

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Auswirkungen eines Prädiabetes auf die Herzfunktion unter basalen
Bedingungen, nach Herzinfarkt und nach einer IGF-1-Behandlung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexandra Wistuba

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

Zusammenfassung

Übergewicht stellt einen relevanten Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), sowie bereits für dessen Vorstufe, den Prädiabetes, dar. Die daraus resultierenden metabolischen Veränderungen im Rahmen einer Hyperglykämie und beginnenden Insulinresistenz begünstigen das Auftreten kardiovaskulärer Komorbiditäten, darunter der Myokardinfarkt (MI). Das Herz gilt als metabolisch flexibles Organ, welches sich durch Steuerung der Substratverwertung dem Substratangebot und dem Energiebedarf anpassen kann. Unter physiologischen Bedingungen nutzt es vermehrt Fettsäuren (FS), aber auch Glukose zur Energiegewinnung. Im Rahmen eines MI erhöht sich die Glukoseverwertung deutlich. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines Prädiabetes auf den Metabolismus zu untersuchen und strukturelle Veränderungen im Myokard vor und nach Eintreten eines MI zu charakterisieren.

Dazu wurden männliche Mäuse des C57Bl/6J-Stammes über 10 Wochen mit einer fett- und zuckerhaltigen Diät gefüttert, um ein Modell der diätinduzierten Fettleibigkeit und des Prädiabetes zu etablieren (DIO = „*diet induced obesity*“), während eine Kontrollgruppe ein Standardfutter erhielt. Im prädiabetischen Tiermodell konnte eine signifikante Gewichtszunahme sowie eine echokardiographisch diagnostizierte konzentrische Herzmuskelhypertrophie festgestellt werden. Immunhistochemische Färbungen ergaben jedoch keine vermehrte Kollageneinlagerung. Im Gegensatz dazu führte die Umstellung der Fütterung zu veränderten Genexpressionsmustern, die mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) auf mRNA-Ebene untersucht wurden. Dabei deutet eine gesteigerte Expression von CPT1B, PDK4 und UCP3 auf eine vermehrte FS-Verwertung hin.

Zur Analyse der Auswirkungen eines MI wurde eine intraoperative 45-minütige Ligatur des Ramus interventricularis anterior mit anschließender Reperfusion durchgeführt. Ein Teil der DIO-Mäuse erhielt postoperativ über drei Tage *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) mittels osmotischer Minipumpen. IGF-1 ist ein anaboles Hormon mit struktureller Ähnlichkeit zu Insulin, dem kardioprotektive Effekte nach einem MI nachgewiesen wurden. Trotz vermehrter Kollagen III-Einlagerung nach MI, nachgewiesen immunhistochemisch und mittels qPCR, zeigte sich bei großer Probenvariabilität kein signifikanter fibrotischer Umbau im Myokard der DIO-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Auch die IGF-1-Behandlung führte zu keiner signifikanten Reduktion der Narbengröße (Masson-Trichom-Färbung). Auf transkriptioneller Ebene, untersucht mittels qPCR metabolisch relevanter Gene, wurde deutlich, dass es nach MI im DIO-Modell zu einer weniger gesteigerten Glukoseverwertung kommt, wie sie bei Wildtyp-Tieren nach MI beobachtet wird. Diese Einschränkung könnte auf eine Entkopplung zwischen Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung hinweisen, wodurch die FS-Verwertung relativ zunimmt. Zudem gibt die Hochregulation der *Uncoupling proteins* UCP2 und UCP3 Hinweise auf eine mögliche verminderte mitochondriale Effizienz und eine Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies. Auch in diesem Kontext zeigte IGF-1 keine signifikanten Effekte.

Schlussfolgernd liefert die Arbeit Hinweise auf eine durch Übergewicht und Prädiabetes bedingte metabolische Anpassung des Herzens, wobei eine Herzmuskelhypertrophie als morphologische Kompensation nachgewiesen werden konnte. Ein Voranschreiten der eingeschränkten Glukosetoleranz könnte langfristig zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beitragen. Die Ergebnisse unterstreichen somit die Notwendigkeit präventiver Maßnahmen gegen Übergewicht und Prädiabetes zur Förderung der kardiovaskulären Gesundheit. Obwohl die Gabe von IGF-1 zu keiner signifikanten Änderung beitrug, ließ sich eine leichte Tendenz zu einer positiven protektiven Wirkung erkennen.

Summary

Obesity is a relevant risk factor for the development of T2DM, as well as for its precursor, prediabetes. The resulting metabolic changes, including hyperglycemia and the onset of insulin resistance promote the occurrence of cardiovascular comorbidities, such as MI. The heart is considered a metabolically flexible organ, capable of adapting to changes in substrate availability and energy demand by regulating substrate utilization. Under physiological conditions, the heart primarily uses fatty acids, but also glucose for energy production. In the context of MI glucose utilization increases significantly. The aim of this study was to investigate the effects of prediabetes on metabolism and to characterize structural changes in the myocardium before and after the onset of an MI.

For this purpose, male C57Bl/6J mice were fed a high-fat and high-sucrose diet for ten weeks to establish a model of diet-induced obesity and prediabetes (DIO), while a control group received standard chow. In the prediabetic model, a significant weight gain and echocardiographically diagnosed concentric cardiac hypertrophy were observed. However, immunohistochemical staining did not reveal an increase in collagen deposition. In contrast, the altered diet led to changes in gene expression patterns, analyzed at the mRNA level using quantitative real-time PCR. An increased expression of CPT1B, PDK4, and UCP3 indicated enhanced fatty acid metabolism.

To analyze the impact of MI, a 45-minute surgical ligation of the left anterior descending artery was performed, followed by reperfusion. A subset of DIO mice received IGF-1 postoperatively for three days via osmotic minipumps. IGF-1 is an anabolic hormone structurally similar to insulin, and cardioprotective effects have been demonstrated in the context of MI. Despite increased collagen III deposition after MI, confirmed by immunohistochemistry and qPCR, no significant fibrotic remodeling was detected in the myocardium of DIO mice compared to wild-type controls, likely due to high sample variability. IGF-1 treatment did not significantly reduce scar size, as assessed by Masson's trichrome staining.

On the transcriptional level, analysis of metabolically relevant genes via qPCR revealed that DIO mice exhibited a reduced shift toward glucose utilization after MI, a response typically seen in wild-type animals. This restriction could indicate an uncoupling between glycolysis and oxidative phosphorylation, leading to a relative increase in fatty acid oxidation. In addition, the upregulation of uncoupling proteins UCP2 and UCP3 suggests decreased mitochondrial efficiency and a reduction in reactive oxygen species. IGF-1 treatment did not result in significant changes in this context either.

In conclusion, this study provides evidence of metabolic adaptation caused by obesity and prediabetes, with cardiac hypertrophy as a compensatory mechanism. A progression of impaired glucose tolerance could contribute to the development of heart failure in the long term. The results thus underline the importance of preventive measures against obesity and prediabetes to promote cardiovascular health. Although the administration of IGF-1 did not contribute to any significant change, a slight trend toward a beneficial, protective influence was observed.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>Area at risk</i>
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Proteinkinase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
B-Mode	<i>Brightness modulation</i>
Ca ²⁺	Calcium
CACT	Carnitin-Acylcarnitin-Translokase
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CPT1(A-C)	Carnitin-Palmityltransferase 1 (A-C)
CPT2	Carnitin-Palmityltransferase 2
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
d	Diastole
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DIO	<i>Diet induced obesity</i>
dl	Deziliter
EKG	Elektrokardiogramm

ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FAT	Fettsäuretranslokase (CD36)
FATP	Fettsäuretransportproteine
FS	Fettsäuren
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
GLUT1	Glukosetransporter 1
GLUT4	Glukosetransporter 4
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
H ₂ O	Wasser
I/R	Ischämie mit Reperfusion
IFG	<i>Impaired fasting glucose</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor 1</i> Rezeptor
IGFBPs	<i>Insulin-like growth factor binding proteins</i>
IGT	<i>Impaired glucose tolerance</i>
IL-6	Interleukin-6
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrate
ITT	Insulintoleranztest
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPL	Lipoproteinlipase

LVAW	<i>Left ventricular anterior wall</i>
LVID	<i>Left ventricular internal diameter</i>
LVPW	<i>Left ventricular posterior wall</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MCD	Malonyl-CoA-Decarboxylase
MCP	<i>Mitochondrial pyruvat carrier</i>
MCT1	Monocarboxylattransporter 1
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M-Mode	<i>Motion modulation</i>
mTORC2	<i>Mammalian target of rapamycin complex 2</i>
ng	Nanogramm
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
O ₂	Sauerstoff
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCI	perkutane koronare Intervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PDK	PDH-Kinase

PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PDK4	PDH-Kinase 4
PFK-1	Phosphofruktokinase 1
PFK-2	Phosphofruktokinase 2
PGC-1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PKB	Proteinkinase B / Akt
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha
PPRE	<i>PPAR response elements</i>
PSLA	<i>Parasternal long axis</i>
qPCR	<i>quantitative Real-Time polymerase chain reaction</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s	Systole
SAX	<i>Short axis</i>
SHC	<i>Src homology collagen</i>
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TAG	Triacylglyceride
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

UCP (1-5)	<i>Uncoupling protein (1-5)</i>
VLDLs	<i>Very low density lipoproteins</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Herz: Funktion und Metabolismus	1
1.1.1 Schlüsselstellen der Regulation des Herzmetabolismus.....	4
1.1.2 Insulin und seine Funktion im Herzen.....	7
1.1.3 Die Rolle der <i>Uncoupling-proteins</i>	10
1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und das Syndrom der Herzinsuffizienz	12
1.3 Myokardinfarkt.....	13
1.3.1 Veränderungen des Herzmetabolismus nach Myokardinfarkt	14
1.3.2 Kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt	17
1.4 Adipositas und ihre Auswirkungen auf die Herzfunktion	18
1.5 Diabetes mellitus	19
1.6 Veränderungen des Herzmetabolismus durch Übergewicht und T2DM.....	20
1.7 <i>Insulin-like growth factor 1</i>	22
1.8 Ziele der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Laborgeräte und Zubehör	26
2.2 Chemikalien und weitere Substanzen.....	28
2.3 Puffersystem	30
2.4 Antikörper.....	30
2.5 Kits	30
2.6 Primer	30
2.7 Verwendete Softwareprogramme	31

2.8	Arbeiten mit Mäusen	32
2.8.1	Tierschutz	32
2.8.2	Tierhaltung und Fütterung	32
2.8.3	Echokardiografie	33
2.8.4	Operation der Mäuse	36
2.8.5	Präparation und Organentnahme	39
2.9	Histologie	40
2.9.1	Präparation der Herzen	40
2.9.2	Schneiden am Kryostaten	40
2.9.3	Masson-Trichom-Färbung	41
2.9.4	Kollagen III-Färbung (Immunfluoreszenz)	43
2.10	RNA – Isolation.....	45
2.10.1	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	47
2.11	Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	47
2.11.1	Allgemeines Prinzip	47
2.11.2	Reverse Transkription.....	48
2.11.3	Quantitative „Real - Time“ PCR	48
2.12	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Die Umstellung auf eine fett- und zuckerhaltige Diät führt zu einer deutlichen Gewichtszunahme	52
3.2	Echokardiographische Untersuchungen zeigen morphologische Veränderungen des linken Ventrikels bei DIO-Mäusen	53
3.2.1	DIO-Mäuse weisen ein verdicktes linksventrikuläres Myokard und ein verkleinertes Ventrikellumen auf.....	54
3.2.2	Die hochkalorische Diät führt zur Zunahme der linksventrikulären Masse	57
3.3	Analyse des Gehalts an reaktiver Fibrose in DIO-Mäusen vor und nach Eintreten eines Myokardinfarktes.....	58

3.3.1	DIO-Mäuse zeigen keine veränderte Kollagen III-Einlagerung in der Immunfluoreszenz.....	59
3.3.2	Vermehrte Kollagen III-Expression im Rahmen des <i>Remodelings</i> nach MI ..	61
3.3.3	IGF-1 zeigt keinen Effekt auf die Narbengröße bei DIO-Mäusen	63
3.4	Veränderter Metabolismus bei DIO-Mäusen	65
3.4.1	Prädiabetes führt bei DIO-Mäusen zu veränderten Genexpressionsmustern im Fettsäure- und im Glukosemetabolismus	66
3.4.2	DIO-Mäuse zeigen leicht veränderte Genexpression im Myokard auf regulatorischer Ebene.....	67
3.4.3	Das Narbengewebe zeigt eingeschränkte Genexpression	69
3.4.4	Veränderte Genexpression der <i>Uncoupling proteins</i> gibt Hinweis auf Einfluss in Metabolismus.....	73
4	Diskussion.....	78
4.1	Herzmuskelhypertrophie als Kompensationsmechanismus bei Prädiabetes	79
4.2	Fibrotische Umbauprozesse im prädiabetischen Modell nicht sichtbar	80
4.2.1	Große Variabilität maskiert strukturelle Umbauprozesse nach MI im prädiabetischen Myokard	83
4.2.2	Anzeichen für protektive Effekte von IGF-1 im Rahmen des <i>Remodelings</i> ...	84
4.3	Prädiabetes steigert myokardiale FS-Verwertung	87
4.4	Änderung der metabolischen Flexibilität nach MI im prädiabetischen Modell ..	89
4.5	Hinweise für Einfluss von UCP2 und UCP3 auf Metabolismus.....	91
4.6	Veränderung der Struktur und Funktionalität im Narbengewebe	93
4.7	Schlussfolgerungen.....	94
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	96
6	Anhang	116
6.1	Weitere Darstellung der Genexpressionsanalysen	116
7	Danksagung.....	117

1 Einleitung

1.1 Das Herz: Funktion und Metabolismus

Das Herz, lateinisch „*Cor*“, ist das zentrale Hohlorgan des kardiovaskulären Systems und spielt mit seiner Pumpfunktion eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Blutversorgung im Körper und dem Transport essentieller Stoffe in die Peripherie. Als Hauptakteur sorgt es für die Verteilung von Sauerstoff (O₂) und Nährstoffen wie Glukose, Fettsäuren (FS), Vitaminen und Aminosäuren (AS) zu den Zellen im Körper und ist für den Abtransport von Stoffwechselendprodukten wie Kohlendioxid (CO₂), Wasser (H₂O) und Harnstoff zuständig [1]. Es erzeugt eine hohe Menge an Adenosintriphosphat (ATP) aus unterschiedlichen Substratquellen wie Kohlenhydraten (Glukose, Laktat), FS, AS und Ketonen. Dadurch wird eine kontinuierliche Energieproduktion ermöglicht, um die Funktionsfähigkeit der Kardiomyozyten unter verschiedenen Stoffwechsellagen aufrechtzuerhalten und zu regulieren [2]. Über 95 % des ATP werden dabei durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien der Kardiomyozyten generiert [3], die mindestens 30 % des Zellvolumens ausmachen [4], während die restlichen 5 % durch Glykolyse erzeugt werden. Die Fettsäureverwertung in den Mitochondrien im Rahmen der β -Oxidation trägt mit 60-90 % zum Hauptteil der ATP-Produktion im gesunden Herzen bei. 10-40 % des ATP generiert die Herzmuskelzelle durch die Oxidation von Glukose und Laktat [5-7]. Aufgrund dieser vielfältigen Substratverwertung ist das Herz in der Lage, sich an unterschiedliche Anforderungen (erhöhte Arbeitsbelastung und Nährstoffbedarf) und an das Substratangebot anzupassen, was als metabolische Flexibilität bezeichnet wird [8].

Die Fettsäureverwertung (Abb. 1.1; rechter Bildanteil) erfolgt durch die β -Oxidation und nutzt sowohl freie FS, die an Plasmaalbumin gebunden sind, als auch Triacylglyceride (TAG), die durch Chylomikronen aus der Leber oder verpackt zu VLDLs („*Very low density lipoproteins*“) transportiert werden [9]. Die Freisetzung der FS aus Chylomikronen und VLDLs erfolgt durch die Lipoproteinlipase (LPL)-vermittelte Lipolyse [10]. Die FS überwinden die Zellmembran der Kardiomyozyten anschließend über passive Diffusion oder werden durch Fettsäuretransportproteine (FATP) und die Fettsäuretranslokase (FAT / CD36) in die Zelle aufgenommen [11, 12]. Im Zytoplasma werden die FS über die Acyl-CoA-Synthase zu (Fettsäure-) Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) aktiviert. Ein Großteil des Acyl-CoA wird je nach Stoffwechsellage zu den Mitochondrien transportiert, um in die

β -Oxidation eingeschleust zu werden, während der Rest als TAG-Reserve im Kardiomyozyt gespeichert wird und bei einem Energiedefizit mobilisiert werden kann. [13, 14].

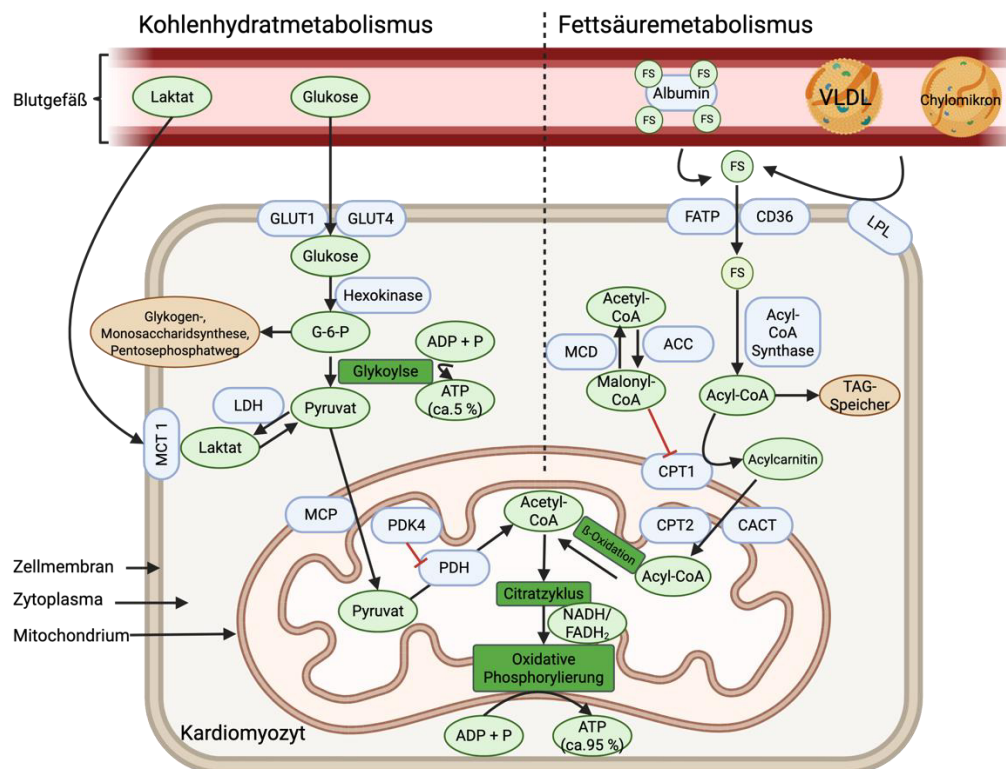


Abb. 1.1: Übersicht über Stoffwechselwege in Kardiomyozyten. Rechter Bildanteil: Freie Fettsäuren (FS) werden über Fettsäuretransportproteine (FATP) oder die Fettsäuretranslokase CD36 in das Zytoplasma aufgenommen und dort in Acyl-CoA umgewandelt. Zur weiteren Energiegewinnung erfolgt der Eintritt ins Mitochondrium über die Carnitin-Palmityltransferasen 1 und 2 (CPT1, CPT2), wo Acyl-CoA im Rahmen der β -Oxidation zu Acetyl-CoA synthetisiert wird. Linker Bildanteil: Die Glukoseverwertung erfolgt nach der Aufnahme in die Zelle über die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 durch Glykolyse, wodurch aus Glukose-6-Phosphat (G-6-P) Pyruvat entsteht. Dieses wird entweder durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat umgewandelt oder in die Mitochondrien eingeschleust und über den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH) zu Acetyl-CoA konvertiert. Die gemeinsame Endstrecke des Kohlenhydrat- und FS-Metabolismus besteht aus der Einschleusung von Acetyl-CoA in den Citratzyklus, wonach mittels oxidativer Phosphorylierung und der Nutzung der Reduktionsäquivalente NADH und FADH₂ Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert wird. Reguliert werden die Prozesse unter anderem durch die PDH-Kinase 4 (PDK4) und Malonyl-CoA. Abb. erstellt mit BioRender.com

Aufgrund der Undurchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Acyl-CoA existiert ein Shuttle-System. Acyl-CoA wird durch die Carnitin-Palmityltransferase 1 (CPT1) in der äußeren Mitochondrienmembran an Carnitin gekoppelt (Acylcarnitin) und unter Freisetzung von Coenzym A durch Porine mit Hilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) im

Antiport mit Carnitin in das Mitochondrium transportiert. CPT1 ist dabei das geschwindigkeitslimitierende Enzym für die Aufnahme von FS. Im Herz- und Skelettmuskel dominiert die Isoform CPT1B (codiert durch das Gen *Cpt1b*), während CPT1A vor allem in der Leber und CPT1C im Gehirn exprimiert wird [15]. Acylcarnitin wird im weiteren Verlauf durch die Carnitin-Palmityltransferase 2 (CPT2), welche sich auf der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran befindet, in Acyl-CoA umgewandelt und anschließend der β -Oxidation zugeführt [16, 17]. Als physiologischer Inhibitor dieser Transportschritte fungiert Malonyl-CoA, der die CPT1 hemmt. Malonyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) synthetisiert und durch die Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD) abgebaut [18]. Während der β -Oxidation wird Acyl-CoA zu Acetyl-CoA reduziert, was zur Produktion von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 führt. Das entstandene Acetyl-CoA wird in den Citratzyklus eingeschleust und zu CO_2 oxidiert. Die daraus resultierende Energie wird ebenfalls in Form der Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 gespeichert. In der Atmungskette wird dann im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Synthase durch Elektronentransport Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP synthetisiert [19, 20].

Eine weitere wichtige Energiequelle zur ATP-Generierung ist die Kohlenhydratverwertung durch Glukose und in geringem Maße durch Laktat (Abb. 1.1; linker Bildanteil). In Kardiomyozyten erfolgt die Glukoseaufnahme hauptsächlich durch Diffusion über zwei Isoformen des Glukosetransporters: den Insulin-unabhängigen Glukosetransporter 1 (GLUT1) und den Insulin-abhängigen Glukosetransporter 4 (GLUT4) [21]. Während GLUT1 vor allem unter basalen Bedingungen die Glukoseaufnahme über das Sarkolemm steuert und dominant während der fötalen und postnatalen Periode vorherrscht [22], wird GLUT4, die Hauptisoform im erwachsenen Herzen, insulinabhängig exprimiert (Gen *Slc2a4*). GLUT4 unterliegt der Translokation aus intrazellulären Vesikeln an die Plasmamembran als Reaktion auf Stimuli wie eine erhöhte Arbeitsbelastung, Ischämie und Insulin [23, 24]. Nach dem Zelleintritt wird Glukose durch die Hexokinase (II) zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert. G-6-P kann nun für die Glykogen- und Monosaccharidsynthese oder den Pentosephosphatweg (Synthese von Pentosephosphaten und NADPH) verwendet werden, jedoch erfolgt der größte Anteil der Weiterverarbeitung von G-6-P durch die Glykolyse. Dabei entstehen aus einem Mol Glukose 2 Mol Pyruvat, 2 Mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ und 2 Mol ATP [20]. Das produzierte Pyruvat kann unter anaeroben Bedingungen durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in Laktat umgewandelt werden oder

unter aerober Stoffwechsellage mithilfe des spezifischen Transporters „*Mitochondrial pyruvat carrier*“ (MCP) in das Innere der Mitochondrien importiert werden [25]. Zusätzlich dient zirkulierendes Laktat auch als direkte Substratquelle und wird über den Monocarboxylattransporter 1 (MCT1) in die Zelle geschleust und in Pyruvat umgewandelt [26]. Im Mitochondrium wird Pyruvat durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH) irreversibel zu Acetyl-CoA konvertiert (oxidative Decarboxylierung), was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glukoseoxidation darstellt und unter anderem durch Produkte wie Acetyl-CoA und NADH nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung reguliert wird. Acetyl-CoA wird dann in den Citratzyklus eingeschleust und wie bereits bei der Fettsäureverwertung beschrieben weiterverarbeitet [27, 28]. Die vollständige Oxidation eines Glukosemoleküls unter aeroben Bedingungen führt zu 31 ATP-Molekülen und einem O₂-Verbrauch von 6 Molekülen [8, 29]. Verglichen damit generiert die komplette Oxidation eines Palmitat-Moleküls (FS) 105 Moleküle des ATP, verbraucht jedoch 23 O₂ Moleküle [19].

Unter verlängerten Fastenbedingungen tragen auch Ketonkörper und Aminosäuren zur ATP-Erzeugung bei, indem sie in Zwischenprodukte des Citratzyklus und zu Acetyl-CoA umgewandelt werden [30, 31].

1.1.1 Schlüsselstellen der Regulation des Herzmetabolismus

Die Regulation der verschiedenen Stoffwechselwege erfolgt auf vielfältige Weise, unter anderem durch die Aktivierung und Inhibierung bestimmter Regulorenzyme oder ihrer Transkriptionsfaktoren und die Translokation von Transportern [3]. Im Weiteren werden Regulationsmechanismen beschrieben, die für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche relevant sind. Es sind jedoch weitere Signalwege bekannt, die eine Rolle im Herzmetabolismus spielen.

Die Verwendung von FS und Glukose korreliert miteinander, wie von Philip Randle beschrieben wurde. Dieser Zusammenhang ist als „Randle-Zyklus“ oder „Glukose-Fettsäure-Zyklus“ bekannt. Es wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Fettsäureoxidation im Herzen zu einer verminderten Glukoseoxidation führt und umgekehrt [32, 33]. Die Glukoseverwertung benötigt jedoch weniger O₂ pro generiertem ATP, weshalb die gezielte Substratnutzung und Interaktion der Substrate als relevanter pathophysiologischer Mechanismus bei kardiovaskulären Erkrankungen gilt [34, 35].

Der Eintritt von Glukose in die Zelle wird über den transmembranen Glukosegradienten und wie bereits beschrieben durch die Translokation von GLUT4 an die Plasmamembran reguliert [23, 24, 36]. Dies erhöht die Aufnahmekapazität für Glukose. Die Translokation wird auch durch eine Aktivierung der AMP-abhängigen Proteinkinase (AMPK) stimuliert [37]. Als Schlüsselenzyme der Glykolyse gelten die Phosphofruktokinase 1 und 2 (PFK-1, PFK-2), die unter anderem durch ihre Substrate aber auch durch ADP / ATP und die AMPK reguliert werden [38, 39].

Die AMPK fungiert als Schlüsselenzym bei zellulärem Energiemangel und führt allgemein durch ihre Aktivierung zu einer vermehrten ATP-Synthese unter anderem durch Aktivierung der Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung [40, 41]. Des Weiteren führt ihre Aktivierung zu einer erhöhten FS-Aufnahme durch Translokation von CD36, und sie inhibiert die ACC durch Phosphorylierung. Dies führt wiederum zu einer verminderten Synthese von Malonyl-CoA (Abb. 1.1) und damit zu einer geringen Inhibierung der CPT1B, so dass durch erhöhte FS-Aufnahme ins Mitochondrium dort die β -Oxidation vermehrt stattfinden kann [18, 42].

Wie bereits erwähnt, ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Glukoseoxidation die irreversible Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, katalysiert durch den PDH-Komplex. Dieser Multienzymkomplex besteht aus drei Untereinheiten und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [43]. Die Inaktivierung erfolgt durch Phosphorylierung der E₁-Untereinheit mittels einer spezifischen PDH-Kinase (PDK), während die PDH durch eine PDH-Phosphatase aktiviert wird [44, 45]. PDK wird durch Pyruvat, ADP und abfallende Acetyl-CoA- und NADH-Spiegel gehemmt [46], während vermehrtes Acetyl-CoA- und NADH, beispielsweise durch erhöhte β -Oxidation, aber auch ATP die PDK aktivieren [47]. Vier Isoformen sind bislang bekannt, wobei PDK4 (Gen *Pdk4*) die dominante Form des Herzens ist [48] (Abb. 1.1). Die Expression von PDK4 wird unter anderem durch Liganden der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) induziert, was darauf hindeutet, dass ihre Expression durch die Aktivität von PPAR-Transkriptionsfaktoren gesteuert wird [49]. Auch vermehrt zirkulierende Lipide und die intrazelluläre Anhäufung langkettiger FS verstärken die PPAR α vermittelte Expression von PDK4, wie es unter anderem bei Hungerzuständen oder Diabetes mellitus beschrieben wurde. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von PDH und einer verringerten Oxidation von Pyruvat [50, 51]. Die Aktivierung des PDH-Komplexes durch die PDH-

Phosphatase wird getriggert durch erhöhte Kalzium- und Magnesiumspiegel (Ca^{2+} , Mg^{2+}), die Folge einer adrenergen Stimulation des Herzens sind [52, 53] (Abb. 1.2).

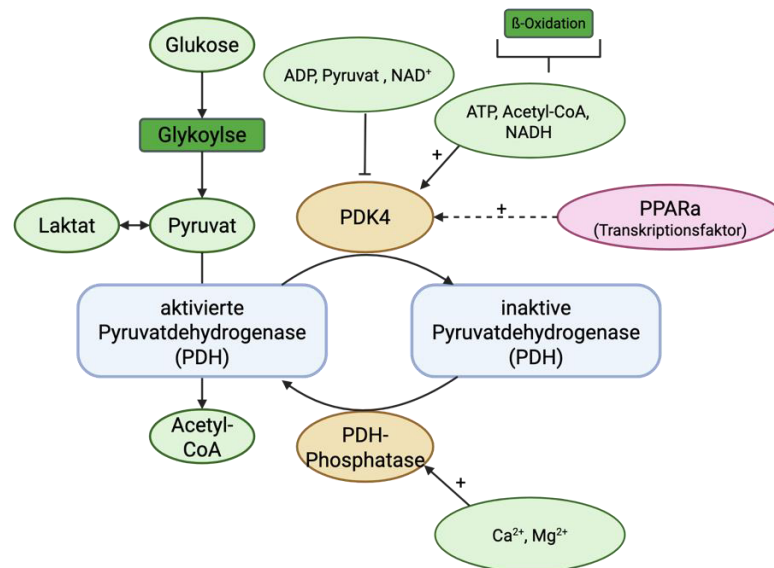


Abb. 1.2: Regulation der Pyruvatdehydrogenase (PDH)-Aktivität. Der PDH-Komplex im Mitochondrium wandelt in seiner aktivierten Form Pyruvat aus der Glykolyse in Acetyl-CoA um. Die aktivierte Form der PDH entsteht durch die PDH-Phosphatase, die durch Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) getriggert wird. Die Hemmung der PDH erfolgt über die PDH-Kinase 4 (PDK4), die durch ATP, Acetyl-CoA und NADH unter anderem aus der β -Oxidation aktiviert wird und durch den Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor alpha (PPAR α) in der Expression gesteuert wird. Abb. erstellt mit BioRender.com

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gehören zur Gruppe der nuklearen Rezeptoren und sind wichtige Transkriptionsregulatoren insbesondere für die myokardiale FS-Oxidation. Es gibt verschiedene Unterformen: PPAR α , die Hauptisoform des Herzens, die durch das Gen *Ppara* codiert wird, PPAR δ und PPAR γ , die ebenfalls den FS-Metabolismus des Herzens modulieren, jedoch nicht in dieser Arbeit untersucht wurden [19]. PPARs kontrollieren die Genexpression metabolischer Enzyme durch die Bildung von heterodimeren Komplexen mit Retinoidrezeptoren der RXR-Klasse und im Folgenden der Bindung an spezifische „PPAR response elements“ (PPRE) im Promotorbereich von Ziel-Genen nach Aktivierung über physiologische (verschiedene FS) und pharmakologische Liganden [54, 55]. Dieser Mechanismus wird unter anderem bei Fettstoffwechselstörungen durch Agonisten wie Fibrate für PPAR α genutzt [20, 56]. Der PPAR/RXR-Komplex wird positiv über den Ko-Faktor PGC-1 (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*) reguliert, der auf eine Vielzahl von Stimuli wie Hunger und Veränderungen

in der Substratverfügbarkeit reagiert [57-59]. Zu den Stoffwechsellenzymen, deren Transkription durch PPAR α induziert wird, gehören wie bereits beschrieben PDK4, aber auch CD36, CPT1, MCD, LPL, die *Uncoupling proteins 2 und 3* (siehe Kapitel 1.1.3) und viele weitere [19, 60-62] (Abb. 1.3).

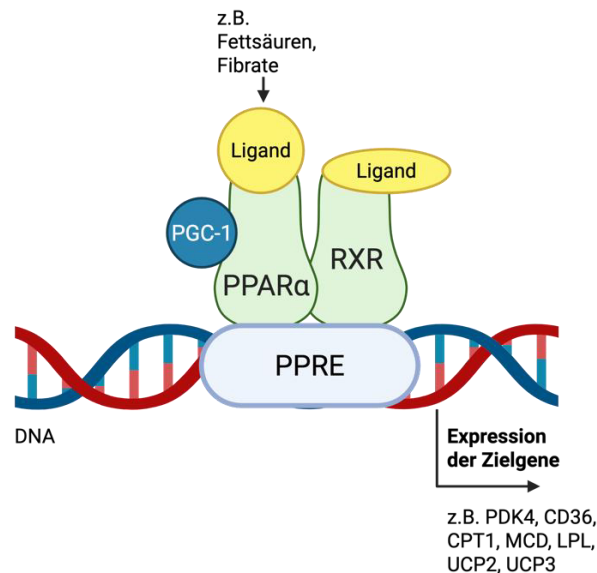


Abb. 1.3: Regulation der Expression metabolischer Gene in Kardiomyozyten durch den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha (PPAR α). Die Kontrolle der Genexpression metabolisch relevanter Gene wie PDK4 und CPT1 erfolgt durch Liganden und Ko-Faktorbindung an PPAR α und Bildung eines Komplexes mit Retinoidrezeptoren der RXR-Klasse. Der Komplex bindet an spezifische „PPAR response elements“ (PPRE) im Promotorbereich von Ziel-Genen. Abb. erstellt mit BioRender.com

1.1.2 Insulin und seine Funktion im Herzen

Der Herzmetabolismus unterliegt nicht nur einer intrinsischen Regulation, sondern auch der Einflussnahme von Hormonen und Signalmolekülen, die in anderen Organen gebildet und sezerniert werden, wie beispielsweise Insulin und sein Gegenspieler Glukagon, die in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet werden, dem wichtigsten Organ für die Regulierung der Blutglukosespiegel.

Insulin entsteht aus einer einkettigen Vorstufe, dem Proinsulin, dessen Transkription durch mehrere Transkriptionsfaktoren synergistisch aktiviert wird und somit durch externe Stimuli wie Glukose reguliert werden kann. Posttranslational wird Proinsulin mithilfe von spezifischen Proteasen durch Entfernung eines C-Peptids zu Insulin modifiziert [63, 64]. Die Hauptfunktion ist die Regulation der Glukoseaufnahme in Insulin-abhängige Gewebe wie der Skelettmuskulatur, dem Fettgewebe und auch im Herzen und damit die Senkung des

Blutglukosespiegels [65]. Weitere Aufgaben des Insulins sind unter anderem die Förderung der Glykolyse und Glykogensynthese in Leber und Muskel, die Hemmung der Lipolyse und die Förderung der Speicherung energiereicher Substrate im Muskel- und Fettgewebe [20].

Auch das Herz ist ein von Insulin abhängiges Organ. Insulin fördert Glukose als primäre Energiequelle und senkt dadurch den O₂-Verbrauch des Myokards, wodurch die kardiale Effizienz verbessert wird. Dies ist vor allem bei metabolischem Stress von Bedeutung [66]. Insulin bindet an der Oberfläche Insulin-abhängiger Zellen wie Kardiomyozyten an einen spezifischen Transmembranrezeptor, den Insulinrezeptor (IR), der zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört. Er ist ein tetrameres Membranprotein bestehend aus zwei extrazellulär gelegenen α -Untereinheiten und zwei transmembranen β -Untereinheiten [67, 68]. Die Bindung von Insulin als Ligand an die extrazellulären Anteile führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase der β -Untereinheit und anschließend zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung dieser β -Untereinheiten [69]. Dadurch werden Bindungsstellen für Insulinrezeptorsubstrate (IRS) geschaffen, von denen hauptsächlich die Isoformen IRS1 und IRS2 im Herzen exprimiert werden. Sie werden ebenfalls durch die Rezeptor-Tyrosinkinasen phosphoryliert und bilden wiederum weitere Bindungsstellen für Proteine, vor allem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und das Protein GRB2 [70, 71]. Die Aktivierung der PI3K führt zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃), was wiederum die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) rekrutiert, die die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB / Akt) an der Aminosäure Threonin 308 katalysiert. Es erfolgt eine zweite Phosphorylierung der PKB durch den mTORC2-Komplex (*mammalian target of rapamycin complex 2*) an der Aminosäure Serin 473, was zur vollständigen Aktivität der Kinase führt [72-74]. Dies induziert die Signalkaskade des Rab-GTPase-aktivierenden Proteins AS 160, welches eine notwendige Voraussetzung für die insulinstimulierte Translokation von GLUT4 aus Vesikeln in die Plasmamembran ist [75]. Die Akt / PKB ist neben Induktion des Glukosetransportsystems auch ein zentrales Signalmolekül für die insulinstimulierte Glykogensynthese. Sie inaktiviert die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3), wodurch die Glykogensynthase in ihrer aktiven Form verbleibt [76].

Neben der Induktion des PI3K-Signalweges führt die Aktivierung der IRS oder aber des Adaptermoleküls SHC (*Src homology collagen*) auch zur Bindung des Protein GRB2 und der Ras-mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, einer nicht metabolischen

Zellantwort. In der Kaskade werden die „*extracellular-signal regulated kinases*“ (ERKs) aktiviert, die die Transkription von Genen regulieren, die für Zelldifferenzierung und Proliferation verantwortlich sind [77-79] (Abb. 1.4).

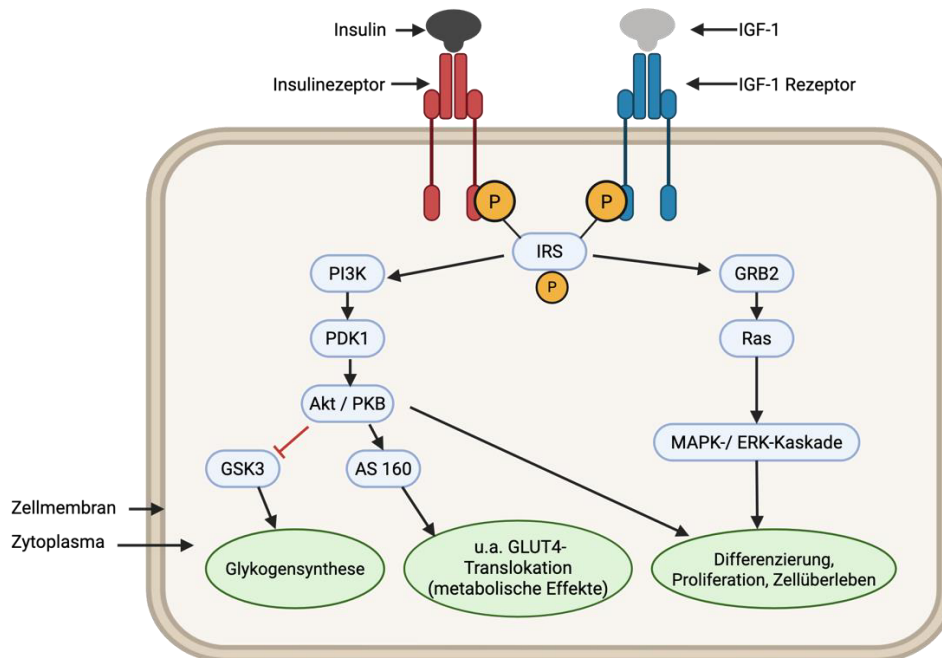


Abb. 1.4: Darstellung der Signaltransduktion durch Insulin oder *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1). Nach der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor oder IGF-1 an den IGF-1 Rezeptor (siehe Kapitel 1.7) führt die Autophosphorylierung der jeweiligen Rezeptoren zur Bindung von Insulinrezeptorsubstraten (IRS), die wiederum nach einer Phosphorylierung die einzelnen Signalwege aktivieren. Die PI3K-Signaltransduktion führt zu einer Aktivierung der Akt / PKB (Proteinkinase B), die über verschiedene weitere Schritte vor allem Auswirkungen auf den Metabolismus hat. Die Aktivierung der MAPK- beziehungsweise ERK-Kaskade durch Insulin oder IGF-1 hat einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und Proliferation. Abb. erstellt mit BioRender.com

Eine weitere Funktion des Insulins im Herzen ist die Förderung der Glykolyse und somit die Substratverwertung von Glukose. Es stimuliert die Hexokinase II (Abb. 1.1) und PFK-2, die Fructose-2,6-bisphosphat synthetisiert, was ein potenter Stimulus der PFK-1 ist, die als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse gilt [80]. Parallel wird auch die FS-Aufnahme in die Zellen durch Insulin induziert. Dies erfolgt durch die Insulin-abhängige Translokation des Fettsäuretransporters CD36 in die Plasmamembran [81]. Im Gegensatz zu Glukose scheint die FS-Aufnahme nicht zu einer gesteigerten Substratverwertung in Form der β -Oxidation zu führen, sondern zur Auffüllung der intrazellulären Lipidspeicher [82].

1.1.3 Die Rolle der *Uncoupling-proteins*

Neben den klassischen Signalwegen, die den Metabolismus des Herzens beeinflussen, gibt es auch Proteine, die in erster Linie eine metabolisch unabhängige Funktion haben, jedoch trotzdem auf die Fettsäure- und Glukoseverwertung einwirken. Dazu gehören die *Uncoupling proteins* (UCPs), die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Die Familie der UCPs besteht aus fünf Untergruppen. UCP1, auch Thermogenin genannt wird vor allem in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes exprimiert und spielt eine Rolle bei der Regulierung der Körpertemperatur durch Kontrolle der Fettspeicherung [83]. Die Hauptaufgabe von UCP2-5 besteht darin, oxidativen Stress unter bestimmten Bedingungen zu reduzieren und somit zytoprotektive Wirkungen auszuüben. Oxidativer Stress entsteht dabei vor allem durch die Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), unter anderem als Nebenprodukt der Atmungskette [84]. Die Anhäufung der ROS induziert zahlreiche Veränderungen von Signalwegen, wie die AKT- und AMPK-Signalwege, DNA-Schäden, eine irreversible Beeinträchtigung der Mitochondrien und eine unzureichende ATP-Synthese bis hin zur Zellschwellung und zum Zelltod (Apoptose) [85]. Dies führt zu vielen Erkrankungen wie der Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch Herzmuskelhypertrophie und Kardiomyozytenuntergang, aber auch zu chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie die Artherosklerose [86]. UCPs sind mitochondriale Anionentransportproteine, die die Produktion von ROS kontrollieren. Unter physiologischen Bedingungen bei niedrigem Energiebedarf der Zelle entkoppeln sie den Protonenfluss der oxidativen Phosphorylierung im Rahmen der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran (Protonenleck), sodass die ATP-Synthese folglich reduziert wird und wandeln die dabei entstehende Energie in Wärme anstelle von ATP um [87]. Vereinfacht ausgedrückt führt dieses Protonenleck zu einer verminderten ROS-Produktion durch Reduktion des Elektronenlecks [88]. Dies wurde insbesondere für UCP1 nachgewiesen, während bei UCP2 und UCP3 von einer deutlich geringeren Transportkapazität für Protonen ausgegangen wird [89] (Abb. 1.5).

