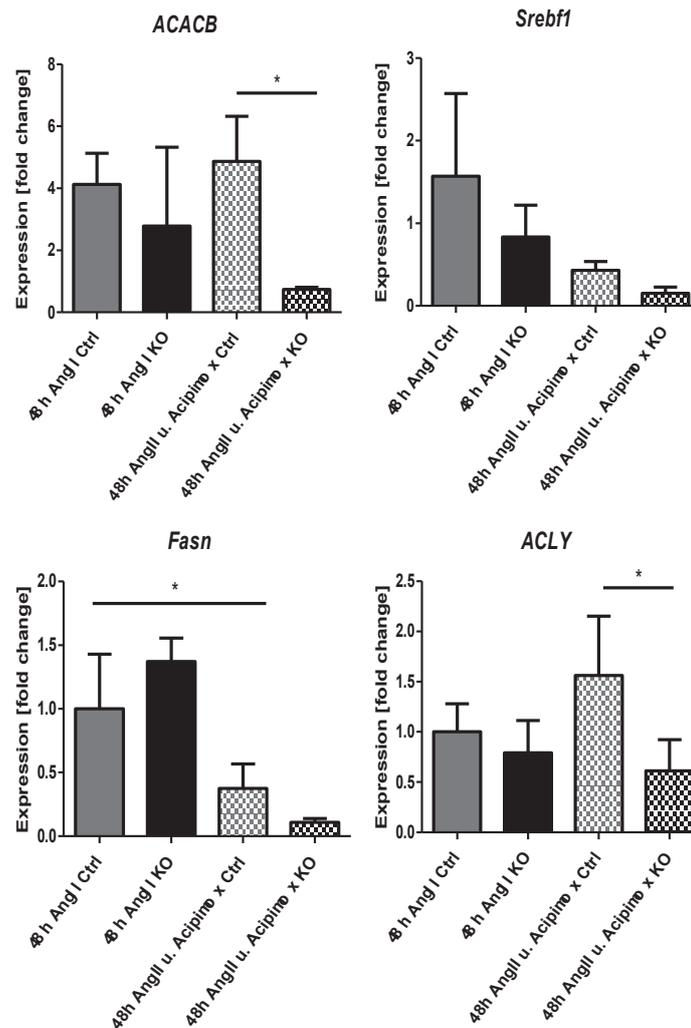
Die Enzyme *ATP citrate lyase* (ACLY), *acetyl CoA carboxylase B* (ACACB) und *fatty acid synthase* (FASN), die an der Fettsäuresynthese (Abb.21) beteiligt sind, stellten sich mit der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode (*fold change*  $\geq 2$ ) in den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox verglichen mit den Kontrollen als signifikant herunterreguliert dar, sowie auch der Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP1) (Vgl Abschnitt 3.5.1). Folglich ist die Fettsäuresynthese in den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox vermutlich verringert.



**Abbildung 21: Einfluss der Acipimox-Behandlung auf den Signalweg der Fettsäuresynthese mit Ergebnissen der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode (ACACB (*acetyl CoA carboxylase B*), Fasn (*fatty acid synthase*), SREBP (*Sterol regulatory element-binding protein 1*)) in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung.  $\Delta\Delta$ Ct-Methode., n=3-4. (modifiziert nach Biochemie und Pathobiochemie, Löffler/Petrides 2014, p 699))**

Dies ließ sich anhand der Analyse mit der X0 – Methode in Abbildung 22 nochmals zeigen. Dort waren in den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox die Enzyme ACLY und ACACB ebenfalls signifikant geringer exprimiert im Vergleich zu den Kontrollen.

Es wurde auch zwischen den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  Tieren ohne und nach Behandlung unter Acipimox ein signifikanter Unterschied hinsichtlich veringertes Expression der Fasn gemessen. Zudem zeigte der Transkriptionsfaktor Sebfl ebenso eine Abnahme der Genexpression zwischen 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  Tieren ohne und nach Behandlung unter Acipimox, erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.

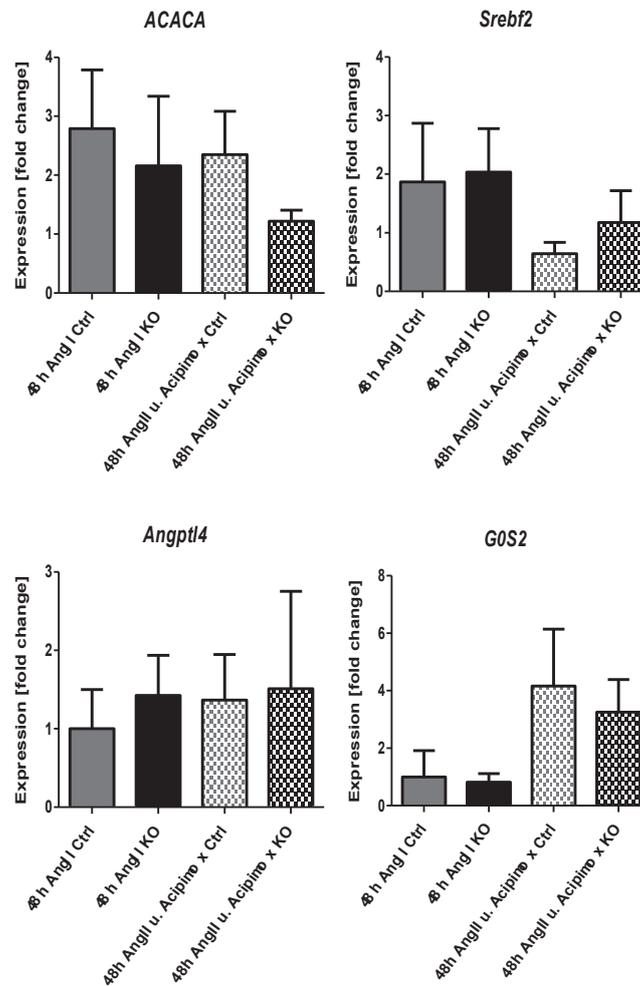


**Abbildung 22: Relative Quantifizierung der Genexpression der Fettsäuresynthese (ACLY, ACACB, Fasn und Srebf1 in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X<sub>0</sub> – Methode, n=3-4, \*p< 0,05, \*\*p< 0,01 , \*\*\*p<0,001)**

Daraus resultiert, dass die Fettsäuresynthese der Leber bei den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox signifikant verringert ist.

Danach wurden andere Faktoren des Fettsäuremetabolismus betrachtet (Abb.23). Zunächst wurde G0S2 analysiert, dessen Funktion als Faktor unter Hungerbedingungen bereits in Abschnitt 3.1.3 erläutert wurde. Es wurde ein signifikanter Anstieg dessen in den 48h AngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox beobachtet, verglichen mit den Tieren, die lediglich 48h AngII erhalten haben. Dies lässt auf Veränderungen im Metabolismus des Fettstoffwechsels der 48h AngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox schließen, die sich mit Bedingungen unter Hungerzustand vergleichen lassen.

Das Enzym *acetyl CoA carboxylase A* (ACACA), das vor allem im Fettgewebe selbst vorkommt, sowie der Transkriptionsfaktor *sterol regulatory element-binding protein 2* (Srebf2), der wesentlich an der Cholesterin-Homöostase beteiligt ist, waren unverändert. Des Weiteren zeigt *Angiopoietin-like 4* (Angptl4) in der Analyse keine Veränderung (Abb.23).

