Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss körperlichen Übergewichts auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und die kardialen Umbauprozesse nach experimenteller Myokardischämie

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eva Sabine Bremen
aus
Bonn

Göttingen 2011

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. K. Schäfer
II. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. R. Seipelt
Tag der mündlichen Prüfung:	19. Oktober 2011

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **IV**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Herzinsuffizienz **1**

1.2 Myokardiale Hypertrophie **2**

1.3 Adipositas als kardiovaskulärer Risikofaktor **3**

1.3.1 Adipositas und kardiale Hypertrophie 5

1.3.2 Adipositas, Atherosklerose und Myokardischämie 6

1.4 Molekularbiologische Veränderungen bei Myokardhypertrophie **8**

1.4.1 Einfluss des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT auf kardiale Parameter 10

1.5 Fragestellung **11**

2 MATERIAL UND METHODEN **13**

2.1 Verwendete Materialien und Geräte **13**

2.1.1 Reagenzien 13

2.1.2 Geräte und Programme 15

2.1.3 Materialien 15

2.1.4 Puffer und Lösungen 16

2.1.4.1 Gewebefärbungen 16

2.1.4.2 Proteinnachweis 16

2.2 Untersuchungen im Tiermodell **17**

2.2.1 Versuchsablauf 17

2.2.2 Echokardiographische Bestimmung von Herzfunktion und -dimensionen 19

2.2.3 Experimentelle Induktion eines Myokardinfarkts 21

2.2.4 Gewebeentnahme 22

2.2.5 Genehmigung der Studie 24

2.3 Messungen im Serum **24**

2.3.1 Bestimmung von Nüchtern-Glukose im Serum 24

2.3.2 Bestimmung von Nüchtern-Insulin und -Leptin im Serum 25

2.4 Histologische Analyse des Herzgewebes **25**

2.4.1 Erstellung von Gefrierschnitten 25

2.4.2 Histologische Untersuchungen 26

2.4.2.1 Postfixation 26

2.4.2.2 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin 26

2.4.2.3 Masson-Trichrom-Färbung zur Detektion von Fibrose 27

2.4.2.4 Pikro-Sirius-Rot-Färbung zum Nachweis von Kollagen 27

2.4.2.5 Öl-Rot-O zur Beurteilung von Fetteinlagerung 28

2.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen 28

2.4.3.1 Allgemeines Färbeprotokoll der CD31-, CD45-, CD68-Färbung 28

2.4.3.2 Spezifische Immunfärbeprotokolle 29
2.4.3.3 Auswertung 31

2.5 Proteinnachweis 32
2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese....32
2.5.1.1 Proteinvorbereitung....32
2.5.1.2 Vorbereitung und Gießen der Gele 33
2.5.1.3 Probenvorbereitung....33
2.5.1.4 Gelbeladung und Lauf 33
2.5.2 Western Blot 34
2.5.3 Antigen-Detektion....34
2.5.4 Entwicklung 34
2.5.5 Stripping 35
2.5.6 Immunpräzipitation....35
2.5.7 Verwendete Antikörper 36
2.5.8 Auswertung....36

2.6 Statistische Auswertung....37

3 ERGEBNISSE 38

3.1 Auswirkungen von Übergewicht auf die kardiale Hypertrophie der Maus....38
3.1.1 Einfluss von Hochfettdiät auf Körpergewicht und metabolische Serumparameter der Maus...38
3.1.1.1 Körper- und Fettgewicht....38
3.1.1.2 Messungen im Serum....39
3.1.2 Einfluss von Übergewicht auf kardiale Parameter der Maus 40
3.1.2.1 Echokardiographie 40
3.1.2.2 Größenveränderungen des Kardiomyozyten....41
3.1.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen....42

3.2 Auswirkungen von Übergewicht auf die myokardialen Umbauvorgänge nach Ischämie 44
3.2.1 Sterblichkeit 44
3.2.2 Herzgewicht und Infarktgröße....45
3.2.3 Echokardiographie 47
3.2.4 Messungen im Serum 48
3.2.5 Histologische Untersuchungen....49
3.2.5.1 Intrazelluläre Fetteinlagerung des Kardiomyozyten....49
3.2.5.2 Kardiale Kollagenablagerung 49
3.2.5.3 Zahl inflammatorischer Zellen 50
3.2.5.4 Kardiale Apoptose 51
3.2.5.5 Kardiale Angiogenese....51
3.2.6 Molekularbiologische Untersuchungen 52
3.2.6.1 Phosphorylierung des IRS-1 52
3.2.6.2 Phosphorylierung der PI3K1A 53
3.2.6.3 Phosphorylierung der AKT....53

4 DISKUSSION....54

4.1 Einfluss von Übergewicht auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie 55
4.1.1 Induktion von Übergewicht am Modell der weiblichen C57BL/6-Maus....55
4.1.2 Übergewicht führt zu Leptin- und Insulinresistenz 56
4.1.3 Übergewicht führt zu konzentrischer kardialer Hypertrophie....57

4.2 Einfluss von Übergewicht auf die kardialen Umbauvorgänge nach Ischämie....59

4.2.1 Induktion eines Myokardinfarkts am Modell der weiblichen C57BL/6-Maus 59
4.2.2 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße 60
4.2.3 Übergewicht und kardialer Insult führen zu beginnender Insulinresistenz 61
4.2.4 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die kardiale Inflammation nach Myokardinfarkt.....61
4.2.5 Übergewicht hat keinen Einfluss auf kardiale Apoptoseraten nach Myokardinfarkt 62
4.2.6 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die kardiale Angiogenese nach Myokardinfarkt.....63
4.2.7 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Proteine IRS, PI3K & AKT nach Induktion eines Myokardinfarkts 64
4.2.8 Übergewicht verhindert eine reaktive Hinterwandhypertrophie nach Vorderwandinfarkt 65

4.3 Einfluss von Übergewicht auf das Überleben nach Myokardinfarkt 66

4.4 Limitationen der Arbeit.....68

4.5 Ausblick 69

5 ZUSAMMENFASSUNG 70

6 LITERATURVERZEICHNIS 71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AKT	Proteinkinase B
aqua dest.	destilliertes Wasser
Area d	Fläche, die das linksventrikuläre Endokard umschreibt, in Diastole
Area s	Fläche, die das linksventrikuläre Endokard umschreibt, in Systole
AWThd	linksventrikuläre Vorderwanddicke, in Diastole
AWThF	Verdickungsfraktion der Vorderwand
AWThs	linksventrikuläre Vorderwanddicke, in Systole
BCA	*bicinchoninic acid*
BMI	*Body–Mass–Index*
BSA	bovines Serumalbumin
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4′,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Epi	Fläche, die das linksventrikuläre Epikard umschreibt, in Systole
FAS	linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion
fat-pad	abdominelles Fettdepot
FS	linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HF	Herzfrequenz
HFD	Versuchsgruppe: Hochfettdiät
HFD MI	Versuchsgruppe: Hochfettdiät, Myokardinfarkt
HFD S	Versuchsgruppe: Hochfettdiät, *sham*-OP
HW	linksventrikuläre Masse
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL-8	Interleukin-8
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
KD	Kontrollgruppe
KD MI	Versuchsgruppe: Kontrolldiät, Myokardinfarkt
KD S	Kontrollgruppe: Kontrolldiät, *sham*-OP
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	linke deszendierende Herzkranzarterie
long axis d	Strecke Aortenklappe bis Herzspitzenendokard, in Diastole
long axis s	Strecke Aortenklappe bis Herzspitzenendokard, in Systole
LVIDd	linksventrikulärer Durchmesser, in Diastole
LVIDs	linksventrikulärer Durchmesser, in Systole

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MI	Myokardinfarkt
NaOH	Natronlauge
NGS	normales Ziegenserum
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OP	Operation
p101	katalytische Untereinheit der PI3K1B
p110	katalytische Einheit der PI3K
p84	regulatorische Untereinheit der PI3K1B
p85	regulatorische Untereinheit der PI3K1A
$p87^{PIKAP}$	regulatorische Untereinheit der PI3K1B
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, 1x in aqua dest.
PDK-1	PIP_3-abhängige Kinase 1
PDK-2	PIP_3-abhängige Kinase 2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3K1A	PI3K der Klasse 1A
PI3K1B	PI3K der Klasse 1B
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PWThd	linksventrikuläre Hinterwanddicke, in Diastole
PWThF	Verdickungsfraktion der Hinterwand
PWThs	linksventrikuläre Hinterwanddicke, in Systole
RISK	*reperfusion injury salvage kinase*
RT	Raumtemperatur
RWT	relative Wanddicke
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SERCA	Kalziumpumpe des sarko- & endoplasmatischen Retikulums
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TdT	Terminaldesoxyribonukleotidyltransferase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TUNEL	*TdT-mediated dUTP nick end labeling*
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
Vol d	Volumen, in Diastole
Vol s	Volumen, in Systole
WGA	Weizenkeimlektin
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtungen

1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Hauptursache von Morbidität und Mortalität in Deutschland und Europa dar (KLEIN L et al. 2003). Zu ihnen zählen chronische Leiden wie Herzinsuffizienz und arterielle Hypertonie genau wie akute Ereignisse, beispielsweise ein Myokardinfarkt. Knapp 42% der Todesfälle in Deutschland im Jahr 2009 wurden durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010c), davon waren allein 20% auf eine koronare Herzerkrankung (KHK) und 13% auf eine Herzinsuffizienz zurückzuführen (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010b). Die Lebenszeitprävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist hoch, für die Herzinsuffizienz liegt diese in Deutschland bei mehr als 4% (STATISTISCHES BUNDESAMT 2004).

1.1 Herzinsuffizienz

Die *American Heart Association* (AHA) definiert die Herzinsuffizienz als ein klinisches Syndrom, das aus jeder strukturellen oder funktionellen kardialen Störung entstehen kann, die die Fähigkeit des Ventrikels, sich mit Blut zu füllen oder dieses auszustoßen, einschränkt. Hieraus resultieren klinisch Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention, die zu pulmonalen (Linksherzinsuffizienz) und peripheren (Rechtsherzinsuffizienz) Ödemen führen kann (HUNT 2005).

Schätzungen zufolge leiden in Deutschland ungefähr 1,8 Millionen Menschen an einer Herzinsuffizienz, jährlich kommen zirka 300 000 Neuerkrankungen hinzu (ZUGCK et al. 2010). Unter den Sterbefällen in Deutschland im Jahr 2009 betrug die Anzahl der Patienten mit einer diagnostizierten Herzinsuffizienz knapp 50 000 (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010b). Auch in den letzten Jahren lag die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich bei ca. 40% (GOLDBERG et al. 2007). Damit bleibt die durch Herzinsuffizienz verursachte Mortalität trotz zahlreicher Fortschritte in Diagnose und Therapie weiterhin hoch.

Klinische Studien belegen die Bedeutung der arteriellen Hypertonie und der sich infolgedessen entwickelnden myokardialen Hypertrophie für das spätere Auftreten einer Herzinsuffizienz (LEVY et al. 1990). Auch die ischämische Kardiomyopathie auf dem Boden nicht-tödlicher Myokardinfarkte konnte bei Männern in 34% und bei Frauen in 13% der Fälle als Ursache einer Herzinsuffizienz identifiziert werden (BOURASSA et al. 1993; KANNEL 2000).