Im weiteren Verlauf wird ein Fokus auf UCP2 und UCP3 im kardiovaskulären Kontext gelegt, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Ihre physiologische und pathophysiologische Funktion ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. UCP2 wird ubiquitär exprimiert darunter in Milz, Niere, Pankreas, im zentralen Nervensystem und Herz, während UCP3 vor allem im Skelettmuskel, braunem Fettgewebe aber auch im Herzen nachgewiesen werden konnte [90, 91]. Auf Proteinebene zeigten sich hohe UCP2-Spiegel in proliferativen Zellen, wie Krebszellen, Stamm- und Immunzellen und in embryonalen Zellen

des murinen Herzens, die vor allem Glukosestoffwechsel betreiben [92-94], während UCP3 vornehmlich in Zellen synthetisiert wird, die Fettsäuren im Rahmen der β -Oxidation verwerten [95]. Eine Hauptaufgabe von UCP2 und UCP3 scheint die ROS-Reduktion zu sein. So konnte in UCP2- und UCP3-Knockout-Mäusen eine erhöhte ROS-Produktion nachgewiesen werden [96, 97].

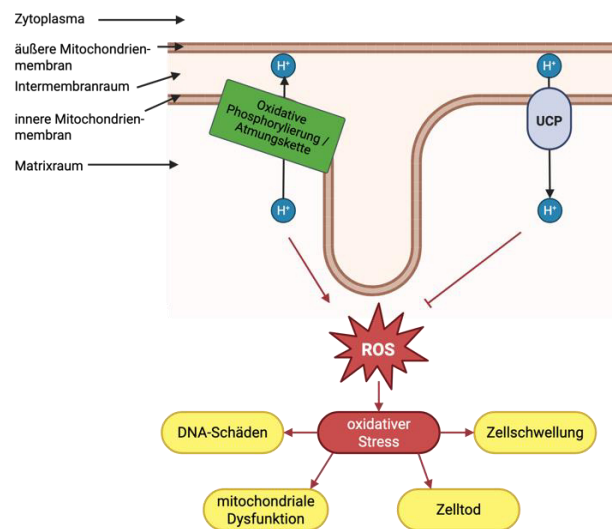


Abb. 1.5: Orientierende Übersicht des Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Generierung von ROS im Mitochondrium erfolgt unter anderem im Rahmen der Atmungskette, während die *Uncoupling proteins* (UCPs) die ROS-Produktion durch Protonentransport hemmen. Eine gesteigerte ROS-Produktion führt zu oxidativem Stress durch Zellschäden. Abb. erstellt mit BioRender.com

UCP2 hat auch metabolische Funktionen. Es reguliert die Glukose-stimulierte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas negativ und begünstigt pathophysiologisch die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 [98]. Zudem konnte eine erhöhte UCP2-Expression bei Adipositas nachgewiesen werden, ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer Insulinresistenz. [99]. UCP2 zeigt jedoch auch protektive Effekte. Neben Reduktion der ROS, konnte eine reduzierte endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden, die mit der Entstehung der Artherosklerose in Verbindung steht [100]. Zudem scheint UCP2 eine Wirkung auf die Calciumhomöostase zu haben [101, 102].

UCP3 zeigt eine Überexpression bei Anhäufung von FS im Skelett- und Herzmuskel [103]. So konnte eine direkte Korrelation zwischen UCP3-Spiegeln und der Expression mitochondrialer FS-Marker während der Herzentwicklung beobachtet werden, die darauf hindeuten, dass UCP3 die FS-Verwertung im Rahmen der β -Oxidation begünstigt [94, 104,

105], eventuell getriggert durch einen FS-Transporter in die mitochondriale Matrix [94]. Vielmehr scheint UCP3 in den Export von mitochondrialen FS-Anionen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum involviert zu sein, um so die Mitochondrien vor einer FS-Akkumulation und Lipidperoxidation zu schützen [106, 107]. Dies könnte in der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 von Bedeutung sein, da die Erkrankung unter anderem durch Fettansammlungen in der Muskulatur und mitochondriale Schäden gekennzeichnet ist, die kompensatorisch zu einer Überexpression von UCP3 und vermehrter FS-Verwertung führen [84, 108, 109].

Im Herzen wird die Transkription, Translation und posttranslationale Modifikation von UCP2 und UCP3 unter anderem durch PPAR α , die Zirkulation freier FS, ROS und ATP reguliert. [110, 111].

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und das Syndrom der Herzinsuffizienz

Die Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems sind die häufigste Todesursache in Deutschland und verursachten 2022 34 % aller Todesfälle mit 358.219 Verstorbenen [112]. Dabei zählen die chronisch ischämische Herzkrankheit (KHK), der akute Myokardinfarkt (MI) und die Herzinsuffizienz zu den Hauptursachen. Sie machten 2021 zusammen mit der hypertensiven Herzkrankheit sowie Vorhofflattern und Vorhofflimmern einen Anteil von insgesamt 19,5 % an allen Todesursachen aus [113].

Die Herzinsuffizienz ist dabei kein eigenständiges Krankheitsbild, sondern ein klinisches Syndrom, das sich durch eine unzureichende Blut- und Sauerstoffversorgung des Körpers auszeichnet [114]. Typische Symptome sind Dyspnoe, Knöchelödeme und Leistungsminderung (*Fatigue*), die durch strukturelle und/oder funktionelle kardiale Anomalien verursacht werden und zu einer erhöhten ventrikulären Druckbelastung oder einer verminderten Auswurffraktion führen [115]. Es zeigt sich ein komplexes klinisches Bild bestehend aus reduzierter myokardialer Kontraktilität, einer veränderten Hämodynamik, ventrikulärem *Remodeling* sowie Veränderungen der Signaltransduktion [116]. Der Schweregrad der Herzinsuffizienz hängt von der Ätiologie und Dauer der zugrunde liegenden Erkrankung (z.B. KHK, Myokardinfarkt, arterielle Hypertonie) sowie von begleitenden Faktoren wie Diabetes mellitus und Adipositas ab, die das Ergebnis negativ beeinflussen können [3]. Als Kompensationsmechanismus bei chronisch erhöhter Herzbelastung entwickelt sich zunächst physiologisch, bei Voranschreiten dann

pathologisch eine Herzmuskelhypertrophie [117]. Hypertrophie ist allgemein definiert als eine Größenzunahme der Kardiomyozyten, die mit einer gesteigerten Proteinbiosynthese verbunden ist und die Kontraktilität der Muskelzellen erhöht [118]. Dabei werden zwei Formen unterschieden. Eine erhöhte ventrikuläre Volumenbelastung durch Klappeninsuffizienzen führt zu einer Dilatation des Ventrikels und einer Dickenzunahme nach Außen, die als exzentrische Hypertrophie bezeichnet wird. Der erhöhten Druckbelastung des Ventrikels durch eine arterielle Hypertonie oder beispielsweise eine Aortenklappenstenose folgt eine Wanddickenzunahme nach Innen mit Erhöhung der ventrikulären Masse und eine Verkleinerung des Ventrikellumens, konzentrische Hypertrophie genannt [119]. Anhaltender kardialer Stress resultiert dabei jedoch folglich ebenfalls in einer Ventrikeldilatation, was wiederum zu einer verminderten Kontraktionskraft und reduzierten Ejektionsfraktion führt (dekompensierte Herzinsuffizienz) [120]. Auf metabolischer Ebene wurden bei einer Herzinsuffizienz Veränderungen in der Substratverwertung und im Energiestoffwechsel des Herzens nachgewiesen, die auf eine mitochondriale Dysfunktion und eine erhöhte Abhängigkeit von Glukose als Substrat zurückzuführen sind [3, 121]. Es ist davon auszugehen, dass das Herz nach chronischer Druck- und Volumenüberlastung und auch nach regionalem Herzinfarkt allmählich eine verringerte Kapazität zur Erzeugung von ATP entwickelt, die das Herz benötigt, um die Herzleistung auf einem angemessenen Niveau zu halten. Es wird angenommen, dass diese metabolischen Veränderungen zur Progredienz einer Herzinsuffizienz beitragen [122-124]. Die genaueren Veränderungen des Metabolismus nach einem Myokardinfarkt werden im folgenden Kapitel erläutert (siehe Kapitel 1.3.1) Präventiv kann die Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie die Behandlung von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus als sinnvoll erachtet werden [115].

1.3 Myokardinfarkt

Ein akuter Myokardinfarkt (MI) ist charakterisiert durch den regionalen Untergang von Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) aufgrund einer lokalen Durchblutungsstörung, die in der Regel durch die Verengung eines Lumens der Koronararterien verursacht wird (ischämische Myokardnekrose) [125]. Er zählt zu den häufigsten Todesursachen, betrifft jährlich weltweit mehr als 7 Millionen Menschen und spielt aufgrund der hohen Hospitalisierungsrate eine enorme ökonomische Rolle [126-128].

Die Hauptursache in der Entwicklung eines MI ist die koronare Herzkrankheit, die durch die Bildung atheromatöser Plaques gekennzeichnet ist, die das Gefäßlumen verengen bis hin

zum vollständigen Erliegen der Durchblutung [129]. Als Folge des Gefäßverschlusses können die ersten nekrotischen Zellen aufgrund der Hypoxie und des Energiemangels bedingt durch die fehlende aerobe Reserve, bereits nach 30 Minuten mit einer exponentiellen Zunahme nachgewiesen werden. Wenn innerhalb von vier bis sechs Stunden keine Reperfusion erfolgt, beispielsweise durch eine perkutane koronare Intervention (PCI) mit Setzung eines Stents oder pharmakologische Thrombolyse, kommt es beinahe zum vollständigen Zelltod des betroffenen Areals [130]. Die im Anschluss stattfindenden Prozesse, die zu einem Umbau des Gewebes führen, sowie physiologische Reparaturprozesse werden in Kapitel 1.3.2 erläutert.

1.3.1 Veränderungen des Herzmetabolismus nach Myokardinfarkt

Die Gefäßokklusion im Rahmen eines MI führt zu einer Ischämie (O_2 -Unterversorgung) des betroffenen Gewebes. Obwohl das Herz als das metabolisch flexibelste Organ bei der Adaptation an Sauerstoffdefiziten und der unterschiedlichen Substratverwertung gilt, verfügt es über begrenzte Substratreserven in Form von Glykogen und TAGs [131]. Der Großteil der ATP-Produktion erfolgt physiologisch im Rahmen der β -Oxidation und aeroben Glykolyse, bis hin zur oxidativen Phosphorylierung und erfordert eine ausreichende O_2 -Versorgung. Durch die Stressbedingungen während einer Ischämie mit anschließender Reperfusion verändern sich die systemischen Substratspiegel, wirken sich auf metabolische Reaktionen aus und führen zur Akkumulation von Stoffwechselzwischenprodukten während der Ischämie. In der Reperfusionsphase steht dagegen eine gesteigerte ROS-Produktion mit ihren Folgen (siehe Kapitel 1.1.3) im Vordergrund [132].

Während der Ischämie zeigt sich ein Wechsel von der Oxidativen Phosphorylierung hin zur anaeroben Glykolyse, um die ATP-Synthese zu gewährleisten [133, 134]. Zudem ist die Glukoseaufnahme, verbunden mit einem vermehrten Einbau der Glukosetransporter (GLUT1 und GLUT4) in die Zellmembran, und die Glykogenolyse gesteigert [135]. Obwohl die ATP-Gewinnung durch anaerobe Glykolyse ausreichen kann, um die Ionenhomöostase und den Metabolismus bei einer leichten bis mittelschweren Ischämie aufrechtzuerhalten, kann das daraus entstehende Pyruvat nicht weiter oxidiert werden [17]. Die Oxidation von Pyruvat (Glukoseoxidation) wird unter anderem durch die Anwesenheit von FS gehemmt. Es werden Laktat und Protonen gebildet, wobei letztere durch die Hydrolyse von glykolytisch gewonnenem ATP entstehen [136]. Diese Protonenproduktion trägt wesentlich zu einer intrazellulären Azidose bei [137]. Bei einer ausgeprägten Ischämie führt sowohl eine verringerte ATP-Produktion mit Beeinträchtigung verschiedener ATPase-Enzyme als

auch die Azidose im weiteren Verlauf unter anderem zu einer intrazellulären Natrium- und Calciumüberladung, die die Auslösung von Herzrhythmusstörungen und einer verminderten Reaktion der kontraktilen Proteine auf Calcium begünstigt (Verlust der Kontraktionskraft) [138, 139]. Der Mangel an Sauerstoff und an Substraten der Atmungskette hemmt die β -Oxidation und ist mit einer Anhäufung langkettiger FS im Zytosol verbunden [140, 141]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich der Fettsäuretransporter CD36 vom Sarkolemm entfernt und damit die FS-Aufnahme einschränkt, um bis zu einem gewissen Grad die Lipidakkumulation intrazellulär zu verhindern [142]. Darüber hinaus wird der mitochondriale Metabolismus durch eine Reduktion der Zwischenprodukte des Citratzyklus und freiem CoenzymA eingeschränkt, während sich das Zwischenprodukt Succinat sowie Acylcarnitin und Acyl-CoA als Intermediate des FS-Stoffwechsels anhäufen. Es wird vermutet, dass Succinat ein Hauptmetabolit ist, der für die mitochondriale ROS-Produktion während der Reperfusion verantwortlich ist [143]. Es ist umstritten, ob die Fettsäureverwertung im Rahmen der β -Oxidation während der frühen Reperfusion erhöht, vermindert oder unverändert ist [132, 142, 144, 145]. Jedoch scheint sie zeitnah als Hauptquelle der oxidativen Phosphorylierung bei Ausgleich des Sauerstoffdefizites zu dominieren [146]. Während der I/R wird eine Überstimulation des Sympathikus mit massiver Katecholaminausschüttung induziert, was zu einem TAG-Abbau in Adipozyten als Quelle für erhöhte FA-Konzentrationen im Blutkreislauf vermutet wird und auch im Herz eine gesteigerte FS-Aufnahme begünstigt [147]. Aufgrund des Energiemangels erfolgt eine AMPK-Aktivierung mit daraus resultierender ACC-Hemmung, sodass die CPT1B in ihrer Aktivität gesteigert wird. Dies führt zu einer vermehrten Synthese von Acylcarnitin, welches wiederum den Pyruvat-Stoffwechsel hemmt, sodass die FS-Verwertung gegenüber der Glukose-Oxidation überwiegt [148, 149]. Trotzdem kommt es zu einer Anreicherung von FS-Metaboliten auch während der Reperfusion, was die ROS-Produktion in den Mitochondrien kontinuierlich stimuliert und zu einem massiven Zellschaden führt. [150].

Während eines akuten MI tritt zudem meist eine Stress-induzierte Hyperglykämie durch die Freisetzung von Stresshormonen wie Cortisol und Katecholaminen auf, die eine Insulinresistenz provozieren, die Insulinsekretion beeinträchtigen und gleichzeitig die Glucagonausschüttung stimulieren [151, 152]. Es konnte gezeigt werden, dass die Hyperglykämie durch Verminderung des protektiven kardialen Effekts von Insulin und die gesteigerte ROS-Produktion das kardiale „Outcome“ verschlechtert [153, 154].

Auch langfristig zeigen sich Veränderungen im Metabolismus. Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, meist verbunden mit einer kompensatorischen Hypertrophie, führt zu einer Abnahme der FS-Verwertung und einem gesteigerten Glukosestoffwechsel, der mit einer vermehrten Glukoseaufnahme und erhöhten Glykolyserate assoziiert ist [155, 156]. Zudem können Veränderungen auf regulatorischer Ebene wie in der Expression und Aktivität von PPAR α und PGC1- nachgewiesen werden [3, 19]. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Glukoseoxidation selbst nicht gesteigert ist und es auch, ähnlich der Situation des MI, zu einer Entkopplung zwischen der Glykolyse und weiteren Pyruvatoxidation kommt. Dies führt zu einer Einschränkung der Verfügbarkeit von Acetyl-CoA als Substrat des Citratzyklus und langfristig zu einer Energieverarmung [157-159].

Zusammenfassend sind die Veränderungen des Metabolismus nach MI vielfältig und abhängig vom Sauerstoffangebot. Die unterschiedliche Substratverwertung während der Ischämie (vor allem anaerobe Glykolyse) gefolgt von der zeitnahen Reperfusion (vermehrte β -Oxidation) bis hin zur langfristigen Umstellung aufgrund des Zellschadens (Glukoseoxidation), zeigt fließende Übergänge und ist vom Ausmaß des Infarktes abhängig (Abb. 1.6).

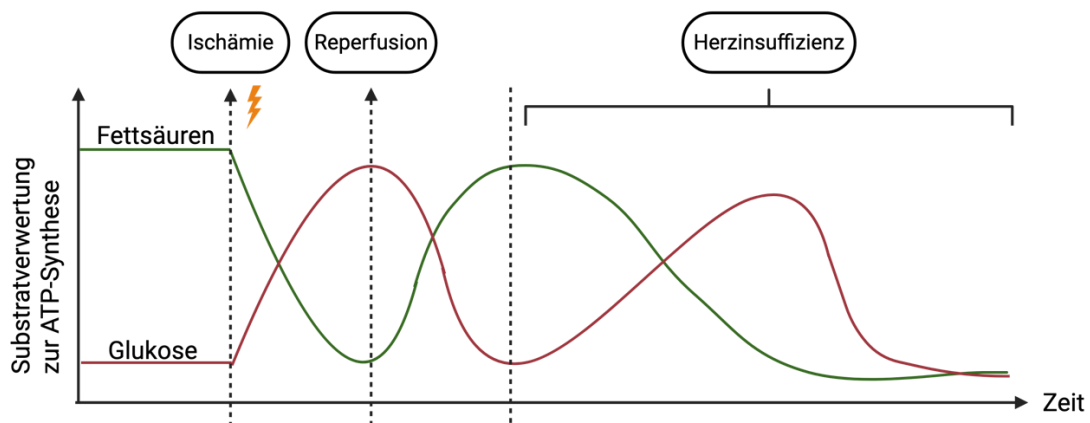


Abb. 1.6: Unterschiede in der Substratverwertung nach einem Myokardinfarkt (MI). Unter physiologischen Bedingungen nutzen Kardiomyozyten vor allem Fettsäuren (FS) im Rahmen der β -Oxidation zur ATP-Gewinnung. Der Anteil an Glukoseverwertung durch aerobe Glykolyse ist deutlich geringer. Nach einem MI (Ischämie) ändert sich die Substratverwertung aufgrund des Sauerstoffdefizites zu Gunsten von Glukose (anaerobe Glykolyse). Nach einer Reperfusion erfolgt ein erneuter Wechsel zu einer vermehrten FS-Verwertung, jedoch führt der zunehmende Zellschaden zu einer Herzinsuffizienz mit ansteigender Glukoseoxidation. Sind die Kompensationsmechanismen erschöpft, zeigt sich eine allgemeine Abnahme der Substratverwertung und ein ATP-Defizit. Abb. erstellt mit BioRender.com

1.3.2 Kardiale Umbauprozesse nach Myokardinfarkt

Die Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels ist begrenzt. Nach Eintreten eines akuten MI führt der massive Verlust von Kardiomyozyten zu einer Reihe von Reaktionen, die unter dem Überbegriff „kardiales *Remodeling*“ (= Umgestaltung) zusammengefasst werden. Dies bezieht sich auf eine Gruppe von molekularen, zellulären und interstitiellen Veränderungen, die sich klinisch als Veränderung der Größe, Form und Funktion des Herzens nach einer Herzerkrankung wie dem MI manifestieren [160]. Diese Umgestaltung kann in mehrere Phasen unterteilt werden, die jedoch fließende Übergänge aufweisen: eine inflammatorische Phase (3 – 4 Tage bei Mäusen), eine Reparatur- und Proliferationsphase (beginnt nach ungefähr 5 Tagen), gefolgt von einer Reifungsphase (> 14 Tage bei Mäusen) [161].

In der inflammatorischen Phase setzen nekrotische Zellen Gefahrensignale (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) frei, die die angeborene Immunabwehr aktivieren und eine Entzündungsreaktion auslösen [162]. Die Stimulation von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und des Komplementsystems führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemokinen und Adhäsionsmolekülen [163, 164]. Diese inflammatorischen Signale beeinflussen adhäsive Interaktionen zwischen Leukozyten, insbesondere Neutrophilen, und Endothelzellen, was zur Migration der Neutrophilen in das entzündete Gewebe führt [165]. Die nachfolgende Freisetzung von matrixabbauenden Enzymen durch die Degranulation der Neutrophilen, sowie die Produktion von ROS und die Bildung neutrophiler extrazellulärer Fallen (*neutrophil extracellular traps*, NET), scheint jedoch zum Absterben von weiteren Myokardzellen beizutragen, was auch nach Reperfusion in der Infarktzone beobachtet werden konnte [166]. Kurz nach Beginn der Neutrophilen-Invasion sammeln sich proinflammatorische Monozyten und Makrophagen im Herzen an, um das Infarktgebiet von Zelltrümmern und Matrixfragmenten mittels Phagozytose zu reinigen. Anschließend beenden antiinflammatorische Monozyten und Makrophagen die Entzündungsreaktion [167, 168]. Sie initiieren den Gewebeumbau. Die Reparatur- und Proliferationsphase beginnt. Fibroblasten differenzieren teils zu Myofibroblasten und lagern große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen ab, die die strukturelle Integrität des infarzierten Ventrikels aufrechterhalten [169, 170]. Myofibroblasten synthetisieren interstitielle Kollagene wie Kollagen III, welches ein feines Netzwerk aus Fibrillen formt. Die weitere Narbenbildung erfolgt durch die Vernetzung kollagener Matrix nach Einlagerung von Kollagen I, das der Narbe Zugfestigkeit verleiht [171, 172]. Zudem zeigt sich im Narbengewebe eine gesteigerte

Angiogenese. Die reparativen Zellen werden deaktiviert und unterliegen der Apoptose (Reifungsphase) [165, 173, 174].

Durch den Verlust des lebensfähigen Myokards kommt es im benachbarten und nicht ischämischen *Remote*-Gewebe zur Bildung einer kompensatorischen Hypertrophie, um die Kontraktionskraft aufrechtzuerhalten [160]. Des Weiteren zeigt sich ein Wachstum des Kapillarnetzes und eine Zunahme des interstitiellen Kollagens [175]. Die Infarktgröße und der ordnungsgemäße Ablauf des *Remodelings* ohne Störungen sind die wichtigsten prognostischen Faktoren. Zudem gilt die rasche Wiederherstellung der Reperfusion als das effizienteste therapeutische Mittel, um kardiale Umbauprozesse und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu minimieren. Medikamentöse Ansätze, insbesondere im Bereich der inflammatorischen Phase, zeigen lediglich eine unterstützende Wirkung und sind Gegenstand aktueller Forschung [161, 176].

Im Rahmen des *Remodelings* zeigt sich sowohl im Narben- als auch im *Remote*-Gewebe ein vermehrter Einbau von Kollagen, was zu einer sekundären Fibrose führt. Sekundäre Fibrose bezeichnet eine pathologische Ansammlung von Fibroblasten und die übermäßige Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen, aufgrund endogener und exogener Auslöser wie Entzündungen und Ischämie, folglich endend in einer gestörten Organarchitektur. [177, 178]. Im Herzen besteht physiologisch über 90 % des Kollagens aus interstitiellem Kollagen, darunter Kollagen Typ I, III und V, die hauptsächlich von Fibroblasten, aber auch von Myofibroblasten synthetisiert werden und strukturelle Eigenschaften haben [172]. Mehrere Kollagenmoleküle verbinden sich zu Fibrillen und sind gegeneinander quervernetzt, sodass sie ein stabiles Netzwerk bilden [171, 179]. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Kollagen [180]. Eine pathologische Zunahme an Kollagenfibrillen führt zu einer verminderten Beweglichkeit der Kardiomyozyten und damit reduzierten Dehnbarkeit (Compliance) der Ventrikel. Zudem können vermehrt Arrhythmien aufgrund einer verlangsamten Depolarisation und Reizweiterleitung durch Beeinflussung des Ionenflusses entstehen [181, 182].

1.4 Adipositas und ihre Auswirkungen auf die Herzfunktion

Adipositas (= Fettleibigkeit) ist eine chronische Krankheit und definiert als übermäßige Vermehrung des Körperfetts [183]. Die mit alarmierender Geschwindigkeit ansteigende Prävalenz sowohl im Kindesalter als auch für Erwachsene führt zu einer ansteigenden

gesundheitlichen und wirtschaftlichen Belastung. In einer systematischen Analyse über einen Zeitraum von 1980 bis 2013 konnte gezeigt werden, dass sich die Zahl fettleibiger Erwachsener in 33 Jahren mehr als verdoppelt hat von 857 Millionen im Jahr 1980 auf 2,1 Milliarden Menschen 2013 [184]. Adipositas selbst gilt als starker Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und einer dadurch erhöhten Mortalität [185]. Zudem ist die Krankheit mit weiteren Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und einer gesteigerten Insulinresistenz verbunden [186, 187]. Eine ausgeprägte viszerale Adipositas beeinflusst die Herzfunktion nicht nur durch vermehrte Begleiterkrankungen, sondern auch durch direkte Auswirkungen auf das Myokard und das Gefäßsystem [188]. Die Ansammlung von Fett im Herzmuskel ist charakterisiert durch eine erhöhte ROS-Produktion und oxidativen Stress und führt darüber hinaus zu Fibrose [189, 190], während Adipozytenansammlungen im Bereich des Perikards und der Leber zu einem erhöhten Blutvolumen und zur Aktivierung von Entzündungsreaktionen beitragen. Dadurch steigen das Schlagvolumen und die Belastung der Herzwand. Der daraus resultierende Myokardschaden führt zur Ausbildung einer konzentrischen Herzmuskelypertrophie, einem weiteren *Remodeling* des Herzens und letztendlich zu einer diastolischen und systolischen Herzinsuffizienz [191, 192]. Präventive Maßnahmen umfassen unter anderem die Gewichtsreduktion aber auch eine Steigerung der körperlichen Fitness, was selbst bei bereits vorhandener Herzinsuffizienz die Prognose verbessern kann [193, 194].

1.5 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe chronischer Stoffwechselerkrankungen, deren Gemeinsamkeit die Erhöhung der Blutglukosekonzentration (Hyperglykämie) ist. Die weltweite Prävalenz von Diabetes mellitus bei Erwachsenen wurde 2021 auf bis 537 Millionen Menschen geschätzt. Es ist aktuell davon auszugehen, dass diese Zahl bis 2045 auf etwa 783 Millionen Menschen ansteigen wird, vor allem bedingt durch T2DM mit über 90 %, auf den in dieser Arbeit mit seiner Vorstufe dem Prädiabetes der Fokus gelegt wurde. [195]. T2DM ist definiert als eine verminderte Wirkung von Insulin (Insulinresistenz) auf die Körperzellen mit einem relativen Insulinmangel und einer zunehmenden Funktionseinschränkung der Insulin-produzierenden Zellen. Es zeigt sich typischerweise eine Störung der glukoseabhängigen Insulinsekretion. Initial führt eine Störung verschiedener zellulärer Signalwege zu einer verminderten Empfindlichkeit peripherer Zellen insbesondere im Muskel-, Leber- und Fettgewebe gegenüber Insulin (Insulinresistenz). In frühen Stadien löst diese verringerte Insulinsensitivität eine

kompensatorische Erhöhung der Insulinsekretion aus den β -Zellen aus. Diese Hyperinsulinämie verhindert zunächst die Hyperglykämie. Im Verlauf sind die Kompensationsmechanismen der β -Zellen jedoch erschöpft [196, 197]. Durch die Summierung mehrerer Faktoren wie eben Insulinresistenz und erhöhtem Insulinbedarf aber auch genetische Veranlagung, Gluko- und Lipotoxizität und eine beeinträchtigte Inkretinfreisetzung entsteht eine fortschreitende β -Zell-Dysfunktion, die zu einem Insulinmangel mit der Folge einer Hyperglykämie führt [198]. Zudem bedingt die Insulinresistenz eine erhöhte Glukoseproduktion in der Leber (durch vermehrte Freisetzung von Glukagon) und eine verminderte Glukoseaufnahme in Muskel-, Leber und Fettgewebe [199, 200]. Die Hyperglykämie im Zusammenhang mit dem Insulindefizit führt in den Zielgeweben zu einer inflammatorischen Reaktion, sowie intrazellulär zu einer mitochondrialen Dysfunktion und einer gesteigerten ROS-Produktion [201].

Als Prädiabetes werden verschiedene Vorstufen des Diabetes mellitus zusammengefasst, bei denen bereits ein erhöhter Nüchternblutzucker (IFG = *impaired fasting glucose*), eine gestörte Glukosetoleranz (IGT = *impaired glucose tolerance*) oder ein HbA1c zwischen 6,0 % und 6,4 % (T2DM $\geq 6,5$ %) vorliegen und beschreiben den Bereich zwischen physiologischen und pathologischen Werten [202, 203]. Auch pathophysiologisch lassen sich bereits eine beginnende Insulinresistenz an den Zielgeweben und eine gestörte quantitative und qualitative Insulinfreisetzung beobachten [198, 204]. Ein Prädiabetes erhöht das Risiko zur Entwicklung eines manifesten Diabetes und seiner Komplikationen. Die kumulative Inzidenz eines T2DM fünf Jahre nach der Erstdiagnose eines Prädiabetes beträgt zwischen 26 % und 50 % [205]. Eine Änderung des Lebensstils insbesondere durch regelmäßige körperliche Bewegung, Gewichtsreduktion und eine kalorienreduzierte Ernährung kann den Übergang zum T2DM verzögern und sogar verhindern [206, 207].

1.6 Veränderungen des Herzmetabolismus durch Übergewicht und T2DM

Der Herzmetabolismus ist bei Adipositas, T2DM und dementsprechend bei der Komorbidität beider Erkrankungen verändert. Die im Folgenden beschriebenen Prozesse sollen einen Einblick in die Anpassung des Stoffwechsels geben (Abb. 1.7), jedoch sind weitere Vorgänge bekannt und in ihrer Komplexität bislang nicht vollständig untersucht.

Sowohl durch eine ineffiziente Fettspeicherung in den Adipozyten und eine erhöhte TAG-Produktion in der Leber bei der Adipositas als auch durch eine gesteigerte Lipolyse durch

die herabgesetzte Insulinfunktion beim T2DM ist das Angebot an frei zirkulierenden FS deutlich erhöht, was die myokardiale FS-Aufnahme und TAG-Speicherung induziert [208]. Infolgedessen wird PPAR α zur Verhinderung einer ektopischen Lipidakkumulation aktiviert [209]. Daraus resultiert eine gesteigerte FS-Aufnahme, sowie die Hochregulation der β -Oxidation und ein relativ verminderter Glukosemetabolismus [210, 211]. Die Zunahme in der FS-Verwertung ist wiederum mit einer voranschreitenden Insulinresistenz verbunden und unterdrückt die Glukoseaufnahme und deren Oxidation [33]. Die vermehrte FS-Verwertung führt jedoch nicht zu einem Anstieg der ATP-Synthese. Aufgrund komplexer Verknüpfungen in der Atmungskette und der Verwertung von Reduktionsäquivalenten ist die oxidative Kapazität der Mitochondrien erschöpft. Daraus resultieren eine geringere ATP-Ausbeute und ein Verlust an mitochondrialer Effizienz [212]. Zudem steigern erhöhte FS die Expression von UCP3, was gleichzeitig die ROS-Produktion hemmt, die aufgrund des erhöhten FS-Gehalts in den Mitochondrien und der vermehrten Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung ebenfalls erhöht ist. Dies hat aufgrund der Reduktion des kardialen Zellschadens einen protektiven Effekt [213]. Des Weiteren ist wie bereits beschrieben der allgemeine Sauerstoffbedarf im Rahmen der β -Oxidation im Vergleich zur Glukoseverwertung erhöht. Obwohl die gesteigerte FS-Aufnahme, getriggert durch eine dauerhafte Verlagerung der FS-Translokase CD36 in das Sarkolemm [214], die ektopische Lipidanhäufung reduziert, konnte auch intrazellulär eine Lipotoxizität aufgrund vermehrter TAG-Anhäufung und weiterer FS-Moleküle in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, die zu einer weiteren Insulinresistenz und einem erheblichen Zellschaden bis hin zur Apoptose führen kann unter anderem verursacht durch mitochondriale Schädigung und ebenfalls eine erhöhte ROS-Produktion [13, 215].

Der veränderte Glukosemetabolismus scheint auf mehreren Ebenen eingeschränkt zu sein. Zum einen zeigt sich eine verringerte Insulin-induzierte Glukoseaufnahme über GLUT4 und eine reduzierte Glykolyse-Rate im Zytosol vor allem durch die Hemmung der PFK-1 durch anfallendes Citrat aus dem Citratzyklus [216]. Zum anderen ist die Umwandlung von Pyruvat durch den PDH-Komplex in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA vermindert, der durch PDK4 gehemmt wird (siehe Kapitel 1.1.1) [217]. Es konnte bislang gezeigt werden, dass die PDH-Aktivität in Echtzeit sowohl in diabetischen als auch in fettreichen Tiermodellen verringert ist [218, 219].

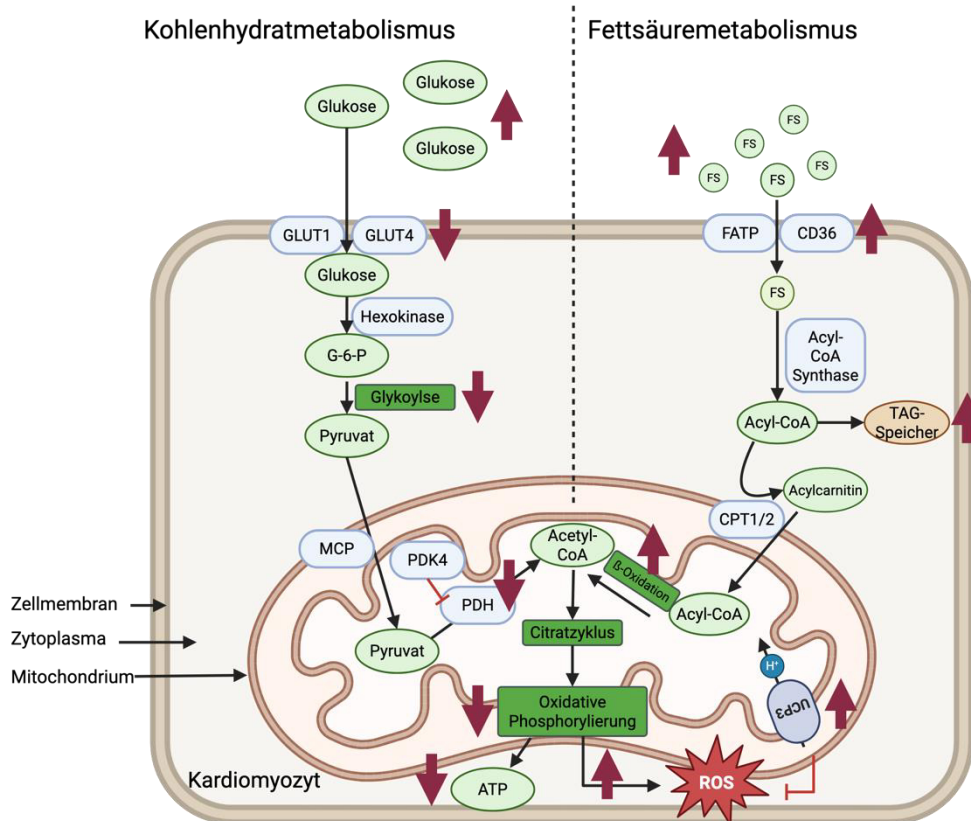


Abb. 1.7: Vereinfachte Darstellung der Veränderungen im Herzmetabolismus durch Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM). Durch Adipositas und T2DM ist das allgemeine Angebot an Glukose und freien Fettsäuren (FS) erhöht. Durch die vermehrte FS-Aufnahme und TAG-Speicherung, sowie einem Anstieg der β -Oxidation, wird die Glukoseverwertung gehemmt. Aufgrund des Überangebots an FS ist die mitochondriale Effizienz jedoch vermindert, was zu einer geringeren ATP-Synthese und vermehrten ROS-Produktion führt. Diese wird wiederum durch eine vermehrte Expression von UCP3 gehemmt. Abb. erstellt mit BioRender.com

1.7 *Insulin-like growth factor 1*

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Hormon, dem wichtige regulatorische Eigenschaften im Rahmen kardialer Stoffwechselprozesse sowie Zellwachstum und Zelldifferenzierung nachgewiesen wurden und das strukturelle Ähnlichkeiten zu Insulin aufweist [220]. Die Hauptproduktion findet in der Leber statt, wobei in nahezu allen Geweben eine Sekretion von IGF-1 beobachtet werden konnte [221, 222]. Die Transkription wird unter anderem durch Somatotropin induziert, während IGF-1 im Sinne der negativen Rückkopplung die Somatotropin-Sekretion im Hypothalamus hemmt [223]. Anders als bei Insulin wird die Bioverfügbarkeit von IGF-1 über *Insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBPs) reguliert, die auch einen Einfluss auf die Affinität zum *Insulin-like growth factor-*

I Receptor (IGF-1R) ausüben [224]. Der IGF-1R gehört wie der IR zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen bestehend aus vier Untereinheiten und wird analog zum IR bei IGF-1-Bindung durch Autophosphorylierung und Bindung der IRS beziehungsweise SHC aktiviert. Intrazellulär folgt ebenso die Aktivierung der PI3K-Signalkaskade, die unter anderem die Glykogensynthese stimuliert und den Glukosetransport beeinflusst, sowie die Aktivierung der MAPK-Kaskade, der eine Zellproliferation und Differenzierung begünstigt [225, 226]. Die genauen Prozesse wurden in Kapitel 1.1.2 erläutert (Abb. 1.4). Interessanterweise kann sowohl der IR als auch der IGF-1R Homodimere oder Heterodimere (Hybrid-Rezeptor) bilden, jedoch ist die Affinität zu den namensgebenden Hormonen höher. [227, 228]. Trotz der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten von Insulin und IGF-1 scheint Insulin vermehrt metabolische Prozesse zu beeinflussen, während IGF-1 dominanter in das Zellwachstum und die Hemmung des programmierten Zelltodes eingreift [229-231].

Durch seine vielfältigen Funktionen, spielt IGF-1 eine große Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen und scheint protektive Funktionen zu haben. Bislang konnte eine inverse Korrelation zwischen der Entstehung einer KHK und IGF-1-Spiegeln nachgewiesen werden, am ehestens ausgelöst durch ein vermindertes Voranschreiten der Atherosklerose. Dies wiederum senkt das Risiko eines MI [232, 233]. Des Weiteren können positive Effekte auf die Herzzellen nachgewiesen werden. IGF-1 hat eine positive inotrope Wirkung durch Sensibilisierung der Myofilamente für Calcium und induziert die Teilung kardialer Stammzellen [234, 235]. Auf der anderen Seite verursacht IGF-1 eine Hypertrophie der Kardiomyozyten [236], verlangsamt jedoch auch eine Verschlechterung der Herzmuskelfunktion durch Hemmung der Apoptose dieser Zellen [237]. Auch auf die Pathogenese des T2DM hat IGF-1 Einfluss, wobei eine moderat erhöhte IGF-1-Konzentration die Prävalenz des Diabetes senkt und ein IGF-1-Defizit dessen Entstehung durch eine Hyperinsulinämie, verminderte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität begünstigt [238-240]. Der erhöhte Gehalt an freien FS wie bei Adipositas inhibiert eine IGF-1 gesteuerte β -Zellproliferation, was bei einem Insulinmangel die Glukosedysregulation verstärkt [241]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass IGF-1 den FS-Transport und die β -Oxidation im Muskel fördert [242]. Dadurch verringert sich der FS-Anteil in der Leber, die sonst frei zirkulierende FS aufnehmen würde mit der Folge einer hepatischen Steatose. Zudem konnte eine verbesserte Insulinsignalwirkung nachgewiesen, die zusammen mit dem erhöhten FS-Verbrauch im Muskel zu einer deutlichen Verringerung des gesamten FS-Flusses führt [243, 244]. Außerdem zeigt IGF-1 einen protektiven Effekt

auf die Mitochondrien durch eine verringerte ROS-Produktion in der Leber [245]. Das Zusammenspiel von IGF-1 mit dem IGF-1R und Somatotropin hat auch Einfluss auf das Immunsystem. Proinflammatorische Zytokine, die zum Beispiel vom Fettgewebe bei Adipositas produziert werden, scheinen mehrere Bereiche der IGF-1-Signalwege zu dämpfen. [246, 247]

Zusammenfassend scheinen die genannten Effekte wie die Beeinflussung der Immunantwort, die erhöhte Insulinsensitivität, die Balance aus pro- und anti-atherosklerotischen Faktoren und eine verbesserte Kontraktilität des Myokards zu einer Verlangsamung kardiovaskulärer Erkrankungen und der Reduktion des MI-Risikos beizutragen [248], jedoch konnten in vereinzelt Studien auch kontroverse Ergebnisse erfasst werden, die eine weitere Forschung zur Verbesserung der Evidenz von IGF-1 als mögliches Therapeutikum von Nöten machen [249].

1.8 Ziele der Arbeit

Sowohl Übergewicht als auch T2DM sind relevante Risikofaktoren für die Entwicklung eines MI und verschlechtern zudem die Prognose. Durch ihre steigende Inzidenz beeinflussen sie vermehrt unser Gesundheitssystem und die Lebensqualität eines jeden Betroffenen. Um dies zu verhindern ist eine intensive Prävention von enormer Bedeutung. Bereits durch einen Prädiabetes zeigen sich erste Veränderungen im Metabolismus, der Morphologie und der Organfunktionen, die jedoch zu Teilen durch eine Lebensstilveränderung umkehrbar sind. Das Ziel der Arbeit war es, die Art und das Ausmaß der Veränderungen im Herzen in einem prädiabetischen Mausmodell, ausgelöst durch eine fett- und zuckerreiche Diät, zu charakterisieren. Des Weiteren sollten Veränderungen nach einem MI in prädiabetischen Mäusen analysiert werden und mögliche Auswirkungen einer IGF-1-Behandlung aufgedeckt werden. Die im folgenden genannten Punkte schaffen einen Überblick über die analysierten Eigenschaften.

- Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der fett- und zuckerreichen Diät auf die Gewichtszunahme von Mäusen und auf die Morphologie des Herzens zu untersuchen. Dazu wurde die wöchentliche Gewichtszunahme gemessen und Veränderungen ventrikulären Wanddicken echokardiographisch untersucht.
- Das Eintreten eines MI führt zu einem Umbau des betroffenen Myokards. Es stellte sich die Frage, inwieweit sich dieses fibrotische *Remodeling* nach einem MI

zwischen wildtypischen Mäusen und Mäusen mit einem Prädiabetes unterscheidet. Zu diesem Zweck wurde eine immunhistochemische Färbung zur Darstellung von Kollagen 3, sowie Genexpressionsanalysen des Gens *Col3a1* mittels qPCR durchgeführt.

- Das gesunde Herz von Wildtyp-Mäusen nutzt sowohl Glukose als auch Fettsäuren als Energiequellen, wobei die Fettsäureverwertung überwiegt. Es konnten bislang Veränderungen im Zusammenhang mit T2DM aber auch nach einem MI unter anderem in der Substratverwertung aber auch im Bereich der mitochondrialen Funktionalität nachgewiesen werden. Dies warf die Frage auf, wie sich der Stoffwechsel bei Mäusen mit Prädiabetes und nach einem MI verändert. Dazu wurden Genexpressionsanalysen (qPCR) von stoffwechselrelevanten Markern wie CPT1B und GLUT4 analysiert.
- Frühere histologische Analysen haben beschrieben, dass eine dreitägige IGF-1-Verabreichung nach einem MI die Größe der Narbe bei Wildtyp-Mäusen reduziert. Um die Auswirkungen einer dreitägigen IGF-1-Behandlung nach einem MI auf das Ausmaß der Fibrose des ventrikulären Myokards und auf den Metabolismus in wildtypischen und prädiabetischen Tieren zu untersuchen, wurden histologische Färbungen und Genexpressionsanalysen durchgeführt.

Zusammenfassend soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der strukturellen und metabolischen Veränderungen bei einem Prädiabetes führen, um so durch mögliche Lebensstilinterventionen und medikamentöse Ansätze frühzeitig das Auftreten und die Verschlechterung kardiovaskulärer Komorbiditäten zu beeinflussen.

2 Material und Methoden

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde bei Bedarf hochreines Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage verwendet. Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden soweit erforderlich bei 121 °C und 2 bar für 30 Minuten autoklaviert. Nicht benannte Materialien, die verwendet wurden, sind üblich in einem molekularbiologischen Labor.

2.1 Laborgeräte und Zubehör

Geräte & Produkte	Hersteller und Bestellnummer
Adhäsive PCR-Platten-Dichtung	Thermo Fisher Scientific (Deutschland), AB-0558
Beatmungsgerät	Hugo Sachs Elektronik (Deutschland), Mouse Ventilator Minivent Type 845
Deckgläser für Mikroskopie	Engelbrecht (Deutschland), 24 x 50 mm, K12450
Dewargefäß	KGW-Isotherm (Deutschland), Dewar Transportgefäß Typ B
Eismaschine	Ziegra (Deutschland), ZBE 70-35
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Deutschland), 5 ml
Faden	Ethicon (Deutschland), Z1012 Stärke: 6-0, KHH5643 Stärke 7-0
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Deutschland), 311652
Feinwaage	Sartorius (Deutschland), BP121S, Typ1801
Fluoreszenzmikroskop	Keyence (Japan), BZ9000
Flüssigstickstofftank	Air Liquide (Deutschland), Arpege 110, GT80
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr (Deutschland), GNP 3056 Premium NoFrost
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Fisher Scientific (Deutschland), Revco UxF 40086V
Gewebehomogenisator	Qiagen (Deutschland), Tissue Ruptor II
Isofluran-Verdampfer	VetEquip (USA), Isofluran Vaporizer
Kryostat	Leica Biosystems (Deutschland), CM1850

Kühlschrank, 4°C	Liebherr (Deutschland), ProfiLine GCv4010
Lichtmikroskop	Leica Biosystems (Deutschland), DME
Löffelspatel	Bochem Instrumente (Deutschland)
Magnetrührer	IKA (Deutschland), RCT Basic
Magnetstäbchen	Roth (Deutschland), Rotilabo
Mikroplatte	Applied Biosystems (USA), Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 mL)
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf (Deutschland), Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 2,0 ml), PCR Tubes (0,2 ml) Sarstedt (Deutschland), Reagiergefäß (1,5 ml)
Mikrotomklinge	Feather (Japan), Microtome Blade C35
Narkosebox	VetEquip (USA), Induction Chamber
Objektträger	Marienfeld (Deutschland), 76 x 26 x 1 mm, adhäsive Oberfläche, 0810000
Osmotische Minipumpe	Alzet (USA), Typ 1003D
PCR Thermocycler	Eppendorf (Deutschland), Mastercycler Nexus Gradient
Pipetten	Eppendorf (Deutschland), 10 – 1000 µl Gilson (UK), Pipetman Classic 10 – 1000 µl
Pipettenspitzen	Star Lab (Deutschland), TipOne Pipettenspitzen (steril), 10/20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
Präparationsbesteck	Fine Science Tools (Deutschland)
Reagenzröhrchen	Greiner Bio-One (Deutschland), Cellstar Tubes (15 ml, 50 ml)
Real-Time PCR System	Applied Biosystems (USA), StepOnePlus
Schallkopf	FUJIFILM VisualSonics (Kanada), Linear Array Transducer MS400
Schüttler	Edmund Bühler GmbH (Deutschland), Kombischüttler KL 2

Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie (Deutschland), Nanodrop ND-1000
Stereomikroskop	Leica Biosystems (Deutschland), KL 1500 LCD
Thermomixer	Eppendorf (Deutschland), Thermomixer compact
Tiermultifunktionsstisch	FUJIFILM VisualSonics (Kanada), Vevo Imaging Station
Ultraschallgerät	FUJIFILM VisualSonics (Kanada), Vevo2100 Imaging System
Vortexer	Heidolph (Deutschland), Reax Top
Waage	Kern (Deutschland), 572-39 Mettler-Toledo (Deutschland), PE 3600
Wärmeplatte	Uno B.V. (Niederlande)
Wasseraufbereitungssystem	Merck (Deutschland), Milli-Q Reference Wasseraufbereitungssystem
Zentrifuge	Eppendorf (Deutschland), 5402; Roth (Deutschland), Micro Centrifuge No. 042690; Thermo Fisher Scientific (Deutschland), Technico Mini C1301B- 230V; Heraeus Instruments (Belgien), Megafuge 1.0

Tabelle 1: verwendete Laborgeräte und Zubehör mit jeweiligen Herstellern

2.2 Chemikalien und weitere Substanzen

Chemikalie & Bestellnummer	Hersteller
2-Methylbutan (3927.1)	Roth, Deutschland
2-Propanol (9866.1)	Roth, Deutschland
Bouin's Solution (HT10132)	Sigma, USA
Buprenorphin (Temgesic®)	Indivior, UK
Calciumcarbonat (C4830)	Sigma, USA
Calciumchlorid (C1016)	Sigma, USA
Chloroform (102445)	Merck, Deutschland

Povidon-Iod (Betaisodona®, 09196772)	ACA Müller Pharma, Deutschland
Dinatriumphosphat (Dihydrat, 106580)	Merck, Deutschland
Entellan New (107961)	Merck, Deutschland
Essigsäure (100063)	Merck, Deutschland
Essigsäure 1% (10180)	Morphisto, Deutschland
Ethanol, 96 % (20.824.321)	VWR, Frankreich
Fluoromount-G DAPI (0100-20)	Southern Biotech, USA
Flüssigstickstoff	Linde, Deutschland
Formaldehyd 37 % (252549)	Sigma, USA
Gefrorenes Gewebemedium (KP - Cryo – Compound, 1620)	Klinipath, Niederlande
Haarentfernungscreme	RB, Veet, UK
Hämatoxylin nach MASSON (11717)	Morphisto, Deutschland
Human IGF-1 (research grade, 130-093-887)	Miltenyi Biotec, Deutschland
Isofluran (9714675)	Piramal Healthcare, UK
Kaliumchlorid (104936)	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (5108)	Merck, Deutschland
Lichtgrün, 0,2 % (GOLDNER III, 10267))	Morphisto, Deutschland
Natriumchlorid (27.810.364)	VWR Chemical, Frankreich
Normal Goat Serum (S-1000)	Vector Laboratories, USA
Paraformaldehyd (16005)	Aldrich, USA
Phosphormolybdänsäure - Orange G, 0,2 % (GOLDNER II, 11195)	Morphisto, Deutschland
Saponin (6857.1)	Roth, Deutschland
Säurefuchsin-Ponceau (GOLDNER I, 10366)	Morphisto, Deutschland
Super PAP Pen Liquid Blocker (N71310)	Science Services, Deutschland
Trizol (Reagent, 15596-026)	Invitrogen, Deutschland
Ultraschallgel	ROESER Medical GmbH, Deutschland
Xylol (Isomere, 9713.1)	Roth, Deutschland

Tabelle 2: verwendete Chemikalien und weitere Substanzen mit jeweiligem Hersteller

2.3 Puffersystem

Puffersystem	Zusammensetzung
PBS (pH 7,5)	0,2 g Kaliumchlorid 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat 8 g Natriumchlorid 1,17 g Dinatriumhydrogenphosphat Pro 1 Liter Wasser

Tabelle 3: verwendetes Puffersystem mit dessen Zusammensetzung

2.4 Antikörper

Antikörper	Referenznummer	Verdünnung	Hersteller
Primär: Rabbit α Collagen III	ab 7778	1:100	Abcam, UK
Sekundär: Goat α Rabbit, gekoppelt an CY3	111-165-144	1:300	Dianova / Jackson, Deutschland

Tabelle 4: verwendete Antikörper für immunhistochemische Färbung mit jeweiligem Hersteller

2.5 Kits

Kit und Bestellnummer	Hersteller
Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (K0221)	Thermo Scientific, USA
QuantiTect Reverse Transkription Kit (205311)	Qiagen, Deutschland
RNase-Free DNase Set (79254)	Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini Kit (74106)	Qiagen, Deutschland

Tabelle 5: verwendete Kits mit jeweiligem Hersteller

2.6 Primer

Primer		Sequenz (5' – 3')
<i>Cpt1b</i>	Forward	ACTAACTATGTGAGTGACTGG
	Reverse	TGGCATAATAGTTGCTGTTC
<i>Col3</i>	Forward	CTGTAACATGGAAACTGGGGAAA
	Reverse	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
<i>Nude</i>	Forward	AGAACTCCAAGCTATCAGAC

	Reverse	CTTCAGGATTCCTGTTTCTTC
<i>Pdk4</i>	Forward	ACAATCAAGATTTCTGACCG
	Reverse	TCTCCTTGAAAATACTTGGC
<i>Ppara</i>	Forward	GATGTCACACAATGCAATTC
	Reverse	CAGTTTCCGAATCTTTCAGG
<i>Slc2a4 (GLUT4)</i>	Forward	CAATGGTTGGGAAGGAAAAG
	Reverse	AATGAGTATCTCAGGAGGC
<i>Ucp2</i>	Forward	ACCTTTAGAGAAGCTTGACC
	Reverse	TTCTGATTTCTGCTACCTC
<i>Ucp3</i>	Forward	CAAGAAATGCCATTGTCAAC
	Reverse	GAAGTTGTCAGTAAACAGGTG

Tabelle 6: verwendete Primer und deren Sequenz

2.7 Verwendete Softwareprogramme

Software	Hersteller
BZ-II-Analyzer Software	Keyence, Japan
GraphPad PRISM 6	GraphPad Software Inc., USA
Image J (1.52p)	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation, USA
Microsoft PowerPoint 2019	Microsoft Corporation, USA
StepOne Software v2.3	Applied Biosystems, USA
Vevo LAB (1.7.1)	FUJIFILM VisualSonics, Kanada
ND-1000 (V.8.1)	Peqlab Biotechnologie, Deutschland
Endnote 21	Clarivate Analytics, USA

Tabelle 7: verwendete Softwareprogramme mit jeweiligem Hersteller

2.8 Arbeiten mit Mäusen

2.8.1 Tierschutz

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Mäusen wurden gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Neufassung vom 18. Mai 2006, BGBl. IS. 1206, 1313) durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt. Die Referenznummer der Tierversuchsgenehmigung lautet: 81-02.04.2017A401. Die Organentnahme erfolgte nach der Genehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität mit der Organisationsnummer O16/04. Ein Tiertötungskurs wurde am 1. Oktober 2019 besucht.

2.8.2 Tierhaltung und Fütterung

Es wurden ausschließlich männliche Mäuse des C57BL/6J Stammes verwendet, die von JANVIER LABS gezüchtet und im ZETT der Heinrich-Heine-Universität gehalten und gefüttert wurden. Alle Tiere hatten durchgehend freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Im Alter von 8 Wochen wurden die Mäuse in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Kontrollgruppe (Wildtyp = WT) erhielt über 10 Wochen eine normale Fütterung (Sniff V1534-000). Die andere Gruppe von Mäusen erhielt über 10 Wochen eine fett- und zuckerhaltige Diät (Sniff S7200-E010) um Übergewicht und Prädiabetes zu induzieren. Diese Gruppe erhält im Folgenden die Bezeichnung „DIO“ für „*Diet induced obesity*“. Der Gewichtsverlauf wurde wöchentlich dokumentiert.

Der prädiabetische Phänotyp wurde bereits zuvor in unserem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie durch Untersuchungen nachgewiesen, durchgeführt von Dr. André Spsychala [250]. Dabei zeigten sich erhöhte Nüchtern-Blutglukosespiegel von bis zu 200 mg/dl und eine eingeschränkte Glukosetoleranz, sowie erhöhte Plasmainsulinspiegel bei DIO-Mäusen mit 1,3 ng/l im Vergleich zu WT mit 0,4 ng/l. Jedoch führte exogen zugegebenes Insulin im Insulintoleranztest (ITT) zu einer Senkung der Blutglukosespiegel, was auf einen Prädiabetes nicht aber auf einen manifesten Diabetes mellitus Typ 2 hinweist (Abb. 2.1).

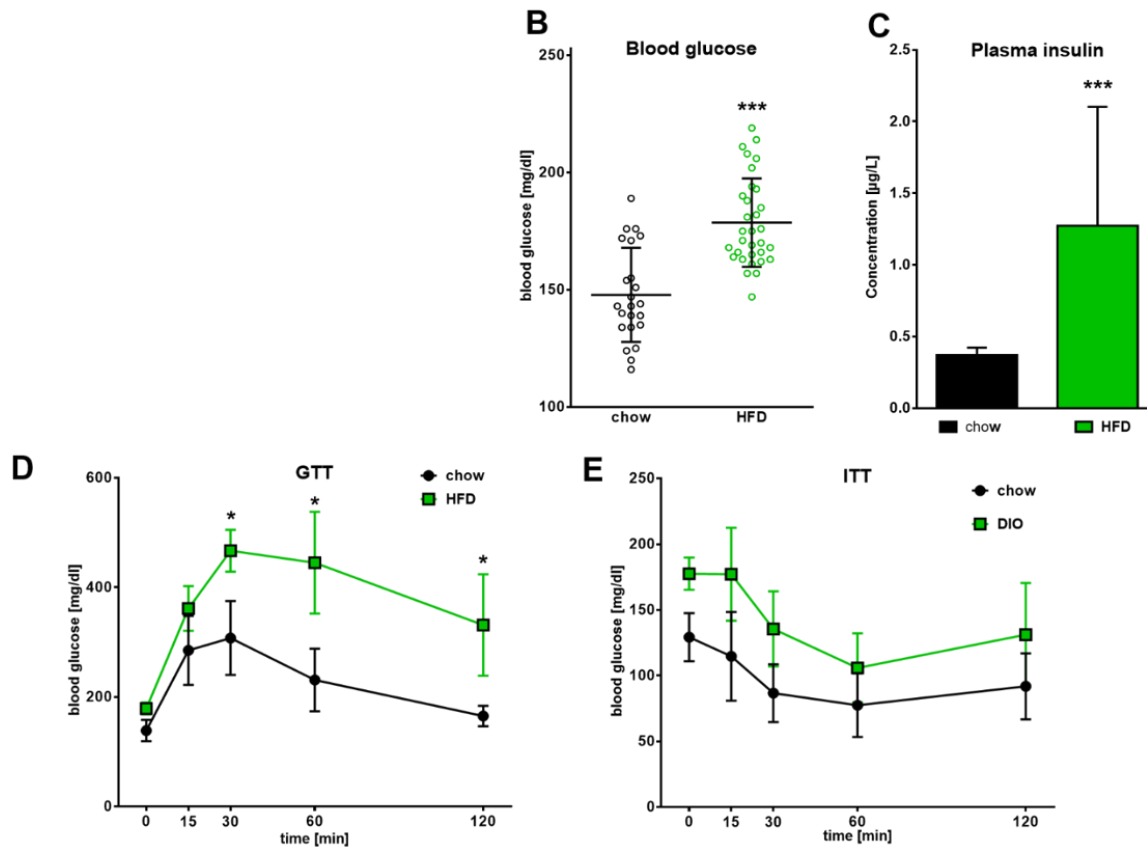


Abb. 2.1: Identifizierung des prädiabetischen Phänotyps. Dargestellt sind die Ergebnisse diagnostischer Tests zu Identifizierung eines Prädiabetes bei Mäusen nach einer fett- und zuckerhaltigen Diät (High-Fat Diet = HFD, entspricht DIO) verglichen zu WT (chow) durchgeführt von Dr. André Sychala aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie. (B) Es wurden erhöhte Blutglukosespiegel nach 9 Wochen Fütterung bei DIO-Mäusen (HFD) nachgewiesen (n = 23/32), sowie (C) erhöhte Plasmainsulinspiegel im ELISA nach 10 Wochen Fütterung gemessen (n = 15/16). (D) Eingeschränkte Glukosetoleranz bei HFD nach einer Injektion von 2 mg Glukose pro Gramm Körpergewicht nach 10 Wochen Fütterung (n = 7/8). (E) Insulintoleranztest nach Injektion von 0,75 U Insulin pro Kilogramm Körpergewicht nach 10 Wochen Fütterung (n = 11/12). Abb. übernommen aus Oehler et al., 2022 [250]

2.8.3 Echokardiografie

Die *in vivo* Untersuchung der linksventrikulären Strukturen des murinen Herzens erfolgte bei wildtypischen und DIO-Mäusen im Alter von 18 Wochen mittels einer echokardiografischen Untersuchung durchgeführt durch Dr. Dr. Andre Heinen und Dr. André Sychala aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie. Ziel der Echokardiografie war die Analyse der Morphologie der Herzen durch Bestimmung der linksventrikulären Wanddicken, Ventrikelgröße und des Ventrikelgewichts.

Die transthorakale Echokardiografie ist das häufigste bildgebende Verfahren in der Kardiologie und liefert wegweisende Informationen über strukturelle und funktionelle

Störungen des Herzens [251]. Technisch gesehen erzeugt eine elektrische Stimulation piezoelektrischer Kristalle im Schallkopf Ultraschallwellen. Diese werden aufgrund der unterschiedlichen Gewebeimpedanzen (zum Beispiel Muskelgewebe und Blut) unterschiedlich stark reflektiert. Wenn die reflektierten Schallwellen aus dem Gewebe auf die Kristalle im Schallkopf treffen, werden sie zurück in elektrische Signale umgewandelt. Nach komplexen Verarbeitungsschritten wird ein Bild generiert [252].

Vor der Untersuchung wurden die Mäuse gewogen. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 2,5 % Isofluran durch Begasung in einer Narkosebox. Anschließend wurde die Narkose mit 2 % Isofluran über eine Atemmaske mit Hilfe eines Isofluranverdampfers aufrechterhalten. Die Lagerung der Mäuse erfolgte in Rückenlage auf einem Tiermultifunktionsstisch mit integrierter Wärmefunktion, um eine konstante Körpertemperatur von 37 °C zu gewährleisten. Eine zusätzliche Erwärmung konnte bei Bedarf durch eine Infrarotlampe erzielt werden. Um vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, sowie eine einheitliche Narkosetiefe zu gewährleisten, wurden die Mäuse während der Aufnahme mittels der Ableitung eines Elektrokardiogramms (EKG), einer Herzfrequenz- und Atemfrequenzbestimmung und der analen Messung der Körpertemperatur überwacht. Das Bauchfell wurde durch Enthaarungscreme beseitigt. Anschließend erfolgte das Auftragen des auf 37 °C erwärmten Ultraschallgels. Die Sequenzen wurden mit einem Ultraschallgerät (Vevo 2100 Imaging System, FUJIFILM VisualSonics) über einen 30 MHz Schallkopf (MS400, FUJIFILM VisualSonics) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte verblindet mit Hilfe der Software „VevoLAB 1.7.1“ (FUJIFILM VisualSonics).

Für die Darstellung des Herzens in dieser Arbeit wurden verschiedene ein- und zweidimensionale Methoden verwendet. Die B-Mode (*Brightness modulation*) Aufnahme zeigt die topographische Anatomie des Herzens und offenbart Details wie die Dimensionen der Herzkammern, Klappenanomalien oder Wandbewegungsstörungen, wie zum Beispiel bei einem Myokardinfarkt auftreten können. Zunächst wurde eine solche B-Mode Aufnahme der parasternalen langen Achse (PSLA, *parasternal long axis*) des linken Ventrikels in Systole und Diastole aufgezeichnet und daraus die Ventrikellänge in beiden Herzzyklusphasen bestimmt (Abb. 2.2). Anschließend wurde eine Aufnahme im B-Mode der parasternalen kurzen Achse (SAX, *short axis*) des linken Ventrikels auf Höhe der Ventrikelmitte aufgezeichnet.

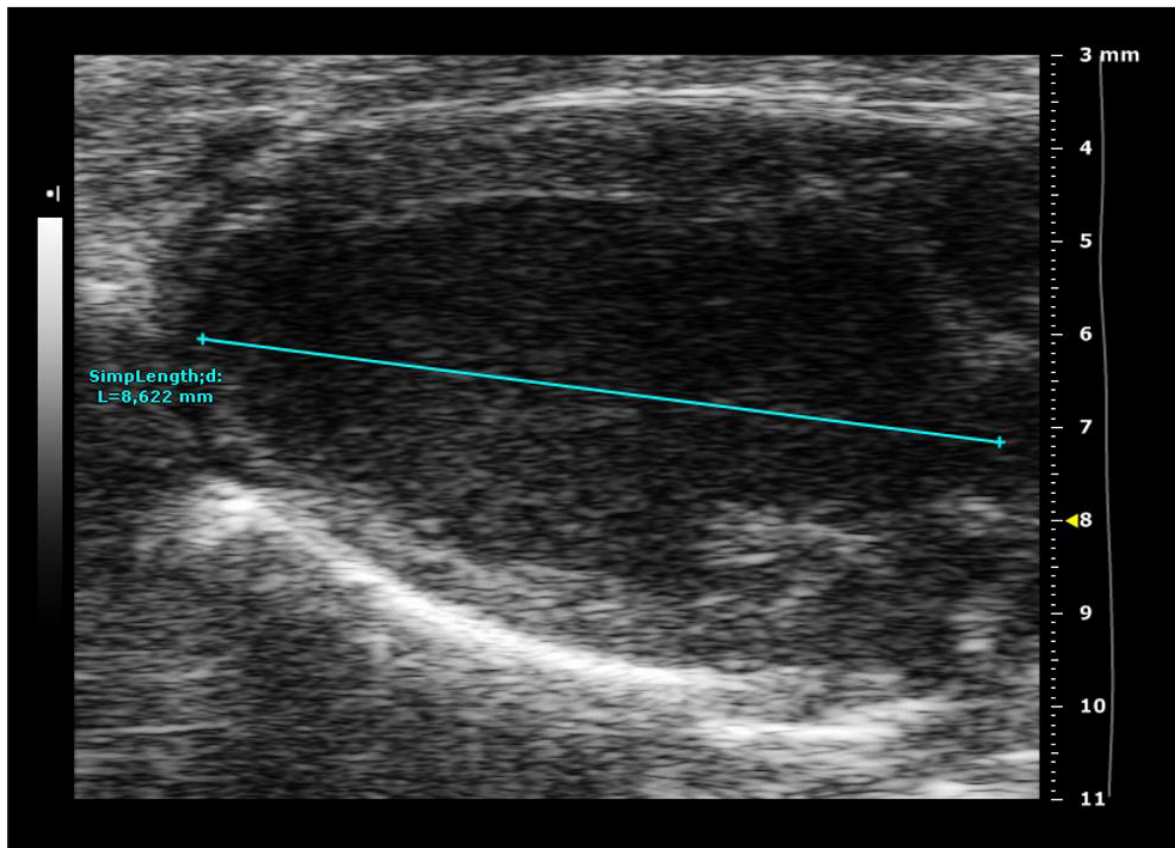


Abb. 2.2: Messung der Länge des linken Ventrikels in der parasternalen langen Achse (PSLA). Dargestellt ist eine exemplarische B-Mode Aufnahme der PSLA des linken Ventrikels in der Diastole zur Messung der Ventrikellänge in mm.

Die eindimensionale M-Mode-Darstellung (*motion modulation*) ermöglicht eine Messung der Größe und des Durchmessers der Herzhöhlen über den Herzzyklus hinweg. Dabei weisen erhöhte enddiastolische linksventrikuläre Wanddickenwerte auf die Ausbildung einer Herzhypertrophie hin. Um eine M-Mode Sequenz der midventrikulären parasternalen kurzen Achse zu erzielen, wurde durch das B-Mode-Bild eine Achse gelegt, die eindimensional die Gewebestrukturen des linken Ventrikels über die Zeit aufträgt. Über die Dauer von drei Herzzyklen wurden in Systole und Diastole die Durchmesser der linksventrikulären anterioren (LVAW, *left ventricular anterior wall*) und posterioren (LVPW, *left ventricular posterior wall*) Myokardwände ausgemessen, sowie das intraventrikuläre Lumen (LVID, *left ventricular internal diameter*) bestimmt (Abb. 2.3). Die linksventrikuläre Masse wurde durch die folgende Formel mit Hilfe der softwaregesteuerten Analysefunktion berechnet:

Linksventrikuläre Masse (LV Mass Corr (LV Trace)) in mg
 $= 0,8 \times 1,053 \times ((\text{durchschnittlicher Durchmesser der äußeren Wand in Diastole})^3 - (\text{durchschnittlicher Durchmesser der inneren Wand in Diastole})^3)$

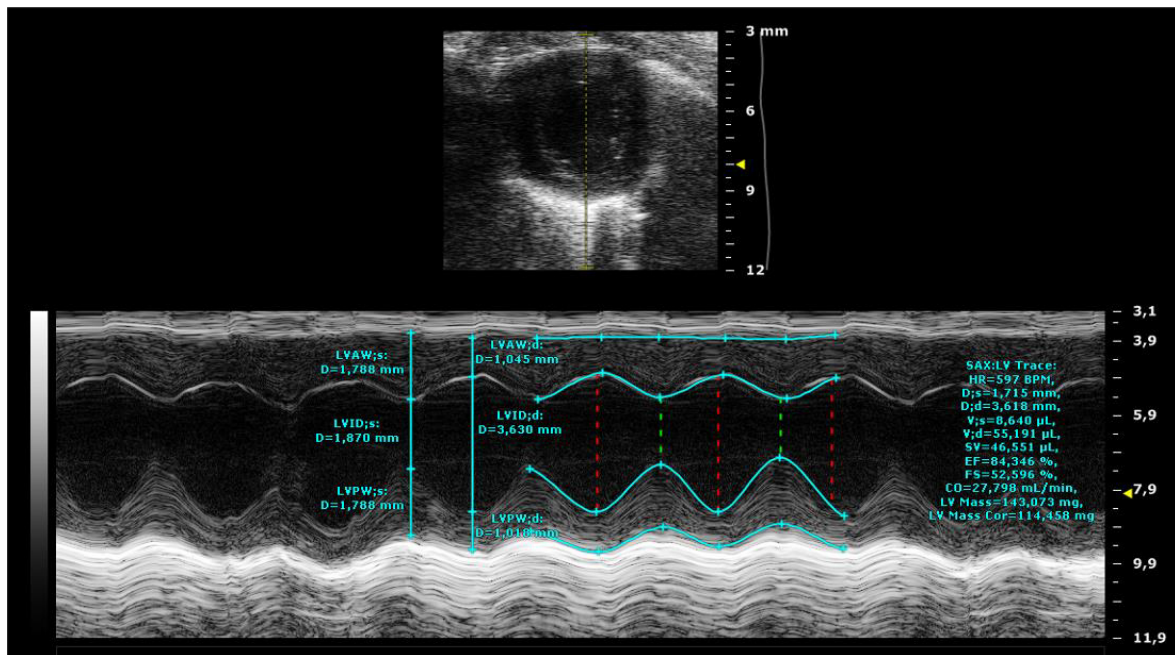


Abb. 2.3: M-Mode der midventrikulären parasternalen kurzen Achse (SAX). Dargestellt ist exemplarisch eine M-Mode Aufnahme der SAX (unteres Bild) mit Markierung der entsprechenden linksventrikulären Wanddicken (LVAW, LVPW) sowie des interventrikulären Durchmessers (LVID) in Systole (s) und Diastole (d) zur Messung der Wandstärken in mm und Berechnung der linksventrikulären Masse in mg. Das obere Bild zeigt die SAX-Aufnahme in der der M-Mode abgeleitet wurde (gelbe, senkrechte Linie).

2.8.4 Operation der Mäuse

Um bei DIO- und Kontroll-Mäusen die Auswirkungen eines Myokardinfarktes zu untersuchen, wurde eine intraoperative Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) für 45 Minuten mit anschließender Reperfusion (I/R) durchgeführt (Abb. 2.4). Dieser gilt trotz einiger Anastomosen als funktionelle Endarterie, da er keinen vollständigen Kollateralkreislauf bildet [253]. Des Weiteren wurde einigen DIO-Tieren mithilfe einer osmotischen Minipumpe IGF-1 für drei Tage nach der OP verabreicht. Die Operation erfolgte durch Dr. André Spychala aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie. Eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 2.5 dargestellt.

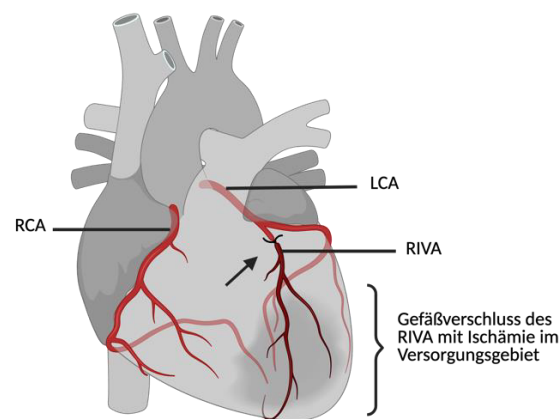
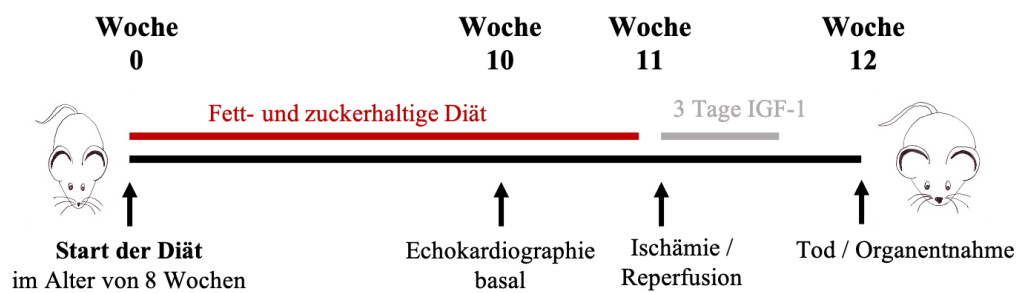


Abb. 2.4: Blutversorgung des Herzens. Dargestellt ist ein Teil der Gefäßversorgung des Herzens über die Hauptäste der Koronararterien *Arteria coronaria dextra* (RCA) und *Arteria coronaria sinistra* (LCA), sowie die Auswirkungen eines Gefäßverschlusses des RIVA (*Ramus interventricularis anterior*). Abb. erstellt mit BioRender.com

Nachdem zu Beginn das Körpergewicht der Mäuse bestimmt worden war, wurden diese mit 2,5 % Isofluran narkotisiert und orotracheal mit einer Verweilkanüle intubiert. Die Ventilation erfolgte mittels eines speziell für Nagetiere hergestellten Beatmungsgeräts (Mouse Ventilator Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik) mit einem Gasgemisch aus Raumluft und 40 % reinem Sauerstoff, sowie einer Beimischung von 2 % Isofluran zur Narkoseerhaltung. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (Uno, Niederlande) positioniert, um eine konstante Körpertemperatur von 37,5 °C zu erzielen. Diese wurde über eine anale Temperatursonde kontinuierlich überwacht. Ebenfalls wurde ein Elektrokardiogramm über die gesamte Dauer des Eingriffs aufgezeichnet. Das Bauchfell wurde mit Enthaarungscreme entfernt und das Operationsgebiet gründlich mit Pvidon-Iod (Betaisodona®, ACA Müller Pharma) desinfiziert. Zur Vergrößerung der Einsicht verwendete der Operateur ein Stereomikroskop (KL 1500 LCD, Leica Biosystems). Der Brustkorb wurde mittels lateraler Thorakotomie (Hautinzision ca. 10 mm Länge) eröffnet und das Perikard durchschnitten. Nach der Detektion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde das Gefäß mit einem 7-0 Polypropylenfaden 1 mm von der Grenze des Vorhofes entfernt umstochen. Die Nahtenden wurden durch einen Silikonschlauch verschlossen, der zur Abklemmung des Gefäßes (Induktion einer Minderperfusion des Myokards) komprimiert wurde. Der daraus resultierende Myokardinfarkt zeigte sich im Abblassen des distal gelegenen Myokards und durch Veränderungen im EKG (ST-Strecken-

Hebung). Nach 45 Minuten wurde die Ligatur des Gefäßes durch Entlastung der Kompression aufgehoben, sodass die Reperfusion des Gewebes stattfand. Der Faden wurde entfernt und die Schichten der Brustwand mit einem resorbierbaren, monofilen 6-0 Faden verschlossen. Ein Teil der DIO-Mäuse erhielt kurz vor Einleitung der Reperfusion einen IGF-1-Bolus (Human IGF-1, 130-093-887, Miltenyi Biotec) von 40 ng pro Gramm Körpergewicht subkutan gefolgt von einer kontinuierlichen IGF-1-Gabe von 1 µg pro Gramm Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von 3 Tagen. Dafür wurde intraoperativ eine subkutane osmotische Pumpe (Typ 1003D, Alzet) in die Nackenregion implantiert. Um vergleichbare Bedingungen in der Kontrollgruppe sicherzustellen, erhielten Standard C57BL/6J-Mäuse und DIO-Tiere eine BSA-Pumpe für 3 Tage. Nach Beendigung des Eingriffs wurden die Tiere mit dem Beginn der Spontanatmung extubiert und unter einer Infrarotlampe für ca. 4 Stunden überwacht.

Mausmodell:



Übersicht über die Versuchsgruppen:

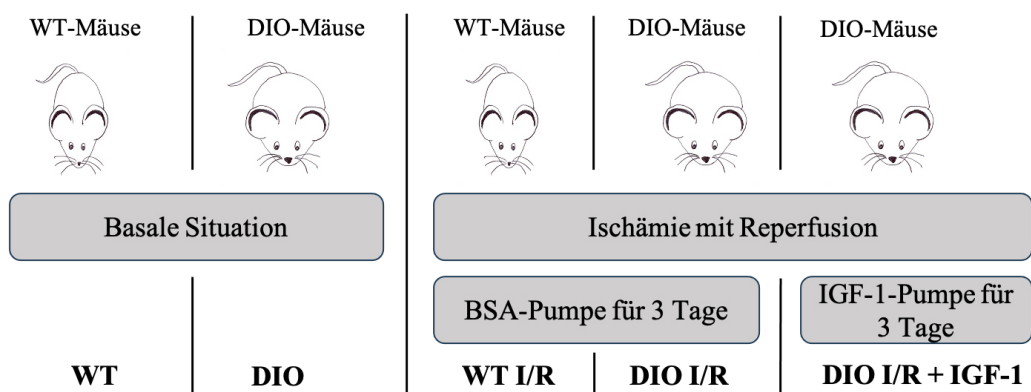


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Mausmodells, sowie orientierende Übersicht über die Versuchsgruppen und ihre Bezeichnung. Dargestellt wurde der Ablauf der Fütterung mit einer fett- und zuckerhaltigen Diät über einen Zeitraum von 10 Wochen. Nach einer Echokardiographie erfolgte bei einem Teil der Mäuse die operativ induzierte Ischämie des Myokards mit anschließender Reperfusion, sowie eine anschließende Pumpentherapie (mit IGF-1 oder BSA).

Alle Tiere erhielten eine Analgesie durch Buprenorphin (Temgesic®, Indivior). Das Analgetikum wurde den Mäusen präoperativ einmalig in einer Dosierung von 0,1 mg/kg Körpergewicht subkutan verabreicht sowie postoperativ in einer Dosierung von 0,05 – 0,1 mg/kg alle 8 Stunden über 3 Tage subkutan gespritzt.

2.8.5 Präparation und Organentnahme

Die Tötung der Tiere mittels zervikaler Dislokation erfolgte im Alter von 18 Wochen (Wildtypen und DIO-Gruppe ohne Infarkt) beziehungsweise 7 Tage nach Myokardinfarkt für histologische Untersuchungen und 3 Tage nach Myokardinfarkt für Genomanalysen. Im Weiteren steht die Bezeichnung „I/R“ für die Gruppen, die eine Ischämie des RIVA mit anschließender Reperfusion erhielten.

Der Brustkorb wurde mittels einer Schere eröffnet, das Herz freipräpariert und entnommen. Es erfolgte die Abtrennung der Vorhöfe, sowie der zu- und abführenden Gefäße. Das übrige Myokard wurde anschließend in PBS gewaschen, um verbliebende Blutbestandteile zu lösen. Für Expressionsanalysen wurde aus einigen Herzproben das Infarktgebiet beziehungsweise bei basalen Mäusen Gewebe an gleicher Stelle (*Area at risk* = AAR) und das *Remote*-Gebiet (septaler Bereich ohne infarziertes Gewebe) aus dem linken Ventrikel und dem Septum präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. (Abb. 2.6). Die AAR stellt dabei das Versorgungsgebiet des RIVA dar, welches bei einer Unterbrechung des Blutflusses (Verschluss des RIVA bei Myokardinfarkt) hypoxisch wird. Die anderen Proben wurden für histologische Analysen weiterverarbeitet.

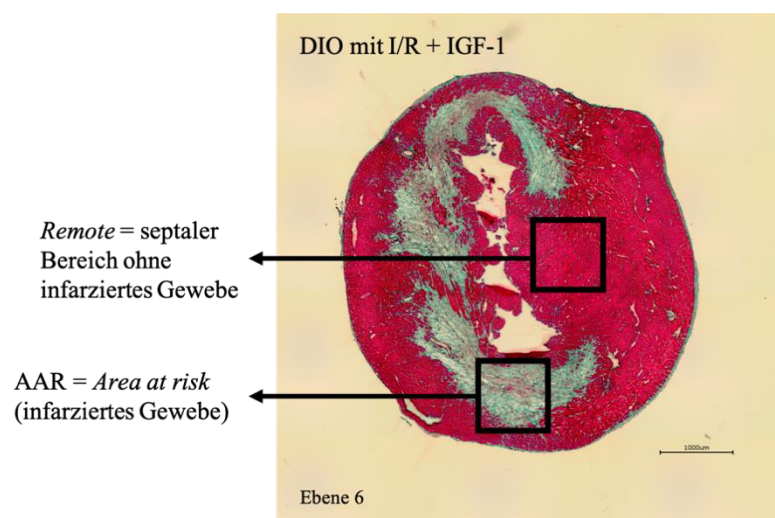


Abb. 2.6: Entnommene Bereiche für Genexpressionsanalysen. Dargestellt sind die Lokalisationen der Probenentnahme (*Remote*- und AAR-Gewebe) für die Genexpressionsanalysen. Dazu dient exemplarisch ein Bild einer Schnittserie eines DIO-Myokards 7 Tage nach I/R und 3-tägiger IGF-1-Behandlung, in der mit Hilfe

der Masson-Trichom-Färbung fibrosiertes Gewebe (Kollagenanteil in grün) angefärbt wurde. Es ist Ebene 6 in 4-facher Vergrößerung durch die Merge-Funktion dargestellt.

2.9 Histologie

2.9.1 Präparation der Herzen

Nach Präparation der Herzen wurden diese jeweils in einen 2 cm x 0,5 cm großen Aluminiumzylinder eingebettet, der mit KP-Cryo-Compound (Klinipath) gefüllt war. Dabei zeigte der Apex nach oben. Die Zylinder wurden in -35 °C vorgekühltes Methylbutan gehalten, um ein schnelles und gleichmäßiges Einfrieren der Proben zu gewährleisten und anschließend kurzzeitig auf Trockeneis aufbewahrt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.9.2 Schneiden am Kryostaten

Zur Anfertigung der Schnittserie wurde der Kryostat zu Beginn auf -23 °C heruntergekühlt und die Herzprobe mindestens eine Stunde bei -20 °C der Temperatur angepasst. Danach wurde die Probe auf der Objektplatte des Kryostaten befestigt. Es folgte das Verwerfen der Schnitte bis zum Anschnitt des Apex. Alle Herzen wurden nach dem hier aufgeführten Schnittprotokoll (Tabelle 8) geschnitten, sodass jede Ebene 350 µm betrug (Abb. 2.7). Dabei wurde die letzte Ebene auf Höhe der Herzklappen bestimmt. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops begutachtet, um gegebenenfalls die Einstellungen des Messers und der Streckerplatte anzupassen.

	Schnittanzahl	Schnittdicke (µm)	Summe (µm)
Trimmen	15	10	150
1. Schnittserie	6	10	60
Trimmen	4	10	40
Feinadjustieren	10	4	40
2. Schnittserie	12	4	48
Verwerfen	3	4	12

Tabelle 8: Schnittprotokoll pro Ebene für histologische Analysen

Es wurden jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger nebeneinander positioniert und kurz angewärmt. Anschließend wurden die Objektträger für einige Minuten hitzefrei unter einem Föhn getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung in einer Box mit Trockenperlen bei -20 °C gelagert.

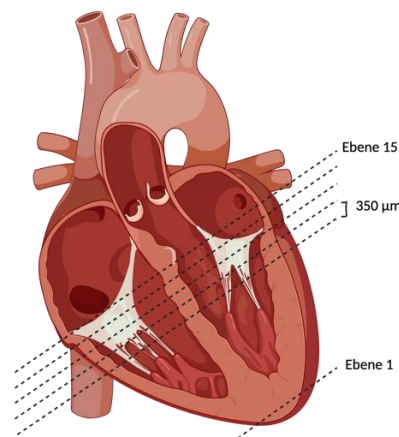


Abb. 2.7: Schnittschema des Herzens. Dargestellt ist die Schnittserie des Herzens, bei der der Abstand zwischen jeder Ebene 350 µm betrug. Es wurden Ebenen vom Apex bis zur Klappenebene verwendet. Abb. erstellt mit BioRender.com

2.9.3 Masson-Trichom-Färbung

Um die Auswirkungen einer dreitägigen IGF-1-Behandlung nach Eintreten eines Myokardinfarkts auf das Ausmaß der Fibrosierung des Ventrikelmyokards bei DIO-Mäusen 7 Tage nach dem operativen Eingriff zu untersuchen, wurde die in 1929 von Claude L. Pierre Masson entwickelte Masson-Trichom-Färbung angewendet. Diese wurde mit dem Färbekit „MASSON-Färbung (Original)“, Bestellnummer: 11092.00.250 der Firma Morphisto durchgeführt. Die Dicke der verwendeten Schnitte betrug 4 µm.