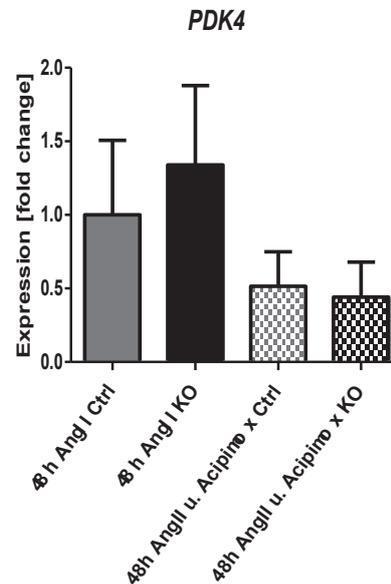


**Abbildung 23: Relative Quantifizierung der Genexpression des Fettstoffwechsels (Angptl4, G0S2, ACACA und Srebf2) in der Leber der Kontrolle und iCMp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X<sub>0</sub> – Methode, n=3-4**

### 3.5.5 Energiemetabolismus der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox

Daraufhin erfolgte ein Vergleich des Energiemetabolismus in der Leber der 48h AngII iCMp38MAPK $\alpha$  Kontrollen und KO nach Behandlung ohne und unter Acipimox mit Betrachtung des Regulatorenzym PDK4 (Abb.24). Dabei zeigte sich eine Tendenz der

Abnahme der PDK4 in den 48hAngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox.

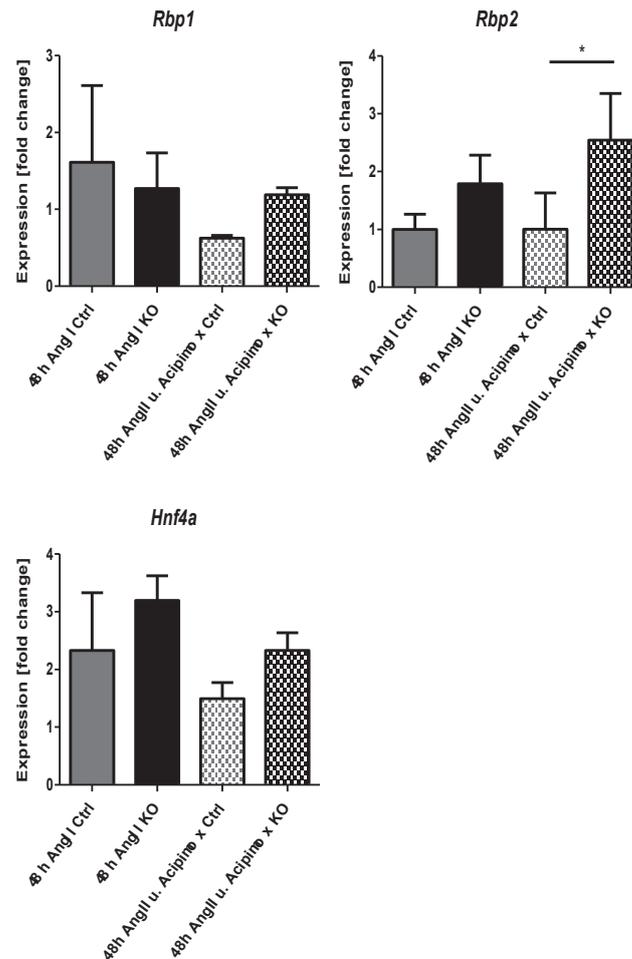


**Abbildung 24: Relative Quantifizierung der Genexpression des Energiemetabolismus (PDK4 in der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrolle und KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X0 – Methode, n=3-4)**

### 3.5.6 Synthesefähigkeit von Blutserumproteinen der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox

Anschließend wurde die Synthesefähigkeit von Blutserumproteinen der Leber der 48hAngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung ohne und unter Acipimox verglichen, da die Leber als wichtigstes Stoffwechselorgan des Organismus viele wichtige Proteine synthetisiert.

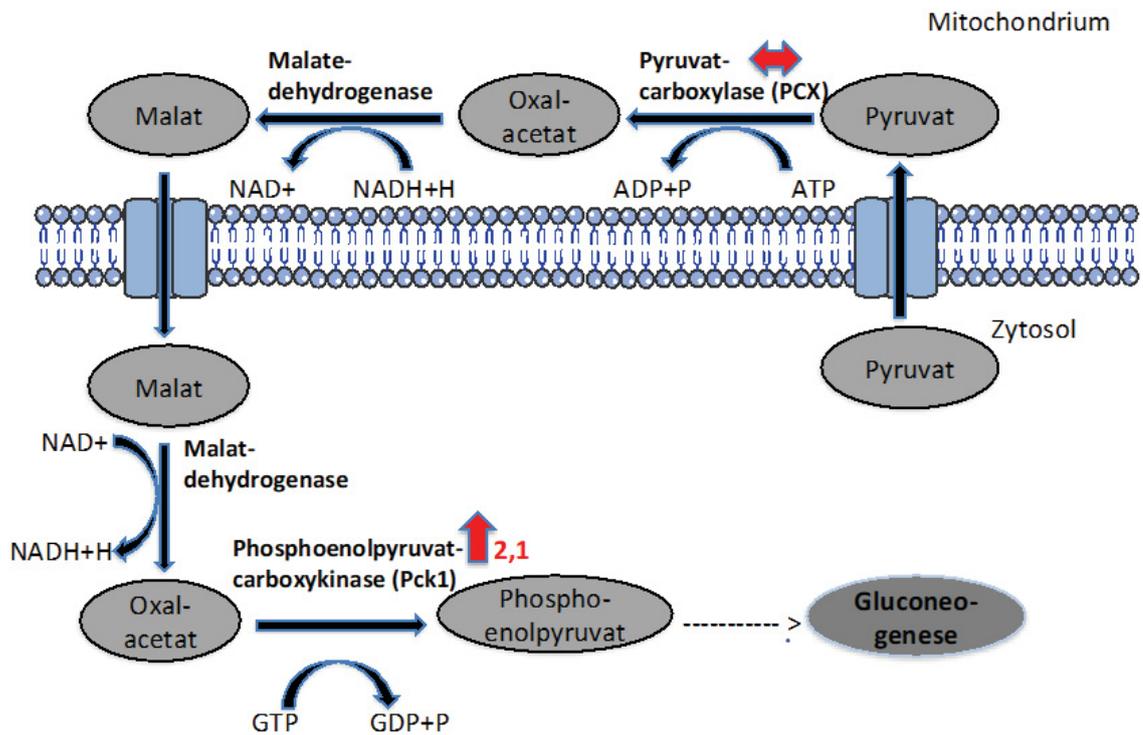
Abbildung 25 stellt die Analyse der Serumproteine *retinol binding protein 1* (Rbp1), *retinol binding protein 2* (Rbp2) sowie des Transkriptionsfaktors *hepatocyte nuclear factor 4a* (Hnf4a) dar. Im Vergleich zu den 48hAngII iCmp38MAPK $\alpha$  Kontrollen nach Behandlung unter Acipimox war Rbp2 in den KO signifikant hochreguliert. Folglich scheint die Synthesefähigkeit von Blutserumproteinen der Leber unter Herzinsuffizienz und gehemmter peripherer Lipolyse signifikant erhöht zu sein.



**Abbildung 25: Relative Quantifizierung der Genexpression der Serumproteine (Rbp1 (*retinol binding protein 1*), Rbp2 (*retinol binding protein 2*), Hnf4a (*hepatocyte nuclear factor 4a*) in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X<sub>0</sub> – Methode, n=3-4)**

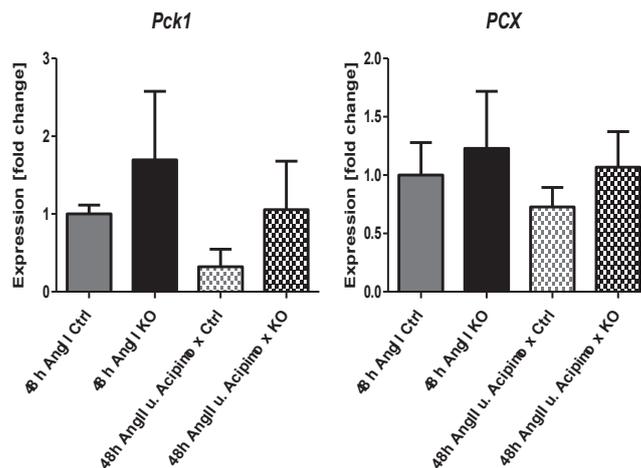
### 3.5.7 Glucosestoffwechsel der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox

Als letzter Stoffwechselweg wurde der Glucosemetabolismus betrachtet. Dabei wurde auf Genexpressionsebene zunächst die Gluconeogenese untersucht. In Abbildung 26 sind die Einzelschritte des Signalwegs dargestellt, der zur Gluconeogenese führt. Dabei stellte sich das Enzym *pyruvate carboxylase* (PCX) bei den 48h AngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode unverändert dar. Die *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1* (Pck1) hingegen war in den 48h AngII iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox um den Faktor 2,1 hochreguliert.



