

**Knockout der adipozytenspezifischen
Adipozyten-Triglycerid-Lipase im murinen
Modell moduliert den kardialen Metabolismus
und reduziert die kardiale Funktion nach
Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Heba Zabri
aus Aleppo

Düsseldorf, November 2024

aus dem Institut für Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

2. Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung:

01.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.2 Der Myokardinfarkt	2
1.2.1 Phasen der Herzreparatur nach Myokardinfarkt.....	3
1.2.2 Kardialer Metabolismus im gesunden und ischämischen Herzen	5
1.3 Das Fettgewebe	8
1.3.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ	9
1.3.2 Periphere Lipolyse und ihre Regulation.....	11
1.3.3 Adipozyten-Triglycerid-Lipase	13
1.3.4 Lipogenese	16
1.4 Der Zusammenhang zwischen Myokardinfarkt und Lipolyse im peripheren Fettgewebe.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Materialien und Methoden	19
2.1 Tierhaltung und Tierversuche.....	19
2.1.1 Verwendete Maus-Linien.....	19
2.1.2 Induktion des ATGL-Knockouts.....	20
2.1.3 Studiendesign des Myokardinfarkt-Modells.....	21
2.1.4 Stimulation der Lipolyse mit CL-316,243.....	22
2.1.5 Experimentelle Induktion von Myokardischämie und Reperfusion	22
2.1.6 Echokardiographie.....	23
2.2 Blut-Untersuchungen.....	23
2.2.1 Messung der nicht-veresterten freien Fettsäuren.....	23
2.2.2 Bestimmung von Adipokinen und anderen Stoffwechselhormonen	24
2.3 Histologische Analysen	24
2.3.1 Weizenkeimagglutinin-Färbung	25
2.3.2 Messung der Narbengröße nach Myokardinfarkt	25
2.3.3 Hämalaun und Eosin-Färbung.....	25

2.3.4 Bestimmung der Größenverteilung der Adipozyten.....	26
2.4 Evans Blau- und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung	26
2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer <i>real-time</i> -PCR	28
2.5.1 RNA-Isolierung aus Herz- und Fettgewebe.....	28
2.5.2 <i>Complementary DNA</i> -Synthese	30
2.5.3 Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	30
2.6 Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot.....	31
2.6.1 Protein-Isolierung aus dem Fettgewebe.....	32
2.6.2 Quantitative Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Test.....	33
2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse.....	33
2.7 Messung extrazellulärer Flüsse in Echtzeit	34
2.7.1 Vorbereitung von Gewebestücken aus dem Herzen	34
2.7.2 Messung und Analyse von Sauerstoffverbrauch und Substratumsatz	35
2.8 Statistische Analysen	35
3 Ergebnisse	37
3.1 Aktivierung der peripheren Lipolyse nach Myokardinfarkt.....	37
3.1.1 Anstieg der zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren nach Myokardinfarkt	37
3.1.2 Vermehrte Phosphorylierung von Proteinkinase A-Substraten im inguinalen Fettgewebe nach Myokardinfarkt	38
3.1.3 Vermehrte Phosphorylierung der hormonsensitiven Lipase nach Myokardinfarkt	40
3.2 Validierung der Effizienz des Tamoxifen-induzierbaren, adipozytenspezifischen ATGL-KOs	41
3.2.1 Verringerte ATGL-Proteinspiegel im Fettgewebe nach der Induktion des ATGL-KOs durch 4-Hydroxytamoxifen	42
3.2.2 Einfluss des ATGL-KOs auf die zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren nach Aktivierung der Lipolyse via CL-316,243	44
3.3 Modell des Myokardinfarkts im Tamoxifen-induzierbaren und adipozytenspezifischen ATGL-KO-Mausmodell	45
3.4 Die Konzentration der nicht-veresterten freien Fettsäuren nach Myokardinfarkt ist bei ATGL-KO-Tieren erniedrigt.....	46
3.5 Einfluss des ATGL-KOs auf das Fettgewebe	47
3.5.1 Zunahme der Fettgewebsgewichte bei ATGL-KO-Tieren	47
3.5.2 Zunahme der Adipozytentgröße bei ATGL-KO-Tieren	49

3.5.3 Verminderte Expression von Lipogenese-Genen im Fettgewebe	51
3.5.4 Verminderte Expression von Adipokin-kodierenden Genen im Fettgewebe	53
3.6 Reduzierte Konzentration von zirkulierendem Adiponektin	55
3.7 Kardialer Phänotyp des adipozytenspezifischen ATGL-KO nach Myokardinfarkt....	56
3.7.1 Absolute Herzgewichte sind durch den ATGL-KO unverändert	56
3.7.2 Verminderte kardiale Funktion nach Myokardinfarkt durch den ATGL-KO	58
3.7.3 Infarktgröße und Narbengröße	60
3.7.4 Der ATGL-KO ist zum Zeitpunkt der letzten Versuche im Fettgewebe noch vorhanden.....	62
3.8 Kardialer Substratmetabolismus im nicht-ischämischen <i>Remote</i> -Myokard.....	63
3.8.1 Adipozytenspezifischer ATGL-KO führt zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch und erhöhter Abhängigkeit von Glukose	63
3.8.2 Erhöhte Expression von Genen, die am Fettsäuremetabolismus und Glukosemetabolismus beteiligt sind	67
4 Diskussion	71
4.1 Aktivierung der Lipolyse durch den Myokardinfarkt.....	71
4.2 ATGL-KO zur Hemmung der Lipolyse.....	73
4.3 Hemmung der Lipolyse durch den ATGL-KO ruft Veränderungen im weißen Fettgewebe hervor	75
4.4 Hemmung der Lipolyse durch den ATGL-KO verschlechtert die kardiale Funktion und verändert den kardialen Metabolismus nach dem Myokardinfarkt	77
4.5 Limitierung und Ausblick	81
5 Zusammenfassung	83
6 Summary	84
7 Abbildungsverzeichnis	85
8 Tabellenverzeichnis	87
9 Literaturverzeichnis	88
10 Publikationen.....	99
11 Danksagung.....	100
12 Eidestattliche Versicherung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
AAR	<i>Area at risk</i>
ABHD5	<i>Abhydrolase domain containing 5</i>
Acadm	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain
Adipoq	Adiponectin
AMPK	Adenosinmonophosphat-abhängige-Kinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD36	Cluster of differentiation 36
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CGI-58	<i>Comparative gene identification-58</i>
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
Cre	<i>Causes/cyclization recombination</i>
CreERT2	<i>Cre recombinase-estrogen receptor T2</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dgat	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribunucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithiothreit
Ech1	Enoyl coenzyme A hydratase 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EKG	Elektrokardiogramm
<i>Fabp3</i>	Fatty acid binding protein 3
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy) phenylhydrazone
g	Gramm
<i>g</i>	<i>Gravity</i>
G0S2	<i>G0/G1 switch gene 2</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT	Glukosetransporter
H&E	Hämalaun und Eosin
HSL	Hormonsensitive Lipase
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
<i>Lep</i>	Leptin
LPL	Lipoproteinlipase
mA	Milliampere
MCT	Monocarboxylat-Transporter
mg	Milligramm
MGL	Monoglycerid-Lipase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPC	Mitochondrialer Pyruvat-Carrier
<i>Ndufab1</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit AB1
NEFA	<i>Non-esterified fatty acids</i>
ng	Nanogramm
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
nm	Nanometer
NSTEMI	Nicht-ST-Stecken-Hebungsinfarkt

<i>Nudc</i>	Nuclear distribution C
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pg	Pikogramm
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PLIN1	Perilipin-1
<i>Pnpla2</i>	Patatin-like phospholipase domain containing protein 2
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
<i>Retn</i>	Resistin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<i>Slc2a4</i>	Solute carrier family 2 member 4
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen umfassen Erkrankungen des Herzens und der Blutgefäße wie koronare Herzkrankheiten, zerebrovaskuläre Erkrankungen, periphere arterielle Verschlusskrankheit, rheumatische Herzkrankheiten, angeborene Herzkrankheiten, tiefe Venenthrombose und Lungenembolie. Myokardinfarkte und Apoplexien sind dabei in der Regel akute Ereignisse und werden häufig durch eine Blockade des Blutflusses zum Herzen oder zum Gehirn verursacht.¹

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation waren ischämische Herzkrankheiten im Jahr 2019 weltweit die häufigste Todesursache, insbesondere in Ländern mit mittlerem und hohem Einkommen. Die Zahl der Todesfälle, die auf solche Erkrankungen zurückzuführen sind, ist zwischen 2000 und 2019 am stärksten gestiegen.² In Deutschland waren Krankheiten des Kreislaufsystems im Jahr 2022 mit einem Anteil von 33,6 % die Hauptursache für Todesfälle, gefolgt von bösartigen Neubildungen mit 21,7 %. An dritter und vierter Stelle folgten mit großem Abstand psychische und Verhaltensstörungen sowie Krankheiten des Atmungssystems mit 6,4 % bzw. 6,3 % (Abbildung 1). Dies zeigt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Innerhalb der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen waren chronische ischämische Herzkrankheiten mit 21,7 % und der akute Myokardinfarkt mit 13 % die beiden häufigsten Todesursachen, gefolgt von der Herzinsuffizienz mit 10,5 %,³ die häufig als Komplikation eines Myokardinfarkts auftritt.⁴

Zu den Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zählen unter anderem ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, Tabakkonsum und übermäßiger Alkoholkonsum. Diese Verhaltensweisen können zu erhöhtem Blutdruck, erhöhtem Blutzucker, erhöhten Blutfetten sowie Übergewicht führen und dadurch das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Aber auch Armut, Stress und genetische Prädisposition gehören zu den Risikofaktoren.¹ Zur Prophylaxe von Myokardinfarkt und Apoplex ist daher neben einem gesunden Lebensstil auch die medikamentöse Behandlung von Hypertonie, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie von Bedeutung. Auch die Aufklärung der Pathomechanismen spielt eine wichtige Rolle, insbesondere für die Risikominimierung von Folgeerkrankungen wie zum Beispiel der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt. Hierbei ist ein besseres Verständnis der Umbauprozesse des Herzens, auch kardiales *Remodeling* genannt, erforderlich, um neue Therapieansätze für eine verbesserte Heilung zu etablieren.

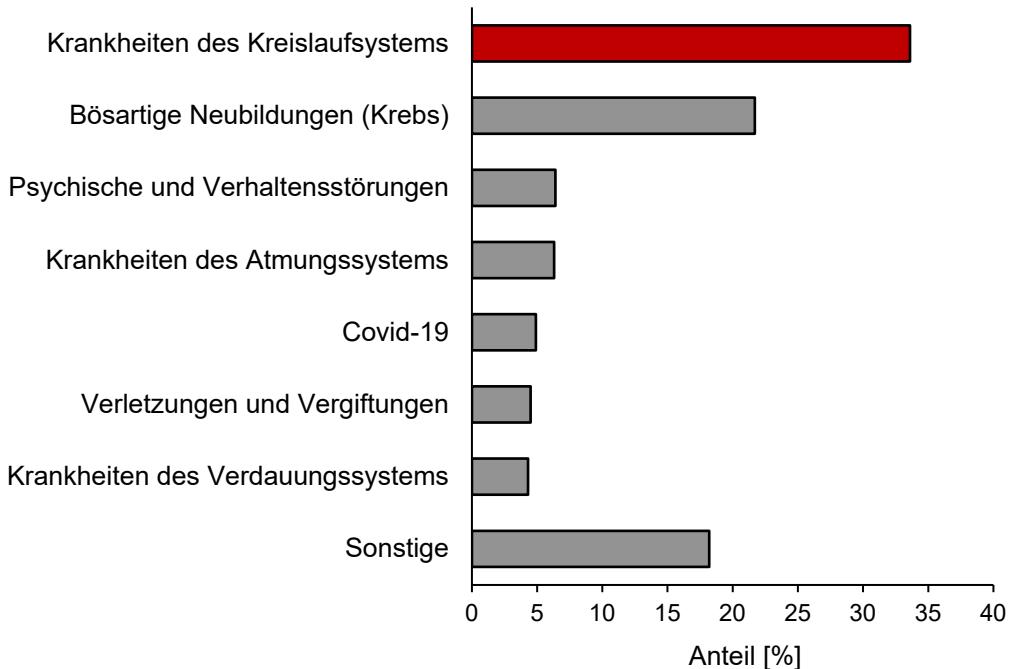


Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten in Deutschland im Jahr 2022 in %
Die aufgeführten Todesfälle betreffen Personen jeden Alters und Geschlechts.³

1.2 Der Myokardinfarkt

Die Versorgung des Herzens mit sauerstoffreichem Blut erfolgt über die Koronararterien, auch Herzkrankgefäß genannt. Diese entspringen aus der Aortenwurzel und werden primär in die rechte und die linke Koronararterie unterteilt. Von diesen Hauptarterien zweigen zahlreiche kleinere Äste ab, die verschiedene Bereiche des Herzens versorgen.⁵ Der Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels ist proportional zum Energieverbrauch und hängt vom Druck-Frequenz-Produkt, der Kontraktilität und der myokardialen Wandspannung ab.⁶

Ein Myokardinfarkt tritt auf, wenn die Blutversorgung eines Teils des Myokards unterbrochen wird. Dies geschieht in der Regel durch den Verschluss einer Koronararterie, was zu einer verminderten Sauerstoffversorgung und zu einer ischämischen Myokardnekrose führt.⁷ Die häufigste Ursache für den Verschluss einer Koronararterie ist die Arteriosklerose.⁸ Dabei handelt es sich um eine chronische Erkrankung der arteriellen Gefäßwände, bei der sich unter anderem Blutlipide in der Arterienwand ablagern. Das Ausmaß dieser Ablagerungen wird durch die Lipidkonzentration im Blut und die Durchlässigkeit der Arterienwand bestimmt, die aufgrund von mechanischen und immunologischen Verletzungen zunimmt. Die angesammelten Lipide fördern Entzündungsreaktionen und die Bildung von arteriosklerotischen Plaques.⁹ Im Laufe der Zeit kann es zur Ruptur der Plaques kommen, was

zur Aktivierung von Gerinnungsprozessen führt und die Bildung eines Thrombus begünstigt. Dieser kann entweder den Blutfluss an der Entstehungsstelle unterbrechen oder sich von der Arterienwand ablösen und den Blutfluss in peripheren Arterien behindern. Eine Unterbrechung des Blutflusses in einer Koronararterie kann je nach Ausmaß der Blockade zu einem Myokardinfarkt führen.¹⁰ Symptome wie länger anhaltende Schmerzen oder Unwohlsein in der Brust, in einem oder beiden Armen, Schultern, Kiefer, Nacken oder Rücken, Kurzatmigkeit, Benommenheit oder Ohnmacht mit kaltem Schweiß können auftreten.¹¹ Es ist jedoch auch möglich, dass ein Myokardinfarkt asymptomatisch verläuft, wie im Fall des stummen Infarkts.¹² Zur Diagnose eines Myokardinfarkts wird der Nachweis von erhöhtem kardialem Troponin im Plasma verwendet, welches bei einer Schädigung der Kardiomyozyten ins Blut gelangt und somit als wichtiger Biomarker dient.¹³ Ein weiteres wichtiges Diagnoseverfahren stellt die Elektrokardiografie dar. Abhängig vom Grad des Arterienverschlusses liefert die Herzstromkurve entweder einen ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) bei einem totalen Verschluss oder einen nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) bei einem partiellen Verschluss. Diese Unterscheidung ermöglicht Rückschlüsse auf die Behandlung und Mortalität. Es ist jedoch auch möglich, dass ein NSTEMI trotzdem mit einem totalen Gefäßverschluss einhergeht.¹⁴

Nach einem Myokardinfarkt ist die schnellstmögliche Wiederherstellung des Blutflusses (Reperfusion) entscheidend, um die Schädigung des Herzgewebes zu minimieren. Hierbei spielt die perkutane Koronarintervention eine zentrale Rolle. Paradoxerweise kann nicht nur die Ischämie, sondern auch die Reperfusion das Herzgewebe schädigen, zum Beispiel durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, intrazelluläre Calciumüberladung, Öffnung der mitochondrialen Permeabilitättransitionsaporen und Inflammation.¹⁵

Die infolge eines Myokardinfarkts abgestorbenen Kardiomyozyten werden durch kollagenhaltiges Narbengewebe ersetzt, welches zwar die Struktur des Ventrikels intakt hält, aber die kontraktile Herzfunktion nicht mehr unterstützen kann.¹⁶ Eine häufige Folge ist daher die chronische Herzinsuffizienz, die je nach Studie bei bis zu 36 % der hospitalisierten Patienten auftritt.¹⁷

1.2.1 Phasen der Herzreparatur nach Myokardinfarkt

Der Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt lässt sich in drei überlappende Phasen einteilen: die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Reifungsphase (Abbildung 2). Während der Entzündungsphase wird das angeborene Immunsystem aktiviert und inflammatorische Leukozyten werden rekrutiert, um die Wunde von abgestorbenen Zellen zu

befreien. Nekrotische Kardiomyozyten setzen *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), auch Alarmino genannt, frei, die vorhandene Immunzellen aktivieren und weitere in das Herzgewebe rekrutieren. Zu den Alarminen gehören zum Beispiel Proteine der S100-Familie, extrazelluläre RNA, Hitzeschockproteine und Zytokine wie Interleukin (IL)-1. Zusätzlich werden durch die geschädigte Matrix Matrixproteinfragmente freigesetzt, die ebenfalls Immunzellen aktivieren.¹⁶ Die ersten Immunzellen, die auf die DAMPs über sogenannte *pattern-recognition-receptors* reagieren und in das geschädigte Myokard infiltrieren, sind die neutrophilen Granulozyten. Durch Phagozytose abgestorbener Zellen sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Proteasen initiieren Neutrophile Umbauprozesse der extrazellulären Matrix. Nach etwa 24 Stunden ist der Höhepunkt der Neutrophileninfiltration erreicht und es kommt zu einer verstärkten Einwanderung zirkulierender Monozyten in das geschädigte Herzgewebe. Dort sammeln sich zunächst proinflammatorische Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren und durch die Freisetzung von Proteasen wie Matrixmetalloproteininasen und Kathepsinen den Abbau nekrotischer Trümmer fördern. Nach etwa 3 Tagen nimmt die Monozyteninfiltration ab und die Funktion der Monozyten und Makrophagen verschiebt sich in Richtung Gewebereparatur durch eine vermehrte Expression von antiinflammatorischen, profibrotischen Mediatoren und angiogenen Wachstumsfaktoren wie IL-10, *transforming growth factor-β* und *vascular endothelial growth factors*.¹⁸ Dadurch wird die Entzündungsreaktion unterdrückt und die proliferative Phase eingeleitet, in der die kardialen Fibroblasten expandieren und in einen aktivierten Myofibroblasten-Phänotyp übergehen, der durch die Expression kontraktiler Proteine und die Ablagerung extrazellulärer Matrix gekennzeichnet ist. Darüber hinaus produzieren aktivierte Myofibroblasten große Mengen an strukturellen Matrixproteinen wie Kollagen, um eine Ruptur des Myokards zu verhindern und die Narbenbildung zu fördern.¹⁹ In der letzten Phase des Heilungsprozesses, der Reifungsphase, werden reparative Zellen entfernt und die Matrix quervernetzt. Die Zahl der aktivierte Myofibroblasten nimmt deutlich ab, viele unterliegen der Apoptose, werden inaktiviert oder zeigen eine verminderte Fähigkeit zur Synthese von Matrixproteinen und kontraktilen Proteinen. Zudem kommt es zu einer verstärkten Expression von Enzymen wie der Lysyloxidase, die der Quervernetzung von Matrixproteinen wie Kollagen und damit der Stabilität der Narbe dienen.¹⁶

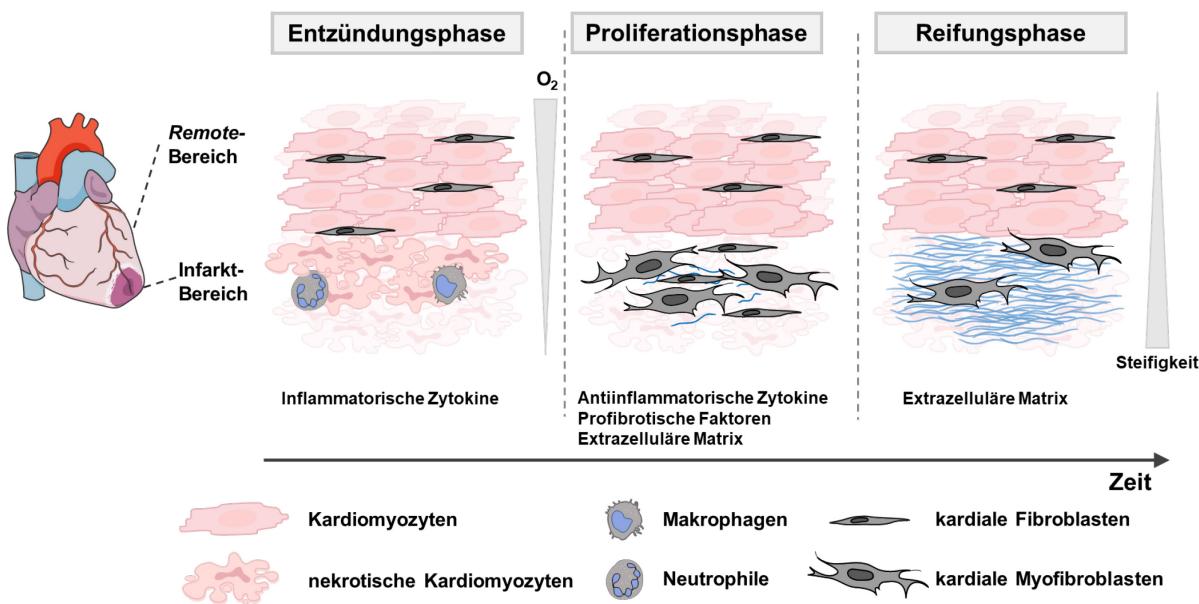


Abbildung 2: Phasen der Herzreparatur nach dem Myokardinfarkt

Die drei Phasen der Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt und die entsprechenden Veränderungen im Infarkt-Bereich im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach Khalil *et al.*²⁰). Beginnend mit der Freisetzung inflammatorischer Zytokine und der Infiltration von Makrophagen und Neutrophilen in der Entzündungsphase, gefolgt von der Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine und profibrotischer Faktoren während der Proliferationsphase, bis hin zur Bildung der extrazellulären Matrix während der Reifungsphase. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1.2.2 Kardialer Metabolismus im gesunden und ischämischen Herzen

Das Herz benötigt zur Aufrechterhaltung seiner Funktion viel Energie, die durch die kontinuierliche Produktion enormer Mengen an Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt wird. Diese Energie wird hauptsächlich durch zwei Prozesse generiert: die mitochondriale oxidative Phosphorylierung, die in der Regel etwa 95 % zur ATP-Produktion des Myokards beiträgt, und die Glykolyse, die die restlichen 5 % liefert. Die Hauptenergiesubstrate des Herzens sind Fettsäuren, Laktat, Glukose, Ketone und Aminosäuren. Das Herz hat eine begrenzte Fähigkeit, diese Energiesubstrate intrazellulär zu speichern, weshalb sie kontinuierlich aus dem Blut aufgenommen werden müssen.²¹ Die Regulierung des Substratverbrauchs des Herzens hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu gehören die Plasmakonzentration des zugeführten Substrats, die Anzahl der spezifischen Substrattransporter in der Zellmembran sowie die Aktivitäten der metabolischen Enzyme.²² Etwa 40 – 60 % der gesamten mitochondrialen ATP-Produktion stammen aus der Oxidation von Fettsäuren. Der zweitwichtigste Beitrag zum Citratzyklus kommt aus der Oxidation von Pyruvat, welches aus Glukose und Laktat entsteht. Ketone machen 10 – 15 % aus, während Aminosäuren nur 1 – 2 % beitragen.^{21,23}

Der kardiale Metabolismus von Fettsäuren und Glukose ist schematisch dargestellt (Abbildung 3). Fettsäuren können nach der Aufnahme in die Zellen entweder als Triglyceride gespeichert oder in den Mitochondrien verstoffwechselt werden.²² Die Aufnahme erfolgt passiv durch die Plasmamembran der Kardiomyozyten oder über *cluster of differentiation 36* (CD36) und *fatty acid transport protein* (FATP) 1. Im Zellinneren werden sie zu Acyl-CoA verestert. Dieses wird durch die Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) 1 in Acylcarnitin umgewandelt und in die Mitochondrien transportiert. Dort wird es durch CPT2 wieder in Acyl-CoA umgewandelt und kann einer β -Oxidation unterzogen werden, wodurch Acetyl-CoA entsteht.^{21,24} CPT1 ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der mitochondrialen Fettsäureaufnahme und wird durch den endogenen Inhibitor Malonyl-CoA reguliert.²⁵ Glukose wird mithilfe von Glukosetransportern (GLUT) in die Kardiomyozyten transportiert und durch Glykolyse in Pyruvat umgewandelt.²¹ In der fötalen und frühen postnatalen Phase dominiert der insulinunabhängige GLUT1, während in adulten Kardiomyozyten der insulinabhängige GLUT4 die Hauptisoform darstellt.^{26,27} Laktat wird von den Kardiomyozyten über Monocarboxylat-Transporter (MCT) aufgenommen und durch Laktatdehydrogenase in Pyruvat umgewandelt. Das Pyruvat aus Glukose und Laktat wird über den mitochondrialen Pyruvat-Carrier (MPC) in die Mitochondrien transportiert und dort durch Pyruvat-Dehydrogenase in Acetyl-CoA umgewandelt. Der aus der Fettsäure- β -Oxidation, Glukose-Oxidation, Keton-Oxidation und Aminosäure-Oxidation erzeugte Acetyl-CoA gelangt in den Citratzyklus. Hier entstehen die Reduktionsäquivalente Flavinadenindinukleotid (FADH₂) und Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), welche in die Elektronentransportkette gelangen und Sauerstoff zur Erzeugung von ATP verbrauchen.²¹ Dabei werden die erzeugten Elektronen entlang der Enzymkomplexe der Elektronentransportkette transportiert und die Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum befördert, wodurch ein Protonengradient entsteht. Die Protonen folgen über die ATP-Synthase ihrem Gefälle zurück in die Mitochondrienmatrix, wobei die Diffusion an die Synthese von ATP gekoppelt ist. Die Oxidation von Fettsäuren produziert unter normalen Bedingungen pro oxidiertem Molekül mehr ATP als die Glukoseoxidation, verbraucht jedoch mehr Sauerstoff.²⁶ So führt die Oxidation von einem Mol Palmitat zu 129 Phosphatbindungen bei einem Verbrauch von 31 Mol O₂, während die Oxidation von 1 Mol Glukose zu 38 Phosphatbindungen führt unter Verwendung von 6 Mol O₂.²⁸

Aufgrund einer verminderten Gewebsperfusion im Rahmen einer Ischämie ist die Versorgung mit Sauerstoff und Atmungskettensubstraten unzureichend. Dies führt zu einer Hemmung der Pyruvat- und Fettsäureoxidation sowie der oxidativen Phosphorylierung²⁹ und beeinträchtigt folglich die ATP-Produktion. Um den Sauerstoffmangel zu kompensieren, wechselt die ATP-Produktion im Myokard vom aeroben zum anaeroben Modus. In diesem Zustand wird die

Glykolyse zur dominierenden Energiequelle, da sie 11 – 13 % mehr ATP pro verbrauchter Sauerstoffeinheit liefert als die β -Oxidation.²⁶ Der Wechsel während der Myokardischämie von der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung auf die anaerobe Glykolyse ist nicht ausreichend, um den ATP-Abfall zu kompensieren^{30,31} und führt zur Anhäufung von Laktat und Protonen (H^+), was den intrazellulären pH-Wert auf unter 7,0 absenkt. Der Anstieg intrazellulärer Protonen aktiviert den Na^+/H^+ -Ionenaustauscher, der Protonen aus der Zelle ausschüttet und gleichzeitig Na^+ aufnimmt. Dies führt zusammen mit einer Verringerung der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität aufgrund von ATP-Mangel zu einer intrazellulären Na^+ -Überladung. Daraufhin arbeitet der Na^+/Ca^{2+} -Ionenaustauscher im umgekehrten Modus, um überschüssiges Na^+ zu entfernen, was jedoch zu einer intrazellulären und mitochondrialen Ca^{2+} -Überladung führt.³¹ Durch den Mangel an ATP steigt die Konzentration von Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) an, wodurch die Adenosinmonophosphat-abhängige-Kinase (AMPK) aktiviert wird.³² Zusätzlich werden die kardialen Triglyceridspeicher während der Ischämie abgebaut, um Fettsäuren für die Oxidation bereitzustellen. Da der Fettsäurestoffwechsel während der Ischämie nicht mit der mitochondrialen Oxidation gekoppelt ist, führen der Abbau von Triglyceriden und die gehemmte β -Oxidation zu einer Akkumulation von Fettsäurezwischenprodukten wie Acylcarnitin in den Mitochondrien.^{29,33} Bei einer Reperfusion des ischämischen Gewebes wird der extrazelluläre pH-Wert schnell wiederhergestellt. Dadurch entsteht ein Protonengradient, der den Na^+/H^+ -Austausch erhöht und wie oben beschrieben zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Überladung führt. In der postischämischen Reperfusion erholt sich die Fettsäureoxidation schnell, während die Glukoseoxidation beeinträchtigt bleibt.³⁴ Dies ist auf eine erhöhte Fettsäureoxidation zurückzuführen, die nach Randle durch Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase die Glukoseoxidation im Muskel hemmt. Trotz der hohen Fettsäureoxidation bleibt die Glykolyse während der Reperfusion erhöht. Die bereits erwähnte Aktivierung von AMPK trägt zu den hohen Raten von Glykolyse und Fettsäureoxidation bei.^{35,36}

Insgesamt führen Sauerstoff- und Energiesubstratmangel während der Ischämie sowie die Wiederherstellung der Blutzufuhr während der Reperfusion zu einer Reihe von Veränderungen. Dazu gehören Störungen der Ionenhomöostase, Akkumulation von Stoffwechselzwischenprodukten und Anpassungen in den Mechanismen zur Regulierung des Substratstoffwechsels. Diese Veränderungen können sich auf die kardiale Funktion auswirken. Beispielsweise wird mehr ATP benötigt, um die Ionengradienten zu korrigieren, was die für die kontraktile Funktion verfügbare ATP-Menge verringert.³⁷

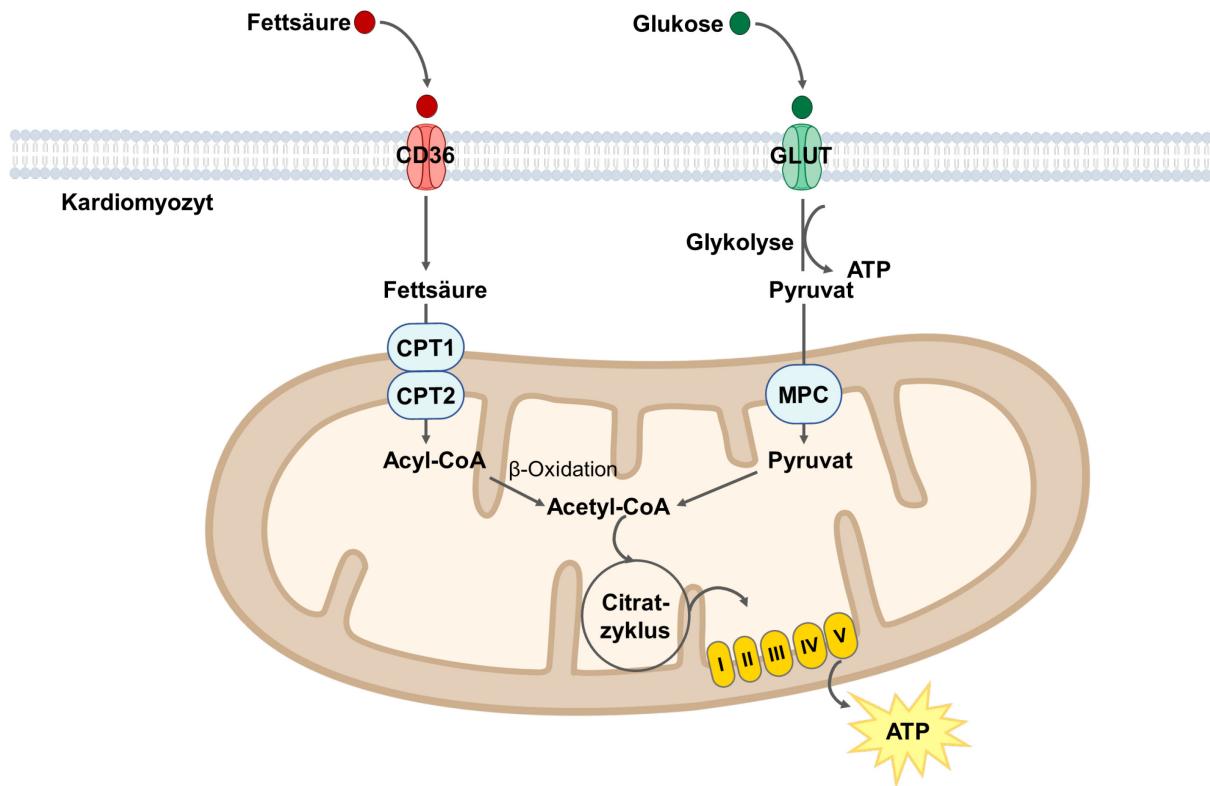


Abbildung 3: Der kardiale Metabolismus von Fettsäuren und Glukose

Fettsäuren gelangen über CD36 in die Kardiomyozyten, wo die über CPT in die Mitochondrien aufgenommen und im Rahmen der β -Oxidation zu Acetyl-CoA umgewandelt werden. Glukose wird über GLUT in die Kardiomyozyten transportiert, durchläuft dort die Glykolyse oder wird über MPC in die Mitochondrien aufgenommen und zu Acetyl-CoA umgewandelt. Das gebildete Acetyl-CoA tritt dann in den Citratzyklus ein. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1.3 Das Fettgewebe

Das Fettgewebe ist ein flexibles und heterogenes Organ, das volumenmäßig hauptsächlich aus Adipozyten besteht, die als Hauptenergiespeicher des Körpers dienen.^{38,39} Überschüssige Energie wird im Körper als Neutralfette in den Lipidtropfen der Adipozyten gespeichert. Diese bestehen aus einem Kern aus Neutralfetten wie Triglyceriden und Cholesterinestern, umgeben von einer Monoschicht aus Phospholipiden und Cholesterin, in die mehrere Proteine eingebettet sind.⁴⁰ Das Fettgewebe besteht neben den Adipozyten auch aus nicht-adipozytären Zellen wie Endothelzellen, Blutzellen, Fibroblasten, Perizyten, Präadipozyten, Makrophagen und weiteren Immunzellen, die zusammen als stromale vaskuläre Fraktion des Fettgewebes bezeichnet werden.⁴¹ Es wird nach Morphologie und Funktion in weißes, braunes und beiges Fettgewebe unterteilt, wobei das beige Fettgewebe eine

Mischform mit Merkmalen des weißen und braunen Fettgewebes darstellt.^{42,43} Pinke Adipozyten entstehen während der Schwangerschaft und Laktation und zeichnen sich durch mehrere Lipidtropfen und verschiedene Organellen wie raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und milchhaltige Granula aus.⁴³ Braune und beige Adipozyten zeichnen sich durch multilokuläre Lipidtropfen, eine hohe Anzahl an Mitochondrien und die Expression von *uncoupling protein 1* (UCP1) aus. Diese Adipozyten sind in der Lage, Thermogenese zu betreiben. Dabei fungiert das UCP1, auch Thermogenin genannt, als Protonenkanal in der inneren Mitochondrienmembran und löst dort den Protonengradienten unter Umgehung der ATP-Synthase auf, um anstelle von ATP Wärme zu erzeugen.³⁸ Die Adipozyten des weißen Fettgewebes sind durch große uniloculäre Lipidtropfen und wenige Mitochondrien gekennzeichnet. Das weiße Fettgewebe ist über den gesamten Körper verteilt und wird in viszerale und subkutane weiße Fettgewebsdepots unterteilt.⁴² Das subkutane Fettgewebe des Menschen wird in abdominales und gluteofemorales Fettgewebe unterteilt, wobei das abdominale Fettgewebe weiter in oberflächliches und tiefes subkutanes Fettgewebe gegliedert wird. Das murine subkutane Fettgewebe wird in anteriores axilläres und posteriores inguinale Fettgewebe unterteilt. Das viszerale Fettgewebe, das die inneren Organe umgibt, umfasst epikardiales/perikardiales, perirenales, retroperitoneales und mesenteriales weißes Fettgewebe. Ein Unterschied im viszeralen Fettgewebe besteht darin, dass der Mensch über ein großes omentales Fettdepot verfügt, während Mäuse über ein großes perigonadale Fettdepot verfügen.⁴⁴ Neben den genannten großen Fettdepots gibt es kleinere Adipozyten-Depots, die an verschiedenen Stellen wichtige Funktionen ausüben, z.B. in Brust, Knochenmark, Augenhöhlen, Gesicht, Gelenken, Füßen und Dermis. Mit der wichtigste Funktion des weißen Fettgewebes ist die Speicherung und Abgabe von Energie in Abhängigkeit vom Energiebedarf des Körpers, wobei Lipogenese (Fettsynthese) und Lipolyse (Fettabbau) eine Rolle spielen.³⁸ Das Fettgewebe ist ein Organ mit weiteren wichtigen physiologischen Funktionen. Neben der Speicherung und Mobilisierung von Energie sowie der Fähigkeit zur Thermogenese ist das Fettgewebe ein endokrines Organ, das Hormone, sogenannte Adipokine, produziert. Diese regulieren verschiedene physiologische Prozesse im gesamten Körper und wirken auf periphere Organe. Darüber hinaus dient das Fettgewebe der mechanischen Polsterung und Isolierung^{38,40} verschiedener Organe, wie z.B. der Niere.