Zu Beginn erfolgte die Fixierung der Schnitte mit Bouin's Solution für 15 Minuten, wobei anschließend die überschüssige Lösung für 5 Minuten mit fließendem Leitungswasser entfernt wurde. Folgend wurden die Zellkerne für 5 Minuten mit Hämatoxylin nach Masson gefärbt. Die Schnitte wurden darauffolgend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Färbung des Zellplasmas erfolgte das Eintauchen der Objektträger für 2 Minuten in Säurefuchsin-Ponceau (Goldner I). Anschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Dann wurden die Objektträger zur Beizung und Färbung für 2 Minuten in Phosphormolybdänsäure-Orange G getaucht und erneut zweimalig für jeweils 30 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen. Die Fasern wurden daraufhin für 20 Minuten in Lichtgrün gefärbt und die restliche Lösung kurz in Leitungswasser abgespült. Die Differenzierung erfolgte kurz in 1-prozentiger Essigsäure, gefolgt von einem kurzen Eintauchen in destilliertem Wasser. Zur Entwässerung wurden die Schnitte kurz zweifach in

Ethanol (96 %) und folgend kurz in Isopropanol eingestellt. Mit Xylol wurden die Schnitte dann abschließend zweimal für jeweils 5 Minuten entwässert. Das Eindecken erfolgte mit Entellan (Merck). Das beschriebene Protokoll färbt die Zellkerne blauschwarz, das Zytoplasma ziegelrot und Kollagen grün (Abb. 2.8).

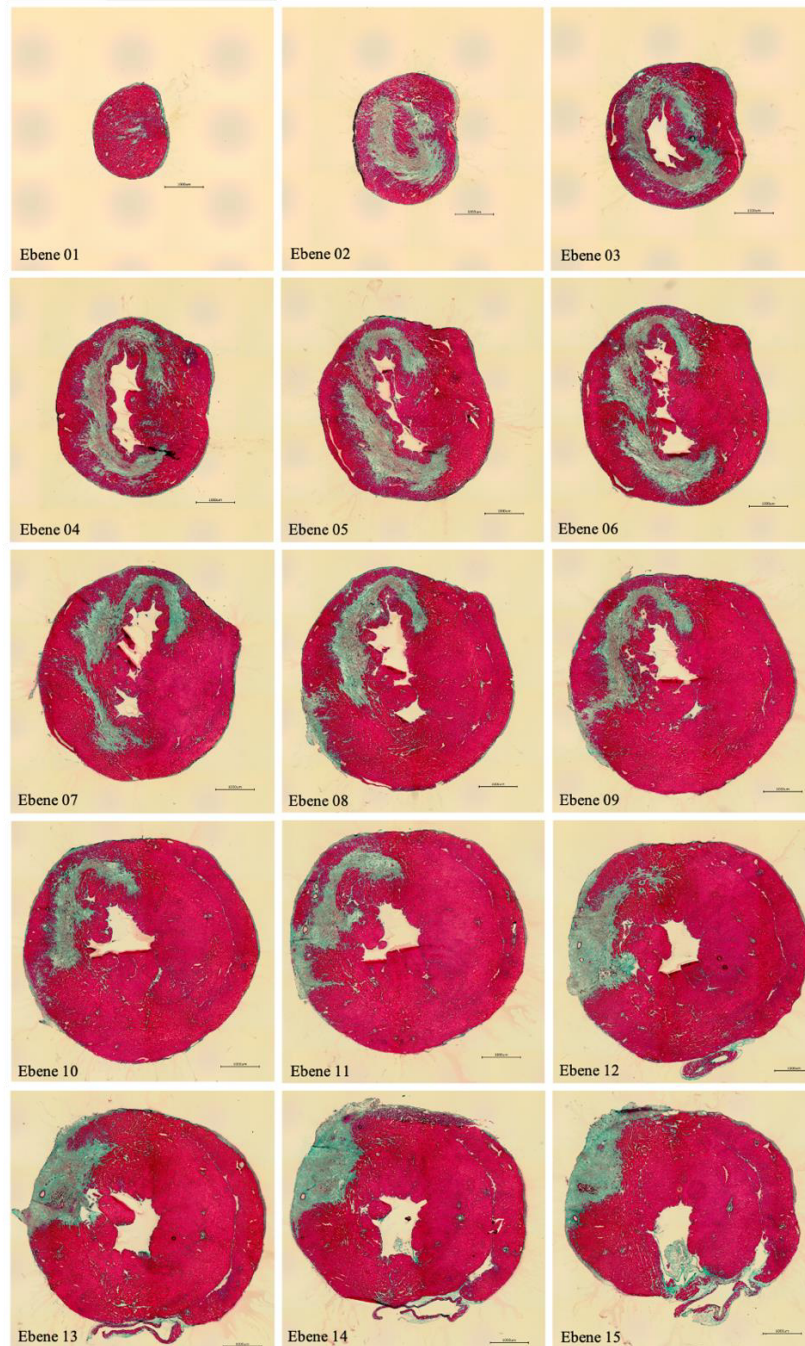


Abb. 2.8: Darstellung einer Schnittserie nach erfolgter Masson-Trichom-Färbung. Dargestellt ist exemplarisch eine Schnittserie eines DIO-Myokards 7 Tage nach I/R und 3-tägiger IGF-1-Behandlung, in der mit Hilfe der Masson-Trichom-Färbung fibrosiertes Gewebe (Kollagenanteil in grün) angefärbt wurde. Dabei liegt zwischen jeder Ebene ein Abstand von 350 μm . Ebene 15 zeigt die Klappenebene.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence, BZ9000 und der „BZ-II-Analyzer Software“ (Keyence). Um einheitliche Bedingungen der Bilder zu erzielen, wurden mit Hilfe der Merge-Funktion pro Schnitt 16 Bilder in 4-facher Vergrößerung erstellt und zusammengefügt. Des Weiteren wurden neben einer konstanten Belichtung von 1:120 Sekunden zusätzliche detaillierte Einstellungen getroffen (Schatten: 47, Helligkeit: 220, Gammakorrektur: 1.0).

Die Auswertung wurde mit dem Grafikprogramm „Image J, Version 1.52p“ (National Institutes of Health) durchgeführt. Dabei wurde die Gesamtfläche eines jeden Schnittes bestimmt, sowie die fibrosierte Fläche (Kollagenanteil in grün) ausgemessen. Anschließend wurde der Narbenanteil im Verhältnis zur Gesamtfläche bis zur Klappenebene der Ventrikel berechnet.

2.9.4 Kollagen III-Färbung (Immunfluoreszenz)

Um den Grad der Fibrosierung im Myokard der verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 2.5) zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung nach dem Protokoll von Emde et al. [254] durchgeführt, die Kollagen III darstellt. Dazu wurden von jedem Herz jeweils 2 Schnitte der Ebene 7 und der Ebene 13 gefärbt.

Zu Beginn wurden die 4 µm dicken Myokardschnitte der Mäuse für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert (250 µl pro Schnitt). Anschließend erfolgten drei Waschschriffe, bei denen die Schnitte einmal für wenige Sekunden und zweimal für jeweils 10 Minuten in PBS eingetaucht wurden. Alle auch im folgenden beschriebenen Waschschriffe wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (KL 2, Edmund Bühler) durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde mit 10 % Normal Goat Serum (NGS), welches in einer Lösung aus 0,2 % Saponin und PBS verdünnt wurde, für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf dem Schüttler blockiert. Saponin permeabilisiert dabei kurzzeitig die Zellmembran. Danach wurden ca. 90 µl der primären Antikörperlösung auf jeden Schnitt gegeben und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung bestand aus dem Antikörper Rabbit α Collagen III (ab 7778, Abcam) mit einer Verdünnung von 1:100 und 2 % NGS verdünnt in PBS/Saponin 0,2 %. Am nächsten Tag erfolgte ein dreistufiger Waschgang mit PBS/Saponin 0,2 % (einmal für wenige Sekunden und zweimal für jeweils 10 Minuten). Der sekundäre Antikörper Goat α Rabbit, gekoppelt an CY3 (111-165-144, Dianova/Jackson) wurde in PBS/Saponin 0,2 % und 2 % NGS in einem Verhältnis von 1:300 verdünnt. 90 µl dieser Antikörperlösung wurden auf jeden Schnitt pipettiert und

für 3 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Seit Einsatz des sekundären Antikörpers erfolgten alle weiteren Schritte aufgrund der Lichtempfindlichkeit des gekoppelten Farbstoffes CY3 im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Schnitte einmal kurz und dreimal für jeweils 15 Minuten in PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Fluoromount G mit DAPI (0100-20, Southern Biotech) eingedeckt und bei 4 °C getrocknet. DAPI (=4',6-Diamidin-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der DNA darstellt und so auch den Zellkern anfärbt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Keyence, BZ9000 und der „BZ-II-Analyzer Software“ (Keyence). Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen wurde zunächst in 4-facher Vergrößerung mit Hilfe der Merge-Funktion eine Übersichtsaufnahme eines jeden Schnittes aus 16 Bildern erstellt. Dabei wurden eine Belichtung von 3 Sekunden, ein Schatten von 18, eine Helligkeit von 200 und eine Gammakorrektur von 1.0 voreingestellt. Anschließend wurden jeweils 4 Nahaufnahmen in 20-facher Vergrößerung aus dem *Remote*-Gebiet und der *Area at Risk* aufgenommen (weitere getroffene Einstellungen: Belichtung = 3 Sekunden, Schatten = 26, Helligkeit = 200, Gammakorrektur = 1.0) (Abb. 2.9).

Die Auswertung der Nahaufnahmen wurde mit dem Grafikprogramm „Image J, Version 1.52p“ (National Institutes of Health) durchgeführt. Zunächst wurde in jedes Bild ein immer gleich großes Kästchen in die linke untere Bildecke gelegt, da hier eine konstante Belichtung des Bildes vorlag. Dieser Ausschnitt wurde anschließend mit der Funktion HSB-Stack konvertiert, sodass lediglich unterschiedliche Helligkeiten zu sehen waren. Danach wurde ein Schwellenwert (*Threshold*) gesetzt, um im Bild die angefärbten Anteile vom Hintergrund zu segmentieren. Dabei wurden Kollagen III angefärbte Bereiche in Rot und der Hintergrund in Graustufen angezeigt. Die gesetzten Schwellenwerte für nicht infarzierte Bereiche lagen bei einem Minimum von 200 und einem Maximum von 254, während im Narbengewebe ein Minimum von 180 bei gleichem Maximum von 254 gewählt wurde. Die verschiedenen Schwellenwerte waren notwendig, da ansonsten eine ausreichende Kontrastierung und somit Abgrenzbarkeit in der Messung bei den unterschiedlich hohen Kollagenanteilen (Narbengewebe *versus* normales Myokard) nicht dargestellt werden konnte. Die Intensität des Signals bei dem jeweiligen Schwellenwertbereich wurde in Pixeln gemessen. Die Menge an Gesamtpixeln ohne gesetzten Schwellenwert war über allen Bildern konstant. Zur abschließenden Auswertung wurden nur Bereiche miteinander verglichen, bei denen die gleiche Schwellenwertgrenze gesetzt worden war. Dazu wurden die Mittelwerte einer jeden

Ebene (aus 4 Nahaufnahmen) der *fold change*-Werte berechnet und diese wiederum zwischen den Gruppen verglichen.

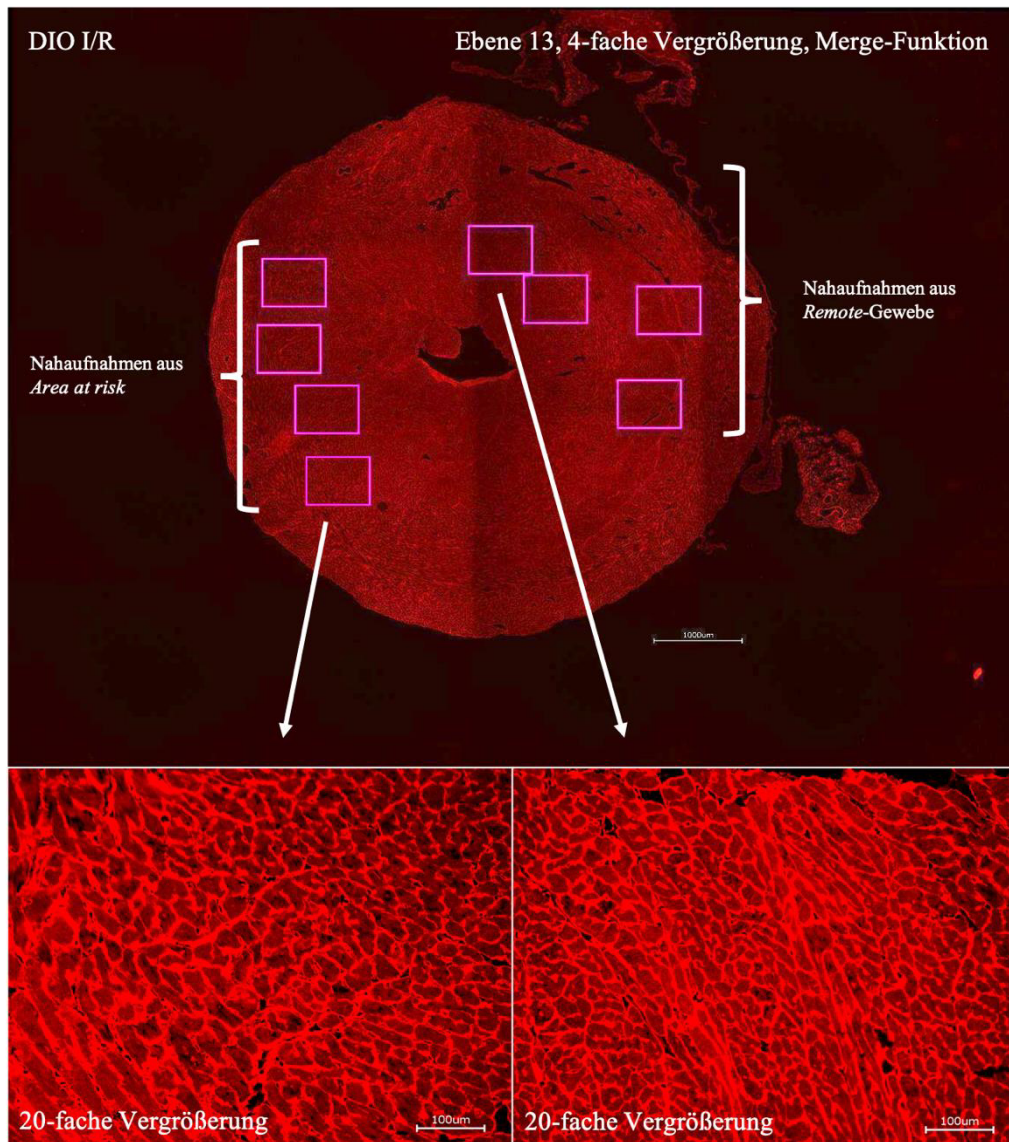


Abb. 2.9: Übersicht über Kollagen III-Färbung. Dargestellt ist im oberen Bild eine Übersichtsaufnahme der Fluoreszenzfärbung mit dem Rabbit α Collagen III einer DIO-Maus nach I/R. Dieser Schnitt wurde in 4-facher Vergrößerung mit Hilfe der Merge-Funktion aufgenommen. Die beiden unteren Bilder zeigen Nahaufnahmen in 20-facher Vergrößerung aus dem *Remote-Gewebe* (rechts) und der AAR (links).

2.10 RNA – Isolation

Zur Durchführung von Genexpressionsanalysen erfolgte eine RNA-Extraktion. Dazu wurde ein im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie etabliertes Hybridprotokoll verwendet. Dieses basiert auf Teilen der Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi [255] und der Verwendung des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen.

Die bei -80 °C eingefrorenen Herzproben wurden vor Beginn der Isolation gewogen. Anschließend wurde zu jeder Probe 1 ml gekühltes Trizol gegeben und das Gewebe mit Hilfe des Tissue Ruptors (Typ II, Qiagen) für 40 Sekunden homogenisiert. Durch das Reagenz Trizol wurden sowohl die Zellen lysiert und die RNA gelöst, als auch RNasen inaktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das dissoziierte Gewebe zur Phasentrennung mit 0,2 ml Chloroform versetzt und gemischt. Die Proben wurden dann 5 Minuten ohne Bewegung bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten zentrifugiert. Dieser und alle im Verlauf genannten Zentrifugationsschritte wurden mit einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (Nr. 5402, Eppendorf) bei 14000 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Nach der Zentrifugation waren drei Phasen zu erkennen: die obere wässrige Phase, welche die gewünschte RNA beinhaltet, die DNA-haltige Interphase und die untere Chloroformphase, die einen Proteingehalt aufweist. Dementsprechend wurde die obere wässrige Phase (RNA-haltig) in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Bis zu 700 μl des Lysats wurden dann auf eine Säule (RNeasy Mini Spin Column, Qiagen) gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Beinhaltete die Probe mehr als 700 μl wurde dieser Vorgang wiederholt. Um Anteile genomischer DNA zu beseitigen und so Verunreinigungen der RNA zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (RNase-Free DNase Set, Qiagen). Dazu wurden 350 μl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben und der Durchfluss nach 15-sekündiger Zentrifugation verworfen. Anschließend wurden die Säulen Tröpfchenweise mit 80 μl eines Gemisches aus 10 μl der DNase I Stammlösung und 70 μl des RDD-Puffers beladen. Nach erfolgter Inkubation über 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden erneut 350 μl RW1-Puffer hinzugegeben. Die Säulen wurden für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Folgend wurden 500 μl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert, für 15 Sekunden zentrifugiert und die gefilterte Flüssigkeit verworfen. Dieser Vorgang wurde mit einer 2-minütigen Zentrifugation wiederholt. Zur Trocknung der Membran der Säulen wurden diese in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und für 1 Minute zentrifugiert. Abschließend erfolgte nach Überführung der Säulen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß ein zweifacher Waschvorgang zur Gewinnung der freien RNA. Dazu wurden jeweils 30 μl RNase freies Wasser auf die Säulen gegeben und die Gefäße nach 1-minütiger Einwirkzeit für 2 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss von ca. 30 μl wurde zur Wiederholung des Vorgangs wieder auf die Säule pipettiert. Im direkten Anschluss wurde die Konzentration der aufgereinigten RNA bestimmt (siehe 2.10.1). Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10.1 Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA nach der Extraktion erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop ND-100, Peqlab Biotechnologie) und der dazu gehörigen Software ND-1000 V.8.1. Dabei wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, da diese dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei 40 µg/ml RNA, sodass sich die RNA-Konzentration mit folgender Formel berechnen lässt:

$$\text{RNA Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

Um den relativen Proteingehalt der Probe und damit deren Reinheit an RNA zu bestimmen wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD₂₈₀) gemessen, was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht und der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ berechnet. Das Verhältnis sollte bei reiner RNA ungefähr bei 2,0 liegen, wobei kleinere Werte auf eine Verunreinigung deuten.

2.11 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

2.11.1 Allgemeines Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Kary B. Mullis [256] entwickelt und dient der Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Durch das Nutzen sequenzspezifischer Primer können gezielt bestimmte Nukleotidsequenzen amplifiziert werden. Im Folgenden soll das allgemeine Prinzip beschrieben werden. Eine PCR-Amplifikation besteht aus etwa 20 – 50 Zyklen, wobei ein jeder Zyklus aus drei Phasen besteht.

1. Denaturierung: Zur Auftrennung des DNA-Doppelstrangs einer Ausgangsprobe in Einzelstränge wird die DNA erhitzt, sodass die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden.
2. Primerhybridisierung: Die Anlagerung der Primer an die komplementären Basen des DNA-Einzelstrangs folgt für etwa 30 Sekunden bei einer für den jeweiligen Primer spezifischen Temperatur.
3. Elongation: Die DNA-Polymerase bindet an die freie OH-Gruppe der Primer am 3'-Ende und füllt durch Verknüpfung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung der Diphosphate die Stränge zu einem neuen komplementären Strang auf. Die bei diesem Schritt vorliegende Temperatur ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase.

Der entstandene Doppelstrang wird wie alle bisher vorhandenen Doppelstränge im nächsten Zyklus zu zwei Einzelsträngen denaturiert und dient ebenfalls als Matrize, sodass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Primer-spezifischen Sequenz kommt.

2.11.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Umschreibung zuvor isolierter RNA in komplementäre DNA (cDNA). Dazu wird das aus Viren stammende Enzym Reverse Transkriptase (RT) genutzt, das durch seine unterschiedlichen Aktivitäten die gesamte Reaktion katalysiert. Zunächst synthetisiert es durch seine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität von einer einzelsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang, sodass ein Hybridstrang vorliegt. Der RNA-Anteil wird anschließend durch eine Endoribonuklease-Aktivität des Enzyms abgebaut und der verbleibende DNA-Einzelstrang durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase der Reversen Transkriptase zum Doppelstrang vervollständigt.

In dieser Arbeit wurde für die Reverse Transkription das QuantiTect Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurde zuvor eine Verdünnung aller Proben auf 200 ng/ μ l RNA in 20 μ l Gesamtvolumen erstellt. Die isolierten RNA-Proben und die Reverse Transkriptase wurden durchgehend auf Eis gelagert. Von jeder Probe wurden zu Beginn 5 μ l der RNA in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Um einen vollständigen DNA-Verdau zu gewährleisten, wurde ein Mix aus 7 μ l Wasser und 2 μ l gDNA Wipeout Puffer erstellt und der Probe hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 2 Minuten bei 42 °C in einem Thermocycler (Mastercycler Nexus Gradient, Eppendorf) inkubiert. Es folgte die Reverse Transkription nach Angaben des Herstellers. Jeder Probe wurde ein Ansatz aus 1 μ l Reverse Transkriptase, 4 μ l RT-Puffer (enthält auch dNTPs) und 1 μ l RT-Primer Mix hinzugegeben. Nach erfolgter Mischung wurde die Probe für 20 Minuten bei 42°C und für 3 Minuten bei 95 °C im Thermocycler inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung der cDNA fand eine Lagerung bei -80 °C statt.

2.11.3 Quantitative „Real - Time“ PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) beruht auf der von Kary B. Mullis entwickelten herkömmlichen PCR-Methode und ermöglicht zusätzlich zur Primer-spezifischen Vervielfältigung der DNA, deren Quantifizierung. Diese findet in der exponentiellen Phase der PCR statt. Zur Quantifizierung wird die DNA fluoreszenzmarkiert und die Intensität des Farbstoffs nach Durchlauf eines jeden Amplifikationszyklus während der Elongation gemessen. Durch die Korrelation steigender Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Menge

an synthetisierter DNA können Rückschlüsse auf die initiale DNA-Menge gezogen werden. In der Anwendung wird dieses Prinzip genutzt, um die Expressionsstärke eines Gens zu messen. Die Verwendung Gen-spezifischer Primer grenzt den zu amplifizierenden Bereich ein und quantifiziert die Gen-codierenden Sequenzen.

Zur Detektion der Expression des Transkripts (cDNA) wurde der Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix der Firma Thermo Scientific verwendet. Dieser beinhaltet den Cyaninfarbstoff SYBR-Green, die „Maxima Hot Start“ Taq DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und einen PCR-Puffer. SYBR-Green bindet die doppelsträngige cDNA und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Des Weiteren wurden dem Ansatz cDNA und sequenzspezifische Primer hinzugefügt, sodass das Gemisch, welches auf eine 96-Well Platte pipettiert wurde, pro Well aus folgenden Komponenten bestand:

10 μ l SYBR Green / ROX qPCR Master Mix

1 μ l cDNA

7,2 μ l H₂O (RNase-frei)

0,9 μ l Forward Primer (0,45 μ M)

0,9 μ l Reverse Primer (0,45 μ M)

20 μ l Gesamtvolumen

Alle Experimente wurden mit dem „StepOnePlus Real-Time PCR Detection System“ (Applied Biosystems) und der dazugehörigen Software (StepOne Software v2.3, Applied Biosystems) unter folgenden Einstellungen durchgeführt. Die Proben wurden als Duplikate gemessen. Der erste Zyklus der Genamplifikation fand zur Aktivierung der Taq DNA-Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C statt. Die weiteren 40 Zyklen wurden bei einer Temperatur von 95 °C für 15 Sekunden und bei 60 °C für weitere 60 Sekunden absolviert. Um die Spezifität der Amplifikate zu verifizieren, wurden im Anschluss Schmelzkurven unter den gleichen Bedingungen analysiert. Dabei wurde die Temperatur alle 15 Sekunden um 0,3 °C bis zu einer Endtemperatur von 90 °C erhöht.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der X_0 -Methode nach Thomsen et al. [257], wobei in allen Experimenten ein Referenzgen (NUDC) mitgemessen wurde, um einen relativen Mengen-Vergleich zu erzielen.

Die Amplifikation einer qPCR besteht aus drei Phasen. In der ersten Phase ist die Menge an cDNA begrenzt und somit die Wahrscheinlichkeit einer Primer- und DNA-Polymeraseanlagerung niedrig. Die dritte Phase kennzeichnet sich durch den gegenteiligen Effekt, da die Menge der amplifizierten Produkte sehr hoch ist, die Substrate verbraucht wurden und die Polymerasen durch die Hitze mit der Zeit in ihrer Funktion eingeschränkt arbeiten. Für die Auswertung wurde daher die zweite Phase betrachtet, in der es zu einem exponentiellen und quantifizierbaren Anstieg an cDNA-Sequenzen kommt. Dabei wurde für jedes Gen ein Schwellenwert (*Threshold*) gesetzt, der sich innerhalb des exponentiellen Wachstumsbereichs der Amplifikationsrate befindet. Aus dem *Threshold* und der Proben-spezifischen Amplifikationskurve wurde der Ct-Wert (*Cycle Threshold*, zu Deutsch: Schwellenwertzyklus) bestimmt. Dieser definiert den Zyklus, bei dem die amplifizierte Menge an Zielmolekülen den bestimmten *Threshold* erreicht.

Die X_0 -Methode beschreibt die exponentielle Amplifikation mit folgender Gleichung:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_{amp})^n$$

Dabei stellt X_n die Anzahl an Zielmolekülen zum Zeitpunkt n dar, wobei n der Zyklusanzahl entspricht. X_0 beschreibt die Menge an Zielmolekülen zu Beginn und E_{amp} die Effizienz der Amplifikation. Es wird angenommen, dass die qPCR eine Effizienz von 100 % ($E_{amp} = 1$) aufweist. Wird für n der Ct-Wert eingesetzt, entspricht die Menge an Zielmolekülen (X_n) zu diesem Zeitpunkt dem manuell gesetzten *Threshold*, sodass sich folgende Formel für die Berechnung ergibt:

$$X_0 = \frac{Threshold}{2^{Ct}}$$

Der errechnete X_0 -Wert des zu analysierenden Gens wurde anschließend auf den X_0 -Wert des Referenzgens (NUDC) bezogen. Daraufhin wurden (wenn nicht anders im Ergebnisteil beschrieben) die Mittelwerte der WT auf 1 normalisiert und bezogen darauf die relative Genexpression (*Fold change*) der anderen Gruppen berechnet.

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad PRISM 6 der Firma GraphPad Software Inc. Dabei wurden die Ergebnisse als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt und die Signifikanzen mit Hilfe eines Student t-Test zwischen zwei Gruppen oder mittels ANOVA bei mehr als zwei Gruppen verglichen. Die genaue Anwendung wurde bei den jeweiligen Ergebnissen beschrieben. Diese Signifikanzen gelten im Folgenden:

* p-Wert $< 0,05$ = signifikant

** p-Wert $< 0,01$ = hochsignifikant

*** p-Wert $< 0,001$ = höchstsignifikant

3 Ergebnisse

3.1 Die Umstellung auf eine fett- und zuckerhaltige Diät führt zu einer deutlichen Gewichtszunahme

Um prädiabetische Bedingungen in einem Mausmodell zu induzieren, wurden wildtypische C57BL/6 Mäuse im Alter von 8 Wochen über 10 Wochen mit einer fett- und zuckerhaltigen Diät (Sniff S7200-E010) gefüttert (DIO = „Diet induced obesity“). Eine Kontrollgruppe (WT = Wildtyp) erhielt über diese 10 Wochen die normale Fütterung (Sniff V1534-000). In initialen Analysen in unserem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie konnte gezeigt werden, dass die Umstellung der Fütterung bei den DIO-Tieren sowohl zu leicht erhöhten Blutglukosespiegeln, als auch zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz führt (Abb. 2.1). Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit der Gewichtsverlauf während der 10-wöchigen Diät durch wöchentliches Wiegen der Tiere analysiert.

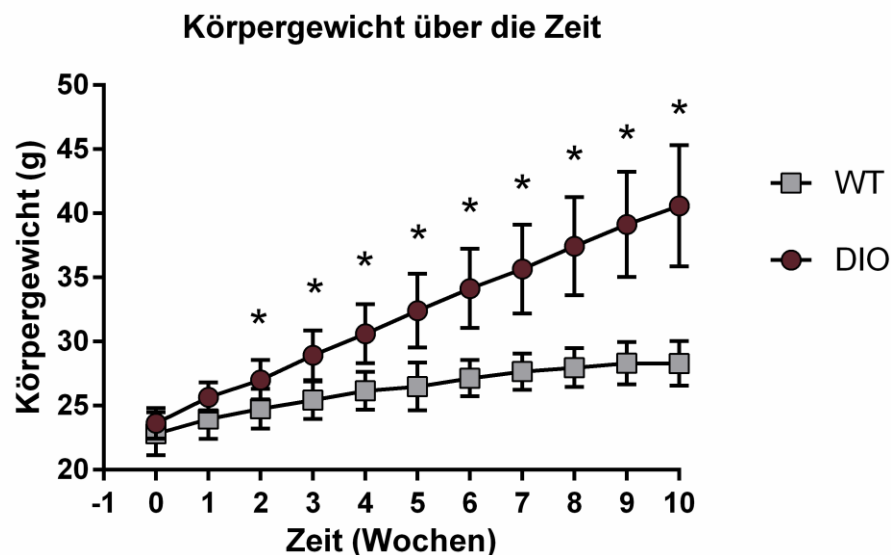


Abb. 3.1: Darstellung des Körpergewichts gemessen über einen Zeitraum von 10 Wochen von DIO- und WT-Mäusen. Zur Analyse der Gewichtszunahme bei DIO- Mäusen, die über 10 Wochen (Zeitraum der Messungen) eine fett- und zuckerhaltige Diät erhielten verglichen mit WT-Mäusen, wurde einmal pro Woche deren Körpergewicht in Gramm (g) gemessen (n = 31). Die Auswertung zeigte eine signifikant höhere Gewichtszunahme der DIO-Mäuse im Vergleich zu den WT. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *two-way-repeated measures* ANOVA, Sidak post-hoc Test, wobei ein * = p-Wert < 0,05 als signifikant gewertet wurde.

Die hochkalorische Diät über einen Zeitraum von 10 Wochen zeigte eine signifikante Gewichtszunahme der DIO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Tieren, wobei eine erste

Signifikanz nach einem Fütterungszeitraum von 2 Wochen auftrat (Abb. 3.1). Während die Wildtypen eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 0,55 g pro Woche ($\pm 0,32$) aufwiesen, nahmen die DIO-Mäuse im Mittel 1,7 g pro Woche zu ($\pm 0,21$). Nach 10-wöchiger Fütterung konnte bei den DIO-Mäusen ein durchschnittliches Gewicht von 40,6 g gemessen werden, was einer Zunahme von 72 % bezogen auf das ursprüngliche Körpergewicht (im Alter von 8 Wochen) entspricht. Verglichen mit der Kontrollgruppe, die ein durchschnittliches Körpergewicht von 28,3 g hatte und somit eine Gewichtszunahme von 24 % erzielte, waren die DIO-Tiere am Ende des Beobachtungszeitraumes im Mittel 12,3 g schwerer. Es konnte somit gezeigt werden, dass die fett- und zuckerhaltige Diät zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Mäuse führt und die Ausbildung eines Prädiabetes initiiert.

3.2 Echokardiographische Untersuchungen zeigen morphologische Veränderungen des linken Ventrikels bei DIO-Mäusen

Eine verstärkte Gewichtszunahme ist ein Risikofaktor für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung, die auch zu strukturellen Veränderungen des Myokards wie zum Beispiel einer Herzmuskelhypertrophie führen können [191]. Um das Myokard der DIO-Tiere im Vergleich zu wildtypischen Mäusen *in vivo* morphologisch zu beurteilen, wurde eine Echokardiographie im Alter von 18 Wochen durchgeführt.

Die Bestimmung der Länge des linken Ventrikels in Diastole und Systole erfolgte in der parasternalen langen Achse. In beiden Herzzyklusphasen zeigte sich eine signifikante Abnahme der Länge des linken Ventrikels. Während der Mittelwert der linksventrikulären Länge bei WT 8,87 mm $\pm 0,24$ in Diastole und in der Kontraktionsphase 8,24 mm $\pm 0,32$ betrug, wurde bei DIO-Mäusen eine Länge von 8,64 mm $\pm 0,21$ in Diastole und 7,81 mm $\pm 0,24$ in Systole gemessen. Daraufhin wurden zusätzliche echokardiographische Analysen durchgeführt, um die morphologischen Veränderungen genauer zu charakterisieren.

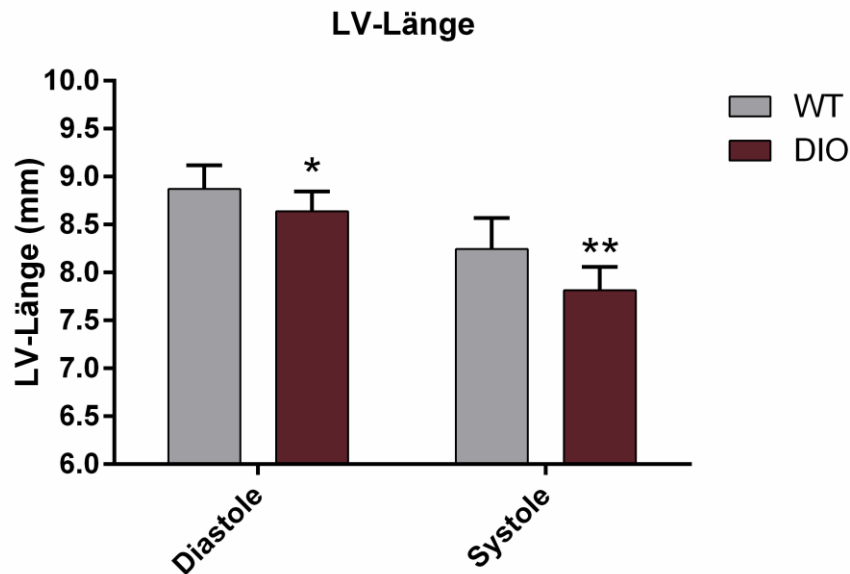


Abb. 3.2: Darstellung linksventrikulären Länge bei DIO- und WT-Mäusen. Dargestellt sind die Messungen der Länge des linken Ventrikels (LV) in der parasternalen langen Achse in Diastole und Systole in mm bestimmt aus der Echokardiographie, wobei gezeigt werden konnte, dass die DIO-Tiere in beiden Herzzyklusphasen eine signifikante Abnahme der linksventrikulären Länge aufweisen. (n = 10). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen unpaired two-tailed Student's t-Test für die jeweilige Herzzyklusphase, wobei: * = p-Wert < 0,05 und ** = p-Wert < 0,01 als signifikant gewertet wurde.

3.2.1 DIO-Mäuse weisen ein verdicktes linksventrikuläres Myokard und ein verkleinertes Ventrikellumen auf

Um Aussagen über eine mögliche Wandverdickung unabhängig von der Kontraktion des Myokards bei DIO-Mäusen treffen zu können, wurde die linksventrikuläre Wanddicke sowie der Innendurchmesser des Ventrikellumens linksseitig in der midventrikulären parasternalen kurzen Achse (SAX) in Systole und Diastole bestimmt (Abb. 3.3). Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der Wanddicke der DIO-Mäuse in beiden Phasen des Herzzyklus, sowie eine Abnahme des Innendurchmessers des linken Ventrikels.

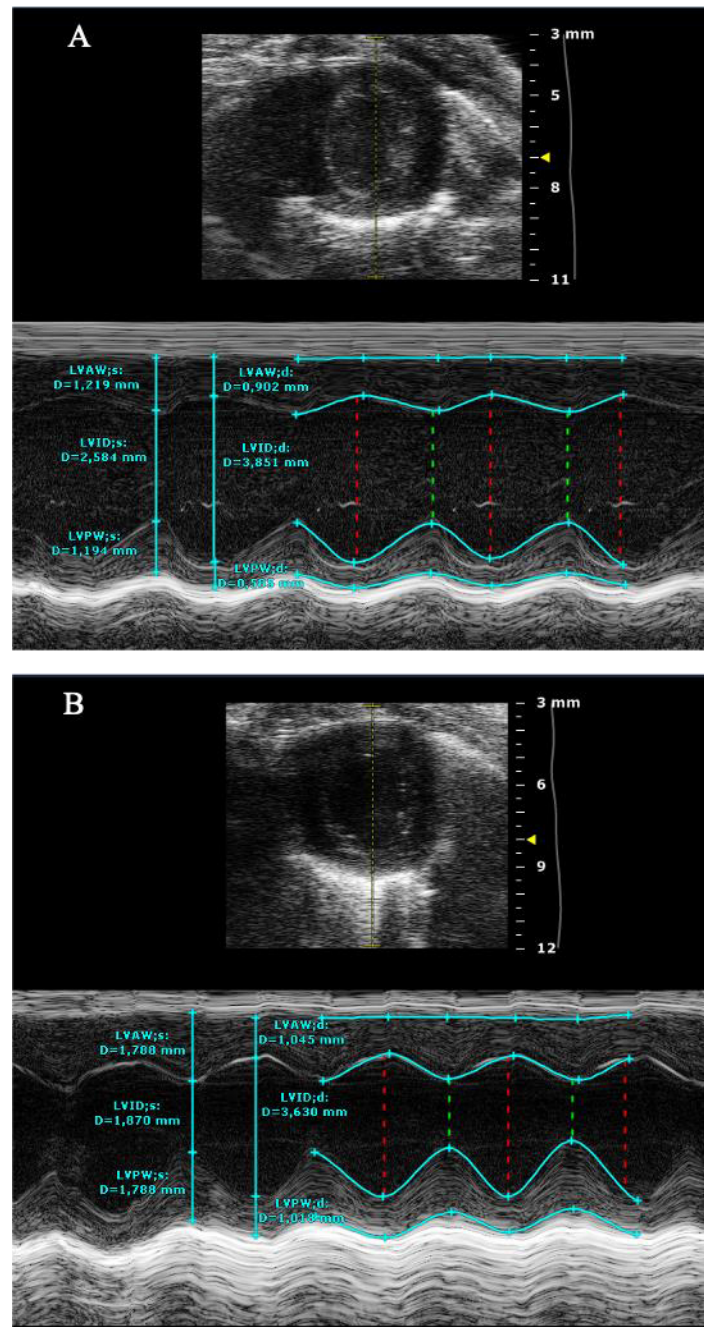


Abb. 3.3: M-Mode der midventrikulären parasternalen kurzen Achse (SAX) aufgezeichnet bei einer DIO-Maus und einer WT-Maus. Dargestellt ist exemplarisch eine M-Mode Aufnahme der SAX einer WT-Maus (A) und einer DIO-Maus (B) mit Markierung der entsprechenden linksventrikulären, anterioren und posterioren Wanddicken (LVAW, LVPW) sowie des interventrikulären Durchmessers (LVID) in Systole (s) und Diastole (d) zur Messung der Wandstärken.

Die Messungen ergaben in den DIO-Mäusen in der Diastole im Mittel eine anteriore Wanddicke von $0,98 \text{ mm} \pm 0,14$, was verglichen zu den WT-Mäusen ($0,91 \text{ mm} \pm 0,11$) einer Zunahme von 8,3 % entspricht (Abb. 3.4 A).

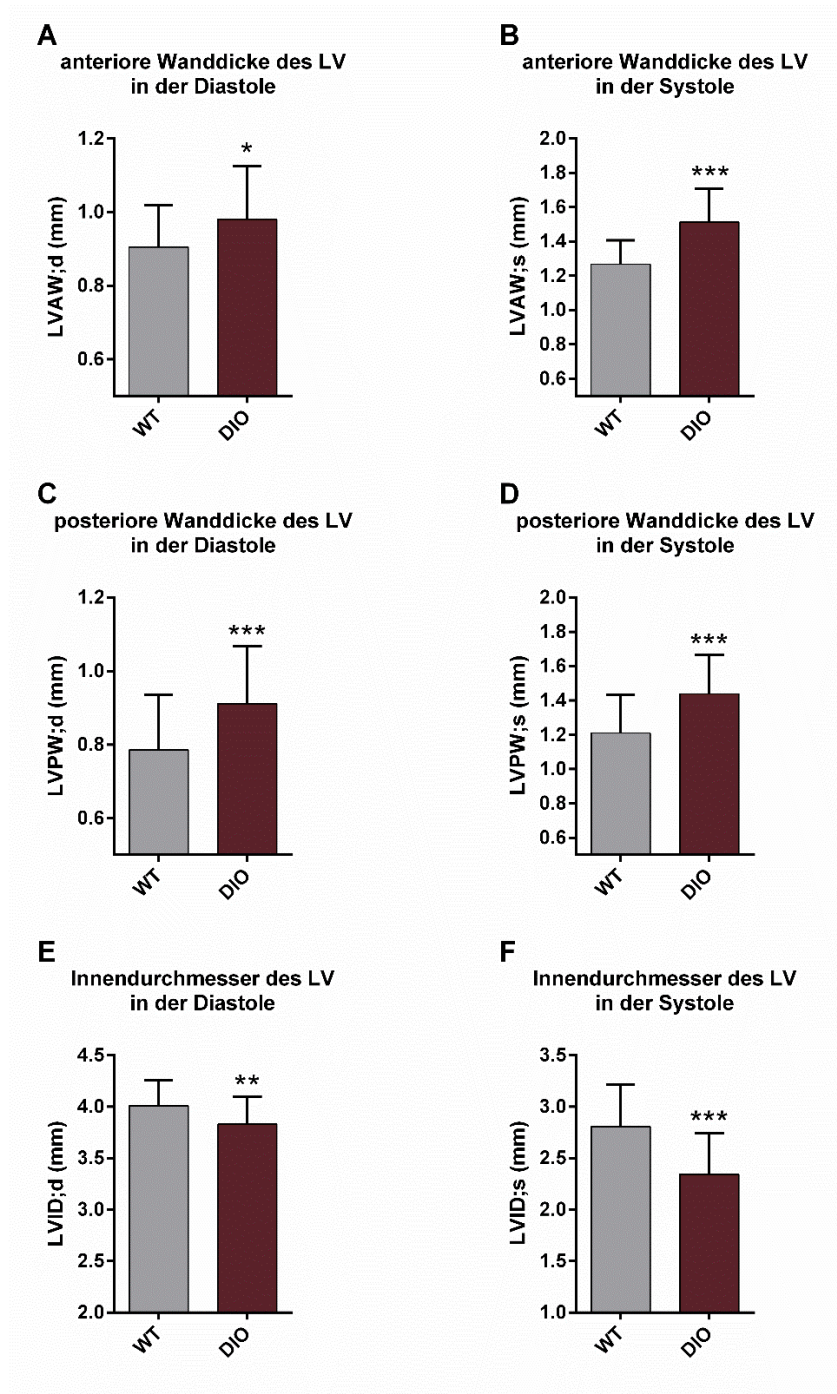


Abb. 3.4: Darstellung der echokardiografisch bestimmten Wanddicken und des gemessenen Innendurchmessers des linken Ventrikels (LV) bei DIO- und WT-Mäusen. (A-D) Dargestellt sind die Messungen der linksventrikulären anterioren (LVAW) und posterioren (LVPW) Wanddicke in Diastole und Systole in mm, wobei gezeigt werden konnte, dass die DIO-Tiere in jedem Bereich eine signifikant dickere Myokardwand aufweisen. (E-F) Dargestellt sind Messungen des linksventrikulären Innendurchmessers (LVID) in Diastole und Systole in mm. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme des Durchmessers bei den DIO-Mäusen. (n = 25/67). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen unpaired two-tailed Student's t-Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde.