**Abbildung 26: Signalweg der Gluconeogenese mit Ergebnissen der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (PCX: (*pyruvate carboxylase*) und Pck1 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII mit und ohne Acipimox Behandlung.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode., n=3-4. (modifiziert nach Biochemie und Pathobiochemie, Löffler/Petrides 2014, p 699))**

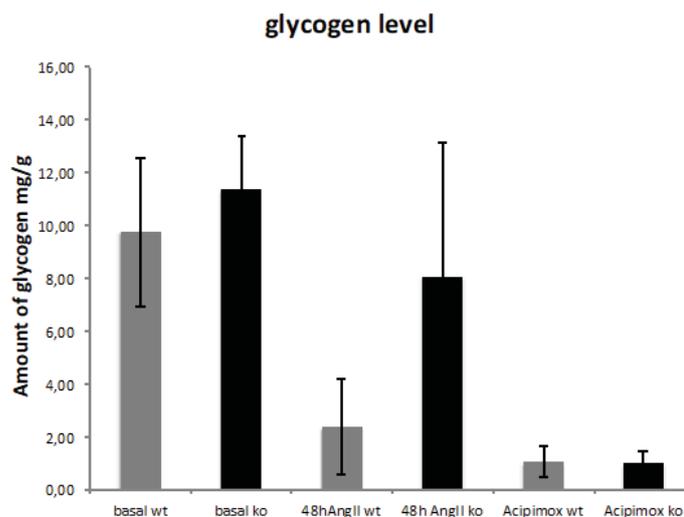
Diese Veränderung wurde daraufhin nochmals mit der X<sub>0</sub> – Methode gemessen (Abb.27). Dort ließ sich in beiden geschwindigkeitsbestimmenden Enzymen kein signifikanter Unterschied nachweisen.



**Abbildung 27: Relative Quantifizierung der Genexpression der Gluconeogenese (PCX (*pyruvate carboxylase*) und Pck1 (*phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*) in der Leber der Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48hAngII mit und ohne Acipimox Behandlung. X<sub>0</sub> – Methode, n=3-4)**

### 3.5.8 Glykogengehalt der Leber nach 48h AngII und Behandlung unter Acipimox

Abschließend wurde eine Bestimmung des Glykogengehalts der Leber durchgeführt, da man unter Herzinsuffizienz einen vermehrten Abbau von Glykogen zur Energiegewinnung erwarten würde. Dabei wurden in Abbildung 28 alle drei Gruppen miteinander verglichen (iCmp38MAPK $\alpha$  1. basal, 2. mit 48h AngII, 3. mit 48hAngII und nach Behandlung unter Acipimox).



**Abbildung 28: Glykogengehalt der Leber (Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO der drei Gruppen: basal, nach 48h AngII, nach 48h AngII mit und ohne Acipimox, n=3-4)**

Hierbei ist ersichtlich, dass die 48h AngII Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach Behandlung unter Acipimox deutlich weniger Glykogen in ihrer Leber gespeichert haben als die basalen Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO sowie die 48hAngII Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO ohne Behandlung unter Acipimox.

Folglich scheint unter 48h AngII und gleichzeitiger Hemmung der peripheren Lipolyse als Energielieferant vermehrt Glucose in Form von Glykogen mobilisiert zu werden sowohl in den Kontrollen als auch den iCmp38MAPK $\alpha$  KO. Jedoch ergibt sich kein spezifischer Einfluss der Herzinsuffizienz auf den Glykogengehalt.

## 4 Diskussion

Eine Herzinsuffizienz ist trotz therapeutischer Beeinflussung neuroendokriner Signalwege mit einer deutlich erhöhten Mortalität sowie Morbidität der Patienten vergesellschaftet. Demzufolge stellt die Herzinsuffizienz eine systemische Erkrankung dar, die sowohl durch neuroendokrine Signale, als auch durch Veränderungen in Inflammation und Metabolismus charakterisiert ist. Dabei ist bekannt, dass es im Herzen zur Ausschüttung von Cardiokinen kommt im Sinne einer sterilen Inflammation unter hämodynamischem Stress (Chen und Nuñez 2010; Nakayama und Otsu 2013).

Die Leber als zentrale Regulatorin von Katabolismus und Anabolismus kontrolliert vor allem den Stoffwechsel und ist mit ihrer großen Anzahl an Makrophagen auch an der inflammatorischen Antwort des Organismus beteiligt. Nun stellt sich die Frage inwiefern die Leber unter Herzinsuffizienz durch inflammatorische Signale beeinflusst wird und ihren Metabolismus verändert. Dementsprechend wurde analysiert inwieweit es im Rahmen der Herzinsuffizienz zu einer ‚Interorgankommunikation‘ im Sinne eines cardiohepatischen Syndroms kommt.

*Wesentliche Befunde dieser Arbeit:*

- Trotz massiv eingeschränkter Herzinsuffizienz in den iCmp38MAPK $\alpha$  KO Mäusen nach 48h AngII Behandlung konnten hinsichtlich inflammatorischer Signale und Metabolismus in der Leber keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollen festgestellt werden.
- Eine *microarray* Analyse ergab 2194 ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich exprimierte Transkripte im Vergleich von Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO in der Leber nach 48h AngII Behandlung. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss auf Gene inflammatorischer und metabolischer Stoffwechselwege.
- Eine Hemmung der Lipolyse mittels Acipimox führt zu einem signifikanten Einfluss zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO auf inflammatorischer und metabolischer Genexpressionsebene nach 48h AngII Behandlung.

#### 4.1 iCmp38MAPK $\alpha$ KO als Modell der Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber

Das iCmp38MAPK $\alpha$  KO Modell zeigte nach Behandlung mit Angiotensin II für 48h eine rasche Induktion einer systolischen Herzinsuffizienz. Folglich ist es durch die kurze Zeitperiode als induzierbares Herzinsuffizienzmodell gut geeignet und schnell reproduzierbar. Hierbei handelt es sich um eine kardiomyozytenspezifische Inaktivierung der p38MAPK $\alpha$ , welche durch die Gabe von Tamoxifen induziert wurde (Vgl. Abschnitt 2.13). Dabei wurde die p38MAPK $\alpha$  in der Leber der Kontrolle gleichermaßen wie in den iCmp38MAPK $\alpha$  KO exprimiert (Vgl. Abschnitt 3.1). Nun stellt sich die Frage, inwiefern Angiotensin II selbst einen direkten Effekt auf die Leber hat. Zur Abgrenzung der Angiotensin II Gabe gegenüber der Auswirkung der Herzinsuffizienz auf die Leber wurden die Ergebnisse der Kontrollen herangezogen. Diese erhielten ebenso für 48h Angiotensin II, entwickelten jedoch keinen Herzinsuffizienzphänotyp. Es konnte dabei keine vermehrte Expression von inflammatorischen Genen wie Interleukinen und Chemokinen sowie von Genen des Energie-, Fett- und Glucosestoffwechsels in der Leber der Kontrollen nach 48h Angiotensin II gezeigt werden. Leung u. a. 2003 beschrieben, dass Angiotensin II in der Leber über den AT-1 Rezeptor zur Produktion von profibrotischen Faktoren wie TGF-beta und Fibronectin in den Kupffersternzellen führt. Die Auswertung des *microarray* der Leber nach 48h AngII der iCmp38MAPK $\alpha$  KO ergab, dass TGF-beta sich unverändert sowie Fibronectin 1,5-fach (p 0,03) im Vergleich zu den Kontrollen heraufreguliert zeigte. Des Weiteren kann es zu portaler Hypertension im Rahmen einer Leberzirrhose kommen (Schneider, Kalk, und Klein 1999). Außerdem nimmt Angiotensin II Einfluss auf die Sternzellen der Leber, indem es diese zu Proliferation und Kontraktion mit einhergehender TGF-beta Produktion und Umbau der Extrazellulären Matrix anregt (Yoshiji u. a. 2001). Hinsichtlich inflammatorischer und metabolischer Veränderungen in der Leber durch den direkten Einfluss von Angiotensin II wurde in der Literatur bisher jedoch nichts beschrieben. Diesbezüglich ergab sich auch kein Unterschied bei dem Vergleich von basaler Kontrolle und der Kontrolle nach Behandlung mit Angiotensin II für 48h. Daraus lässt sich vermuten, dass ein fibrotischer Umbau der Extrazellulären Matrix erst nach einer längeren Behandlung mit Angiotensin II eintritt.