1.3.1 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Das Fettgewebe sezerniert neben Fettsäuren, anderen Lipiden und Metaboliten auch über 600 bioaktive Faktoren, die als Adipokine bezeichnet werden.⁴⁵ Diese können auf endokrine, parakrine und autokrine Weise wirken.⁴⁶ Adipokine spielen eine wichtige Rolle sowohl im

Fettgewebe selbst, wo sie die Adipogenese, die Migration von Immunzellen sowie den Metabolismus und die Funktion der Adipozyten beeinflussen, als auch im gesamten Körper, wo sie biologische Prozesse in verschiedenen Organen wie Gehirn, Leber, Muskulatur, Gefäßen, Herz und Pankreas regulieren.⁴⁵ Zu den Prozessen, die durch vom Fettgewebe sezernierte Faktoren beeinflusst und reguliert werden, gehören: Energiehomöostase (Lipid- und Kohlenhydratmetabolismus, Appetit, Thermogenese), Immunsystem, Inflammation, maligne Prozesse sowie die kardiovaskuläre Funktion.^{47,48} Die Art und Menge der produzierten Adipokine hängen von verschiedenen Faktoren ab, wie der Art und Lokalisation des produzierenden Fettgewebes und seiner Wechselwirkung mit anderen Zellen.⁴⁸ Einige Adipokine, darunter Leptin, Resistin und Adiponektin, beeinflussen das kardiovaskuläre System und das kardiale *Remodeling* nach dem Myokardinfarkt.

Das Adipokin Leptin wird hauptsächlich vom Fettgewebe sezerniert und seine zirkulierenden Spiegel sind proportional zur Masse des Fettgewebes. Das Hormon reguliert Prozesse wie Nahrungsaufnahme, Thermogenese, Reproduktion, Hämostase, Angiogenese, Blutdruck und Immunantwort.⁴⁹ Leptin wirkt auf die Zielzellen durch die Bindung an seine Rezeptoren, wobei die Isoform des Leptinrezeptors Ob-Rb, auch LepRb genannt, vorherrscht.⁵⁰ LepRb wird stark im Hypothalamus exprimiert und kommt in geringerem Maße in peripheren Geweben und Makrophagen vor.⁴⁹ Durch die zentrale Wirkung von Leptin im Hypothalamus wird die Nahrungsaufnahme reduziert und die Energieverwertung gesteigert, außerdem wirkt es proinflammatorisch.⁵⁰ Leptin und seine Rezeptoren werden auch im Herzen exprimiert, und ihre Expressionsspiegel können durch eine Myokardischämie in den ersten Stunden der Reperfusion beeinflusst werden.⁵¹ Leptin kann die kardiale Funktion durch direkte Wirkung im Herzen beeinflussen. Ein kardiomyozytenspezifischer KO der Leptin-Rezeptoren führt zu einer Herzinsuffizienz mit verminderter kardialer Energieproduktion⁵² und verschlechtert die ischämische Herzinsuffizienz durch den Verlust der kardialen AMPK-Signalwege.⁵³

Resistin wird bei Nagetieren hauptsächlich vom Fettgewebe sezerniert, während es beim Menschen hauptsächlich von Makrophagen produziert wird, welche zum Beispiel bei Adipositas in das Fettgewebe infiltriert sind, und wirkt proinflammatorisch.⁵⁴ Resistin wurde mit Insulinresistenz in Verbindung gebracht. Die Verabreichung von rekombinantem Resistin beeinträchtigt die Glukosetoleranz und die Insulinwirkung bei normalen Mäusen, während die Verabreichung eines neutralisierenden Anti-Resistin-Antikörpers die Insulinsensitivität bei fettleibigen Mäusen verbessert.⁵⁵

Adiponektin zirkuliert hauptsächlich in drei Isoformen: ein Trimer mit niedrigem, ein Hexamer mit mittlerem und ein Multimer mit hohem Molekulargewicht, wobei letzteres die biologisch

aktivere Form darstellt. Die zirkulierenden Adiponektin-Spiegel sind im Gegensatz zu anderen Adipokinen umgekehrt proportional zur gesamten Fettmasse. Adiponektin steigert die Insulinsensitivität und wirkt antiinflammatorisch und antifibrotisch.⁴⁹ Seine Wirkung wird über drei Rezeptoren vermittelt: AdipoR1, AdipoR2 und T-Cadherin, die alle auch im Herzen exprimiert werden.⁵⁰ Niedrige Adiponektin-Spiegel werden mit einer erhöhten Prävalenz von Adipositas-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen wie ischämische Herzkrankheiten in Verbindung gebracht. Hohe Adiponektin-Spiegel zeigen in manchen Fällen ein verbessertes Ergebnis bei kardiovaskulären Ereignissen, während in anderen Fällen hohe Adiponektin-Spiegel mit keinem vorteilhaften oder sogar mit einem schädlichen Effekt assoziiert sind. Dieses Phänomen wird als Adiponektin-Paradoxon bezeichnet. Humanstudien haben gezeigt, dass niedrige Adiponektin-Spiegel mit negativen kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind. So war bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten das Verhältnis von hochmolekularem Adiponektin zu Gesamt-Adiponektin niedriger. Auch Zellkultur- und murine Untersuchungen haben gezeigt, dass Adiponektin, insbesondere die hochmolekulare Form, einen positiven Effekt auf die kardiovaskuläre Funktion hat.⁴⁹

Die zahlreichen Adipokine, die vom Fettgewebe sezerniert werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler metabolischer Prozesse und haben Einfluss auf den gesamten Körper. Adipokine dienen der Kommunikation zwischen dem Fettgewebe und anderen Organen.

1.3.2 Periphere Lipolyse und ihre Regulation

Die Lipolyse ist ein Stoffwechselprozess, bei dem Triglyceride hydrolytisch in nicht-veresterte Fettsäuren (*non-esterified fatty acids*: NEFA) und Glycerol gespalten werden. Dieser Abbau von gespeichertem Fett dient der Versorgung des Körpers mit Fettsäuren als Energiesubstrat in Phasen mit erhöhtem Energiebedarf, wie z.B. bei körperlicher Anstrengung, Fasten oder Kältereizen.⁵⁶ Die Umwandlung von Triglyceriden in freie Fettsäuren und Glycerol wird hauptsächlich durch die drei Lipasen Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), hormonsensitive Lipase (HSL) und Monoglycerid-Lipase (MGL) katalysiert.⁵⁷ ATGL katalysiert den ersten Schritt der Hydrolyse von Triglyceriden in Diglyceride und Fettsäuren. Dabei wird die Aktivität von ATGL über *comparative gene identification-58* (CGI-58), welches unter physiologischen Bedingungen an Perilipin-1 (PLIN1) gebunden vorliegt, coaktiviert und über *G0/G1 switch gene 2* (G0S2) inhibiert. Das Enzym HSL katalysiert die Hydrolyse von Diglyceriden zu Monoglyceriden und Fettsäuren, zeigt aber eine breitere Substratspezifität, indem es auch Triglyceride, Cholesterinester und Retinylester hydrolysiert. Zum Schluss wird die Hydrolyse

der Monoglyceriden zu Glycerol und Fettsäuren durch die MGL katalysiert.⁵⁸ Diese Fettsäuren können in den Adipozyten oxidiert, in die Zirkulation freigesetzt oder zu Triglyceriden wiederverestert werden. Die Verteilung der endogenen Fettsäuren wurde in isolierten Adipozyten von Ratten gemessen: 0,2 % werden oxidiert, 50,1 % freigesetzt und 49,7 % wiederverestert.⁵⁹ Freigesetzte Fettsäuren werden in die Zellen verschiedener Gewebe aufgenommen und in Acyl-CoA umgewandelt. Das Acyl-CoA wird durch das Enzym CPT1 in Acylcarnitin umgewandelt und durch die äußere Mitochondrienmembran transportiert. Acylcarnitin wird mithilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Transporter durch die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix transportiert, wo es durch CPT2 zurück in Acyl-CoA umgewandelt wird. Im Rahmen der β -Oxidation erfolgt schließlich die Degradation der Fettsäuren in der mitochondrialen Matrix, wobei das generierte Acetyl-CoA zur Herstellung von ATP verwendet wird.⁶⁰ Die Stimulation der Lipolyse in den Adipozyten erfolgt unter anderem durch die Aktivierung der β -adrenergen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abbildung 4). Nach der Aktivierung dissoziiert die α -Untereinheit des G_s-Proteins und stimuliert die Adenylylcyclase. Dadurch wird ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umgewandelt, was zu erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel führt. Die Proteinkinase A (PKA) wird durch die erhöhten cAMP-Spiegel aktiviert und phosphoryliert verschiedene Substrate wie HSL und PLIN1. Durch die Phosphorylierung wird das Enzym HSL aus dem Zytosol in die Lipidtropfen verlagert und seine hydrolytische Aktivität aktiviert. Die Phosphorylierung des Proteins PLIN1, das sich auf der Oberfläche der Lipidtropfen befindet, bewirkt dessen Dissoziation von CGI-58 und ist für die Translokation von HSL notwendig. CGI-58 bindet an der ATGL und aktiviert diese. Neben der PKA kann auch die Proteinkinase G (PKG) nach Aktivierung durch atriale natriuretische Peptide HSL und PLIN1 phosphorylieren.⁶¹ Die Aktivierung der Lipolyse kann durch verschiedene Hormone und Zytokine erfolgen. Klassische Beispiele hierfür sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die durch Bindung an adrenerge Rezeptoren auf der Zellmembran der Adipozyten wirken. Weitere Aktivatoren der Lipolyse sind unter anderem Wachstumshormon, Cortisol, Schilddrüsenhormone, natriuretische Peptide, Glucagon, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukine und Leptin. Im Gegensatz dazu inhibieren Insulin und Adiponektin die Lipolyse, wobei Insulin den wichtigsten inhibitorischen endokrinen Faktor darstellt.^{62,63}

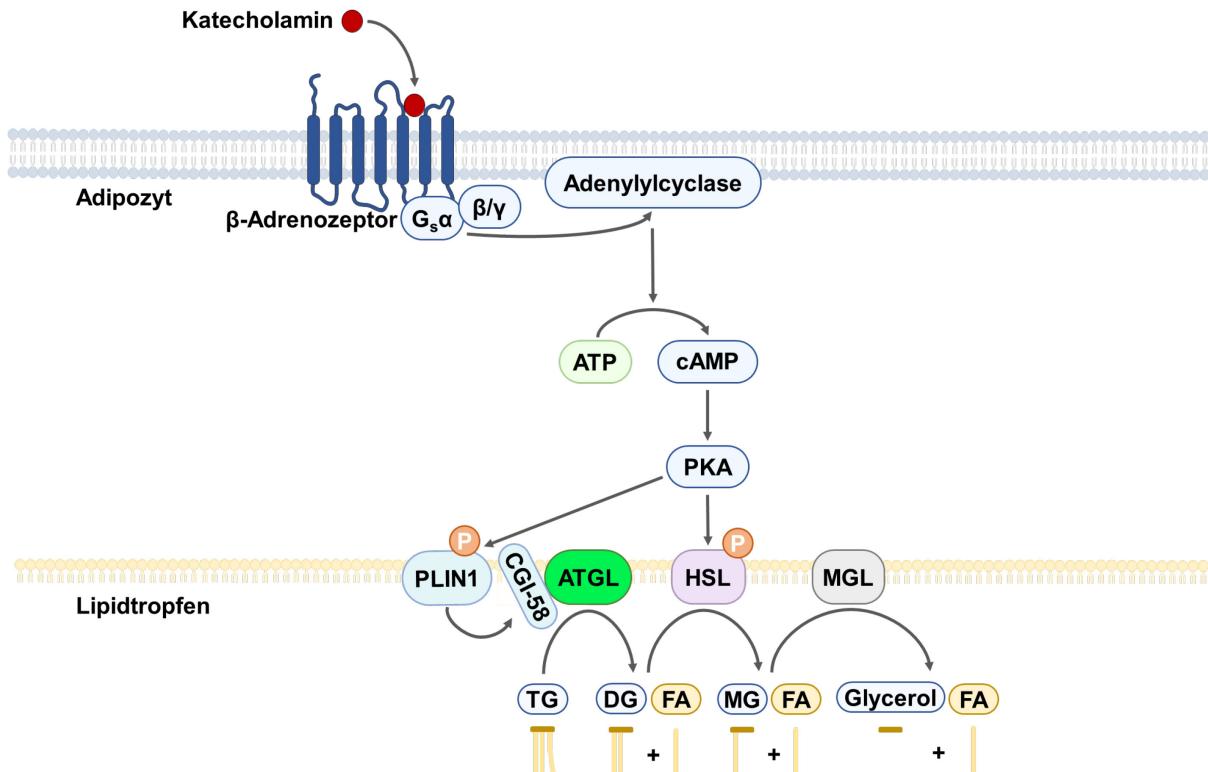


Abbildung 4: Aktivierung der Lipolyse in den Adipozyten

Die Bindung von Katecholaminen an β-adrenerge G-Protein-gekoppelte Rezeptoren führt zur Aktivierung der PKA. Diese phosphoryliert wichtige Proteine wie PLIN1 und HSL. Daraufhin erfolgt die Hydrolyse von TG zu DG und Fettsäuren unter der Katalyse von ATGL. Danach werden DG unter der Katalyse von HSL zu MG und Fettsäuren abgebaut, und schließlich werden MG unter Katalyse von MGL zu Glycerol und Fettsäuren hydrolysiert. P: Phosphat. TG: Triglycerid. DG: Diglycerid. MG: Monoglycerid. FA: Fettsäure. Die Abbildung (modifiziert nach Li et al.⁵⁶) wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

1.3.3 Adipozyten-Triglycerid-Lipase

ATGL spielt eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung von Lipidspeichern im Rahmen der Lipolyse und ist dabei verantwortlich für den initialen Schritt des Triglycerid-Abbaus und die Hydrolyse der ersten Esterbindung der Triglyceride in Diglyceride und Fettsäuren.⁶⁴ Das Enzym ATGL, auch bekannt als Desnutrin oder Calcium-unabhängige Phospholipase A2ζ, wurde im Jahr 2004 von drei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt.^{64,65,66} ATGL wird durch das Gen *patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (human: *PNPLA2*, murin: *Pnpla2*) kodiert.⁶⁷ Das murine ATGL-Protein besteht aus 486 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 54 kDa, während das humane ATGL-Protein aus 504 Aminosäuren besteht und zu 86 % mit dem murinen Protein identisch ist.⁶⁴ ATGL zeigt eine hohe Substratspezifität für Triglyceride, während andere Substrate wie Diglyceride,

Phosphoglyceride oder Retinylester nur geringfügig hydrolysiert werden.⁶¹ Die Triglycerid-Hydrolase-Aktivität von ATGL wird durch verschiedene Cofaktoren reguliert. Beispielsweise wird die ATGL durch die direkte Protein-Protein-Bindung an CGI-58, auch bekannt als *Abhydrolase domain containing 5* (ABHD5), aktiviert und durch die direkte Bindung an G0S2 inhibiert.^{68,69} ATGL ist intrazellulär im Zytoplasma sowie an den Lipidtropfen lokalisiert⁶⁴ und wird am stärksten im weißen und braunen Fettgewebe exprimiert. In geringen Mengen wird ATGL auch in Nicht-Fettgewebe wie Hoden, Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Lunge, Retina, Immunzellen, Pankreas und Dünndarm exprimiert.⁷⁰

Um die physiologische und pathophysiologische Rolle von ATGL zu untersuchen, wurden transgene Mausmodelle mit gewebespezifischer oder globaler Überexpression oder Knockout (KO) des ATGL-Gens generiert.⁷¹ Ein globaler ATGL-KO führt zu einer Zunahme des Körpergewichts und der Gesamtkörperfettmasse. Es kommt nicht nur zu einer Vergrößerung der Fettdepots, was sich in einem erhöhten Gewicht und vergrößerten Lipidtropfen des weißen und braunen Fettgewebes zeigt, sondern auch zu Akkumulationen von Triglyceriden in Nicht-Fettgeweben, einschließlich Herz, Skelettmuskulatur, Leber, Pankreas und Nieren. Daher spielt die ATGL auch in Nicht-Fettgeweben eine wichtige lipolytische Rolle. Die Triglycerid-Lipolyse ist nicht nur im weißen und braunen Fettgewebe, sondern auch in Herz, Skelettmuskulatur, Hoden und Leber vermindert. Die Konzentration der zirkulierenden Fettsäuren ist reduziert, was die Verwendung von Glukose begünstigt. Entsprechend ist die Glukoseaufnahme in Herz, Skelettmuskulatur und Leber erhöht. Außerdem wurde eine verminderte Insulinsekretion beobachtet. Der globale ATGL-KO führt zu schwerwiegenden Triglycerid-Akkumulationen im Herzen. Es kommt zu einer Zunahme des Herzgewichts, einer starken Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion, einer gestörten Herzstruktur, Fibrose und Hypertrophie. Schließlich führt die Fettakkumulation zu einem mechanischen Kontraktionsdefekt und damit zu einer letalen Herzinsuffizienz.⁷² Trotz geringer Expressionsmengen im Herzen zeigen Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischen ATGL-KO ebenfalls schwerwiegende Auswirkungen wie eine erhöhte Triglycerid-Akkumulation, fibrotische und hypertrophe Kardiomyopathien sowie eine verschlechterte Kontraktilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus zeigen *ex vivo* Analysen eine verminderte myokardiale Fettsäureoxidation.⁷³ Dies beweist, dass ATGL sowohl im Fett- als auch im Glukosemetabolismus eine wichtige Rolle spielt und in verschiedenen Organen einen bedeutenden Einfluss ausübt. Weitere Forschungen haben gezeigt, dass ATGL in verschiedenen Tumorzellarten eine Rolle spielt und das Ausmaß verschiedener Krebsarten konnte mit veränderten ATGL-Expressionsspiegeln in Zusammenhang gebracht werden, sowohl in murine Modellen als auch in menschlichen Patienten.^{70,74} In einigen Krebsarten

herrschen hypoxische Bedingungen, weshalb Tumorzellen dazu neigen, die Fettsäureoxidation herabzusetzen, um den Sauerstoffverbrauch zu verringern. Durch die Hypoxie werden Gene exprimiert, die auf direktem oder indirektem Wege die ATGL-Aktivität hemmen und somit die Lipolyse reduzieren. Allerdings zeigen nicht alle Tumorzellen eine Hypoxie-induzierte Hemmung der Fettsäure-Oxidation, beispielsweise war der ATGL-Spiegel in Brustkrebszellen im Vergleich zu normalen Zellen erhöht.⁷⁴

In der vorliegenden Arbeit wird ein adipozytenspezifischer ATGL-KO verwendet. Dieser wurde bereits in einigen Studien beschrieben, um die Bedeutung der adipozytenspezifischen ATGL zu untersuchen. KO-Mäuse zeigen eine reduzierte Lipolyse der Adipozyten sowohl im basalen als auch im stimulierten Zustand, niedrigere Serumspiegel von Fettsäuren und Triglyceriden sowie eine verminderte Expression von Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) α und PPAR α -Zielgenen im Fettgewebe. Dabei wird nicht nur die PPAR α -vermittelte Lipidoxidation reduziert, sondern auch PPAR γ -vermittelte Prozesse wie Lipidaufnahme und -synthese. So ist unter anderem die Expression von *Cd36* und Diacylglycerol-O-Acyltransferase (*Dgat*) 2 in weißem und braunem Fettgewebe reduziert. Das braune Fettgewebe ähnelt morphologisch dem weißen Fettgewebe mit großen unilokulären Lipidtropfen in den braunen Adipozyten. Außerdem zeigen diese Mäuse unter basalen Bedingungen eine erhöhte Expression von pro- und antiinflammatorischen Genen im weißen und braunen Fettgewebe. Auch in der Leber wurden Veränderungen beobachtet, wie eine Reduktion des Gewichts und des Triglyceridgehalts. Zudem wurde eine verminderte Expression von hepatischen PPAR α , PPAR α -Zielgenen und Genen, die an der Lipidsynthese beteiligt sind, beobachtet. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Genen, die an der hepatischen Glukoneogenese beteiligt sind, erhöht. Die Glukosetoleranz der KO-Mäuse ist verbessert.⁷⁵ In einer weiteren Studie wurden adipozytenspezifische ATGL-KO-Mäuse einer transversalen Aorten-Konstriktion ausgesetzt, um eine druckvermittelte Herzinsuffizienz zu induzieren. Dabei zeigt die KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Verbesserung der druckinduzierten Herzinsuffizienz. Zudem wurden die in der Kontrollgruppe nach Aortenverengung beobachteten kardialen Lipidomveränderungen durch den KO verhindert.⁷⁶

All diese Ergebnisse zeigen, dass die adipozytenspezifische ATGL die systemische Glukosetoleranz sowie die Inflammation und den Metabolismus verschiedener Organe beeinflusst.

1.3.4 Lipogenese

Die Regulation der Fettakkumulation erfolgt durch das Gleichgewicht zwischen Fettsynthese (Lipogenese) und Fettabbau (Lipolyse/Fettsäureoxidation). Unter Lipogenese werden die Prozesse der Fettsäuresynthese und der anschließenden Triglyceridsynthese zusammengefasst.⁷⁷ Die Fettsäuren im Fettgewebe stammen aus zwei verschiedenen Quellen: aus zirkulierenden Triglyceriden und aus der *de novo* Lipogenese. Zirkulierende Triglyceride stammen aus der Nahrung und werden zunächst im Darm als Chylomikronen oder in der Leber als *very low density lipoprotein* verpackt. Diese triglyceridhaltigen Lipoproteine werden durch die Lipoproteinlipase (LPL) zu freien Fettsäuren hydrolysiert, die dann über Fettsäuretransporter aus der Blutbahn in die Adipozyten gelangen. Zusätzlich nehmen die Adipozyten Glukose auf und wandeln diese in Glycerol um, welches als Grundgerüst für die Veresterung von Fettsäuren und die Bildung von Triglyceriden dient. Bei der *de novo* Lipogenese können Kohlenhydrate in Fettsäuren umgewandelt werden. Insbesondere nach einer kohlenhydratreichen Mahlzeit kommt es zu einer übermäßigen Glukoseoxidation, die zu erhöhten Acetyl-CoA-Spiegeln führt. Acetyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase 1 und die Fettsäuresynthase in Fettsäuren umgewandelt. Die Fettsäuren aus den beiden Quellen werden unter Verwendung von Glycerin-3-phosphat, das aus Glukose gewonnen wird, und unter Katalyse durch DGAT zu Triglyceriden verestert, die in den Lipidtropfen gespeichert werden.^{41,78} Die Plasmaglukose stimuliert die Lipogenese nicht nur dadurch, dass Glukose selbst als Substrat für die Lipogenese dient, sondern Glukose induziert auch die Expression von Lipogenese-Genen und steigert die Lipogenese durch Stimulation der Insulinfreisetzung und die Hemmung der Glukagonfreisetzung. Insulin stellt dabei einen wichtigen Stimulator der Lipogenese dar, indem es die Aufnahme von Glukose in die Adipozyten erhöht und die Expression von Lipogenese-Genen über den Transkriptionsfaktor *Sterol regulatory element-binding protein* (SREBP) 1 beeinflusst. Im Gegensatz zu Glukose regulieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren die Expression von Lipogenese-Genen herunter. Ein weiteres Hormon, das die Lipogenese beeinflusst, ist Leptin, das die Fettspeicherung begrenzt, indem es die Nahrungsaufnahme hemmt und metabolische Vorgänge beeinflusst. Es stimuliert die Freisetzung von Glycerol aus den Adipozyten, indem es sowohl die Fettsäureoxidation fördert als auch die Lipogenese hemmt. Neben SREBP stellt der nukleare Hormonrezeptor PPAR γ einen wichtigen Transkriptionsfaktor im Fettgewebe dar. Das Protein PPAR γ wird unter anderem durch Fettsäuren aktiviert und seine Expression durch Insulin stimuliert. Es ist an der Differenzierung von Adipozyten beteiligt und reguliert die Transkription einiger Gene im Fettgewebe, wie beispielweise *LPL*.⁷⁷

1.4 Der Zusammenhang zwischen Myokardinfarkt und Lipolyse im peripheren Fettgewebe

Durch den akuten Myokardinfarkt wird das sympathische Nervensystem kompensatorisch aktiviert, um die Herzleistung aufrechtzuerhalten.⁷⁹ Dies führt zu erhöhten Konzentrationen von Katecholaminen wie Noradrenalin sowohl im Plasma^{80,81} als auch im peri-Infarkt-Bereich.⁸¹ Es kommt nicht nur zu einer erhöhten peripheren Freisetzung von Katecholaminen, sondern auch zu einer erhöhten sympathischen Nervenaktivität am Herzen.⁸⁰ Zirkulierende Katecholamine stellen einen wichtigen Stimulus für die Lipolyse dar. Dies erfolgt durch Bindung an β -Adrenorezeptoren auf der Plasmamembran von Adipozyten, wodurch freie Fettsäuren durch Hydrolyse entstehen.⁸² In Übereinstimmung damit waren die Plasmakonzentrationen der freien Fettsäuren bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die stündlich über einen Zeitraum von fünf Stunden nach Einsetzen der Hauptsymptome gemessen wurden, während des gesamten Zeitraums höher als normal und erreichten nach zwei Stunden einen Spitzenwert.⁸³ Ähnliche Ergebnisse für erhöhte Konzentrationen freier Fettsäuren wurden auch im murinen Modell während der Reperfusion beobachtet.⁸⁴

Da das Enzym ATGL den initialen Schritt der Triglycerid-Hydrolyse und somit der Lipolyse katalysiert,⁶⁴ wurde in einigen Studien die Lipolyse durch pharmakologische oder genetische Inhibition von ATGL gezielt im Fettgewebe gehemmt, um die Auswirkung der peripheren Lipolyse auf kardiale Heilungsprozesse zu untersuchen. Eine dieser Studien zeigt, dass der adipozytenspezifische ATGL-KO die durch transversale Aorten-Konstriktion induzierte, druckvermittelte Herzinsuffizienz verhindert. Dabei wurden Veränderungen des kardialen Lipidoms, die nach Drucküberlastung beobachtet wurden, darunter eine Hochregulation verschiedener kardialer Phosphatidylethanolamine, durch den ATGL-KO abgeschwächt. Auch der zirkulierende Fettsäuregehalt wurde beeinflusst.⁷⁶ In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz nach einer durch transversale Aorten-Konstriktion induzierten Drucküberlastung durch die Hemmung von ATGL im Fettgewebe sowohl durch den KO als auch durch den pharmakologischen Inhibitor Atglistatin verhindert.⁸⁵ Eine übermäßige adrenerge Stimulation kann die Herzfunktion beeinträchtigen und zu einer erhöhten Lipolyse im Fettgewebe führen. In einem Modell der Katecholamin-induzierten Herzschädigung wurde das synthetische Katecholamin Isoproterenol zur β -adrenergen Stimulation verwendet. Die Hemmung von ATGL im Fettgewebe sowohl durch den KO als auch durch Atglistatin reduziert die Inflammation und Fibrose und verbessert somit das durch chronische β -adrenerge Stimulation induzierte kardiale *Remodeling*, wie Hypertrophie und Fibrose. Dabei reduziert die ATGL-Inhibition im weißen Fettgewebe, im Herzen und in der

Zirkulation die Isoproterenol-induzierte Hochregulation von Galektin-3, einem Marker für aktivierte Makrophagen, der bei der Fibrose eine Rolle spielt.⁸⁶ In Übereinstimmung damit wurde in einer weiteren Untersuchung, ebenfalls nach adrenerger Stimulation mit Isoproterenol, ein kardioprotektiver Effekt durch die pharmakologische Inhibition von ATGL mit Atglistatin beobachtet. Dies führte zu einer Verbesserung der Herzfunktion durch lipidomische Veränderungen. Dabei wurde *in vitro* gezeigt, dass Atglistatin die Isoproterenol-induzierte Sekretion von spezifischen Fettsäuren, die für die Apoptose von Kardiomyozyten verantwortlich sind, reduziert. Dadurch wurde die kardiale Apoptose und somit auch die kardiale Fibrose reduziert.⁸⁷

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Daten aus der Literatur zeigen, dass die adipozytenspezifische ATGL einen wesentlichen Einfluss auf das *Outcome* bei verschiedenen kardialen Erkrankungen hat. In eigenen Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass eine Myokardischämie zu langfristigen Veränderungen im weißen Fettgewebe führt und die adipozytenspezifische ATGL in der späten Phase der Reperfusion auf Genexpressionsebene hochreguliert wird.⁸⁸

Um die Rolle der adipozytenspezifischen ATGL auf die kardiale Funktion und den kardialen Metabolismus nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde zunächst in einem murinen Modell geprüft, ob die Lipolyse durch das genutzte Protokoll zur Induktion der Myokardischämie während der Reperfusion aktiviert wird und welche Fettgewebsdepots davon betroffen sind. Mäuse mit einem adipozytenspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren ATGL-KO wurden generiert, um die Auswirkungen der gehemmten Lipolyse durch den ATGL-KO auf die Heilungsprozesse nach Myokardischämie zu untersuchen. Nach Validierung des KOs wurden sowohl das weiße Fettgewebe als auch die kardiale Funktion und der kardiale Metabolismus zu verschiedenen Reperfusionszeitpunkten untersucht. Dadurch soll beurteilt werden, ob die adipozytenspezifische ATGL ein potentielles therapeutisches Ziel bei der Behandlung des Myokardinfarkts darstellen könnte.

2 Materialien und Methoden

2.1 Tierhaltung und Tierversuche

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Tiere wurden in einem 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Während dieser Zeit stand den Tieren *ad libitum* entkeimtes Wasser und Zuchtfutter (V1184-300, ssniff Spezialdiäten GmbH) zur Verfügung. Sämtliche Tierexperimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) NRW, Bezirksregierung Düsseldorf, unter dem Aktenzeichen 81-02.04.2019.A397 genehmigt.

2.1.1 Verwendete Maus-Linien

Für die Versuche wurden C57BL/6J-Mäuse von Janvier Labs (Frankreich) und die genetisch veränderte ATGL-KO-Linie verwendet. Bei der genetisch veränderten Linie handelt es sich um einen adipozytenspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren KO der ATGL. Um diesen KO zu erhalten, wurde die ATGL-flox-Linie (IMSR_JAX:024278) mit der Adipoq-CreERT2-Linie (IMSR_JAX:025124) gekreuzt. Beide Linien wurden von The Jackson Laboratory (USA) bezogen.

Die ATGL-flox-Linie wurde von Sitnick *et al.* generiert. Dazu wurde ein *bacterial artificial chromosome* (BAC)-Klon, der das murine ATGL-Gen (*Pnpla2*) enthält, in rekombinante Bakterien eingebracht. Anschließend wurde durch homologe Rekombination eine LoxP-Sequenz in Intron 1 und eine Frt-Neo^R-Frt-LoxP-Sequenz in Intron 7 des ATGL-Gens eingefügt. Das LoxP-modifizierte Konstrukt wurde in embryonale Stammzellen transfiziert und unter Neomycin-Selektion kultiviert. Zur Erzeugung chimärer Mäuse wurde DNA aus den Stammzellklonen in C57BL/6-Blastozyten injiziert und in C57BL/6J-Empfänger transferiert. Anschließend wurden ATGL-flox-Mäuse mit Flp-Rekombinase-exprimierenden Mäusen gekreuzt, um die Frt-flankierte Neo-Kassette zu entfernen.⁸⁹ Die Adipoq-CreERT2-Linie wurde von Sassmann *et al.* durch Insertion der Tamoxifen-regulierten Cre (*causes/cyclization recombination*)-Rekombinase in das Startcodon des adipozytenspezifischen Adipoq-Promotors auf dem BAC erzeugt. Dadurch wurde Exon 2 ersetzt. Das Konstrukt wurde in Eizellen von C57/BL6-Mäusen injiziert und die Tiere wurden mit C57/BL6-Mäusen verpaart.⁹⁰

Durch Kreuzung beider Linien wurden adipozytenspezifische und Tamoxifen-induzierbare ATGL-KO-Mäuse erzeugt (Abbildung 5). Das modifizierte Cre-Protein ist mit einem

Östrogenrezeptor fusioniert, der eine mutierte Liganden-Bindungsdomäne enthält und durch Tamoxifen aktiviert werden kann (*Cre recombinase-estrogen receptor T2*: CreERT2). Es liegt im Zytosol gebunden an das Hitzeschockprotein (HSP) 90 vor. Nach der Gabe des synthetischen Steroids 4-Hydroxytamoxifen wird das HSP90 von der CreERT2 abgespalten. Dies führt zu einer Translokation der CreERT2 in den Zellkern, wo sie mit den loxP-Stellen interagiert. Dadurch kommt es zur Deletion der Exons 2 bis 7 und damit zum Funktionsverlust des *Pnpla2*-Gens. Mit dieser Technik kann die Genexpression in der Maus zelltypspezifisch und zeitlich reguliert werden. Aus der Verpaarung wurden die Tiere mit dem Genotyp Adipoq-CreERT2^{hemi}/ATGL^{fl/fl} als ATGL-KO-Tiere und die Tiere mit dem Genotyp Adipoq-CreERT2^{wt/wt}/ATGL^{fl/fl} als Kontrolltiere verwendet.

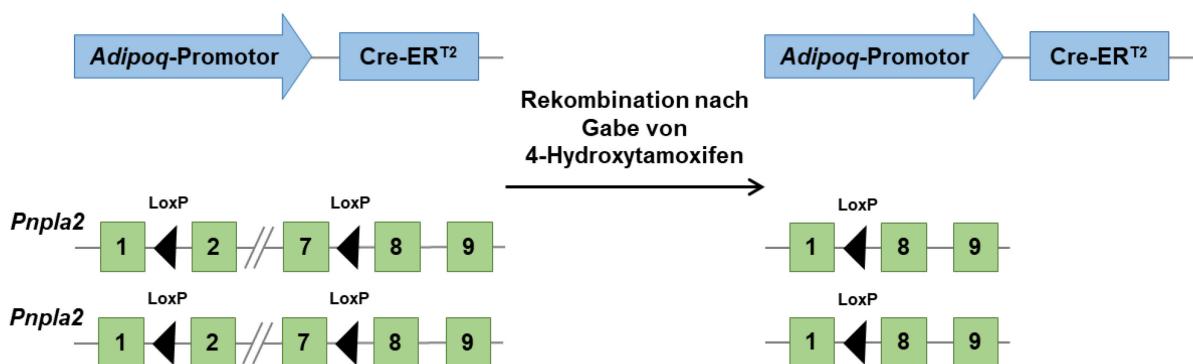


Abbildung 5: Generierung des adipozytenspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren ATGL-KO-Mausmodells

Durch die Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen wird die Cre-ERT2 in diesen Mäusen aktiviert. Dies ermöglicht unter dem Adipoq-Promotor das selektive Ausschneiden der Exons 2 bis 7 und damit den Funktionsverlust des ATGL-Gens (*Pnpla2*) in den Adipozyten.

2.1.2 Induktion des ATGL-Knockouts

Um den ATGL-KO zu induzieren, wurde den etwa 10 Wochen alten Tieren 500 µg 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich), gelöst in Erdnussöl, an sieben aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert. Nach der letzten Injektion folgte eine Auswaschphase von mindestens 2 Wochen vor dem Beginn der Versuche (Abbildung 6).



Abbildung 6: Induktion des ATGL-KOs mittels 4-Hydroxytamoxifen

Darstellung der Verabreichung von 4-Hydroxytamoxifen über einen Zeitraum von 7 Tagen, gefolgt von einer 14-tägigen Auswaschphase vor Beginn der Experimente. Die Abbildung wurde teilweise unter

Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2.1.3 Studiendesign des Myokardinfarkt-Modells

Männliche C57Bl/6J-Mäuse oder Mäuse von der ATGL-Linie (nach Verabreichung von 4-Hydroxytamoxifen) im Alter von 12 bis 15 Wochen wurden einer 60-minütigen Myokardischämie bei geschlossenem Thorax (*closed-chest model*) unterzogen, gefolgt von einer 30-minütigen, 24-stündigen, 7-tägigen oder 28-tägigen Reperfusion. Vor der experimentellen Induktion der Myokardischämie und nach 30 Minuten Reperfusion wurden ca. 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Echokardiographische Untersuchungen wurden vor der Operation der Ligaturanlage und während der Reperfusion nach 7, 14, 21 und 28 Tagen durchgeführt (Abbildung 7). Anschließend wurden je nach Versuch Blut, Herz, weißes Fettgewebe, braunes Fettgewebe und Leber zu den entsprechenden Zeitpunkten entnommen und für die nachfolgenden Untersuchungen vorbereitet. Die Proben wurden entweder unmittelbar nach der Entnahme untersucht oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Herzgewebe wurde für die Bestimmung der Infarktgröße, die Messung der extrazellulären Flüsse, Gen-, Protein- und histologische Analysen entnommen. Als weißes Fettgewebe wurden das subkutane inguinale Fettgewebe nach Entfernung der darin enthaltenen Lymphknoten und das viszerale gonadale Fettgewebe entnommen. Die rechte Seite wurde für *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR) und histologische Analysen und die linke Seite für Proteinanalysen verwendet.