Noch deutlicher zeigte sich der Unterschied in der Systole (Abb. 3.4 B), in der die DIO-Tiere eine 19 % dickere Wand aufwiesen ($1,51 \text{ mm} \pm 0,20$) als die WT-Tiere ($1,27 \text{ mm} \pm 0,14$). Die gleiche Tendenz ergab sich aus der Messung der posterioren Wanddicke mit einer Zunahme von 16 % (WT: $0,79 \text{ mm} \pm 0,15$; DIO: $0,91 \text{ mm} \pm 0,16$) in der Diastole (Abb. 3.4 C) und 18 % (WT: $1,21 \text{ mm} \pm 0,22$; DIO: $1,44 \text{ mm} \pm 0,23$) in der Systole bei den DIO-Mäusen (Abb. 3.4 D). Interessanterweise nahm der Innendurchmesser des linken Ventrikels in beiden Herzzyklusphasen ab. So wurde in der Diastole ein Innendurchmesser bei den DIO-Mäusen von $3,8 \text{ mm} \pm 0,27$ gemessen, während dieser bei den WT $4,0 \text{ mm} \pm 0,25$ betrug (Abb. 3.4 E), was einer Abnahme um 4,5 % entspricht. In der Systole zeigte sich kongruent zu der Wanddickenzunahme eine Verkleinerung des Innendurchmessers um 16,5 % (WT: $2,81 \text{ mm} \pm 0,41$; DIO: $2,34 \text{ mm} \pm 0,40$) (Abb. 3.4 F). Zusammengefasst zeigen diese Daten deutlich, dass die hochkalorische Fütterung zu einer signifikanten Wanddickenzunahme führt, die in Kombination mit der Verkleinerung des Ventrikellumens, auf die Ausbildung einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie hinweist.

3.2.2 Die hochkalorische Diät führt zur Zunahme der linksventrikulären Masse

Um den Einfluss der fett- und zuckerhaltigen Fütterung auf das Herzgewicht zu untersuchen, wurde mit Hilfe der softwaregesteuerten Analysefunktion des Programms „VevoLAB 1.7.1“ (FUJIFILM VisualSonics) die linksventrikuläre Masse der DIO- und WT-Mäuse berechnet. Dabei zeigte die Auswertung einen signifikanten Massenunterschied zwischen beiden Gruppen von 10,8 %. Bei den DIO-Mäusen wurde eine durchschnittliche linksventrikuläre Masse von $110,68 \text{ mg} \pm 17,60$ gemessen, während sie dagegen bei den WT-Mäusen $99,91 \text{ mg} \pm 9,92$ betrug (Abb. 3.5).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Umstellung der Fütterung sowohl zu morphologischen Veränderungen (Abnahme der Ventrikellänge und Wanddickenzunahme des linken Ventrikels) als auch zu einer Massenzunahme der Herzen bei Mäusen führt.

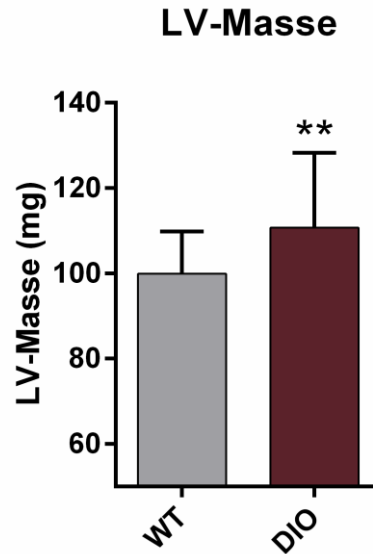


Abb. 3.5: Darstellung der aus echokardiografischen Daten errechneten linksventrikulären Masse (LV-Masse) von DIO- und WT-Mäusen. Dargestellt ist die mit Hilfe der softwaregesteuerten Analysefunktion des Programms „VevoLAB 1.7.1“ (FUJIFILM VisualSonics) errechnete linksventrikuläre Masse der DIO- und WT-Mäuse. Die Berechnungen zeigen eine signifikante Massenzunahme des linken Ventrikels bei DIO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. (n = 25/67). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t-Test*, wobei: * = p-Wert < 0,05 und ** = p-Wert < 0,01 als signifikant gewertet wurde.

3.3 Analyse des Gehalts an reaktiver Fibrose in DIO-Mäusen vor und nach Eintreten eines Myokardinfarktes

Kardiale Umbauprozesse (*Remodeling*) entstehen durch strukturelle und zelluläre Veränderungen, die wiederum auf unterschiedliche Erkrankungen wie zum Beispiel einen MI aber auch T2DM zurückzuführen sind [160]. Ein wichtiger Faktor des *Remodelings* ist der vermehrte Einbau von Kollagen, der zu einer sekundären Fibrose führt, wodurch sich die Organarchitektur verändert und die Beweglichkeit der Kardiomyozyten vermindert ist [178]. Nachdem bereits morphologische Veränderungen bei DIO-Mäusen in der Echokardiographie nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob diese Gruppe auch strukturelle Unterschiede in Form einer vermehrten Kollageneinlagerung im Myokard aufweist. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Zusätzlich zum Vergleich zwischen Kontroll- (WT) und DIO-Tieren, wurde auch Gewebe von Herzen untersucht, die aus Tieren isoliert wurden, die einen experimentell ausgelösten Myokardinfarkt aufwiesen. Entsprechend des Protokolls wurden die Herzen sieben Tage nach Induktion eines MI (45-minütige Ischämie gefolgt von Reperfusion, I/R)

für histologische Untersuchungen und drei Tage nach I/R für Genomanalysen entnommen. Ein Teil der DIO-Mäuse erhielt nach I/R IGF-1 für drei Tage über eine osmotische Minipumpe, da dem Hormon kardioprotektive Effekte nachgewiesen werden konnten. Eine Übersicht über die Versuchsgruppen zeigt Abb. 2.5

3.3.1 DIO-Mäuse zeigen keine veränderte Kollagen III-Einlagerung in der Immunfluoreszenz.

Die Darstellung von Kollagen III erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung durch einen Rabbit α Collagen III Antikörper auf zwei Ebenen des Myokards der verschiedenen Versuchsgruppen. Dabei zeigte sich die kollagenhaltige Matrix in Rot, wie beispielhaft für die Ebene 7 eines WT-Herzens und eines DIO-Schnittes in Abb. 3.6 zu sehen ist.

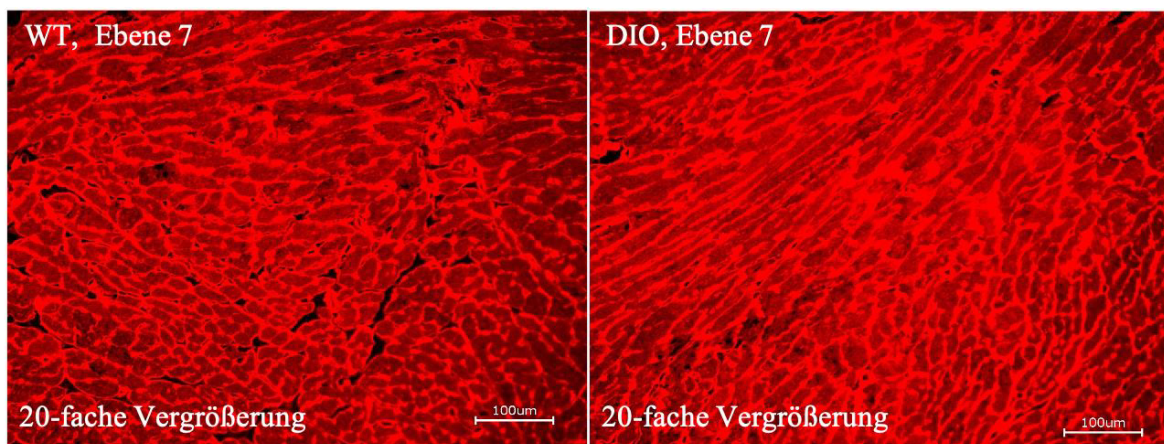


Abb. 3.6: Kollagen III-Immunfluoreszenzfärbung. Dargestellt sind zwei Myokardschnitte der Ebene 7 links eines WT-Myokards und rechts eines DIO-Herzens, die nach erfolgter Immunfluoreszenzfärbung Kollagen III in Rot darstellen. Die Aufnahme wurde in 20-facher Vergrößerung erstellt.

Die anschließende Auswertung der vorhandenen Kollagen III-Menge erfolgte bei konstanter Belichtung durch Setzung eines Schwellenwertes und Messung des Helligkeitssignals in Pixeln. Dabei mussten unterschiedliche Schwellenwerte für die basalen Gruppen, die Infarkttiere und die unterschiedlichen Bereiche (Narbgewebe und *Remote*) gesetzt werden, da eine Abgrenzbarkeit aufgrund des unterschiedlich hohen Kollagenanteils bei einem einheitlichen Schwellenwert nicht möglich gewesen wäre (siehe Kapitel 2.9.4). Daher wurden diese Gruppen nur getrennt voneinander im Folgenden ausgewertet. Unter basalen Bedingungen (Abb. 3.7) konnte keine vermehrte Kollagen III-Einlagerung im DIO-Myokard verglichen zu WT nachgewiesen werden (p -Wert = 0,5130), sodass das Vorliegen eines Prädiabetes allein scheinbar zu keinem gesteigerten Kollagen III-Einbau führt.

Kollagen III-Einlagerung unter basalen Bedingungen

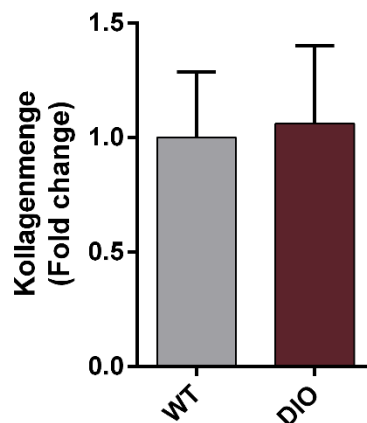


Abb. 3.7: Darstellung der gemessenen relativen Menge an Kollagen III bei WT und DIO-Mäusen unter basalen Bedingungen. Es wurden WT- und DIO-Hezen entnommen, eingebettet und immunhistochemisch mit einem Rabbit α Collagen III Antikörper gefärbt, der Kollagen III in Rot darstellt. Dargestellt ist die errechnete relative Menge an Kollagen III (*Fold change*) im Verhältnis zum WT. Die Auswertung ergab keinen Unterschied zwischen WT (*Fold change*: $1 \pm 0,29$) und DIO (*Fold change*: $1,061 \pm 0,34$) ($n = 4$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t-Test*, wobei ein p -Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet wurde.

Auch nach Eintreten eines MI mit anschließender Reperfusion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, sondern nur eine leichte Tendenz (p -Wert = $0,06$) zu einer erhöhten Kollagen III-Einlagerung bei DIO-Mäusen im *Remote*-Gewebe (*Fold change*: $1,415 \pm 0,62$ verglichen zu WT (*Fold change*: $1 \pm 0,27$), wobei eine große Variabilität innerhalb der Gruppen vorlag. Eine IGF-1-Behandlung verminderte diese Tendenz lediglich leicht (*Fold change*: $1,22 \pm 0,49$) (Abb. 3.8 A). Dieses Muster wurde auch in der AAR nachgewiesen. Während Schnitte von DIO-Hezen eine leicht erhöhte Kollagenmenge beinhalteten (*Fold change*: $1,19 \pm 0,20$), war die Menge nach einer IGF-1-Gabe leicht reduziert (*Fold change*: $1,01 \pm 0,26$) (Abb. 3.8 B).

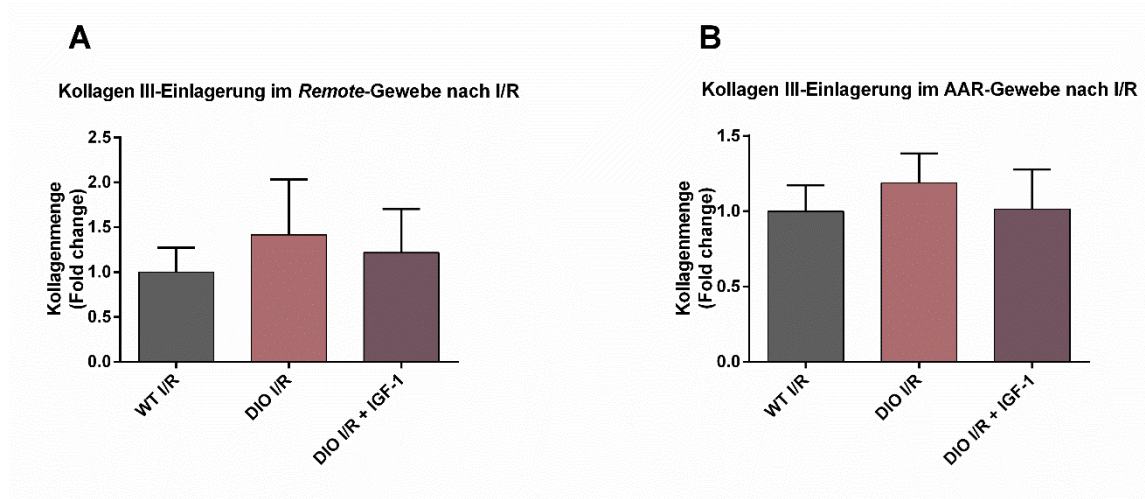


Abb. 3.8: Darstellung der gemessenen relativen Menge an Kollagen III nach Eintreten eines MI mit anschließender Reperfusion (I/R). Es wurden WT- und DIO-Herzen 7 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen, eingebettet und immunhistochemisch mit einem Rabbit α Collagen III Antikörper gefärbt, der Kollagen III in Rot darstellt. Dabei erhielt eine Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die errechnete relative Menge an Kollagen III (*Fold change*) im Verhältnis zum WT im *Remote* (A) und der AAR (B). Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede. Es zeigte sich in beiden Gebieten lediglich eine leichte Tendenz. DIO-Mäusen wiesen etwas mehr Kollagen auf als WT, wobei eine IGF-1-Behandlung diesen Effekt reduzierte. ($n = 4$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p -Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet wurde.

3.3.2 Vermehrte Kollagen III-Expression im Rahmen des *Remodelings* nach MI

Nachdem in der Immunfluoreszenzfärbung eine leicht vermehrte Kollagen III-Einlagerung im Myokard bei prädiabetischen Mäusen lediglich nach Eintreten eines MI nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese Veränderung bereits auf Ebene der Genexpression von Kollagen III zu beobachten ist. Dazu wurde die Genexpression von *Col3a1* (codiert Kollagen III) mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) auf mRNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde zuvor RNA aus entnommenen Herzen der verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 2.5) isoliert, in cDNA umgewandelt und im Verhältnis zum Referenzgen *NUDC* gemessen. Um einen direkten Vergleich der Kollagenmenge zwischen dem *Remote*-Gewebe und der AAR zu erhalten, wurden in Abb. 3.9 die X_0 -Werte normalisiert zu *NUDC* aufgetragen.

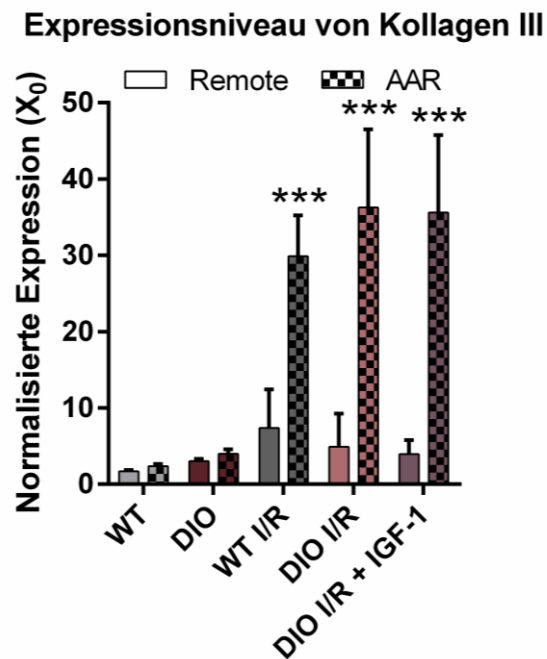


Abb. 3.9: Darstellung der absoluten Genexpression von Kollagen III (*Col3a1*) in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Es wurden WT- und DIO-Herzen im Alter von 18 Wochen ohne Ischämie und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem *Remote*-Gewebe und der AAR herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt sind die mittels qPCR ermittelten Werte der Genexpression (X_0 -Werte) von *Col3a1* normalisiert auf den X_0 -Wert des internen Standards *Nudc*. Dabei wurde jeweils die gemessene Expression im *Remote*-Gewebe mit der in der AAR einer jeden Gruppe verglichen. In den basalen Herzen von WT- und DIO-Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den entnommenen Bereichen (*Remote* / AAR) als auch zwischen den Versuchsgruppen. Nach Eintreten eines Myokardinfarktes mit anschließender Reperfusion (I/R) konnte in allen drei Gruppen (WT I/R, DIO I/R und DIO I/R + IGF-1) eine signifikant höhere Expression im infarzierten Gewebe (AAR) verglichen zum *Remote*-Gewebe beobachtet werden. ($n = 4$ Herzen pro Reihe). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p-Wert $< 0,05$, ** = p-Wert $< 0,01$ und *** = p-Wert $< 0,001$ als signifikant gewertet wurde. Es gilt: * p versus *Remote*-Gewebe der jeweiligen Versuchsgruppe.

Unter basalen Bedingungen zeigten sich auch auf Ebene der Genexpression keine Unterschiede nach einer fett- und zuckerhaltigen Diät zwischen WT und DIO-Mäusen sowohl im Bereich des *Remotes* als auch in der AAR (p-Wert $> 0,999$). Das Eintreten eines MI mit anschließender Reperfusion führte zu einer Hochregulation von *Col3a1* im *Remote* bei WT um das 4-fache ($X_0 = 7,368 \pm 5,04$), jedoch ohne Signifikanz (p-Wert = 0,878). Diese Hochregulation fiel bei DIO-Mäusen sogar geringer aus ($X_0 = 4,91 \pm 4,33$). Allgemein

zeigte sich eine große Variabilität zwischen den einzelnen Messwerten innerhalb der Gruppen. Eine IGF-1-Behandlung reduzierte tendenziell jedoch nicht signifikant die Expression von Kollagen III wie auch schon in der Immunfluoreszenz gezeigt wurde ($X_0 = 3,967 \pm 1,80$). Das Narbengewebe wies in allen drei Gruppen eine signifikant höhere Expression von Kollagen III verglichen zum *Remote*-Gewebe der jeweiligen Gruppe auf. Dies war zu erwarten, da in der immunhistochemischen Färbung bereits unterschiedliche Schwellenwerte zur Differenzierung gesetzt werden mussten. Die höchste Expression wurde in der AAR der DIO-Tiere nach I/R gemessen ($X_0 = 36,27 \pm 10,24$). Signifikante Unterschiede in der AAR nach I/R zwischen WT, DIO-Mäusen und nach einer IGF-1-Behandlung wurden jedoch nicht aufgedeckt.

Zusammengefasst zeigte die Analyse von Kollagen III sowohl immunhistochemisch als auch in der Genexpression keine signifikante Zunahme von Kollagen III im Myokard prädiabetischer Mäuse unter basalen Bedingungen, so dass die fett- und zuckerhaltige Diät allein nicht zu einer reaktiven Fibrose in diesem frühen Stadium zu führen scheint. Auch das Eintreten eines MI zeigte lediglich eine leichte Tendenz der vermehrten Kollagen III-Einlagerung, interessanterweise auf Transkriptionsebene vermehrt bei WT und aus histologischer Sicht in DIO-Mäusen. Im Narbengewebe selbst waren die zu erwartenden Umbauprozesse im Rahmen des *Remodelings* nachweisbar. IGF-1 scheint einen leicht reduzierenden Effekt auf den Einbau von Kollagen III zu haben. Dies wurde im folgenden Kapitel in Bezug auf die allgemeine Narbengröße genauer untersucht.

3.3.3 IGF-1 zeigt keinen Effekt auf die Narbengröße bei DIO-Mäusen

In früheren histologischen Analysen konnte bereits beschrieben werden, dass eine 3-tägige IGF-1-Gabe nach Eintreten eines Myokardinfarktes die Narbengröße bei wildtypischen Mäusen um 37 % reduziert [258]. Auch wurde wie zuvor beschrieben eine leicht verminderte Kollagen III-Einlagerung nach IGF-1 bei DIO-Mäusen beobachtet. Um zu untersuchen ob IGF-1 bei DIO-Mäusen einen ähnlichen Effekt auf die Narbengröße ausübt, bekam ein Teil der DIO-Mäuse nach der Ischämie/Reperfusionsoption (I/R) eine IGF-1-Behandlung über 3 Tage. Nach 7 Tagen wurden die Herzen entnommen, geschnitten und histologisch mit der Masson-Trichom-Färbung gefärbt. Dabei stellen sich Zellkerne blauschwarz, das Zytoplasma ziegelrot und Kollagen grün dar. Die Auswertung wurde manuell mit dem Grafikprogramm „Image J, Version 1.52p“ (National Institutes of Health) durchgeführt. Dabei wurde die Größe der Gesamtfläche eines jeden Schnittes und die fibrosierte Fläche (Kollagenanteil in grün) ausgemessen und anschließend ins Verhältnis

zueinander gesetzt. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde für jedes Herz das gleiche Schnittprotokoll verwendet. Des Weiteren wurden nur Schnitte bis zur Klappenebene ausgewertet.



Abb. 3.10: Exemplarische Aufnahmen zweier Myokardschnitte nach erfolgter Masson-Trichom-Färbung. Dargestellt sind zwei Myokardschnitte, in denen fibrosiertes Gewebe (Narbengewebe) 7 Tage nach Eintreten eines Myokardinfarktes mit Hilfe der Masson-Trichom-Färbung grün angefärbt wurde. Links ist ein Schnitt aus Ebene 10 eines DIO-Herzens abgebildet, während rechts ein Schnitt aus selbiger Ebene einer mit IGF-1 behandelten DIO-Maus zu sehen ist.

Die Narbe präsentierte sich als grünes, zusammenhängendes Areal, welches sich über mehrere Ebenen zog (Abb. 3.10). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied der Narbengröße zwischen DIO-Mäusen mit und ohne eine IGF-1-Behandlung ($p = 0,1775$). Dabei wurde bei DIO-Mäusen, die IGF-1 erhielten, ein durchschnittlicher Narbenanteil von $21,2 \% \pm 1,54$ im Verhältnis zur Gesamtfläche gemessen, während die Kontrollgruppe einen Narbenanteil von $17,17 \% \pm 3,98$ aufwies (Abb. 3.11). Somit führte die kurzzeitige IGF-1 Gabe bei DIO-Mäusen zu keiner Reduktion der Narbengröße 7 Tage nach Eintreten eines Myokardinfarktes.

Narbengröße (Masson-Trichom-Färbung)

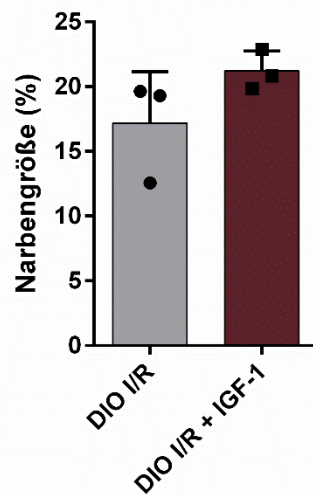


Abb. 3.11: Darstellung der gemessenen Narbengröße im Verhältnis zur Gesamtfläche bei DIO-Mäusen mit und ohne IGF-1-Behandlung nach Eintreten eines Myokardinfarktes. Es wurden DIO-Herzen 7 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen, eingebettet und histologisch mit der Masson-Trichom-Färbung gefärbt. Dabei erhielt eine Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die errechnete Narbengröße in %, die sich aus dem Verhältnis der gemessenen Gesamtfläche eines Schnittes und der fibrosierten Fläche (Kollagenanteil in grün) ergab. Die Auswertung ergab keine Reduktion der Narbengröße durch IGF-1 ($p = 0,1775$). ($n = 3$). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t-Test*, wobei ein p -Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet wurde.

3.4 Veränderter Metabolismus bei DIO-Mäusen

Wildtypische Mäuse zeigen eine ausgeglichene Energieverwertung. Sie nutzen vor allem Fettsäuren, aber auch Glukose um ATP zu generieren und können so flexibel auf wechselnde Bedingungen reagieren und Energiereserven aufbauen [5]. So konnte nachgewiesen werden, dass es nach Eintreten eines Myokardinfarktes zu einer Veränderung des Gleichgewichts der Energiegewinnung durch eine zunehmende Glukoseverwertung kommt [133]. Diese Umstellung führt zu der Frage, ob DIO-Mäuse mit einem Prädiabetes basal eine Umstellung in der Art der kardialen Energiegewinnung aufweisen, wie das Eintreten eines Myokardinfarktes diese beeinflusst und ob die 3-tägige IGF-1-Gabe einen Effekt auf den Metabolismus zeigt. Dazu wurde die Genexpression metabolisch relevanter Gene mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) auf mRNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde zuvor RNA aus entnommenen Herzen der verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 2.5) isoliert und in cDNA umgewandelt. Um einen relativen Mengenvergleich zu erzielen wurde NUDC als Referenzgen mitgemessen.

3.4.1 Prädiabetes führt bei DIO-Mäusen zu veränderten Genexpressionsmustern im Fettsäure- und im Glukosemetabolismus

Bei einer Verwertung der FS im Rahmen der β -Oxidation, die den Hauptanteil der ATP-Gewinnung im gesunden Herzen ausmacht, muss aufgrund der Undurchlässigkeit der Mitochondrienmembran Acyl-CoA aus dem Zytosol durch die Carnitin-Palmityltransferase 1B (CPT1B) über die äußere Mitochondrienmembran eingeschleust werden. CPT1B gilt dabei als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym für die Aufnahme von FS, so dass deren Genexpression als Maß für die Verwertung von FS gewertet werden kann [15]. Durch die Umstellung der Fütterung (fett- und zuckerhaltig) zeigte sich in der qPCR (Abb. 3.12 A) eine leichte Zunahme der Expression von CPT1B im septalen Bereich (*Remote*) von basalen DIO-Mäusen (*Fold change*: $1,91 \pm 0,67$) im Vergleich zu WT. Nach Eintreten eines Infarktes wurde ein signifikanter Anstieg der Expression sowohl bei WT- (*Fold change*: $3,89 \pm 0,67$) als auch bei DIO-Tieren (*Fold change*: $3,26 \pm 0,64$) gemessen, was auf eine allgemein erhöhte FS-Verwertung nach einem Myokardinfarkt hindeutet. Die Behandlung mit IGF-1 zeigte in den DIO I/R-Tieren eine tendenziell stärkere Expression von CPT1B im Vergleich zu DIO I/R Tieren ohne IGF-1-Behandlung (*Fold change*: $4,47 \pm 0,82$).

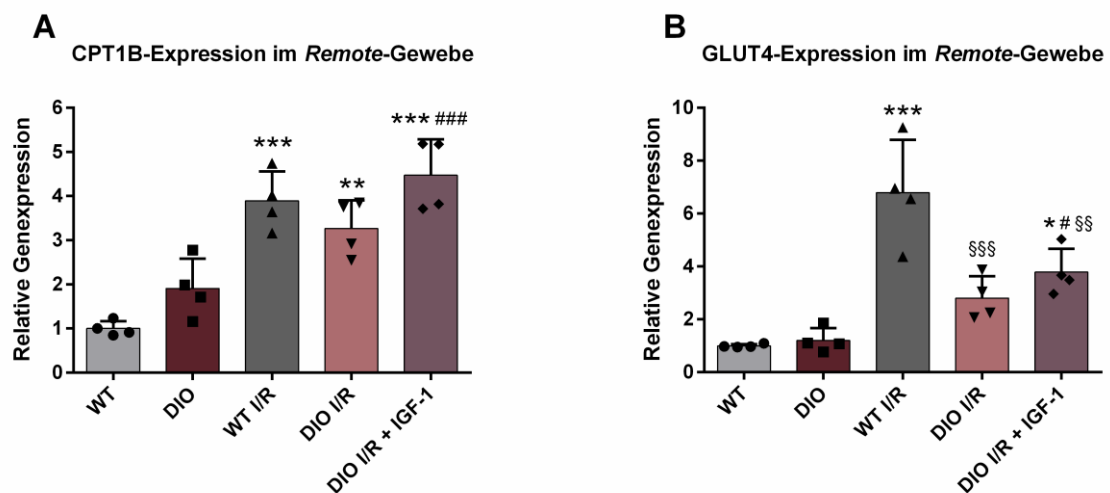


Abb. 3.12: Darstellung der relativen Genexpression von CPT1B und GLUT4 im Remote-Gewebe der DIO- und WT-Mäuse vor und nach Eintreten eines Myokardinfarktes und einer folgenden IGF-1-Behandlung. Es wurden WT- und DIO-Hezen im Alter von 18 Wochen ohne Ischämie und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem Bereich des *Remotes* (septaler Bereich) herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) von CPT1B (A) und GLUT4 (B), die im Verhältnis zum Referenzgen NUDC berechnet wurde. Dabei wurden die Mittelwerte der WT auf 1 normalisiert. (A) In der qPCR von CPT1B konnte eine leicht erhöhte Expression in DIO-Hezen

beobachtet werden. In den Infarktgruppen war die Expression allgemein erhöht. (D) Es wurde eine höchstsignifikante Expressionszunahme von GLUT4 im WT nach I/R gemessen, die signifikant höher war als der Anstieg in den DIO-I/R-Gruppen. (n=4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde. Es gilt: * p versus WT, # p versus DIO, § p versus WT I/R.

Um einen Eindruck über die Glukoseverwertung in Zellen des Myokards zu erlangen, wurde die Genexpression des Glukosetransporters Typ 4 (GLUT4, Gen: *Slc2a4*), gemessen. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der insulinvermittelten Glukoseaufnahme in die Zelle [21]. Die relative Genexpression von GLUT4 (Abb. 3.12 B) wies keine Unterschiede zwischen WT- und DIO-Herzen auf. Das Eintreten einer Ischämie mit anschließender Reperfusion führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg bei WT-Mäusen mit I/R (*Fold change*: $6,78 \pm 2,0$), während das gleiche Prozedere (I/R) bei DIO-Mäusen nur eine deutlich geringere Zunahme der GLUT4-Expression verursachte (*Fold change*: $2,81 \pm 0,83$). Die Behandlung mit IGF-1 in den DIO-Mäusen zeigte nur einen marginalen Anstieg der Expression nach Infarkt verglichen zu DIO-Mäusen ohne IGF-1-Behandlung (*Fold change*: $3,79 \pm 0,88$). Betrachtet man lediglich die Infarkttiere, so konnte eine signifikant niedrigere Expression bei DIO-Herzen im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.

Zusammengefasst führt das Eintreten eines Prädiabetes insbesondere nach Eintreten eines Myokardinfarktes zu einer Einschränkung der metabolischen Flexibilität. Während wildtypische Tiere vermehrt GLUT4 exprimieren, scheint die Glukoseaufnahme durch GLUT4 bei DIO-Mäusen eingeschränkt zu sein. Zudem zeigt sich sowohl bei WT als auch bei DIO-Tieren eine Hochregulation von CPT1B nach I/R.

3.4.2 DIO-Mäuse zeigen leicht veränderte Genexpression im Myokard auf regulatorischer Ebene

Durch die zuvor beschriebenen Veränderungen metabolisch relevanter Gene, stellte sich die Frage, ob Proteine, die eine regulierende Funktion in diesen Stoffwechselabläufen ausüben, ebenfalls in der Genexpression auf mRNA-Ebene Veränderungen aufweisen. Um die Höhe der Expression im Vergleich zum Referenzgen *NUDC* zu messen, wurde die relative Genexpression des Gens *Ppara* und des *Pdk4*-Gens mittels der qPCR aus cDNA aller Versuchsgruppen (Abb. 2.5) im *Remote*-Gewebe bestimmt. *Ppara* ist das codierende Gen des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha (PPAR α), der durch seine Funktion als nukleärer Rezeptor als Transkriptionsfaktor tätig ist. Dabei fördert seine Aktivierung die

Aufnahme und den Katabolismus von Fettsäuren durch eine Hochregulation der in den Lipidmetabolismus involvierten Gene [259].

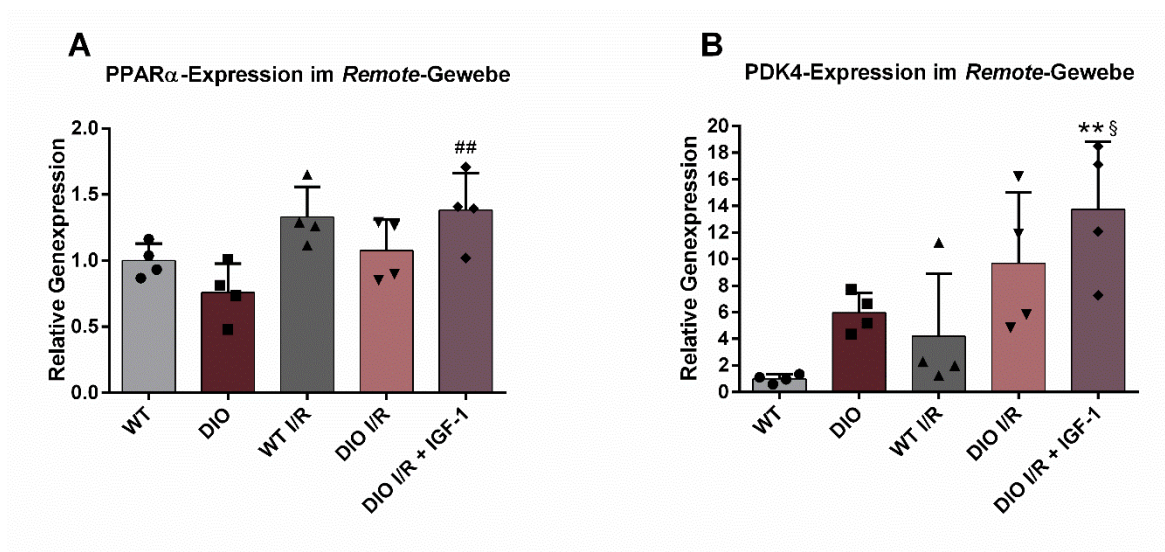


Abb. 3.13: Darstellung der relativen Genexpression von PPAR α und PDK4 im Myokard der DIO- und WT-Mäuse vor und nach Eintreten eines Myokardinfarktes und einer folgenden IGF-1-Behandlung. Es wurden WT- und DIO-Hezen im Alter von 18 Wochen ohne I/R und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem *Remote*-Gewebe herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) von PPAR α und PDK4, die im Verhältnis zum Referenzgen NUDC berechnet wurde. Dabei wurden die Mittelwerte der WT auf 1 normalisiert. (A) In der Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von PPAR α im *Remote*-Gewebe zwischen den Versuchsgruppen. Es konnte jedoch eine Zunahme der Expression in DIO-Mäusen mit I/R und IGF-1-Behandlung nachgewiesen werden verglichen zum basalen DIO-Myokard. (B) PDK4 wurde in der Gruppe der DIO-I/R Herzen mit IGF-1-Behandlung im *Remote*-Gewebe signifikant höher exprimiert verglichen zum basalen WT und der WT-I/R-Gruppe. Der Myokardinfarkt beeinflusste die Expression nicht signifikant. (n = 4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde. Es gilt: * p versus WT, # p versus DIO, § p versus WT I/R.

Die Expression von PPAR α zeigte im septalen Myokard (Abb. 3.13 A) bei den basalen DIO-Mäusen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum WT. Aufgrund der erhöhten Expression von CPT1B nach Infarkt, bestand die Vermutung, dass die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α ebenfalls verändert sei, durch den die Transkription unter anderem von CPT1B induziert wird [19]. Diese Hypothese konnte wegen der nicht nachweisbaren Signifikanz der Messwertunterschiede nicht bestätigt werden. Eine IGF-1-Behandlung nach I/R führte allerdings zu einer hochsignifikanten Expressionszunahme

(*Fold change*: $1,38 \pm 0,28$) im DIO-Myokard verglichen zur basalen DIO-Gruppe (*Fold change*: $0,76 \pm 0,22$).

Als Transkriptionsfaktor steuert PPAR α ebenfalls die Expression der PDK4, die als mitochondriales Enzym den PDH-Komplex durch Phosphorylierung inhibiert und so die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA reduziert. Dies schränkt die ATP-Produktion durch die Verwertung von Glukose bedeutend ein [44, 49]. Unter prädiabetischen Bedingungen wurde bei DIO-Tieren im septalen *Remote*-Gewebe eine 6-fach höhere Expression von PDK4 (*Fold change*: $5,97 \pm 1,5$) nachgewiesen als in WT (*Fold change*: $1 \pm 0,32$) (Abb. 3.13 B). In Kongruenz zur deutlich gesteigerten GLUT4 Expression (erhöhte Glukoseverwertung) nach Eintreten eines Infarktes im Vergleich zu den DIO-Tieren mit I/R zeigte sich eine geringere Expressionszunahme von PDK4 nach I/R in WT verglichen zu DIO-Mäusen mit I/R. Die nahezu verdoppelte PDK4-Expression in der Gruppe der DIO-I/R-Tiere (*Fold change*: $9,68 \pm 5,34$) im Vergleich zum basalen DIO-Myokard deutet auf eine verminderte Glukoseverwertung hin. Dies sind jedoch nur Tendenzen, da die einzelnen Messwerte eine große Streuung aufwiesen und die statistische Auswertung keine Signifikanz ergab. Die Gabe von IGF-1 führte zu einer weiteren Steigerung der Expression um 30 % (*Fold change*: $13,74 \pm 5,12$).

3.4.3 Das Narbengewebe zeigt eingeschränkte Genexpression

Ein Gefäßverschluss mit der darauffolgenden Hypoxie im betroffenen Myokard ist charakterisiert durch einen regionalen Untergang von Kardiomyozyten. Dieser nekrotische Prozess führt dabei nicht nur zu strukturellen Umbauprozessen wie einer Kollageneinlagerung, sondern auch zu Veränderungen im Metabolismus [125, 134]. Während im *Remote*-Gewebe das Energiedefizit im Rahmen der Ischämie bei WT durch eine gesteigerte Glukoseverwertung scheinbar kompensiert wird, nutzen DIO-Mäuse verstärkt FS zur Energiegewinnung. Es stellte sich die Frage, ob dieser Trend auch im infarzierten Gewebe (*Area at risk* = AAR) zu sehen ist, weshalb die Expression der zuvor beschriebenen metabolischen Marker auch im Narbengewebe mittels Genexpressionsanalysen (qPCR) untersucht wurde.

Die kardialen Umbauprozesse führen zu einer eingeschränkten Genexpression aller untersuchten Marker. Im Folgenden wird dies am Beispiel von CPT1B erläutert, wobei vergleichbare Ergebnisse für GLUT4, PPAR α und PDK4 dem Anhang beigelegt wurden

(Abb. 6.1). Dabei wurden die beschriebenen Daten aus dem *Remote* und der AAR zueinander in Bezug gesetzt und verglichen.

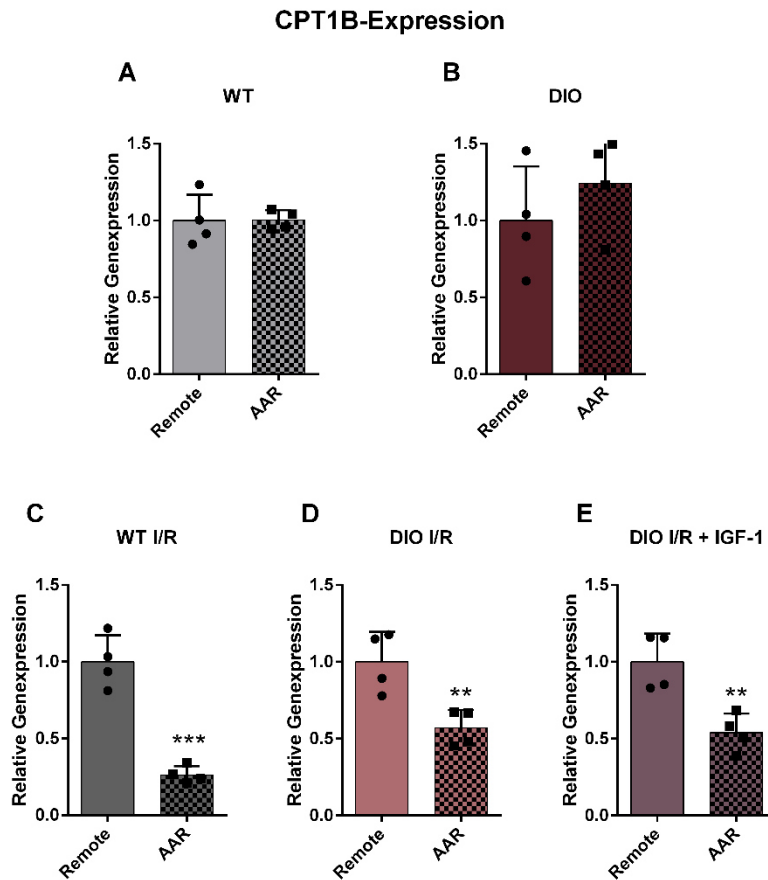


Abb. 3.14: Darstellung der relativen Genexpression von CPT1B im *Remote* und AAR in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Es wurden WT- und DIO-Herzen im Alter von 18 Wochen ohne Ischämie und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem Bereich des *Remotes* und der AAR herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression von CPT1B, die im Verhältnis zum Referenzgen NUDC berechnet wurde. Dabei wurde jeweils die gemessene Expression im *Remote*-Gewebe mit der in der AAR einer jeden Gruppe verglichen und die Mittelwerte des *Remotes* auf 1 normalisiert. (A und B) In den basalen Herzen von WT- und DIO-Tieren zeigten sich keine Unterschiede in der Expression zwischen dem septalen *Remote*-Gewebe und der aus der AAR entnommenen Probe. (C-E) Im infarzierten Gewebe konnte in allen drei Gruppen (WT I/R, DIO I/R und DIO I/R + IGF-1) eine geringere Expression verglichen zum *Remote*-Gewebe beobachtet werden. (n = 4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t*-Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde.