#### **4.2 Zeitpunkt 48h der iCmp38MAPK $\alpha$ KO zur Beurteilung der Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber**

Nach einem Zeitpunkt von 48h AngII konnten nur geringe Veränderungen in der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO hinsichtlich inflammatorischer Antwort und metabolischen Veränderungen festgestellt werden. Bezüglich einer Interorgankommunikation stellt sich dabei zunächst die Frage, ob ein zu früher Zeitpunkt betrachtet wurde. Im Herzen der iCmp38MAPK $\alpha$  KO wurde nach 24h und 48h AngII von Bottermann et al. eine inflammatorische Antwort sowie metabolische Veränderungen festgestellt. Leitner (2017) konnte zeigen, dass nach 48h AngII in der Skelettmuskulatur mehr als 3000 veränderte Transkripte mit Erhöhung von Inflammationssignalen sowie Atrogenen im Sinne eines *wasting* Programmes wie bei kardialer Kachexie nachweisbar waren. Dies belegt eine weitreichende Interorgankommunikation zwischen Herz und Skelettmuskel. Aufgrund dieser starken Expressionsveränderungen wurde die Zeitperiode von 48h AngII auch für die Leber gewählt. Kato et. al (2012) untersuchten in ihrer Studie ebenso den Einfluss der Herzinsuffizienz auf die Leber hinsichtlich Metabolismus und Inflammation. Sie benutzten Dahl Ratten, die nach elf Wochen Hochsalzdiät eine arterielle Hypertension entwickelten, und analysierten hepatische Effekte nach einem Zeitpunkt von 17 Wochen, an welchem die Tiere bereits Zeichen einer chronischen Herzinsuffizienz und damit einhergender Tachypnoe und Immobilität zeigten. Dabei konnte eine vermehrte Expression von inflammatorischen Signalen sowie Veränderungen des Metabolismus beobachtet werden. Somit stellt sich nun die Frage, ob zu einem späterem Zeitpunkt auch ein Effekt auf die inflammatorische Antwort und den Metabolismus der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach AngII Gabe gesehen werden kann.

#### **4.3 Metabolischer und inflammatorischer Einfluss einer Herzinsuffizienz auf die Leber**

Durch die Ausschüttung von Cardiokinen kommt es zu einer Veränderung des Metabolismus im weißen Fettgewebe sowie in der Leber (Nakamura und Sadoshima 2014). Eine Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber wurde auch bei einer familiären hypertrophen Kardiomyopathie entdeckt (Magida und Leinwand 2014). Hinsichtlich der Veränderung der energetischen Homöostase nimmt das Herz durch den Mediator Complex Subunit 13 (MED13) sowie MicroRNA 208a (miR-208a), welche

MED13 negativ reguliert, Einfluss auf eine vermehrte Insulinsensitivität und Glucosetoleranz (Grueter u. a. 2012). MED13 stellt hierbei eine Untereinheit des Mediator Komplexes dar, der die Transkription von Schilddrüsenhormonen und anderen nukleären Hormonrezeptoren reguliert. Dabei verändert MED13 den Stoffwechsel der Leber und des weißen Fettgewebes durch Hochregulierung des Energiemetabolismus und der Anzahl an Mitochondrien (Baskin u. a. 2014). Es führt zu vermehrtem Fettsäureverbrauch in den peripheren Organen (Baskin u. a. 2014). Welche genauen Cardiokine und Signalstoffe dabei in diesen Prozeß der Interorgankommunikation zwischen Herz, Leber und weißem Fettgewebe durch MED13 involviert sind, bleibt bisher unbekannt. Kato et. al (2012) zeigten in dem Modell der herzinsuffizienten Dahlratte einen veränderten Metabolismus der Leber mit eingeschränkter Synthese von hepatischen Plasmaproteinen, sowie eine Hochregulierung von proinflammatorischen Signalen, einem Anstieg von Triglyceriden und einem Abfall von plasmatischen Fettsäuren. In der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO hingegen konnte nach 48h AngII nur geringe Veränderungen hinsichtlich inflammatorischer Signale wie Interleukinen und Chemokinen, die zu einer Interorgankommunikation zwischen der Leber unter Herzinsuffizienz beitragen, festgestellt werden (Vgl. Abschnitt 3.2). Ebenso blieben der Fettsäure und Glucosemetabolismus auf Genexpressionsebene sowie Proteinebene der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII unbeeinflusst (Vgl. Abschnitt 3.2 und 3.3). Folglich scheint es nach einer Zeitperiode von 48h AngII allenfalls einen geringen Einfluss auf die Leber zu geben.

#### **4.4 Microarray Genexpressionsanalyse nach 48h Angiotensin II**

Zur Analyse aller Transkriptionsveränderungen nach 48h AngII wurde eine *microarray* Genexpressionanalyse angefertigt. Diese zeigte nach 48h AngII 2194 ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich exprimierte Transkripte zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO, wobei die inflammatorischen und metabolischen Stoffwechselwege, die bereits mit der rt-PCR analysiert wurden, sich auch hier als unverändert zeigen (Vgl. Abschnitt 3.4). In der IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) stellten sich vor allem viele kleine Stoffwechselwege, wie der Tryptophandegradationsweg, die Östrogenbiosynthese, der Melatonin-degradationsweg und Nikotindegradationsweg, sowohl hoch- als auch herunterreguliert dar. Hierbei wird durch den p-Value von  $10^{-5}$  der 12 am stärksten veränderten Stoffwechselwege in der Leber nach 48h Angiotensin II verdeutlicht, dass im Vergleich zum Herzen (p-Value der Top fünf am stärksten veränderten Signalwege

von  $10^{-12}$  bis  $10^{-7}$  ) und der Skelettmuskulatur (p-Value  $10^{-10}$ ) nicht so ausgeprägte Expressionsunterschiede vorliegen. Des Weiteren sind maximal 50% der Gene eines Signalweges verändert. Folglich kommt es zu einem Expressionsunterschied nach 48h AngII mit 2194 ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich exprimierten Transkripten zwischen Kontrolle und iCmp38MAPK $\alpha$  KO, jedoch scheinen diese nur geringe Effekte hinsichtlich inflammatorischer und metabolischer Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber zu verdeutlichen.