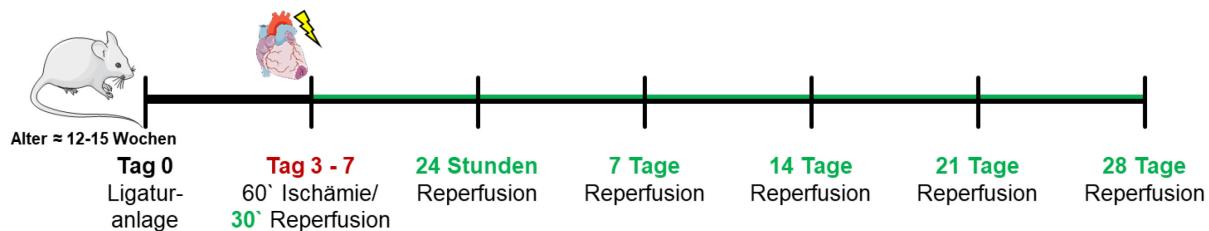


Abbildung 7: Versuchsaufbau des Modells für Myokardinfarkt

Darstellung des Versuchsaufbaus mit den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten. Der Zeitpunkt der Myokardischämie ist rot markiert, während die Reperfusionszeitpunkte, die nach dem Infarkt untersucht wurden, grün markiert sind. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

2.1.4 Stimulation der Lipolyse mit CL-316,243

Der β_3 -Adrenozeptor Agonist CL-316,243 (Sigma-Aldrich) wurde verwendet, um die Reaktion auf die Aktivierung der Lipolyse zwischen den ATGL-KO-Tieren und den Kontrolltieren zu vergleichen. Zunächst wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen, um daraus die basalen NEFA-Spiegel zu bestimmen. Anschließend wurde den Mäusen der β_3 -adrenerge Agonist CL-316,243 gelöst in steriler physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert (1 mg/kg Körpergewicht). 30 Minuten nach der Behandlung mit CL-316,243 wurden die Mäuse getötet und das kardiale Blut entnommen. Anschließend wurden die NEFA-Werte im Basalblut und im Blut nach 30 Minuten CL-316,243-Behandlung bestimmt.

2.1.5 Experimentelle Induktion von Myokardischämie und Reperfusion

Die Myokardischämien wurden experimentell induziert, um zeitlich kontrollierte und reproduzierbare Myokardinfarkte zu erzielen. Die Induktion der Myokardischämie bei geschlossenem Thorax wurde in einem zweistufigen Verfahren durchgeführt. Im ersten Eingriff wurde eine lockere Ligatur um den absteigenden Ast der linken Herzkranzarterie (*left anterior descending artery*: LAD) angelegt. Die Enden des ca. 15 cm langen 7.0 Prolene-Fadens wurden in einer Hauptsche subkutan platziert. 3 – 7 Tage später wurde in einem zweiten Eingriff durch den Zug an den Fadenenden und die damit einhergehende Unterbrechung der Perfusion des LAD-abhängigen Herzgebiets die Myokardischämie induziert. Die zeitliche Trennung der Operationen dient zur Erholung der Tiere und der Elimination physiologischer Veränderungen, die aufgrund der Thoraxeröffnung auftreten können. Die Operationen wurden von Frau Dr. Katharina Bottermann und Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

Zum Anlegen der Ligatur wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Danach erfolgte die Intubation zur mechanischen Beatmung. Der Thorax wurde im 3. oder 4. Interkostalraum eröffnet und die LAD wurde mit einem 7-0 Prolene-Faden unterstochen. Um die Ligatur beim zweiten Eingriff zu schließen, wurde ein Polyethylen (PE)-Schlauch durch beide Fadenenden gefädelt und locker auf dem Herzen belassen. Thorax und Muskeln wurden zugenäht, die Fadenenden wurden in einer subkutanen Tasche aufbewahrt und die Haut per Naht verschlossen. Zur Induktion der Ischämie wurden die voroperierten Mäuse 3 – 7 Tage nach der Ligaturanlage mit Isofluran (2 %) anästhesiert. Anschließend wurde die Haut eröffnet und die Fadenenden aus der subkutanen Tasche freigelegt. An beiden Fadenenden wurden 5 g Gewichte befestigt und der Faden unter Spannung aufgehängt. Auf diese Weise wurde die Perfusion unterbrochen und eine Ischämie induziert. Um sicherzustellen, dass die Induktion

erfolgreich verlief, wurde die ST-Strecken-Hebung im Elektrokardiogramm (EKG) kontrolliert (Basic Data Acquisition Software 2.0, Harvard Apparatus). Der Zug wurde für 60 Minuten ausgeübt, danach wurden die Gewichte entfernt und das Tier wurde wieder zugenäht. Die Körpertemperatur wurde zwischen 37 und 38 °C gehalten. Zur intra- und postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht) verabreicht.

2.1.6 Echokardiographie

Um kardiale Funktionsparameter zu ermitteln, wurden echokardiographische Untersuchungen mit dem Ultraschallgerät Vevo 3100 (Visual Sonics) und der Ultraschallsonde MX400 durchgeführt. Für die Untersuchung wurden die Tiere mit Isofluran (4 %) in 0,6 ml/Minute O₂ initial anästhesiert und danach wurde die Anästhesie mit Isofluran (2 %) aufrechterhalten. Während der Untersuchung wurden die Tiere auf einem beheizten Elektrodenkontaktpad fixiert. Dies ermöglicht die Kontrolle von Herzfrequenz, EKG und Körpertemperatur. Eine Atemfrequenz von 70/Minute durfte nicht unterschritten werden. Vor dem Auftragen des Gels wurde der Brustraum enthaart. Anschließend wurden Aufnahmen von der parasternalen Längsachse (im B- und M-Modus) und von der parasternalen Kurzachse (in der Mitte im B- und M-Modus, an der Basis und am Apex jeweils im B-Modus) des linken Ventrikels angefertigt. Aus den Aufnahmen wurden Herzvolumina und Funktionsparameter mit der Simpson-Methode ermittelt.⁹¹ Echokardiographische Untersuchungen wurden von Frau Dr. Katharina Bottermann durchgeführt.

2.2 Blut-Untersuchungen

Zur Vermeidung von Nachkoagulationseffekten wurde das Blut nach der Entnahme für mindestens 30 Minuten bei 4 °C gelagert. Blutproben wurden zwei- bis dreimal 5 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Serum gesammelt.

2.2.1 Messung der nicht-veresterten freien Fettsäuren

Die verwendeten Serumproben wurden aus der Schwanzvene oder nach Tötung des Tiers aus dem Herzen entnommen. Zur quantitativen Bestimmung der NEFA-Werte im Serum wurde der enzymatische und kolorimetrische NEFA-HR(2) Assay (FUJIFILM Wako) verwendet, bei dem ein violetter Farbkomplex entsteht. Eine Kalibriergerade (0 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM FUJIFILM NEFA Standard) wurde hergestellt. Je 4 µl Standard und Probe wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µl FUJIFILM NEFA-HR(2) R1 für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert. Die ersten Messwerte A wurden mit

einem Mikroplatten-Photometer (SYNERGY) bei 550 nm gemessen. Anschließend wurden 100 µl FUJIFILM NEFA-HR(2) R2 zugegeben. Die Platte wurde unter den gleichen Bedingungen inkubiert und erneut gemessen, um den Messwert B zu erhalten. Zur Bestimmung der Konzentration der freien Fettsäuren wurde der Messwert A von B subtrahiert und in die Gleichung der Kalibriergeraden eingesetzt.

2.2.2 Bestimmung von Adipokinen und anderen Stoffwechselhormonen

Die Serumkonzentrationen von Ghrelin, *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), Glucagon, Insulin, Leptin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1), Resistin und Adiponektin wurden 7 Tage nach Myokardinfarkt in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stefan Lehr (Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf) aus kardialem Blut bestimmt. Dazu wurden der Bio-Plex Pro Mouse Diabetes 8-Plex Assay und der Bio-Plex Pro Mouse Diabetes Adiponectin Assay (Bio-Rad Laboratories Inc.) nach Herstellerangaben durchgeführt und mit dem Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories Inc.) gemessen.

2.3 Histologische Analysen

Für die Vorbereitung histologischer Analysen wurden das subkutane und das gonadale Fettgewebe nach der Organentnahme in kaltem PBS präpariert und über Nacht bei 4 °C in Formaldehyd (ROTI® Histofix 4 %, Carl Roth) gewebsfixiert. Um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen wurde das Fettgewebe in PBS gewaschen. Die Präparate wurden mittels aufsteigender Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 % und absolut) und ROTICLEAR® (Carl Roth) entwässert und in Paraffin eingebettet. Vom eingebetteten Fettgewebe wurden mit einem Rotationsmikrotom (HistoCore MULTICUT, Leica Microsystems) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Hierbei wurden die Schnitte aus der Mitte der Präparate entnommen. Die angefertigten Paraffinschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 60 Minuten bei 60 °C hitzefixiert und bei Raumtemperatur gelagert.

Entnommene Herzen wurden nach Entfernen der Vorhöfe in kaltem PBS präpariert und in einem Einbettmedium für Gefrierschnitte (Cryocompound, ImmunoLogic) eingebettet. Danach wurde das native Gewebe in etwa -30 °C kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Eingebettete Herzen wurden mit einem Kryostat (Leica CM3050 S, Leica Biosystems) vom Apex bis zu den Herzklappen geschnitten. Dabei wurden die Schichtdicken 14 µm, 8 µm und 5 µm gewählt. Zwischen den Ebenen wurden 500 µm verworfen. Die Schnitte wurden bei -20 °C gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axio

Observer und der Software Zen (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH) erstellt. Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ.⁹²

2.3.1 Weizenkeimagglutinin-Färbung

8 µm Herz-Kryoschnitte wurden in eiskaltem Formaldehyd (ROTI® Histofix 4 %, Carl Roth) für 10 Minuten fixiert und 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Schnitte mit 10 % *Normal Goat Serum* (NGS, Cell Signaling) in 0,2 % Saponin/PBS für 1 Stunde blockiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Danach wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in 0,2 % Saponin/PBS gewaschen und mit Alexa Fluor™ 488 markiertem Weizenkeimagglutinin (*wheat germ agglutinin*: WGA, Invitrogen) für 3 Stunden im Dunkeln inkubiert. Das WGA wurde 1:500 in 2 % NGS und 0,2 % Saponin/PBS verdünnt. Nach der Inkubation wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten zweimal mit 0,2 % Saponin/PBS und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit ROTI®Mount FluorCare DAPI (Carl Roth) eingedeckt.

2.3.2 Messung der Narbengröße nach Myokardinfarkt

Zur Beurteilung der Narbengröße nach dem Infarkt wurden Aufnahmen der ganzen Herzschnitte nach 28 Tagen Reperfusion und Färbung mit WGA (Objektiv 20x) angefertigt. Für die Auswertung wurden jeweils die ersten 8 Ebenen, beginnend mit Ebene 1 am Apex in Richtung Basis, herangezogen. Sowohl die Gesamtfläche der Herzschnitte als auch die Konturen des vernarbten Gewebes wurden manuell in ImageJ⁹² eingezeichnet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Narbe von der Gesamtfläche der verwendeten Herzschnitte berechnet.

2.3.3 Hämalaun und Eosin-Färbung

Für die Hämalaun und Eosin (H&E)-Färbung wurden zunächst 5 µm dicke, hitzefixierte Fettgewebe-Paraffinschnitte für 3 x 15 Minuten mit ROTICLEAR® entparaffiniert. Über einer absteigenden Ethanolreihe (je 2 Minuten: absolut, 96 % und 70 %) wurden die entparaffinierten Schnitte hydratisiert und 2 x 5 Minuten in PBS und 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden in Hämalaunlösung (Carl Roth) für eine Minute inkubiert, in Leitungswasser getaucht, in 1 % HCl getaucht, 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser geblättert und 1 Minute in 1 % Eosin G-Lösung (Carl Roth) inkubiert. Danach wurden die Schnitte über einer aufsteigenden Ethanolreihe, je 2 Minuten, und ROTICLEAR® für 5 Minuten entwässert. Das Eindecken erfolgte mit ROTI®Mount (Carl Roth).

2.3.4 Bestimmung der Größenverteilung der Adipozyten

Die gefärbten Schnitte wurden mikroskopiert (Objektiv 20x) und in ImageJ⁹² analysiert. Für die Bestimmung der Zellgrößen wurden in jedem Präparat die Ränder von 200 Adipozyten manuell gezeichnet und anschließend die Größe ermittelt (Abbildung 8). Abhängig von der Intaktheit der Adipozyten, wurden in einem oder mehreren Gesichtsfeldern 200 der enthaltenen Adipozyten möglichst zusammenhängend und lückenlos gezählt. So wird eine objektive Auswertung gewährleistet und das Auslassen einzelner Zellgrößen verhindert.

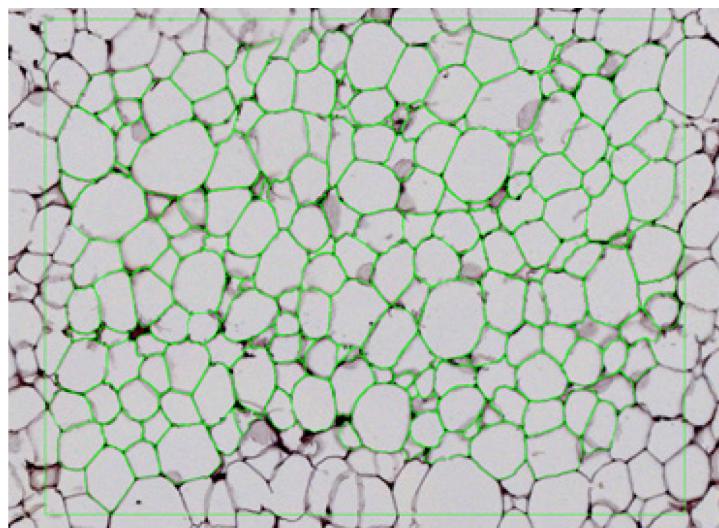


Abbildung 8: Quantifizierung der Adipozytentgröße nach Färbung von weißem Fettgewebe mit Hämalaun und Eosin

Die grünen Umrandungen zeigen ein Beispiel für manuell gezeichnete Adipozyten in ImageJ.

2.4 Evans Blau- und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

Nach 60 Minuten Myokardischämie und 24 Stunden Reperfusion wurde das Herz in kalter Kochsalz-(0,9 %)/Heparin-Lösung präpariert, an der Aortenwurzel über eine Kanüle gezogen, mit einem Faden fixiert und über die Koronararterien mit Kochsalzlösung (0,9 %) gespült, um Blutreste zu entfernen. In der ersten Färbung wurde die *area at risk* (AAR), die den hypoxischen Bereich des Myokards darstellt, vom *Remote* Bereich, der keine Perfusionsunterbrechung erfuhr, abgegrenzt (Abbildung 9). Dafür wurde die Ligatur um die LAD durch Austausch des alten Fadens durch einen neuen Faden erneut verschlossen. Evans Blau-Lösung (1 %, 1 ml, Sigma-Aldrich) wurde durch die Aortenwurzel in die Koronararterien injiziert, um den von den offenen Koronararterien durchbluteten *Remote* Bereich blau anzufärben. Danach wurde das Herz von außen und durch die Kanüle gründlich mit Kochsalzlösung (0,9 %) gespült, von der Kanüle entfernt und von weiteren Farbstoffresten befreit. In der zweiten Färbung wurden lebensfähige und nekrotische Abschnitte der AAR

identifiziert. Hierfür wurde das Herz zunächst in Folie gewickelt und für 30 Minuten bei -20 °C eingefroren. Das gefrorene Herz wurde zügig aus der Folie gelöst und mit einer Mikrotomklinge vom Apex ausgehend vollständig in ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die angefertigten Schnitte wurden für 3 Minuten bei 37 °C unter Schütteln in 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 1 %, Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach der TTC-Färbung wurden die Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und Auflichtaufnahmen angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte für die Auswertung gewogen und die Flächen des rechten Ventrikels, des linken Ventrikels, der AAR und des Infarkts mit der Software Diskus ermittelt. Der beschriebene Versuch wurde von Herrn Dominik Semmler durchgeführt.

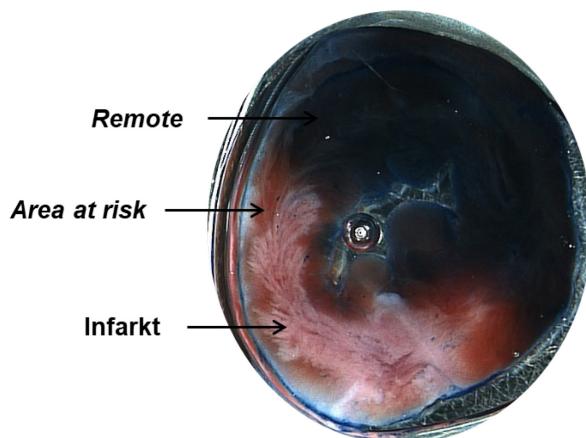


Abbildung 9: Mit Evans-Blau und TTC gefärbter Querschnitt eines infarzierten Herzens

Die blaue, mit Evans Blau gefärbte Zone stellt den nicht-ischämischen *Remote* Bereich dar, die rote, mit TTC gefärbte Zone die AAR und die weiße Zone den nekrotischen Infarktbereich.

2.5 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real-time*-PCR

Tabelle 1: Primer-Sequenzen für die quantitative *real-time*-PCR

Gen	Vorwärts-Primer 5' → 3'	Rückwärts-Primer 5' → 3'
<i>Acadm</i>	CCA ATG ATG TGT GCT TAC TG	GTT GAT AAC ATA CTC GTC ACC
<i>Adipoq</i>	CCA CTT TCT CCT CAT TTC TG	CTA GCT CTT CAG TTG TAG TAA C
<i>Cd36</i>	AGA TGA CGT GGC AAA GAA CAG	CCT TGG CTA GAT AAC GAA CTC TG
<i>Cpt1b</i>	GCA CAC CAG GCA GTA GCT TT	CAG GAG TTG ATT CCA GAC AGG TA
<i>Cpt2</i>	CAG CAC AGC ATC GTA CCC A	TCC CAA TGC CGT TCT CAA AAT
<i>Dgat2</i>	GCG CTA CTT CCG AGA CTA CTT	GGG CCT TAT GCC AGG AAA CT
<i>Ech1</i>	GCT ACC GCG ATG ACA GTT TC	TCA GAG ATC GAA GGC TGA TGT T
<i>Fabp3</i>	AAA CTC ATC CTG ACT CTC AC	AAA ATG TCA GAG GGG AAA AC
<i>Lep</i>	GAG ACC CCT GTG TCG GTT C	CTG CGT GTG TGA AAT GTC ATT G
<i>Lpl</i>	GGG AGT TTG GCT CCA GAG TTT	TGT GTC TTC AGG GGT CCT TAG
<i>Mpc1</i>	ATG AGT ACG CAC TTC TGG GG	CGC CCA CTG ATA ATC TCT GGA
<i>Mpc2</i>	TAC CAC CGA CTC ATGGATAAAGT	CAC ACA CCA ATC CCC ATT TCA
<i>Ndufab1</i>	ATG GCG TCT CGT GTC CTCT	GCG GCA CAA ATG TGT GAC T
<i>Nudc</i>	AGA ACT CCA AGC TAT CAG AC	CTT CAG GAT TTC CTG TTT CTT C
<i>Pnpla2</i>	CAA CCT TCG CAA TCT CTA C	TTC AGT AGG CCA TTC CTC
<i>Pparg</i>	AAA GAC AAC GGA CAA ATC AC	GGG ATA TTT TTG GCA TAC TCT G
<i>Retn</i>	AAG AAC CTT TCA TTT CCC CTC CT	GTC CAG CAA TTT AAG CCA ATG TT
<i>Slc2a4</i>	TCT TGA TGA CCG TGG CTC TG	TGC CAC AAT GAA CCA GGG AA
<i>Srebp1c</i>	TGA CCC GGC TAT TCC GTG A	CTG GGC TGA GCA ATA CAG TTC

2.5.1 RNA-Isolierung aus Herz- und Fettgewebe

Nach der Organentnahme wurde das Gewebe zügig in 4 °C PBS präpariert, in Flüssigstickstoff tiefgekühlt und anschließend bei -80 °C gelagert, um einen RNA-Abbau zu verhindern. Die RNA-Isolierung aus dem gonadalen und inguinalen Fettgewebe wurde mit dem RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) und aus dem Herzgewebe mit dem RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Nach Zugabe der jeweiligen Extraktionslösung wurde das Gewebe mit dem TissueRuptor® II (Qiagen) im Reaktionsgefäß aufgeschlossen.

Für die RNA-Isolierung wurde das Fettgewebe in 1 ml QIAzol lysiert und 5 Minuten inkubiert, um die Dissoziation zu fördern. Zur Phasentrennung wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und voller Geschwindigkeit wurde die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, mit Ethanol 70 % (1:1) versetzt. 700 µl der Mischung wurden auf eine RNeasy Mini Spin-Säule überführt und für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA an die Silikagel-Membran zu binden. Der RNA-freie Eluent wurde verworfen und der Vorgang mit der verbleibenden Probe wiederholt. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Eluenten wurde die Säule zweimal mit 500 µl des zweiten Waschpuffers RPE gewaschen und für 30 Sekunden bzw. nach der zweiten Zugabe für 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Um eine mögliche Verschleppung des RPE-Puffers zu vermeiden und Reste zu entfernen, wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelbehälter überführt und für 1 Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, 30-50 µl Ribonuklease (RNase)-freies Wasser auf die Membran gegeben und für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

Für die RNA-Isolierung aus Herzgewebe wurden maximal 30 mg Gewebe in 300 µl RTL-Puffer lysiert und anschließend mit 590 µl RNase-freiem Wasser und 10 µl Proteinase K für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. Das Homogenat wurde für 3 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und der RNA-haltige Überstand mit Ethanol absolut (2:1) versetzt. 700 µl der Mischung wurden auf eine RNeasy Mini Spin-Säule überführt und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA an die Silikagel-Membran zu binden. Der RNA-freie Eluent wurde verworfen und der Vorgang mit der verbleibenden Probe wiederholt. Die Säule wurde zweimal mit 350 µl RWI-Puffer gewaschen und jeweils 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und für 30 Sekunden bzw. nach der zweiten Zugabe für 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Nach den Waschschritten wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelbehälter überführt und für 1 Minute bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert, 30-50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

Nachdem die erhaltene RNA in RNase-freiem Wasser eluiert wurde, erfolgte die qualitative und quantitative Bestimmung mit dem NanoDrop™ One Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific). Dabei wurde die Reinheit der Proben anhand der Absorptionsverhältnisse bei den Wellenlängen 260 nm/280 nm bzw. 260 nm/230 nm beurteilt. Für eine reine Probe gelten

folgende Werte: $A_{260}/A_{280} = 1,8$ bis $2,0$ bzw. $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$. Isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.5.2 Complementary DNA-Synthese

Nach der RNA-Isolierung erfolgte die reverse Transkription der RNA zu *complementary* DNA (cDNA) mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen). Dazu wurde die RNA entsprechend der gemessenen Konzentration mit RNase-freiem Wasser auf $12 \mu\text{l}$ Endvolumen und 1000 ng Endkonzentration verdünnt. Die verdünnte RNA wurde mit $2 \mu\text{l}$ gDNA Wipeout Buffer im Mastercycler® (Eppendorf) für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, um genomische DNA zu entfernen. Danach wurden $6 \mu\text{l}$ Mastermix ($4 \mu\text{l}$ Quantiscript RT Buffer, $1 \mu\text{l}$ Quantiscript Reverse Transcriptase, $1 \mu\text{l}$ RT Primer Mix) hinzugefügt und für 30 Minuten bei 42°C im Mastercycler inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 5 Minuten auf 95°C erhöht, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Der cDNA Mix wurde durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser auf 1000 ng verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.5.3 Quantitative *real-time*-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Genexpression wurden qPCR-Messungen durchgeführt. Bei dieser Methode wird die transkribierte cDNA vervielfältigt und ein Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der neu hergestellte doppelsträngige DNA. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge an amplifizierter DNA und wird zur Quantifizierung verwendet. Dazu wurden $2,5 \mu\text{l}$ der zuvor hergestellten cDNA und $7,5 \mu\text{l}$ Mastermix ($1,25 \mu\text{l}$ *Forward Primer*, $1,25 \mu\text{l}$ *Reverse Primer* und $5 \mu\text{l}$ Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)) in eine 96-Well-Platte (MicroAmp™, Applied Biosystems) pipettiert und mit einer Klebefolie (MicroAmp™ optische Klebefolie) verschlossen. Der Platinum™ SYBR™ Green SuperMix enthält unter anderem die *Taq* DNA Polymerase, SYBR® Green I dye, ROX Reference Dye und Desoxyribonukleosidtriphosphate. Die Platte wurde mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies) unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C für 10 Minuten für die Initialdenaturierung der DNA in Einzelstränge durch Aktivierung der DNA Polymerase, gefolgt von 40 Zyklen abwechselnd 95°C für 15 Sekunden für die Denaturierung und 60°C für 60 Sekunden für die Anlagerung der komplementären Primer an die Zielsequenz und die Elongation. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Zur Normalisierung wurde die Expression von *Nudc* als Haushaltsgen verwendet. Die relative Genexpression wurde mit der ΔCt -Methode berechnet. Dazu wurde der Ct-Wert des Haushaltsgens vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert: ($\Delta\text{Ct} =$

$Ct(\text{Zielgen}) - Ct(Nudc)$) und der erhaltene Wert als negative Potenz der Basis zwei berechnet: $(2^{(-\Delta Ct)})$. Zur Normalisierung auf die Kontrollgruppe wurden die erhaltenen Werte jeder Probe durch den Mittelwert der Kontrollgruppe dividiert.

2.6 Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot

Tabelle 2: Puffer, Lösungen und Gele für Western Blot

Puffer/ Lösungen/ Gele	Zusammensetzung
Blockier-Puffer	50 % LI-COR Intercept® Blocking Buffer (LI-COR) 50 % <i>Tris-buffered saline</i> (TBS)
Blotting-Puffer Semi-dry	1900 mM Glycin 250 mM Tris 20 % Ethanol 0,1 % <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) Wasser
Laemml Puffer 4X	250 mM Tris (pH=6,8) 8 % SDS 20 % Glycerol 0,02 % Bromophenolblau 100 mM 1,4-Dithiothreit (DTT, unmittelbar vor der Lyse) Wasser
Lyse-Puffer für Fettgewebe	20 mM Tris-HCl 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 255 mM Sucrose Wasser
Sammelgel	5 % Acrylamid 125 mM Tris (pH=6,8) 0,1 % SDS 0,15 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin 0,03 % Ammoniumpersulfat Wasser
SDS Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS Wasser
<i>Tris-buffered saline</i> (TBS, pH = 7,4)	150 mM NaCl 10 mM Tris Wasser

<i>Tris-buffered saline with Tween 20 (TBST)</i>	0,1 % Tween® 20 (Carl Roth) TBS
Trenngel	10 % Acrylamid 250 mM Tris (pH=8,8) 0,1 % SDS 0,2 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin 0,025 % Ammoniumpersulfat Wasser
Verdünnungspuffer für Primärantikörper	5 % Bovines Serumalbumin (BSA) TBST
Verdünnungspuffer für Sekundärantikörper	50 % LI-COR Intercept® Blocking Buffer 50 % TBS 0,1 % Tween® 20

Tabelle 3: Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
ATGL (30A4) Rabbit mAb	1:1000	2439	Cell Signaling
HSL (D6W5S) XP® Rabbit mAb	1:1000	18381	Cell Signaling
Phospho-HSL (Ser563) Antibody	1:1000	4139	Cell Signaling
Phospho-PKA Substrate (RRXS*/T*) (100G7E) Rabbit mAb	1:1000	9624	Cell Signaling
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit	1:10000	926-32211	LI-COR

2.6.1 Protein-Isolierung aus dem Fettgewebe

Das entnommene Gewebe wurde in 4 °C PBS präpariert, in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Proteinextraktion aus dem gonadalen und dem inguinalen Fettgewebe erfolgte mit dem beschriebenen Lyse-Puffer. Dieser wurde zunächst mit Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis von 1:100 angereichert, um Proteinasen und Phosphatase zu inhibieren und die Stabilität der Proteine und Modifikationen zu gewährleisten. Nach Zugabe von 500 µl des mit dem Inhibitor Cocktail angereicherten Puffers wurde das Gewebe mit dem TissueRuptor® II (Qiagen) lysiert und zweimal für 10 Minuten bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine im Überstand der mittleren Phase gesammelt.

2.6.2 Quantitative Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Test

Der Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid*: BCA)-Test basiert auf der Reduktion von Kupferionen durch die Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu und der anschließenden kolorimetrischen Messung des gebildeten violetten Komplexes aus reduzierten Kupferionen und BCA. Nach der Proteinisolierung wurde der PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) zur quantitativen Bestimmung der vorhandenen Proteinkonzentration verwendet. Aus BSA wurde eine Kalibriergerade (0 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml) erstellt. Das Proteinlysat aus dem Fettgewebe wurde 1:5 mit Lysepuffer verdünnt. Je 25 µl BSA-Standard und verdünnte Probe wurden mit 200 µl Reagenz zur Proteinkonzentrationsbestimmung (PierceTM BCA Protein Assay Reagent A und PierceTM BCA Protein Assay Reagent B, 50:1) in eine 96-Well-Platte pipettiert und 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit einem Mikroplatten-Photometer (SYNERGY) bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration unter Verwendung der Kalibriergerade berechnet.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot Analyse

Die lysierten Proben wurden je nach gemessener Proteinkonzentration mit Reinstwasser und 4x Laemmli Puffer (frischer DTT-Zusatz) verdünnt, um eine einheitliche Endkonzentration zu erhalten. Nach gründlichem Mischen wurden die Proteine durch Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Je nach Volumen der Probe wurden 30 – 50 µg Protein auf ein zuvor hergestelltes Polyacrylamid-Gel (10 %) aufgetragen. Als Referenz für das Molekulargewicht wurden 5 µl PageRulerTM Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Das Gel wurde in 1 l SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 100 – 150 V so lange laufen gelassen, bis die Lauffront den unteren Gel-Rand erreichte. Nach Auf trennung der Proteine wurden diese vom Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose übertragen („blotting“). Dazu wurden 3 Whatman-Papiere, die Membran, das Gel und weitere 3 Whatman-Papiere luftfrei von der Anode zur Kathode einer Halbtrocken-Blotting-Kammer (Semi-Dry Blotter (Peqlab)) gestapelt, nachdem alle Komponenten zuvor mit Blotting-Puffer durchtränkt wurden. Das Blotten erfolgte für 60 Minuten bei einer Stromstärke von 110 mA für ein Gel oder 210 mA für zwei parallel zu blottende Gele. Zur Normalisierung der später gemessenen spezifischen Zielproteine wurden die Gesamtproteine auf der Membran nach dem Blotten mit dem RevertTM 700 Total Protein Stain and Wash Solution Kit (LI-COR) gemäß den Herstelleranweisungen angefärbt und aufgenommen. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10 ml Blockier-Puffer für eine Stunde blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären

Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach 3 x 5 Minuten Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem Odyssey Imaging System 9120 (LI-COR) eingelesen. Inkubation, Waschung und Färbung erfolgten auf einer Schüttelplatte.

2.7 Messung extrazellulärer Flüsse in Echtzeit

Tabelle 4: Substanzen für die extrazellulären Flussanalysen

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
Agarose Low Melt	6351	Roth
Antimycin A	A8674	Sigma
Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy) phenylhydrazone (FCCP)	C2920	Sigma
Etomoxir	E1905	Sigma
Glucose	103577-100	Agilent
Glutamin	103579-100	Agilent
L-Carnitin	C0283	Sigma
Natriumpalmitat	P9767	Sigma
Rinderserumalbumin Fraktion V, fettsäurefrei	10775835001	Roche
Rotenon	R8875	Sigma
Seahorse XF Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	103680-100	Agilent
UK5099	PZ0160	Sigma

2.7.1 Vorbereitung von Gewebestücken aus dem Herzen

Um den Einfluss der Myokardischämie auf den Substratstoffwechsel zu untersuchen, wurde dieser im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich nach 24 Stunden Reperfusion untersucht. Als *Remote*-Bereich wurde das intraventrikuläre Septum verwendet. Zunächst wurden die infarzierten Herzen entnommen und in 4 °C PBS präpariert. Das intraventrikuläre Septum wurde herausgeschnitten und in 37 °C warme Agarose (4 %) eingebettet. Nach Einbringen des Herzgewebes in die Agarose wurde die Probe kurz bei -20 °C und anschließend in 4 °C PBS weitergekühlt. Nach erkalten der Agarose wurde das horizontal eingebettete Septum mit

einem Vibratom (1 mm Amplitude, 85 Hz, 0.5 mm/s, VT1200S, Leica) in Längsschnitte mit einer Dicke von 150 μm in Tyrode-Puffer (18 mM NaHCO₃, 126 mM NaCl, 4,4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 4 mM Hepes, 11 mM Glucose, 30 mM Taurin, 10 mM 2,3-Butandionmonoxim) geschnitten. Den Gewebeschnitten wurde Calcium über eine aufsteigende Calciumreihe (50 μM , 75 μM , 125 μM , 275 μM und 525 μM) in Tyrode-Puffer für jeweils 2 Minuten zugegeben. Danach wurden die Schnitte in Medium A (2 mM Glutamin, 5,5 mM Glucose, 0,5 mM Carnitin in DMEM) überführt und mit einer geschliffenen Kanüle kleine Gewebestücke aus den Schnitten entnommen. Die ausgestanzten Gewebestücke wurden jeweils einzeln in den *Wells* der Islet capture Platte (Agilent) in 100 μL Medium B (2 mM Glutamin, 5,5 mM Glucose, 0,5 mM Carnitin, 0,2 mM Palmitat-BSA in DMEM) platziert und mit einem Netz fixiert. Danach wurden 400 μl Medium B, das bei 37 °C erwärmt wurde, hinzugegeben. Die Platte mit den darin eingenetzten Gewebestücken wurde zur Equilibrierung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.7.2 Messung und Analyse von Sauerstoffverbrauch und Substratumsatz

Der Sauerstoffverbrauch und die Protonenkonzentration wurden mit einem Seahorse XFe24 Gerät (Agilent) gemessen. Für die Messung wurde ein Protokoll mit 8-minütigen Zyklen verwendet, bestehend aus 3 Minuten Mischen, 2 Minuten Warten und 3 Minuten Messen. Der Sauerstoffverbrauch wurde jeweils basal sowie nach der Zugabe von FCCP (3 μM), Etomoxir (40 μM), UK5099 (4 μM) und einer Kombination aus Rotenon (3 μM) und Antimycin A (10 μM) gemessen. Der Zusatz von FCCP diente zur mitochondrialen Entkopplung, während der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch durch eine Kombination der Inhibitoren der Elektronentransportkette Rotenon und Antimycin A bestimmt wurde. Der CPT1-Inhibitor Etomoxir und der MPC-Inhibitor UK5099 wurden verwendet, um die substratspezifischen Beiträge zum Gesamtstoffwechsel zu untersuchen. Der mitochondriale Sauerstoffverbrauch wurde bestimmt, indem die nicht-mitochondrialen Werte des Sauerstoffverbrauchs von den Werten des Sauerstoffverbrauchs vor der Hemmung der mitochondrialen Elektronentransportkette subtrahiert wurden.

2.8 Statistische Analysen

Die Berechnung aller statistischen Analysen erfolgte mit GraphPad Prism 10.2.3 (GraphPad Software Inc.). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (*standard deviation*: SD) angegeben. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der *unpaired t-test* verwendet und auf Normalverteilung getestet. Bei Vorliegen von Varianzheterogenität wurde

Welch's Korrektur vorgenommen. Für die Analyse nicht normalverteilter Daten wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Für den Vergleich von mehreren Gruppen über die Zeit wurde der *two-way analysis of variance* (ANOVA)-Test gefolgt von einem Sidak-Test für multiple Vergleiche verwendet. Bei allen Tests gilt ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant. Der p-Wert wurde über das entsprechende Ergebnis geschrieben, wenn der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant war oder wenn der Unterschied einen relevanten Trend für die Gesamtergebnisse zeigte.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung der peripheren Lipolyse nach Myokardinfarkt

3.1.1 Anstieg der zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren nach Myokardinfarkt

Um die Aktivierung der Lipolyse durch den Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde die Konzentration der zirkulierenden NEFA als Produkt der Lipolyse gemessen. Dazu wurden Blutproben aus der Schwanzvene von Tieren, die entweder einer 60-minütigen Ischämie oder einer Scheinoperation als Kontrolle (Sham) unterzogen wurden, entnommen. Die Konzentration der freien Fettsäuren wurde sowohl basal als auch nach 30 Minuten Reperfusion im Serum ermittelt. Die Myokardischämie führte zu signifikant höheren Konzentrationen an zirkulierenden NEFA nach 30 Minuten Reperfusion im Vergleich zu den Werten vor der Ischämie als auch zur Kontrollgruppe (Sham: $0,532 \pm 0,110$ mmol/l, Ischämie: $0,742 \pm 0,148$ mmol/l, Abbildung 10). Auch in der scheinoperierten Kontrollgruppe kommt es zu einem leichten Anstieg der NEFA-Werte. Dies zeigt eine Aktivierung der Lipolyse, sowohl durch den experimentellen Eingriff an sich, aber insbesondere auch durch die Myokardischämie.