1.2 Myokardiale Hypertrophie

Die Hypertrophie des Myokards stellt zunächst einen notwendigen kardialen Kompensationsmechanismus bei Herzinsuffizienz dar. Sie ist definiert als eine durch Zellwachstum bedingte Organvergrößerung (LORELL und CARABELLO 2000), welche vor allem Kardiomyozyten, aber auch kardiale Fibroblasten, das Koronargefäßsystem und die extrazelluläre Matrix umfasst. Die myokardiale Hypertrophie wird echokardiographisch bestimmt und stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar (LEVY et al. 1990). Laut klinischen Studien ist sie mit einer erhöhten unspezifischen Mortalität (COOPER RS et al. 1990) sowie mit einem erhöhtem Risiko für den plötzlichen Herztod (ARONOW et al. 1988; HAIDER et al. 1998) assoziiert.

Ursache für eine Myokardhypertrophie können physiologische oder pathologische Veränderungen sein. Die physiologische Hypertrophie ist gekennzeichnet durch erhaltene kontraktile Funktion, fehlende interstitielle Fibrose und komplette Reversibilität (SHIOJIMA et al. 2005), eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz ist nicht bekannt (LORELL und CARABELLO 2000). Zu den Ursachen dieser Hypertrophieform zählen kindliches Wachstum, Schwangerschaft und körperliches Training. Pathologische Hypertrophieformen werden dagegen durch biomechanischen (z. B. bei arterieller Hypertonie oder Myokardinfarkt) oder neurohumoralen Stress (z. B. bei übermäßiger Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems) ausgelöst. Sie sind charakterisiert durch metabolische, strukturelle und funktionelle Umbauvorgänge des Herzens. Durch eine vermehrte Kollagenbildung erhöht sich die Wanddicke (MEDUGORAC 1980). Hierdurch steigert sich die Ventrikelrigidität, was in der Folge zu einer schlechteren Ventrikeldehnung und -füllung führt. Weiterhin finden sich pathologische Veränderungen des myokardialen Glukosemetabolismus, der Kalziumverwertung und der Kontraktilität, sowie am Ende der Verlust von Kardiomyozyten und ihr fibrotischer Ersatz. Die Folge sind eine systolische bzw. diastolische Dysfunktion und Arrhythmien (BERENJI et al. 2005).

Als Risikofaktor für die Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie gilt vor allem die arterielle Hypertonie (FROHLICH et al. 1992). In Experimenten mit Ratten konnte durch die medikamentöse Behandlung der Hypertonie ein Rückgang der Hypertrophie erzielt werden, wodurch der kausale Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und kardialer Hypertrophie weiter verdeutlicht wird (SEN und TARAZI 1983). Auf die Bedeutung von Adipositas für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie soll in Kap. 1.3.1 näher eingegangen werden.

Kardiale Hypertrophie wird unterschieden in konzentrische und exzentrische Hypertrophie (FROHLICH et al. 1992). Konzentrische Hypertrophie entsteht durch zu hohen Druck innerhalb des Ventrikels. Als Reaktion werden Sarkomere gebildet, die parallel zu den bereits vorhandenen angeordnet sind, sodass sich vornehmlich die Zellbreite erhöht (s. Abb. 1.1). Dadurch verdicken sich Ventrikelwand und Septum unter Inkaufnahme eines geringeren intraventrikulären Volumens, während sich die Kraftentwicklung des Herzens steigert. Dagegen entsteht die exzentrische, dilatative Hypertrophie durch eine übermäßige Dehnung des Ventrikels aufgrund einer zu hohen Volumenbelastung. Die neugebildeten Sarkomere werden hier in Reihe angeordnet. Dies mündet in einer Verlängerung der Kardiomyozyten und führt zu einer Dilatation des Ventrikels bei gleichzeitiger Kontraktilitätsminderung (GROSSMAN et al. 1975; CARABELLO 2002).

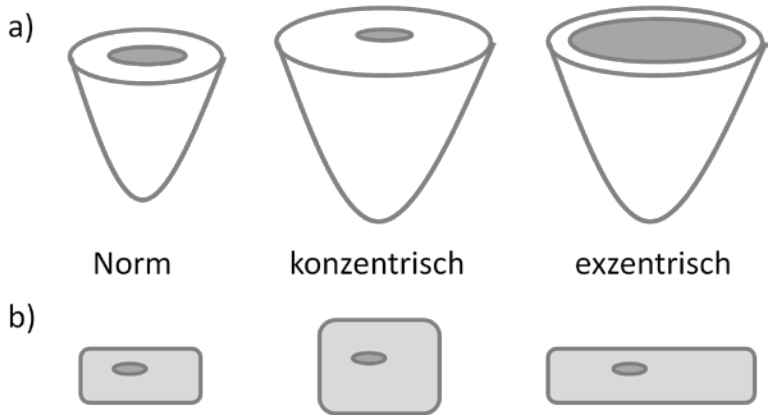

Abb. 1.1 Konzentrische und exzentrische Hypertrophie: a) Schema des Herzens. Abb. modifiziert nach FROHLICH et al. (1992), S. 999. **b) Schema des Kardiomyozyten.** Abb. modifiziert nach HUNTER und CHIEN (1999), S. 1277.

1.3 Adipositas als kardiovaskulärer Risikofaktor

Wie bereits oben erwähnt, gilt Adipositas als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie (DE SIMONE et al. 1994; AVELAR et al. 2007).

Sie ist definiert durch einen erhöhten Anteil der Fettmasse am Körpergewicht. Als erhöht gilt dieser Fettanteil bei Frauen ab 30%, bei Männern ab 20% (HEROLD 2009). Die Abschätzung gelingt mithilfe des *Body–Mass–Index* (BMI), der als Quotient aus ‚Körpergewicht' und ‚Körpergröße zum Quadrat' berechnet wird. Als normgewichtig gelten Personen mit einem BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2, als adipös Menschen mit einem BMI über 30 kg/m^2. Die genaue Einteilung ist in Tab. 1.1 dargestellt (WHO 2010).

Etwa 95% der Patienten leiden an primären Formen der Adipositas. Zu diesen zählen eine durch Überernährung, körperliche Inaktivität oder psychische Faktoren bedingte Adipositas

sowie verschiedene genetisch bedingte Varianten (z. B. Prader-Willi-Syndrom). Als sekundäre Adipositas werden Formen bezeichnet, die entweder endokrinologisch begründet (z. B. Morbus Cushing, Hypothyreose) oder aber zentral bedingt sind (z. B. durch Hirntumoren) (HEROLD 2009).

Normalgewicht	18,5 – 24,9 kg/m^2
Übergewicht; Präadipositas	25,0 – 29,9 kg/m^2
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9 kg/m^2
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9 kg/m^2
Adipositas Grad III	> 40 kg/m^2

Tab. 1.1 Abschätzung der Adipositas über den BMI. Diese Tabelle schließt die asiatische Bevölkerung nicht ein, für diese wurden andere Grenzen definiert.

Die Prävalenz der Adipositas ist in den westlichen Industrieländern hoch, steigt jedoch in den letzten Jahren nur noch langsam an. Die Prävalenz der übergewichtigen deutschen Erwachsenen betrug 2009 36,7%, die der Adipösen 14,7%. Dabei steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010a).

Altersgruppe	**Geschlecht**	***Body–Mass–Index* (kg / m^2)**				
		Ø	**< 18,5**	**18,5 - 25**	**25 - 29,9**	**> 30**
alle	Beide	25,7	2,1	46,5	36,7	14,7
	♂	26,3	0,7	39,2	44,4	15,7
	♀	24,9	3,4	53,7	29,1	13,8
18 - 39 Jahre	Beide	24,2	3,9	62,2	25,8	8,1
	♂	25,0	1,5	55,9	33,5	9,1
	♀	23,1	6,6	69,0	17,5	6,9
40 - 65 Jahre	Beide	26,2	1,3	42,5	39,5	16,7
	♂	27,0	0,4	32,8	48,8	18,5
	♀	25,3	2,2	52,7	30,2	14,9
> 65 Jahre	Beide	26,7	1,4	35,2	44,5	19,0
	♂	27,1	0,5	29,0	51,3	19,2
	♀	26,3	2,0	40,1	39,0	18,9

Tab. 1.2 Verteilung der Bevölkerung auf *Body–Mass–Index*-Gruppen 2009 in Prozent in Deutschland. Zum Vergleich: 2003 betrug der Anteil übergewichtiger Erwachsener 36,3%, der adipöser Erwachsener 12,9%. Abb. modifiziert nach (STATISTISCHES BUNDESAMT 2010a).

Obwohl die Adipositas nicht als eigenständiges Krankheitsbild gilt, stellt sich ihr Krankheitswert vor allem durch die von ihr verursachten Folgeerkrankungen dar. Eine Komplikation der Adipositas bildet das sogenannte Metabolische Syndrom, welches als das gemeinsame Auftreten von stammbetonter Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, essenzieller Hypertonie und Glukosetoleranzstörung definiert wird.

Adipositas ist außerdem mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (STEVENS et al. 2002) und gilt als Risikofaktor für ventrikuläre Dysfunktion, kardiale Arrhythmien,

KHK, Schlaganfall und das Schlafapnoe-Syndrom (KLEIN S et al. 2004). DOLL et al. konnten eine lineare Verbindung zwischen dem Ausmaß der Adipositas und einer Blutdrucksteigerung zeigen (DOLL et al. 2002). Die Mechanismen der adipositasassoziierten Hypertonie sind noch nicht endgültig geklärt, diskutiert werden unter anderem eine vermehrte Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Systems sowie erhöhte Leptinspiegel im Blut (SCHORR et al. 1998; AIZAWA-ABE et al. 2000; MASUO et al. 2000; EMDIN et al. 2001). Auf die Bedeutung der Adipositas in Bezug auf die kardiale Hypertrophie soll im folgenden Kapitel eingegangen werden. Die Adipositas stellt einen Risikofaktor für die Entstehung einer Herzinsuffizienz dar und beeinflusst diese ungünstig (KENCHAIAH et al. 2002). Pro 5 BMI-Punkte erhöhte sich in einer prospektiven Studie an zirka 50 000 Norwegern die durch Herzinsuffizienz bedingte Mortalität um 30% (SELMER und TVERDAL 1995). Neben der spezifischen erhöht sich auch die allgemeine Mortalität durch Adipositas (CALLE et al. 1999; SINGH et al. 1999).

1.3.1 Adipositas und kardiale Hypertrophie

Adipositas gilt als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie (LAUER et al. 1991; WONG et al. 2004).

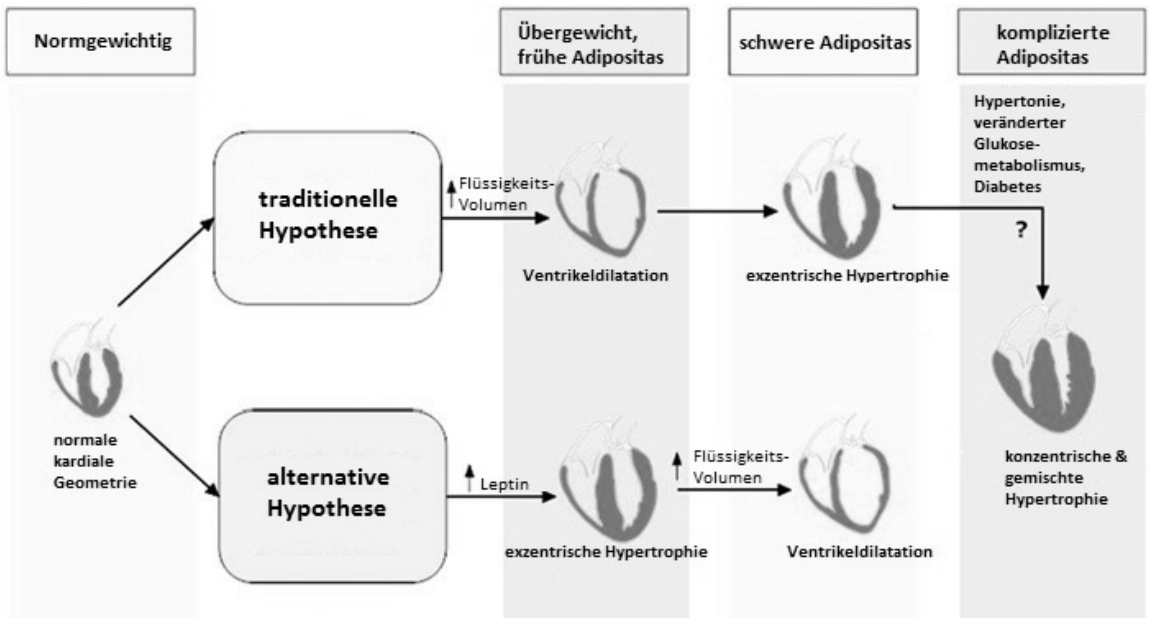

Abb. 1.2 Hypertrophieentstehung bei Adipositas. Verschiedene Hypothesen. Abb. modifiziert nach ASHRAFIAN et al. (2011), S. 172.

In klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Adipositas und sowohl konzentrischer als auch exzentrischer Hypertrophie gezeigt werden. Nach der sog. traditionellen Hypothese (s. Abb. 1.2) steht am Beginn der kardialen Reaktion auf das

vermehrte Körpergewicht eine gesteigerte Ejektionsfraktion (EF) des Herzens. Zu beobachten ist eine physiologische kompensatorische Steigerung der systolischen Herzfunktion. Durch die bei Adipositas erhöhte Volumenbelastung des Herzens folgt jedoch eine Dilatation des Ventrikels. Der Druck auf die Ventrikelwand erhöht sich und resultiert in kompensatorischer exzentrischer Hypertrophie. Das Ausmaß dieser pathologischen diastolischen Dysfunktion ist dabei abhängig vom Grad der Adipositas (ALPERT 2001; PASCUAL et al. 2003; WONG et al. 2004).

Durch die häufig parallel vorliegenden Komorbiditäten – wie zum Beispiel die arterielle Hypertonie – entstehen hier allerdings auch Mischformen mit konzentrischen Hypertrophiearten. So konnte gezeigt werden, dass Frauen, die an Adipositas und Hypertonie erkrankt sind, vermehrt eine konzentrische Hypertrophie ausbilden (KUCH et al. 1998). Alternative Ansätze schreiben anderen häufig mit Adipositas assoziierten Faktoren wie einem erhöhten Flüssigkeitsvolumen (ALEXANDER et al. 1962), verstärkt aktiviertem Renin-Angiotensin-System (COOPER R et al. 1997; MAZZOLAI et al. 1998) oder erhöhten Leptinspiegeln (ZEIDAN et al. 2008), einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie zu. Wiederum andere Hypothesen argumentieren, dass Adipositas mit einer geringgradigen, chronischen systemischen Inflammation einhergeht, welche die kardiale Funktion ungünstig beeinflusst (LEE YH und PRATLEY 2005). Adipositas ist mit erhöhten Spiegeln von proinflammatorischen Markern, wie dem C-reaktiven Protein (CRP) oder dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), assoziiert, und es konnte gezeigt werden, dass die Interleukin-6-Spiegel im Blut direkt mit dem Grad der Adipositas bei jungen Erwachsenen korrelieren (PICKUP und CROOK 1998; VOZAROVA et al. 2001). Aus diesen Beobachtungen resultiert die Hypothese, dass Inflammation zumindest teilweise mitverantwortlich für die durch Adipositas verursachten kardialen Folgeschäden ist.

1.3.2 Adipositas, Atherosklerose und Myokardischämie

Adipositas gilt als Risikofaktor für Koronarsklerose und Myokardinfarkt (MANSON et al. 1990).

Atherosklerose ist definiert als eine chronisch fortschreitende entzündliche Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien. Die zunehmende Akkumulation von Lipiden, glatten Gefäßmuskelzellen, Leukozyten und fibrösem Material in der Gefäßwand gehört zu den Charakteristika der Atherosklerose (LIBBY 2002).

Die Initialläsion der Artheroskleroseentstehung stellt eine intimale Lipidakkumulation dar (STARY et al. 1995). Durch strukturelle Modifikationen, denen das *low density lipoprotein* in der Intima unterliegt, werden Endothelzellen angeregt, Adhäsionsmoleküle, Chemotaxine und Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Hierdurch angelockte Leukozyten – vor allem Monozyten – wandern in die Intima ein und differenzieren dort zu Schaumzellen, welche makroskopisch wegen ihres beträchtlichen Lipidgehalts als *fatty streaks* imponieren. Letztlich geht die Schaumzelle an dieser Lipidaufnahme zu Grunde und gibt ihren fettreichen Inhalt zusammen mit den restlichen Zelltrümmern in den Extrazellulärraum ab. In Atheromen sammelt sich dieses Fett, umgeben von einer bindegewebigen, aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärmatrix bestehenden Kapsel. Die Dicke dieser Kapsel bestimmt die Stabilität des Atheroms und damit sein Potential zur Thrombusbildung. Atherosklerotische Plaques mit einer dünnen fibrösen Kappe haben ein hohes Rupturrisiko und werden daher als vulnerabel bezeichnet. Rupturiert das Atherom, entlässt es seinen thrombogenen Inhalt in das Gefäßlumen. Dort bildet sich ein Thrombus, der entweder das Gefäßlumen sofort vollständig verschließen oder aber als Embolus verschleppt werden und später eine arterielle Endstrombahn verlegen kann (STARY et al. 1995). Somit gilt Atherosklerose als wesentliche Ursache des Myokardinfarkts, der in der Mehrzahl der Fälle durch eine KHK verursacht wird.

Dem Infarkt folgen nachstehende Reaktionen: Von ischämischen Kardiomyozyten freigesetzte Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle induzieren die Einwanderung von Immunzellen (vor allem Monozyten). Diese und die aus ihnen differenzierten Makrophagen säubern das infarzierte Gewebe von nekrotischen Kardiomyozyten und aktivieren Myofibroblasten und Endothelzellen zur Bildung von Granulationsgewebe und neuen Blutgefäßen. Bei diesen Prozessen unterliegt der Ventrikel sowohl geometrischen als auch strukturellen Umbauprozessen, dem sogenannten *Remodeling*. Die hier beschriebene Form des *Remodeling* ist pathologisch und führt zur Dysfunktion des Ventrikels (THAKKER et al. 2006). Im nicht-infarzierten Herzgewebe induziert der Myokardverlust eine kompensatorische Hypertrophie.

Während die Mortalität nach Infarkt generell abhängig von der Infarktgröße ist (MILLER et al. 1995), wird sie langfristig auch vom Ausmaß des pathologischen *Remodeling* bestimmt (THAKKER et al. 2006). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Fütterung mit einer Hochfettdiät keinen Einfluss auf die Narbengröße des durch Ischämie und Reperfusion verursachten Infarktes hatte (THIM et al. 2006), sich jedoch auf die dem Infarkt folgende myokardiale Inflammationsreaktion auswirkte (THAKKER et al. 2006). Somit könnte

Übergewicht auch die Umbauprozesse nach Myokardischämie und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit beeinflussen.

1.4 Molekularbiologische Veränderungen bei Myokardhypertrophie

Kardiale Hypertrophie kann über mehrere Signalwege induziert werden. Ein wichtiges Enzym für die Vermittlung einer kardialen Hypertrophie ist die Proteinkinase B (PKB, ab jetzt AKT), welche unter anderem unterhalb des Insulinrezeptors über das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) und die Phosphoinositid-3-Kinase der Klasse 1A (PI3K1A) angeregt wird (SHIOI et al. 2002). Im Zusammenhang mit dem Thema der vorliegenden Arbeit soll hier nur dieser Signalweg (IRS-PI3K1A-AKT) näher beschrieben werden (s. Abb. 1.3).

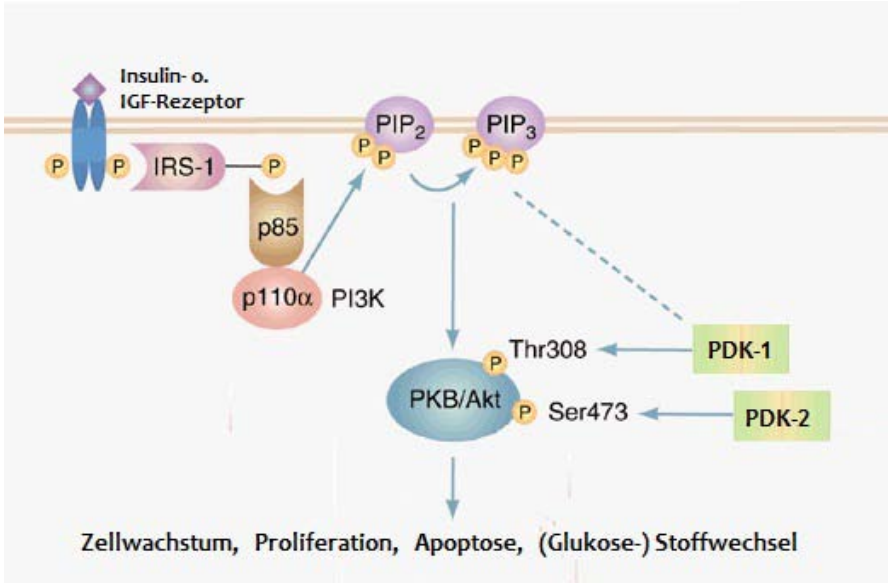

Abb. 1.3 Signalweg über Insulin, IRS, PI3K zur AKT. Abb. modifiziert nach WORKMAN et al. (2006), S. 795.

Der Signaleintritt in die Zelle erfolgt über Membranrezeptoren für Insulin oder insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1 (IGF-1). Die beteiligten Rezeptoren gehören zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (PANDINI et al. 2002). Bindet ein Ligand an den Rezeptor, entwickelt dieser seine Kinaseaktivität und phosphoryliert zunächst eigene Tyrosinreste. Diese dienen als Bindungsstellen für phosphotyrosinbindende intrazelluläre Moleküle wie zum Beispiel IRS (UNIPROT 1988).

IRS ist ein intrazelluläres Protein, das die Verbindung zwischen der Rezeptortyrosinkinase und Proteinen mit SH-Domänen herstellt. Bis heute sind 6 Isoformen des IRS bekannt (LAVAN et al. 1997b; LAVAN et al. 1997a; CAI et al. 2003), die wichtigsten sind IRS-1 und IRS-2 (SUN et al. 1991; SUN et al. 1995). Die Aktivierung erfolgt über die durch eine

Rezeptortyrosinkinase vorgenommene Phosphorylierung von Tyrosinresten. Die so entstandenen Phosphotyrosine bilden Bindungsstellen für Proteine mit SH-2-Domänen. Die Inaktivierung des IRS geschieht über die Phosphorylierung eines Serinrestes, wodurch die Bindung des IRS an den Insulinrezeptor verhindert wird (UNIPROT 1994).