#### **4.5 Einfluss der Hemmung der peripheren Lipolyse auf die Leber unter Herzinsuffizienz**

Des Weiteren konnte in den Herzen iCmp38MAPK $\alpha$  KO histologisch nach der Gabe von AngII über 48h eine Lipidakkumulation sowie eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Unter Herzinsuffizienz ist die metabolische Flexibilität deutlich eingeschränkt und mit einer Abnahme an ATP-Produktion im Rahmen einer mitochondrialen Dysfunktion verbunden (Neubauer 2007). Es kommt zu einer verminderten Glucose- (Zhabyeyev u. a. 2013) und Fettsäureoxidation (Neubauer 2007) sowie vermehrter Ketonoxidation (Aubert u. a. 2016). Die Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII wurden mit Acipimox (*5methylpyrazinecarboxylic acid 4oxid*) behandelt. Acipimox, ein Niacinderivat, hemmt über den Niacin-Rezeptor-1 die Triglycerid-Lipase und reduziert somit die Konzentration an freien Fettsäuren im Blut (vgl. Abschnitt 3.5.2). Es kommt zu einer Abnahme an freien Triglyceriden und LDL (*low density lipoprotein*) sowie einem Anstieg an HDL (*high density lipoprotein*) im Serum (Sirtori u. a. 1981). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Acipimox durch die Abnahme an freien Fettsäuren im Serum zu verminderter Insulinresistenz und vermehrter oraler Glucosetoleranz bei Übergewichtigen führt (Santomauro u. a. 1999). Ein Einfluss auf die kardiale Funktion konnte nicht gefunden werden (Halbirk u. a. 2010). Durch die Hemmung der Lipolyse der Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO mittels Acipimox konnte eine verstärkte Inflammation und eine Veränderung im Metabolismus in der Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII im Vergleich zu den Tieren ohne Behandlung mit Acipimox gemessen werden. Unter dieser Umstellung des Stoffwechsels wurde eine Hochregulation von inflammatorischen Signalen wie IL1R2, Il6, Cxcl1 und Cxcl6 sowie eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII unter Acipimox beobachtet (Vgl. Abschnitt 3.5.1-3). Zudem kam es

zu einer reduzierten Expression von Genen der Fettsäuresynthese mit signifikanter Verminderung der Expression der Enzyme ACLY, ACACB und FASN sowie des Transkriptionsfaktors SREBP1 festzustellen (vgl. Abschnitt 3.5.4). Ebenso waren Gene der Gluconeogenese hochreguliert und der Glykogengehalt in den Kontrollen und iCmp38MAPK $\alpha$  KO verringert (vgl. Abschnitt 3.5.5-6). Der Glykogengehalt scheint also unabhängig vom Genotyp der Tiere unter Acipimox verringert zu werden. Während nach 48h AngII in der Skelettmuskulatur der iCmp38MAPK $\alpha$  KO ein *wasting* Programm mit Erhöhung der Gene für Inflammation und Proteindegradation im Rahmen einer kardialen Kachexie nachgewiesen wurde (Leitner, 2017), waren in der Leber keine Veränderungen inflammatorischer und metabolischer Prozesse messbar. Unter der Umstellung des Organismus durch Hemmung der Lipolyse scheint nun jedoch der Metabolismus bei Herzinsuffizienz auch die Leber in den inflammatorischen Prozeß und die Energiebereitstellung zu involvieren. Dabei kommt es durch die Hemmung der Lipolyse nach 48h AngII zu einem Einfluss der Leber als Energielieferant durch vermehrte Gluconeogenese, Glykogenabbau sowie einer Verminderung der Fettsäuresynthese.

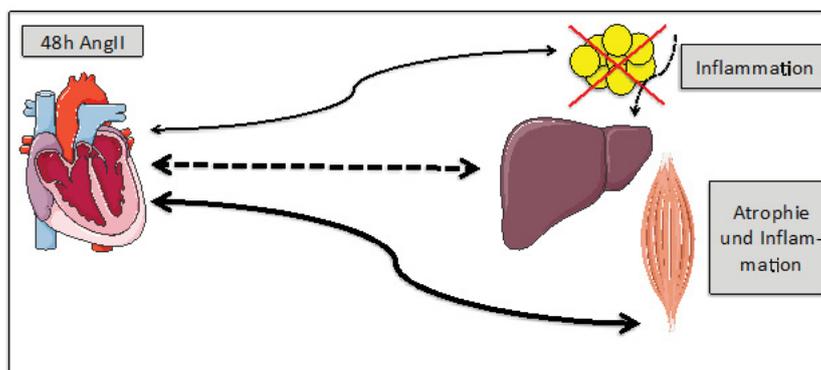
#### **4.5 Schlussfolgerung und weitere Konsequenzen**

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Leber hinsichtlich der Interorgankommunikation unter Herzinsuffizienz betrachtet. Dabei eignet sich das Modell des iCmp38MAPK $\alpha$  KO zur Analyse der Fragestellung, da es schnell reproduzierbar ist und Angiotensin II als Auslöser der Herzinsuffizienz im Untersuchungszeitraum keinen direkten Einfluss auf den Metabolismus und die Inflammation der Leber nimmt. Jedoch konnten nach einem Zeitpunkt von 48h AngII nur geringe Unterschiede hinsichtlich inflammatorischer Antwort und metabolischen Veränderungen in der Leber gesehen werden. Dabei ist es wahrscheinlich, dass es zu einem späteren Zeitpunkt eine veränderte Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber feststellen sein wird. Es bleibt zu diskutieren, inwiefern die Leber durch die Hypertrophie und Dilatation des linken Ventrikels beeinflusst wird. In klinischen Studien konnte dargestellt werden, dass mehr als 90 % der ischämischen Hepatitiden als Ursache ein Versagen des rechten Ventrikels aufweisen (Giallourakis 2013). Folglich ist die Leber vor allem durch die Volumenbelastung des rechten Herzens beeinträchtigt. Es kommt unter Erhöhung des zentralvenösen Drucks zu einer Zunahme der Lebersteifigkeit mit einhergehender *cirrhose cardiaque*, sowie durch die rechtsventrikuläre Dysfunktion zu einer Atrophie

der Hepatozyten und damit einhergehendem perisinusoidalem Ödem (Giallourakis 2013; Dunn u. a. 1973). Dies kann jedoch durch die Minderversorgung bei reduziertem kardialen Auswurf unter gleichzeitig bestehender Linksherzinsuffizienz verstärkt werden. Folglich stellt sich die Frage, ob hinsichtlich dieses Zusammenhangs nach einer Zeitperiode von 48h AngII ein zu früher Zeitpunkt für cardiohepatische Kommunikation betrachtet wurde, da der rechte Ventrikel der iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach dieser Zeitperiode noch nicht beeinflusst scheint. Folglich sollte als Zukunftsausblick ein späterer Zeitpunkt betrachtet werden sowie eine echokardiographische Analyse des rechten Ventrikels erfolgen.

Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus der Auswertung der *microarray* Analyse der Leber in den iCmp38MAPK $\alpha$  KO nach 48h AngII. In der IPA war der Tryptophan Degradationsweg III, der Einfluss auf inflammatorische Signale nimmt, unter den zwölf am stärksten veränderten Signalwegen. Die vermehrte Tryptophan Degradation und der darausfolgende Kynurenin (KYN) Signalweg gehen mit chronischer Inflammation einher, welches einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Mangge u. a. 2014). Kynurenin ist sowohl an der inflammatorischen als auch der neuronalen Signalkaskade beteiligt (Stone, Stoy, und Darlington 2013). Der Großteil des Tryptophan wird zu KYN umgesetzt, wobei die Tryptophan 2,3-Dioxygenase und die Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO1) die limitierenden Enzyme darstellen (Liu u. a. 2017). IDO1 ist vor allem in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und führt über die Abnahme der Tryptophankonzentration zu einer Herabregulierung der Aktivität von T-Lymphozyten (Mellor und Munn 2003). IDO hat dabei einen immunhemmenden Effekt mit Inhibierung von T-Zellen, Aktivierung regulatorischer T-Zellen und Hemmung von NK-Zellen (natürliche Killerzellen) (Mándi und Vécsei 2012). Eine finnische Studie zeigte, dass die IDO1 Enzymaktivität vor allem im weiblichen Geschlecht mit kardiovaskulären Risikofaktoren für Artherosklerose wie Alter, *Body Mass Index* (BMI), *Low Density Lipoprotein*, *High Density Lipoprotein*, C-reaktives Protein (CRP) und Intimial-Media-Dicke der Carotiden korreliert (Pertovaara u. a. 2007). Die Korrelation der IDO1 Enzymaktivität mit der Intimial-Media-Dicke der Carotiden als Risikofaktor für Artherosklerose konnte ein Jahr später auch für das männliche Geschlecht gezeigt werden (Niinisalo u. a. 2008). Des Weiteren konnte eine erhöhte Tryptophan Degradation mit erniedrigtem Tryptophan Spiegel und erhöhtem KYN bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit gefunden werden, welches für