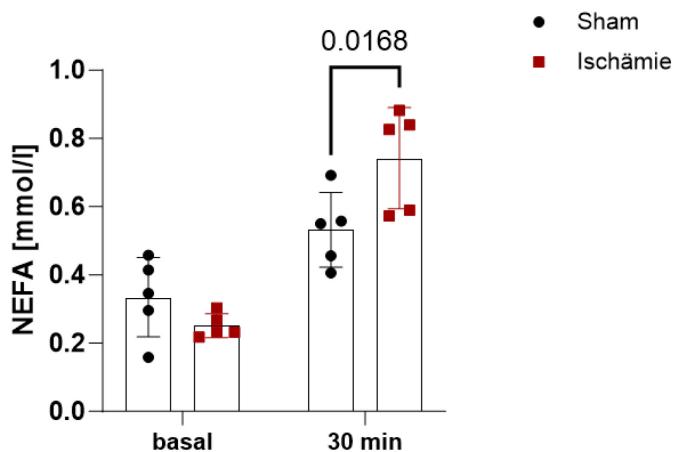


Abbildung 10: Zirkulierende nicht-veresterte Fettsäuren vor Myokardischämie und nach 30 Minuten Reperfusion

Serum-NEFA-Konzentrationen in ischämierten und scheinoperierten (Sham) Mäusen basal vor der Myokardischämie und nach 30 Minuten Reperfusion, $n = 5$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels two-way ANOVA. (Daten dieser Abbildung wurden publiziert: Wang L, Zabri H, Gorresen S, Semmler D, Hundhausen C, Fischer JW, Bottermann K (2022), *Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner*. *Front. Physiol.* 13:1036945. doi: 10.3389/fphys.2022.1036945).⁸⁸

3.1.2 Vermehrte Phosphorylierung von Proteinkinase A-Substraten im inguinalen Fettgewebe nach Myokardinfarkt

Neben der Messung der zirkulierenden Fettsäurespiegel wurden weitere Parameter zur Beurteilung der Aktivierung der Lipolyse im Fettgewebe nach Myokardinfarkt untersucht. Dazu zählt die Aktivität der PKA, deren Aktivierung einen initialen Schritt in der Lipolysekaskade darstellt und die im aktiven Zustand verschiedene pro-lipolytische Substrate phosphoryliert. Inguinales und gonadales weißes Fettgewebe wurden von ischämisierten und scheinoperierten Mäusen nach 30 Minuten Reperfusion entnommen und die Proteinspiegel der phosphorylierten PKA-Substrate mittels Western Blot Analyse ermittelt. Der genutzte Antikörper erkennt dabei ein Phosphorylierungsmuster der PKA an verschiedenen Substraten (RRXS*/T*) und kann daher zur groben allgemeinen Einschätzung der PKA-Aktivität herangezogen werden. Die Quantifizierung der Phosphorylierungssignale zeigte eine signifikant erhöhte Phosphorylierung der PKA-Substrate im inguinalen weißen Fettgewebe nach Myokardischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe ($123,9 \pm 16,6\%$, Abbildung 11 A, C). Im gonadalen weißen Fettgewebe wurde hingegen nur ein Trend zu einer erhöhten Phosphorylierung der PKA-Substrate beobachtet (Abbildung 11 B, D). Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung der Lipolyse als Folge des Myokardinfarkts vor allem im inguinalen weißen Fettgewebe stattfindet.

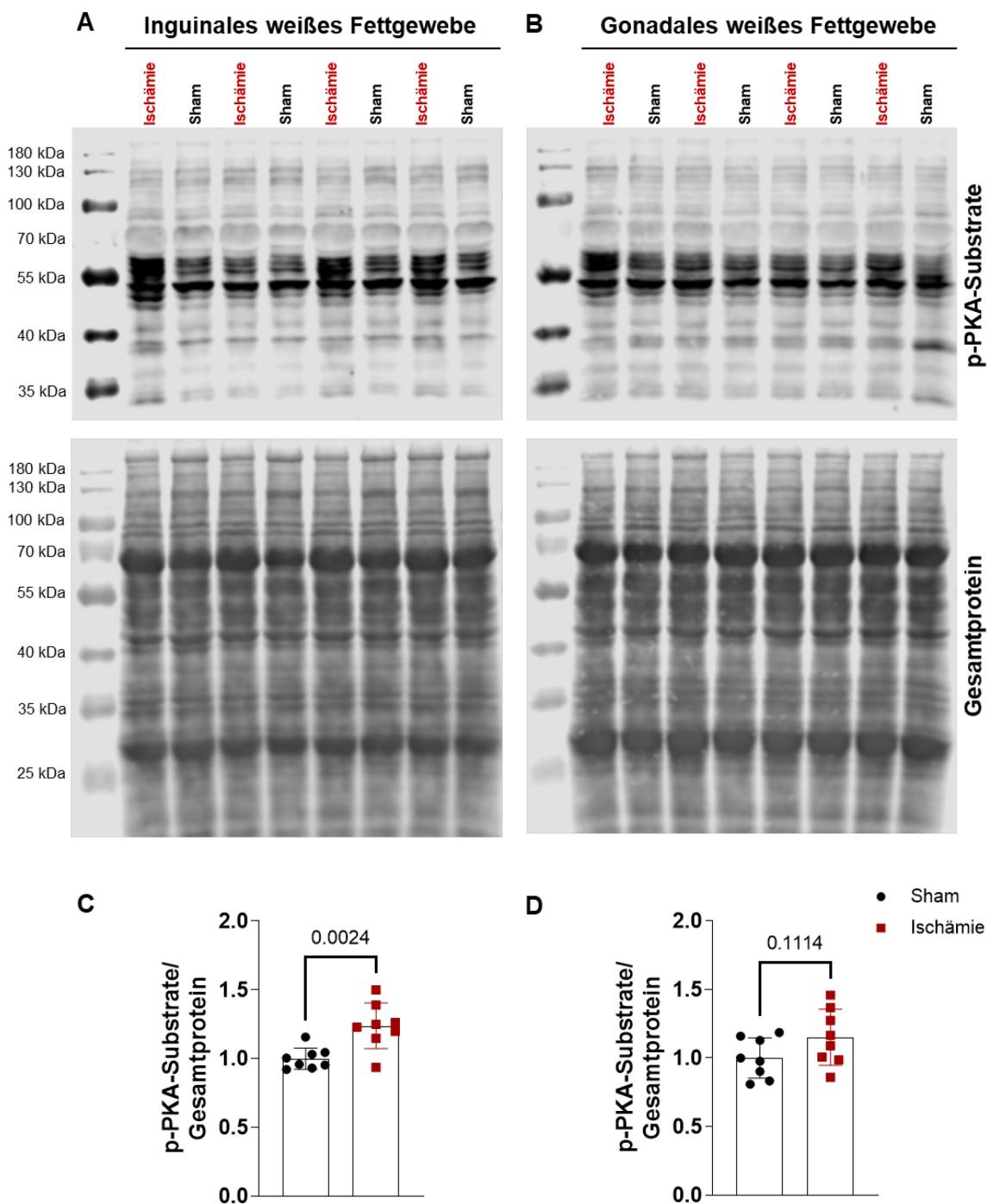


Abbildung 11: Western Blot Analyse von phosphorylierten PKA-Substraten (RRXS*/T*) im inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebe nach 30 Minuten Reperfusion

Proteinspiegel der phosphorylierten PKA-Substrate (p-PKA-Substrate) im Fettgewebe von ischämisierten und scheinoperierten (Sham) Mäusen nach 30 Minuten Reperfusion. Western-Blot-Aufnahmen der p-PKA-Substrate und der entsprechenden Gesamtprotein-Färbungen des (A) inguinalen und (B) gonadalen weißen Fettgewebes. Sowohl für (C) inguinales als auch für (D) gonadale weißes Fettgewebe wurde jeder Wert auf den Gesamtprotein gehalt und dann auf den Mittelwert der scheinoperierten Kontrollen normalisiert, $n = 8$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*.

3.1.3 Vermehrte Phosphorylierung der hormonsensitiven Lipase nach Myokardinfarkt

Nachdem eine allgemein erhöhte PKA-Aktivität durch erhöhte Phosphorylierungsmuster verschiedener Substrate festgestellt wurde, sollten spezifischere PKA-Substrate, die für die Lipolyse wichtig sind, wie zum Beispiel die HSL, untersucht werden. Die oben beschriebenen Proben wurden daher zum einen auf totale Proteinspiegel sowie den phosphorylierten Anteil der HSL analysiert. Dabei war die Phosphorylierung der HSL im inguinalen weißen Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($296,8 \pm 176,8\%$, Abbildung 12 A, C). Im gonadalen weißen Fettgewebe konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 12 B, D). Zusammenfassend zeigt die erhöhte Aktivität der PKA sowie eine verstärkte Phosphorylierung der HSL, dass die Lipolyse als Folge der Myokardischämie vor allem im inguinalen Fettgewebe aktiviert ist.

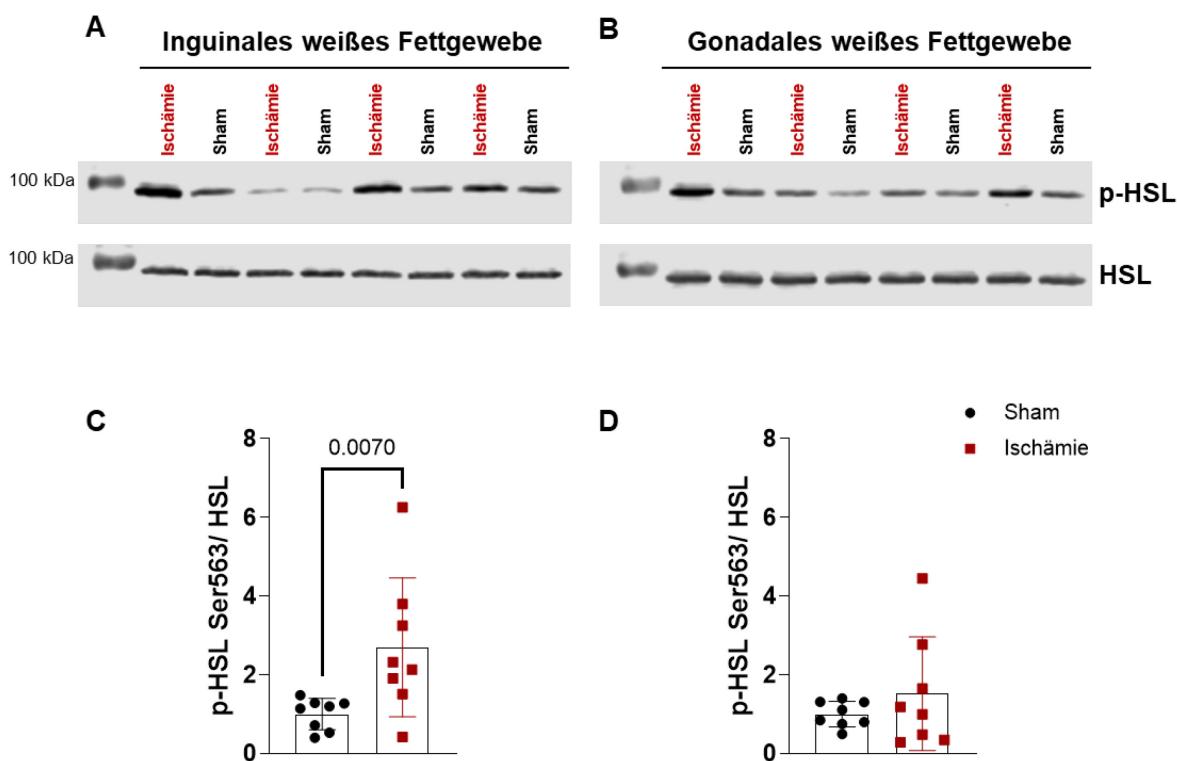


Abbildung 12: Western Blot Analyse der phosphorylierten hormonsensitiven Lipase im inguinalen und gonadalen weißem Fettgewebe nach 30 Minuten Reperfusion

Phosphorylierungsspiegel von HSL (p-HSL) im Fettgewebe von ischämisierten und scheinoperierten (Sham) Mäusen nach 30 Minuten Reperfusion. Western Blot-Aufnahmen von p-HSL und des entsprechenden Gesamt-HSL-Gehalts von (A) inguinalem und (B) gonadalem weißem Fettgewebe. Sowohl für (C) inguinales als auch für (D) gonadales weißes Fettgewebe wurde jeder Wert auf den Gesamt-HSL-Gehalt und dann auf den Mittelwert der scheinoperierten Kontrollen normalisiert, $n = 8$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels Mann-Whitney-Test.

3.2 Validierung der Effizienz des Tamoxifen-induzierbaren, adipozytenspezifischen ATGL-KOs

Als Folge des Myokardinfarkts wurde in den zuvor dargestellten Ergebnissen eine erhöhte periphere Lipolyse, insbesondere im inguinalen Fettgewebe beobachtet. Um herauszufinden, welchen Einfluss die peripheren Lipolyse auf das Herz nach Myokardinfarkt hat, wurde die ATGL, welche für den initialen Schritt der Lipolyse verantwortlich ist, im murinen Modell Tamoxifen-induzierbar und adipozytenspezifisch ausgeknockt, um eine Hemmung der Lipolyse zu erreichen. Dies wurde erreicht, indem eine ATGL flox-Linie mit einer Adipoq CreERT2-Linie gekreuzt wurde. Als Kontrolle dienten Tiere mit dem Genotyp Adipoq-CreERT2^{wt/wt}/ATGL^{flox/flox}.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die Effizienz des KOs nach Verabreichung von 4-Hydroxytamoxifen sowohl phänotypisch, als auch auf Proteinebene im Fettgewebe untersucht. Die repräsentativen Aufnahmen der unterschiedlichen Fettgewebsdepots (gonadales weißes, inguinales weißes und braunes Fettgewebe) zeigen makroskopisch sichtbare Veränderungen im Fettgewebe der ATGL-KO-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abbildung 13). Das inguinale weiße Fettgewebe und das braune Fettgewebe stellten sich deutlich vergrößert dar. Zusätzlich zeigte das braune Fettgewebe eine veränderte Farbe von braun zu beige/ weiß. Interessanterweise, zeigte das gonadale weiße Fettgewebe kaum sichtbare Veränderungen.

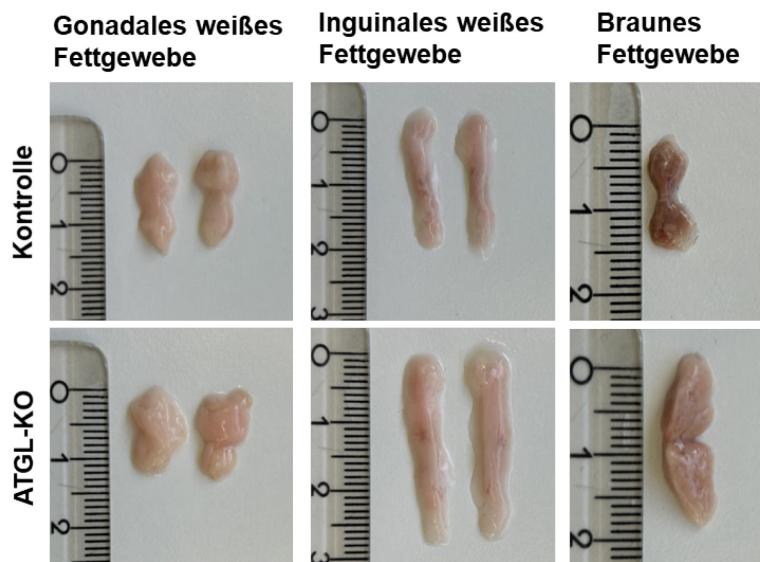


Abbildung 13: Makroskopie von braunem und weißem Fettgewebe von Kontroll- und ATGL-KO-Tieren

Repräsentative Aufnahmen des gonadalen weißen, inguinalen weißen und braunen Fettgewebes von ATGL-KO- und Kontrolltieren nach Verabreichung von 4-Hydroxytamoxifen.

3.2.1 Verringerte ATGL-Proteinspiegel im Fettgewebe nach der Induktion des ATGL-KOs durch 4-Hydroxytamoxifen

Zusätzlich zur makroskopischen phänotypischen Charakterisierung wurden zum Nachweis des KOs durch die 4-Hydroxytamoxifen-Gabe die ATGL-Proteinspiegel im Fettgewebe ermittelt. Da der Fokus dieser Arbeit auf den Fettdepots des inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebes lag, wurden die ATGL-Proteinspiegel in diesen beiden Fettgeweben mittels Western Blot analysiert. Sowohl das inguinale (ATGL-Expression: $24,9 \pm 22,6\%$) als auch das gonadale weiße Fettgewebe (ATGL-Expression: $14,0 \pm 9,7\%$) zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe ausreichend unterdrückte ATGL-Proteinspiegel (Abbildung 14 A, B). Somit konnte ein erfolgreich induzierter ATGL-KO gezeigt werden.

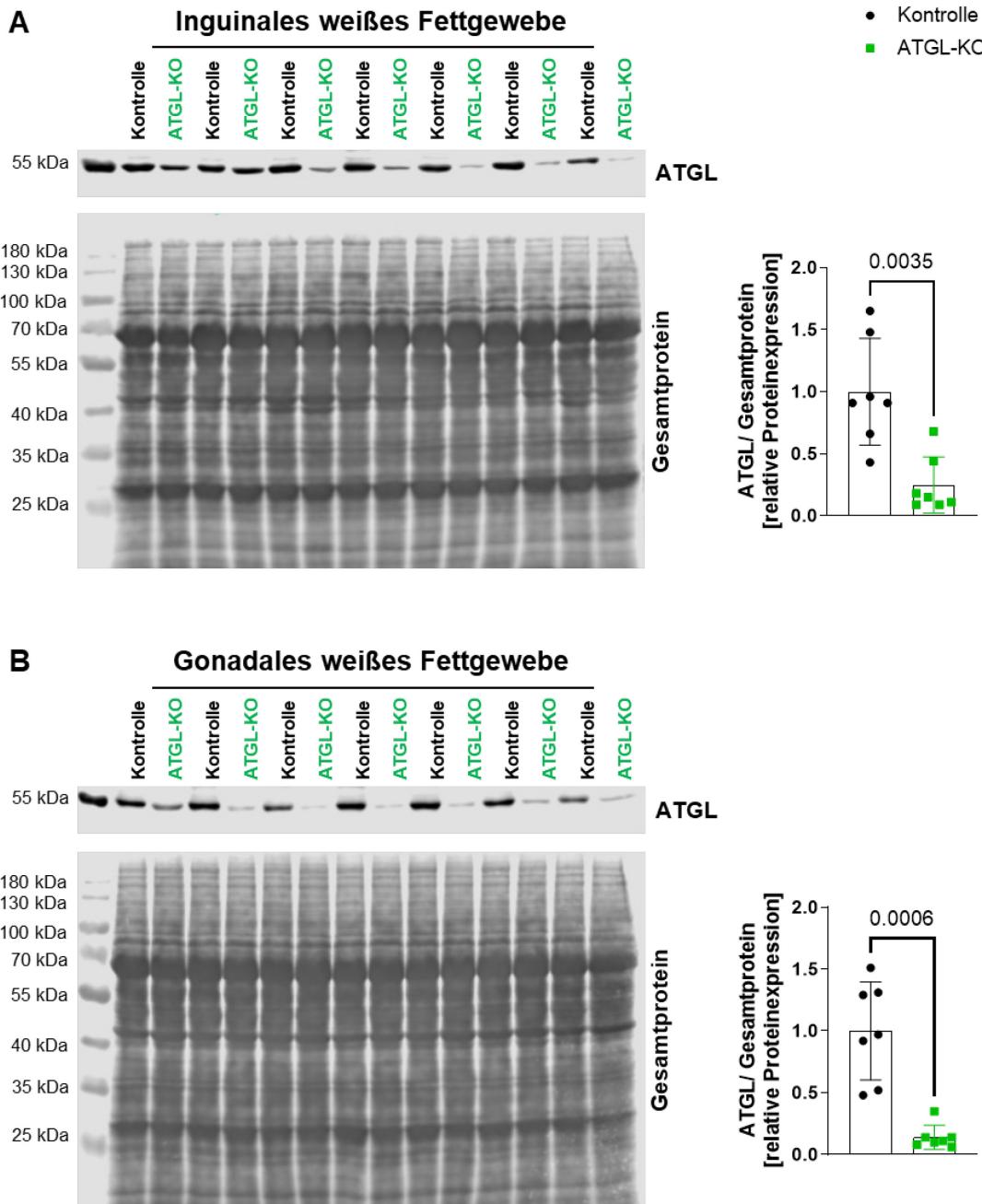


Abbildung 14: Western Blot Analyse zur Validierung des induzierbaren ATGL-KOs im Fettgewebe

Western Blot Analyse der ATGL-Proteinspiegel im Fettgewebe von ATGL-KO und Kontrolltieren. Sowohl für (A) inguinales als auch für (B) gonadales weißes Fettgewebe wurde jeder Wert auf den Gesamtproteingehalt und dann auf den Mittelwert der Kontrollen normalisiert, $n = 7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels Mann-Whitney-Test.

3.2.2 Einfluss des ATGL-KOs auf die zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren nach Aktivierung der Lipolyse via CL-316,243

Um die funktionelle Auswirkung des adipozytenspezifischen ATGL-KO auf die Lipolyse zu untersuchen, wurde in einem Vorversuch die Lipolyse durch Injektion des β_3 -Adrenozeptor-Agonisten CL-316,243 stimuliert. Zum Vergleich wurde den Mäusen unmittelbar vor und 30 Minuten nach der Injektion des Lipolyse-Stimulators Blut entnommen. Aus diesen Proben wurden die zirkulierenden NEFA-Werte als Indikator für eine aktive Lipolyse bestimmt. Die Lipolyse konnte durch den Adrenozeptor-Agonisten CL-316,243 erfolgreich stimuliert werden, wie die erhöhten NEFA-Konzentrationen 30 Minuten nach Stimulation zeigten (Abbildung 15). Die ATGL-KO-Gruppe zeigte jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Konzentrationen an zirkulierenden NEFA sowohl im basalen Zustand als auch nach Stimulation der Lipolyse. Dies zeigt eine suffiziente Hemmung der Lipolyse in den ATGL-KO-Mäusen.

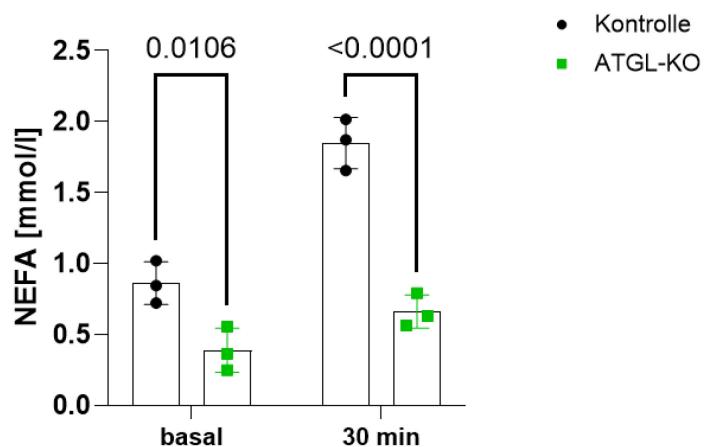


Abbildung 15: Konzentration zirkulierender nicht-veresterter Fettsäuren im Serum vor und 30 Minuten nach der Gabe von CL-316,243

Zirkulierende NEFA basal und nach 30 Minuten Stimulation der Lipolyse durch intraperitoneale Injektion des β_3 -Adrenozeptor-Agonisten CL-316,243 in Kontroll- und ATGL-KO-Mäusen, $n = 3$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels two-way ANOVA.

3.3 Modell des Myokardinfarkts im Tamoxifen-induzierbaren und adipozytenspezifischen ATGL-KO-Mausmodell

Nach erfolgreicher, auch funktioneller, Validierung des ATGL-KOs, sollten die Mäuse im experimentellen Myokardinfarktmodell untersucht werden, um die Bedeutung der adipozytenspezifischen ATGL für das Herz nach Myokardinfarkt zu untersuchen. Der zeitliche Verlauf ist nachfolgend grafisch dargestellt (Abbildung 16). Zunächst wurde bei männlichen Mäusen im Alter von etwa 10 Wochen der ATGL-KO durch intraperitoneale Injektion von 4-Hydroxytamoxifen über 7 aufeinanderfolgende Tage induziert. Es folgte eine Auswaschphase von 2 Wochen. Der Myokardinfarkt erfolgte in einem zweistufigen Verfahren, bestehend aus Ligaturanlage und 60-minütiger Myokardischämie. Vor der Ligaturanlage wurde eine basale Echokardiographie durchgeführt. Blutproben wurden vor der Myokardischämie sowie nach 30 Minuten Reperfusion entnommen. Die Reperfusionszeitpunkte 24 Stunden und 7 bis 28 Tage wurden untersucht, wobei wöchentliche echokardiographische Messungen durchgeführt wurden.

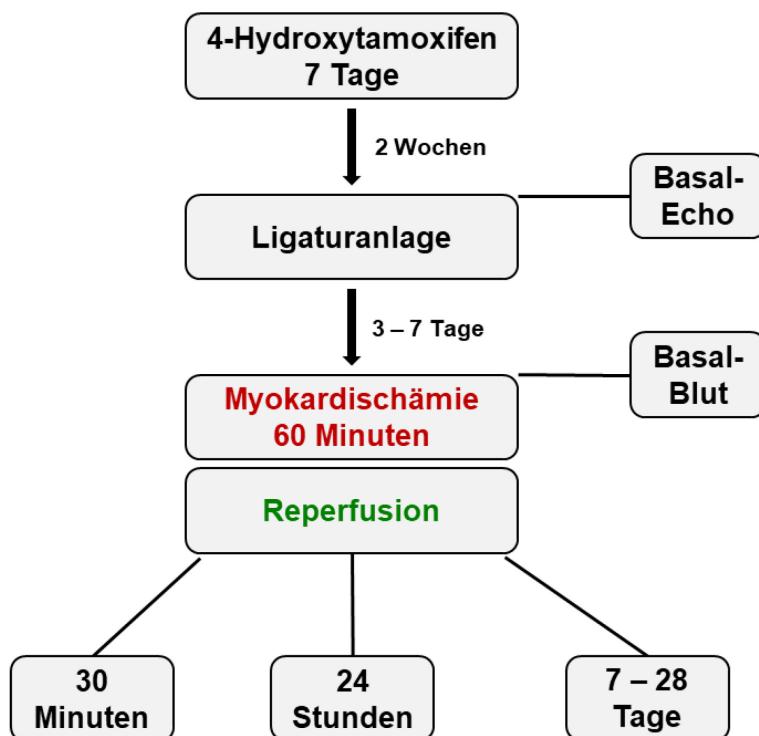


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des Myokardinfarktmodells im Tamoxifen-induzierbaren und adipozytenspezifischen ATGL-KO-Mausmodells

Nach 7-tägiger intraperitonealer Injektion von 4-Hydroxytamoxifen, gefolgt von einer zweiwöchigen Auswaschphase, wurde die Ligaturanlage durchgeführt. 3 bis 7 Tage später wurde eine 60-minütige Myokardischämie induziert. Die Analysen wurden zu verschiedenen Reperfusionszeitpunkten durchgeführt: 30 Minuten, 24 Stunden und 7 bis 28 Tage.

3.4 Die Konzentration der nicht-veresterten freien Fettsäuren nach Myokardinfarkt ist bei ATGL-KO-Tieren erniedrigt

Um auch im experimentellen Myokardinfarktmodell den Einfluss des ATGL-KOs auf die aktivierte Lipolyse zu untersuchen, wurden erneut NEFA-Werte aus Blutproben basal und nach 30 Minuten Reperfusion gemessen. Die NEFA-Konzentrationen zeigten wieder einen Anstieg zwischen dem prä- und postischämischen Zustand, nach 30 Minuten Reperfusion war der Wert durch den ATGL-KO signifikant niedriger als die Werte der Kontrollgruppe (Kontrolle: $0,531 \pm 0,136$ mmol/l, ATGL-KO: $0,416 \pm 0,141$ mmol/l, Abbildung 17 A). Zusätzlich wurden die Fettsäurekonzentrationen nach 7 Tagen Reperfusion aus kardialen Blutproben gemessen. Hier konnte ein Trend zu niedrigeren NEFA-Werten durch den KO beobachtet werden (Abbildung 17 B). Daraus lässt sich schließen, dass der adipozytenspezifische ATGL-KO sowohl die nach dem Myokardinfarkt aktivierte Lipolyse als auch die Lipolyse während der späteren Reperfusionsphase erfolgreich unterdrückt.

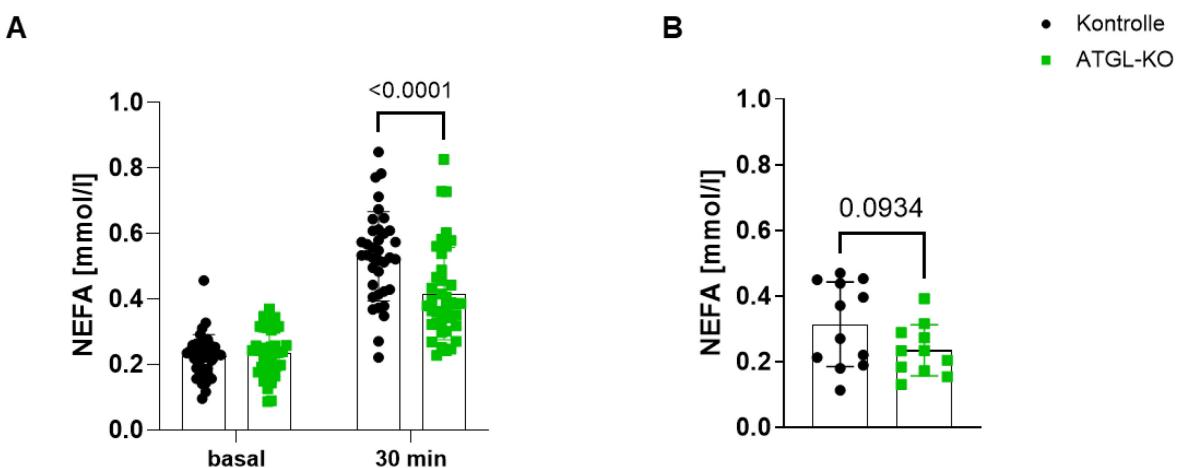


Abbildung 17: Konzentration der zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren vor und nach Myokardischämie

Konzentration zirkulierender NEFA (A) basal und nach 30 Minuten Reperfusion sowie (B) nach 7 Tagen Reperfusion, (A) n = 37 bis 40, (B) n = 11 bis 12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels (A) two-way ANOVA, (B) unpaired t-test.

3.5 Einfluss des ATGL-KOs auf das Fettgewebe

3.5.1 Zunahme der Fettgewebsgewichte bei ATGL-KO-Tieren

Der adipozytenspezifische ATGL-KO unterdrückt die Lipolyse, lagert daher mehr Triglyceride in das Fettgewebe ein und kann somit die Gewichte der verschiedenen Fettgewebsdepots beeinflussen. Sowohl das Gewicht des weißen als auch des braunen Fettgewebes wurden basal sowie nach 24 Stunden, 7 Tagen und 28 Tagen Reperfusion gewogen (Abbildung 18). Das subkutane inguinale weiße Fettgewebe und das braune Fettgewebe wiesen zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höhere Gewichte im Verhältnis zum Körpergewicht auf (inguinales weißes Fettgewebe im Verhältnis zum Körpergewicht: basal: Kontrolle: $9,81 \pm 2,04$ mg/g, ATGL-KO: $15,45 \pm 2,99$ mg/g, 24 Stunden Reperfusion: Kontrolle: $8,65 \pm 2,09$ mg/g, ATGL-KO: $12,41 \pm 2,68$ mg/g, 7 Tage Reperfusion: Kontrolle: $8,39 \pm 2,00$ mg/g, ATGL-KO: $11,65 \pm 1,97$ mg/g, 28 Tage Reperfusion: Kontrolle: $11,34 \pm 2,67$ mg/g, ATGL-KO: $15,26 \pm 3,11$ mg/g, braunes Fettgewebe im Verhältnis zum Körpergewicht: basal: Kontrolle: $2,48 \pm 0,47$ mg/g, ATGL-KO: $6,04 \pm 0,87$ mg/g, 24 Stunden Reperfusion: Kontrolle: $2,07 \pm 0,44$ mg/g, ATGL-KO: $5,49 \pm 1,25$ mg/g, 7 Tage Reperfusion: Kontrolle: $2,01 \pm 0,41$ mg/g, ATGL-KO: $4,93 \pm 1,12$ mg/g, 28 Tage Reperfusion: Kontrolle: $2,31 \pm 0,30$ mg/g, ATGL-KO: $5,81 \pm 0,87$ mg/g). Das viszerale gonadale weiße Fettgewebe war nach 24 Stunden und 7 Tagen Reperfusion höher als in der Kontrollgruppe und blieb sowohl basal als auch nach 28 Tagen Reperfusion unverändert (gonadales weißes Fettgewebe im Verhältnis zum Körpergewicht: 24 Stunden Reperfusion: Kontrolle: $10,41 \pm 2,63$ mg/g, ATGL-KO: $15,67 \pm 4,98$ mg/g, 7 Tage Reperfusion: Kontrolle: $10,12 \pm 2,34$ mg/g, ATGL-KO: $12,72 \pm 3,52$ mg/g). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der adipozytenspezifische ATGL-KO eine wichtige Rolle bei der Regulation der Fettgewebsmasse spielt. Die Hemmung der Lipolyse führt zu einer vermehrten Einlagerung von Triglyceriden, was sich in einer Gewichtszunahme des subkutanen inguinalen weißen Fettgewebes und des braunen Fettgewebes über den gesamten Untersuchungszeitraum widerspiegelt.

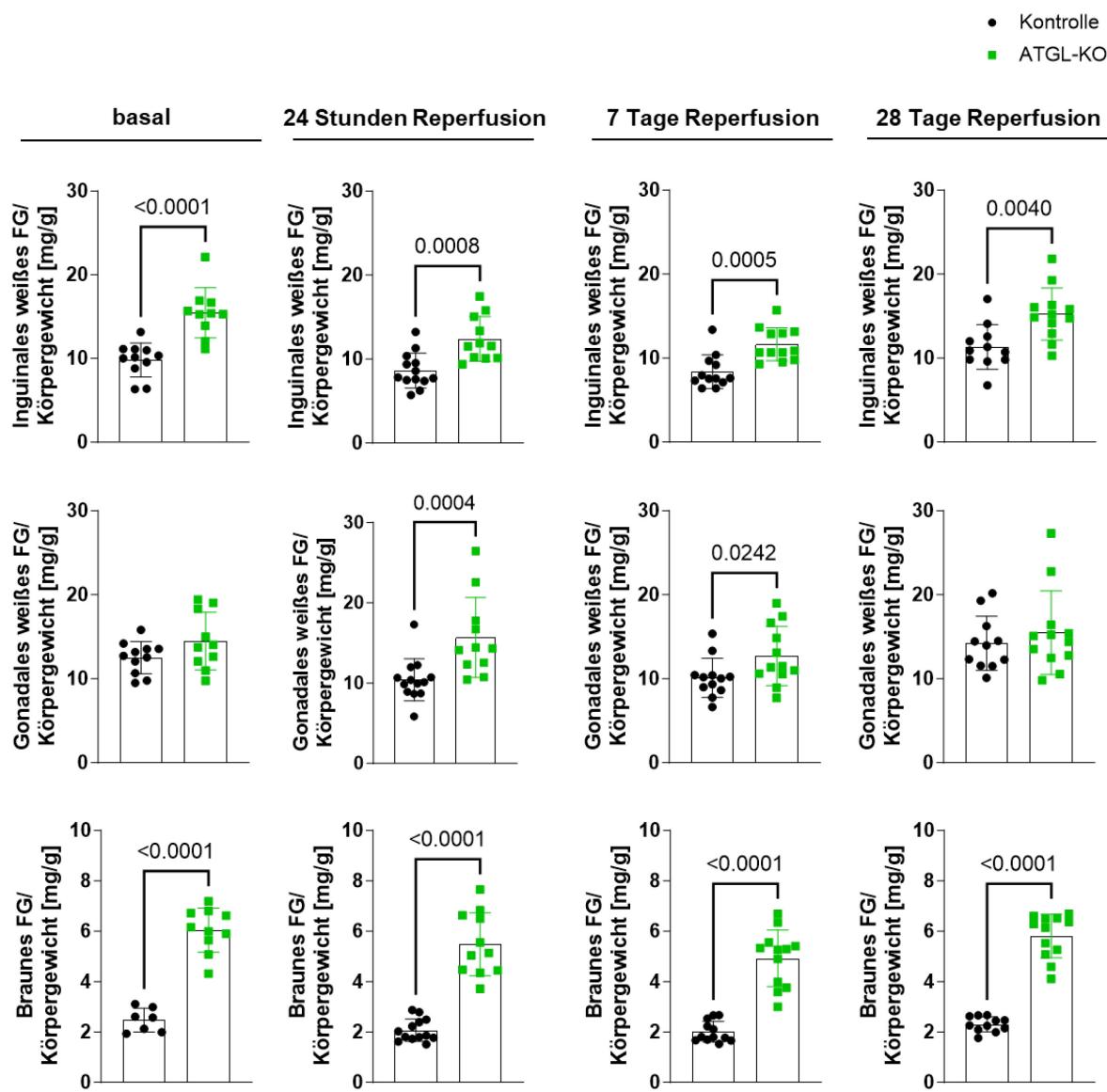
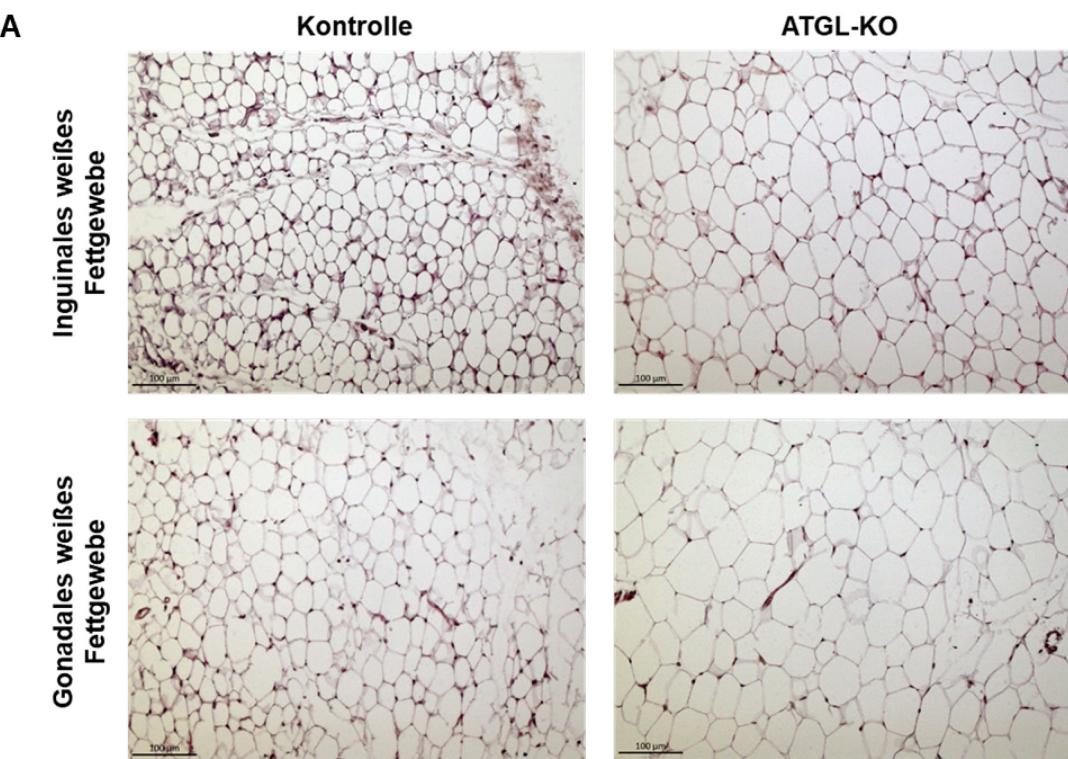


Abbildung 18: Gewichte des inguinalen und gonadalen weißen und des braunen Fettgewebes
 Gewichte des weißen und braunen Fettgewebes im Verhältnis zum Körpergewicht basal und nach verschiedenen Reperfusionszeitpunkten (24 Stunden, 7 Tagen und 28 Tagen), n = 7 bis 22. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*, Mann-Whitney-Test oder *unpaired t-test* mit Welch's Korrektur. FG: Fettgewebe.