Die PI3K1A ist eines dieser Proteine mit SH-2-Domäne. Sie bindet an aktiviertes IRS und wird durch die damit verbundene Konformationsänderung selbst aktiviert (HERBST et al. 1994). PI3K1A bestehen aus einer regulatorischen (p85 und p55, diese besitzen jeweils SH-2-Domänen) und einer katalytischen (p110) Untereinheit. Die drei Isoformen der katalytischen Einheit sind als α, β und δ klassifiziert. Dabei können alle regulatorischen Untereinheiten an alle katalytischen Untereinheiten binden und eine funktionsfähige PI3K bilden (VANHAESEBROECK und WATERFIELD 1999). Hingegen werden die PI3K der Klasse 1B hauptsächlich durch G_i-Proteine und deren Liganden wie beispielsweise Angiotensin II, Adenosindiphosphat oder Interleukin-8 (IL-8) aktiviert (HAWKINS und STEPHENS 2007). Sie bestehen ebenfalls aus einer katalytischen (p110γ) und einer regulatorischen (p101, p84 und $p87^{PIKAP}$) Untereinheit. Dabei wird die $p87^{PIKAP}$ besonders im Herzen exprimiert und könnte dementsprechend eine wichtige Bedeutung im Rahmen kardialer Hypertrophie einnehmen (SUIRE et al. 2005; VOIGT et al. 2006). Die Aufgabe aller PI3K besteht in der Phosphorylierung von membrangebundenem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) (VANHAESEBROECK und WATERFIELD 1999). Bekannt ist auch eine Transaktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (z. B. des IGF-1-Rezeptors) durch Liganden der G-Proteine, sodass häufig mehrere Klassen der PI3K in die einer Ligandenbindung folgende zelluläre Antwort mit eingebunden sind (DU et al. 1996; ASAKURA et al. 2002).

Das membranständige PIP_3 besitzt Bindedomänen für Proteine mit PH-Domänen, beispielsweise AKT, PIP_3-abhängige Kinase 1 (PDK-1), oder PIP_3-abhängige Kinase 2 (PDK-2) (WHITE 2003).

Es sind drei Isoformen der AKT bekannt, diese werden mit 1, 2 und 3 bezeichnet (O'NEILL und ABEL 2005). Die Aktivierung von AKT erfolgt durch Phosphorylierung eines Threonins an Position 308 durch die PDK-1 (ALESSI et al. 1997). Die Phosphorylierung eines Serins an Position 473 durch die PDK-2 hat eine weitere Aktivitätssteigerung zur Folge (CHAN und TSICHLIS 2001). AKT selbst phosphoryliert im Verlauf weitere Proteine (z. B. mTOR, beta-GSK3) und nimmt so Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation, Apoptose und

Glukosestoffwechsel (BELLACOSA et al. 2004). Auch Angiogenese wird unter anderem über den beschriebenen Signalweg vermittelt (GERBER et al. 1998).

Die drei Isoformen der AKT werden beim Menschen ubiquitär exprimiert, wobei AKT2 in insulinsensitivem Gewebe wie Leber oder Skelettmuskel vermehrt nachzuweisen ist (BELLACOSA et al. 2004). Die AKT3 lässt sich besonders in Hirn, Lunge und Nieren nachweisen. Entsprechend fand sich in Mäusen mit AKT1-Deletion eine reduzierte Körpergröße in Verbindung mit einer reduzierten allgemeinen Organgröße (CHEN et al. 2001). Eine AKT2-Deletion mündete dagegen in Insulinresistenz und Diabetes mellitus, ohne dabei Einfluss auf die Körper- oder Organgröße zu nehmen (CHO et al. 2001). Eine AKT3-Deletion führte bei Mäusen zu verminderter Gehirngröße (EASTON et al. 2005). Von kardialer Bedeutung ist damit hauptsächlich die AKT1.

Entscheidender Einfluss bei der Vermittlung von kardialer Hypertrophie wird weiterhin dem Signalweg der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) zugeschrieben. Auch intrazelluläre Kalziumkonzentrationen sowie deren Verteilung innerhalb der Zelle – beispielsweise durch SERCA – spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von kardialer Hypertrophie (MAIER et al. 1998; TAIGEN et al. 2000). Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt jedoch bei dem bereits beschriebenen Signalweg IRS-PI3K1A-AKT und seiner myokardialen Aktivierung im Rahmen von Übergewicht und Ischämie.

1.4.1 Einfluss des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT auf kardiale Parameter

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung dieses Signalwegs für die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie vermehrt untersucht (SHIOJIMA und WALSH 2006). Die Herzen von p110α-dominant-negativen Mäusen hypertrophierten bei Druckbelastung, nicht jedoch als Reaktion auf körperliches Training (MCMULLEN et al. 2003). Die Deletion des regulatorischen Anteils der PI3K1A (p85) führte sowohl mit als auch ohne Training zu reduzierter Herzgröße (LUO et al. 2005). Physiologische Hypertrophie nach Training konnte sowohl in Zell- als auch Mausexperimenten durch die Deletion der AKT1 vermindert werden. Diese Deletion nahm jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung pathologischer Hypertrophie, z. B. nach Aortenbanding (DE BOSCH et al. 2006), was darauf hinweist, dass der PI3K1A eine wichtige Bedeutung bei physiologischer Hypertrophie, nicht jedoch bei pathologischer Hypertrophie zukommt.

Bei chronisch aktiver AKT liegt eine pathologische Form der kardialen Hypertrophie vor (MATSUI et al. 2002; SHIOJIMA et al. 2005; TANIYAMA et al. 2005; SCHIEKOFER et al.

2006). Es existieren jedoch auch Studien, in denen die chronische Aktivierung des Signalwegs durch eine Überexpression von p110α bzw. AKT1 zu physiologischer Hypertrophie führte (SHIOI et al. 2000; CONDORELLI et al. 2002). Dieser Gegensatz zeigt, dass physiologische und pathologische Hypertrophie durch einen einzigen Signalweg induziert werden können. Unklar bleibt weiterhin, durch welche Signale der Weg in Richtung physiologischer oder pathologischer Hypertrophie geebnet wird.

Nach myokardialer Ischämie wirkt eine akute Aktivierung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT kardioprotektiv. Bereits 2004 wurde der *reperfusion injury salvage kinase* (RISK)-Signalweg von HAUSENLOY und YELLON beschrieben, der über vielerlei Stimulatoren (wie IGF-1, Atorvastatin) aktiviert werden kann. Eine Aktivierung des Signalwegs schützt unter anderem über einen antiapoptotischen Effekt das Myokard und wirkt damit kardioprotektiv (HAUSENLOY und YELLON 2004).

Eine Aktivierung der PI3K1B scheint dagegen im Allgemeinen in pathologischer Hypertrophie zu münden (CRACKOWER et al. 2002; PATRUCCO et al. 2004).

Da der Signalweg IRS-PI3K1A-AKT – wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben – im Herzen eine Hypertrophie induziert, und Insulin, aber auch Leptin als potentielle Aktivatoren des Signalwegs bei Adipositas oftmals in chronisch erhöhten Blutkonzentrationen vorliegen, erscheint es naheliegend, dass auch die adipositasvermittelte kardiale Hypertrophie über diesen Signalweg vermittelt wird. Von Interesse ist außerdem der Einfluss der PI3K1B, da auch diese in der Lage ist, kardiale Hypertrophie zu vermitteln, und auch ihre die zelluläre Kaskade vermittelnden Liganden wie beispielsweise Angiotensin bei Adipositas vermehrt zur Verfügung stehen.

1.5 Fragestellung

Adipositas ist ein anerkannter kardiovaskulärer Risikofaktor und führt unter anderem zu kardialer Hypertrophie, linksventrikulärer Dilatation und – oftmals subklinischer – linksventrikulärer Funktionsminderung. Klinische Studien deuten dabei auf einen direkten, unabhängigen Einfluss körperlichen Übergewichts auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie, einem wichtigen Risikofaktor für die Ausbildung einer Herzinsuffizienz, hin. Eine Aktivierung des kardialen IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs vermittelt Zellwachstum, -überleben und -metabolismus und spielt damit eine wichtige Rolle im Rahmen physiologischer kardialer Umbauvorgänge. Klinische und experimentelle Studien deuten unter anderem im Rahmen des sog. RISK-Signalwegs auf eine protektive Funktion nach

kardialer Ischämie hin. Hingegen wird eine chronische AKT-Aktivierung mit maladaptiven kardialen Prozessen in Verbindung gebracht. Bislang ist wenig über den Einfluss von Adipositas auf die Aktivierung des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs im Herzen bekannt. Auch die Auswirkung von Übergewicht und Hyperinsulinämie auf die myokardialen Reparaturprozesse nach Ischämie stehen unter aktuellem wissenschaftlichen Interesse.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss körperlichen Übergewichts auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sowie auf die Mortalität und den Ablauf kardialer Umbauprozesse nach Induktion einer experimentellen Myokardischämie. Insbesondere sollte untersucht werden, ob und auf welche Weise die mit Übergewicht assoziierte Hyperinsulinämie und chronische Aktivierung des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs die kardiale Reaktion auf das erhöhte Körpergewicht und auf die Induktion einer chronischen Myokardischämie beeinflussen. Nicht zuletzt sollte über die Untersuchung der PI3K1B eine Differenzierung der beteiligten PI3K und der möglichen Aktivierung der AKT über andere bei Übergewicht erhöhte, an G-Proteinrezeptoren bindende Liganden erreicht werden. Um den Einfluss von Übergewicht auf die spontane kardiale Hypertrophie zu untersuchen, wurde zunächst ein Tiermodell einer übergewichtigen, insulinresistenten Maus entwickelt. Hierzu wurden acht Wochen alte weibliche Wildtypmäuse über einen Zeitraum von neun Wochen mit einer hochkalorischen Diät gefüttert, die 60% der Kalorien aus Fett enthielt. Zum Nachweis einer kardialen Hypertrophie des Herzens wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Die Hypertrophie des einzelnen Kardiomyozyten wurde histologisch quantifiziert. Bei nachgewiesenem Übergewicht und kardialer Hypertrophie folgte die Induktion eines Myokardinfarktes sowie, drei Wochen später, die Gewebeentnahme. Es folgte die Analyse des Einflusses von Übergewicht auf die kardialen Umbauprozesse nach myokardialer Ischämie. Insbesondere wurden dabei die Parameter Fibrose, Inflammation, Angiogenese und Apoptose mithilfe histologischer und immunhistochemischer Verfahren untersucht. Auf Proteinebene folgten Untersuchungen über den Phosphorylierungsgrad der Signaltransduktionsproteine IRS, PI3K und AKT. Dies sollte eine Aussage darüber ermöglichen, ob eine diätassoziierte kardiale Hypertrophie durch eine veränderte Aktivierung dieses Signalwegs entstanden sein könnte. Ziel der Untersuchungen war somit, den Einfluss des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT auf die Entwicklung einer pathologischen oder physiologischen kardialen Hypertrophie sowie auf die myokardialen Umbauvorgänge nach experimenteller Myokardischämie bei Vorliegen von körperlichem Übergewicht und chronischer Hyperinsulinämie zu beschreiben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Reagenzien

Artikel	Art.-Nummer	Firma
Aceton	8222511000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Antibody-Diluent	S3022	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Antikörper Immunfluoreszenz		**s. Immunfluoreszenz, Kap. 2.4.3**
Antikörper Western Blot		**s. Western Blot, Kap. 2.5.6**
APS (Ammoniumpersulfat)	A3678	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	1009831000	Merck KGaA, Darmstadt, D
BCA Protein Assay	23227	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Biebrich-Scharlachrot	B6008	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Braunol	3864219	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Bromphenolblau	B0126	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
BSA (Bovines Serum Albumin)	A7906	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eisenchlorid (29%, in aqua dest.)	236489	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Eisessig	1000631000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin	HT110216	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FCS (Fötales Kälberserum)	10270-106	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Formalin	252549	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Gelatine	G1890	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Gill´s Hämatoxylin	6765007	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Glukose (HK) Assay Kit	GAHK-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerol	G6251	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerol Reagent Plus	G7757	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glyzin (Pufferan)	3908.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Hämatoxylin	1043020100	Merck KGaA, Darmstadt, D
Histomount	9999122	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Isofluran	B506	Abbott, GmbH+Co KG, Wiesbaden, D
Isopropanol (2-Propanol)	278475	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumchlorid	05433	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ketamin, 10%	84029	medistar, Holzwickede, D
Magnesiumchlorid	105833	Merck KGaA, Darmstadt, D