einen inflammatorischen vaskulären Prozeß spricht (Wirleitner u. a. 2003). Dabei kann das Kynurenin-Tryptophan-Verhältnis akute koronare Geschehnisse voraussagen bei Patienten ohne vorhergehende koronare Ereignisse (Sulo u. a. 2013). Demzufolge scheint das hiesige cardiovaskuläre Ereignis der Herzinsuffizienz der iCmp38MAPK $\alpha$  KO eventuell eine inflammatorische Kommunikation zwischen Herz und Leber auszulösen. Jedoch konnten nach 48hAngII in den iCmp38MAPK $\alpha$  KO keine Interleukine und Chemokine als Signalboten der Leber, die zu dieser Interorgankommunikation beitragen, gemessen werden (Vgl. Abschnitt 3.2). Demzufolge sollte in darauffolgenden Arbeiten der Kynurenin-Spiegel gemessen werden um eine inflammatorische Interaktion näher zu beurteilen.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung der Interorgankommunikation unter Hemmung der peripheren Lipolyse (Interorgankommunikation zwischen dem dilatierten Herzen nach 48hAngII und den peripheren Organen (peripheres Fettgewebe, Leber und Skelettmuskel))

Zuletzt scheint unter der Beeinflussung des Gesamtkörpermetabolismus mit Hemmung der Lipolyse die Leber der iCmp38MAPK $\alpha$  KO auch schon nach 48h AngII durch vermehrte Genexpression von inflammatorischen Signalen, Verringerung der Fettsäuresynthese, vermehrter Gluconeogenese und Glykogenabbau in die Energiegewinnung und inflammatorische Antwort involviert zu sein (Abb.29). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Leber neben dem Skelettmuskel zu solch einem frühen Zeitpunkt der Herzinsuffizienz nur unter Umstellung des Metabolismus mit Hemmung der peripheren Lipolyse eine Rolle in der Interorgankommunikation zwischen Herz und Leber einnimmt.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

Anker, S. D., T. P. Chua, P. Ponikowski, D. Harrington, J. W. Swan, W. J. Kox, P. A. Poole-Wilson, und A. J. Coats. „Hormonal Changes and Catabolic/Anabolic Imbalance in Chronic Heart Failure and Their Importance for Cardiac Cachexia“. *Circulation* 96, Nr. 2 (15. Juli 1997): 526–34.

Anker, Stefan D., und Rakesh Sharma. „The Syndrome of Cardiac Cachexia“. *International Journal of Cardiology* 85, Nr. 1 (September 2002): 51–66.

Arcidi, J. M., G. W. Moore, und G. M. Hutchins. „Hepatic morphology in cardiac dysfunction: a clinicopathologic study of 1000 subjects at autopsy.“ *The American Journal of Pathology* 104, Nr. 2 (August 1981): 159–66.

Aubert, Gregory, Ola J. Martin, Julie L. Horton, Ling Lai, Rick B. Vega, Teresa C. Leone, Timothy Koves, u. a. „The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel“. *Circulation* 133, Nr. 8 (23. Februar 2016): 698–705. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017355>.

Bao, Weike, David J. Behm, Sandhya S. Nerurkar, Zhaohui Ao, Ross Bentley, Rosanna C. Mirabile, Douglas G. Johns, u. a. „Effects of p38 MAPK Inhibitor on Angiotensin II-Dependent Hypertension, Organ Damage, and Superoxide Anion Production“. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 49, Nr. 6 (Juni 2007): 362–68.

Baskin, Kedryn K., Chad E. Grueter, Christine M. Kusminski, William L. Holland, Angie L. Bookout, Santosh Satapati, Y. Megan Kong, u. a. „MED13-Dependent Signaling from the Heart Confers Leanness by Enhancing Metabolism in Adipose Tissue and Liver“. *EMBO Molecular Medicine* 6, Nr. 12 (Dezember 2014): 1610–21.

Berry, C., und A. L. Clark. „Catabolism in Chronic Heart Failure“. *European Heart Journal* 21, Nr. 7 (April 2000): 521–32.

Bilzer, Manfred, Frigga Roggel, und Alexander L. Gerbes. „Role of Kupffer Cells in Host Defense and Liver Disease“. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 26, Nr. 10 (Dezember 2006): 1175–86.

Braunstein, Joel B., Gerard F. Anderson, Gary Gerstenblith, Wendy Weller, Marlene Niefeld, Robert Herbert, und Albert W. Wu. „Noncardiac Comorbidity Increases Preventable Hospitalizations and Mortality among Medicare Beneficiaries with Chronic Heart Failure“. *Journal of the American College of Cardiology* 42, Nr. 7 (1. Oktober 2003): 1226–33.

Chen, Grace Y., und Gabriel Nuñez. „Sterile inflammation: sensing and reacting to damage“. *Nature*

reviews. *Immunology* 10, Nr. 12 (Dezember 2010): 826–37.

Deursen, V. M. van, K. Damman, H. L. Hillege, A. P. van Beek, D. J. van Veldhuisen, und A. A. Voors. „Abnormal Liver Function in Relation to Hemodynamic Profile in Heart Failure Patients“. *Journal of Cardiac Failure* 16, Nr. 1 (Januar 2010): 84–90.

Deursen, Vincent M. van, Kevin Damman, Peter van der Meer, Peter J. Wijkstra, Gert-Jan Luijckx, Andre van Beek, Dirk J. van Veldhuisen, und Adriaan A. Voors. „Co-Morbidities in Heart Failure“. *Heart Failure Reviews* 19, Nr. 2 (1. März 2014): 163–72.

Doroudgar, S., und C.C. Glembotski. „The Cardiomyokine Story Unfolds: Investigating Stress induced Protein Secretion in the Heart“. *Trends in molecular medicine* 17, Nr. 4 (April 2011): 207–14.

Dunn, G. D., P. Hayes, K. J. Breen, und S. Schenker. „The Liver in Congestive Heart Failure: A Review“. *The American Journal of the Medical Sciences* 265, Nr. 3 (März 1973): 174–89.

Fuccella, L. M., G. Goldaniga, P. Lovisolò, E. Maggi, L. Musatti, V. Mandelli, und C. R. Sirtori. „Inhibition of Lipolysis by Nicotinic Acid and by Acipimox“. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 28, Nr. 6 (Dezember 1980): 790–95.

Giallourakis, Cosmas C. „Liver Complications in Patients with Congestive Heart Failure“. *Gastroenterology & Hepatology* 9, Nr. 4 (April 2013): 244–46.

Giallourakis, Cosmas C., Peter M. Rosenberg, und Lawrence S. Friedman. „The Liver in Heart Failure“. *Clinics in Liver Disease* 6, Nr. 4 (November 2002): 947–967, viii–ix.

Grueter, Chad E., Eva van Rooij, Brett A. Johnson, Susan M. DeLeon, Lillian B. Sutherland, Xiaoxia Qi, Laurent Gautron, Joel K. Elmquist, Rhonda Bassel-Duby, und Eric N. Olson. „A Cardiac MicroRNA Governs Systemic Energy Homeostasis by Regulation of MED13“. *Cell* 149, Nr. 3 (April 2012): 671–83.