Wie in Abb. 3.14 A und B dargestellt, wurde in den basalen Herzen ohne Infarkt eine ähnliche Expression in der AAR gemessen wie im *Remote*-Gewebe, was auf eine vergleichbare metabolische Situation zwischen den verschiedenen Bereichen im gesunden Zustand hindeutet. Nach Eintreten des Infarktes kam es jedoch verglichen zum *Remote*-Gewebe sowohl bei den Kontrolltieren (*Fold change*: $0,26 \pm 0,06$), als auch bei den DIO-Tieren mit und ohne IGF-1-Behandlung (*Fold change*: DIO I/R: $0,57 \pm 0,12$; DIO I/R + IGF-1: $0,54 \pm 0,12$) zu einer signifikant geringeren Expression von CPT1B in der AAR (Abb. 3.14 C-E).

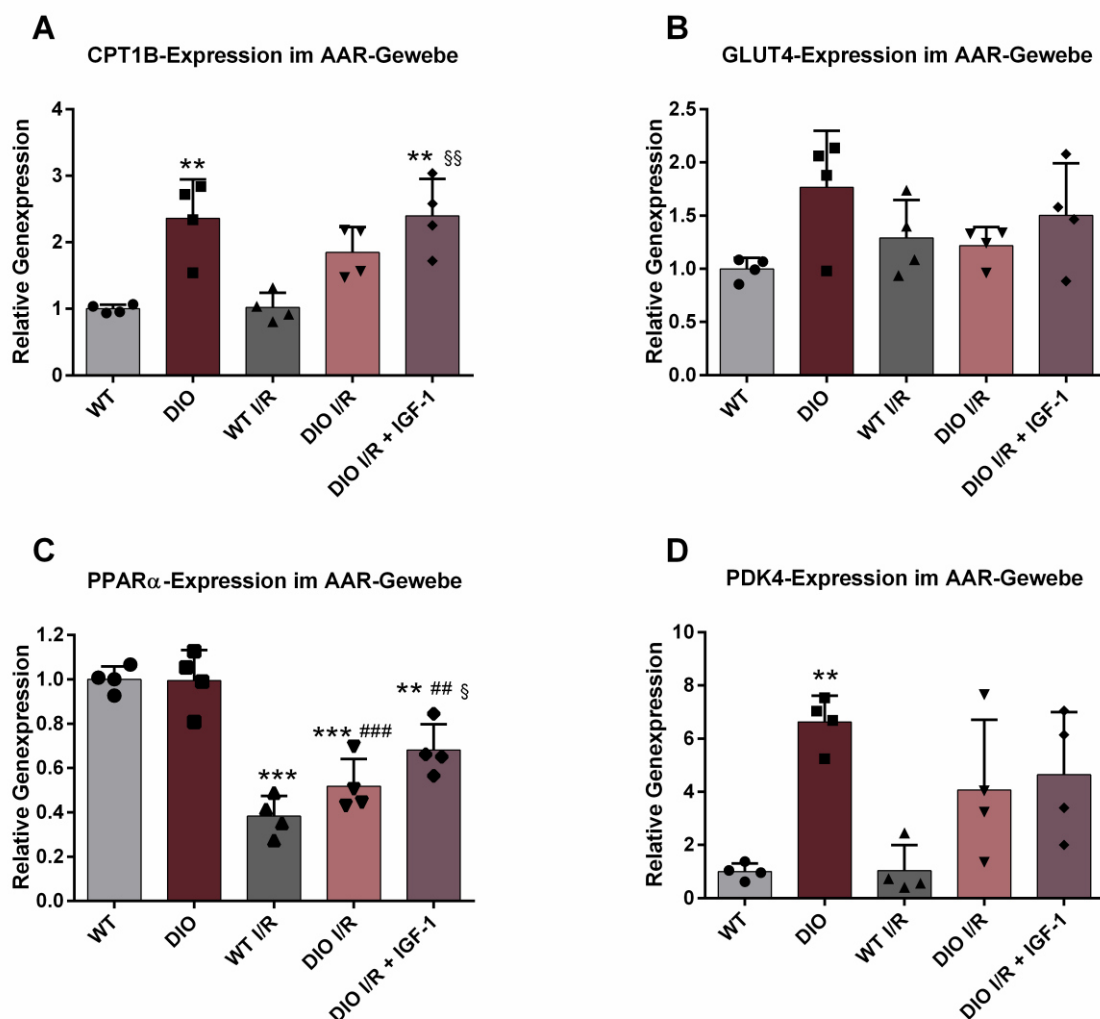


Abb. 3.15: Darstellung der relativen Genexpression metabolisch relevanter Proteine im AAR-Gewebe der DIO- und WT-Mäuse vor und nach Eintreten eines Myokardinfarktes und einer folgenden IGF-1-Behandlung. Es wurden WT- und DIO-Hezen im Alter von 18 Wochen ohne Ischämie und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem Bereich der AAR herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) von CPT1B (A), GLUT4 (B), PPAR α

(C) und PDK4 (D), die im Verhältnis zum Referenzgen NUDC berechnet wurde. Die Mittelwerte der WT wurden auf 1 normalisiert. (A) DIO-Tiere zeigten eine höhere Expression als WT vor und nach Infarkt. (B) Die GLUT4-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede im AAR-Gewebe zwischen den Gruppen nach I/R. (C) PPAR α wird nach Infarkt signifikant geringer exprimiert. (D) DIO-Tiere weisen mehr PDK4 auf als WT, sowie eine geringere Abnahme nach I/R. (n = 4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde. Es gilt: * p versus WT, # p versus DIO und § p versus WT I/R.

Betrachtet man das Gewebe der AAR eigenständig (Abb. 3.15 A) wurde in den DIO-Herzen sowohl basal (*Fold change*: $2,36 \pm 0,59$), als auch nach I/R (*Fold change*: $1,85 \pm 0,38$) und einer IGF-1-Behandlung (*Fold change*: $2,4 \pm 0,56$) eine höhere CPT1B-Expression nachgewiesen als bei den Kontrolltieren. Anders als im *Remote*-Gewebe gab es in der GLUT4-Expression keine Unterschiede nach I/R zwischen den Gruppen (Abb. 3.15 B). Auf regulatorischer Ebene zeigte sich bei der Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α ein vergleichbares Bild zu CPT1B (Abb. 3.15 C). Während WT-Mäuse nach I/R dort nur eine relative Expression von $0,38 \pm 0,09$ aufwiesen, wurde in DIO-Mäusen verglichen zur basalen Situation (*Fold change*: $0,99 \pm 0,14$) eine Abnahme um die Hälfte beobachtet (*Fold change* DIO I/R: $0,52 \pm 0,12$). In IGF-1 behandelten Mäusen betrug die relative Expression $0,68 \pm 0,12$. Interessanterweise wurde somit die Abnahme der Expression in der AAR für PPAR α und auch für CPT1B nach Infarkt durch eine IGF-1-Behandlung vermindert, sodass sich eine verstärkte Aktivierung des Lipidmetabolismus durch PPAR α im Gegensatz zu WT mit I/R vermuten lässt. Die Untersuchungen der PDK4-Expression in der AAR (Abb. 3.15 D) ergaben eine signifikante Zunahme bei DIO-Mäusen im Vergleich zum WT, kongruent zu der bereits beschriebenen Tendenz im *Remote*-Gewebe. Bis auf eine allgemeine Abnahme der Expression im infarzierten Gewebe wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen deutlich.

Zusammengefasst führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass es durch die Umstellung der Fütterung und die Induktion eines Prädiabetes zu Veränderungen im Metabolismus und insbesondere in der Gewichtung der Energiegewinnung im Myokard der Mäuse kommt. Basale DIO-Mäuse weisen dabei sowohl im septalen *Remote*-Gewebe als auch im anterioren linksventrikulären AAR-Gewebe eine gleichwertige leichte Erhöhung der Expression von CPT1B als Indikator des Fettsäuremetabolismus auf, während die Glukoseverwertung nicht gesteigert zu sein scheint. Durch Eintreten eines Infarktes kommt es im *Remote*-Gewebe zu einer erhöhten Genexpression aller untersuchten metabolischen Marker. Während WT-

Mäuse die ATP-Produktion scheinbar vor allem durch die Verwertung von Glukose aufrechterhalten (Anstieg der GLUT4-Expression, geringere Steigerung der PDK4-Expression), weisen die Ergebnisse der DIO-Tiere auf eine verstärkte Fettsäureverwertung in den Mitochondrien des Myokards hin (vermehrte Expression von CPT1B und in AAR von PPAR α). Der direkte Vergleich zwischen *Remote*- und AAR-Proben zeigt zudem eine Abnahme der Genexpression aller untersuchten Gene im infarzierten Gewebe, was auf eine eingeschränkte Funktionalität des Gewebes deuten lässt. IGF-1 erzielte keine maßgebliche Änderung der Genexpressionsmuster.

3.4.4 Veränderte Genexpression der *Uncoupling proteins* gibt Hinweis auf Einfluss in Metabolismus

Die *Uncoupling proteins* (UCP2 und UCP3), die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, weisen vielfältige Funktionen auf. Ihre Hauptaufgabe ist die Reduktion oxidativen Stresses, der vor allem durch eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) entsteht. Dabei dienen UCP2 und UCP3 als mitochondriale Anionentransportproteine [84, 88]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass UCP2 und UCP3 die FS- und Glukoseverwertung beeinflussen, wobei UCP3 vornehmlich in Zellen synthetisiert wird, die β -Oxidation betreiben und UCP2 in Zellen hochreguliert ist, die ihre Energie über die Glykolyse gewinnen [94, 95]. Es stellte sich die Frage, ob prädiabetische Mäuse ebenfalls eine Veränderung der UCP2- und UCP3-Expression aufweisen und ob diese möglichen Veränderungen Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen Expressionsmustern der metabolischen Marker zeigen. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss von UCP2 und UCP3 auf metabolische Abläufe sein. Um die Expression für die codierenden Gene (*Ucp3* und *Ucp2*) zu untersuchen wurde eine qPCR durchgeführt, die Unterschiede in der Expression von UCP3 und UCP2 zwischen WT- und DIO-Mäusen sowohl in der basalen Situation, als auch signifikant nach Eintreten eines Myokardinfarktes zeigte.

So ergab die Auswertung des septalen Gewebes wie in Abb. 3.16 A zu sehen eine 6-fache relative Erhöhung der Genexpression von UCP3 (*Fold change*: $5,99 \pm 2,59$) bei DIO-Mäusen ohne Myokardinfarkt im Vergleich zu WT (*Fold change*: $1 \pm 0,47$). Eine ähnlich hohe Expression konnte bei WT-Mäusen mit Infarkt gemessen werden (*Fold change*: $5,2 \pm 3,86$), während die DIO-Tiere nach Eintreten eines Infarktes sogar eine hochsignifikante Hochregulation der Expression von UCP3 aufwiesen verglichen zu basalen WT-Mäusen (*Fold change*: $10,52 \pm 2,88$). Im Vergleich zu basalen DIO-Herzen entspricht dies nahezu einer Verdopplung der UCP3-Expression verursacht durch einen Infarkt. Eine

IGF-1-Behandlung zeigte bei den DIO-Mäusen mit Infarkt keine Änderung der Genexpression von UCP3 (*Fold change*: $11,5 \pm 4,07$).

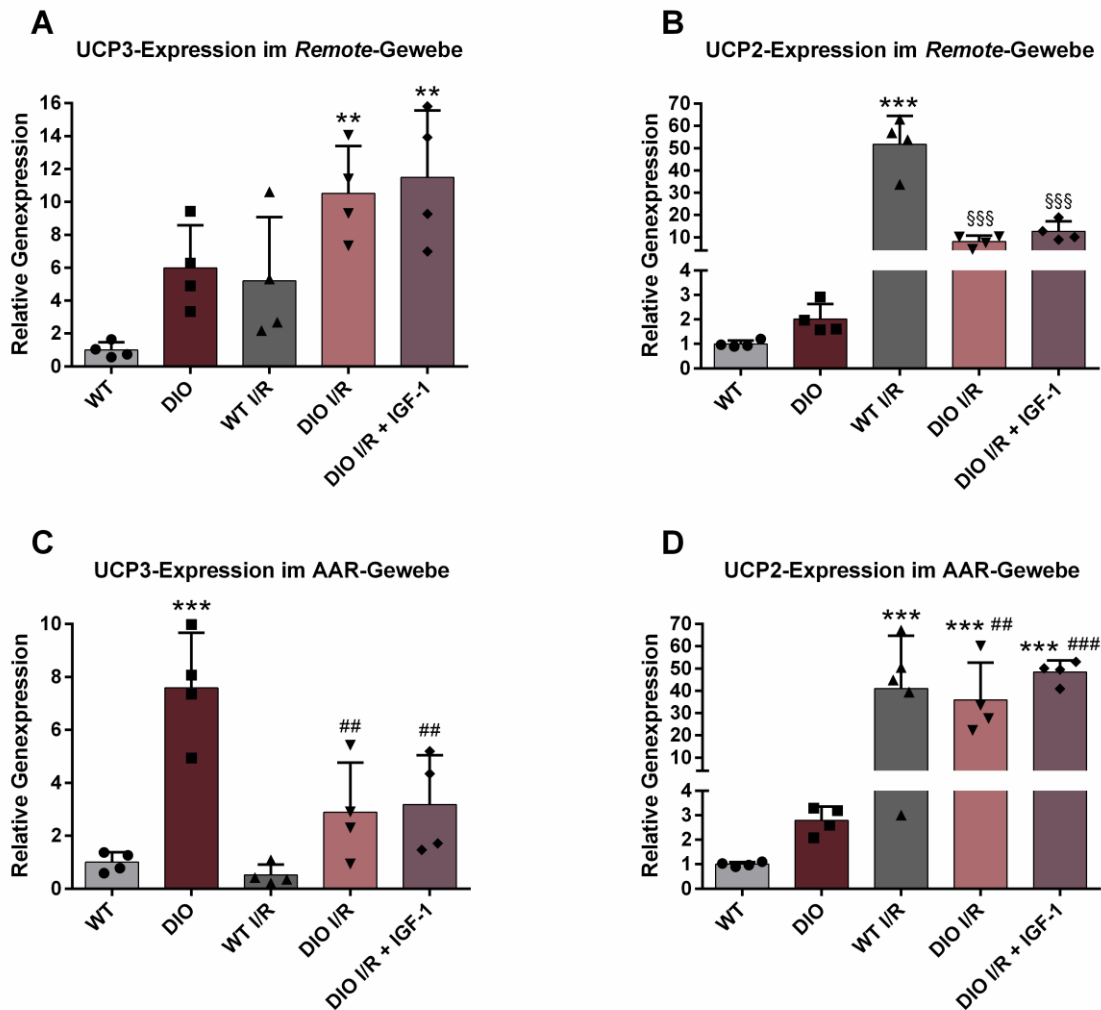


Abb. 3.16: Darstellung der relativen Genexpression von UCP3 und UCP2 vor und nach I/R und einer folgenden IGF-1-Behandlung. WT- und DIO-Herzen im Alter von 18 Wochen ohne Ischämie und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie wurden entnommen und Gewebeproben aus dem *Remote* und der *AAR* herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über 3 Tage nach I/R eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) von UCP3 (A, C), UCP2 (B, D), im Verhältnis zum Referenzgen *NUDC*. Die Mittelwerte der WT wurden auf 1 normalisiert. (A) Die Abbildung der relativen Genexpression von UCP3 zeigt eine verstärkte Expression von UCP3 im DIO-Myokard und einen signifikanten Anstieg nach Eintreten des I/R in DIO-Herzen, während der Anstieg in der WT-I/R-Gruppe geringer ausfällt. (B) Es zeigte sich eine leicht erhöhte UCP2-Expression in basalen DIO-Herzen. Des Weiteren war die Expression nach Infarkt deutlich in allen I/R-Gruppen erhöht, jedoch höchstsignifikant im WT-I/R. (C) UCP3 zeigte nach I/R eine signifikante Abnahme der Expression im infarzierten Gewebe der DIO-Mäuse, während die Expressionsabnahme in WT-I/R-Proben deutlich geringer ausfiel. (D) Die Abbildung stellt eine höchstsignifikante Expressionszunahme von UCP2 im infarzierten Myokard aller drei Gruppen nach I/R dar.

(n = 4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *one-way* ANOVA, Tukey post-hoc Test, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde. Es gilt: * p versus WT, # p versus DIO, § p versus WT I/R.

Die Auswertung der relativen Genexpression von UCP2 im *Remote*-Gewebe zeigte einen gegenläufigen Verlauf zur UCP3-Expression (Abb. 3.16 B). Basale DIO-Mäuse wiesen lediglich eine Verdopplung der Expression auf (*Fold change*: $2,02 \pm 0,62$). Interessanterweise konnte in der Gruppe der WT-Mäuse nach Eintreten des Infarktes eine signifikante Zunahme der Expression von UCP2 um das 52-fache (*Fold change*: $51,86 \pm 12,67$) gezeigt werden, ähnlich wie es zuvor bei GLUT4 beobachtet wurde. Betrachtet man die Expression von UCP2 in den DIO-Tieren nach Infarkt (*Fold change*: $8,13 \pm 2,71$), so konnte zwar auch eine erhöhte Expression im Vergleich zur Basalsituation gezeigt werden, jedoch fällt diese geringer aus als bei WT-Tieren mit Infarkt. Eine IGF-1-Behandlung der DIO-I/R-Mäuse zeigt keinen Effekt (*Fold change*: $12,68 \pm 4,48$).

Im Gewebe der AAR konnte für UCP3 (Abb. 3.16 C) eine deutlich signifikante Erhöhung der Expression bei DIO-Mäusen (*Fold change*: $7,59 \pm 2,08$) im Vergleich zu WT-Mäusen (*Fold change*: $1 \pm 0,38$) nachgewiesen werden, was der bereits beschriebenen Tendenz im *Remote*-Gewebe ähnelt. Nach einem Infarkt, zeigten die DIO-Tiere zwar eine verringerte UCP3-Expression, jedoch war diese weiterhin deutlich größer als in den WT-Tieren nach Infarkt (*Fold change*: $2,89 \pm 1,88$). Die IGF-1-Behandlung zeigte keinen Effekt auf die UCP3-Expression in den DIO-Mäusen (*Fold change*: $3,18 \pm 1,87$). Bei den WT-Mäusen mit I/R kam es zu keiner signifikanten Änderung der Expression im Vergleich zur basalen Kontrollgruppe (*Fold change*: $0,52 \pm 0,39$).

Die UCP2-Expression im AAR-Gewebe (Abb. 3.16 D) zeigte ähnliche Muster sowohl in WT- als auch in DIO-Tieren verglichen zur Expression im *Remote*-Gewebe. Ebenso war die UCP2-Expression in der Gruppe der WT-Mäuse mit I/R im AAR- und *Remote*-Gewebe gleichwertig erhöht (Abb. 3.17 A). In der Gruppe der DIO-Mäuse mit I/R zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Regionen (Abb. 3.17 B), der einer 4,5-fachen Zunahme der Expression in der AAR (*Fold change*: $4,54 \pm 2,13$) verglichen zum *Remote* entsprach. Diese Signifikanz verstärkte sich durch eine IGF-1-Behandlung (*Fold change*: $3,93 \pm 0,42$, Abb. 3.17 C).

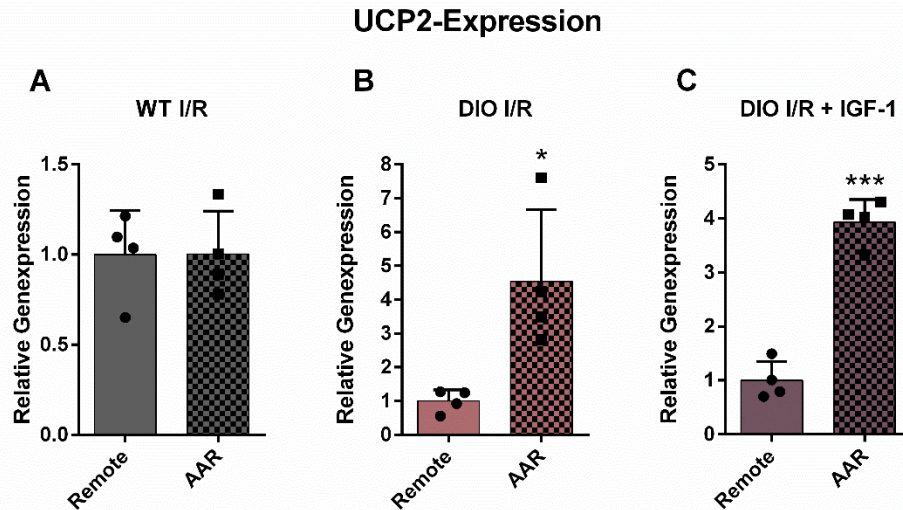


Abb. 3.17: Darstellung der relativen Genexpression von UCP2 im *Remote*- und *AAR*-Gewebe. Es wurden WT- und DIO- Herzen im Alter von 18 Wochen und 3 Tage nach Eintreten der Ischämie entnommen und eine Gewebeprobe aus dem Bereich des *Remotes* und der *AAR* herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) von UCP2, die im Verhältnis zum Referenzgen *NUDC* berechnet wurde. Dabei wurde jeweils die gemessene Expression im *Remote*-Gewebe mit der in der *AAR* einer jeden Gruppe verglichen und die Mittelwerte des *Remotes* auf 1 normalisiert. (A) In wildtypischen Herzen mit I/R wurde kein Unterschied in der UCP2-Expression zwischen den beiden Gebieten gemessen. (B und C) Im infarzierten Gewebe der DIO- Herzen mit und ohne IGF-1-Behandlung zeigte sich verglichen zum *Remote*-Gewebe eine signifikant höhere Expression von UCP2. (n=4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t-Test*, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei DIO-Mäusen nach einem Myokardinfarkt im *Remote*-Gewebe eine erhöhte Genexpression von UCP3 im Myokard auftritt, während UCP2 in dieser Gruppe im Vergleich zu WT-Mäusen mit I/R weniger stark exprimiert wird. Basale DIO-Mäuse weisen im Vergleich zu WT-Mäusen vor allem eine verstärkte Expression von UCP3 auf. Ein Prädiabetes beeinflusst somit die Anhäufung von UCP3 im Myokard sowie die von CPT1B, einem Marker der Fettsäureverwertung. Nach einem Myokardinfarkt scheinen prädiabetische Tiere im Gegensatz zu WT-Mäusen in ihrer metabolischen Flexibilität eingeschränkt zu sein. Insbesondere die Glukoseverwertung ist im Vergleich zu normal ernährten Tieren mit I/R reduziert, ebenso wie die Expression von UCP2. Die parallelen Veränderungen in der Genexpression der UCPs und anderer Marker, die direkt am Metabolismus beteiligt sind, deuten auf einen metabolischen Einfluss der

Uncoupling Proteins hin. Aber auch ein Einfluss auf die ROS-Produktion durch UCP2 und UCP3 ist im Bezug auf prädiabetische Bedingungen durchaus relevant und sollte diskutiert werden.

4 Diskussion

Übergewicht und die Entwicklung einer Adipositas gelten nicht nur als eigenständige Erkrankung, sondern sind auch wichtige Risikofaktoren für die Entstehung kardiovaskulärer Komorbiditäten, Diabetes mellitus und einiger Krebserkrankungen. Durch die rasant ansteigende Prävalenz der Adipositas bei Erwachsenen aber auch schon im Kindesalter, erhält die Erkrankung eine zunehmend wichtige Rolle durch wirtschaftliche Folgen, in der allgemeinen Prävention und in der Forschung, in der die genauen Auswirkungen von Übergewicht analysiert werden [187]. Das Krankheitsbild des T2DM ist multifaktoriell und führt insbesondere durch die Vielzahl an chronischen Langzeitschäden zu einer hohen Mortalität. Die Vorstufe des T2DM, der Prädiabetes, wird unter anderem durch Übergewicht ausgelöst und ist mit bereits erhöhten Blutglukosespiegeln und einer beginnenden Insulinresistenz assoziiert. Prädiabetes gilt als relevanter aber umkehrbarer Risikofaktor für T2DM und dem damit verbundenen erhöhten kardiovaskulären Risikoprofil [198]. Jedoch konnten bereits Veränderungen am Herzen durch einen Prädiabetes beschrieben werden. So zeigten Untersuchungen, dass bei mehr als 60 % der Personen, bei denen eine Herzkatheteruntersuchung aufgrund des Verdachts einer KHK durchgeführt wurde, ein bislang unentdeckter Prädiabetes oder sogar T2DM diagnostiziert werden konnte [260]. Ein MI ausgelöst durch eine KHK gilt als die Haupttodesursache bei Patienten mit T2DM und ist mit einer doppelt so hohen Mortalität im Vergleich zu Nicht-Diabetikern verbunden [261, 262].

Diese Arbeit thematisierte in einem durch eine fett- und zuckerhaltige Diät induzierten prädiabetischen Mausmodell die strukturellen und funktionellen Auswirkungen auf das Herz basal, sowie nach Eintreten einer Ischämie mit anschließender Reperfusion, wie es der Myokardinfarkt als häufige Komorbidität darstellt. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Auf struktureller Ebene wurde nach einer fett- und zuckerhaltigen Diät eine signifikante Wanddickenzunahme des Myokards mit Ausbildung einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie nachgewiesen.
- 2) Ein Prädiabetes allein führt zu keiner vermehrten Kollagen III-Einlagerung im murinen Herzen.

- 3) Das prädiabetische Myokard zeigt basal einen erhöhten Fettsäuremetabolismus. Nach Eintreten eines MI scheint der Wechsel zur vermehrten Glukoseverwertung eingeschränkt zu sein.
- 4) UCP2 und UCP3 haben Einfluss auf Metabolismus im prädiabetischen Mausmodell.
- 5) IGF-1 zeigt keine signifikanten Effekte auf die Expression Metabolismus-assoziiierter Gene.

4.1 Herzmuskelhypertrophie als Kompensationsmechanismus bei Prädiabetes

Menschen mit einem Prädiabetes haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, sowie für die Entwicklung eines T2DM [263]. Bereits viele Jahre vor der Diagnose eines T2DM mit einer Hyperglykämie zeigt sich eine beginnende Insulinresistenz, die Auswirkungen auf verschiedene Organe wie Leber, Niere, Skelettmuskulatur aber auch das Herz hat. Im prädiabetischen Mausmodell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die fett- und zuckerhaltige Diät zu einer Wanddickenzunahme des Myokards führt, während der Innendurchmesser des linken Ventrikels abnimmt (siehe Kapitel 3.2.1). Diese Kombination deutet auf die Ausbildung einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie hin. Auch die linksventrikuläre Masse nahm zu (siehe Kapitel 3.2.2). In einer Studie von De Marco et al. konnte neben einer linksventrikulären Massenzunahme auch eine beginnende systolische und diastolische Dysfunktion bei Menschen mit Prädiabetes und T2DM beschrieben werden [264]. Auch die Progression der kardialen Dysfunktion bis zur Herzinsuffizienz ist bei T2DM deutlich erhöht und die Prognose verschlechtert [265, 266]. Des Weiteren wurde in vorangegangenen Arbeiten ein erhöhter Sauerstoffbedarf des hypertrophen Herzens nachgewiesen mit der Auswirkung, dass ein O₂-Mangel bei Hypertrophie verstärkt zu kardiovaskulären Erkrankungen wie Arrhythmien und Myokardinfarkten beiträgt [267]. Der Herzmuskel besteht vor allem aus Kardiomyozyten, die 70 – 80 % der Herzmasse ausmachen, aber auch aus Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und Immunzellen [268]. Da sich die meisten Kardiomyozyten nicht teilen können, geht man davon aus, dass die Massenzunahme bei konzentrischer Hypertrophie mit einer lateralen Vergrößerung der Kardiomyozyten infolge einer gesteigerten Proteinbiosynthese einhergeht [120, 269, 270]. Die konzentrische Herzmuskelhypertrophie wird häufig als Kompensationsmechanismus bei einer erhöhten Druckbelastung beschrieben [119]. Diese resultiert zum Beispiel aus einer arteriellen Hypertonie, die als häufige Komorbidität bei einem Prädiabetes auftritt [271]. Für das hier

untersuchte Mausmodell liegen bisher keine Blutdruckdaten vor, so dass ein genaueres Monitoring des Blutdrucks und weitere echokardiographische Analysen bei dem uns vorliegenden Mausmodell zu weiteren Erkenntnissen bezüglich der genauen Ursache der Hypertrophie beitragen könnten. Woodiwiss et al. zeigten jedoch auch, dass Übergewicht allein zu einer konzentrischen Herzmuskelhypertrophie führt in Abwesenheit einer Hypertonie [272]. In vorangegangenen Studien wurde das Vorliegen einer Hypertrophie im Rahmen eines T2DM ohne die Existenz weiterer kardiovaskulärer Komorbiditäten beschrieben [273], was erstmalig durch Rubler et al. als diabetische Kardiomyopathie benannt wurde [274]. Dabei scheinen vor allem die Hyperglykämie, die zeitweise bestehende Hyperinsulinämie und die Insulinresistenz im Rahmen des T2DM für die Pathogenese verantwortlich zu sein. Weitere Arbeiten beschrieben, dass es neben der ventrikulären Hypertrophie zu einer zunehmenden Myokardfibrose kommt, die durch eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine ausgelöst werden kann. Ergebnis des daraus folgenden *Remodelings* ist in der Regel zunächst eine diastolische, später aber auch aber auch systolische Dysfunktion [275-278]. In unserem Mausmodell konnten Untersuchungen aus unserem Institut jedoch zeigen, dass DIO- im Vergleich zu WT-Mäusen im Untersuchungszeitraum eine leicht verbesserte Ejektionsfraktion aufweisen (*unpublished data*, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, [279]). Dies deutet auf eine bislang fehlende kardiale Dysfunktion hin. Die Hypertrophie scheint hier einen kompensatorischen Effekt auszuüben, um die Kontraktilität aufrechtzuerhalten. Eine zunächst physiologische Hypertrophie ohne kardiale Dysfunktion kann jedoch bei Voranschreiten der Pathogenese und einem fibrotischen Umbau in eine pathologische Hypertrophie mit der Entstehung einer Herzinsuffizienz übergehen, wie es von Shimizu et al. beschrieben wurde [280]. All diese Erkenntnisse demonstrieren die große Bandbreite der Ätiologie der konzentrischen Herzmuskelhypertrophie und geben Grund zur Annahme, dass im Rahmen einer gestörten Glukosetoleranz multifaktorielle Einflüsse existieren.

4.2 Fibrotische Umbauprozesse im prädiabetischen Modell nicht sichtbar

Die Hauptaufgabe des Herzmuskels ist die Kontraktion mit anschließender Relaxation, um die Pumpfunktion und somit die Blutversorgung des Körpers aufrechtzuerhalten. Ein vermehrter Einbau von Kollagen und anderer Matrixproteine schränkt diese Beweglichkeit ein und führt zu einer sekundären Fibrose [178]. Meine Ergebnisse in Abb. 3.7 zeigen, dass die fett- und zuckerhaltige Diät bei prädiabetischen DIO-Mäusen basal zu keiner vermehrten

Kollagen III-Einlagerung in das Myokard führt. Auch eine Studie von Storz et al. wies keine signifikanten fibrotischen Veränderungen bei relativ gesunden Patientenpopulationen mit Prädiabetes nach [281]. Diese Ergebnisse passen zu den vorherigen echokardiographischen Untersuchungen meiner Arbeitsgruppe, in denen bei DIO-Tieren keine Anzeichen einer kardialen Funktionseinschränkung nachgewiesen werden konnten (*unpublished data*, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, [279]). Kongruent dazu konnte eine Studie von Kitamura et al. zeigen, dass die Menge an eingelagertem Kollagen III signifikant mit der Einschränkung der diastolischen Funktion und der Ejektionsfraktion als Marker der systolischen Funktion korreliert [282]. Eine Studie von Carroll et al. wies dagegen eine vermehrte Fibrose mit Kollageneinlagerung bei Kaninchen nach einer Diät von 12 Wochen nach. In dieser Arbeit wurde jedoch nur das Übergewicht protokolliert und keine Angaben zu einem eventuell veränderten Zuckerstoffwechsel veröffentlicht [283].

Während der Literaturrecherche fiel zudem auf, dass in einigen Studien nur die allgemeine Zunahme an Kollagen bei der Entstehung der Fibrose beschrieben wurde und nicht die genaue Typisierung der verschiedenen Kollagen-Arten. Eine pathologische Hypertrophie geht in der Regel mit einer interstitiellen Fibrose und dem Absterben von Kardiomyozyten einher, wobei die Konzentration von Typ I Kollagen und die Aktivierung von Myofibroblasten zunimmt. In mehreren Studien konnte bislang gezeigt werden, dass die relative Zunahme der Kollagen I-Expression eher zu einer verminderten Dehnbarkeit der Ventrikel führt, während eine gesteigerte Kollagen III-Synthese aufgrund der erhöhten Elastizität die Entwicklung einer Ventrikeldilatation begünstigt [284, 285]. In diesem Zusammenhang, wäre eine Untersuchung der Kollagen I-Expression im Myokard von Bedeutung. Es ist jedoch aufgrund der guten Kontraktilität bei den DIO-Herzen nicht von einer starken Kollagen I-Einlagerung auszugehen. Die Effekte der fett- und zuckerhaltigen Diät scheinen in einem so frühen Stadium keine maßgeblichen Auswirkungen auf die strukturellen Eigenschaften der extrazellulären Matrix zu haben. Bei einer längeren Fütterungsdauer könnten weitere Einflüsse eventuell zu sehen sein. In einer Studie von Calligaris et al. wurde nach einer acht monatigen Fütterung fettreicher Nahrung eine Überexpression sowohl von Kollagen I als auch III nachgewiesen, nach 16 Monaten sogar eine signifikante Herzmuskelhypertrophie mit deutlicher Myokardfibrose [286]. Es muss jedoch bedacht werden, dass der Übergang in einen manifesten T2DM, bei dem strukturelle Veränderungen in der Literatur beschrieben wurden, fließend ist und ebenfalls genau erfasst werden müsste. Diese Veränderungen untersuchte die Arbeitsgruppe von Regan et al. bereits

1981 am Myokard von Hunden. Der nachgewiesene vermehrte Einbau von interstitiellem Kollagen verstärkte die Steifigkeit der Herzkammern und senkte die Kontraktionskraft [287].

In weiteren Studien wurde beschrieben, dass insbesondere auf Ebene der Kardiomyozyten Defekte in der Erregungsweiterleitung (Verlust der autonomen Funktion) und der Calciumhomöostase sowie erhöhter oxidativer Stress vorliegen, aber auch metabolische Veränderungen wie ein erhöhter FS-Metabolismus und der Verlust insulinabhängiger Glukosetransporter nachweisbar sind (siehe auch Kapitel 4.3) [277, 288]. Auch bei Myokardproben von Menschen mit einem Diabetes wurde eine erhöhte perivaskuläre und interstitielle Fibrose in Abwesenheit anderer kardiovaskulärer Erkrankungen beobachtet [289]. So konnte die Arbeitsgruppe von Gao et al. eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Fibrose und der Höhe des HbA1c nachweisen [290].

Das Absterben von Kardiomyozyten geht mit dem Ersatz des Gewebes durch Fibroblasten einher. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Blutglukosekonzentration die Fibroblastenproliferation stimuliert, die Umwandlung in Myofibroblasten fördert und die Transkription und Sekretion extrazellulärer Matrixproteine aktiviert [291, 292]. Mechanistisch ist davon auszugehen, dass die vermehrten Kollagenablagerungen mit einer erhöhten Expression von Bindegewebswachstumsfaktoren wie TGF- β zusammenhängen, die die Kollagenproduktion anregen, während der Zelltod vor allem mit erhöhtem oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird [293-296]. In einer Studie von Kwon et al. konnte gezeigt werden, dass ROS zum Verlust von Herzmuskelmasse im Rahmen des *Remodelings* beitragen, indem sie die Apoptose von Kardiomyozyten induzieren [297]. Zudem zeigten Van Linthout et al. eine Dysregulation des extrazellulären Matrixabbaus aufgrund einer Umstrukturierung der Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die zu einem erhöhten Bindegewebsanteil in diabetischen Herzen beiträgt [298].

Zusammengefasst scheinen die fibrotischen Umbauprozesse mit Kollageneinlagerung und Dysregulation der MMPs, die bei einem Diabetes zu finden sind, im prädiabetischen Modell noch nicht nachweisbar zu sein. Die Dauer der Hyperglykämie und die bislang fehlende Insulinresistenz könnten hierfür ausschlaggebend sein [299].

4.2.1 Große Variabilität maskiert strukturelle Umbauprozesse nach MI im prädiabetischen Myokard

Das Risiko einen MI innerhalb von 10 Jahren nach Erstdiagnose eines T2DM zu erleiden liegt bei über 20 % [300]. Auch ein Prädiabetes und die meist damit verbundenen Komorbiditäten wie Übergewicht, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie erhöhen durch die Entstehung einer Atherosklerose das Risiko enorm. In einer Studie von Stacey et al. konnte gezeigt werden, dass die Anzahl unerkannter MI bei prädiabetischen Patienten mit einer dreifach höheren Prävalenz verbunden ist im Vergleich zu normoglykämischen Patienten [301]. Mit Eintreten eines MI beginnt das kardiale *Remodeling* bis zur Entstehung einer sekundären Fibrose. Dabei zeigen sich Umbauprozesse nicht nur im ischämischen Infarktgewebe, sondern auch im *Remote*-Bereich.

Erste immunhistochemische Analysen in dieser Arbeit zeigten in WT-Mäusen nach einer induzierten Ischämie mit anschließender Reperfusion eine leicht erhöhte Kollagen III-Einlagerung in das nicht infarzierte Myokard (*Remote*-Gewebe). Bei DIO-Herzen ergab sich lediglich eine leichte Tendenz einer vermehrten Kollagen III-Einlagerung in das *Remote*-Gewebe (siehe Kapitel 3.3.1). Auf Transkriptionsebene wurde dagegen eine höhere Kollagen III-Expression bei WT nach I/R gemessen (siehe Kapitel 3.3.2). Bei beiden Methoden zeigte sich jedoch eine große Variabilität innerhalb der Gruppen. Diese könnte mit der Komplexität des Heilungsprozesses nach einem MI, aber auch aufgrund der unterschiedlichen Größe des ischämischen Areals zusammenhängen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben baut sich das nicht infarzierte Myokard zur Kompensation um und weist eine Kardiomyozytenhypertrophie auf, die von einer fortschreitenden interstitiellen Fibrose begleitet wird. Zudem konnte in einer Studie gezeigt werden, dass während der inflammatorischen Phase eine lokale Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten einen chronischen Umbau der extrazellulären Matrix im *Remote*-Gewebe auslösen [302]. Zu Beginn dieser Arbeit wurde hypothetisch von einer vermehrten Kollageneinlagerung in DIO-Mäusen nach MI ausgegangen, da Diabetes aber auch Übergewicht allein mit einem Umbau der extrazellulären Matrix assoziiert sind insbesondere auch durch inflammatorische Prozesse. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass durch die erhöhte Blutglukose matrixfördernde Proteine in diabetischen Herzen vermehrt gebildet werden und über verschiedene Signalwege kardiale Fibroblasten aktivieren [303, 304]. Der Einbau an kollagenreicher Matrix scheint nicht nur von der Umwandlung der Myofibroblasten abhängig zu sein, sondern auch durch Makrophagen, Kardiomyozyten und Endothelzellen

beeinflusst zu werden, die durch Sekretion von Wachstumsfaktoren die von Fibroblasten abgeleitete Kollagensynthese stimulieren [305-307]. Der hyperglykämische Zustand, verbunden mit der Insulinresistenz und der gesteigerten inflammatorischen Reaktion, kann zu einer Störung während der Reparatur nach einem MI führen, was zu einer fehlerhaften Heilung beiträgt und die Narbengröße negativ beeinflusst [308, 309]. Es existieren jedoch auch kontroverse Ergebnisse, bei denen eine verminderte Narbengröße nach MI bei übergewichtigen Ratten nachgewiesen wurde, wobei die genauen Mechanismen ungeklärt sind [310].

Neben der Tatsache, dass das hier vorliegende Mausmodell eine leichte Form des Prädiabetes aufweist, bei der mögliche Prozesse des fibrotischen Umbaus noch nicht vollzogen sind, spielt die pathophysiologische Heterogenität von Adipositas und Diabetes / Prädiabetes in Kombination mit der Komorbidität eines MI eine entscheidende Rolle, was die Analyse im Einzelnen erschwert und weiter erforscht werden muss.

4.2.2 Anzeichen für protektive Effekte von IGF-1 im Rahmen des *Remodelings*

IGF-1 ist ein regulatorisches Peptid, welches als Wachstumsfaktor Einfluss auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung hat, aber auch als anaboles Hormon den kardialen Stoffwechsel beeinflusst [311]. Aufgrund nachgewiesener protektiver Effekte im kardiovaskulären Gebiet, rückt IGF-1 zunehmend in den Vordergrund der Forschung, jedoch mit kontroversen Ergebnissen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine dreitägige IGF-1-Gabe nach einem MI einen leicht positiven, aber nicht signifikanten Effekt auf die Kollagen III-Einlagerung im Myokard hat. So wurde bei DIO-Herzen mit IGF-1-Behandlung nach MI sowohl immunhistochemisch als auch auf Transkriptionsebene eine etwas geringere Kollagen III-Menge als bei DIO-Mäusen nach MI nachgewiesen (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Der positive Effekt von IGF-1 auf das kardiale *Remodeling* nach einem MI wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe bei wildtypischen Mäusen demonstriert. Dabei war die Narbengröße nach einer kurzzeitigen IGF-1-Gabe verringert [258]. Ebenso konnte in dieser Studie und in anderen vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Überexpression von IGF-1 beziehungsweise die kurzzeitige IGF-1-Gabe nach einem MI die Angiogenese fördert und die kardiale Funktion verbessert. Auch Zellen der frühen Immunantwort scheinen die Prozesse zu beeinflussen [312, 313]. Experimentelle Studien mit einer induzierten Herzinsuffizienz oder einem MI, stützen diese These. In diesen fördert IGF-1 das physiologische Herzwachstum und reduziert die Apoptose sowie Kollagenablagerungen, wodurch die Herzfunktion und das Überleben verbessert wurde

[314-316]. Durch seine Wirkung auf die Regeneration des Herzmuskels kann IGF-1 den Beginn einer Herzinsuffizienz verzögern, indem unter anderem die Kontraktilität und das Schlagvolumen verbessert wird [317-319]. Jedoch werden in der Literatur auch kontroverse Ergebnisse beschrieben, die eine weitere Forschung von Nöten machen. In einer Studie von Andreassen et al. wurde eine Korrelation zwischen erhöhten IGF-1-Spiegeln mit einer erhöhten Mortalität und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz nachgewiesen [320]. Blackstock et al. zeigte, dass IGF-1 die Kollagen I-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen und dessen extrazelluläre Anreicherung stimuliert [321], während die Arbeitsgruppe von Huang et al. eine gesteigerte Kollagensynthese und Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten in Ratten nachwies [322]. Auch eine Untersuchung von Iswandi et al. mittels nuklearmedizinischer Untersuchung (Single-Photon-Emissionscomputer-tomographie, SPECT) beschrieb keinen Zusammenhang zwischen IGF-1-Spiegeln im Verhältnis zur Infarktgröße [323].