Mayer's Hämatoxylin	MHS32	Sima-Aldrich, Steinheim, D
Mercaptoethanol	M7154	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Methanol	106009	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methylbutan	106056	Merck KGaA, Darmstadt, D
Maus Leptin Quantikine ELISA Kit	MOB00	R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, GB
NaOH, 2M	109136	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid, 0,9%	7462979	DeltaSelect GmbH, Dreireich, D
NGS (Normales Ziegenserum)	X0907	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Öl-Rot-O	O-0625	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
nProtein A Sepharose 4	17-5280-01	GE Healthcare Bio Sciences Corp., München, D
PAP PEN Mini	LP0002	Zytomed Systems, Berlin, D
PBS, 10%	70011-036	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Phenol	P1037	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phosphomolybdänsäure	P7390	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phosphotungstensäure	P6395	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Pikrinsäure, gesättigt	P6744-1GA	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ponceau S	P7170	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Precision Plus Protein Standard	161-0374	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Propylen-Glycerol	398039	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Rat / Mouse Insulin Assay	INSKR020	Chrystal Chem Inc., Illionois, USA
Rotiphorese Gel 40	T802.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Salzsäure, konzentriert	1099110001	Merck KGaA, Darmstadt, D
Säurefuchsin	F8129	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	L4509	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Solvent Blue 43	531251	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Stickstoff, flüssig		hausintern
SuperSignal Chemiluminescent Substrate	34080	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
TEMED	2367.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Tissue Tec O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, NL
Triton X-100	93426	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trizma-Base	T6066	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
VectaShield Mounting Medium	H-1000	Linaris, Wertheim, D
Xylazin, 2%	12095	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D
Xylolersatzmittel	9990505	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Zinkformalin	6764255	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D

2.1.2 Geräte und Programme

Artikel	Firma
Axio Vision 3.0 (Graphikprogramm)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Digitaler Messschieber (Z11155)	Paget Trading Ltd. c/o Paget Services, London, GB
Elektrokauter	Effner & Spreine GmbH, Berlin, D
Entwicklungsmaschine (SRX-101A)	Konica Minolta, Langenhagen, D
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
GraphPad Prism (Statistikprogramm)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Homogenisator (Labsonic 3000)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Image Pro Plus (Graphikprogramm)	Media Cybernetics, Inc.; Bethesda, MD, USA
KC4	Biotec Laboratories Limited, Suffolk, GB
Kryostat (Frigocut 2800N)	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, D
Mikroskop (Olympus BX51)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Mini Vent Mouse Ventilator Typ 845	Hugo Sachs Elektronik GmbH, March-Hugstetten, D
Plattenfotometer	BIO-TEK Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, D
Spektrofotometer (utrospec 3000)	Pharmacia Biotech, jetzt GE Healthcare, München, D
Sterilisierung (Steri 250)	Simon Kelter AG, Burgdorf, CH
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Ultraschallgerät (VeVo2100)	Visualsonics, Toronto, CDN
Waage (Extend)	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad (D8)	Haake, Karlsruhe, D
Western-Blot-Apparatur (Mini Protean III)	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Wippschüttler	SSL4, Stuart über Roth, Karlsruhe, D
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge (Rotanta/S)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D

2.1.3 Materialien

Artikel	Art.-Nummer	Firma
Deckgläschen	CB00110RA1	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Eppendorfgefäß	0030 120.094	Eppendorf AG, Hamburg, D
Filterpapier	D3701	GE Healthcare, München, D
Insulinspritzen, 1 ml	9161309V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kryoröhrchen	368632	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Mikrowellplatten	269620	Thermo Fisher Scientific Germany, Braunschweig, D
Naht 6-0	Prolene C-1	Ethicon, Johnson & Johnson medical GmbH, Norderstedt, D
Naht 9-0	Ethilon BV-4	Ethicon, Johnson & Johnson medical GmbH, Norderstedt, D
Nitrozellulosemembran	Protran	Whatman, Dassel, D
Objektträger	J1800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Pipetten		Eppendorf AG, Hamburg, D

Pipettenspitzen	Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röntgenfilme	Super RX	Fuji Foto Film GmbH, Düsseldorf, D

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Gewebefärbungen

Anilinblau-Lösung:	2,5 ml 2 ml auf 100 ml	Solvent Blue 43 Eisessig aqua dest.
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung:	90 ml 10 ml 1 ml	Biebrich-Scharlachrot (1%, in aqua dest.) Säurefuchsin (1%, in aqua dest.) Eisessig
Bouin´s Fixative:	750 ml 250 ml 50 ml	gesättigte Pikrinsäure Formalin Eisessig
Essigsäure, 1%:	1 ml auf 100 ml	Eisessig aqua dest.
Glycerin Jelly:	10 g auf 60 ml 70 ml 1 ml	Gelatine aqua dest. erhitzen und auflösen Glycerol Reagent Plus Phenol
Öl-Rot-O-Lösung:	0,5 g auf 100 ml	Öl-Rot-O Propylenglycol, 100% Dem Öl-Rot-O das Propylenglycol unter Rühren langsam zugeben, vorsichtig auf 95 °C erhitzen und auflösen. Abfiltern. Über Nacht abkühlen, unter Vakuum filtern.
Phosphomolybdic-Phosphotungstic-Lösung:	5 g 5 g auf 200 ml	Phosphomolybdänsäure Phosphotungstensäure aqua dest.
Pikro-Sirius-Rot-Lösung:	1%	Direct Red 80 gesättigte Pikrinsäure
Weigert´s-Eisen-Hämatoxylin-Lösung:	Lösung A 1 g auf 100 ml Lösung B 4 ml 1 ml auf 100 ml A : B	 Hämatoxylin Ethanol (95%, in aqua dest.) Eisenchloridlösung (29%, in aqua dest.) konzentrierte Salzsäure aqua dest. 1:1 (zeitnah ansetzen)

2.1.4.2 Proteinnachweis

Blockpuffer:	3%	BSA in 1x TBS-T

Lämmli-Puffer, 2x:	0,151 g 0,4 g auf 2 ml auf 10 ml 10% 0,01%	Trizma-Base SDS Glycerol aqua dest. auf pH 6,6 Mercaptoethanol Bromphenolblau
Laufpuffer, 5x:	30,2 g 144 g 10 g auf 2 l	Trizma-Base Glyzin SDS aqua dest.
Sammelgel:	1,25 ml 0,67 ml 0,025 ml 0,01 ml auf 5 ml	4x Tris-SDS, pH 6,8 Rotiphorese Gel 40 10% APS TEMED aqua dest.
TBS, 10x:	198,2 g 24,2 g	NaCl Trizma-Base
TBS-T, 1x:	100 ml 10 ml auf 1 l	10x TBS Tween 20 aqua dest. auf pH 7,5
Transferpuffer, 10x:	78,8 g 288 g auf 2 l	Trizma-Base Glyzin aqua dest.
Transferpuffer, 1x:	100 ml 200 ml auf 1 l	10x Transferpuffer Methanol 20% aqua dest.
Trenngel, 10%:	3,75 ml 5 ml 0,05 ml 0,01 ml auf 15 ml	4x Tris-SDS, pH 8,8 Rotiphorese Gel 40 10% APS TEMED aqua dest.
Tris-SDS, 4x, pH 6,8:	6,05 g 0,4 g auf 100 ml	Trizma-Base SDS aqua dest.
Tris-SDS, 4x, pH 8,8:	45,5 g 1 g auf 250 ml	Trizma-Base SDS aqua dest.

2.2 Untersuchungen im Tiermodell

2.2.1 Versuchsablauf

Die Versuchsgröße belief sich auf insgesamt 80 weibliche Mäuse des genetischen Hintergrundes C57BL/6J. Sie wurden im Alter von sechs Wochen von der Firma Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld, D) bezogen und ab diesem Zeitpunkt in den Zentralen Tierexperimentellen Einrichtungen (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG)

gehalten. Allen Tieren stand während ihres gesamten Aufenthalts in der ZTE Wasser und Futter zur freien Verfügung.

Um jede Maus während des gesamten Versuches eindeutig identifizieren zu können, wurden die Mäuse vor Versuchsbeginn einer Ohrmarkierung unter kurzer Isoflurannarkose unterzogen.

Zu Beginn des Versuches wurden alle Mäuse gewogen und in zwei Gruppen aufgeteilt. Da in der Arbeit der Einfluss von Übergewicht untersucht werden sollte, erfolgte die Einteilung so, dass sich die beiden Gruppen in Bezug auf das mittlere Körpergewicht der Tiere nicht unterschieden. Die Hälfte der Tiere (ab jetzt: HFD) wurde ab diesem Zeitpunkt für zwölf Wochen mit einer hochkalorischen Hochfettdiät (D12492), die andere Hälfte der Tiere (ab jetzt: KD) stellte die Futter-Kontrollgruppe dar und wurde mit einer Kontrolldiät (D12450B) gefüttert (s. Tab. 2.1). Alle Tiere wurden ab Beginn der Fettfütterung (bzw. der Kontrollfütterung) alle sieben Tage gewogen.

Bestandteil (%)	**HFD: D12492**	**KD: D12450B**
Protein	20	20
Kohlenhydrate	20	70
Fett	60	10
kcal / g	5,24	3,85

Tab. 2.1 Verwendete Diäten. Auszüge aus den jeweiligen Datenblättern. Firma: *ResearchDiets, Inc.*, NJ, USA; über *Brogaarden ApS*, Gentofte, DK.

Nach neun Wochen wurden wiederum beide Gruppen (HFD und KD) in zwei in Bezug auf ihr mittleres Körpergewicht möglichst ähnliche Gruppen geteilt. Die eine Hälfte wurde einem experimentellen Myokardinfarkt (MI) ausgesetzt (HFD MI; KD MI), die andere Hälfte wurde, als Infarkt-Kontrollgruppe, einer reinen Thoraxeröffnung mit anschließender Wiederverschließung (*sham*-OP) unterzogen (HDS S; KD S). Um eine erhöhte Sterblichkeit der MI-Gruppen auszugleichen, war die Anzahl der Tiere in diesen Gruppen höher. 22 Tiere der HFD-Gruppe und 23 Tiere der KD-Gruppe wurden einer permanenten Ligatur der linken deszendierenden Herzkranzarterie unterzogen. Ab dem Zeitpunkt der Operation wurden die Tiere über drei Wochen täglich auf ihren Zustand hin beobachtet und zusätzlich jeden zweiten Tag gewogen.

Drei Wochen nach Infarktsetzung wurden die Untergruppen der Mäuse letztmalig halbiert. Die Hälfte der Mäuseherzen jeder Untergruppe wurde histologisch (H) untersucht, die andere Hälfte stand für Proteinanalysen mittels Western Blot (WB) zur Verfügung. Bedingt durch den Aufbau des Versuches konnten alle durch invasive Methoden erhobenen Daten (z. B.

Tibialänge, Serumparameter) erst zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme – nach zwölf Wochen Hochfettdiät und drei Wochen post-OP – gewonnen werden. In Abb. 2.1 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.