3.5.2 Zunahme der Adipozytengröße bei ATGL-KO-Tieren

Neben der makroskopischen Analyse wurden die verschiedenen Depots auch mikroskopisch analysiert. Dazu wurde die Adipozytengröße im inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebe nach 7 Tagen Reperfusions in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Paraffinschnitten des Fettgewebes bestimmt (Abbildung 19 A). Insgesamt zeigt das gonadale weiße Fettgewebe eine homogenere Verteilung der Adipozytengröße, während der Anteil kleinerer Adipozyten im inguinalen Fettgewebe höher ist. In Übereinstimmung mit den höheren Fettgewebsgewichten zeigte die Adipozytengrößeverteilung im inguinalen weißen Fettgewebe der ATGL-KO-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Anzahl kleiner Adipozyten und eine höhere Anzahl großer Adipozyten. Auch die mittlere Adipozytengröße war in der ATGL-KO-Gruppe signifikant größer (Abbildung 19 B, C). Wie sich auch schon in der makroskopischen Analyse andeutete, war die Adipozytengrößeverteilung im gonadalen weißen Fettgewebe zwischen beiden Gruppen kaum verändert und auch die mittlere Adipozytengröße zeigte nur einen Trend zu größeren Adipozyten (Abbildung 19 D, E).



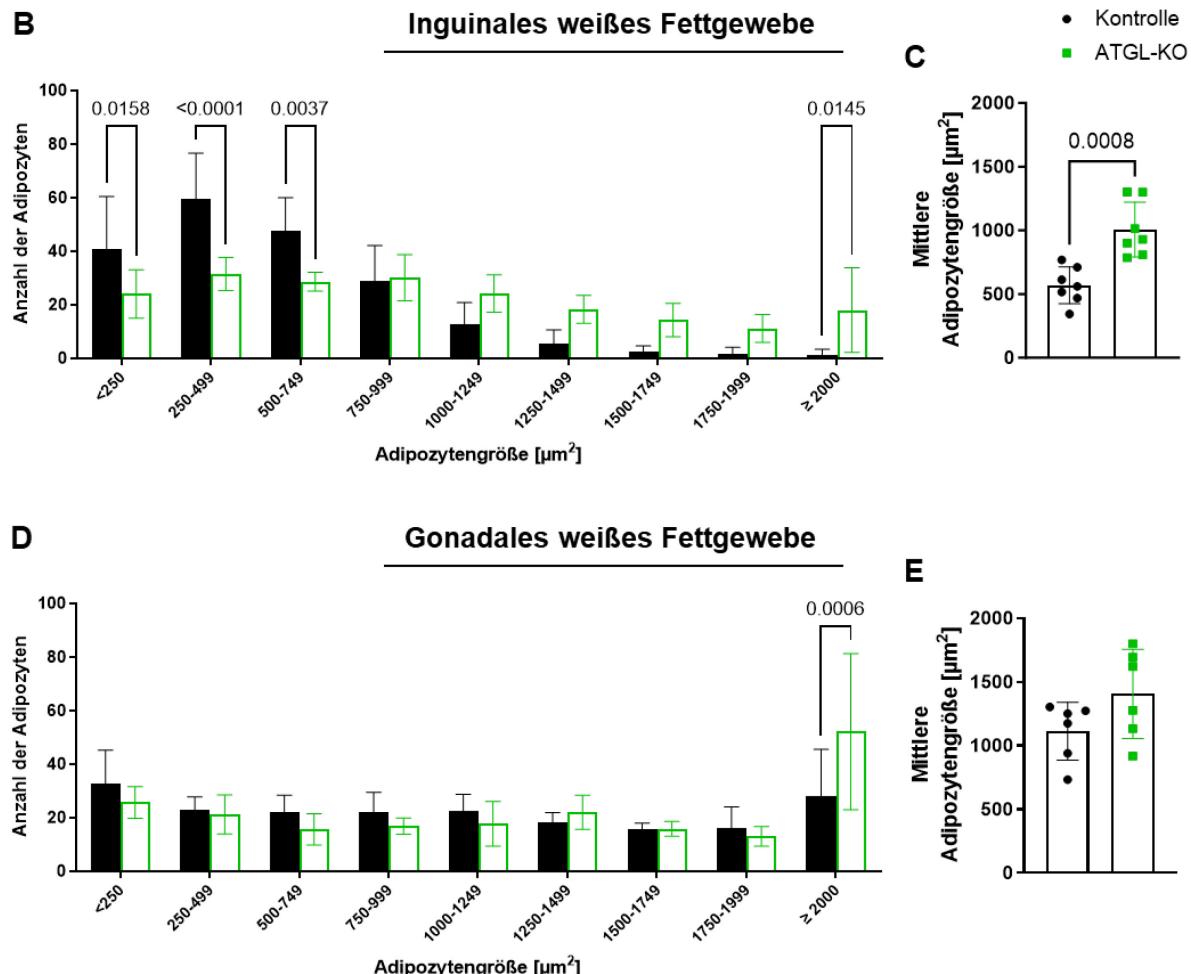
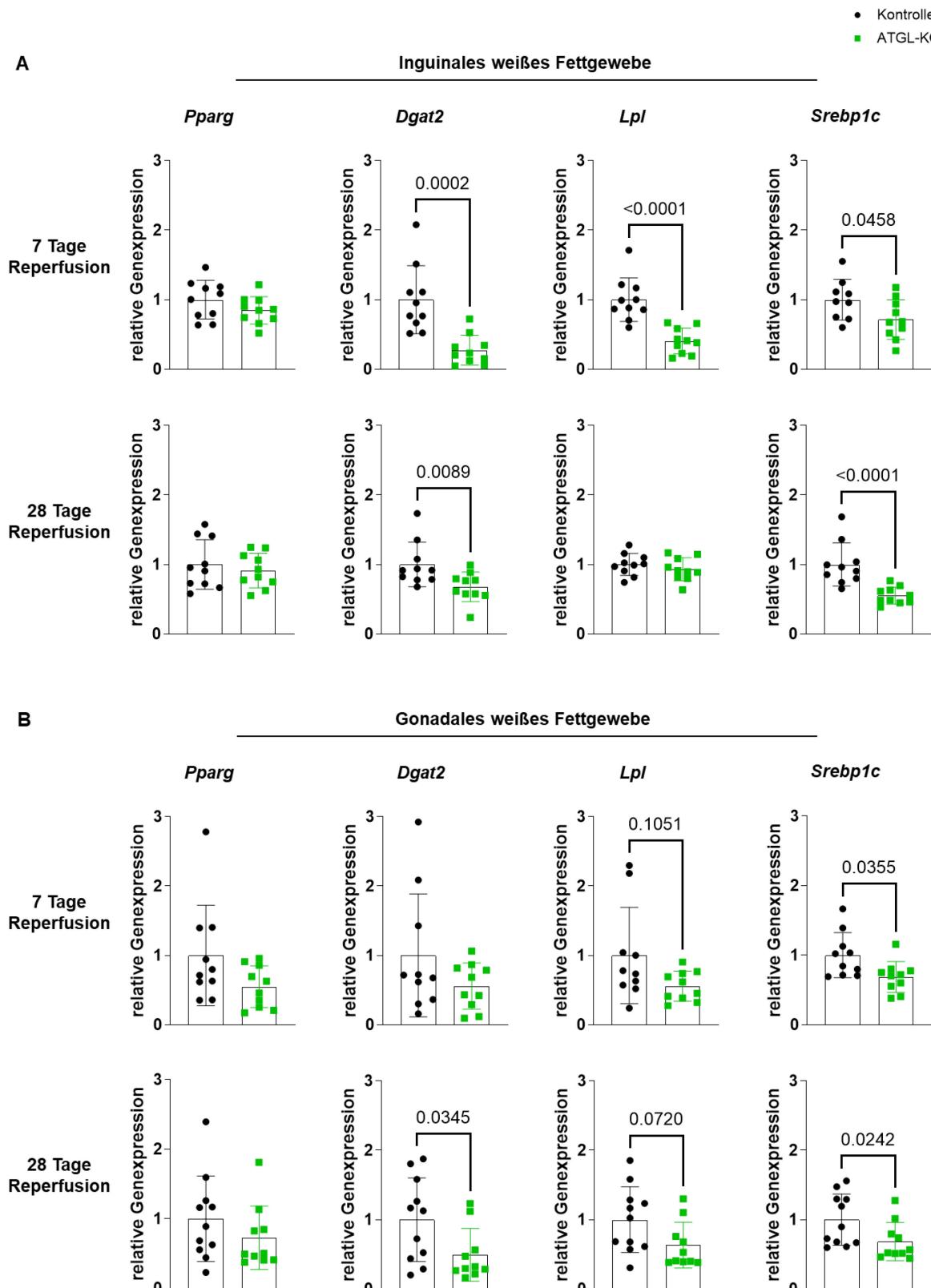


Abbildung 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Bestimmung der Adipozytengröße des Fettgewebes

(A) Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Fettgewebes von ATGL-KO- und Kontrolltieren. Die Adipozytengrößeverteilung sowie die mittlere Adipozytengröße des inguinalen (B, C) und gonadalen (D, E) weißen Fettgewebes nach sieben Tagen Reperfusion, n = 6 bis 7. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels (B, D) two-way ANOVA und (C, E) unpaired t-test.

3.5.3 Verminderte Expression von Lipogenese-Genen im Fettgewebe

Die Lipolyse und die Lipogenese sind wichtige Stoffwechselprozesse, die den Lipidmetabolismus regulieren. Deshalb wurde der Einfluss der Hemmung der Lipolyse durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO auf die Lipogenese im Fettgewebe untersucht. Dazu wurde die relative Genexpression von zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren für die Regulation der Lipogenese, *Pparg* und *Srebp1c*, sowie von den *Pparg*-Zielgenen *Dgat2* und *Lpl* im inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebe von ATGL-KO- und Kontrolltieren nach 7 und 28 Tagen Reperfusion gemessen. Im inguinalen weißen Fettgewebe war die Genexpression des Transkriptionsfaktors *Srebp1c* herunterreguliert. Die Genexpression des Transkriptionsfaktors *Pparg* blieb unverändert, während *Dgat2* nach 7 und 28 Tagen Reperfusion sowie *Lpl* nach 7 Tagen Reperfusion herunterreguliert waren. *Lpl* war nach 28 Tagen Reperfusion nicht mehr verändert (Abbildung 20 A). Im gonadalen weißen Fettgewebe wurde ebenfalls eine Herunterregulierung von *Srebp1c* beobachtet, während *Pparg* unverändert blieb. *Dgat2* war nach 28 Tagen Reperfusion herunterreguliert und zeigte einen Trend zu niedrigeren Spiegeln nach 7 Tagen Reperfusion. *Lpl* zeigte ebenfalls einen Trend zur Herunterregulierung (Abbildung 20 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Lipogenese im Fettgewebe von ATGL-KO-Tieren reduziert ist.

**Abbildung 20: Genexpression von Lipogenese-Genen im Fettgewebe**

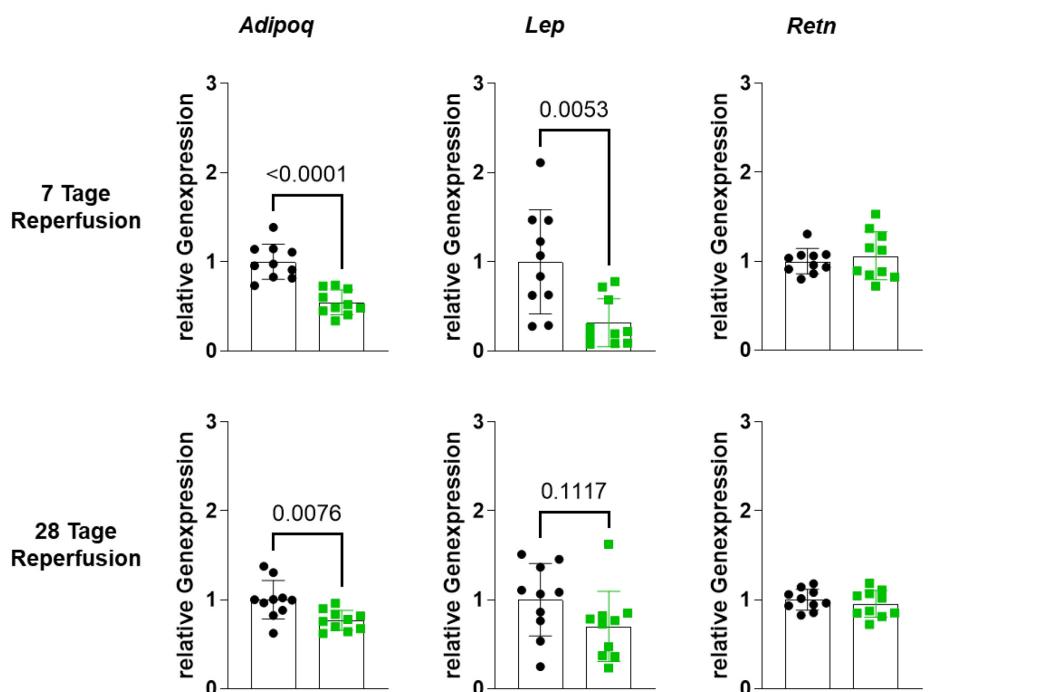
Relative Genexpression von *Pparg*, *Dgat2*, *Lpl* und *Srebp1c* im weißen (A) inguinalen und (B) gonadalen Fettgewebe nach 7 und 28 Tagen Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren, $n = 9$ bis 11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test* oder Mann-Whitney-Test.

3.5.4 Verminderte Expression von Adipokin-kodierenden Genen im Fettgewebe

Um zu untersuchen, ob die endokrine Funktion des Fettgewebes durch den ATGL-KO verändert wird, wurde neben den Lipogenese-Genen auch die Genexpression von Adipokin-kodierenden Genen untersucht, die das kardiovaskuläre System beeinflussen können. Dazu wurde die Genexpression der Adipokine Adiponektin, Leptin und Resistin im weißen inguinalen und gonadalen Fettgewebe nach 7 und 28 Tagen Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren gemessen. Im inguinalen weißen Fettgewebe war die Genexpression von *Adipoq* herunterreguliert. Die Genexpression von *Lep* war nach 7 Tagen Reperfusion herunterreguliert und zeigte nach 28 Tagen Reperfusion einen Trend zu geringerer Genexpression. *Retn* blieb unverändert (Abbildung 21 A). Im gonadalen Fettgewebe war die Genexpression von *Adipoq* nicht verändert, während *Lep* nach 28 Tagen Reperfusion herunterreguliert war und nach 7 Tagen Reperfusion unverändert blieb. Wie im inguinalen Fettgewebe blieb auch die Genexpression von *Retn* im gonadalen Fettgewebe unverändert (Abbildung 21 B). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte die ATGL-KO-Gruppe eine reduzierte Genexpression verschiedener Adipokine.

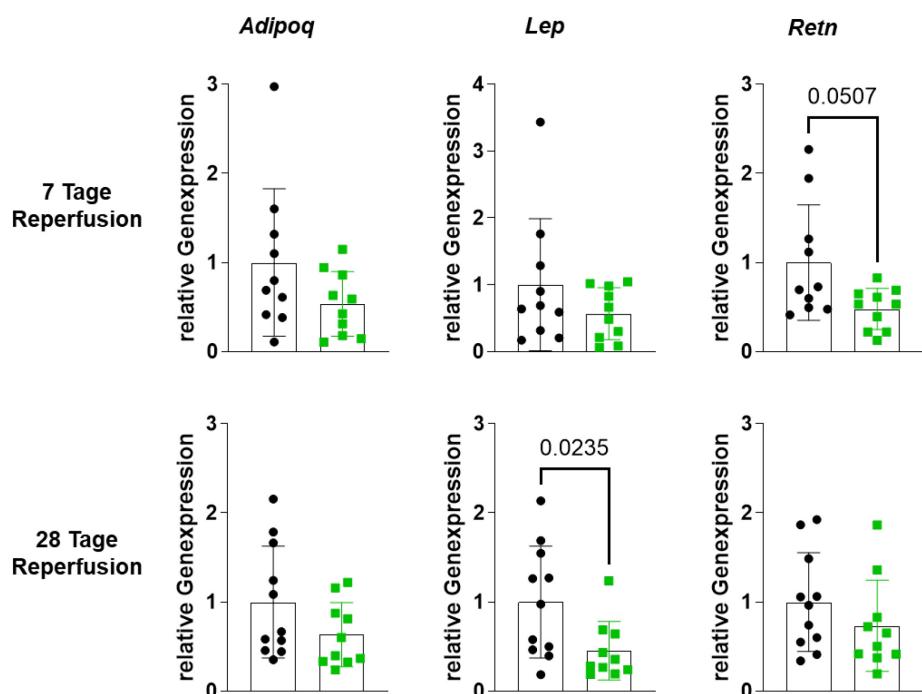
A

Inguinales weißes Fettgewebe



B

Gonadales weißes Fettgewebe

**Abbildung 21: Genexpression von Adipokin-kodierenden Genen im Fettgewebe**

Relative Genexpression von *Adipoq*, *Lep* und *Retn* im weißen (A) inguinalen und (B) gonadalen Fettgewebe nach 7 und 28 Tagen Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren, n = 10 bis 11. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*, Mann-Whitney-Test oder *unpaired t-test* mit Welch's Korrektur.

3.6 Reduzierte Konzentration von zirkulierendem Adiponektin

Da Veränderungen der Adipokine auf Genexpressionsebene festgestellt wurden, wurde untersucht, ob sich diese Veränderungen auch in der Zirkulation widerspiegeln. Dazu wurden die Spiegel von Adipokinen und anderen Stoffwechselhormonen in Serumproben nach 7 Tagen Reperfusion mittels Multiplex-Assays gemessen (Abbildung 22). In Übereinstimmung mit der reduzierten Genexpression von Adiponektin im Fettgewebe war auch das zirkulierende Adiponektin in der ATGL-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (Kontrolle: 12160000 ± 673053 pg/ml, ATGL-KO: 9582000 ± 791656 pg/ml). Weitere zirkulierende Adipokine wie Leptin, Resistin und PAI-1 waren unverändert. Unter den gemessenen Stoffwechselhormonen zeigten die zirkulierenden Glucagonspiegel in den ATGL-KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe einen Trend zu niedrigeren Konzentrationen. Die Konzentrationen von Insulin, Ghrelin und GLP-1 blieben unverändert.

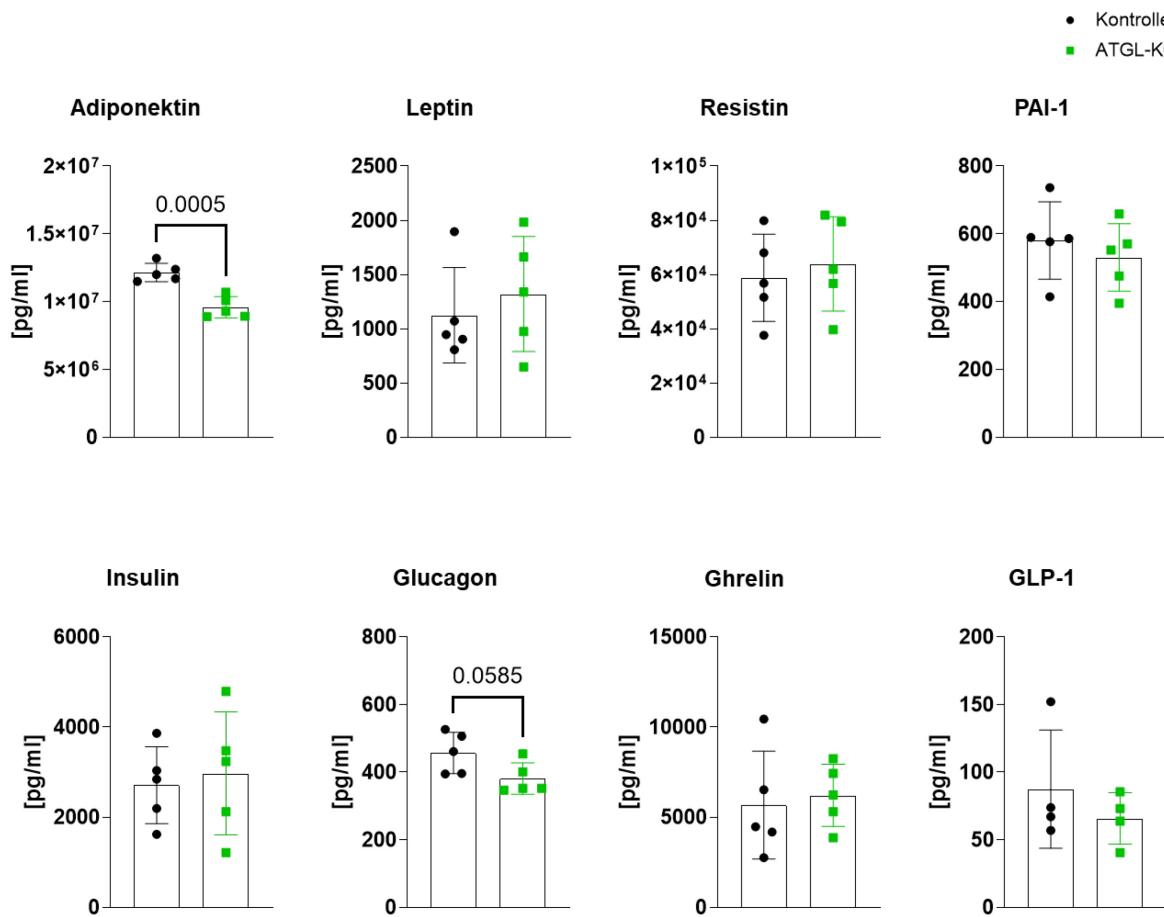


Abbildung 22: Zirkulierende Spiegel von Adipokinen und anderen Hormonen nach sieben Tagen Reperfusion

Serumkonzentration von Adiponektin, Leptin, Resistin, PAI-1, Insulin, Glucagon, Ghrelin und GLP-1 in ATGL-KO- und Kontrolltieren nach sieben Tagen Reperfusion, $n = 4$ bis 5. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*.

3.7 Kardialer Phänotyp des adipozytenspezifischen ATGL-KO nach Myokardinfarkt

3.7.1 Absolute Herzgewichte sind durch den ATGL-KO unverändert

Der adipozytenspezifische ATGL-KO führte zu verschiedenen Veränderungen im Fettgewebe, darunter eine Zunahme der Adipozytengröße, eine verminderte Expression von Lipogenese- und Adipokin-Genen sowie eine reduzierte Konzentration von zirkulierenden NEFA und Adiponektin. Daher stellt sich die Frage, wie der adipozytenspezifische ATGL-KO den kardialen Phänotyp beeinflusst. Dazu wurde zunächst geprüft, ob das Herzgewicht durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO verändert ist. Sowohl die absoluten Herzgewichte als auch die Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio wurden basal und nach 24 Stunden, 7 und 28 Tagen Reperfusion bestimmt (Abbildung 23). Die Körpergewichte waren basal und nach 24 Stunden Reperfusion höher bzw. zeigten einen Trend zu höheren Gewichten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 7 Tagen und 28 Tagen Reperfusion wurde kein Unterschied mehr beobachtet. Die absoluten Herzgewichte zeigten zu allen Zeitpunkten keinen Unterschied, während die auf das Körpergewicht bezogenen Gewichte basal und nach 24 Stunden Reperfusion in der ATGL-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner waren und nach 7 und 28 Tagen Reperfusion einen Trend zu kleineren Gewichten zeigten (Herzgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht: basal: Kontrolle: $4,20 \pm 0,29$ mg/g, ATGL-KO: $3,96 \pm 0,21$ mg/g, 24 Stunden Reperfusion: Kontrolle: $5,08 \pm 0,31$ mg/g, ATGL-KO: $4,74 \pm 0,31$ mg/g).

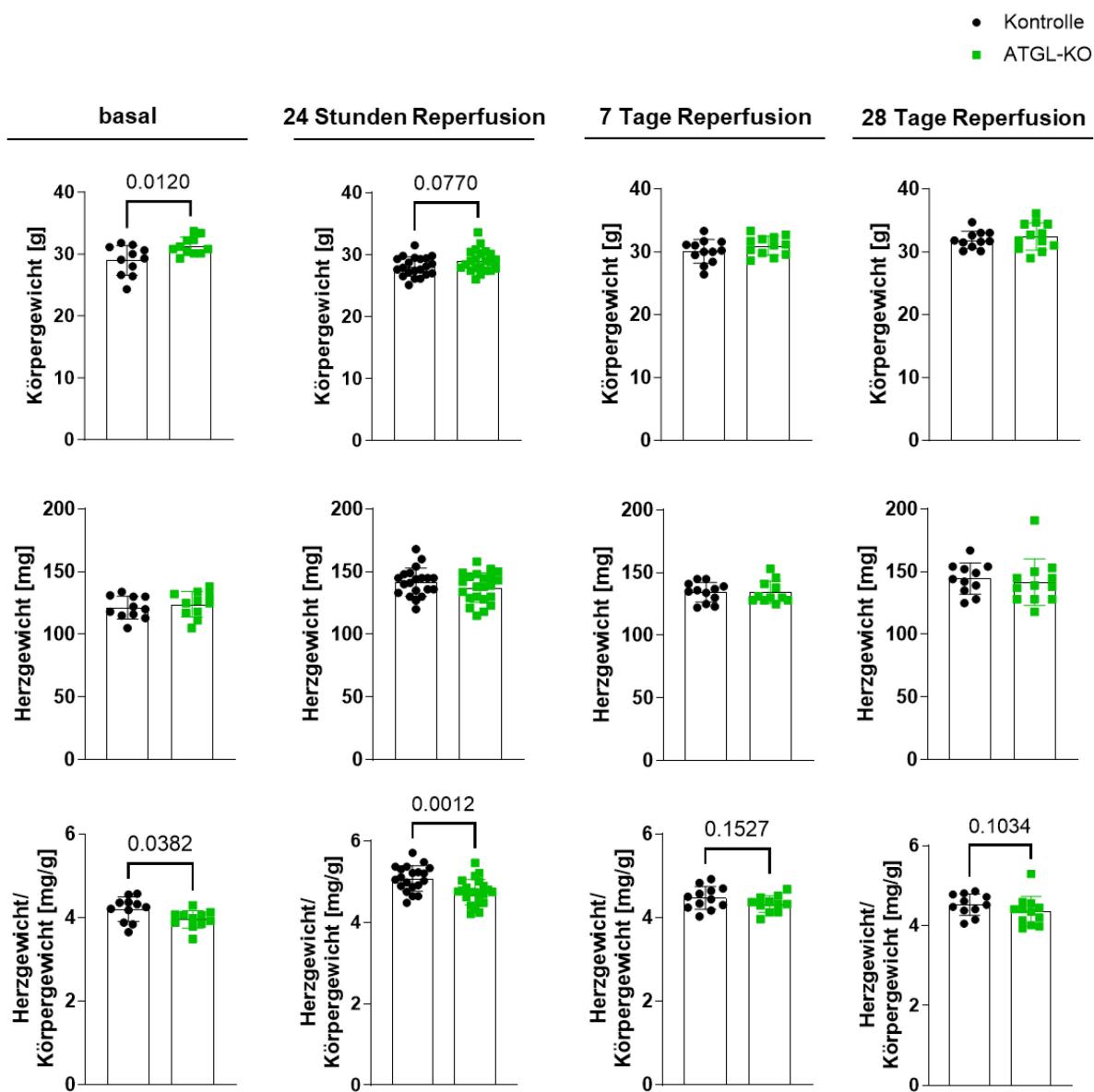


Abbildung 23: Körpergewichte und Herzgewichte von ATGL-KO- und Kontrolltieren basal und nach Myokardinfarkt

Dargestellt sind die absoluten Körpergewichte sowie die absoluten und auf das Körpergewicht bezogenen Herzgewichte von ATGL-KO und Kontrolltieren basal und nach 24 Stunden, 7 und 28 Tagen Reperfusions, $n = 11$ bis 22. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels unpaired t-test oder Mann-Whitney-Test.

3.7.2 Verminderte kardiale Funktion nach Myokardinfarkt durch den ATGL-KO

Der Einfluss der gehemmten Lipolyse durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO auf die kardiale Funktion wurde untersucht. Dazu wurden bei ATGL-KO- und Kontrolltieren echokardiographische Analysen sowohl basal als auch wöchentlich bis zu 28 Tage nach dem Myokardinfarkt durchgeführt (Abbildung 24). Parameter der systolischen Pumpfunktion und kardiale Volumina zeigten basal keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Nach dem Myokardinfarkt war die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in der ATGL-KO-Gruppe sowohl nach 7 und 28 Tagen Reperfusion als auch über den gesamten Kurvenverlauf signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Ejektionsfraktion nach 28 Tagen Reperfusion: Kontrolle: $30,1 \pm 5,6\%$, ATGL-KO: $22,1 \pm 4,9\%$). Passend dazu war auch die *fractional area change*, als weiterer Parameter für die systolische Funktion, zu den Endzeitpunkten nach 21 und 28 Tagen Reperfusion und über den gesamten Kurvenverlauf signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Funktionell schlug sich das auch in einem verringerten Schlagvolumen und Herzzeitvolumen bei unveränderter Herzfrequenz nieder. Diese Parameter waren nach 7 Tagen Reperfusion und über den gesamten Kurvenverlauf in der ATGL-KO-Gruppe geringer. Die echokardiographisch ermittelte linksventrikuläre Masse blieb unverändert. Die endsystolischen und enddiastolischen Volumina zeigten keine signifikanten Veränderungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die kardiale Funktion im basalen nicht-ischämischen Zustand unverändert ist, während sich die kardiale Dysfunktion nach einem Myokardinfarkt im Verlauf der Reperfusion aufgrund des adipozytenspezifischen ATGL-KOs verschlechtert.

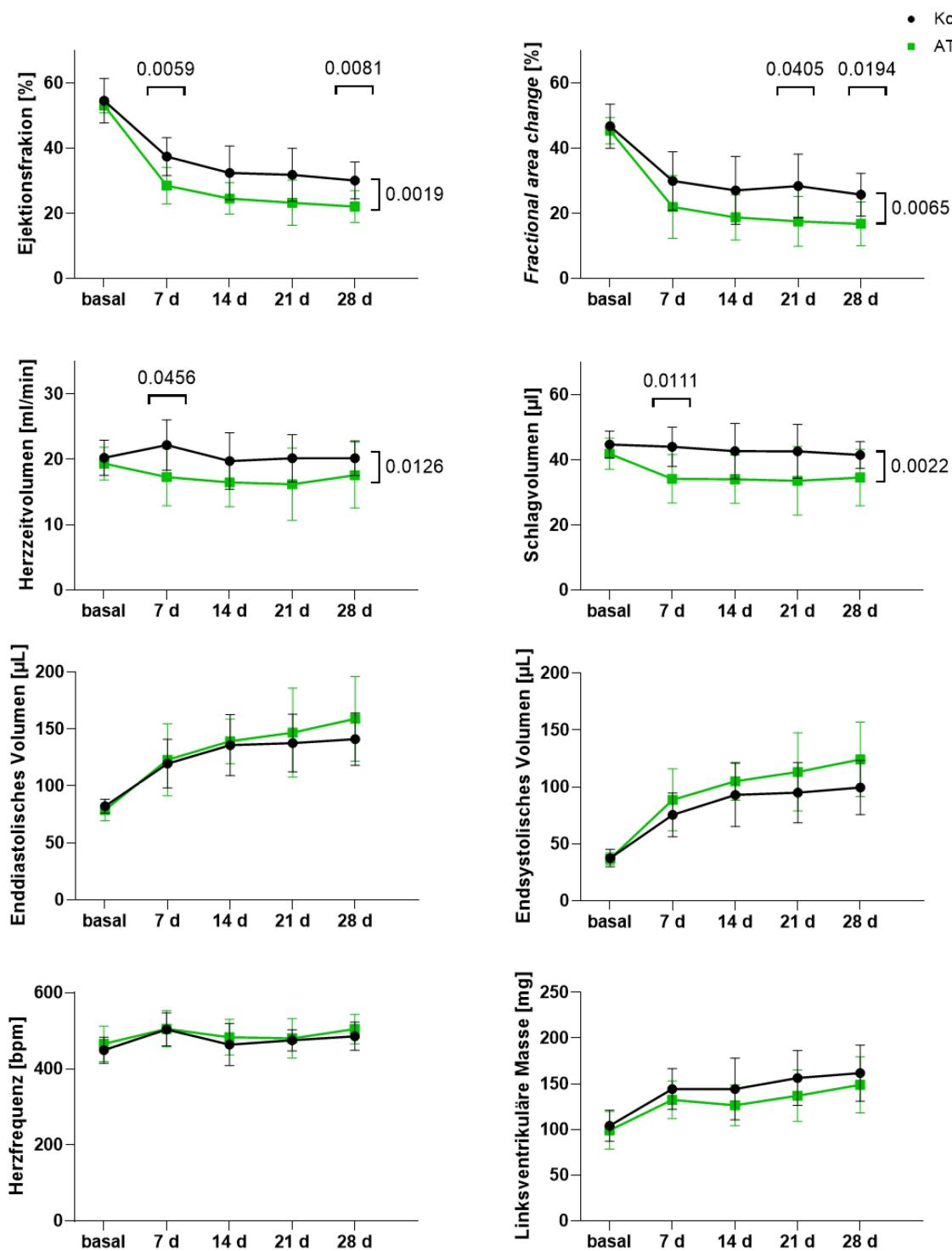


Abbildung 24: Kardiale Funktion bei ATGL-KO- und Kontrolltieren bis zu 28 Tage nach Myokardinfarkt

Echokardiographisch ermittelte kardiale Funktion der ATGL-KO- und Kontrolltiere basal und wöchentlich bis 28 Tage nach Myokardinfarkt. Ejektionsfraktion, *fractional area change*, Herzzeitvolumen, Herzfrequenz, Schlagvolumen, linksventrikuläre Masse, endsystolisches Volumen und enddiastolisches Volumen, $n = 11$ bis 12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels two-way ANOVA. Der p-Wert für den Unterschied zwischen den Genotypen ist rechts von den Zeitkurven angegeben. d: Tag.

3.7.3 Infarktgröße und Narbengröße

Ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt ist die Narbengröße. Dazu wurden die Herzen von ATGL-KO- und Kontrolltieren nach 28 Tagen Reperfusion entnommen und eine WGA-Färbung der angefertigten Herz-Kryoschnitte wurde durchgeführt (Abbildung 25 A). Die Narbengröße im Verhältnis zur Herzfläche war bei den ATGL-KO-Tieren größer als in der Kontrollgruppe, während die gesamte gemessene Herzfläche unverändert blieb (Abbildung 25 B).