Halbirk, Mads, Helene Nørrelund, Niels Møller, Ole Schmitz, Liv Gøtzsche, Roni Nielsen, Jens Erik Nielsen-Kudsk, u. a. „Suppression of circulating free fatty acids with acipimox in chronic heart failure patients changes whole body metabolism but does not affect cardiac function“. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 299, Nr. 4 (13. August 2010): H1220–25.

Heinrich PC, Müller M, Graeve L. „Loeffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie“, 9. Auflage 2014, 195, 699

Henrion, J., O. Descamps, R. Luwaert, M. Schapira, A. Parfonry, und F. Heller. „Hypoxic Hepatitis in

Patients with Cardiac Failure: Incidence in a Coronary Care Unit and Measurement of Hepatic Blood Flow“. *Journal of Hepatology* 21, Nr. 5 (November 1994): 696–703.

Herold, Gerd, „Innere Medizin“ 2018, 209-224

Heusch, Gerd, Peter Libby, Bernard Gersh, Derek Yellon, Michael Böhm, Gary Lopaschuk, und Lionel Opie. „Lancet Seminar: Cardiovascular Remodelling in Coronary Artery Disease and Heart Failure“. *Lancet* 383, Nr. 9932 (31. Mai 2014): 1933–43.

Jahng, James Won Suk, Erfei Song, und Gary Sweeney. „Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure“. *Experimental & Molecular Medicine* 48, Nr. 3 (März 2016): e217.

Kato, Takao, Shinichiro Niizuma, Yasutaka Inuzuka, Tsuneaki Kawashima, Junji Okuda, Akira Kawamoto, Yodo Tamaki, u. a. „Analysis of Liver Metabolism in a Rat Model of Heart Failure“. *International Journal of Cardiology* 161, Nr. 3 (29. November 2012): 130–36.

Kubo, S. H., B. A. Walter, D. H. John, M. Clark, und R. J. Cody. „Liver Function Abnormalities in Chronic Heart Failure. Influence of Systemic Hemodynamics“. *Archives of Internal Medicine* 147, Nr. 7 (Juli 1987): 1227–30.

Leitner, „Heart failure rapidly induces Wasting-related Program in skeletal muscle“, Dissertation Lucia Leitner 2017

Leung, Po Sing, Po Man Suen, Siu Po Ip, Chun Kit Yip, George Chen, und Paul B. S. Lai. „Expression and Localization of AT1 Receptors in Hepatic Kupffer Cells: Its Potential Role in Regulating a Fibrogenic Response“. *Regulatory Peptides* 116, Nr. 1–3 (15. November 2003): 61–69.

Levine, B., J. Kalman, L. Mayer, H. M. Fillit, und M. Packer. „Elevated Circulating Levels of Tumor Necrosis Factor in Severe Chronic Heart Failure“. *The New England Journal of Medicine* 323, Nr. 4 (26. Juli 1990): 236–41.

Liu, Gang, Shuai Chen, Jin Zhong, Kunling Teng, und Yulong Yin. „Crosstalk between Tryptophan Metabolism and Cardiovascular Disease, Mechanisms, and Therapeutic Implications“. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 (2017).

Livak, K. J., und T. D. Schmittgen. „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method“. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, Nr. 4 (Dezember 2001): 402–8.

Lommi, J., K. Pulkki, P. Koskinen, H. Näveri, H. Leinonen, M. Härkönen, und M. Kupari.

„Haemodynamic, Neuroendocrine and Metabolic Correlates of Circulating Cytokine Concentrations in Congestive Heart Failure“. *European Heart Journal* 18, Nr. 10 (Oktober 1997): 1620–25.

Magida, Jason A., und Leslie A. Leinwand. „Metabolic Crosstalk between the Heart and Liver Impacts Familial Hypertrophic Cardiomyopathy“. *EMBO Molecular Medicine* 6, Nr. 4 (2014): 482–95.

Mándi, Yvette, und László Vécsei. „The Kynurenine System and Immunoregulation“. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 119, Nr. 2 (Februar 2012): 197–209.

Mangge, Harald, Kelli L. Summers, Andreas Meinitzer, Sieglinde Zelzer, Gunter Almer, Ruth Prassl, Wolfgang J. Schnedl, u. a. „Obesity-Related Dysregulation of the Tryptophan-Kynurenine Metabolism: Role of Age and Parameters of the Metabolic Syndrome“. *Obesity (Silver Spring, Md.)* 22, Nr. 1 (Januar 2014): 195–201.

McMurray, John J. V., Stamatis Adamopoulos, Stefan D. Anker, Angelo Auricchio, Michael Böhm, Kenneth Dickstein, Volkmar Falk, u. a. „ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in Collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC“. *European Journal of Heart Failure* 14, Nr. 8 (August 2012): 803–69.

Mellor, Andrew L., und David H. Munn. „Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 170, Nr. 12 (15. Juni 2003): 5809–13.

Myers, Robert P., Raimondo Cerini, Raymond Sayegh, Richard Moreau, Claude Degott, Didier Lebec, und Samuel S. Lee. „Cardiac Hepatopathy: Clinical, Hemodynamic, and Histologic Characteristics and Correlations“. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 37, Nr. 2 (Februar 2003): 393–400.

Nakamura, Michinari, und Junichi Sadoshima. „Heart over Mind: Metabolic Control of White Adipose Tissue and Liver“. *EMBO Molecular Medicine* 6, Nr. 12 (Dezember 2014): 1521–24.

Nakayama, Hiroyuki, und Kinya Otsu. „Translation of Hemodynamic Stress to Sterile Inflammation in the Heart“. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24, Nr. 11 (November 2013): 546–53.

Neubauer, Stefan. „The Failing Heart--an Engine out of Fuel“. *The New England Journal of Medicine* 356, Nr. 11 (15. März 2007): 1140–51.

Niinistö, P., A. Raitala, M. Pertovaara, S. S. Oja, T. Lehtimäki, M. Kähönen, A. Reunanen, u. a. „Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity Associates with Cardiovascular Risk Factors: The Health 2000 Study“. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 68, Nr. 8 (2008): 767–70.

Paul, Andrew, Susan Wilson, Christopher M Belham, Caspar J. M Robinson, Pamela H Scott, Gwyn W Gould, und Robin Plevin. „Stress-activated Protein Kinases: Activation, Regulation and Function“. *Cellular Signalling* 9, Nr. 6 (1. September 1997): 403–10.

Perk, Joep, Guy De Backer, Helmut Gohlke, Ian Graham, Zeljko Reiner, Monique Verschuren, Christian Albus, u. a. „European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by Representatives of Nine Societies and by Invited Experts)“. *European Heart Journal* 33, Nr. 13 (Juli 2012): 1635–1701.

Pertovaara, M., A. Raitala, M. Juonala, T. Lehtimäki, H. Huhtala, S. S. Oja, E. Jokinen, J. S. A. Viikari, O. T. Raitakari, und M. Hurme. „Indoleamine 2,3-Dioxygenase Enzyme Activity Correlates with Risk Factors for Atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study“. *Clinical and Experimental Immunology* 148, Nr. 1 (April 2007): 106–11.

Poelzl, Gerhard, Michael Ess, Christine Mussner-Seeber, Otmar Pachinger, Matthias Frick, und Hanno Ulmer. „Liver Dysfunction in Chronic Heart Failure: Prevalence, Characteristics and Prognostic Significance“. *European Journal of Clinical Investigation* 42, Nr. 2 (1. Februar 2012): 153–63.

Safran, A. P., und F. Schaffner. „Chronic Passive Congestion of the Liver in Man. Electron Microscopic Study of Cell Atrophy and Intralobular Fibrosis“. *The American Journal of Pathology* 50, Nr. 3 (März 1967): 447–63.