Im Bereich der Signaltransduktion wirkt IGF-1 auf Rezeptor-Tyrosinkinase gekoppelte Rezeptoren [324]. Sie scheinen eher einen Einfluss auf ein kompensatorisches (physiologisches) Kardiomyozytenwachstum zu haben. So konnte eine Studie von Bueno et al. zeigen, dass genetisch veränderte Mäuse, bei denen die ERK-Kaskade aktiviert wurde, eine Form der kompensierten Hypertrophie aufwiesen, die nur leichte Anzeichen einer veränderten Histologie oder Fibrose hatten, ähnlich dem prädiabetischen Modell. Diese Kaskade wird auch unter anderem durch IGF-1 aktiviert [325]. Es wäre interessant im Weiteren zu untersuchen, ob sich die bereits nachgewiesene konzentrische Herzmuskelhypertrophie bei DIO-Mäusen nach einer IGF-1-Gabe verändert. Bei einer Ischämie mit anschließender Reperfusion aktiviert IGF-1 ebenfalls den PI3K/Akt-Signalweg und reduziert so die kardiale Dysfunktion und Fibrose wie es von Khan et al. gezeigt wurde [326]. Diese Signalkaskade scheint somit durch eine kurzzeitige Aktivierung protektive Effekte auszuüben, die mit einer kompensierten Herzmuskelhypertrophie und einer verminderten Fibrose einhergehen, während in Modellen mit einer dauerhaften Überexpression ebenfalls eine kardiale Dilatation und Dysfunktion nachgewiesen wurde [327, 328]. Dieses Ergebnis gibt Grund zur Annahme, dass eine dauerhafte IGF-1-Gabe, die unter anderem zur Aktivierung der PI3K/Akt Signalkaskade führt, negative Effekte haben kann. Die beschriebenen Abläufe stellen nur einen Ausschnitt der Effekte von IGF-1 dar. Das Hauptproblem in der therapeutischen Gabe von IGF-1 scheint in der Komplexität der verschiedenen folgenden Signalwege zu liegen. Während das Zellwachstum zum einen zu

einer Kompensation der Herzfunktion beiträgt, führt eine dauerhafte Aktivierung eher zu einer Verschlechterung der kardialen Kontraktilität. Daher könnte ein gezielteres Ansteuern einzelner nachfolgender Signalwege von IGF-1 durch medikamentöse Liganden eher von Nutzen sein.

Doch wie beeinflusst die IGF-1-Gabe das *Remodeling* bei Übergewicht und Prädiabetes? Eine verringerte Narbengröße bei DIO-Mäusen im prädiabetischen Modell durch IGF-1 konnte in dieser Arbeit, anders als bei WT zuvor, nicht gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.3). Die untersuchte Gruppe an Myokardproben war mit einer Anzahl von drei pro Gruppe jedoch sehr klein, was eine eindeutige Limitation darstellt.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass IGF-1 die Insulinsensitivität erhöht und den Blutzuckerspiegel senkt, auch bei einem gestörten Glukosestoffwechsel [329, 330]. Reduzierte IGF-1-Spiegel werden mit einer gestörten Glukosetoleranz und T2DM in Verbindung gebracht [331]. Zudem zeigen übergewichtige Erwachsene und sogar Kinder erniedrigte IGF-1-Werte verbunden mit erhöhten Nüchternglukosewerten. Das Ausmaß korreliert dabei mit der Menge an Körperfett [332, 333]. In unserem prädiabetischen Mausmodell sind die basalen IGF-1-Spiegel bisher unbekannt und müssten für eine genaue Einordnung der Befunde untersucht werden. Erniedrigte IGF-1-Spiegel könnten den Effekt der induzierten IGF-1-Gabe nach I/R maskieren, da die Dosis im Vergleich zu WT möglicherweise nicht ausreicht, um ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Narbengröße zu messen. In einer Studie von Bailey-Downs et al. konnte gezeigt werden, dass ein IGF-1-Mangel das kardiovaskuläre System anfälliger für die schädlichen Auswirkungen von Übergewicht (gesteigerte Entzündung, vermehrter oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion) macht [334]. Eine weitere Arbeit, in der Übergewicht durch eine fett- und zuckerhaltige Diät bei Mäusen induziert wurde, zeigte in einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen Fütterung sowohl eine verbesserte Glukosetoleranz durch eine IGF-1-Gabe als auch eine verminderte Kollagen I- und III-Einlagerung [335]. Verglichen zu unserem Modell betrug die Dauer der IGF-1-Gabe hierbei jedoch 7 Tage. Mechanistisch wurde eine Hochregulation des Akt-Signalweges nachgewiesen. Auch der IGF-1R spielt eine Rolle. So konnte eine Studie von Huynh et al. zeigen, dass die herzspezifische Überexpression des IGF-1R zu einer verminderten Kollagenexpression und Fibrose im diabetischen Mausmodell beiträgt [336].

All diese Erkenntnisse untermauern den protektiven Effekt von IGF-1 auf das Herz. Dennoch existieren auch negative Eigenschaften. Insbesondere eine kurzzeitige und auf die Kardiomyozyten begrenzte IGF-1-Therapie scheint positiven Einfluss zu haben, während die systemische Gabe mit Nebenwirkungen wie Vasodilatation, Tachykardie und Hypoglykämie sowie Langzeitfolgen verbunden ist. Dabei können die anti-apoptischen Eigenschaften und die Beeinflussung des Zellwachstums auch eine Vermehrung maligner Zellen und somit das Krebsrisiko begünstigen, ein wichtiger negativer Effekt durch IGF-1 [337, 338].

4.3 Prädiabetes steigert myokardiale FS-Verwertung

Das Herz ist in der Lage sich verschiedenen Stoffwechsellagen anzupassen und so eine kontinuierliche Energieproduktion aufrechtzuerhalten, um die Funktionsfähigkeit der Kardiomyozyten zu gewährleisten. Dabei nutzt es unter physiologischen Bedingungen vor allem FS im Rahmen der β -Oxidation zur ATP-Produktion aber auch Glukose und Laktat [5]. Unter pathologischen Bedingungen ändert sich jedoch sowohl das Substratangebot als auch der Energiebedarf. Dadurch kommt es zu einer anderen Gewichtung der Substratverwertung.

In dieser Arbeit wurde zunächst das myokardiale Expressionsprofil metabolisch relevanter Gene nach einer fett- und zuckerhaltigen Diät basal untersucht. Erste Analysen konnten zeigen, dass im prädiabetischen Mausmodell die Fettsäureverwertung gesteigert zu sein scheint, da die Genexpression von CPT1B leicht erhöht war, während die Glukoseverwertung bei einer stabilen GLUT4-Expression vermeintlich unverändert ist (siehe Kapitel 3.4.1). Auch in einer Studie von Yan et al. wurde eine gesteigerte FS-Oxidation bei übergewichtigen Mäusen beschrieben [339]. Die reduzierte Insulinsensitivität, die bereits bei einem Prädiabetes auftritt, führt insbesondere postprandial zu einer Erhöhung frei zirkulierender FS, die vermehrt in die Kardiomyozyten aufgenommen werden [208, 340]. In einer anderen Studie mit einer Fütterungsdauer von 16 Wochen wurde ebenfalls eine gesteigerte FS-Aufnahme (Erhöhung von CD36) und Lipidakkumulation nachgewiesen, jedoch zeigte sich hier eine reduzierte β -Oxidation. (erniedrigte CPT1B-Expression) [341]. In Bezug auf die Glukoseverwertung sind in der Literatur kontroverse Ergebnisse beschrieben, da die Patientenpopulationen meist nicht nur den prädiabetischen Phänotyp beinhalten, sondern auch Patienten mit T2DM. Kim et al. zeigte ähnlich zu der GLUT4-Expression in dieser Arbeit, dass Prädiabetes nicht mit einer verringerten myokardialen Glukoseaufnahme im nüchternen Zustand assoziiert war, T2DM dagegen

schon [342]. Die Arbeitsgruppe von Nielsen et al. untersuchte diesen Zusammenhang eine Stunde nach oraler Glukoseaufnahme mit dem Ergebnis einer verminderten Glukoseaufnahme im Herzen. Es ist jedoch nicht bekannt ob es Unterschiede zwischen Prädiabetes und T2DM in dieser Studie gab, zumal die Studienpopulation zudem eine Herzinsuffizienz hatte. [343].

Der GLUT4-Transporter gilt als Insulin-abhängig [21]. Eine verminderte GLUT4-Expression bei T2DM könnte ein protektiver Mechanismus zur relativen Minderung der Glukoseaufnahme bei chronischer Hyperglykämie sein [344, 345]. Eine Studie von Sahraoui et al. untersuchte die metabolischen Veränderungen am Modell von Wüstenrennmäusen nach einer 16-wöchigen fettreichen Diät. Hier zeigte sich wie in meiner Arbeit eine gleichbleibende GLUT4-Expression, während eine Hochregulation des Insulin-unabhängigen Glukosetransporters GLUT1 beschrieben wurde [341]. Der vermehrte Einbau von GLUT1 im adulten Herzen wurde auch nach einer Ischämie oder myokardialen Stress nachgewiesen [346]. Es wäre daher interessant im weiteren Verlauf sowohl die GLUT1-Expression, als auch weitere Marker der Glukoseverwertung zu bestimmen, um die Zusammenhänge der einzelnen Stoffwechselwege (wie anaerobe Glykolyse, Pentosephosphatweg, Glukoseoxidation etc.) nachzuvollziehen.

Des Weiteren konnte in unserem Mausmodell eine erhöhte PDK4-Expression nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4.2). Diese gilt als wichtigster Regulator der PDH und inhibiert so die Glukoseoxidation. Dies steht im Einklang mit einer früheren Studie von Crewe et al., in der eine erhöhte PDK4-Expression zusammen mit einer erhöhten Verfügbarkeit von FS anstelle von Glukose bei Übergewicht beschrieben wurde. Diese Veränderung in der Substratnutzung geht wahrscheinlich mit einer verringerten myokardialen ATP-Produktion durch Glukose einher, da die Inhibition des PDH-Komplexes zu einer Änderung der Glukoseverwertung mit verminderter Oxidation von Pyruvat hin zu einer gesteigerten Glykolyse führt [347].

Die Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors PPAR α zeigte in dieser Arbeit interessanterweise keine Veränderungen bei DIO-Tieren im *Remote*-Gewebe (siehe Kapitel 3.4.2), obwohl PPAR α unter anderem die Transkription der bereits beschriebenen Gene wie PDK4 und CPT1B induziert. In einer Studie von Finck et al. führte die Überexpression von PPAR α im Myokard zu einem deutlichen Anstieg der FS-Aufnahme, β -Oxidation und Fetteinlagerung aufgrund einer Erhöhung der an diesen Prozessen beteiligten Enzyme [259].

Im Gegensatz dazu wurde bei Experimenten mit einer Deletion von PPAR α (PPAR α -Knockout), eine reduzierte Expression relevanter Gene der β -Oxidation und parallel ein Anstieg der Glukoseoxidation nachgewiesen [348, 349]. Die unveränderte PPAR α -Expression und damit scheinbare Diskrepanz, die auch bei diabetischen Mäusen beobachtet wurde [350], könnte darauf zurückzuführen sein, dass die PPAR α -Aktivität unabhängig von der Genexpression erhöht sein könnte oder die veränderten Stoffwechselprozesse hier nicht von PPAR α abhängig sind. Die PPAR α -Expressionshöhe allein ist daher möglicherweise kein geeigneter Marker des kardialen Substratstoffwechsels *in vivo*.

4.4 Änderung der metabolischen Flexibilität nach MI im prädiabetischen Modell

Nach einem MI kommt es im *Remote*-Gewebe zu einer metabolischen Umstellung (*metabolic switch*) [8]. Dieser beinhaltet die vermehrte Glukoseverwertung insbesondere im Rahmen der anaeroben Glykolyse [134]. Untersuchungen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass es nach Eintreten eines MI mit anschließender Reperfusion zu einer Expressionszunahme von CTP1B bei WT und im DIO-Modell kommt, die jedoch in der Höhe nicht zwischen den Gruppen variiert (siehe Kapitel 3.4.1). Auch die Expression von GLUT4 war gesteigert. Im WT zeigte sich eine deutliche Expressionszunahme von GLUT4, während die PDK4-Expression (mit einer großen Variabilität innerhalb der Proben) nur leicht erhöht war (siehe Kapitel 3.4.2). Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass bei WT nach einer I/R der „metabolische Switch“ mit einem Wechsel zur vermehrten Glukoseverwertung stattgefunden hat, wie es zu erwarten war. Im prädiabetischen Modell scheint diese Flexibilität eingeschränkt zu sein, da eine geringere Zunahme der GLUT4-Expression nachgewiesen wurde, die für eine zwar leicht erhöhte Glukoseverwertung spricht, jedoch in geringerem Maße als bei WT-Herzen. Zudem zeigte sich eine vermehrte PDK4-Expression im DIO-Myokard verglichen zu WT mit I/R (Abb. 4.1). Eine relative Erhöhung der FS-Verwertung führt zu einer Entkopplung der Glukoseoxidation von der Glykolyse, passend zu der gesteigerten PDK4-Expression, was zu einer Anhäufung von Wasserstoffionen führt und durch intrazelluläre pH-Verschiebungen die Kontraktilität einschränkt [145, 351]. Beobachtungen in mehreren Studien führten zu therapeutischen Ansätzen, die den Glukosestoffwechsel bei Herzinsuffizienz fördern, da davon ausgegangen wurde, dass dies die Schädigung positiv beeinflusst und die Effizienz der kardialen ATP-Generierung unter hypoxischen Bedingungen nach einem MI erhöht [352, 353]. Eine weitere Interventionsmöglichkeit bietet die Blockade der FS-Oxidation, um den Wechsel zur

Glukoseoxidation zu stimulieren [354]. Kontrovers zu diesem Ansatz zeigte eine Studie von Berthiaume et al. anhand eines isolierten Arbeitsherz-Perfusionsmodells *ex vivo*, dass eine fettreiche Diät über 8 Wochen nach einem MI kardioprotektiv wirken kann, indem der metabolische Phänotyp sich dem gesunden Herzen mit einer vermehrten β -Oxidation und geringerer Glukoseoxidation annähert [355]. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch in weiteren Studien nachgewiesen werden [310, 356].

Zusammengefasst geben die Ergebnisse Grund zur Annahme, dass das Vorliegen eines Prädiabetes in Kombination mit einem MI zu einer Entkopplung der Glukoseoxidation von der Glykolyse führt, während die FS-Verwertung gesteigert zu sein scheint.

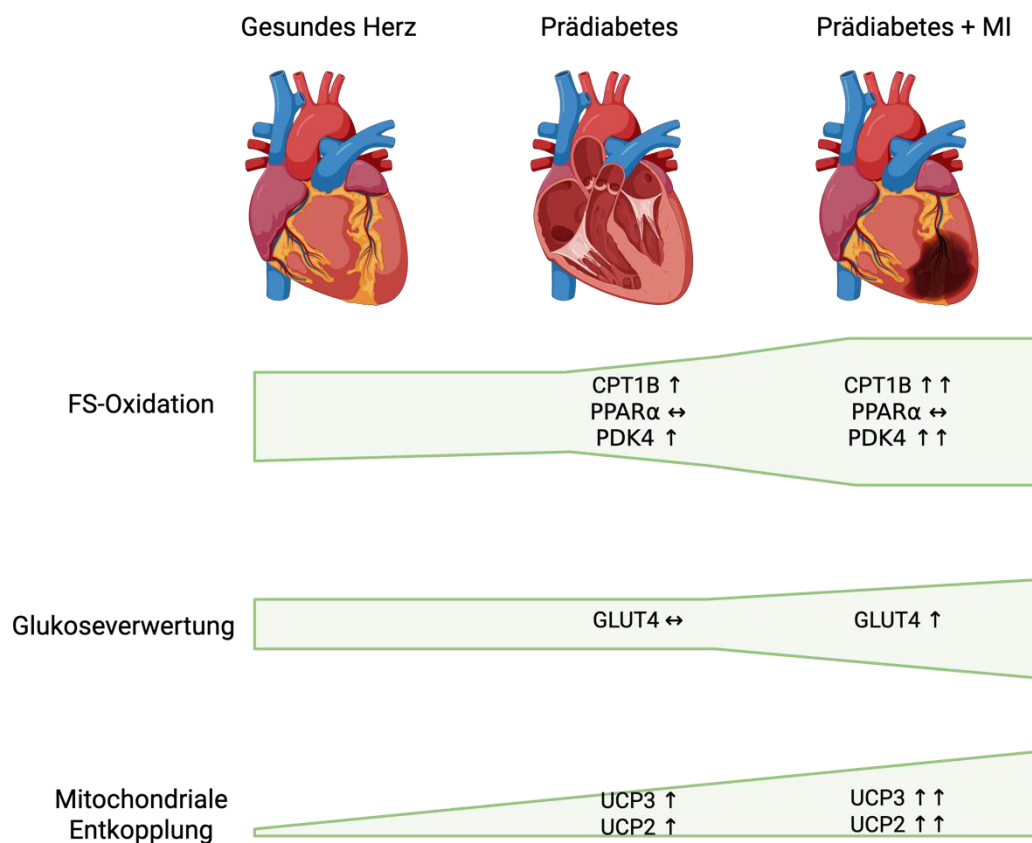


Abb. 4.1: Schematische Darstellung metabolischer Veränderungen vor und nach einem MI im prädiabetischen Modell. Während das gesunde Herz vor allem β -Oxidation betreibt aber auch in geringerem Maße Glukose nutzt, führt die Ausbildung eines Prädiabetes zu einer gesteigerten FS-Verwertung. Nach einem MI scheint die metabolische Flexibilität, die bei WT durch eine starke Glukoseverwertung gekennzeichnet ist, eingeschränkt zu sein, was ebenfalls zu einer relativ gesteigerten FS-Verwertung führt, während die Glykolyse von der Glukoseoxidation entkoppelt zu sein scheint (PDK4-Expression erhöht). Mit voranschreitender Pathogenese zeigt sich eine zunehmend erhöhte mitochondriale Entkopplung. Abb. erstellt mit BioRender.com

4.5 Hinweise für Einfluss von UCP2 und UCP3 auf Metabolismus

Die Hauptaufgabe von UCP2 und UCP3 scheint die Reduktion von oxidativem Stress zu sein, was mit einer Reduktion von ROS einhergeht. In der Literatur gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass die Expression von UCP2 und UCP3 den Glukose- und FS-Metabolismus beeinflusst [94, 95].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Prädiabetes basal zu einer deutlichen Genexpressionszunahme von UCP3 und einer milden Zunahme von UCP2 führt. Im Gegensatz dazu wurde nach I/R eine um das 52-fache gesteigerte UCP2-Expression bei WT nachgewiesen, während bei den DIO-Tieren UCP3 vermehrt exprimiert wurde (siehe Kapitel 3.4.4). Wie bereits beschrieben sind der Sauerstoffverbrauch und die FS-Verwertung im Herzen fettleibiger Tiere gesteigert, was auf eine beginnende mitochondriale Entkopplung zurückzuführen sein könnte. In einer Studie von Hidaka et al. konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass ein Diabetes ebenfalls mit einer erhöhten UCP3-Expression verbunden ist, jedoch wurde nicht untersucht, ob die mitochondriale Entkopplung direkt zur myokardialen Dysfunktion bei Diabetes und Adipositas beiträgt [357]. Eine erhöhte UCP3-Expression wurde auch bei erhöhten FS-Konzentration im Herzmuskel nachgewiesen [358]. Die Arbeitsgruppe von Boudina et al. zeigte eine FS-induzierte mitochondriale Entkopplung mit verminderter ATP-Synthese (geringere kardiale Effizienz) im Herzen diabetischer Mäuse und beobachtete, dass diese hauptsächlich durch eine erhöhte UCP-Aktivität vermittelt wird [359]. In mehreren Studien wurde eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung durch gesteigerte UCP2 und UCP3 Level bei Übergewicht im Myokard nachgewiesen [356, 360, 361]. Ein mildes Entkoppeln der oxidativen Phosphorylierung durch UCPs unter oxidativem Stress zeigte jedoch auch kardioprotektive Effekte. Dies konnte unter anderem bei Diabetes [362] und nach Reperfusion nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden [90, 363]. Sowohl die Hochregulation der Expression von UCP2 als auch UCP3 war nach I/R in gesunden Tieren am ehesten mit einer Reduktion des Zellschadens assoziiert [364], während in UCP3-Knockout-Tieren nach einem MI eine ventrikuläre Funktionseinschränkung mit verschlechterter Kontraktilität, der Entwicklung von Arrhythmien und eine größere Narbe nachgewiesen wurde [363].

Die UCP3-Expression steht in engem Zusammenhang mit dem FS-Metabolismus, was auf eine Rolle bei der β -Oxidation oder deren Regulierung schließen lässt. Interessanterweise konnte eine Studie von Gong et al. jedoch zeigen, dass UCP3-Knockout-Mäuse weder basal

noch unter Einfluss von Stress einen veränderten Phänotyp aufwiesen, was darauf hindeutet, dass das Fehlen von UCP3 durch andere Signalkaskaden umgangen werden kann [365]. In meiner Arbeit zeigten DIO-Mäuse nach I/R eine gesteigerte UCP3-Expression, was in der Zusammenschau der Befunde mit der nachgewiesenen erhöhten CPT1B- und PDK4-Expression für einen vermehrten FS-Stoffwechsel spricht. Eine ähnliche Korrelation wurde auch in einer Studie von Rohm et al. bei Diabetes beschrieben [344]. In Ratten, die für 7 Tage einer hypobaren hypoxischen Umgebung ausgesetzt waren, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine signifikant verringerte kardiale UCP3-Expression, sowie von PDK4 und CPT1B gemessen, was die Glukoseverwertung begünstigte [366].

In Bezug auf UCP2 werden in der Literatur kontroverse Ergebnisse beschrieben, wobei UCP2 im adulten Herzen in manchen Studien nachgewiesen wurde und in anderen nicht. Dagegen existiert ein allgemeiner Konsens, dass UCP2 während der fetalen Entwicklung und unter pathophysiologischen Bedingungen verstärkt gebildet wird [89, 92, 94, 111]. Auch der Einfluss von UCP2 auf die Substratverwertung ist nicht eindeutig geklärt. Neben einer erhöhten UCP2-Expression in glukoseverwertenden Zellen [94], konnte eine Hochregulation der UCP2-Expression auch in Zellen mit vermindertem aeroben Glukosestoffwechsel (Hemmung der Glukoseoxidation durch UCP2) und einer gesteigerten β -Oxidation nachgewiesen werden [89, 367]. Die stark erhöhte UCP2-Expression nach einem MI bei WT könnte somit auf eine gesteigerte anaerobe Glykolyse unter ischämischen Bedingungen hindeuten. Die Entwicklung eines Prädiabetes führte in dieser Arbeit basal zu leicht erhöhten UCP2-Werten. In einer Studie von Li et al. induzierte die Exposition mit freien FS bei adulten Ratten-Kardiomyozyten eine UCP2-Expression und eine anschließende Apoptose *in vitro*, wobei die Transkription von UCP2 durch PPAR α reguliert wurde [368]. Somoza et al. stellten ebenfalls eine erhöhte UCP2-Expression nach 8-Wochen fettreicher Nahrung fest [369]. Im Gegensatz dazu zeigte die Arbeitsgruppe von Alrefraie et al. eine signifikante Herabregulierung von UCP2 nach einer 6-monatigen HFD-Diät [370]. Diese Kontroverse bezüglich der UCP2-Genexpression könnte auf die längere Dauer der Fütterung zurückzuführen sein und auf eine weitere Umstellung der Substratverwertung aufgrund der zunehmenden Pathogenese hindeuten.

Insgesamt ist die Datenlage zur kardialen UCP2- und UCP3-Expression in der Literatur uneinheitlich, was auf eine große Variabilität bei verschiedenen Spezies und Stämmen oder auf experimentelle Einschränkungen hinweisen kann. Einigkeit herrscht jedoch darüber,

dass die UCPs durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung den Metabolismus beeinflussen und eine Zielstruktur für therapeutische Ansätze sein könnte (Abb. 4.1).

4.6 Veränderung der Struktur und Funktionalität im Narbengewebe

Der Verlust an Kardiomyozyten nach einem Infarkt führt zur Bildung einer Narbe auf Kollagenbasis, die den Ventrikel strukturell stützt und gleichzeitig seine mechanischen Eigenschaften verändert. Proteine der extrazellulären Matrix, die im infarzierten Gewebe vermehrt gebildet werden, scheinen als Vermittler für Schlüsselsignale der Reparatur zu dienen und wirken als Modulatoren der Zellmigration, Proliferation und Adhäsion [371]. In dieser Arbeit wurde, wie zu erwarten war, eine erhöhte Kollagen III-Einlagerung sowohl immunhistochemisch als auch auf Transkriptionsebene nachgewiesen, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen WT und DIO-Herzen. Diese „*Replacement Fibrose*“, die sich auf die Bildung kollagenreichen Narbengewebes in Bereichen der Myokardnekrose bezieht, konnte unter anderem auch eine Studie von Cleutjens et al. zeigen [171]. In anderen Mausmodellen mit genetisch oder diätetisch induziertem Übergewicht und einer Insulinresistenz (also mit fortgeschrittener Pathogenese) zeigte sich nach I/R eine verstärkte ventrikuläre Dilatation, was auf eine mangelhafte Narbenbildung und eingeschränkte Funktion der reparativen Zellen zurückzuführen sein könnte [372, 373]. Dies wiederum führt zu einer verminderten Ablagerung von Kollagen und einer geringeren Zugfestigkeit der Narbe. Adipositas und eine eingeschränkte Glukosetoleranz scheinen somit die Fibroblastenfunktion zu beeinflussen und führen zu einer weniger effektiven Heilung [374].

Die Ischämie mündet in einer Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung, weshalb die Kardiomyozyten alternative Wege zur ATP-Erzeugung nutzen (insbesondere anaerobe Glykolyse). Im hypoxischen Areal (Narbengewebe, AAR) wurden in dieser Arbeit signifikant erniedrigte Genexpressionslevel von CPT1B, GLUT4, PPAR α und PDK4 gemessen, was auf eine allgemeine Funktionseinschränkung des Narbengewebes hindeutet (siehe Kapitel 3.4.3). Es muss jedoch bedacht werden, dass die zelluläre Zusammensetzung im Narbengewebe verändert ist. Kardiomyozyten, die durch den Infarkt zugrunde gegangen sind, werden im Narbengewebe erst allmählich durch Bindegewebszellen ersetzt, was zu einem Verlust an metabolischer Funktionalität / Kontraktilität führt [375, 376]. Es dominieren Fibroblasten und Myofibroblasten. Auch eine inflammatorische Reaktion hat stattgefunden (siehe Kapitel 1.3.2). Während Fibroblasten eine geringe metabolische Aktivität zeigen, betreiben Myofibroblasten in der aktiven Umbauphase aerobe Glykolyse

[377]. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit im Narbengewebe eine gesteigerte UCP2-Expression nachgewiesen verglichen zum *Remote*-Gewebe (siehe Kapitel 3.4.4). Eine Studie von Safari et al. untersuchte die UCP2-Spiegel auf Transkriptions- und Proteinebene nach I/R [364]. Hier zeigte sich zwar keine veränderte Genexpression weder nach der Ischämie noch der Reperfusion, aber auf Proteinebene war eine signifikante UCP2-Erhöhung im linken Ventrikel nach der Reperfusion messbar. Diese nahm mit der Zeit im Verlauf ab. Anders als in dieser Arbeit, wo sich eine erhöhte UCP3-Expression nur im *Remote*-Gewebe zeigte, wurde auch eine UCP3-Erhöhung im Narbengewebe gemessen. Die nachgewiesenen Erhöhungen könnten am ehestens auf eine erhöhte ROS-Produktion durch die Schädigung im antioxidativen System (mitochondriale Dysfunktion) zurückzuführen sein [378, 379]. Frühere Studien haben gezeigt, dass ROS der wichtigste regulierende Faktor für die Aktivität und Expression von UCP2 und UCP3 ist [380].

4.7 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass das hier vorliegende prädiabetische Mausmodell mit milder Insulinresistenz bereits strukturelle Veränderungen des Myokards verursacht, ohne die kardiale Funktion bislang wesentlich zu beeinträchtigen. Eine metabolische Anpassung durch eine vermehrte FS-Verwertung ist jedoch auch in diesem frühen Stadium schon nachweisbar. Die grundlegenden Auswirkungen des Prädiabetes wurden in Abb. 4.2 schematisch dargestellt. Ein Einfluss von IGF-1 auf das *Remodeling* nach einem MI liefert Hinweise auf potenziell protektive Effekte eines therapeutischen Ansatzes. Allerdings ist die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit diskutierten Studienergebnisse kritisch zu bewerten, da die verwendeten prädiabetischen und diabetischen Modelle hinsichtlich genetischer Grundlagen, diätetischer Einflüsse, Fütterungsdauer und Tierstämme teils erheblich variieren.

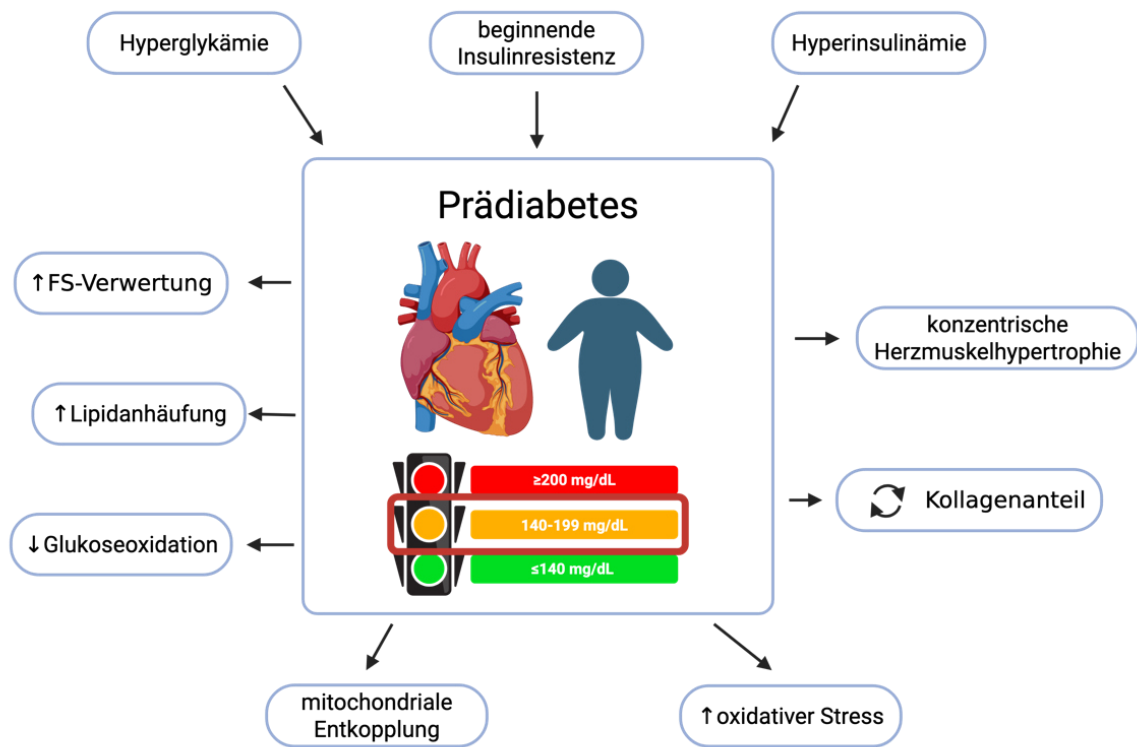


Abb. 4.2 Auswirkungen eines Prädiabetes basal. Die Abbildung zeigt eine orientierende Übersicht über metabolische und strukturelle Veränderungen des Myokards bei einem Prädiabetes, ausgelöst durch eine Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz. Abb. erstellt mit BioRender.com

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Schmidt, R.F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbaren Repetitorium*. 31., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2010, Heidelberg: Springer.
2. Hue, L. and H. Taegtmeyer, *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E578-91.
3. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
4. Schaper, J., E. Meiser, and G. Stammeler, *Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts*. Circ Res, 1985. **56**(3): p. 377-91.
5. Belke, D.D., et al., *Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart*. Am J Physiol, 1999. **277**(4): p. R1210-7.
6. Stanley, W.C. and M.P. Chandler, *Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 115-30.
7. Wisneski, J.A., et al., *Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1819-27.
8. Karwi, Q.G., et al., *Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 68.
9. van der Vusse, G.J., M. van Bilsen, and J.F. Glatz, *Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 279-93.
10. Cryer, A., *Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism*. Int J Biochem, 1981. **13**(5): p. 525-41.
11. Glatz, J.F., J.J. Luiken, and A. Bonen, *Involvement of membrane-associated proteins in the acute regulation of cellular fatty acid uptake*. J Mol Neurosci, 2001. **16**(2-3): p. 123-32; discussion 151-7.
12. Bharadwaj, K.G., et al., *Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 37976-86.
13. Chiu, H.C., et al., *A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 813-22.
14. Murphy, S., S. Martin, and R.G. Parton, *Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 441-7.
15. Bonnefont, J.P., et al., *Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(5-6): p. 495-520.
16. McGarry, J.D. and N.F. Brown, *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. Eur J Biochem, 1997. **244**(1): p. 1-14.
17. Jaswal, J.S., et al., *Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1333-50.
18. Hardie, D.G., *Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase*. Prog Lipid Res, 1989. **28**(2): p. 117-46.
19. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
20. Heinrich, P.C., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Springer-Lehrbuch. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

21. Fischer, Y., et al., *Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations.* J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7085-92.
22. Santalucia, T., et al., *Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue.* Endocrinology, 1992. **130**(2): p. 837-46.
23. Wheeler, T.J., R.D. Fell, and M.A. Hauck, *Translocation of two glucose transporters in heart: effects of rotenone, uncouplers, workload, palmitate, insulin and anoxia.* Biochim Biophys Acta, 1994. **1196**(2): p. 191-200.
24. Egert, S., et al., *Effects of wortmannin on insulin- and ischemia-induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused rat hearts.* Cardiovasc Res, 1997. **35**(2): p. 283-93.
25. Herzig, S., et al., *Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier.* Science, 2012. **337**(6090): p. 93-6.
26. Garcia, C.K., et al., *Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle.* Cell, 1994. **76**(5): p. 865-73.
27. Holness, M.J. and M.C. Sugden, *Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation.* Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1143-51.
28. Randle, P.J., *Fuel selection in animals.* Biochem Soc Trans, 1986. **14**(5): p. 799-806.
29. Sankaralingam, S. and G.D. Lopaschuk, *Cardiac energy metabolic alterations in pressure overload-induced left and right heart failure (2013 Grover Conference Series).* Pulm Circ, 2015. **5**(1): p. 15-28.
30. Bertrand, L., et al., *Insulin signalling in the heart.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 238-48.
31. Kolwicz, S.C., Jr., S. Purohit, and R. Tian, *Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes.* Circ Res, 2013. **113**(5): p. 603-16.
32. Randle, P.J., *Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years.* Diabetes Metab Rev, 1998. **14**(4): p. 263-83.
33. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.* Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
34. Mjos, O.D., *Effect of free fatty acids on myocardial function and oxygen consumption in intact dogs.* J Clin Invest, 1971. **50**(7): p. 1386-9.
35. Opie, L.H. and J. Knuuti, *The adrenergic-fatty acid load in heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(18): p. 1637-46.
36. Stanley, W.C., et al., *Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions.* Cardiovasc Res, 1997. **33**(2): p. 243-57.
37. Russell, R.R., 3rd, et al., *Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR.* Am J Physiol, 1999. **277**(2): p. H643-9.
38. Hue, L. and M.H. Rider, *Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues.* Biochem J, 1987. **245**(2): p. 313-24.
39. Kurland, I.J. and S.J. Pilkis, *Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme.* Protein Sci, 1995. **4**(6): p. 1023-37.
40. Rodriguez, C., et al., *AMPK, metabolism, and vascular function.* FEBS J, 2021. **288**(12): p. 3746-3771.

41. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 113-20.
42. Dyck, J.R. and G.D. Lopaschuk, *AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally?* J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 95-112.
43. Kolobova, E., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 69-77.
44. Kerbey, A.L., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide*. Biochem J, 1976. **154**(2): p. 327-48.
45. Wieland, O., et al., *Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: effect of diabetes, fasting, and refeeding on pyruvate dehydrogenase interconversion*. Arch Biochem Biophys, 1971. **143**(2): p. 593-601.
46. Whitehouse, S., R.H. Cooper, and P.J. Randle, *Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by dichloroacetate and other halogenated carboxylic acids*. Biochem J, 1974. **141**(3): p. 761-74.
47. Hansford, R.G. and L. Cohen, *Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys, 1978. **191**(1): p. 65-81.
48. Moon, S.S., et al., *Association of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene polymorphisms with type 2 diabetes and metabolic syndrome*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **95**(2): p. 230-6.
49. Harris, R.A., B. Huang, and P. Wu, *Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression*. Adv Enzyme Regul, 2001. **41**: p. 269-88.
50. Huang, B., et al., *Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands, glucocorticoids, and insulin*. Diabetes, 2002. **51**(2): p. 276-83.
51. Wu, P., J.M. Peters, and R.A. Harris, *Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**(2): p. 391-6.
52. McCormack, J.G. and R.M. Denton, *Role of Ca²⁺ ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Evidence from studies with isolated mitochondria that adrenaline activates the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes by increasing the intramitochondrial concentration of Ca²⁺*. Biochem J, 1984. **218**(1): p. 235-47.
53. McCormack, J.G., A.P. Halestrap, and R.M. Denton, *Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 391-425.
54. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. Circ Res, 2004. **95**(6): p. 568-78.
55. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 409-35.
56. Forman, B.M., J. Chen, and R.M. Evans, *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4312-7.
57. Vega, R.B., J.M. Huss, and D.P. Kelly, *The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of*

- nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1868-76.
58. Rowe, G.C., A. Jiang, and Z. Arany, *PGC-1 coactivators in cardiac development and disease.* Circ Res, 2010. **107**(7): p. 825-38.
 59. Fernandez-Marcos, P.J. and J. Auwerx, *Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis.* Am J Clin Nutr, 2011. **93**(4): p. 884S-90.
 60. Yang, Q. and Y. Li, *Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis.* J Mol Med (Berl), 2007. **85**(7): p. 697-706.
 61. Doenst, T., T.D. Nguyen, and E.D. Abel, *Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production.* Circ Res, 2013. **113**(6): p. 709-24.
 62. Schoonjans, K., et al., *PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene.* EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5336-48.
 63. Hay, C.W. and K. Docherty, *Comparative analysis of insulin gene promoters: implications for diabetes research.* Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3201-13.
 64. Steiner, D.F., *Evidence for a precursor in the biosynthesis of insulin.* Trans N Y Acad Sci, 1967. **30**(1): p. 60-8.
 65. Levine, R., *Concerning the mechanisms of insulin action.* Diabetes, 1961. **10**: p. 421-31.
 66. Iliadis, F., N. Kadoglou, and T. Didangelos, *Insulin and the heart.* Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93 Suppl 1**: p. S86-91.
 67. Ottensmeyer, F.P., et al., *Mechanism of transmembrane signaling: insulin binding and the insulin receptor.* Biochemistry, 2000. **39**(40): p. 12103-12.
 68. Ward, C.W. and M.C. Lawrence, *Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor.* Bioessays, 2009. **31**(4): p. 422-34.
 69. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
 70. Valverde, A.M., et al., *Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes.* Mol Endocrinol, 1998. **12**(5): p. 688-97.
 71. Qi, Y., et al., *Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance.* Diabetes, 2013. **62**(11): p. 3887-900.
 72. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-I.* EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
 73. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha.* Curr Biol, 1997. **7**(4): p. 261-9.
 74. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.* Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
 75. Larance, M., et al., *Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking.* J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37803-13.
 76. Mora, A., et al., *Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart.* FEBS Lett, 2005. **579**(17): p. 3632-8.
 77. Boulton, T.G., et al., *ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.* Cell, 1991. **65**(4): p. 663-75.
 78. Tamemoto, H., et al., *Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 20293-7.

79. Giorgetti, S., et al., *Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor.* Eur J Biochem, 1994. **223**(1): p. 195-202.
80. Rider, M.H. and L. Hue, *Activation of rat heart phosphofructokinase-2 by insulin in vivo.* FEBS Lett, 1984. **176**(2): p. 484-8.
81. Glatz, J.F., et al., *Regulation of sarcolemmal transport of substrates in the healthy and diseased heart.* Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(6): p. 471-6.
82. Dyck, D.J., G. Steinberg, and A. Bonen, *Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(3): p. E600-7.
83. Nedergaard, J., D. Ricquier, and L.P. Kozak, *Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects.* EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 917-21.
84. Cadenas, S., *Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection.* Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2018. **1859**(9): p. 940-950.
85. Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 143-83.
86. Hulsmans, M., E. Van Dooren, and P. Holvoet, *Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis.* Curr Atheroscler Rep, 2012. **14**(3): p. 264-76.
87. Stanzione, R., et al., *Uncoupling Protein 2 as a Pathogenic Determinant and Therapeutic Target in Cardiovascular and Metabolic Diseases.* Curr Neuropharmacol, 2022. **20**(4): p. 662-674.
88. Zhao, R.Z., et al., *Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review).* Int J Mol Med, 2019. **44**(1): p. 3-15.
89. Kutsche, H.S., R. Schreckenber, and K.D. Schluter, *Uncoupling Proteins in Striated Muscle Tissue: Known Facts and Open Questions.* Antioxid Redox Signal, 2022. **37**(4-6): p. 324-335.
90. Teshima, Y., et al., *Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes.* Circ Res, 2003. **93**(3): p. 192-200.
91. Boss, O., et al., *Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression.* FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 39-42.
92. Pecqueur, C., et al., *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation.* J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8705-12.
93. Rupprecht, A., et al., *Quantification of uncoupling protein 2 reveals its main expression in immune cells and selective up-regulation during T-cell proliferation.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41406.
94. Hilse, K.E., et al., *The Expression of Uncoupling Protein 3 Coincides With the Fatty Acid Oxidation Type of Metabolism in Adult Murine Heart.* Front Physiol, 2018. **9**: p. 747.
95. Hilse, K.E., et al., *The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1857**(1): p. 72-78.
96. Brand, M.D. and T.C. Esteves, *Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3.* Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 85-93.
97. Mailloux, R.J. and M.E. Harper, *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production.* Free Radic Biol Med, 2011. **51**(6): p. 1106-15.
98. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cells.* Diabetes Obes Metab, 2010. **12 Suppl 2**: p. 134-40.