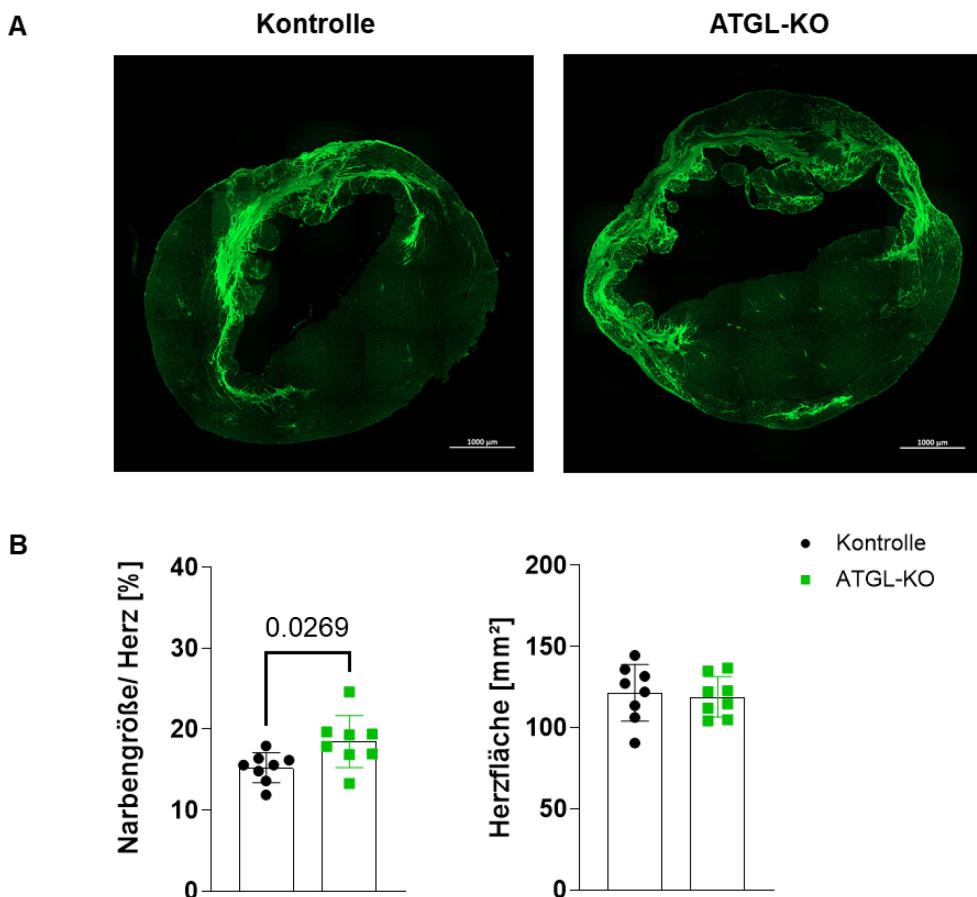


Abbildung 25: WGA-Färbung von Herz-Kryoschnitten zur Bestimmung der Narbengröße nach 28 Tagen Reperfusion

Die Narbengröße wurde anhand von mit WGA gefärbten Herz-Kryoschnitten von ATGL-KO- und Kontrolltieren bewertet. (A) Repräsentative Aufnahmen der angefärbten Narbe. (B) Narbengröße pro Herzfläche und gemessene Herzfläche, $n = 8$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*.

Um zu untersuchen, ob die größere Narbe durch eine erhöhte Infarktgröße bedingt ist, wurde die Infarktgröße nach 24 Stunden Reperfusion ermittelt. Dazu wurden Herzschnitte von ATGL-KO- und Kontrolltieren mit Evans-blau und TTC gefärbt und analysiert. Die *area at risk* (AAR), die den hypoxischen Bereich darstellt, wird durch die Evans-blau-Färbung vom nicht-ischämischen *Remote*-Bereich, der keine Perfusionsunterbrechung erlitt, abgegrenzt. Zudem werden lebensfähige und nekrotische Abschnitte der AAR durch die TTC-Färbung bestimmt. Anhand dieser Analysen und der Gewichte der Herzschnitte konnten die AAR und der Infarktbereich ermittelt werden. Bei einer vergleichbaren AAR pro linkem Ventrikel zeigte sowohl der Infarktbereich pro AAR als auch der Infarktbereich pro linkem Ventrikel keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 26), was darauf hinweist, dass die vergrößerte Nabe auf eine vermehrte Fibrosierung nach Infarkt zurückzuführen ist.

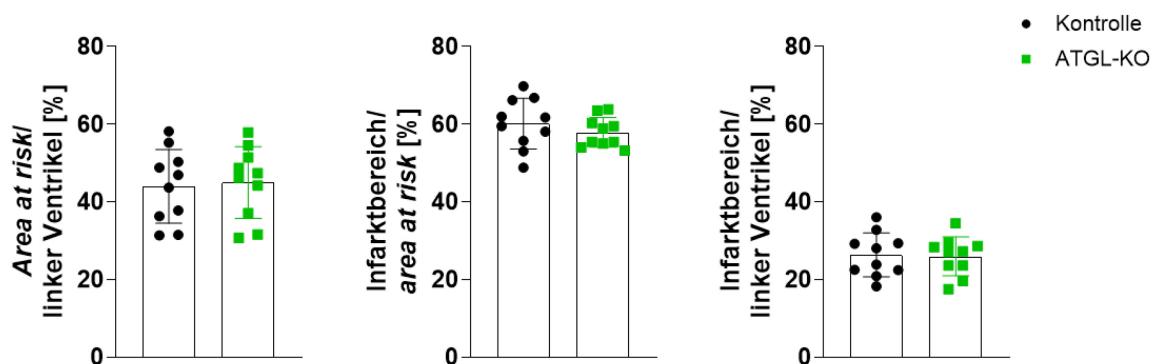


Abbildung 26: Bestimmung der Infarktgröße nach 24 Stunden Reperfusion

Die Infarktgröße wurde anhand von mit Evans-blau und TTC gefärbten Herzschnitten von ATGL-KO- und Kontrolltieren bewertet, $n = 10$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*.

3.7.4 Der ATGL-KO ist zum Zeitpunkt der letzten Versuche im Fettgewebe noch vorhanden

Adipozyten können im Rahmen der Adipogenese neu gebildet werden. Da es sich bei dem gewählten Modell um einen induzierbaren KO handelt, musste die Effizienz des ATGL-KOs zum Zeitpunkt der letzten Experimente erneut überprüft werden. Dazu wurde die Expression des Proteins ATGL und des entsprechenden Gens *Pnpla2* im inguinalen weißen Fettgewebe mittels Western Blot Analyse und qPCR gemessen. Sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionsebene war der ATGL-KO zum Zeitpunkt der letzten Versuche noch eindeutig nachweisbar (ATGL-Expression: $31,0 \pm 17,9\%$, *Pnpla2*-Expression: $45,5 \pm 7,5\%$, Abbildung 27).

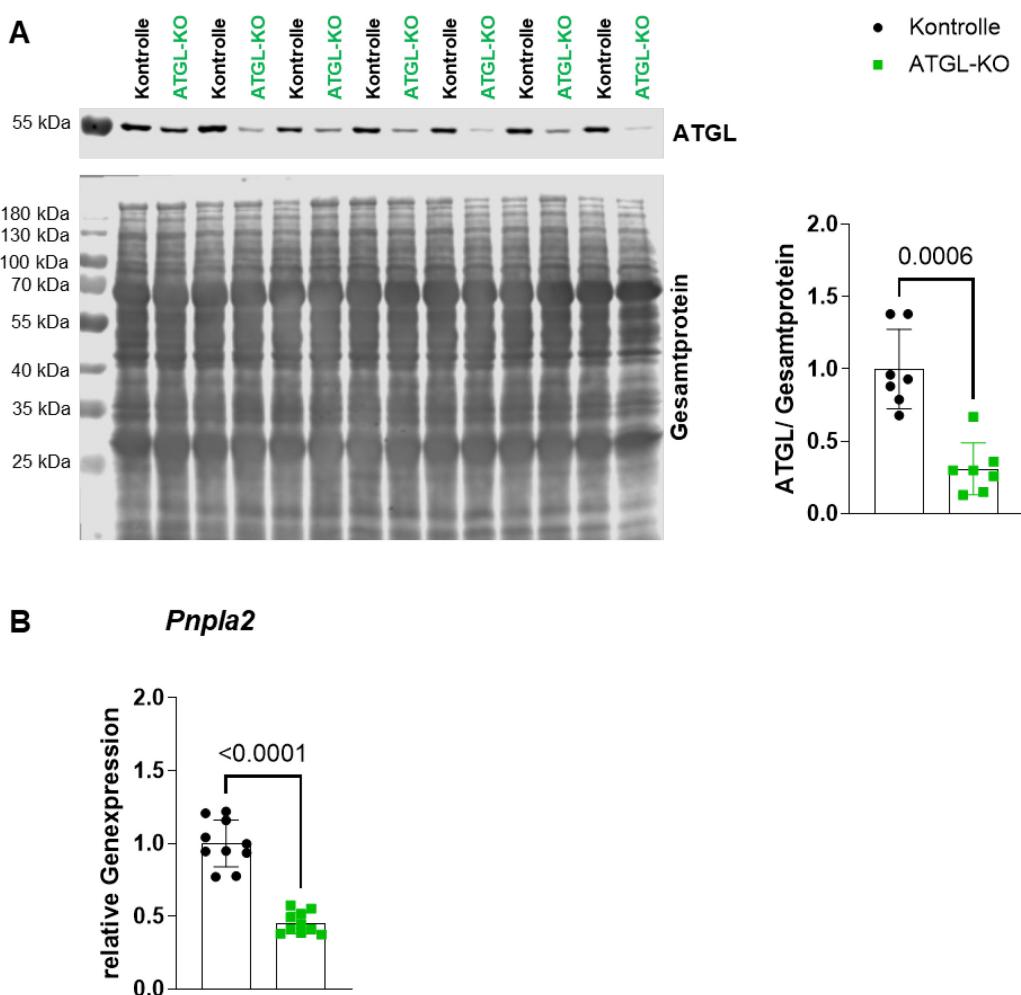


Abbildung 27: Validierung des induzierbaren ATGL-KO zum Zeitpunkt der letzten Versuche
 (A) ATGL-Proteinspiegel und (B) relative Genexpression von *Pnpla2* nach 28 Tagen Reperfusion im inguinalen weißen Fettgewebe von ATGL-KO- und Kontrolltieren. Jeder Wert wurde (A) auf den Gesamtproteingehalt oder (B) auf das Haushaltsgen und dann auf den Mittelwert der Kontrollen normalisiert, (A) $n = 7$, (B) $n = 10$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels (A) Mann-Whitney-Test, (B) unpaired *t*-test mit Welch's Korrektur.

3.8 Kardialer Substratmetabolismus im nicht-ischämischen Remote-Myokard

3.8.1 Adipozytenspezifischer ATGL-KO führt zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch und erhöhter Abhängigkeit von Glukose

Ein Myokardinfarkt führt, wie oben beschrieben, zu Veränderungen im Substratmetabolismus des Herzens. Der adipozytenspezifische ATGL-KO führt phänotypisch zu einer reduzierten linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt. Um der Frage nachzugehen, inwieweit ein veränderter Substratmetabolismus durch die Hemmung der Lipolyse und die damit verbundene reduzierte Konzentration von freien Fettsäuren durch den ATGL-KO für die schlechtere Funktion verantwortlich sein könnte, wurde der Substratmetabolismus des Herzens im *Remote*-Myokard post-Infarkt untersucht. Dazu wurden extrazelluläre Flussanalysen an intakten Herzschnitten des nicht-ischämischen *Remote*-Bereichs von ATGL-KO- und Kontrolltieren nach 24 Stunden Reperfusion durchgeführt. Die Messungen erfolgen in Medien, die BSA-gekoppeltes Palmitat (0,2 mM) und Glukose (5,5 mM) enthalten, sodass beide Substrate vom Gewebe konsumiert werden können. Durch den Zusatz der substratspezifischen Inhibitoren Etomoxir (CPT-Inhibitor) oder UK5099 (MPC-Inhibitor) konnte der Beitrag der Fettsäure- bzw. Glukoseoxidation zur mitochondrialen Oxidation ermittelt werden (Abbildung 28). Die Sauerstoffverbrauchsrate (Abbildung 29 A, B) und die Ansäuerungsrate (Abbildung 30 A, B) wurden basal, nach Zugabe des mitochondrialen Entkopplers FCCP, nach Zugabe der Inhibitoren Etomoxir oder UK5099 sowie nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A gemessen. Der Zusatz von FCCP dient der Maximierung der basalen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate, um die Wirkung der Inhibitoren besser zu erfassen. Zuletzt wurde der nicht-mitochondriale Umsatz durch Zugabe der Inhibitoren der Elektronentransportkette Rotenon und Antimycin A bestimmt und von allen Atmungszuständen subtrahiert. Sowohl die basale mitochondriale als auch die entkoppelte Sauerstoffverbrauchsrate waren nach 24 Stunden Reperfusion in der ATGL-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 29 C, D). Das Verhältnis von entkoppelter zu basaler Sauerstoffverbrauchsrate zeigte einen abnehmenden Trend, während die Kapazitätsreserven unverändert blieben (Abbildung 29 E, F). Die basale extrazelluläre Ansäuerungsrate war nicht signifikant verändert (Abbildung 30 C). Die CPT-Hemmung mit Etomoxir zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, weder in der Sauerstoffverbrauchsrate (Abbildung 29 G) noch in der Ansäuerungsrate (Abbildung 30 D). Hingegen führte die MPC-Hemmung mit UK5099 in der ATGL-KO-Gruppe zu höheren

Abnahme der absoluten Sauerstoffverbrauchsrate und einem Trend zu höheren Abnahme der prozentualen Sauerstoffverbrauchsrate bezogen auf die entkoppelten Sauerstoffverbrauchsrate (Abbildung 29 H). Außerdem waren die höchsten absoluten Ansäuerungsraten nach der MPC-Hemmung in der ATGL-KO-Gruppe erhöht (Abbildung 30 E). Dies zeigt zusammen mit einer höheren Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate nach MPC-Hemmung, dass der ATGL-KO zu einer stärkeren Substratabhängigkeit von Glukose nach 60 Minuten Ischämie und 24h Reperfusion führt.

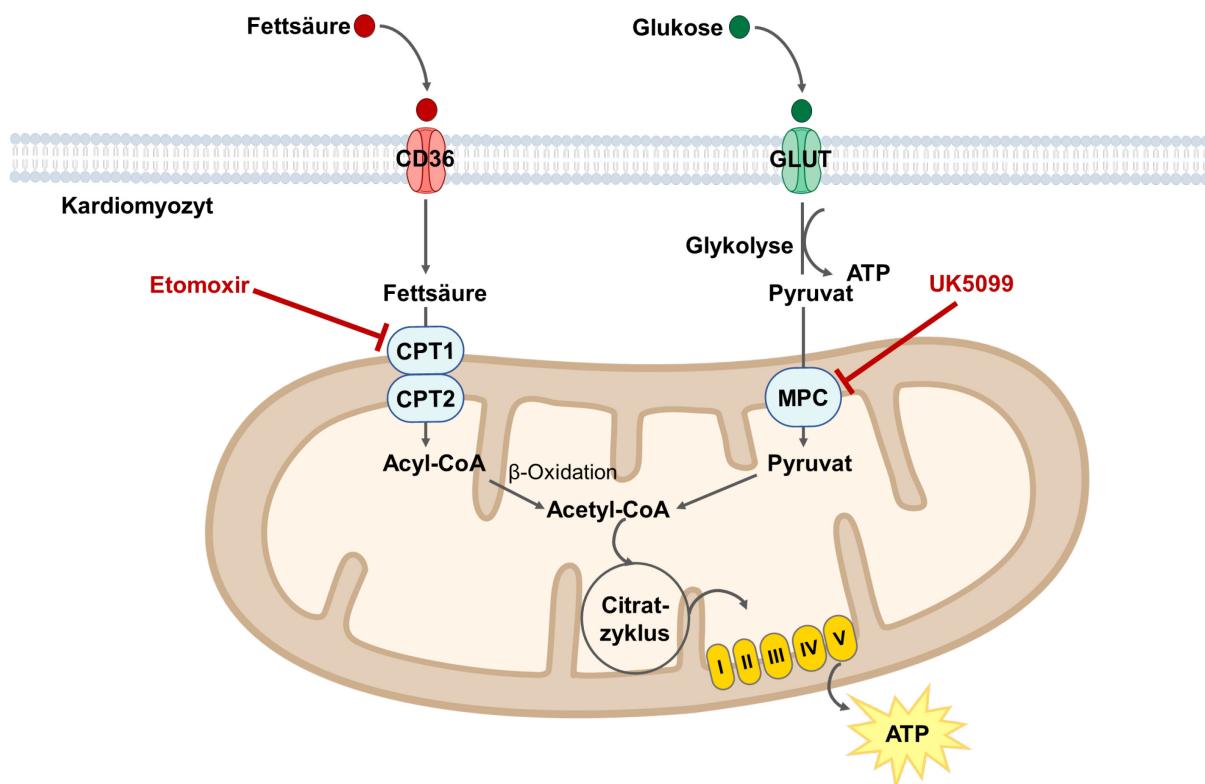


Abbildung 28: Inhibition des kardialen Metabolismus durch Etomoxir oder UK5099

Der kardiale Metabolismus wurde durch die Zugabe der substratspezifischen Inhibitoren untersucht. Die Aufnahme von Fettsäuren in die Mitochondrien wurde durch den CPT-Inhibitor Etomoxir gehemmt. Durch die Zugabe des MPC-Inhibititors UK5099 wurde die Aufnahme von Glukose in die Mitochondrien verhindert. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

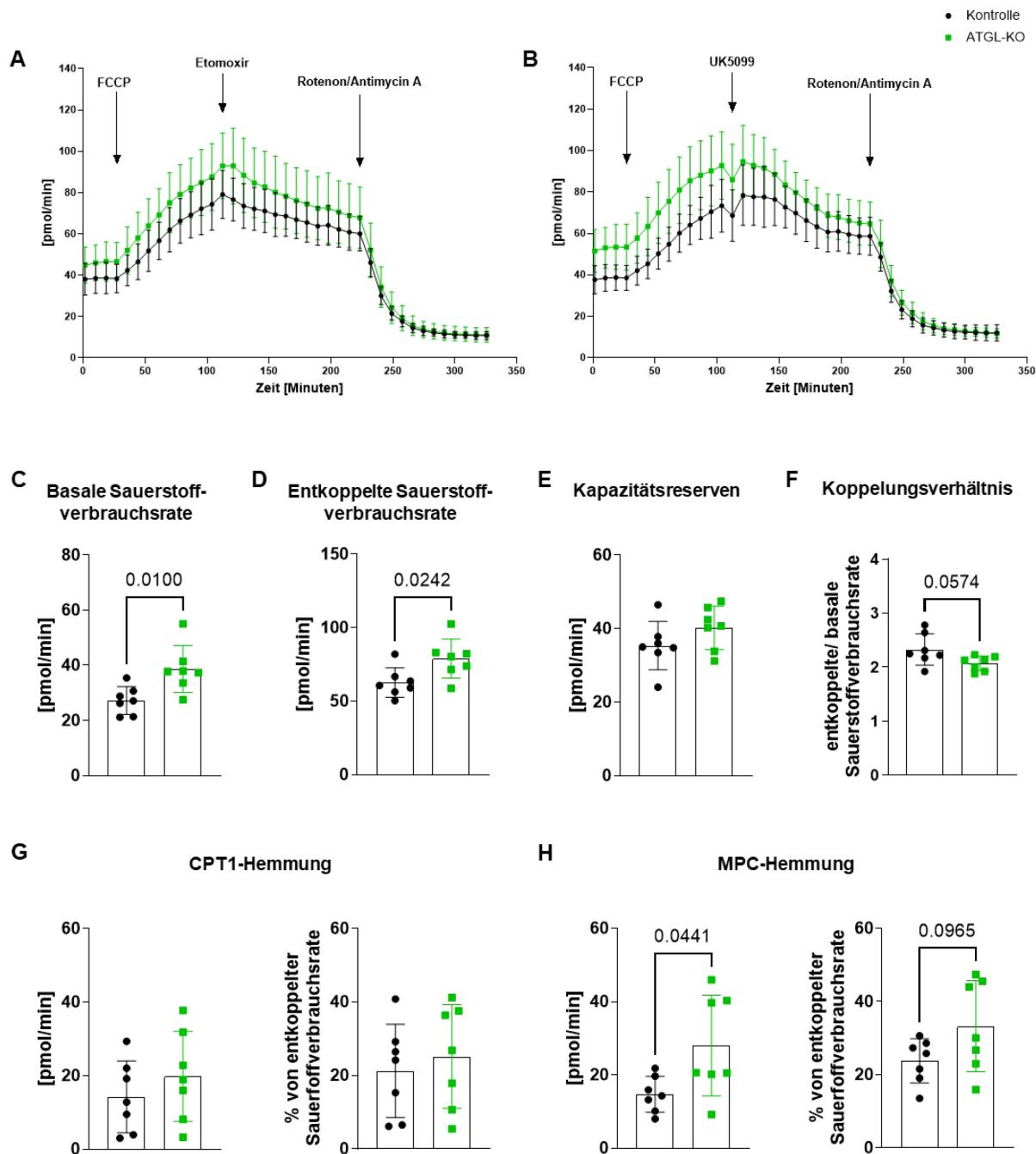


Abbildung 29: Extrazelluläre Flussanalyse des Sauerstoffverbrauchs im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens

Sauerstoffverbrauchsrate des nicht-ischämischen Septums nach 24 h Reperfusion. (A, B) Mittelwerte der Versuchsverläufe basal und nach Zugabe von FCCP, Etomoxir oder UK5099 und Rotenon/Antimycin A, dargestellt durch Pfeile. (C) Basale und (D) entkoppelte Sauerstoffverbrauchsrate, (E) Kapazitätsreserven, (F) Koppelungsverhältnis, die Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate nach (G) CPT1-Hemmung und nach (H) MPC-Hemmung, jeweils absolut und in Prozent von der entkoppelten Sauerstoffverbrauchsrate, $n = 7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test* oder *unpaired t-test* mit Welch's Korrektur.

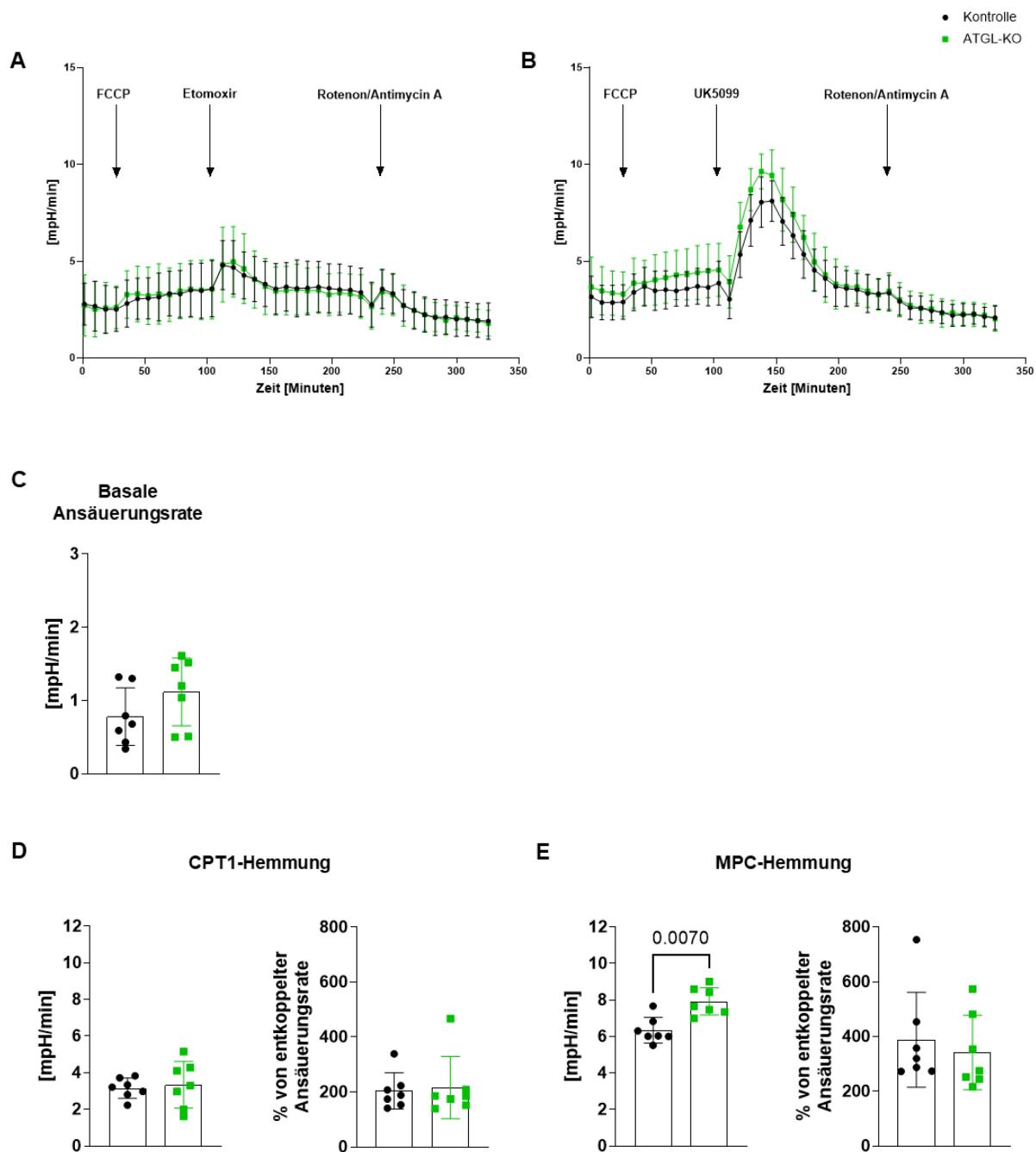


Abbildung 30: Extrazelluläre Flussanalyse der Ansäuerungsrate im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens

Extrazelluläre Ansäuerungsrate des nicht-ischämischen Septums nach 24 h Reperfusion. (A, B) Mittelwerte der Versuchsverläufe basal und nach Zugabe von FCCP, Etomoxir oder UK5099 und Rotenon/ Antimycin A, dargestellt durch Pfeile. (C) Basale Ansäuerungsrate sowie die Wirkung der (D) CPT1-Hemmung und der (E) MPC-Hemmung, jeweils die höchste absolute Ansäuerungsrate und in Prozent von der entkoppelten Ansäuerungsrate, $n = 7$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test* oder Mann-Whitney-Test.

3.8.2 Erhöhte Expression von Genen, die am Fettsäuremetabolismus und Glukosemetabolismus beteiligt sind

Um die Befunde der veränderten Substratpräferenz auf molekularer Ebene zu analysieren, wurde die Genexpression von Enzymen, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind, gemessen. Die Messungen wurden an Proben aus dem nicht-ischämischen *Remote*-Bereich des Herzens nach 24 Stunden und 7 Tagen Reperfusion durchgeführt. Außerdem wurde die Genexpression von *Pnpla2* in den nach 24 Stunden Reperfusion gewonnenen Proben gemessen. Die *Pnpla2*-Werte waren zwischen den beiden Gruppen unverändert (Abbildung 31). Somit konnte sichergestellt werden, dass der adipozytenspezifische KO keinen Einfluss auf die ATGL im Herzen hatte. Nach 24 Stunden Reperfusion war die relative Genexpression von Genen, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind wie *Cd36*, *Cpt2*, *Ech1* und *Ndufab1* in der ATGL-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, während *Cpt1b*, *Fabp3* und *Acadm* unverändert blieben (Abbildung 32 A). Nach 7 Tagen Reperfusion zeigte die relative Genexpression all dieser Gene keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 32 B). Zusätzlich zu den Genen, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind, wurde die Genexpression von Genen untersucht, die am Glukosemetabolismus beteiligt sind. Im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich des Herzens war die relative Genexpression von *Slc2a4*, *Mpc1* und *Mpc2* nach 24 Stunden Reperfusion in der ATGL-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert (Abbildung 33 A). Nach 7 Tagen Reperfusion wurde kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen beobachtet (Abbildung 33 B). Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulierung der am Fettsäuremetabolismus und Glukosemetabolismus beteiligten Gene nur akut nach dem Myokardinfarkt stattfindet (Abbildung 34).

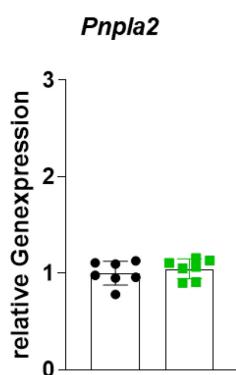


Abbildung 31: Genexpression von *Pnpla2* im Herzen

Relative Genexpression von *Pnpla2* im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich des Herzens nach 24 Stunden Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren, normalisiert auf das Haushaltsgen *Nudc* und bezogen auf die Kontrolle, n = 7. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, getestet mittels *unpaired t-test*.

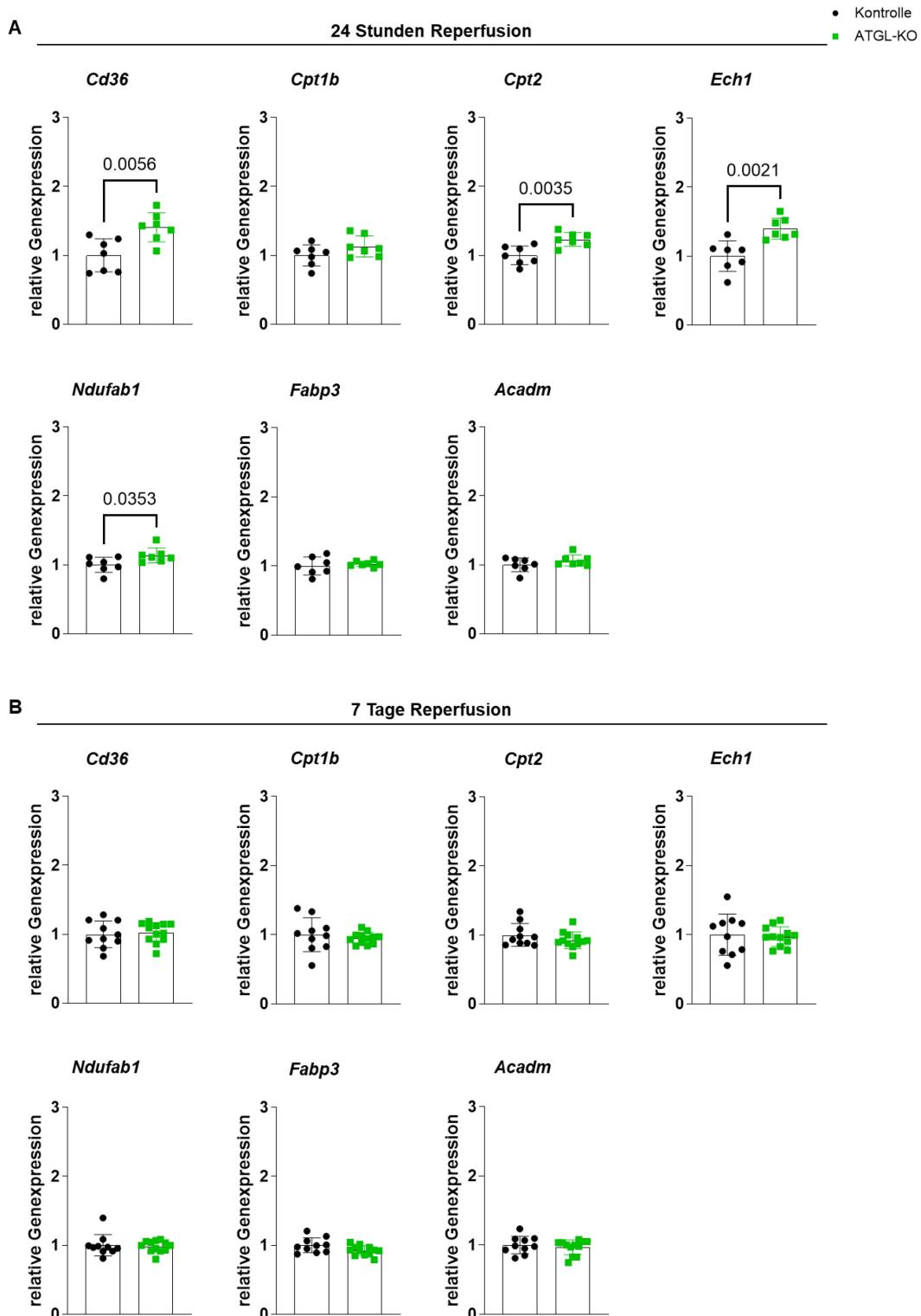


Abbildung 32: Genexpression der am Fettsäuremetabolismus beteiligten Gene im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens

Relative Genexpression von *Cd36*, *Cpt1b*, *Cpt2*, *Ech1*, *Ndufab1*, *Fabp3* und *Acadm* im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens nach 60 Minuten Ischämie und (A) 24 Stunden oder (B) 7 Tagen Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren, normalisiert auf das Haushaltsgen *Nudc* und bezogen auf die Kontrolle, (A) n = 7, (B) n = 10 bis 12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test*, Mann-Whitney-Test oder *unpaired t-test* mit Welch's Korrektur.

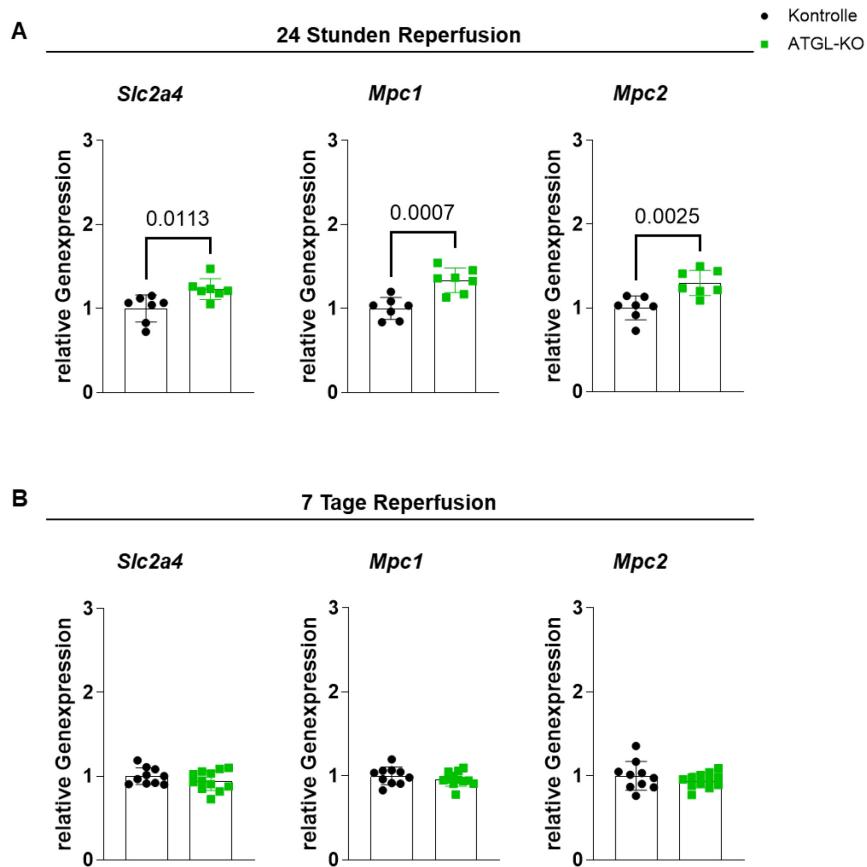


Abbildung 33: Genexpression der am Glukosemetabolismus beteiligten Gene im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens

Relative Genexpression von *Slc2a4*, *Mpc1* und *Mpc2* im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich des Herzens nach (A) 24 Stunden und (B) 7 Tagen Reperfusion in ATGL-KO- und Kontrolltieren, normalisiert auf das Haushaltsgen *Nudc* und bezogen auf die Kontrolle, (A) n = 7, (B) n = 10 bis 12. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, getestet mittels *unpaired t-test* oder *unpaired t-test* mit Welch's Korrektur.

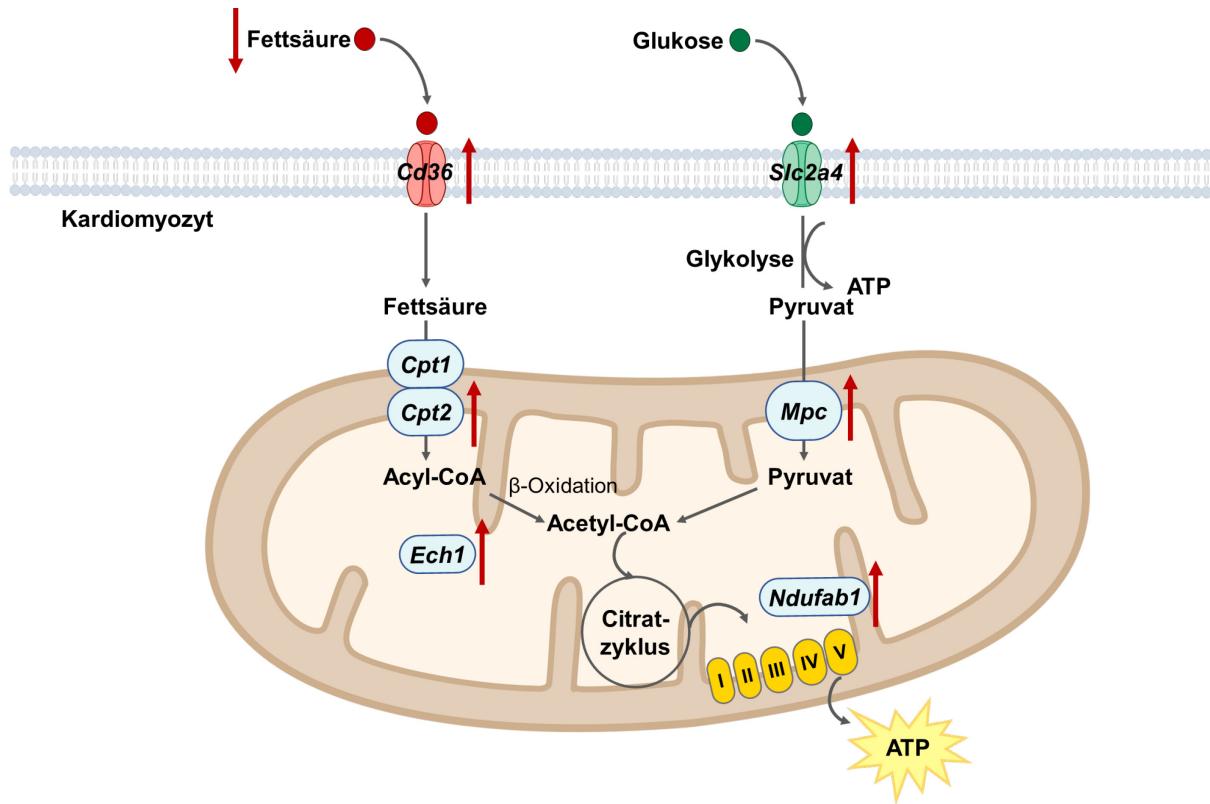


Abbildung 34: Schematische Darstellung der veränderten Genexpression im nicht-ischämischen Remote-Bereich des Herzens

Veränderung der Genexpression von am Fettsäure- und Glukosemetabolismus beteiligten Gene im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich des Herzens nach 24 Stunden Reperfusion von ATGL-KO-Tieren. Die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung modifizierter Elemente von Servier Medical Art erstellt, lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Lipolyse durch die adipozytenspezifische ATGL im Rahmen des Myokardinfarkts in männlichen Mäusen untersucht. Zunächst führte die experimentelle Induktion einer Myokardischämie in C57BL/6J-Mäusen während der frühen Reperfusion zu einer Aktivierung der Lipolyse, die sich in (1) erhöhten zirkulierenden NEFA-Konzentrationen und (2) einer verstärkten Phosphorylierung von PKA-Substraten und insbesondere von der HSL im inguinalen weißen Fettgewebe zeigte.