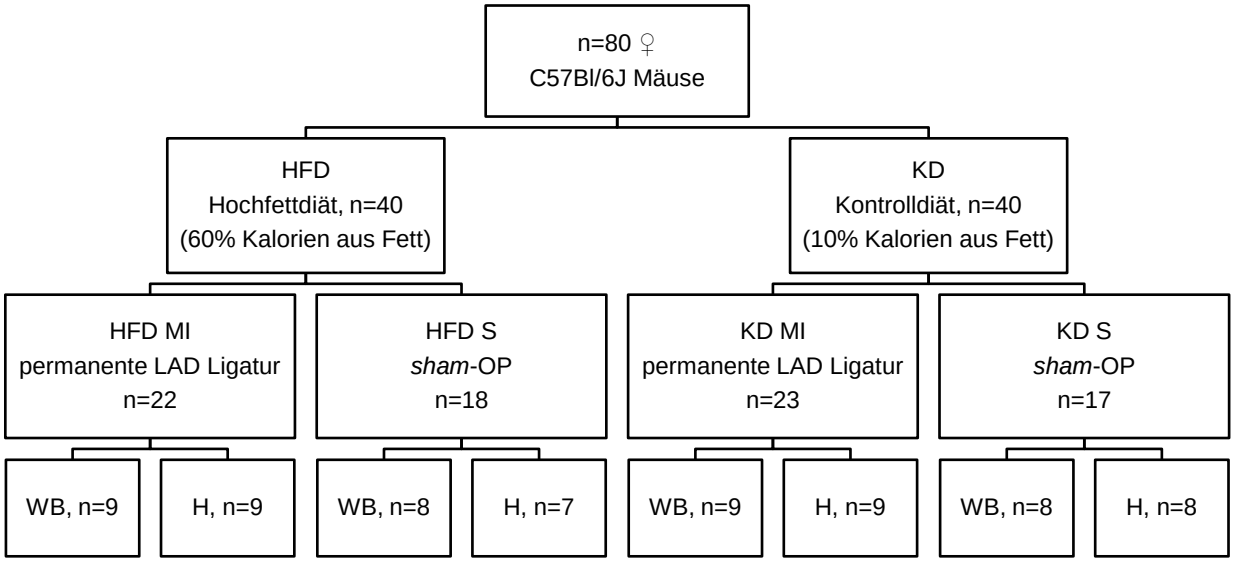

Abb. 2.1 Versuchsaufbau, schematisch.

Um die Herzfunktion der Tiere im Verlauf beurteilen zu können, wurden die Tiere während des Versuches in regelmäßigen Abständen einer Echokardiographie unterzogen. So wurden zu Beginn des Versuches 31 Tiere stellvertretend für alle Mäuse sonographiert. Vor Infarktsetzung bzw. *sham*-OP sowie vor der Gewebeentnahme wurden jeweils alle Tiere echokardiographisch untersucht.

2.2.2 Echokardiographische Bestimmung von Herzfunktion und -dimensionen

Die echokardiographische Untersuchung wurde mithilfe des handelsüblichen Ultraschallgeräts für Untersuchungen an Tieren, unter anderem an Mäusen, *(Vevo2100)* durchgeführt.

Die mittels Ohrmarkierung identifizierte Maus wurde in der Induktionskammer platziert, es erfolgte die Narkoseeinleitung mit 3% Isofluran. Nach Eintritt der Sedierung wurde die Maus rücklings auf der Untersuchungsplatte platziert, das Isofluran wurde ab jetzt über eine Mund-Nasen-Maske appliziert. Eine Wärmelampe schützte vor Unterkühlung. Über die EKG-Elektroden an den Extremitäten der Maus wurde während der gesamten Untersuchung ein Ein-Kanal-EKG abgeleitet.

Die Körpertemperatur der Maus wurde über eine rektale Temperatursonde gemessen, der Brustkorb wurde mithilfe von Enthaarungscreme großflächig vom Haarkleid befreit. Unter dieser Vorbereitung wurde die Narkose in mehreren Schritten auf 2% Isofluran erniedrigt.

Während der Echokardiographie wurde darauf geachtet, dass die physiologischen Parameter der Maus in Bezug auf die Körpertemperatur (ca. 38,0 °C) (EUMORPHIA / EUROPHENOME) sowie die Atemfrequenz (> 120 min^{-1}) auch unter Narkose erhalten blieben.

Die echokardiographische Untersuchung begann nach dem Ausrichten der Untersuchungsplatte und dem Auftragen des Ultraschallgels. Während der Untersuchung wurde darauf geachtet, dass die Herzfrequenz immer bei knapp über 500 min^{-1} eingestellt war. Es wurden sowohl zweidimensionale B-Mode-Bilder als auch eine M-Mode-Aufnahme erstellt. Im B-Mode stellen die Aufnahmen der langen Achse den Längsschnitt des Herzens durch Aortenklappe und Herzspitze dar, die der kurzen Achse den Querschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln. Der M-Mode stellt den größten Durchmesser der kurzen Achse im zeitlichen Verlauf dar. Die Wanddicken wurden in M-Mode-Aufnahmen ermittelt.

Im Rahmen der echokardiographischen Untersuchung wurden folgende Parameter sowohl in Systole als auch in Diastole ermittelt:

B-Mode lange Achse:
Strecke Aortenklappe bis Herzspitzenendokard (long axis s, long axis d) (mm)

B-Mode kurze Achse:
Linksventrikuläre Vorderwanddicken (AWThs, AWThd) (mm)
Linksventrikuläre Durchmesser (LVIDs, LVIDd) (mm)
Linksventrikuläre Hinterwanddicken (PWThs, PWThd) (mm)
Flächen, die das linksventrikuläre Endokard umschreiben (Area s, Area d) (mm^2)
Fläche, die das linksventrikuläre Epikard umschreibt, in Systole (Epi) (mm^2)
Herzfrequenz, unabhängig von Systole oder Diastole (HF) (min^{-1})

M-Mode:
Linksventrikuläre Vorderwanddicken (AWThs, AWThd) (mm)
Linksventrikuläre Durchmesser (LVIDs, LVIDd) (mm)
Linksventrikuläre Hinterwanddicken (PWThs, PWThd) (mm)

Berechnung der folgenden Parameter:
Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (%): FAS = (Area d – Area s) / Area d x 100
Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (%): FS = (LVIDd – LVIDs) / LVIDd x 100
Verdickungsfraktion der Vorderwand (%): AWThF = (AWThs – AWThd) / AWThs x 100
Verdickungsfraktion der Hinterwand (%): PWThF = (PWThs – PWThd) / PWThs x 100
LV-Masse (mg): HW = 1,05 x (5/6) x ((Epi s x (Ls + ((AWThs + PWThs) / 2))) – (Area s x Ls))
Volumen in Systole (µl): Vol s = (5/6) x (Area s x Ls)
Volumen in Diastole (µl): Vol d = (5/6) x (Area d x Ld)
Ejektionsfraktion (%): EF = (Vol d – Vol s) / Vol d x 100

Tab. 2.2 Echokardiographisch bestimmte Messwerte.

Im Anschluss an die erfolgreiche Echokardiographie wurden Sedierung, Ultraschallgel und Rektalsonde entfernt, die Maus wurde gewogen und nach dem Aufwachen zurück in ihren Käfig gesetzt. Alle Messungen erfolgten durch Herrn Michael Didié, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Abteilung Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen.

2.2.3 Experimentelle Induktion eines Myokardinfarkts

Die Induktion des Myokardinfarkts wurde in Anlehnung an PATTEN et al. durch einen manuellen Verschluss der linken deszendierenden Herzkranzarterie durchgeführt (PATTEN et al. 1998).

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem verschließbaren Glasgefäß mit isofluranhaltiger Luft. Nach Eintritt der Sedierung wurde die Maus zügig mit den Vorderzähnen an einem eigens hierfür angefertigten Gestell „aufgehängt“ und die Zunge mithilfe einer Pinzette behutsam nach vorne gezogen, um ein spezielles Laryngoskop in den Rachen einzuführen. Nun konnte die Stimmritze unter Sicht eingestellt und die Maus mit einem selbst hergestellten Kunststoffröhrchen intubiert werden.

Der Tubus wurde an ein Beatmungsgerät (*Mini Vent Mouse Ventilator Typ 845*) angeschlossen, die regelrechte Intubation wurde anhand der Luftblasenbildung des in Wasser platzierten Endes des Exspirationsschlauchs kontrolliert. Die Beatmung erfolgte gemäß den nachstehenden Parametern: Frequenz 150 min^{-1}; Atemzugvolumen 150 µl; mit einem Gemisch aus O_2 und 2% Isofluran.

Die Operation wurde unter dem Mikroskop durchgeführt. Die Maus wurde leicht rechtsseitig gelagert. Zur Vorbereitung wurde die linke Thoraxhälfte der Maus enthaart und mit Braunol desinfiziert. Die Haut über dem Herzen wurde über eine Länge von ca. 1 cm inzidiert. Die Eröffnung des Brustkorbs erfolgte über einen Schnitt zwischen den Rippen, der Schnitt wurde

mithilfe eines Elektrokauters gespreizt und durch sterile Haken offen gehalten. Dieser Operationsabschnitt wurde sowohl an den Infarkt-operierten als auch an den *sham*-operierten Mäusen durchgeführt. Den nachfolgenden Schritten dagegen waren nur die Infarkt-operierten Mäuse ausgesetzt.

Die Darstellung des Herzens folgte nach Durchtrennung des Perikards. Die linke deszendierende Herzkranzarterie (LAD) wurde 1 - 3 mm unterhalb des linken Herzohres aufgesucht und dort mithilfe einer 9-0 Naht ligiert. Nach Verblassen des Herzmuskels distal der Umstechung – als Indikator für eine erfolgreiche Gefäßunterbindung – wurden Thorax und Haut jeweils mit 6-0 Einzelknopfnähten wieder verschlossen. Es folgte eine letzte Desinfektion der Wunde mit Braunol. Die Operationen wurden von Herrn Dr. Bernhard Unsöld, Assistenzarzt der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der UMG, durchgeführt.

Zur Ausleitung der Narkose wurde das Isofluran aus dem Narkosegemisch entfernt. Bei ausreichender Spontanatmung wurde der Tubus entfernt. Zum schonenden Erwachen wurde die Maus in einem sauberen, auf 37°C gewärmten Käfig platziert. Erst nach vollständigem Erwachen und nach Überprüfung des unauffälligen Allgemeinzustandes der Maus wurde diese wieder in den Tierstall verbracht und dort weiterhin regelmäßig – in der ersten Woche täglich – auf Auffälligkeiten hin untersucht.

Zur Vorbeugung gegen Schmerzen war das Trinkwasser der Mäuse schon am Vortag mit Metamizol (15 Tropfen in 200 ml Trinkwasser) versetzt worden. Die Schmerzmedikation wurde bis einschließlich eine Woche *post infarctionem* fortgeführt.

2.2.4 Gewebeentnahme

An Tag 21 nach Induktion des Myokardinfarktes bzw. nach *sham*-OP wurde allen Mäusen nach ihrem Tod das Herz für histologische und molekularbiologische Analysen entnommen. Gleichzeitig wurde der Maus für spätere Bestimmungen von Nüchtern-Glukose und -Insulin sowie zur Bestimmung des Leptinspiegels Blut entnommen. Um neben dem Körpergewicht einen weiteren Marker für die Gewichtszunahme der Maus zur Verfügung zu haben, wurden jeder Maus die abdominellen Fettdepots entnommen, genau wie die rechte Tibia, die in späteren Berechnungen als Maß für die Größe der Maus diente.

Zur Bestimmung von Nüchtern-Glukose und -Insulin im Serum war den Mäusen am Vortag das Futter entzogen worden. Wasser stand weiterhin zur freien Verfügung.

Nach Identifikation anhand der Ohrmarkierung wurde die Maus mittels Peritonealanästhesie betäubt. Als Betäubungsmittel wurden Natriumchlorid, Xylazin, sowie Ketamin im Verhältnis 2:1:1 verwendet. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit 2,5 µl/g Körpergewicht. Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurde die Maus erneut gewogen, um eventuelle, durch Mausbewegungen verursachte Ungenauigkeiten der vorherigen Messung zu erkennen. Zur Organentnahme erfolgte die Fixierung rücklings mit abgespreizten Extremitäten durch Leukosilk, zur Desinfektion und zum leichteren Arbeiten wurden Thorax und Abdomen oberflächlich mit 70% Ethanol (in aqua dest.) behandelt. Im Folgenden wurde der Bauchraum entlang des Rippenbogens eröffnet. Die Thoraxeröffnung erfolgte durch das Aufschneiden der Rippen links lateral des Sternums bis hin zur oberen Thoraxapertur.