99. Zhang, C.Y., et al., *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes*. Cell, 2001. **105**(6): p. 745-55.
100. Blanc, J., et al., *Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 388-90.
101. Brand, M.D., et al., *The causes and functions of mitochondrial proton leak*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1187**(2): p. 132-9.
102. Tian, X.Y., et al., *Uncoupling Protein 2 in Cardiovascular Health and Disease*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1060.
103. Stavinoha, M.A., et al., *Evidence for mitochondrial thioesterase 1 as a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-regulated gene in cardiac and skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(5): p. E888-95.
104. Bezaire, V., et al., *Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation*. FASEB J, 2005. **19**(8): p. 977-9.
105. Seifert, E.L., et al., *Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25124-25131.
106. Schrauwen, P. and M.K. Hesselink, *The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity?* Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 287-92.
107. Goglia, F. and V.P. Skulachev, *A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet*. FASEB J, 2003. **17**(12): p. 1585-91.
108. Schrauwen, P., J. Hoeks, and M.K. Hesselink, *Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism?* Prog Lipid Res, 2006. **45**(1): p. 17-41.
109. Mazumder, P.K., et al., *Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts*. Diabetes, 2004. **53**(9): p. 2366-74.
110. Murray, A.J., et al., *Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the control of myocardial uncoupling protein levels*. Diabetes, 2005. **54**(12): p. 3496-502.
111. Van Der Lee, K.A., et al., *Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart*. FASEB J, 2000. **14**(3): p. 495-502.
112. Statistisches Bundesamt (Destatis). *Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10 und nach Geschlecht für 2022; Stand 15.11.2023; www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html*. Zugegriffen am 23.04.2024.
113. Hrsg. Deutsche Herzstiftung e.V., *34. Deutscher Herzbericht 2022, Frankfurt am Main; S. 13*. September 2023.
114. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2016. **69**(12): p. 1167.
115. Metra, M. and J.R. Teerlink, *Heart failure*. The Lancet, 2017. **390**(10106): p. 1981-1995.
116. Hasenfuss, G., *Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy*. Cardiovasc Res, 1998. **39**(1): p. 60-76.
117. Badeer, H.S., *Biological Significance of Cardiac Hypertrophy*. Am J Cardiol, 1964. **14**: p. 133-8.
118. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.

119. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. J Clin Invest, 1975. **56**(1): p. 56-64.
120. Tham, Y.K., et al., *Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets*. Arch Toxicol, 2015. **89**(9): p. 1401-38.
121. Ventura-Clapier, R., A. Garnier, and V. Veksler, *Energy metabolism in heart failure*. J Physiol, 2004. **555**(Pt 1): p. 1-13.
122. Dzeja, P.P., et al., *Failing energetics in failing hearts*. Curr Cardiol Rep, 2000. **2**(3): p. 212-7.
123. van Bilsen, M., et al., *Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome?* Cardiovasc Res, 2004. **61**(2): p. 218-26.
124. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
125. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
126. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2929.
127. Weintraub, W.S., et al., *Value of primordial and primary prevention for cardiovascular disease: a policy statement from the American Heart Association*. Circulation, 2011. **124**(8): p. 967-90.
128. Reed, G.W., J.E. Rossi, and C.P. Cannon, *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2017. **389**(10065): p. 197-210.
129. Libby, P., *Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy*. N Engl J Med, 2013. **368**(21): p. 2004-13.
130. Tibaut, M., D. Mekis, and D. Petrovic, *Pathophysiology of Myocardial Infarction and Acute Management Strategies*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2017. **14**(3): p. 150-159.
131. McLaughlin, K.L., et al., *Novel approach to quantify mitochondrial content and intrinsic bioenergetic efficiency across organs*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 17599.
132. Dambrova, M., et al., *Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury*. Free Radic Biol Med, 2021. **165**: p. 24-37.
133. Bashan, N., et al., *Mechanisms of adaptation of glucose transporters to changes in the oxidative chain of muscle and fat cells*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 1): p. C430-40.
134. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1247-55.
135. Young, L.H., et al., *Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo*. Circulation, 1997. **95**(2): p. 415-22.
136. Neely, J.R. and H.E. Morgan, *Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle*. Annu Rev Physiol, 1974. **36**: p. 413-59.
137. Dennis, S.C., W. Gevers, and L.H. Opie, *Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to?* J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(9): p. 1077-86.
138. Scholz, W. and U. Albus, *Na⁺/H⁺ exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion*. Basic Res Cardiol, 1993. **88**(5): p. 443-55.
139. Orchard, C.H., et al., *Acidosis facilitates spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat myocardium*. J Gen Physiol, 1987. **90**(1): p. 145-65.

140. Liepinsh, E., et al., *Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013. **386**(6): p. 541-50.
141. Lerch, R., et al., *Myocardial fatty acid oxidation during ischemia and reperfusion*. Mol Cell Biochem, 1992. **116**(1-2): p. 103-9.
142. Heather, L.C., et al., *Differential translocation of the fatty acid transporter, FAT/CD36, and the glucose transporter, GLUT4, coordinates changes in cardiac substrate metabolism during ischemia and reperfusion*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(5): p. 1058-66.
143. Chouchani, E.T., et al., *Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 431-435.
144. Zuurbier, C.J. and H.B. Van Wezel, *Glucose-insulin therapy, plasma substrate levels and cardiac recovery after cardiac ischemic events*. Cardiovasc Drugs Ther, 2008. **22**(2): p. 125-31.
145. Liu, Q., et al., *High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 718-25.
146. Liedtke, A.J., et al., *Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium*. Circ Res, 1988. **62**(3): p. 535-42.
147. Jaworski, K., et al., *Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(1): p. G1-4.
148. Makrecka, M., et al., *Long-chain acylcarnitine content determines the pattern of energy metabolism in cardiac mitochondria*. Mol Cell Biochem, 2014. **395**(1-2): p. 1-10.
149. Russell, R.R., 3rd, et al., *AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 495-503.
150. Liepinsh, E., et al., *Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria*. Biochem J, 2016. **473**(9): p. 1191-202.
151. Dungan, K.M., S.S. Braithwaite, and J.C. Preiser, *Stress hyperglycaemia*. Lancet, 2009. **373**(9677): p. 1798-807.
152. Christensen, N.J. and J. Videbaek, *Plasma catecholamines and carbohydrate metabolism in patients with acute myocardial infarction*. J Clin Invest, 1974. **54**(2): p. 278-86.
153. Penna, C., et al., *Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols*. Br J Pharmacol, 2020. **177**(23): p. 5312-5335.
154. Kaludercic, N. and F. Di Lisa, *Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy*. Front Cardiovasc Med, 2020. **7**: p. 12.
155. Taegtmeier, H., *Switching metabolic genes to build a better heart*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2043-5.
156. Allard, M.F., et al., *Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts*. Am J Physiol, 1994. **267**(2 Pt 2): p. H742-50.
157. Lydell, C.P., et al., *Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 841-51.
158. Akki, A., K. Smith, and A.M. Seymour, *Compensated cardiac hypertrophy is characterised by a decline in palmitate oxidation*. Mol Cell Biochem, 2008. **311**(1-2): p. 215-24.

159. Sorokina, N., et al., *Recruitment of compensatory pathways to sustain oxidative flux with reduced carnitine palmitoyltransferase I activity characterizes inefficiency in energy metabolism in hypertrophied hearts*. *Circulation*, 2007. **115**(15): p. 2033-41.
160. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **35**(3): p. 569-82.
161. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 91-112.
162. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. *Nat Med*, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
163. Timmers, L., et al., *The innate immune response in reperfused myocardium*. *Cardiovasc Res*, 2012. **94**(2): p. 276-83.
164. Arslan, F., D.P. de Kleijn, and G. Pasterkamp, *Innate immune signaling in cardiac ischemia*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(5): p. 292-300.
165. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. *Circ Res*, 2012. **110**(1): p. 159-73.
166. Chia, S., et al., *Association of leukocyte and neutrophil counts with infarct size, left ventricular function and outcomes after percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction*. *Am J Cardiol*, 2009. **103**(3): p. 333-7.
167. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **62**: p. 24-35.
168. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
169. Turner, N.A. and K.E. Porter, *Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013. **6**(1): p. 5.
170. Santiago, J.J., et al., *Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts*. *Dev Dyn*, 2010. **239**(6): p. 1573-84.
171. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. *Am J Pathol*, 1995. **147**(2): p. 325-38.
172. Bishop, J.E. and G.J. Laurent, *Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart*. *Eur Heart J*, 1995. **16 Suppl C**: p. 38-44.
173. Li, J., et al., *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
174. Bujak, M., et al., *Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction*. *Circ Res*, 2009. **105**(10): p. 973-83.
175. Blankesteijn, W.M., et al., *Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice*. *Acta Physiol Scand*, 2001. **173**(1): p. 75-82.
176. Frangogiannis, N.G., *Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration*. *Curr Opin Cardiol*, 2015. **30**(3): p. 240-5.
177. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
178. Krenning, G., E.M. Zeisberg, and R. Kalluri, *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. *J Cell Physiol*, 2010. **225**(3): p. 631-7.

179. Kuivaniemi, H. and G. Tromp, *Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases*. *Gene*, 2019. **707**: p. 151-171.
180. Baum, J. and H.S. Duffy, *Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?* *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. **57**(4): p. 376-9.
181. Covell, J.W., *Factors influencing diastolic function. Possible role of the extracellular matrix*. *Circulation*, 1990. **81**(2 Suppl): p. III155-8.
182. Merx, W., M.S. Yoon, and J. Han, *The role of local disparity in conduction and recovery time on ventricular vulnerability to fibrillation*. *Am Heart J*, 1977. **94**(5): p. 603-10.
183. World Health Organization, *Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser., 2000. **894**: p. 1-253.
184. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. *Lancet*, 2014. **384**(9945): p. 766-81.
185. Khan, S.S., et al., *Association of Body Mass Index With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Compression of Morbidity*. *JAMA Cardiol*, 2018. **3**(4): p. 280-287.
186. Wang, Y.C., et al., *Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK*. *Lancet*, 2011. **378**(9793): p. 815-25.
187. Swinburn, B.A., et al., *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. *Lancet*, 2011. **378**(9793): p. 804-14.
188. Alpert, M.A., et al., *Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*. *Transl Res*, 2014. **164**(4): p. 345-56.
189. Obokata, M., et al., *Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. *Circulation*, 2017. **136**(1): p. 6-19.
190. Schilling, J.D., *The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise*. *Antioxid Redox Signal*, 2015. **22**(17): p. 1515-26.
191. Neeland, I.J., et al., *Relation of regional fat distribution to left ventricular structure and function*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2013. **6**(5): p. 800-7.
192. Murase, T., et al., *Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome*. *Hypertens Res*, 2012. **35**(2): p. 186-93.
193. Lavie, C.J., et al., *Reprint of: Healthy Weight and Obesity Prevention: JACC Health Promotion Series*. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **72**(23 Pt B): p. 3027-3052.
194. Pandey, A., K.V. Patel, and C.J. Lavie, *Obesity, Central Adiposity, and Fitness: Understanding the Obesity Paradox in the Context of Other Cardiometabolic Parameters*. *Mayo Clin Proc*, 2018. **93**(6): p. 676-678.
195. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas 10th edition*. Belgium, 2021 <https://diabetesatlas.org/>. 2021 Zugegriffen am 15.05.2024].
196. Banday, M.Z., A.S. Sameer, and S. Nissar, *Pathophysiology of diabetes: An overview*. *Avicenna J Med*, 2020. **10**(4): p. 174-188.
197. Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haefen, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*, 2005. **365**(9467): p. 1333-46.
198. Bergman, M., *Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus*. *Endocrine*, 2013. **43**(3): p. 504-13.
199. DeFronzo, R.A., E. Ferrannini, and D.C. Simonson, *Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake*. *Metabolism*, 1989. **38**(4): p. 387-95.

200. Magnusson, I., et al., *Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1323-7.
201. Galicia-Garcia, U., et al., *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
202. American Diabetes, A., *2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021.* Diabetes Care, 2021. **44**(Suppl 1): p. S15-S33.
203. Ghody, P., et al., *Identifying prediabetes - Is it beneficial in the long run?* Maturitas, 2015. **81**(2): p. 282-6.
204. Hien, P., et al., *Pathophysiologie und Klinik Diabetes mellitus Typ 2*, in *Diabetes-Handbuch*, P. Hien, et al., Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 39-43.
205. Richter, B., et al., *Development of type 2 diabetes mellitus in people with intermediate hyperglycaemia.* Cochrane Database Syst Rev, 2018. **10**(10): p. CD012661.
206. Santaguida, P.L., et al., *Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose.* Evid Rep Technol Assess (Summ), 2005(128): p. 1-11.
207. Yeboah, J., et al., *Impaired fasting glucose and the risk of incident diabetes mellitus and cardiovascular events in an adult population: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis).* J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(2): p. 140-6.
208. Labbe, S.M., et al., *Increased myocardial uptake of dietary fatty acids linked to cardiac dysfunction in glucose-intolerant humans.* Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2701-10.
209. Pagano, C., et al., *Heart lipid accumulation in obese non-diabetic rats: effect of weight loss.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008. **18**(3): p. 189-97.
210. Lopaschuk, G.D. and J.C. Russell, *Myocardial function and energy substrate metabolism in the insulin-resistant JCR:LA corpulent rat.* J Appl Physiol (1985), 1991. **71**(4): p. 1302-8.
211. Peterson, L.R., et al., *Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women.* Circulation, 2004. **109**(18): p. 2191-6.
212. Rider, O.J., et al., *Myocardial substrate metabolism in obesity.* Int J Obes (Lond), 2013. **37**(7): p. 972-9.
213. Anderson, E.J., et al., *Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart.* J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(20): p. 1891-8.
214. Coort, S.L., et al., *Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats.* Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1655-63.
215. Finck, B.N., et al., *A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1226-31.
216. Wall, S.R. and G.D. Lopaschuk, *Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats.* Biochim Biophys Acta, 1989. **1006**(1): p. 97-103.
217. Randle, P.J., A.L. Kerbey, and J. Espinal, *Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones.* Diabetes Metab Rev, 1988. **4**(7): p. 623-38.
218. Schroeder, M.A., et al., *In vivo assessment of pyruvate dehydrogenase flux in the heart using hyperpolarized carbon-13 magnetic resonance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 12051-6.

219. Atherton, H.J., et al., *Validation of the in vivo assessment of pyruvate dehydrogenase activity using hyperpolarised ¹³C MRS*. NMR Biomed, 2011. **24**(2): p. 201-208.
220. Rinderknecht, E. and R.E. Humbel, *The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): p. 2769-76.
221. D'Ercole, A.J., A.D. Stiles, and L.E. Underwood, *Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(3): p. 935-9.
222. Zapf, J., E. Schoenle, and E.R. Froesch, *Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum*. Eur J Biochem, 1978. **87**(2): p. 285-96.
223. Berelowitz, M., et al., *Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary*. Science, 1981. **212**(4500): p. 1279-81.
224. Wheatcroft, S.B. and M.T. Kearney, *IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(4): p. 153-62.
225. Hakuno, F. and S.I. Takahashi, *IGF1 receptor signaling pathways*. J Mol Endocrinol, 2018. **61**(1): p. T69-T86.
226. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocr Rev, 1995. **16**(1): p. 3-34.
227. Moxham, C.P., V. Duronio, and S. Jacobs, *Insulin-like growth factor I receptor beta-subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers*. J Biol Chem, 1989. **264**(22): p. 13238-44.
228. Bayne, M.L., et al., *The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type I IGF receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11004-8.
229. Resnicoff, M., et al., *The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo*. Cancer Res, 1995. **55**(11): p. 2463-9.
230. Werner, H., D. Weinstein, and I. Bentov, *Similarities and differences between insulin and IGF-I: structures, receptors, and signalling pathways*. Arch Physiol Biochem, 2008. **114**(1): p. 17-22.
231. Siddle, K., et al., *Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 4): p. 513-25.
232. Juul, A., et al., *Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 939-44.
233. Ruidavets, J.B., et al., *Effects of insulin-like growth factor I in preventing acute coronary syndromes: the PRIME study*. Atherosclerosis, 2011. **218**(2): p. 464-9.
234. Torella, D., et al., *Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression*. Circ Res, 2004. **94**(4): p. 514-24.
235. Cittadini, A., et al., *Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 50-9.

236. Ito, H., et al., *Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes*. *Circulation*, 1993. **87**(5): p. 1715-21.
237. Wang, P.H., *Roads to survival: insulin-like growth factor-I signaling pathways in cardiac muscle*. *Circ Res*, 2001. **88**(6): p. 552-4.
238. Aguirre, G.A., et al., *Insulin-like growth factor-I deficiency and metabolic syndrome*. *J Transl Med*, 2016. **14**: p. 3.
239. Sandhu, M.S., et al., *Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study*. *Lancet*, 2002. **359**(9319): p. 1740-5.
240. Paolisso, G., et al., *Low plasma insulin-like growth factor-I concentrations predict worsening of insulin-mediated glucose uptake in older people*. *J Am Geriatr Soc*, 1999. **47**(11): p. 1312-8.
241. Rhodes, C.J., *IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication*. *J Mol Endocrinol*, 2000. **24**(3): p. 303-11.
242. Fernandez, A.M., et al., *Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes*. *Genes Dev*, 2001. **15**(15): p. 1926-34.
243. Mauras, N., et al., *Insulin-like growth factor I and growth hormone (GH) treatment in GH-deficient humans: differential effects on protein, glucose, lipid, and calcium metabolism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(4): p. 1686-94.
244. Savastano, S., et al., *The complex relationship between obesity and the somatotropic axis: the long and winding road*. *Growth Horm IGF Res*, 2014. **24**(6): p. 221-6.
245. Perez, R., et al., *Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor-I in experimental cirrhosis*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(17): p. 2731-9.
246. Smith, T.J., *Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases?* *Pharmacol Rev*, 2010. **62**(2): p. 199-236.
247. O'Connor, J.C., et al., *Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology*. *Cell Immunol*, 2008. **252**(1-2): p. 91-110.
248. Colao, A., *The GH-IGF-I axis and the cardiovascular system: clinical implications*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008. **69**(3): p. 347-58.
249. Abbas, A., P.J. Grant, and M.T. Kearney, *Role of IGF-I in glucose regulation and cardiovascular disease*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008. **6**(8): p. 1135-49.
250. Oehler, D., et al., *Full-length transcriptomic analysis in murine and human heart reveals diversity of PGC-1alpha promoters and isoforms regulated distinctly in myocardial ischemia and obesity*. *BMC Biol*, 2022. **20**(1): p. 169, Additional file 7: Figure S6: Pre-diabetic phenotype, lizenziert nach Creative Common Attribution 4.0 International.
251. Firschke, C., *[Echocardiography]*. *Internist (Berl)*, 2012. **53**(3): p. 291-7.
252. Hofer, M., *FKDS-Trainer ein Arbeitsbuch für den Einstieg in die Farbkodierte Duplexsonographie und Echokardiographie*. 4. Aufl. ed, ed. M. Hofer. 2013, Düsseldorf: Didamed-Verl.
253. Schünke, M., *Prometheus LernAtlas der Anatomie Innere Organe*. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage ed, ed. M. Voll. 2015.
254. Emde, B., et al., *Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction*. *Eur J Histochem*, 2014. **58**(4): p. 2448.
255. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.

256. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
257. Thomsen, R., et al., *Analysis of qPCR data by converting exponentially related Ct values into linearly related X0 values*. J Bioinform Comput Biol, 2010. **8(5)**: p. 885-900.
258. Heinen, A., et al., *IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells*. Mol Ther, 2019. **27(1)**: p. 46-58.
259. Finck, B.N., et al., *The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus*. J Clin Invest, 2002. **109(1)**: p. 121-30.
260. DeFronzo, R.A. and M. Abdul-Ghani, *Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose*. Am J Cardiol, 2011. **108(3 Suppl)**: p. 3B-24B.
261. Gu, K., C.C. Cowie, and M.I. Harris, *Diabetes and decline in heart disease mortality in US adults*. JAMA, 1999. **281(14)**: p. 1291-7.
262. Stone, P.H., et al., *The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group*. J Am Coll Cardiol, 1989. **14(1)**: p. 49-57.
263. Coutinho, M., et al., *The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years*. Diabetes Care, 1999. **22(2)**: p. 233-40.
264. De Marco, M., et al., *Cardiac geometry and function in diabetic or prediabetic adolescents and young adults: the Strong Heart Study*. Diabetes Care, 2011. **34(10)**: p. 2300-5.
265. MacDonald, M.R., et al., *Impact of diabetes on outcomes in patients with low and preserved ejection fraction heart failure: an analysis of the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme*. Eur Heart J, 2008. **29(11)**: p. 1377-85.
266. Cubbon, R.M., et al., *Diabetes mellitus is associated with adverse prognosis in chronic heart failure of ischaemic and non-ischaemic aetiology*. Diab Vasc Dis Res, 2013. **10(4)**: p. 330-6.
267. Kavey, R.E., *Left ventricular hypertrophy in hypertensive children and adolescents: predictors and prevalence*. Curr Hypertens Rep, 2013. **15(5)**: p. 453-7.
268. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128(1)**: p. 191-227.
269. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331(6020)**: p. 1078-80.
270. Frey, N., et al., *Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?* Circulation, 2004. **109(13)**: p. 1580-9.
271. Hadi Alijanvand, M., et al., *Prevalence and predictors of prediabetes and its coexistence with high blood pressure in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes: A 9-year cohort study*. J Res Med Sci, 2020. **25**: p. 31.
272. Woodiwiss, A.J., et al., *Obesity promotes left ventricular concentric rather than eccentric geometric remodeling and hypertrophy independent of blood pressure*. Am J Hypertens, 2008. **21(10)**: p. 1144-51.
273. Boudina, S. and E.D. Abel, *Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 250-8.
274. Rubler, S., et al., *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis*. Am J Cardiol, 1972. **30(6)**: p. 595-602.

275. Diamant, M., et al., *Diastolic dysfunction is associated with altered myocardial metabolism in asymptomatic normotensive patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(2): p. 328-35.
276. Fein, F.S., *Diabetic cardiomyopathy*. Diabetes Care, 1990. **13**(11): p. 1169-79.
277. Fang, Z.Y., J.B. Prins, and T.H. Marwick, *Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 543-67.
278. Murarka, S. and M.R. Movahed, *Diabetic cardiomyopathy*. J Card Fail, 2010. **16**(12): p. 971-9.
279. Spychala, A., et al., *Insulin-like Growth Factor 1 Improves Cardiac Function after Acute Myocardial Infarction in a Prediabetic Mouse Model*. The FASEB Journal, 2020. **34**(S1): p. 1-1.
280. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
281. Storz, C., et al., *Myocardial tissue characterization by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging in subjects with prediabetes, diabetes, and normal controls with preserved ejection fraction from the general population*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2018. **19**(6): p. 701-708.
282. Kitamura, M., et al., *Collagen remodeling and cardiac dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the significance of type III and VI collagens*. Clin Cardiol, 2001. **24**(4): p. 325-9.
283. Carroll, J.F. and S.C. Tyagi, *Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit*. Am J Hypertens, 2005. **18**(5 Pt 1): p. 692-8.
284. Hayashi, T., et al., *Collagen subtypes and matrix metalloproteinase in idiopathic restrictive cardiomyopathy*. Int J Cardiol, 1998. **64**(2): p. 109-16.
285. Sivakumar, P., et al., *Upregulation of lysyl oxidase and MMPs during cardiac remodeling in human dilated cardiomyopathy*. Mol Cell Biochem, 2008. **307**(1-2): p. 159-67.
286. Calligaris, S.D., et al., *Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60931.
287. Regan, T.J., et al., *Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use*. Circ Res, 1981. **49**(6): p. 1268-77.
288. Rodrigues, B., M.C. Cam, and J.H. McNeill, *Myocardial substrate metabolism: implications for diabetic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 169-79.
289. Shimizu, M., et al., *Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes*. J Clin Pathol, 1993. **46**(1): p. 32-6.
290. Gao, Y., et al., *Evaluation of myocardial fibrosis in diabetes with cardiac magnetic resonance T1-mapping: Correlation with the high-level hemoglobin A1c*. Diabetes Res Clin Pract, 2019. **150**: p. 72-80.
291. Shamhart, P.E., et al., *Hyperglycemia enhances function and differentiation of adult rat cardiac fibroblasts*. Can J Physiol Pharmacol, 2014. **92**(7): p. 598-604.
292. Tang, M., et al., *High glucose promotes the production of collagen types I and III by cardiac fibroblasts through a pathway dependent on extracellular-signal-regulated kinase 1/2*. Mol Cell Biochem, 2007. **301**(1-2): p. 109-14.
293. Cai, L. and Y.J. Kang, *Cell death and diabetic cardiomyopathy*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(3): p. 219-28.
294. Liu, Q., S. Wang, and L. Cai, *Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage*. J Diabetes Investig, 2014. **5**(6): p. 623-34.

295. Westermann, D., et al., *Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism*. *Diabetes*, 2007. **56**(3): p. 641-6.
296. Galeone, A., et al., *Diabetic Cardiomyopathy: Role of Cell Death, Exosomes, Fibrosis and Epicardial Adipose Tissue*. *Int J Mol Sci*, 2024. **25**(17).
297. Kwon, S.H., et al., *H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(6): p. 615-21.
298. Van Linthout, S., et al., *Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(4): p. 319-27.
299. Verboven, M., et al., *Western diet given to healthy rats mimics the human phenotype of diabetic cardiomyopathy*. *J Nutr Biochem*, 2018. **61**: p. 140-146.
300. Avogaro, A., et al., *Glucose-lowering therapy and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and acute coronary syndrome*. *Diab Vasc Dis Res*, 2019. **16**(5): p. 399-414.
301. Stacey, R.B., et al., *Prediabetes and the association with unrecognized myocardial infarction in the multi-ethnic study of atherosclerosis*. *Am Heart J*, 2015. **170**(5): p. 923-8.
302. Sager, H.B., et al., *Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure*. *Circ Res*, 2016. **119**(7): p. 853-64.
303. Zhang, X., et al., *Effects of elevated glucose levels on interactions of cardiac fibroblasts with the extracellular matrix*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2007. **43**(8-9): p. 297-305.
304. Fowlkes, V., et al., *Type II diabetes promotes a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts*. *Life Sci*, 2013. **92**(11): p. 669-76.
305. Alex, L., et al., *Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **315**(4): p. H934-H949.
306. Gonzalez-Quesada, C., et al., *Thrombospondin-1 induction in the diabetic myocardium stabilizes the cardiac matrix in addition to promoting vascular rarefaction through angiotensin-2 upregulation*. *Circ Res*, 2013. **113**(12): p. 1331-44.
307. Biernacka, A., et al., *Smad3 Signaling Promotes Fibrosis While Preserving Cardiac and Aortic Geometry in Obese Diabetic Mice*. *Circ Heart Fail*, 2015. **8**(4): p. 788-98.
308. Marso, S.P., et al., *Comparison of myocardial reperfusion in patients undergoing percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation acute myocardial infarction with versus without diabetes mellitus (from the EMERALD Trial)*. *Am J Cardiol*, 2007. **100**(2): p. 206-10.
309. Wensley, I., et al., *Myocardial structure, function and ischaemic tolerance in a rodent model of obesity with insulin resistance*. *Exp Physiol*, 2013. **98**(11): p. 1552-64.
310. Salie, R., B. Huisamen, and A. Lochner, *High carbohydrate and high fat diets protect the heart against ischaemia/reperfusion injury*. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. **13**: p. 109.
311. Gatenby, V.K. and M.T. Kearney, *The role of IGF-1 resistance in obesity and type 2 diabetes-mellitus-related insulin resistance and vascular disease*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(12): p. 1333-42.
312. Santini, M.P., et al., *Enhancing repair of the mammalian heart*. *Circ Res*, 2007. **100**(12): p. 1732-40.

313. O'Sullivan, J.F., et al., *Potent long-term cardioprotective effects of single low-dose insulin-like growth factor-1 treatment postmyocardial infarction*. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(4): p. 327-35.
314. Duerr, R.L., et al., *Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(2): p. 619-27.
315. Li, Q., et al., *Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 1991-9.
316. Su, E.J., et al., *Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(4): p. H1429-40.
317. Musaro, A., et al., *Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor I*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(5): p. 1206-10.
318. von Lewinski, D., et al., *Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium*. *Circ Res*, 2003. **92**(2): p. 169-76.
319. Donath, M.Y., et al., *Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(9): p. 3177-83.
320. Andreassen, M., et al., *IGF1 as predictor of all cause mortality and cardiovascular disease in an elderly population*. *Eur J Endocrinol*, 2009. **160**(1): p. 25-31.
321. Blackstock, C.D., et al., *Insulin-like growth factor-1 increases synthesis of collagen type I via induction of the mRNA-binding protein LARP6 expression and binding to the 5' stem-loop of COL1a1 and COL1a2 mRNA*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(11): p. 7264-74.
322. Huang, K.W., et al., *Insulin-like growth factor-1 directly affects cardiac cellular remodelling via distinct pathways*. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2021. **36**: p. 100852.
323. Iswandi, C.P., et al., *IGF-1 is not related to long-term outcome in hyperglycemic acute coronary syndrome patients*. *Diab Vasc Dis Res*, 2021. **18**(6): p. 14791641211047436.
324. Samak, M., et al., *Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis*. *Med Sci Monit Basic Res*, 2016. **22**: p. 75-9.
325. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. *EMBO J*, 2000. **19**(23): p. 6341-50.
326. Khan, R.S., et al., *Targeting extracellular DNA to deliver IGF-1 to the injured heart*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 4257.
327. Condorelli, G., et al., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(19): p. 12333-8.
328. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
329. Sesti, G., et al., *Plasma concentration of IGF-I is independently associated with insulin sensitivity in subjects with different degrees of glucose tolerance*. *Diabetes Care*, 2005. **28**(1): p. 120-5.
330. Moses, A.C., et al., *Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes*. *Diabetes*, 1996. **45**(1): p. 91-100.
331. Troncoso, R., et al., *New insights into IGF-1 signaling in the heart*. *Trends Endocrinol Metab*, 2014. **25**(3): p. 128-37.

332. Kubo, H., et al., *Insulin-like growth factor-1 levels are associated with high comorbidity of metabolic disorders in obese subjects; a Japanese single-center, retrospective-study*. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): p. 20130.
333. Niu, W., et al., *The correlation between insulin-like growth factor 1 and left ventricular mass index in obese children*. *BMC Endocr Disord*, 2025. **25**(1): p. 99.
334. Bailey-Downs, L.C., et al., *Growth hormone and IGF-1 deficiency exacerbate high-fat diet-induced endothelial impairment in obese Lewis dwarf rats: implications for vascular aging*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2012. **67**(6): p. 553-64.
335. Andrade, D., et al., *Insulin-like growth factor-1 short-period therapy improves cardiomyopathy stimulating cardiac progenitor cells survival in obese mice*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020. **30**(1): p. 151-161.
336. Huynh, K., et al., *Cardiac-specific IGF-1 receptor transgenic expression protects against cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in a mouse model of diabetic cardiomyopathy*. *Diabetes*, 2010. **59**(6): p. 1512-20.
337. AsghariHanjani, N. and M. Vafa, *The role of IGF-1 in obesity, cardiovascular disease, and cancer*. *Med J Islam Repub Iran*, 2019. **33**: p. 56.
338. O'Connor, R., C. Fennelly, and D. Krause, *Regulation of survival signals from the insulin-like growth factor-1 receptor*. *Biochem Soc Trans*, 2000. **28**(2): p. 47-51.
339. Yan, J., et al., *Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity*. *Circulation*, 2009. **119**(21): p. 2818-28.
340. Brassard, P., et al., *Impaired plasma nonesterified fatty acid tolerance is an early defect in the natural history of type 2 diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(3): p. 837-44.
341. Sahraoui, A., et al., *High fat diet altered cardiac metabolic gene profile in *Psammomys obesus* gerbils*. *Lipids Health Dis*, 2020. **19**(1): p. 123.
342. Kim, G., et al., *Visceral adiposity is associated with altered myocardial glucose uptake measured by (18)FDG-PET in 346 subjects with normal glucose tolerance, prediabetes, and type 2 diabetes*. *Cardiovasc Diabetol*, 2015. **14**: p. 148.
343. Nielsen, R., et al., *Heart failure patients with prediabetes and newly diagnosed diabetes display abnormalities in myocardial metabolism*. *J Nucl Cardiol*, 2018. **25**(1): p. 169-176.
344. Rohm, M., et al., *Cardiac Dysfunction and Metabolic Inflexibility in a Mouse Model of Diabetes Without Dyslipidemia*. *Diabetes*, 2018. **67**(6): p. 1057-1067.
345. Li, W., et al., *Profile of cardiac lipid metabolism in STZ-induced diabetic mice*. *Lipids Health Dis*, 2018. **17**(1): p. 231.
346. Brosius, F.C., 3rd, et al., *Persistent myocardial ischemia increases GLUT1 glucose transporter expression in both ischemic and non-ischemic heart regions*. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**(6): p. 1675-85.
347. Crewe, C., M. Kinter, and L.I. Szweda, *Rapid inhibition of pyruvate dehydrogenase: an initiating event in high dietary fat-induced loss of metabolic flexibility in the heart*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77280.
348. Campbell, F.M., et al., *A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(6): p. 4098-103.
349. Watanabe, K., et al., *Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22293-9.

350. Buchanan, J., et al., *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5341-9.
351. Liu, B., et al., *Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons*. *Circ Res*, 1996. **79**(5): p. 940-8.
352. Lopaschuk, G.D., R.B. Wambolt, and R.L. Barr, *An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993. **264**(1): p. 135-44.
353. Mazer, C.D., et al., *Myocardial metabolism during hypoxia: maintained lactate oxidation during increased glycolysis*. *Metabolism*, 1990. **39**(9): p. 913-8.
354. Heggermont, W.A., et al., *Metabolic support for the heart: complementary therapy for heart failure?* *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(12): p. 1420-1429.
355. Berthiaume, J.M., et al., *Normalizing the metabolic phenotype after myocardial infarction: impact of subchronic high fat feeding*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **53**(1): p. 125-33.
356. Inserte, J., et al., *High-fat diet improves tolerance to myocardial ischemia by delaying normalization of intracellular PH at reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 2019. **133**: p. 164-173.
357. Hidaka, S., et al., *Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart*. *Diabetes*, 1999. **48**(2): p. 430-5.
358. Young, M.E., et al., *Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) in the adult rodent heart*. *FASEB J*, 2001. **15**(3): p. 833-45.
359. Boudina, S., et al., *Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins*. *Diabetes*, 2007. **56**(10): p. 2457-66.
360. Yu, L., et al., *Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics*. *J Bioenerg Biomembr*, 2014. **46**(1): p. 33-44.
361. Luptak, I., et al., *Decreased ATP production and myocardial contractile reserve in metabolic heart disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2018. **116**: p. 106-114.
362. Green, K., M.D. Brand, and M.P. Murphy, *Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S110-8.
363. Ozcan, C., et al., *Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **304**(9): p. H1192-200.
364. Safari, F., et al., *Differential expression of cardiac uncoupling proteins 2 and 3 in response to myocardial ischemia-reperfusion in rats*. *Life Sci*, 2014. **98**(2): p. 68-74.
365. Gong, D.W., et al., *Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16251-7.
366. Essop, M.F., et al., *Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **314**(2): p. 561-4.
367. Kutsche, H.S., et al., *Alterations in Glucose Metabolism During the Transition to Heart Failure: The Contribution of UCP-2*. *Cells*, 2020. **9**(3).
368. Li, N., et al., *The role of uncoupling protein 2 in the apoptosis induced by free fatty acid in rat cardiomyocytes*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. **55**(2): p. 161-7.

369. Somoza, B., et al., *Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity in mice*. *Endocrinology*, 2007. **148**(3): p. 924-31.
370. Alrefaie, Z., et al., *Uncoupling proteins: are they involved in vitamin D3 protective effect against high-fat diet-induced cardiac apoptosis in rats?* *Arch Physiol Biochem*, 2022. **128**(2): p. 438-446.
371. Frangogiannis, N.G., *Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(2): p. 635-88.
372. Thakker, G.D., et al., *Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(5): p. H2504-14.
373. Greer, J.J., D.P. Ware, and D.J. Lefer, *Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H146-53.
374. Cavalera, M., J. Wang, and N.G. Frangogiannis, *Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities*. *Transl Res*, 2014. **164**(4): p. 323-35.
375. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration*. *Cell Tissue Res*, 2016. **365**(3): p. 563-81.
376. French, B.A. and J.W. Holmes, *Implications of scar structure and mechanics for post-infarction cardiac repair and regeneration*. *Exp Cell Res*, 2019. **376**(1): p. 98-103.
377. Peng, X., J. Du, and Y. Wang, *Metabolic signatures in post-myocardial infarction heart failure, including insights into prediction, intervention, and prognosis*. *Biomed Pharmacother*, 2024. **170**: p. 116079.
378. Brand, M.D., et al., *Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(6): p. 755-67.
379. Edwards, K.S., et al., *Uncoupling protein 3 deficiency impairs myocardial fatty acid oxidation and contractile recovery following ischemia/reperfusion*. *Basic Res Cardiol*, 2018. **113**(6): p. 47.
380. Gross, G.J. and J.A. Auchampach, *Reperfusion injury: does it exist?* *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(1): p. 12-8.

6 Anhang

6.1 Weitere Darstellung der Genexpressionsanalysen

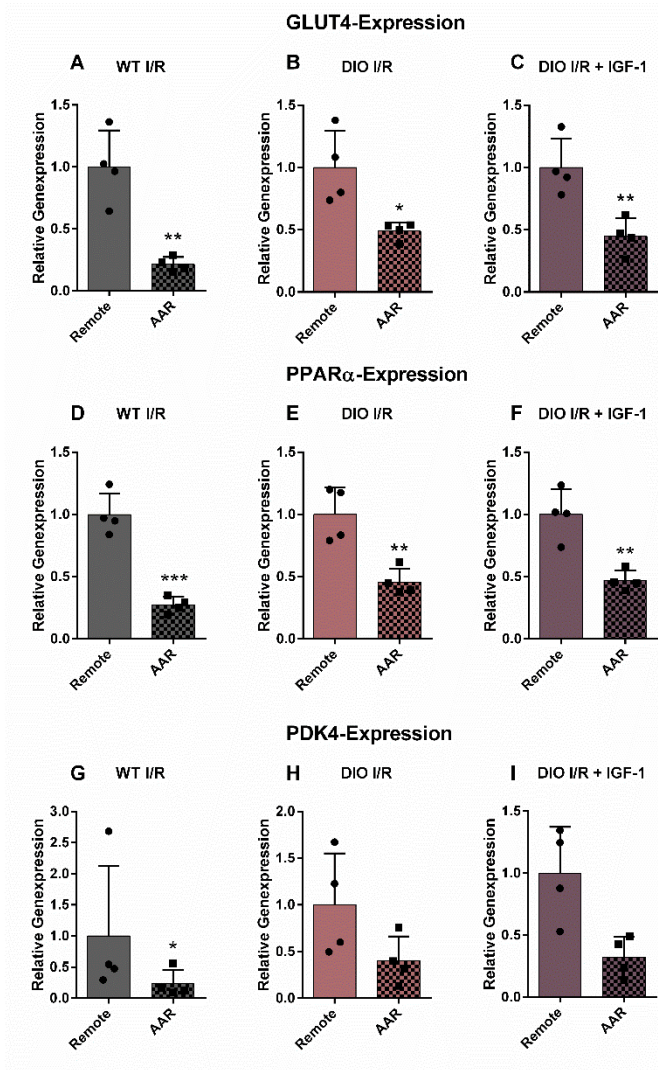


Abb. 6.1: Darstellung der relativen Genexpression von GLUT4, PPAR α und PDK4 im *Remote* und AAR nach I/R. Es wurden WT- und DIO-Herzen im Alter von 18 Wochen 3 Tage nach I/R entnommen und eine Gewebeprobe aus dem Bereich des *Remotes* und der AAR herauspräpariert. Dabei erhielt eine DIO-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Infarkt eine IGF-1-Behandlung. Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte, relative Genexpression (*Fold change*) eines jeden Genes, die im Verhältnis zum Referenzgen NUDC berechnet wurde. Dabei wurde jeweils die gemessene Expression im *Remote*-Gewebe mit der in der AAR einer jeden Gruppe verglichen und die Mittelwerte des *Remotes* auf 1 normalisiert. (A-I) Im infarzierten Gewebe konnte in allen drei Gruppen (WT I/R, DIO I/R und DIO I/R + IGF-1) für alle untersuchten Gene eine geringere Expression verglichen zum *Remote*-Gewebe beobachtet werden. (n = 4). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *unpaired two-tailed Student's t-Test*, wobei: * = p-Wert < 0,05, ** = p-Wert < 0,01 und *** = p-Wert < 0,001 als signifikant gewertet wurde.

7 Danksagung

Viele Menschen haben in unterschiedlichster Form zu dieser Arbeit beigetragen. So möchte ich mich zuerst bei Prof. Dr. Axel Gödecke für die Möglichkeit der Promotion bedanken. Du hast mir stets mit deinem Wissen und deiner Erfahrung geholfen und mir neue Denkansätze gegeben. Vor allem aber danke ich dir für die stets geöffnete Tür und die intensive, freundliche und engagierte Betreuung insbesondere im letzten Abschnitt meiner Arbeit, was ich sehr wertschätze.

Frau Prof. Dr. Judith Haendeler möchte ich für die Co-Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Ein großer Dank gilt Dr. André Sychala für die Mitbetreuung meiner Arbeit. Du hast mir alles mit großer Geduld erklärt und mir bei allen technischen Fragen und Computerproblemen geholfen. So bedanke ich mich auch bei dir und Dr. André Heinen für die Durchführung der Operationen und Echokardiographien der Mäuse, ohne die meine Versuche nicht möglich gewesen wären. Du hast mich immer motiviert nicht aufzugeben und in den richtigen Momenten gesagt: „Alles wird gut“. Auch nach deiner Zeit im Institut konnte ich mich bei Fragen an dich wenden, was ich nicht als selbstverständlich ansehe.

Die Zeit im Labor habt insbesondere ihr, Sophia und Nils, so abwechslungsreich gemacht. Auch wenn es vielleicht nicht immer ganz produktiv war, haben wir in unserer Dreierreihe im Büro viel gelacht aber uns auch gegenseitig unterstützt. Danke dafür!

Für die Einarbeitung im Labor, die Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre möchte ich mich vor allem bei Daniela, Julia und Selina, aber auch dem gesamten Team des Instituts bedanken. Sandra Berger und Janett Schindler danke ich für die organisatorische Hilfe meiner Promotion.

Zum Schluss danke ich meinen Eltern und meinem Mann Sven für die ständige Frage nach dem Stand meiner Promotion. Ihr habt mich motiviert weiterzumachen. Ohne euch und eure Unterstützung, insbesondere bei der Betreuung von Fiete, hätte ich die Arbeit nicht fertig stellen können, auch wenn ich leider keine „Frau Dr. Zimmerhofer“ mehr geworden bin. Und danke Fiete, dass du meist so friedlich geschlafen hast, während ich abends am Schreibtisch saß.