Die genetische Hemmung der Lipolyse durch den Tamoxifen-induzierbaren adipozytenspezifischen ATGL-KO im Rahmen der Myokardischämie führte (1) zu einer Verschlechterung der kardialen Dysfunktion und einer Vergrößerung der Narbe, (2) zu verminderten zirkulierenden NEFA- und Adiponektin-Spiegeln und (3) zu einer Modulation des kardialen Substratmetabolismus im *Remote*-Myokard, die sich in einer erhöhten Abhängigkeit von Glukose und einer Hochregulierung von Genen, die am Glukose- und Fettsäuremetabolismus beteiligt sind, zeigte.

4.1 Aktivierung der Lipolyse durch den Myokardinfarkt

Ischämische Herzkrankheiten gehören zu den weltweit führenden Todesursachen.² Der wechselseitige Einfluss von Lipolyse und Myokardinfarkt zwischen den beteiligten Organen, dem Fettgewebe und dem Herzen, wurde vielfach vermutet,⁹³ ist jedoch in den molekularen Zusammenhängen weitestgehend unerforscht. Um diese Zusammenhänge näher zu untersuchen, wurde im murinen Modell experimentell eine Myokardischämie durch ein zweistufiges *closed-chest model* induziert. Diese Methode, bei der die Eröffnung des Thorax und die Induktion der Myokardischämie getrennt voneinander durchgeführt werden, soll ein größeres Trauma durch einen einzigen großen Eingriff vermeiden und physiologisch einem klinischen Myokardinfarkt mehr ähneln. Außerdem wird durch den zeitlichen Abstand eine Erholung der betroffenen Tiere ermöglicht. Es ist bekannt, dass Traumata und Blutverlust die Lipolyse beeinflussen, da ein Modell des hämorrhagischen Schocks zu einer adipozytären Lipolyse führt, die sich in einem Anstieg der zirkulierenden Glycerol-Spiegel zeigt.⁹⁴ Deshalb war es umso wichtiger, dass der Einfluss der chirurgischen Eingriffe auf die untersuchte Lipolyse durch das zweistufige Verfahren möglichst gering gehalten wird.

Es gibt bei Myokardinfarkten deutliche Unterschiede in den Heilungsprozessen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Männliche Mäuse zeigen nach experimenteller Induktion einer Myokardischämie eine höhere Rate an Herzrupturen und nach Entwicklung einer

Herzinsuffizienz eine schlechtere kardiale Funktion im Vergleich zu weiblichen Mäusen.⁹⁵ Es wird angenommen, dass Östrogen eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System spielt.⁹⁶ Zudem gibt es weitere Unterschiede wie höhere Adiponektin-Spiegel in weiblichen Mäusen.⁹⁷ Deshalb sollen Mäuse des gleichen Geschlechts eingesetzt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Tiere innerhalb der Experimente zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur männliche Mäuse verwendet, um die Anzahl der Tiere zu reduzieren. Die Nutzung von weiblichen Mäusen hätte in einer eigenen Gruppe erfolgen müssen.

Nach Induktion der Myokardischämie wurde zunächst in C57BL/6J-Mäusen untersucht, ob die Lipolyse dadurch aktiviert wird. Da im Rahmen der Lipolyse Triglyceride zu NEFA und Glycerol hydrolysiert werden, wurden die zirkulierenden NEFA-Konzentrationen als Produkt der Lipolyse gemessen. Als Kontrollgruppe dienten scheinoperierte Mäuse, die unter den gleichen Bedingungen wie die Ischämie-Gruppe behandelt wurden, mit dem einzigen Unterschied, dass die Fadenenden keinem Zug ausgesetzt wurden und somit die Durchblutung im Herzen nicht unterbrochen wurde. Auf diese Weise konnten Effekte, die durch die Anästhesie und die chirurgischen Schritte hervorgerufen wurden, von den Effekten, die durch die Myokardischämie verursacht wurden, unterschieden werden. Die gemessenen NEFA-Werte nach 30 Minuten Reperfusion waren im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Basalwert erhöht. Der Anstieg in der Kontrollgruppe nach 30 Minuten kann durch die ebenfalls erfolgte Anästhesie erklärt werden. Somit bestätigten die durchgeführten Messungen, dass die Erhöhung der zirkulierenden NEFA-Werte und somit auch die Aktivierung der Lipolyse durch das beschriebene Protokoll zur Induktion der Myokardischämie stattfinden. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Konzentration der zirkulierenden freien Fettsäuren in den ersten Stunden nach einem Myokardinfarkt bei Patienten ansteigt.^{83,98} Auch im murinen Modell kommt es zu diesem Anstieg.⁸⁴

Zusätzlich zu der NEFA-Analyse in der Zirkulation wurde die Aktivierung der Lipolyse im subkutanen und viszeralen weißen Fettgewebe untersucht. Als subkutanes Fettgewebe wurde das inguinale Depot und als viszerales das gonadale Depot untersucht. Bei der Stimulation der Lipolyse werden Gs-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert, was zur Aktivierung der PKA führt. Diese phosphoryliert nachgeschaltete Ziele, darunter die HSL,⁹⁹ die für die Hydrolyse von Diglyceriden zu Monoglyceriden und freien Fettsäuren verantwortlich ist und somit den zweiten Schritt der Fettsäurefreisetzung in der Lipolyse reguliert.⁵⁸ Die phosphorylierten PKA-Substrate und spezifisch die phosphorylierten HSL wurden im Fettgewebe mittels Western Blot Analysen untersucht. Dabei war der Gehalt an phosphorylierten PKA-Substraten und phosphorylierten HSL nach 30 Minuten Reperfusion im inguinalen Fettgewebe im Vergleich

zur scheinoperierten Kontrollgruppe erhöht. Im gonadalen Fettgewebe wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipolyse im subkutanen weißen Fettgewebe während der Reperfusion stärker aktiviert wird als im viszeralen weißen Fettgewebe. Dies geht einher mit Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass eine Myokardischämie im murinen Modell zu Veränderungen im subkutanen, aber kaum im viszeralen weißen Fettgewebe führt, wie einer Abnahme der Adipozytengröße, einer Herunterregulierung von Adipokin-kodierenden Genen und einer vermehrten Infiltration von Makrophagen.⁸⁸ In einer weiteren Studie wurde die mitochondriale Kapazität von weißem Fettgewebe ebenfalls in einem murinen Modell untersucht. Dabei zeigen subkutane Adipozyten eine höhere respiratorische Kapazität im Vergleich zu viszeralen Adipozyten, was auf einen höheren Gehalt an mitochondrialer Atmungskette zurückzuführen ist.¹⁰⁰ Somit könnte die stärkere Reaktion des subkutanen Fettgewebes nach Myokardischämie auf seine höhere metabolische Aktivität im Vergleich zum viszeralen Fettgewebe zurückzuführen sein. Eine Untersuchung hat gezeigt, dass mehr als 90 % der Adipozyten im murinen inguinalen weißen Fettgewebe von sympathischen Fasern umgeben sind.¹⁰¹ Diese dichte Innervation könnte ebenfalls eine Ursache sein.

4.2 ATGL-KO zur Hemmung der Lipolyse

Mit der Erkenntnis, dass die Lipolyse durch die Induktion der Myokardischämie aktiviert wird, stellt sich die Frage, inwieweit eine Hemmung der Lipolyse die Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde eine Mauslinie mit einem adipozytenspezifischen, Tamoxifen-induzierbaren ATGL-KO generiert und im Infarktmodell untersucht. Das Enzym ATGL ist für die Hydrolyse von Triglyceriden zu Diglyceriden und freien Fettsäuren verantwortlich und somit für den initialen Schritt in der Kaskade der Lipolyse entscheidend.⁶⁴ Die Reduktion der Lipolyse durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO ist in der Literatur bereits beschrieben.^{75,76,102} Zur Erzeugung der ATGL-KO-Mauslinie wurde das Cre/loxP-System verwendet. Dabei wurden ATGL-flox-Mäuse, bei denen das ATGL-exprimierende *Pnpla2*-Gen vor Exon 2 und hinter Exon 7 mit loxP-Sequenzen flankiert ist, mit Mäusen gekreuzt, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem adipozytenspezifischen *Adipoq*-Promotor exprimieren. Dies ermöglicht die gezielte Induktion des ATGL-KOs ausschließlich in Adipozyten und nur nach der Gabe von 4-Hydroxytamoxifen, welches die Cre-Rekombinase aktiviert. Das Enzym ATGL wird in verschiedenen Organen exprimiert.⁷⁰ Daher war es wichtig, dass der ATGL-KO nur in Adipozyten induziert wird, um spezifische Aussagen darüber treffen zu können, wie die adipozytenspezifische Hemmung der

Lipolyse den Myokardinfarkt beeinflusst. Außerdem würde ein globaler ATGL-KO zu belastenden Fettakkumulationen im Herzen führen, die kardiale Dysfunktion und Tod zur Folge haben können.⁷² Ein angeborener adipozytenspezifischer ATGL-KO wurde nicht verwendet, damit die durch den KO verursachten Veränderungen möglichst kurzfristig und nicht vorzeitig auftreten. Die Spezifität der Cre-vermittelten Rekombination unter dem *Adipoq*-Promotor wurde in verschiedenen Organen wie Leber, Pankreas, Darm, Niere, Lunge, Skelettmuskulatur, Herz, Thymus, Milz und Gehirn untersucht und ausschließlich im Fettgewebe beobachtet.⁹⁰ Diese Aussage ist von Bedeutung, da andere Modelle, die den *aP2*-Promotor zur Erzeugung eines adipozytenspezifischen KOs verwenden, eine Genexpression auch in Nicht-Adipozyten zeigen.¹⁰³

Als Kontrollgruppe wurden Mäuse mit dem Genotyp *Adipoq-CreERT2*^{wt/wt}/*ATGL*^{flox/flox} verwendet. Der ATGL-flox ist in allen Tieren, auch in der Kontrollgruppe, vorhanden, so dass diese Gruppe keine reine Wildtyp-Gruppe ist, sondern eine spezifische Kontrolle für die verwendete Linie darstellt. Es war wichtig, dass beide Gruppen mit 4-Hydroxytamoxifen behandelt wurden, um sicherzustellen, dass die dadurch verursachten Nebeneffekte in beiden Gruppen möglichst gleich ausfallen. Dies ist besonders relevant, da eine Behandlung mit Tamoxifen Veränderungen im Fettgewebe verursachen kann, unter anderem *browning*-Effekte, erhöhte UCP1-Expression und Veränderungen der Adipozytengrößenverteilung.¹⁰⁴ Nach der siebentägigen intraperitonealen Injektion von 4-Hydroxytamoxifen wurde eine zweiwöchige Auswaschphase durchgeführt, um das 4-Hydroxytamoxifen vor der Fortsetzung der Experimente aus dem Körper zu entfernen. Dadurch werden unerwünschte Effekte minimiert und es wird weitestgehend sichergestellt, dass die beobachteten Effekte auf die genetische Modifikation und nicht auf das synthetische Steroid zurückzuführen sind.

Die KO-Effizienz wurde in den beiden untersuchten Depots des weißen Fettgewebes analysiert. Die Western Blot Analyse zeigte, dass das ATGL-Protein sowohl im inguinalen als auch im gonadalen weißen Fettgewebe durch die Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen in *CreERT2*-positiven Mäusen erfolgreich herunterreguliert wurde, jedoch nicht in *CreERT2*-negativen Mäusen. Adipozyten unterliegen einem *Turnover* (Zellaustausch), bei dem reife Adipozyten absterben und durch neue Adipozyten ersetzt werden. Beim Menschen werden jährlich etwa 10 % der vorhandenen Adipozyten erneuert, während bei Mäusen täglich 1 bis 5 % der Adipozyten ausgetauscht werden.^{105,106} Aufgrund dieser Regeneration wurde die KO-Effizienz zum Zeitpunkt der letzten Experimente erneut überprüft. Auch hier war sowohl das ATGL-Protein als auch sein exprimierendes Gen *Pnpla2* im Fettgewebe weiterhin signifikant unterdrückt.

Nach erfolgreicher KO-Induktion wurde in einem Vorversuch die funktionelle Wirkung des ATGL-KOs auf die Hemmung der Lipolyse *in vivo* untersucht. Dafür sollte die Lipolyse mit dem β_3 -Adrenozeptor-Agonisten CL-316,243 stimuliert und die Lipolyseaktivität durch die Messung der NEFA-Konzentrationen als Produkt der Lipolyse ermittelt werden. CL-316,243 besitzt eine hohe Selektivität für β_3 -Adrenozeptoren und kann die Lipolyse aktivieren, was zu erhöhten Glycerol- und NEFA-Spiegeln führt.¹⁰⁷ In dieser Studie wurde die Lipolyse durch die Verabreichung von CL-316,243 stimuliert, was sich in einem Anstieg der NEFA-Werte widerspiegeln. Die NEFA-Werte waren in der ATGL-KO-Gruppe sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch 30 Minuten nach der Gabe von CL-316,243 niedriger als in der Kontrollgruppe. Damit konnte gezeigt werden, dass der ATGL-KO seine funktionelle Wirkung durch Hemmung der Lipolyse nicht nur im physiologischen Zustand, sondern auch nach spezifischer Stimulation erfüllt.

4.3 Hemmung der Lipolyse durch den ATGL-KO ruft Veränderungen im weißen Fettgewebe hervor

Studien haben gezeigt, dass ein adipozytenspezifischer ATGL-KO zu einem erhöhten Körperfettanteil führt.^{102,108} Es gibt jedoch unterschiedliche Beobachtungen darüber, welches Fettgewebe von einer Gewichtszunahme betroffen ist. Sowohl induzierbare als auch angeborene adipozytenspezifische ATGL-KO-Linien, die unter dem gleichen Promotor wie in dieser Arbeit generiert wurden, weisen eine Gewichtszunahme im weißen inguinalen und braunen Fettgewebe, jedoch nicht im weißen gonadalen Fettgewebe auf.^{109,110} In der vorliegenden Untersuchung zeigte die 4-Hydroxytamoxifen-vermittelte Induktion des adipozytenspezifischen ATGL-KOs ebenfalls einen deutlichen Phänotyp im braunen und weißen inguinalen Fettgewebe. Diese waren makroskopisch deutlich vergrößert, während das gonadale Fettgewebe nicht sichtbar verändert war, was darauf schließen lässt, dass sich der induzierbare adipozytenspezifische ATGL-KO im weißen inguinalen und braunen Fettgewebe stärker manifestiert als im weißen gonadalen Fettgewebe. Dementsprechend waren auch die Gewichte der verschiedenen Fettgewebe durch eine vermehrte Akkumulation von Triglyceriden verändert. So waren die Gewichte des braunen und des inguinalen weißen Fettgewebes im Verhältnis zum Körpergewicht basal vor Induktion der Myokardischämie und nach 24 Stunden, 7 und 28 Tage Reperfusion höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung des ATGL-Knockouts für die Regulation der Fettgewebsmasse. Interessanterweise war das Gewicht des gonadalen weißen Fettgewebes nur zu Beginn der Reperfusion nach 24 Stunden und 7 Tagen höher, jedoch basal und nach

28 Tage Reperfusion unverändert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Masse des gonadalen weißen Fettgewebes aufgrund der Myokardischämie in der Kontrollgruppe während der ersten Phase der Reperfusion im Vergleich zu der ATGL-KO-Gruppe abnimmt. Zusätzlich zu den Gewichtsmessungen wurden nach 7 Tagen Reperfusion mikroskopische Analysen zur Untersuchung der Adipozytengröße durchgeführt. Dabei zeigte sich im inguinalen weißen Fettgewebe eine höhere mittlere Adipozytengröße, während im gonadalen weißen Fettgewebe nur ein Trend zu einer höheren mittleren Adipozytengröße beobachtet wurde. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass die Effekte des ATGL-KOs im inguinalen weißen Fettgewebe stärker ausgeprägt sind als im gonadalen, oder daran liegen, dass die beobachtete stärkere Aktivierung der Lipolyse im inguinalen weißen Fettgewebe im Vergleich zum gonadalen dazu führt, dass die Adipozytengröße in der Kontrollgruppe kleiner ist, während die gehemmte Lipolyse in der ATGL-KO-Gruppe zu größeren Adipozyten führt.

Der ATGL-KO hemmt die Lipolyse und beeinflusst somit den Lipidmetabolismus. Daher wurde untersucht, ob dies auch die Lipidsynthese im weißen Fettgewebe während der Reperfusion beeinträchtigt. Es zeigte sich, dass die relative Genexpression des wichtigen Transkriptionsregulators *Srebp1c* herunterreguliert war. Dies wurde in adipozytenspezifische ATGL-KO-Mäuse und in ATGL-KO-Mäuse, die ATGL ausschließlich in Kardiomyozyten exprimieren, unter Hochfettdiät, ebenfalls beobachtet.^{75,111} Auch die Genexpression des *Pparg*-Zielgens, *Dgat2*, welches den letzten Schritt der Triglyceridsynthese durch die Umwandlung von Diglyceriden und Acyl-CoA in Triglyceride katalysiert,¹¹² war reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Fehlen von ATGL nicht nur die Lipolyse, sondern auch die Lipogenese verringert, was möglicherweise als Schutzmechanismus gegen übermäßige Fettakkumulation und als Kompensationsmechanismus für die reduzierte Freisetzung von Fettsäuren dienen könnte.

Eine Forschungsgruppe hat Adipokine im adipozytenspezifischen ATGL-KO-Modell untersucht und festgestellt, dass die Genexpressionsspiegel von *Lep* im weißen Fettgewebe bei KO-Mäusen zu Beginn des Fastens niedriger sind als in der Kontrollgruppe und nach längerem Fasten ansteigen, während die Kontrollgruppe ein umgekehrtes Verhalten zeigt. Zudem sind die *Adipoq*-Spiegel zu Beginn des Fastens in der ATGL-KO-Gruppe ebenfalls niedriger als in der Kontrollgruppe und sinken nach längerem Fasten weiter. Auch in der Zirkulation ist die Konzentration von Leptin durch den ATGL-KO nach kürzerem Fasten niedriger und nach längerem Fasten höher als in der Kontrollgruppe, während das zirkulierende Adiponektin in beiden Fastenperioden in der ATGL-KO-Gruppe niedriger bleibt.¹⁰² Daraus lässt sich schließen, dass der ATGL-KO die Regulierung der Adipokine

beeinflusst. Auch hier wurde die endokrine Funktion des Fettgewebes durch den ATGL-KO beeinflusst. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf dem Einfluss der adipozytenspezifischen ATGL auf die Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt. Daher wurden Adipokine untersucht, die bei kardiovaskulären Erkrankungen eine Rolle spielen, darunter Adiponektin und Leptin.¹¹³ Die relative Genexpression von *Adipoq* war unabhängig von der Reperfusionsdauer im inguinalen weißen Fettgewebe herunterreguliert. Obwohl die mRNA-Spiegel von *Lep* mit der Adipozytentgröße korrelieren,¹¹⁴ war die Expression von *Lep* im inguinalen weißen Fettgewebe nach 7 Tagen Reperfusion herunterreguliert und zeigte nach 28 Tagen Reperfusion einen Trend zur Herunterregulation. Im gonadalen weißen Fettgewebe war sie nach 28 Tagen Reperfusion herunterreguliert. Die durch den KO reduzierte relative Genexpression von Adipokinen im weißen Fettgewebe scheint daher nicht nur Depot-spezifisch, sondern auch vom Zeitpunkt der Reperfusion abhängig zu sein. Veränderungen der Konzentrationen zirkulierender Adipokine infolge eines Myokardinfarkts sind bereits in der Literatur beschrieben. So zeigt die Leptin-Konzentration in humanen Proben in den ersten Tagen nach einem Myokardinfarkt einen Anstieg,¹¹⁵ während die Adiponektin-Konzentration sinkt.¹¹⁶ Deshalb war es wichtig zu untersuchen, wie sich die beobachteten Veränderungen der Genexpression der Adipokine im weißen Fettgewebe auf die Zirkulation auswirken. Dazu wurden Messungen 7 Tage nach Reperfusion durchgeführt. In Übereinstimmung mit der reduzierten Genexpression von *Adipoq* im weißen Fettgewebe war die Konzentration von Adiponektin in der Zirkulation durch den ATGL-KO vermindert. Die Leptin-Spiegel zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen, was darauf hindeutet, dass sich die Veränderungen im Fettgewebe auf Genexpressionsebene nicht in der Zirkulation widerspiegeln.

4.4 Hemmung der Lipolyse durch den ATGL-KO verschlechtert die kardiale Funktion und verändert den kardialen Metabolismus nach dem Myokardinfarkt

Im Allgemeinen spielt das Fettgewebe eine entscheidende Rolle im kardiovaskulären System, sowohl in Bezug auf die Gesundheit als auch auf Erkrankungen.¹¹⁷ Die Wechselwirkung zwischen Fettgewebe und Herz wird in der Forschung untersucht, insbesondere im Hinblick auf das Potenzial von Fettgewebe und Lipolyse als therapeutische Ziele bei der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.¹¹⁸ Die Aufklärung dieser Zusammenhänge erfordert ein tieferes Verständnis und eine Erweiterung dieses Forschungsbereichs. In dieser Studie zeigte der experimentell induzierte Myokardinfarkt eine Aktivierung der Lipolyse, die durch erhöhte

zirkulierende NEFA-Konzentrationen sowie erhöhte Phosphorylierung an PKA-Substraten und HSL im subkutanen weißen Fettgewebe charakterisiert ist. Deshalb wurde untersucht, wie sich die Hemmung der Lipolyse im induzierbaren adipozytenspezifischen ATGL-KO-Modell auf die kardiale Funktion auswirkt. Die räumliche Eingrenzung der ATGL-Hemmung ermöglicht Rückschlüsse auf den Einfluss nur der in Adipozyten exprimierten ATGL. Der durch die Myokardischämie nach 30 Minuten Reperfusion verursachte Anstieg der NEFA-Konzentrationen wurde durch den ATGL-KO reduziert. Auch nach einer längeren Reperfusionsdauer von 7 Tagen zeigte sich ein Trend zu niedrigeren NEFA-Werten in den KO-Tieren. Diese Ergebnisse belegen, dass der ATGL-KO die durch die Myokardischämie aktivierte Lipolyse erfolgreich reduziert.

Um herauszufinden, wie der ATGL-KO und die damit einhergehende Reduktion der Lipolyse die kardiale Funktion beeinflusst, wurden bis zu 28 Tage nach der Myokardischämie wöchentlich echokardiographische Analysen durchgeführt. Diese Analysen zeigten eine stärkere Verschlechterung der kardialen Dysfunktion durch den ATGL-KO im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Verschlechterung wurde durch eine größere Abnahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion, der *fractional area change*, des Herzzeitvolumens und des Schlagvolumens dargestellt. Dabei ist es wichtig anzumerken, dass die Parameter der systolischen Pumpfunktion im basalen Zustand vor der Ischämie keine Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der adipozytenspezifische ATGL-KO die kardiale Funktion unter physiologischen Bedingungen nicht beeinflusst, jedoch nach einer Myokardischämie die kardiale Dysfunktion verschlechtert. Passend zu diesen Ergebnissen war die Narbe in den ATGL-KO-Tieren bei unveränderter Infarktgröße größer, was auf einen Einfluss auf die Reparaturprozesse nach Infarkt hinweist. Diese Befunde sind kontrovers zu der bisherigen Literatur, die eine Inhibition der adipozytenspezifischen ATGL sowohl genetisch als auch pharmakologisch als protektiv bei verschiedenen Herzschäden beschreibt. Verschiedene Modelle der pathologischen Herzbelastung wurden untersucht, darunter die durch transversale Aorten-Konstriktion induzierte Drucküberlastung. Durch Inhibition oder KO der ATGL kam es zu einer Verbesserung der kardialen Funktion was unter anderem mit einer Abschwächung der nach Drucküberlastung beobachteten kardialen Lipidom-Veränderungen einherging.^{76,85} Bei der durch das synthetische Katecholamin Isoproterenol induzierten kardialen Dysfunktion wurden als zugrunde liegende Mechanismen für eine kardiale Funktionsverbesserung eine Reduktion der Isoproterenol-induzierten Hochregulation von Galektin-3 und lipidomische Veränderungen identifiziert.^{86,87} Im Modell des Myokardinfarkts wurde die Verbesserung der systolischen Funktion mit einer verbesserten Leistung des *Remote*-Myokards assoziiert.¹¹⁹ In einer weiteren Untersuchung zur

trainingsinduzierten physiologischen Herzhypertrophie zeigt der adipozytenspezifische ATGL-KO eine verringerte kardiale Fettsäureaufnahme und eine verminderte Entwicklung der adaptiven physiologischen kardialen Hypertrophie,¹²⁰ was in diesem Fall jedoch auch nachteilig sein könnte. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Modell zur Untersuchung der Auswirkungen des adipozytenspezifischen ATGL-KOs im Rahmen des Myokardinfarkts wurde meines Wissens nach bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Der häufig genutzte pharmakologische ATGL-Inhibitor Atglistatin zur Hemmung der Lipolyse ist in vielen Punkten zudem nicht vergleichbar mit einem adipozytenspezifischen ATGL-KO. Atglistatin akkumuliert hauptsächlich im weißen und braunen Fettgewebe sowie in der Leber, jedoch in geringen Mengen auch in anderen Geweben wie Gehirn, Niere, Herz, Skelettmuskulatur und Lunge.¹²¹ Auch die Akkumulation von Lipidtropfen in Makrophagen kann durch Atglistatin gesteigert werden.¹²² Somit ist die Spezifität für das Fettgewebe begrenzt, und die Leber als großes metabolisches Organ könnte durch die hohe Akkumulation beeinflusst werden. Außerdem reduziert die Behandlung mit Atglistatin die Zunahme des Körpergewichts¹²³ sowie die Masse und die Größe der Adipozyten des gonadalen weißen Fettgewebes.⁸⁶ Dies deutet darauf hin, dass Atglistatin weitere Effekte hat, da bei Hemmung der ATGL eine erhöhte Lipidakkumulation zu erwarten wäre.

Die infolge des adipozytenspezifischen ATGL-KOs reduzierte kardiale Dysfunktion kann verschiedene Ursachen haben. Eine zentrale Rolle könnten dabei die reduzierten Spiegel von Adiponektin spielen. Es wurde mehrfach berichtet, dass Adiponektin eine protektive Funktion auf das Herz hat. Beispielsweise weisen Adiponektin-KO-Mäuse bei induzierter Drucküberlastung eine verstärkte kardiale Hypertrophie und erhöhte Mortalität auf, die durch den Adenovirus-vermittelten Adiponektin-Zusatz verbessert werden.¹²⁴ Im Modell der Ischämie/ Reperfusion zeigen Adiponektin-KO-Mäuse einen größeren Infarkt, erhöhte kardiale Apoptose und TNF- α -Expression, die ebenfalls durch den Adiponektin-Zusatz verringert werden. Dabei schützt Adiponektin das Myokard, indem es die Apoptose durch die direkte Aktivierung des AMPK-Signalwegs reduziert und die kardiale Produktion von TNF- α durch die Aktivierung des Cyclooxygenase-2-Signalwegs hemmt.¹²⁵ In einer weiteren Studie zeigen Adiponektin-KO-Mäuse nach einem Myokardinfarkt durch permanente LAD-Ligatur verstärkte linksventrikuläre Dilatation, Hypertrophie und kontraktile Dysfunktion.¹²⁶ Darüber hinaus reduziert Adiponektin den oxidativen/nitrosativen Stress nach einem Myokardinfarkt.¹²⁷ Insgesamt schützt Adiponektin das geschädigte Herz durch die Reduktion der Infarktgröße, der Entzündung, der Apoptose und des oxidativen Stresses. Auch die Behandlung mit dem synthetischen Adiponektin-Rezeptor-Agonisten AdipoRon¹²⁸ zeigt kardioprotektive Effekte,

beispielsweise durch Verbesserung der kardialen Dysfunktion nach einer Myokardischämie.¹²⁹ Somit könnten die reduzierten Adiponektin-Spiegel den verschlechterten kardialen Phänotypen erklären.

Veränderungen im braunen Fettgewebe könnten ebenfalls zur verstärkten kardialen Dysfunktion beitragen. Die Cre-vermittelte Rekombination unter dem *Adipoq*-Promotor induziert den ATGL-KO nicht nur im weißen, sondern auch im braunen Fettgewebe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das braune Fettgewebe durch den ATGL-KO deutlich vergrößert und eher weißlich als braun. Einige Studien berichten von der Rolle des braunen Fettgewebes bei kardialen Erkrankungen. Es wurde gezeigt, dass das braune Fettgewebe im murinen Modell infolge eines Myokardinfarkts aktiviert wird, was sich in einer Gewichtszunahme des braunen Fettgewebes und einer erhöhten Genexpression von *Ucp1* äußert. Dabei korrelieren die *Ucp1*-Spiegel mit dem Ausmaß der kardialen Dysfunktion.¹³⁰ Zudem zeigt das braune Fettgewebe protektive Eigenschaften bei verschiedenen Modellen der Herzschäden, darunter hypertensive Herzerkrankungen,¹³¹ Katecholamin-induzierte kardiale Belastung¹³⁰ und Myokardinfarkt.^{132,133} Der adipozytenspezifische ATGL-KO führt zur Umwandlung des braunen Fettgewebes in einen weißen Fettgewebe-ähnlichen Phänotyp und reduziert die Expression von UCP1.^{75,108} Außerdem kommt es zu einer ausgeprägten Bildung von *crown-like structures* und einer erhöhten Expression inflammatorischer Marker.¹³⁴ All diese Veränderungen können zu einem Funktionsverlust des braunen Fettgewebes führen und somit die kardioprotektiven Eigenschaften beeinträchtigen.

Da eine Myokardischämie mit Veränderungen im kardialen Substratmetabolismus einhergeht,²⁶ wurden diese nach 24 Stunden Reperfusion im nicht-ischämischen *Remote*-Bereich untersucht, welcher in dieser Studie durch das intraventrikuläre Septum repräsentiert wurde. Hierbei wurden die extrazelluläre Sauerstoffverbrauchsrate und Ansäuerungsrate analysiert. Sauerstoff wird bei der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung verbraucht, weshalb seine Verbrauchsrate als Indikator für die mitochondriale Respiration dienen kann. Die Messung der Ansäuerungsrate ermöglicht Rückschlüsse auf das Ausmaß der anaeroben Glykolyse. Analysen der metabolischen Veränderungen der zellulären Respiration erfolgten basal und nach experimenteller Modifikation. In den ATGL-KO-Tieren waren sowohl die basale als auch die durch FCCP entkoppelte Sauerstoffverbrauchsrate höher als in der Kontrollgruppe, was auf eine erhöhte oxidative Phosphorylierung hinweisen könnte. Ein Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate bzw. der oxidativen Phosphorylierung im *Remote*-Bereich nach einem Myokardinfarkt wurde sowohl im experimentellen murinen Modell¹³⁵ als auch bei Patienten beschrieben und konnte durch eine Behandlung mit β -Blocker

gesenkt werden.¹³⁶ Außerdem zeigte der nicht-ischämische *Remote*-Bereich der ATGL-KO-Herzen nach MPC-Hemmung eine stärkere Substratabhängigkeit von Glukose. Diese erhöhte Bedeutung von Glukose als Substrat ging mit einer erhöhten Genexpression von am Glukosemetabolismus beteiligten Genen einher und könnte durch eine Anpassung des Metabolismus aufgrund der niedrigen zirkulierenden NEFA-Spiegel erklärt werden. Interessanterweise war auch die Genexpression von am Fettsäuremetabolismus beteiligten Genen erhöht, was ein kompensatorischer Mechanismus für die verringerten NEFA-Spiegel sein könnte. Im Gegensatz zu *in vivo* steht dem Herzgewebe im Rahmen dieses *ex vivo*-Experimentes *ad libitum* Palmitat und Glukose zur Verfügung. Eine bereits vorhandene Hochregulierung der metabolischen Gene könnte somit eine erhöhte oxidative Phosphorylierung begünstigen und die erhöhte basale Sauerstoffverbrauchsrate erklären. Insgesamt deuten diese Veränderungen auf einen gestörten kardialen Metabolismus durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO hin und könnten zu dem beobachteten Phänotyp nach Myokardischämie führen. Darüber hinaus dienen Fettsäuren nicht nur als Hauptsubstratquelle für das Herz zur ATP-Produktion,²¹ sondern auch als wichtige Signalmoleküle. Beispielsweise führt die Verabreichung der Fettsäure Palmitoleinsäure (C16:1n7) zu einer kardialen Aktivierung der Expression von PPAR α - und δ -Zielgenen, was mit kardioprotektiven antifibrotischen und antiinflammatorischen Effekten im Modell der Isoproterenol-induzierten Herzschädigung assoziiert wird.¹³⁷ Daher könnte eine zeitgerechte oder gezielte Reduktion der erhöhten Fettsäurespiegel vorteilhaft sein, während eine chronische Reduktion der Lipolyse, wie in der vorliegenden Studie, nachteilige Effekte haben könnte.

4.5 Limitierung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist einige Limitierungen auf, so wurden beispielsweise ausschließlich männliche Mäuse untersucht, wodurch geschlechtsspezifische Unterschiede nicht berücksichtigt werden konnten. Es wurde im murinen Modell gezeigt, dass die periphere Lipolyse nach einer Myokardischämie während der Reperfusion aktiviert ist. Dafür wäre die Untersuchung von humanen Fettgewebsproben von großem Interesse, um herauszufinden, inwiefern und welche Fettgewebsdepots infolge eines Myokardinfarkts beeinflusst werden.

Durch die Induktion des adipozytenspezifischen ATGL-KOs wurde die Lipolyse erfolgreich gehemmt, jedoch war diese Hemmung chronisch und fand vor, während und nach der Myokardischämie statt. Somit fehlte die zeitliche Kontrolle für die Inhibition. Darüber hinaus könnte ein solcher Eingriff in die genetische Ausstattung möglicherweise zu nicht identifizierten unerwünschten Effekten führen. Um die genannten Punkte zu umgehen, wäre die Verwendung

eines adipozytenspezifischen ATGL-Inhibitors in einer geeigneten Formulierung als Vergleich zum genetisch veränderten Modell eine vielversprechende Option. Dies könnte den Transfer auf den Menschen verbessern, insbesondere da kürzlich ein selektiver Inhibitor der humanen ATGL entwickelt wurde.¹³⁸ Hierbei wäre die regelmäßige Messung der NEFA-Werte über einen längeren Zeitraum während und nach der Myokardischämie sinnvoll, um zeitgerecht eingreifen zu können. Auch die starke Modifikation des braunen Fettgewebes durch die genetische ATGL-Hemmung darf nicht vernachlässigt werden.

Der adipozytenspezifische ATGL-KO führte zu einer Verschlechterung der kardialen Dysfunktion und zu Veränderungen im kardialen Metabolismus nach der Myokardischämie. Zur detaillierten Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen könnte eine Substitution des kardioprotektiven Adipokins Adiponektin oder eines Adiponektin-Rezeptoragonisten eine Möglichkeit darstellen. Dabei ist eine genaue Dosierung aufgrund des paradoxen Effekts erforderlich. Eine weitere Option wäre die Substitution der Fettsäuren zu ausgewählten Zeitpunkten.

5 Zusammenfassung

Die adipozytenspezifische Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL) katalysiert den initialen Schritt der Lipolyse und beeinflusst Heilungsprozesse bei verschiedenen kardialen Erkrankungen. Die molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der adipozytenspezifischen ATGL im Rahmen des Myokardinfarkts in einem murinen Modell mit induzierbarem adipozytenspezifischem ATGL-Knockout (KO) zu untersuchen. Dazu wurde in männlichen C57BL/6J- sowie in ATGL-KO- und Kontroll-Mäusen experimentell eine 60-minütige Myokardischämie induziert, gefolgt von verschiedenen Reperfusionszeitpunkten. Zur Beurteilung der lipolytischen Aktivität wurden die Konzentration nicht-veresterter Fettsäuren (NEFA) sowie die Phosphorylierung von Proteinkinase-A (PKA)-Substraten analysiert. Das weiße Fettgewebe wurde untersucht und zirkulierende Adipokine quantifiziert. Darüber hinaus wurden die kardiale Funktion, die Narbengröße und Veränderungen im kardialen Metabolismus bestimmt.