Nach Durchtrennung der Aorta wurde das Blut mit einer Insulinspritze aus dem Thorax entnommen, in ein beschriftetes Eppendorfgefäß umgefüllt und für 5 Min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde vorsichtig abgenommen, in saubere Gefäße überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Um das Herz unter guter Sicht entnehmen zu können, wurde der Thorax großzügig eröffnet. Das Zwerchfell wurde bis zu den Seiten abgetrennt, die Rippen nach außen geklappt. Die Entnahme des Herzens erfolgte zunächst mitsamt dem epikardialen Fettgewebe. Gefäße und Lungen wurden sorgfältig und zügig direkt oberhalb des Herzens abgetrennt und in der Maus belassen. Zur Dilatation wurde das Herz kurz in 0,1 M kardioplegem KCl (in PBS) geschwenkt. Nach vorsichtiger Ablösung des epikardialen Fettgewebes sowie Reinigung des Herzens von eventuell am Herz verbliebenen Gefäßteilen wurde das Mäuseherz gewogen. Auf sauberer Aluminiumfolie wurden die Vorhöfe abgetrennt und je nach beabsichtigter Untersuchung in einem Kryoröhrchen oder PBS gelagert. Die für den Western Blot vorgesehenen Herzen wurden bis zum Zeitpunkt der Proteinanalysen bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagert. Die für die Histologie vorgesehenen Herzen wurden bei RT in PBS (in aqua dest.) aufbewahrt, um im Verlauf eingebettet zu werden. Hierzu wurden sie unter dem Abzug auf einen beschrifteten Korken versetzt und dort mit *tissue-tec O.C.T. compound* befestigt. Die Fixierung gelang durch kurzes Einsenken des Korkens inklusive des Herzens in einen mit Methylbutan gefüllten Behälter, der durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurde. Das Herz war mit seiner Schnittfläche auf den Korken gesetzt worden, sodass es später von dem Apex her angeschnitten werden würde. Die Lagerung der eingebetteten Herzen erfolgte bei -20 °C.

Zur Entnahme der abdominellen Fettdepots (*fat-pad*) wurde der Bauchraum nach kaudal weiter eröffnet. Die Haut und das Peritoneum wurden gespreizt, sodass die *fat-pads* jeweils frei lagen und leicht unter Erhaltung besonders der Ovarien entnommen und gewogen werden konnten.

Für die Freilegung der Tibia wurde der rechte Hinterlauf auf Höhe des Femurschaftes abgetrennt. Mit Pinzette und Schere wurde die Tibia grob von Fell, Muskeln und Fibula getrennt, um dann an den jeweiligen Gelenken aus ihrer Verbindung zu Femur und Talus herausgedreht werden zu können. Mit Kompressen wurde der Knochen manuell vom restlichen Muskelgewebe befreit. Die Längenmessung der Tibia erfolgte mithilfe eines digitalen Messschiebers.

Einmalig wurden von einer Kontrolldiät-gefütterten, *sham*-operierten Maus zusätzlich eine Milz und ein 1 cm langes Dünndarmstück für Positivkontrollen der verschiedenen Färbungen entnommen, die auf die gleiche Art wie die für die Histologie bestimmten Herzen gelagert wurden, nachdem sie in 0,9% NaCl gespült und, im Fall des Darms, ausgestrichen worden waren.

2.2.5 Genehmigung der Studie

Die tierexperimentelle Studie wurde nach §8 des Tierschutzgesetzes vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Az. 33.9.42502-04-063/09). Haltung und Versuche erfolgten gemäß nationalen Bestimmungen.

2.3 Messungen im Serum

Als Material für die Serumanalysen wurde das aus dem Nüchtern-Vollblut abzentrifugierte Serum genutzt, welches bei -80 °C gelagert worden war.

2.3.1 Bestimmung von Nüchtern-Glukose im Serum

Zur Bestimmung der Nüchtern-Glukose wurde das *Glukose (HK) Assay Kit* verwendet. Die Bestimmung erfolgte genau nach Herstelleranleitung. Als Probenvolumen wurde 10 µl gewählt. Die vom Hersteller mitgelieferte Standardlösung mit bekannter Glukosekonzentration wurde mitgeführt. Die Absorption wurde im Spektrofotometer bei 340 nm gegen aqua dest. gemessen, die Glukosekonzentration wurde anhand der vom Hersteller vorgegebenen Formel berechnet.

2.3.2 Bestimmung von Nüchtern-Insulin und -Leptin im Serum

Die Konzentration von Insulin und Leptin im Serum wurde mithilfe spezifischer Sandwich ELISAs bestimmt. Bei dieser Form der ELISAs ist ein an das Antigen bindender Antikörper fest an die Mikrowellplatte gebunden. Das im Serum vorhandene Antigen bindet an diesen Antikörper. Nicht bindende Bestandteile der Probe werden nach einer Inkubationszeit von der Platte gewaschen. In einem zweiten Schritt wird ein mit einem Enzym verbundener Detektionsantikörper zugegeben. Dieser bindet an ein anderes Epitop des Antigens, sodass das Antigen wie ein Sandwich zwischen beiden Antikörpern eingeschlossen wird. Wiederum wird nicht gebundene Lösung von der Platte gewaschen. Im letzten Schritt wird nun ein Substrat hinzugegeben, welches durch das Enzym des Detektionsantikörpers umgesetzt werden kann. Der Substratumsatz ist proportional zur Enzymmenge und damit auch zur Menge des Antigens.

Zur Bestimmung der Nüchtern-Insulinwerte der Mäuse wurde der *Rat / Mouse Insulin Assay* verwendet. Die Bestimmung erfolgte strikt nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Nüchtern-Leptinwerte der Mäuse wurde der *Mouse Leptin Quantikine ELISA Kit* verwendet. Auch diese Bestimmung erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers.

Für die Auswertung aller ELISAs wurde ein Plattenfotometer sowie das Programm KC4 verwendet.

2.4 Histologische Analyse des Herzgewebes

2.4.1 Erstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurde das auf einer Korkplatte befestigte, bei -20 °C tiefgefrorene Herzgewebe verwendet.

Das Schneiden des Gewebes erfolgte im vorgefrorenen Kryostat auf eine Dicke von 5 – 7 µm. Pro Herz wurden zehn Objektträger mit je vier Schnitten erstellt. Bei der Aufteilung der Schnitte auf die Objektträger wurde jeweils eine einheitliche Reihenfolge beibehalten (s. Abb. 2.2). Diese Reihenfolge ermöglichte es, innerhalb eines jeden Objektträgers verschiedene Schnittebenen des Herzens zu repräsentieren und gleichzeitig auch auf den unterschiedlichen Objektträgern Areale abzubilden, die miteinander vergleichbar waren.

Auf jedem Objektträger wurde die vollständige Mausnummer sowie die Nummer des Objektträgers vermerkt, später wurde die durchgeführte Färbung ergänzt.

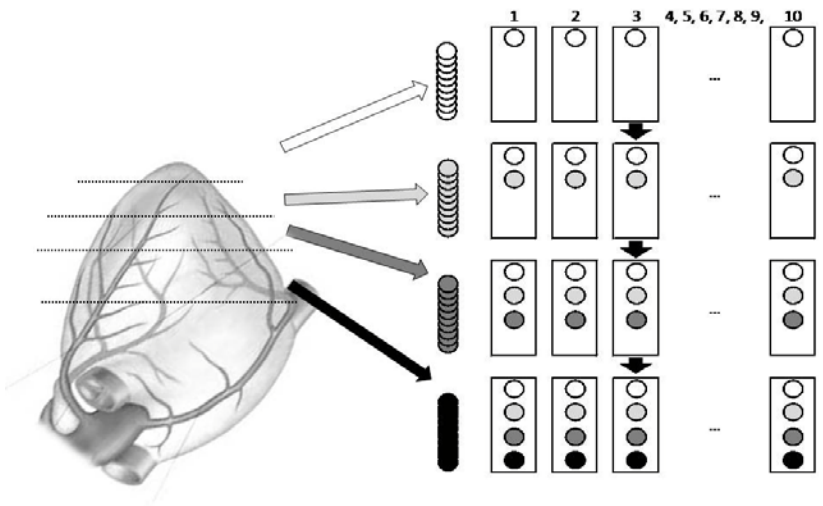

Abb. 2.2 Aufteilung der Gewebeschnitte auf Objektträger. Die Schnitte 1 – 10 eines Herzens wurden auf zehn Objektträger verteilt. Im weiteren Verlauf wurde wiederum je ein Schnitt auf jeden Objektträger überführt (11 – 20, 21 – 30, 31 – 40), bis auf jedem Objektträger vier Schnitte lagen. Damit waren die Schnitte 1, 11, 21, 31 auf den ersten Objektträger aufgezogen, die Schnitte 2, 12, 22, 32 auf den zweiten Objektträger. Um mit diesen vier Schnitten ein großes Areal des Herzens abzubilden, wurde jeweils nach zehn abgenommenen Schnitten ein Gewebestück von ca. 50 µm bewusst verworfen.

Die Lagerung aller Objektträger erfolgte bei -20 °C. Auch das restliche Herzgewebe wurde weiter bei -20 °C gelagert, um eventuell zu einem späteren Zeitpunkt weitere Schnitte erstellen zu können.

2.4.2 Histologische Untersuchungen

2.4.2.1 Postfixation

Nach dem Auftauen wurden die bisher kontinuierlich bei -20 °C gelagerten Objektträger für 5 Min in PBS gewässert. Im Anschluss daran erfolgte die Fixierung des Gewebes für 10 Min bei -20 °C in vorgekühltem Aceton, gefolgt von einer kurzen Trocknung der Objektträger unter dem Abzug.

2.4.2.2 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Um eine Übersicht über die angefertigten Schnitte zu gewinnen, wurde zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung angewandt.

Nach erfolgter Trocknung standen die Objektträger für 3 Min in 50% Ethanol. Die Kernfärbung erfolgte mittels Mayer´s Hämatoxylin für 8 Min, gefolgt von einer kurzen Spülung in aqua dest.. Das Bläuen resultierte aus der 13-minütigen Inkubation in Leitungswasser, gefolgt von der Zellfärbung durch 10 Sek Inkubation in 0,5%igem Eosin, an

welche sich kurzes Spülen in aqua dest. anschloss. Die Dehydrierung folgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (je zweimalig 2 Min in 90%, 100% Ethanol), an die sich zweimalig 5 Min Xylolersatzmittel und das Eindecken mithilfe von Histomount anschloss.

2.4.2.3 Masson-Trichrom-Färbung zur Detektion von Fibrose

Zur Quantifizierung fibrotischer Areale im infarzierten Herzen wurde die Färbung nach Masson-Trichrom verwendet.

Hierzu standen die Objektträger nach erfolgter Trocknung für 5 Min in aqua dest.. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht unter dem Abzug in *Bouin´s Fixative* nachfixiert. Am nächsten Morgen wurde unter laufendem Wasser gespült und anschließend zur Kernfärbung 10 Min in Weigert´s-Eisen-Hämatoxylin-Lösung inkubiert, gefolgt von anschließender 10-minütiger Waschung in Leitungswasser. Nach einer kurzen Spülung in aqua dest. folgte die Muskelanfärbung mithilfe einer 15-minütigen Inkubation in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin. Nach Lagerung über 15 Min in Phosphomolybdic-Phosphotungstic-Lösung erfolgte die Kollagenanfärbung durch 8-minütige Inkubation in Anilinblau-Lösung mit anschließender Spülung in aqua dest.. Zur Differenzierung lagen die Schnitte für 3 Min in 1% Essigsäure. Anschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe sowie zweimalige Inkubation über 5 Min im Xylolersatzmittel und das blasenfreie Eindecken der Schnitte unter Zuhilfenahme von Histomount.