Santomauro, A. T., G. Boden, M. E. Silva, D. M. Rocha, R. F. Santos, M. J. Ursich, P. G. Strassmann, und B. L. Wajchenberg. „Overnight Lowering of Free Fatty Acids with Acipimox Improves Insulin Resistance and Glucose Tolerance in Obese Diabetic and Nondiabetic Subjects“. *Diabetes* 48, Nr. 9 (September 1999): 1836–41.

Schneider, A. W., J. F. Kalk, und C. P. Klein. „Effect of Losartan, an Angiotensin II Receptor Antagonist, on Portal Pressure in Cirrhosis“. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29, Nr. 2 (Februar 1999): 334–39.

Schroeder, Andreas, Odilo Mueller, Susanne Stocker, Ruediger Salowsky, Michael Leiber, Marcus Gassmann, Samar Lightfoot, Wolfram Menzel, Martin Granzow, und Thomas Ragg. „The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements“. *BMC Molecular Biology* 7 (31. Januar 2006): 3.

Seeto, R. K., B. Fenn, und D. C. Rockey. „Ischemic Hepatitis: Clinical Presentation and Pathogenesis“. *The American Journal of Medicine* 109, Nr. 2 (1. August 2000): 109–13.

Seta, Y., K. Shan, B. Bozkurt, H. Oral, und D. L. Mann. „Basic Mechanisms in Heart Failure: The Cytokine Hypothesis“. *Journal of Cardiac Failure* 2, Nr. 3 (September 1996): 243–49.

Sherlock, Sheila. „The Liver in Heart Failure Relation of Anatomical, Functional, and Circulatory Changes“. *Heart* 13, Nr. 3 (1. Juli 1951): 273–93.

Sirtori, C. R., G. Gianfranceschi, M. Sirtori, F. Bernini, G. Descovich, U. Montaguti, L. M. Fuccella, und L. Musatti. „Reduced Triglyceridemia and Increased High Density Lipoprotein Cholesterol Levels after Treatment with Acipimox, a New Inhibitor of Lipolysis“. *Atherosclerosis* 38, Nr. 3–4 (März 1981): 267–71.

Sohal, D. S., M. Nghiem, M. A. Crackower, S. A. Witt, T. R. Kimball, K. M. Tymitz, J. M. Penninger, und J. D. Molkentin. „Temporally Regulated and Tissue-Specific Gene Manipulations in the Adult and Embryonic Heart Using a Tamoxifen-Inducible Cre Protein“. *Circulation Research* 89, Nr. 1 (6. Juli 2001): 20–25.

Stanley, William C., Fabio A. Recchia, und Gary D. Lopaschuk. „Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart“. *Physiological Reviews* 85, Nr. 3 (1. Juli 2005): 1093–1129.

Stone, Trevor W., Nicholas Stoy, und L. Gail Darlington. „An Expanding Range of Targets for Kynurenine Metabolites of Tryptophan“. *Trends in Pharmacological Sciences* 34, Nr. 2 (Februar 2013): 136–43.

Strassburg, Sabine, Jochen Springer, und Stefan D. Anker. „Muscle Wasting in Cardiac Cachexia“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, Nr. 10 (Oktober 2005): 1938–47.

Styczynski, Grzegorz, Aleksandra Milewska, Małgorzata Marczewska, Piotr Sobieraj, Magdalena Sobczynska, Michal Dabrowski, Agnieszka Kuch-Wocial, und Cezary Szmigielski. „Echocardiographic Correlates of Abnormal Liver Tests in Patients with Exacerbation of Chronic Heart Failure“. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 29, Nr. 2 (Februar 2016): 132–39.

Sulo, Gerhard, Stein E. Vollset, Ottar Nygård, Øivind Midttun, Per Magne Ueland, Simone J. P. M. Eussen, Eva R. Pedersen, und Grethe S. Tell. „Neopterin and Kynurenine-Tryptophan Ratio as Predictors of Coronary Events in Older Adults, the Hordaland Health Study“. *International Journal of Cardiology* 168, Nr. 2 (30. September 2013): 1435–40.

Sundaram, Varun, und James C. Fang. „Gastrointestinal and Liver Issues in Heart Failure“. *Circulation* 133, Nr. 17 (26. April 2016): 1696–1703.

Thomsen, Rune, Christina Ane Elisabeth Sølvsten, Toke Elbek Linnet, Jenny Blechingberg, und Anders Lade Nielsen. „Analysis of qPCR Data by Converting Exponentially Related Ct Values into Linearly Related X0 Values“. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 8, Nr. 5 (Oktober 2010): 885–900.

Verrou, C., Y. Zhang, C. Zürn, W. W. Schamel, und M. Reth. „Comparison of the Tamoxifen Regulated Chimeric Cre Recombinases MerCreMer and CreMer“. *Biological Chemistry* 380, Nr. 12 (Dezember 1999): 1435–38.

Welsch, U., Sobotta J. „Lehrbuch Atlas Histologie“, 2003, pp 349-360

Wirleitner, B., V. Rudzite, G. Neurauter, C. Murr, U. Kalnins, A. Erglis, K. Trusinskis, und D. Fuchs. „Immune Activation and Degradation of Tryptophan in Coronary Heart Disease“. *European Journal of Clinical Investigation* 33, Nr. 7 (Juli 2003): 550–54.

Yang, Xingyuan, Xin Lu, Marc Lombès, Geun Bae Rha, Young-In Chi, Theresa M. Guerin, Eric J. Smart, und Jun Liu. „The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase“. *Cell metabolism* 11, Nr. 3 (3. März 2010): 194–205.

Yoshida, Kenichi, Tetsuya Shimizugawa, Mitsuru Ono, und Hidehiko Furukawa. „Angiopoietin-like Protein 4 Is a Potent Hyperlipidemia-Inducing Factor in Mice and Inhibitor of Lipoprotein Lipase“. *Journal of Lipid Research* 43, Nr. 11 (1. November 2002): 1770–72.

Yoshiji, H., S. Kuriyama, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, T. Nakatani, H. Tsujinoue, und H. Fukui. „Angiotensin-II Type 1 Receptor Interaction Is a Major Regulator for Liver Fibrosis Development in Rats“. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 34, Nr. 4 Pt 1 (Oktober 2001): 745–50.

Zandbergen, Fokko, Stéphane Mandard, Pascal Escher, Nguan Soon Tan, David Patsouris, Tim Jatkoe, Sandra Rojas-Caro, u. a. „The G0/G1 Switch Gene 2 Is a Novel PPAR Target Gene“. *Biochemical Journal* 392, Nr. 2 (1. Dezember 2005): 313–24.

Zhabyeyev, Pavel, Manoj Gandhi, Jun Mori, Ratnadeep Basu, Zamaneh Kassiri, Alexander Clanachan, Gary D. Lopaschuk, und Gavin Y. Oudit. „Pressure-Overload-Induced Heart Failure Induces a Selective Reduction in Glucose Oxidation at Physiological Afterload“. *Cardiovascular Research* 97, Nr. 4 (15. März 2013): 676–85.

## **Danksagung**

Zunächst einmal möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Axel Gödecke bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat im Rahmen des IRTG 1902, an diesem Thema und in diesem Institut zu arbeiten und zu forschen. Vielen Dank für die durchgehend immer vorhandene Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern des Instituts bedanken.

Vor allem zu erwähnen ist hierbei meine Betreuerin und dadurch gewonnene Freundin Dr. Katharina Bottermann, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mich in allen Vorhaben unterstützt hat und immer für ein persönliches Treffen Zeit hatte (auch aus den USA und Frankfurt). Vielen Dank für all die positiven Worte und die schnellen Korrekturen, das ist nicht selbstverständlich!

Des Weiteren danke ich Dr. Lucia Leitner, die stets eine große Stütze war.

Meinem Lebenspartner Simon Ellermann danke ich für die Unterstützung in den letzten Zügen der Korrektur.

Zuletzt möchte ich besonders meine Familie erwähnen, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben und damit auch zu promovieren. Meiner Mutter, meiner Schwester Lena und meinem Bruder Michael, vielen Dank für alles!