Die Konzentration zirkulierender NEFA sowie die Phosphorylierung von PKA-Substraten und insbesondere von der hormonsensitiven Lipase im inguinalen weißen Fettgewebe waren in C57BL/6J-Mäusen nach 30 Minuten Reperfusion erhöht. ATGL-KO-Mäuse hingegen zeigten nach 30 Minuten Reperfusion einen geringeren Anstieg der NEFA-Konzentration. Das weiße und braune Fettgewebe waren in der ATGL-KO-Gruppe hypertrophiert. Darüber hinaus war die Expression von Lipogenese-Genen und Adipokin-kodierenden Genen im weißen Fettgewebe herunterreguliert und die Konzentration von zirkulierendem Adiponektin verringert. Echokardiographische Analysen zeigten in den ATGL-KO-Mäusen bis zu 28 Tage nach Reperfusion eine verschlechterte kardiale Funktion, die mit einer vergrößerten Narbe einherging. Das nicht-ischämische *Remote*-Myokard zeigte nach 24 Stunden Reperfusion einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, eine erhöhte Glukoseabhängigkeit sowie eine erhöhte Expression von Genen, die am Fettsäure- und Glukosemetabolismus beteiligt sind.

Insgesamt führte die Myokardischämie zu einer Aktivierung der Lipolyse während der frühen Reperfusion. Die Hemmung der Lipolyse durch den adipozytenspezifischen ATGL-KO führte zu einer verschlechterten kardialen Funktion, was möglicherweise auf eine verminderte Konzentration des kardioprotektiven Adipokins Adiponektin, einen Funktionsverlust des braunen Fettgewebes, einen gestörten kardialen Metabolismus und eine verminderte Konzentration von zirkulierenden Fettsäuren als wichtige kardiale Substratquelle zurückzuführen ist. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die adipozytenspezifische ATGL eine wesentliche, möglicherweise protektive, Rolle in den Heilungsprozessen nach Myokardinfarkt spielt und eine pharmakologische Hemmung der ATGL zur therapeutischen Nutzung im Rahmen des Myokardinfarkts daher weiterer Untersuchungen bedarf.

6 Summary

The adipocyte-specific adipose triglyceride lipase (ATGL) catalyzes the initial step of lipolysis and influences healing processes in various cardiac diseases. However, the molecular mechanisms are not yet fully understood.

The aim of the present study was to investigate the role of adipocyte-specific ATGL in the context of myocardial infarction in a murine model with inducible adipocyte-specific ATGL knockout (KO). For this purpose, 60 minutes of myocardial ischemia was experimentally induced in male C57BL/6J as well as in ATGL-KO and control mice, followed by different reperfusion time points. To assess lipolytic activity, the concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) and the phosphorylation of protein kinase A (PKA) substrates were analyzed. White adipose tissue was examined and circulating adipokines were quantified. In addition, cardiac function, scar size and changes in cardiac metabolism were determined.

The concentration of circulating NEFA, as well as the phosphorylation of PKA substrates and especially of hormone-sensitive lipase in the inguinal white adipose tissue, were increased in C57BL/6J mice after 30 minutes of reperfusion. In contrast, ATGL-KO mice showed a lower increase in NEFA levels after 30 minutes of reperfusion. White and brown adipose tissue were hypertrophied in the ATGL-KO group. In addition, the expression of lipogenesis genes and adipokine-encoding genes was downregulated in white adipose tissue, and the concentration of circulating adiponectin was decreased. Echocardiographic analyses showed worsened cardiac function in the ATGL-KO mice up to 28 days after reperfusion, which went along with an enlarged scar. The non-ischemic remote myocardium showed increased oxygen consumption, increased glucose dependence and increased expression of genes involved in fatty acid and glucose metabolism after 24 hours of reperfusion.

Overall, myocardial ischemia led to activation of lipolysis during early reperfusion. Inhibition of lipolysis by the adipocyte-specific ATGL-KO resulted in impaired cardiac function, possibly due to decreased levels of the cardioprotective adipokine adiponectin, loss of brown adipose tissue function, impaired cardiac metabolism, and decreased levels of circulating fatty acids as a major cardiac substrate source. The present results show that adipocyte-specific ATGL plays an essential, possibly protective, role in the healing processes after myocardial infarction and that pharmacological inhibition of ATGL for therapeutic use in the context of myocardial infarction therefore requires further investigation.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Todesursachen nach Krankheitsarten in Deutschland im Jahr 2022 in %	2
Abbildung 2: Phasen der Herzreparatur nach dem Myokardinfarkt	5
Abbildung 3: Der kardiale Metabolismus von Fettsäuren und Glukose	8
Abbildung 4: Aktivierung der Lipolyse in den Adipozyten	13
Abbildung 5: Generierung des adipozytenspezifischen und Tamoxifen-induzierbaren ATGL-KO-Mausmodells	20
Abbildung 6: Induktion des ATGL-KOs mittels 4-Hydroxytamoxifen	20
Abbildung 7: Versuchsaufbau des Modells für Myokardinfarkt	21
Abbildung 8: Quantifizierung der Adipozytentgröße nach Färbung von weißem Fettgewebe mit Hämalaun und Eosin	26
Abbildung 9: Mit Evans-Blau und TTC gefärbter Querschnitt eines infarzierten Herzens....	27
Abbildung 10: Zirkulierende nicht-veresterte Fettsäuren vor Myokardischämie und nach 30 Minuten Reperfusion	37
Abbildung 11: Western Blot Analyse von phosphorylierten PKA-Substraten (RRXS*/T*) im inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebe nach 30 Minuten Reperfusion	39
Abbildung 12: Western Blot Analyse der phosphorylierten hormonsensitiven Lipase im inguinalen und gonadalen weißen Fettgewebe nach 30 Minuten Reperfusion	40
Abbildung 13: Makroskopie von braunem und weißem Fettgewebe von Kontroll- und ATGL-KO-Tieren	41
Abbildung 14: Western Blot Analyse zur Validierung des induzierbaren ATGL-KOs im Fettgewebe	43
Abbildung 15: Konzentration zirkulierender nicht-veresterter Fettsäuren im Serum vor und 30 Minuten nach der Gabe von CL-316,243	44
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf des Myokardinfarktmodells im Tamoxifen-induzierbaren und adipozytenspezifischen ATGL-KO-Mausmodells	45
Abbildung 17: Konzentration der zirkulierenden nicht-veresterten Fettsäuren vor und nach Myokardischämie	46
Abbildung 18: Gewichte des inguinalen und gonadalen weißen und des braunen Fettgewebes	48
Abbildung 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Bestimmung der Adipozytentgröße des Fettgewebes	50
Abbildung 20: Genexpression von Lipogenese-Genen im Fettgewebe	52
Abbildung 21: Genexpression von Adipokin-kodierenden Genen im Fettgewebe	54
Abbildung 22: Zirkulierende Spiegel von Adipokinen und anderen Hormonen nach sieben Tagen Reperfusion	55

Abbildung 23: Körpergewichte und Herzgewichte von ATGL-KO- und Kontrolltieren basal und nach Myokardinfarkt	57
Abbildung 24: Kardiale Funktion bei ATGL-KO- und Kontrolltieren bis zu 28 Tage nach Myokardinfarkt.....	59
Abbildung 25: WGA-Färbung von Herz-Kryoschnitten zur Bestimmung der Narbengröße nach 28 Tagen Reperfusion	60
Abbildung 26: Bestimmung der Infarktgröße nach 24 Stunden Reperfusion	61
Abbildung 27: Validierung des induzierbaren ATGL-KO zum Zeitpunkt der letzten Versuche	62
Abbildung 28: Inhibition des kardialen Metabolismus durch Etomoxir oder UK5099	64
Abbildung 29: Extrazelluläre Flussanalyse des Sauerstoffverbrauchs im nicht- ischämischen <i>Remote</i> -Bereich des Herzens	65
Abbildung 30: Extrazelluläre Flussanalyse der Ansäuerungsrate im nicht-ischämischen <i>Remote</i> -Bereich des Herzens	66
Abbildung 31: Genexpression von <i>Pnpla2</i> im Herzen.....	67
Abbildung 32: Genexpression der am Fettsäuremetabolismus beteiligten Gene im nicht- ischämischen <i>Remote</i> -Bereich des Herzens	68
Abbildung 33: Genexpression der am Glukosemetabolismus beteiligten Gene im nicht- ischämischen <i>Remote</i> -Bereich des Herzens	69
Abbildung 34: Schematische Darstellung der veränderten Genexpression im nicht- ischämischen <i>Remote</i> -Bereich des Herzens	70

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer-Sequenzen für die quantitative <i>real-time</i> -PCR	28
Tabelle 2:	Puffer, Lösungen und Gele für Western Blot	31
Tabelle 3:	Antikörper für Western Blot	32
Tabelle 4:	Substanzen für die extrazellulären Flussanalysen.....	34

9 Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organization. *Cardiovascular diseases (CVDs)*, <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))> (11 June 2021).
- 2 World Health Organization. *The top 10 causes of death*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>> (9 December 2020).
- 3 Statistisches Bundesamt. *Todesursachen in Deutschland*, <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#_uhdnlzmiz> (15 November 2023).
- 4 Jenca, D., Melenovsky, V., Stehlik, J. *et al.* Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail* **8**, 222-237, doi:10.1002/ehf2.13144 (2021).
- 5 Ogobuiro, I., Wehrle, C. J. & Tuma, F. Anatomy, Thorax, Heart Coronary Arteries in *StatPearls* (2024).
- 6 Brandes, R., Lang, F. & Schmidt, R. F. *Physiologie des Menschen*. 978-3-662-56467-7 (Springer, 2019).
- 7 Gossage, J. R. Acute myocardial infarction. Reperfusion strategies. *Chest* **106**, 1851-1866, doi:10.1378/cheest.106.6.1851 (1994).
- 8 Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L. *et al.* Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 56, doi:10.1038/s41572-019-0106-z (2019).
- 9 Smit, M., Coetzee, A. R. & Lochner, A. The Pathophysiology of Myocardial Ischemia and Perioperative Myocardial Infarction. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **34**, 2501-2512, doi:10.1053/j.jvca.2019.10.005 (2020).
- 10 Jebari-Benslaiman, S., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A. *et al.* Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* **23**, doi:10.3390/ijms23063346 (2022).
- 11 Centers for Disease Control and Prevention. *Heart Attack Symptoms, Risk, and Recovery*, <https://www.cdc.gov/heartdisease/heart_attack.htm> (July 12, 2022).
- 12 Cohn, P. F., Fox, K. M. & Daly, C. Silent myocardial ischemia. *Circulation* **108**, 1263-1277, doi:10.1161/01.CIR.0000088001.59265.EE (2003).
- 13 Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D. *et al.* Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* **116**, 2634-2653, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397 (2007).
- 14 Tziakas, D., Chalikias, G., Al-Lamee, R. & Kaski, J. C. Total coronary occlusion in non ST elevation myocardial infarction: Time to change our practice? *Int J Cardiol* **329**, 1-8, doi:10.1016/j.ijcard.2020.12.082 (2021).
- 15 Welt, F. G. P., Batchelor, W., Spears, J. R. *et al.* Reperfusion Injury in Patients With Acute Myocardial Infarction: JACC Scientific Statement. *J Am Coll Cardiol* **83**, 2196-2213, doi:10.1016/j.jacc.2024.02.056 (2024).

16 Frangogiannis, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* **5**, 1841-1875, doi:10.1002/cphy.c150006 (2015).

17 Bahit, M. C., Kochar, A. & Granger, C. B. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail* **6**, 179-186, doi:10.1016/j.jchf.2017.09.015 (2018).

18 Weil, B. R. & Neelamegham, S. Selectins and Immune Cells in Acute Myocardial Infarction and Post-infarction Ventricular Remodeling: Pathophysiology and Novel Treatments. *Front Immunol* **10**, 300, doi:10.3389/fimmu.2019.00300 (2019).

19 Venugopal, H., Hanna, A., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction. *Cells* **11**, doi:10.3390/cells11091386 (2022).

20 Khalil, N. N. & McCain, M. L. Engineering the Cellular Microenvironment of Post-infarct Myocardium on a Chip. *Front Cardiovasc Med* **8**, 709871, doi:10.3389/fcvm.2021.709871 (2021).

21 Lopaschuk, G. D., Karwi, Q. G., Tian, R., Wende, A. R. & Abel, E. D. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ Res* **128**, 1487-1513, doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318241 (2021).

22 Zuurbier, C. J., Bertrand, L., Beauloye, C. R. *et al.* Cardiac metabolism as a driver and therapeutic target of myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **24**, 5937-5954, doi:10.1111/jcmm.15180 (2020).

23 Karwi, Q. G., Biswas, D., Pulinkunnil, T. & Lopaschuk, G. D. Myocardial Ketones Metabolism in Heart Failure. *J Card Fail* **26**, 998-1005, doi:10.1016/j.cardfail.2020.04.005 (2020).

24 Leggat, J., Bidault, G. & Vidal-Puig, A. Lipotoxicity: a driver of heart failure with preserved ejection fraction? *Clin Sci (Lond)* **135**, 2265-2283, doi:10.1042/CS20210127 (2021).

25 Gamble, J. & Lopaschuk, G. D. Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism* **46**, 1270-1274, doi:10.1016/s0026-0495(97)90229-8 (1997).

26 Jiang, M., Xie, X., Cao, F. & Wang, Y. Mitochondrial Metabolism in Myocardial Remodeling and Mechanical Unloading: Implications for Ischemic Heart Disease. *Front Cardiovasc Med* **8**, 789267, doi:10.3389/fcvm.2021.789267 (2021).

27 Ebeling, P., Koistinen, H. A. & Koivisto, V. A. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. *FEBS Lett* **436**, 301-303, doi:10.1016/s0014-5793(98)01149-1 (1998).

28 Kessler, G. & Friedman, J. Metabolism of fatty acids and glucose. *Circulation* **98**, 1351 (1998).

29 Dambrova, M., Zuurbier, C. J., Borutaite, V., Liepinsh, E. & Makrecka-Kuka, M. Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac

ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **165**, 24-37, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.036 (2021).

30 Correia, M., Santos, F., da Silva Ferreira, R. *et al.* Metabolic Determinants in Cardiomyocyte Function and Heart Regenerative Strategies. *Metabolites* **12**, doi:10.3390/metabo12060500 (2022).

31 Ramachandra, C. J. A., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Lin, Y. H. & Hausenloy, D. J. Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection. *EBioMedicine* **57**, 102884, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102884 (2020).

32 Qi, D. & Young, L. H. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 422-429, doi:10.1016/j.tem.2015.05.010 (2015).

33 Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 207-258, doi:10.1152/physrev.00015.2009 (2010).

34 Jaswal, J. S., Keung, W., Wang, W., Ussher, J. R. & Lopaschuk, G. D. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1333-1350, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.015 (2011).

35 Sambandam, N. & Lopaschuk, G. D. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res* **42**, 238-256, doi:10.1016/s0163-7827(02)00065-6 (2003).

36 Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-789, doi:10.1016/s0140-6736(63)91500-9 (1963).

37 Lopaschuk, G. D. Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future. *Can J Cardiol* **33**, 838-849, doi:10.1016/j.cjca.2016.12.013 (2017).

38 Sakers, A., De Siqueira, M. K., Seale, P. & Villanueva, C. J. Adipose-tissue plasticity in health and disease. *Cell* **185**, 419-446, doi:10.1016/j.cell.2021.12.016 (2022).

39 Corvera, S. Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. *Annu Rev Physiol* **83**, 257-278, doi:10.1146/annurev-physiol-031620-095446 (2021).

40 Parra-Peralbo, E., Talamillo, A. & Barrio, R. Origin and Development of the Adipose Tissue, a Key Organ in Physiology and Disease. *Front Cell Dev Biol* **9**, 786129, doi:10.3389/fcell.2021.786129 (2021).

41 Richard, A. J., White, U., Elks, C. M. & Stephens, J. M. Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction in *Endotext* (eds K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman *et al.*) (2020).

42 Ghesmati, Z., Rashid, M., Fayezi, S. *et al.* An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Rev Endocr Metab Disord* **25**, 279-308, doi:10.1007/s11154-023-09850-0 (2024).

43 Correa, L. H., Heyn, G. S. & Magalhaes, K. G. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells* **8**, doi:10.3390/cells8070662 (2019).

44 Luong, Q., Huang, J. & Lee, K. Y. Deciphering White Adipose Tissue Heterogeneity. *Biology (Basel)* **8**, doi:10.3390/biology8020023 (2019).

45 Bluher, M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab* **3**, 230-240, doi:10.1016/j.molmet.2014.01.005 (2014).

46 van Meijel, R. L. J. Adipose tissue metabolism and inflammation in obesity. *Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease*, pp. 1–22 (2019).

47 Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* **48**, 1253-1262, doi:10.1194/jlr.R700005-JLR200 (2007).

48 Clemente-Suarez, V. J., Redondo-Florez, L., Beltran-Velasco, A. I. *et al.* The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicines* **11**, doi:10.3390/biomedicines11051290 (2023).

49 Zhao, S., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ Res* **128**, 136-149, doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.314458 (2021).

50 Mattu, H. S. & Randeva, H. S. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* **216**, T17-36, doi:10.1530/JOE-12-0232 (2013).

51 Matsui, H., Motooka, M., Koike, H. *et al.* Ischemia/reperfusion in rat heart induces leptin and leptin receptor gene expression. *Life Sci* **80**, 672-680, doi:10.1016/j.lfs.2006.10.027 (2007).

52 Hall, M. E., Smith, G., Hall, J. E. & Stec, D. E. Cardiomyocyte-specific deletion of leptin receptors causes lethal heart failure in Cre-recombinase-mediated cardiotoxicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **303**, R1241-1250, doi:10.1152/ajpregu.00292.2012 (2012).

53 McGaffin, K. R., Witham, W. G., Yester, K. A. *et al.* Cardiac-specific leptin receptor deletion exacerbates ischaemic heart failure in mice. *Cardiovasc Res* **89**, 60-71, doi:10.1093/cvr/cvq288 (2011).

54 Badoer, E. Cardiovascular and Metabolic Crosstalk in the Brain: Leptin and Resistin. *Front Physiol* **12**, 639417, doi:10.3389/fphys.2021.639417 (2021).

55 Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312, doi:10.1038/35053000 (2001).

56 Li, Y., Li, Z., Ngandiri, D. A. *et al.* The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Front Physiol* **13**, 826314, doi:10.3389/fphys.2022.826314 (2022).

57 Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O. *et al.* FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* **15**, 279-291, doi:10.1016/j.cmet.2011.12.018 (2012).

58 Schweiger, M., Eichmann, T. O., Taschler, U. *et al.* Measurement of lipolysis. *Methods Enzymol* **538**, 171-193, doi:10.1016/B978-0-12-800280-3.00010-4 (2014).

59 Wang, T., Zang, Y., Ling, W., Corkey, B. E. & Guo, W. Metabolic partitioning of endogenous fatty acid in adipocytes. *Obes Res* **11**, 880-887, doi:10.1038/oby.2003.121 (2003).

60 Edwards, M. & Mohiuddin, S. S. Biochemistry, Lipolysis in *StatPearls* (2024).

61 Grabner, G. F., Xie, H., Schweiger, M. & Zechner, R. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. *Nat Metab* **3**, 1445-1465, doi:10.1038/s42255-021-00493-6 (2021).

62 Fruhbeck, G., Mendez-Gimenez, L., Fernandez-Formoso, J. A., Fernandez, S. & Rodriguez, A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* **27**, 63-93, doi:10.1017/S095442241400002X (2014).

63 Saponaro, C., Gaggini, M., Carli, F. & Gastaldelli, A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* **7**, 9453-9474, doi:10.3390/nu7115475 (2015).

64 Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G. *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386, doi:10.1126/science.1100747 (2004).

65 Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. & Sul, H. S. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* **279**, 47066-47075, doi:10.1074/jbc.M403855200 (2004).

66 Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W. *et al.* Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* **279**, 48968-48975, doi:10.1074/jbc.M407841200 (2004).

67 Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M. & Zechner, R. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* **50**, 14-27, doi:10.1016/j.plipres.2010.10.004 (2011).

68 Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G. *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* **3**, 309-319, doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005 (2006).

69 Yang, X., Lu, X., Lombes, M. *et al.* The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* **11**, 194-205, doi:10.1016/j.cmet.2010.02.003 (2010).

70 Schreiber, R., Xie, H. & Schweiger, M. Of mice and men: The physiological role of adipose triglyceride lipase (ATGL). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**, 880-899, doi:10.1016/j.bbalip.2018.10.008 (2019).

71 Trites, M. J. & Clugston, R. D. The role of adipose triglyceride lipase in lipid and glucose homeostasis: lessons from transgenic mice. *Lipids Health Dis* **18**, 204, doi:10.1186/s12944-019-1151-z (2019).

72 Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R. *et al.* Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* **312**, 734-737, doi:10.1126/science.1123965 (2006).

73 Kienesberger, P. C., Pulinilkunnil, T., Nagendran, J. *et al.* Early structural and metabolic cardiac remodelling in response to inducible adipose triglyceride lipase ablation. *Cardiovasc Res* **99**, 442-451, doi:10.1093/cvr/cvt124 (2013).

74 Zhang, R., Meng, J., Yang, S. *et al.* Recent Advances on the Role of ATGL in Cancer. *Front Oncol* **12**, 944025, doi:10.3389/fonc.2022.944025 (2022).

75 Schoiswohl, G., Stefanovic-Racic, M., Menke, M. N. *et al.* Impact of Reduced ATGL-Mediated Adipocyte Lipolysis on Obesity-Associated Insulin Resistance and Inflammation in Male Mice. *Endocrinology* **156**, 3610-3624, doi:10.1210/en.2015-1322 (2015).

76 Salatzki, J., Foryst-Ludwig, A., Bentele, K. *et al.* Adipose tissue ATGL modifies the cardiac lipidome in pressure-overload-induced left ventricular failure. *PLoS Genet* **14**, e1007171, doi:10.1371/journal.pgen.1007171 (2018).

77 Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *Embo Rep* **2**, 282-286, doi:10.1093/embo-reports/kve071 (2001).

78 Song, Z., Xiaoli, A. M. & Yang, F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10101383 (2018).

79 Karakas, M. & Koenig, W. Sympathetic nervous system: a crucial player modulating residual cardiovascular risk. *Circ Res* **112**, 13-16, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.281097 (2013).

80 Schomig, A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* **82**, II13-22 (1990).

81 Lyu, J., Wang, M., Kang, X. *et al.* Macrophage-mediated regulation of catecholamines in sympathetic neural remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* **115**, 56, doi:10.1007/s00395-020-0813-3 (2020).

82 Preston, K. J., Scalia, R. G. & Autieri, M. V. Adipocyte Phenotype Flexibility and Lipid Dysregulation. *Cells* **11**, doi:10.3390/cells11050882 (2022).

83 Vetter, N. J., Strange, R. C., Adams, W. & Oliver, M. F. Initial metabolic and hormonal response to acute myocardial infarction. *Lancet* **1**, 284-288, doi:10.1016/s0140-6736(74)92595-1 (1974).

84 Yue, T. L., Bao, W., Jucker, B. M. *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **108**, 2393-2399, doi:10.1161/01.CIR.0000093187.42015.6C (2003).

85 Parajuli, N., Takahara, S., Matsumura, N. *et al.* Atglistatin ameliorates functional decline in heart failure via adipocyte-specific inhibition of adipose triglyceride lipase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **315**, H879-H884, doi:10.1152/ajpheart.00308.2018 (2018).

86 Takahara, S., Ferdaoussi, M., Srnic, N. *et al.* Inhibition of ATGL in adipose tissue ameliorates isoproterenol-induced cardiac remodeling by reducing adipose tissue inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **320**, H432-H446, doi:10.1152/ajpheart.00737.2020 (2021).

87 Thiele, A., Luetges, K., Ritter, D. *et al.* Pharmacological inhibition of adipose tissue adipose triglyceride lipase by Atglistatin prevents catecholamine-induced myocardial damage. *Cardiovasc Res* **118**, 2488-2505, doi:10.1093/cvr/cvab182 (2022).

88 Wang, L., Zabri, H., Gorresen, S. *et al.* Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner. *Front Physiol* **13**, 1036945, doi:10.3389/fphys.2022.1036945 (2022).

89 Sitnick, M. T., Basantani, M. K., Cai, L. *et al.* Skeletal muscle triacylglycerol hydrolysis does not influence metabolic complications of obesity. *Diabetes* **62**, 3350-3361, doi:10.2337/db13-0500 (2013).

90 Sassmann, A., Offermanns, S. & Wettschureck, N. Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis* **48**, 618-625, doi:10.1002/dvg.20665 (2010).

91 Heinen, A., Raupach, A., Behmenburg, F. *et al.* Echocardiographic Analysis of Cardiac Function after Infarction in Mice: Validation of Single-Plane Long-Axis View Measurements and the Bi-Plane Simpson Method. *Ultrasound Med Biol* **44**, 1544-1555, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2018.03.020 (2018).

92 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).

93 Essop, M. F. & Opie, L. H. The acute coronary syndrome revisited: effects and therapeutic modulation of excess metabolic fuel supply. *Cardiovasc J Afr* **31**, 159-161 (2020).

94 Raje, V., Ahern, K. W., Martinez, B. A. *et al.* Adipocyte lipolysis drives acute stress-induced insulin resistance. *Sci Rep* **10**, 18166, doi:10.1038/s41598-020-75321-0 (2020).

95 Cavasin, M. A., Tao, Z., Menon, S. & Yang, X. P. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci* **75**, 2181-2192, doi:10.1016/j.lfs.2004.04.024 (2004).

96 Blenck, C. L., Harvey, P. A., Reckelhoff, J. F. & Leinwand, L. A. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res* **118**, 1294-1312, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307509 (2016).

97 Gui, Y., Silha, J. V. & Murphy, L. J. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* **12**, 1481-1491, doi:10.1038/oby.2004.185 (2004).

98 Oliver, M. F., Kurien, V. A. & Greenwood, T. W. Relation between serum-free-fatty acids and arrhythmias and death after acute myocardial infarction. *Lancet* **1**, 710-714, doi:10.1016/s0140-6736(68)92163-6 (1968).

99 Holm, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* **31**, 1120-1124, doi:10.1042/bst0311120 (2003).

100 Schottl, T., Kappler, L., Braun, K., Fromme, T. & Klingenspor, M. Limited mitochondrial capacity of visceral versus subcutaneous white adipocytes in male C57BL/6N mice. *Endocrinology* **156**, 923-933, doi:10.1210/en.2014-1689 (2015).

101 Jiang, H., Ding, X., Cao, Y., Wang, H. & Zeng, W. Dense Intra-adipose Sympathetic Arborizations Are Essential for Cold-Induced Beiging of Mouse White Adipose Tissue. *Cell Metab* **26**, 686-692 e683, doi:10.1016/j.cmet.2017.08.016 (2017).

102 Wu, J. W., Wang, S. P., Casavant, S. et al. Fasting energy homeostasis in mice with adipose deficiency of desnutrin/adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* **153**, 2198-2207, doi:10.1210/en.2011-1518 (2012).

103 Lee, K. Y., Russell, S. J., Ussar, S. et al. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* **62**, 864-874, doi:10.2337/db12-1089 (2013).

104 Hesselbarth, N., Pettinelli, C., Gericke, M. et al. Tamoxifen affects glucose and lipid metabolism parameters, causes browning of subcutaneous adipose tissue and transient body composition changes in C57BL/6NTac mice. *Biochem Biophys Res Commun* **464**, 724-729, doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.015 (2015).

105 Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O. et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783-787, doi:10.1038/nature06902 (2008).

106 Rigamonti, A., Brennan, K., Lau, F. & Cowan, C. A. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One* **6**, e17637, doi:10.1371/journal.pone.0017637 (2011).

107 MacPherson, R. E., Castellani, L., Beaudoin, M. S. & Wright, D. C. Evidence for fatty acids mediating CL 316,243-induced reductions in blood glucose in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E563-570, doi:10.1152/ajpendo.00287.2014 (2014).

108 Ahmadian, M., Abbott, M. J., Tang, T. et al. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab* **13**, 739-748, doi:10.1016/j.cmet.2011.05.002 (2011).

109 Mottillo, E. P., Balasubramanian, P., Lee, Y. H. et al. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic beta3-adrenergic receptor activation. *J Lipid Res* **55**, 2276-2286, doi:10.1194/jlr.M050005 (2014).

110 Zhang, S., Williams, K. J., Verlande-Ferrero, A. et al. Acute activation of adipocyte lipolysis reveals dynamic lipid remodeling of the hepatic lipidome. *J Lipid Res* **65**, 100434, doi:10.1016/j.jlr.2023.100434 (2024).

111 Schreiber, R., Hofer, P., Taschler, U. et al. Hypophagia and metabolic adaptations in mice with defective ATGL-mediated lipolysis cause resistance to HFD-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 13850-13855, doi:10.1073/pnas.1516004112 (2015).

112 Cases, S., Stone, S. J., Zhou, P. *et al.* Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem* **276**, 38870-38876, doi:10.1074/jbc.M106219200 (2001).

113 Anthony, S. R., Guarnieri, A. R., Gozdiff, A. *et al.* Mechanisms linking adipose tissue inflammation to cardiac hypertrophy and fibrosis. *Clin Sci (Lond)* **133**, 2329-2344, doi:10.1042/CS20190578 (2019).

114 Zhang, Y., Guo, K. Y., Diaz, P. A., Heo, M. & Leibel, R. L. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R226-234, doi:10.1152/ajpregu.00392.2001 (2002).

115 Khafaji, H. A., Bener, A. B., Rizk, N. M. & Al Suwaidi, J. Elevated serum leptin levels in patients with acute myocardial infarction; correlation with coronary angiographic and echocardiographic findings. *BMC Res Notes* **5**, 262, doi:10.1186/1756-0500-5-262 (2012).

116 Kojima, S., Funahashi, T., Sakamoto, T. *et al.* The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. *Heart* **89**, 667, doi:10.1136/heart.89.6.667 (2003).

117 Oikonomou, E. K. & Antoniades, C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol* **16**, 83-99, doi:10.1038/s41569-018-0097-6 (2019).

118 Smeir, E., Kintscher, U. & Foryst-Ludwig, A. Adipose tissue-heart crosstalk as a novel target for treatment of cardiometabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* **60**, 249-254, doi:10.1016/j.coph.2021.07.017 (2021).

119 Bottermann, K., Granade, M. E., Oenarto, V., Fischer, J. W. & Harris, T. E. Atglistatin Pretreatment Preserves Remote Myocardium Function Following Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* **26**, 289-297, doi:10.1177/1074248420971113 (2021).

120 Foryst-Ludwig, A., Kreissl, M. C., Benz, V. *et al.* Adipose Tissue Lipolysis Promotes Exercise-induced Cardiac Hypertrophy Involving the Lipokine C16:1n7-Palmitoleate. *J Biol Chem* **290**, 23603-23615, doi:10.1074/jbc.M115.645341 (2015).

121 Mayer, N., Schweiger, M., Romauch, M. *et al.* Development of small-molecule inhibitors targeting adipose triglyceride lipase. *Nat Chem Biol* **9**, 785-787, doi:10.1038/nchembio.1359 (2013).

122 van Dierendonck, X., Vrieling, F., Smeehuijzen, L. *et al.* Triglyceride breakdown from lipid droplets regulates the inflammatory response in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2114739119, doi:10.1073/pnas.2114739119 (2022).

123 Schweiger, M., Romauch, M., Schreiber, R. *et al.* Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. *Nat Commun* **8**, 14859, doi:10.1038/ncomms14859 (2017).

124 Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M. *et al.* Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* **10**, 1384-1389, doi:10.1038/nm1137 (2004).

125 Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D. R. *et al.* Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* **11**, 1096-1103, doi:10.1038/nm1295 (2005).

126 Shibata, R., Izumiya, Y., Sato, K. *et al.* Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 1065-1074, doi:10.1016/j.yjmcc.2007.03.808 (2007).

127 Tao, L., Gao, E., Jiao, X. *et al.* Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* **115**, 1408-1416, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.666941 (2007).

128 Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., Iwabu, M. *et al.* A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* **503**, 493-499, doi:10.1038/nature12656 (2013).

129 Zhang, Y., Zhao, J., Li, R. *et al.* AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **309**, E275-282, doi:10.1152/ajpendo.00577.2014 (2015).

130 Thoonen, R., Ernande, L., Cheng, J. *et al.* Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **84**, 202-211, doi:10.1016/j.yjmcc.2015.05.002 (2015).

131 Ruan, C. C., Kong, L. R., Chen, X. H. *et al.* A(2A) Receptor Activation Attenuates Hypertensive Cardiac Remodeling via Promoting Brown Adipose Tissue-Derived FGF21. *Cell Metab* **28**, 476-489 e475, doi:10.1016/j.cmet.2018.06.013 (2018).

132 Zhao, H., Chen, X., Hu, G. *et al.* Small Extracellular Vesicles From Brown Adipose Tissue Mediate Exercise Cardioprotection. *Circ Res* **130**, 1490-1506, doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.320458 (2022).

133 Marti-Pamies, I., Thoonen, R., Morley, M. *et al.* Brown Adipose Tissue and BMP3b Decrease Injury in Cardiac Ischemia-Reperfusion. *Circ Res* **133**, 353-365, doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.322337 (2023).

134 Kotzbeck, P., Giordano, A., Mondini, E. *et al.* Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation. *J Lipid Res* **59**, 784-794, doi:10.1194/jlr.M079665 (2018).

135 Bottermann, K., Spychala, A., Eliacik, A. *et al.* Extracellular flux analysis in intact cardiac tissue slices-A novel tool to investigate cardiac substrate metabolism in mouse myocardium. *Acta Physiol (Oxf)* **239**, e14004, doi:10.1111/apha.14004 (2023).

136 Ohte, N., Kurokawa, K., Iida, A. *et al.* Myocardial oxidative metabolism in remote normal regions in the left ventricles with remodeling after myocardial infarction: effect of beta-adrenoceptor blockers. *J Nucl Med* **43**, 780-785 (2002).

137 Betz, I. R., Qaiyumi, S. J., Goeritzer, M. *et al.* Cardioprotective Effects of Palmitoleic Acid (C16:1n7) in a Mouse Model of Catecholamine-Induced Cardiac Damage Are Mediated by PPAR Activation. *Int J Mol Sci* **22**, doi:10.3390/ijms222312695 (2021).

138 Grabner, G. F., Guttenberger, N., Mayer, N. *et al.* Small-Molecule Inhibitors Targeting Lipolysis in Human Adipocytes. *J Am Chem Soc* **144**, 6237-6250, doi:10.1021/jacs.1c10836 (2022).

10 Publikationen

Dietzsch AN, Al-Hasani H, Altschmied J, Bottermann K, Brendler J, Haendeler J, Horn S, Kaczmarek I, Körner A, Krause K, Landgraf K, Le Duc D, Lehmann L, Lehr S, Pick S, Ricken A, Schnorr R, Schulz A, Strnadová M, Velluva A, Zabri H, Schöneberg T, Thor D, Prömel S. *Dysfunction of the adhesion G protein-coupled receptor latrophilin 1 (ADGRL1/LPHN1) increases the risk of obesity*. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Apr 26;9(1):103. doi: 10.1038/s41392-024-01810-7.

Wang L, Zabri H, Gorresen S, Semmler D, Hundhausen C, Fischer JW, Bottermann K. *Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner*. *Front Physiol*. 2022 Oct 28;13:1036945. doi: 10.3389/fphys.2022.1036945.

Bottermann K, Kalfhues L, Nederlof R, Hemmers A, Leitner LM, Oenarto V, Nemmer J, Pfeffer M, Raje V, Deenen R, Petzsch P, Zabri H, Köhrer K, Reichert AS, Grandoch M, Fischer JW, Herebian D, Stegbauer J, Harris TE, Gödecke A. *Cardiomyocyte p38 MAPKα suppresses a heart-adipose tissue-neutrophil crosstalk in heart failure development*. *Basic Res Cardiol*. 2022 Oct 7;117(1):48. doi: 10.1007/s00395-022-00955-2.

Piroth M, Gorski DJ, Hundhausen C, Petz A, Gorresen S, Semmler D, Zabri H, Hartwig S, Lehr S, Kelm M, Jung C, Fischer JW. *Hyaluronan synthase 3 is protective after cardiac ischemia-reperfusion by preserving the T cell response*. *Matrix Biol*. 2022 Sep;112:116-131. doi: 10.1016/j.matbio.2022.08.008.

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jens W. Fischer und Frau Dr. Katharina Bottermann für die wertvolle Möglichkeit bedanken, am Institut für Pharmakologie in einer angenehmen Atmosphäre forschen zu dürfen. Vielen Dank auch für die abwechslungsreiche Zeit, wodurch der Alltag immer spannend geblieben ist. Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke danke ich für die freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten des Instituts für Physiologie zur Durchführung extrazellulärer Flussmessungen. Mein größter Dank gilt Frau Dr. Katharina Bottermann für die engagierte Betreuung, die mich sowohl fachlich als auch persönlich sehr geprägt hat. Ohne ihre Unterstützung, in guten wie in herausfordernden Zeiten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die unvergessliche Zeit, die Herzlichkeit und all die Hilfe. Ein weiterer Dank geht an Dominik Semmler für die Durchführung der chirurgischen Eingriffe. Prof. Dr. Dr. Andre Heinen danke ich für die fachliche Unterstützung im Bereich extrazellulärer Flussmessungen. Dr. Luzhou Wang danke ich für die Zusammenarbeit und die zahlreichen Gespräche. Meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die gemeinsame Zeit. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Christian Hundhausen, Dr. Marco Piroth, Sara Metry, Lennart Gebert, Dr. Florian Funk, Dr. Tatsiana Suvorava und Dr. Simone Gorressen. Vielen Dank für viele fachliche und private Gespräche, Ratschläge und eure Hilfsbereitschaft. Fedor Brack danke ich für die geduldige Unterstützung. Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Großeltern Najah und Ahmad, meinem Onkel Jalal, meiner Schwester Diana sowie Stefan und Christiane. Ihr wart für mich da, habt mich unterstützt und geduldig beraten. Vielen Dank, dass ihr mich nicht nur während der Promotionszeit begleitet habt.

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Heba Zabri