Für die Auswertung der Schnitte wurden diese unter dem Mikroskop begutachtet. Mithilfe des Programms *Image Pro Plus* wurde von jedem Schnitt ein Foto in 12,5-facher Vergrößerung erstellt, sodass von jedem Mäuseherz vier Fotografien existierten. Pro Schnitt wurde die Fläche der blau gefärbten fibrotischen Anteile des Herzens durch die Fläche des gesamten Herzens dividiert, um einen prozentuellen Fibroseanteil pro Schnitt zu ermitteln. Aus den vier Werten einer jeden Maus wurde der arithmetische Mittelwert gebildet.

2.4.2.4 Pikro-Sirius-Rot-Färbung zum Nachweis von Kollagen

Zur Überprüfung der Ergebnisse bzw. zur spezifischen Darstellung von Kollagenfasern wurde die Pikro-Sirius-Rot-Färbung in Verbindung mit Polarisationsmikroskopie verwendet.

Nach der Trocknung wurden die Schnitte für 5 Min in aqua dest. gewässert. Die Färbung mit Pikro-Sirius-Rot-Lösung dauerte 60 Min. Die überschüssige Farbe tropfte auf einem Tuch ab, danach wurden die Schnitte kurz in aqua dest. eingetaucht. Der Dehydrierung in einer

aufsteigenden Alkoholreihe folgte eine zweimalige Lagerung in Xylolersatzmittel für je 5 Min. Das Eindecken gelang mithilfe von Histomount.

Alle Schnitte wurden unter dem Mikroskop mithilfe eines Polarisators begutachtet. Von jedem Quadranten eines jeden Schnittes wurde unter dem Mikroskop ein Foto in 200-facher Vergrößerung gefertigt, sodass von jeder Maus 16 Fotografien vorhanden waren. Mithilfe des Programms *Image Pro Plus* konnte die Fläche des durch die Färbung orange bis grün erscheinenden Kollagens quantifiziert werden. Für jede Maus wurde das arithmetische Mittel der gemessenen Fläche gebildet.

2.4.2.5 Öl-Rot-O zur Beurteilung von Fetteinlagerung

Die Öl-Rot-O-Färbung wurde zur Beurteilung der extra- und intrazellulären, sowie der epikardialen Fetteinlagerung im Herzen verwendet.

Die Postfixation der Schnitte erfolgte nach dem Auftauen in eisgekühltem Formalin (10%) für 10 Min. Anschließend wurden die Schnitte je dreimal für 2 Min in aqua dest. gewaschen, um dann für 5 Min bei RT in Propylen-Glycerol (100%) zu inkubieren. Die Färbung mithilfe der Öl-Rot-O-Lösung erfolgte für 8 Min bei 60 °C im Wasserbad. Im Anschluss folgte nach der 5-minütigen Inkubation in Propylen-Glycerol (85%, in aqua dest.) ein weiterer dreimaliger Waschgang für je 2 Min in aqua dest.. Die Kerne wurden mit Gill´s Hämatoxylin durch 13-maliges, kurzes Eintauchen angefärbt. Die Bläuung fand unter fließendem Leitungswasser für 30 Sek statt. Anschließend wurden die Schnitte mithilfe von vorher im Wärmebad verflüssigtem Glycerin Jelly eingebettet.

Unter dem Mikroskop wurden alle Schnitte sorgfältig betrachtet. Die Schnitte wurden gemäß der Lokalisation des Fettsignals (intra- und extrazellulär sowie epikardial) beurteilt.

2.4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

2.4.3.1 Allgemeines Färbeprotokoll der CD31-, CD45-, CD68-Färbung

Nach dem Auftauen der Objektträger wurden diese für 5 Min in PBS gewässert. Im Anschluss daran erfolgte die Fixierung des Gewebes für 10 Min bei -20 °C in vorgekühltem Aceton. Nach kurzer Trocknung der Objektträger unter dem Abzug wurden die Schnitte jeweils mit dem *PAP PEN Mini* eingekreist, damit die später erfolgende Benetzung mit Antikörpern während der Inkubationszeit nicht verfließen konnte. Anschließend standen die Schnitte für 5 Min in PBS. Falls notwendig (siehe spezifisches Färbeprotokoll), erfolgte nun die Blockade

der im Gewebe vorhandenen Bindungsstellen für den später verwendeten zweiten Antikörper. Die Inkubation des ersten, in einem kommerziellen Verdünnungsmedium mit hintergrundreduzierenden Eigenschaften (*Antibody-Diluent*) gelösten Antikörpers fand bei RT für 60 Min statt. Anschließend folgte ein dreimaliger Waschgang in PBS für je 5 Min, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper aus dem Gewebe zu entfernen. Die Schnitte wurden bei 4 °C über Nacht im Dunkeln mit dem zweiten, in PBS gelösten Antikörper bedeckt und anschließend wiederum dreimal für je 5 Min in PBS gewaschen. Die Inkubation der Kernfärbung mit DAPI dauerte 30 Min im Dunkeln, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS für je 5 Min. Die Eindeckung erfolgte blasenfrei unter Zuhilfenahme von *VectaShield Mounting Medium.*

Zum Schutz vor einer Austrocknung des Gewebes erfolgten alle Inkubationen mit Antikörpern in Feuchtkammern.

Als Negativkontrolle wurde ein weiterer Objektträger mit gleich behandelten Herzschnitten, auf denen statt des ersten Antikörpers nur *Antibody-Diluent* aufgetragen wurde, mitgeführt. Eine Positivkontrolle ist gegebenenfalls bei den jeweiligen Färbungen gesondert aufgeführt.

2.4.3.2 Spezifische Immunfärbeprotokolle

2.4.3.2.1 CD31 / Angiogenese

Angiogenese entwickelt sich unter anderem ausgehend von Endothelzellen. Zur Beurteilung der Gewebeerholung *post infarctionem* wurde als Marker für kapillare Endothelzellen eine anti-CD31-Färbung verwendet.

Vor der Inkubation des ersten Antikörpers wurde das Gewebe mittels vorgewärmtem Triton X (0,05%, in PBS) für 10 Min bei 37 °C permeabilisiert und anschließend dreimalig für 2 Min in PBS gewaschen.

Um die Zellen später zusätzlich in Bezug auf Hypertrophie untersuchen zu können, erfolgte vor der Kernfärbung (DAPI) weiterhin die Anfärbung der Zellgrenzen der Kardiomyozyten mit Weizenkeimlektin (WGA; in PBS) über 1 Std im Dunkeln.

Folgende Antikörper wurden in den beschriebenen Verdünnungen verwendet:

1. AK	PECAM-1 (MEC 13.3)	1 : 40	sc-18916, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
2. AK	goat anti-rat 555	1 : 400	MFP-A2434, MoBiTec GmbH, Göttingen, D
WGA	Alexa Flour 488	1 : 400	W11261, Invitrogen, Paisley, UK
Kerne	DAPI	1 : 200	D9542, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tab. 2.3 Antikörper der CD31-Immunfluoreszenz.

2.4.3.2.2 CD45 / Inflammation

CD45 wurde als transmembranäres Glykoprotein der hämatopoietischen Zellen, ausgenommen Erythrozyten, identifiziert. Als solches gilt es als Marker für Leukozyten und damit, im weiteren Sinn, von Inflammation.

Die hier nötige Blockade der Bindungsstellen für den zweiten Antikörper erfolgte für 30 Min mittels 10% NGS (in PBS). Als Positivkontrolle wurde der Schnitt einer Mausmilz mitgeführt.

Folgende Antikörper wurden in den beschriebenen Verdünnungen verwendet:

1. AK	CD45 (30-F11)	1 : 50	sc-53665, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
2. AK	goat anti-rat 555	1 : 400	MFP-A2434, MoBiTec GmbH, Göttingen, D
Kerne	DAPI	1 : 200	D9542, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tab. 2.4 Antikörper der CD45-Immunfluoreszenz.

2.4.3.2.3 CD68 / Makrophagen

CD68 ist ein glykosyliertes, lysosomales Membranprotein, das zusätzlich an der Zelloberfläche von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und NK-Zellen nachzuweisen ist. Der hier verwendete Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop eines makrophagenrestringierten CD68-Antigens und ist damit makrophagenspezifisch.

Zur 30-minütigen Blockade der Bindungsstellen des zweiten Antikörpers wurde ein spezieller *Blocking Mix* (s. u.) bei RT verwendet. Als Positivkontrolle wurde der Schnitt einer Mausmilz mitgeführt.

Folgende Antikörper und Reagenzien wurden in genannten Verdünnungen verwendet:

1. AK	CD 68 (PG-M1)	1 : 100	M0876, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
2. AK	goat anti-mouse 555	1 : 400	MFP-A2422, MoBiTec GmbH, Göttingen, D
Kerne	DAPI	1 : 200	D9542, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Blocking Mix:
5% FCS
1% BSA
0,05% Triton X
10 mM TRIS-HCl, pH= 7,5
100 mM $MgCl_2$
in aqua dest.

Tab. 2.5 Antikörper der CD68-Immunfluoreszenz.

2.4.3.2.4 TUNEL / Apoptose

Ein Kennzeichen der Apoptose ist die DNA-Zergliederung in Fragmente einer Länge von zirka 200 Basenpaaren (RASSOW 2008). Im Rahmen der *TdT-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Färbung bindet die Terminaldesoxynukleotidyltransferase (TdT) an die 3´-OH-Enden dieser Fragmente und fügt dort Polydesoxyuridylnukleotide an, an welche in weiteren Schritten eine Fluoreszinmarkierung angefügt wird. Sie bietet somit den Nachweis für gespaltene DNA und gilt als Marker für Apoptose (GAVRIELI et al. 1992).

Zur Bestimmung wurde ein kommerzielles Kit (*Inkubation Labeling Mix*) verwendet. Die Postfixation erfolgte analog zu den anderen verwendeten immunhistochemischen Färbemethoden, siehe Kapitel 2.4.3.1. Nach dem abschließenden Wässern für 5 Min in PBS wurden die Schnitte zur Permeabilisierung für 5 Min bei 400 W in der Mikrowelle mit 0,1 M Citratpuffer (pH=6,0) behandelt, im Folgenden kühlten sie 20 Min bei RT ab. Es folgten drei erneute Waschvorgänge in PBS für je 5 Min. Nun wurden die Schnitte für 60 Min bei 37 °C im Dunkeln mit dem *Inkubation Labeling Mix* inkubiert, drei weitere 5-minütige Waschgänge mit PBS schlossen sich an. Zur Kernfärbung wurde DAPI (1:200 in PBS) verwendet, überschüssige Lösung wurde in drei weiteren je 5-minütigen Waschgängen mit PBS entfernt. Das Eindecken erfolgte mithilfe von *VectaShield Mounting Medium*.

Als Positivkontrolle wurde der Schnitt eines Mausdarms mitgeführt.

Es wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Inkubation Labeling Mix (TUNEL)	11684795910	Roche Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, D
Kerne	DAPI (1:200)	D9542, Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Tab. 2.6 Antikörper der TUNEL-Färbung.

2.4.3.3 Auswertung

Nach Abschluss der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte innerhalb von 24 Std unter dem Fluoreszenzmikroskop in entsprechender Vergrößerung (CD45, CD68, TUNEL: 200-fach; CD31: 400-fach) mit dem Programm *Axio Vision* fotografiert, um eine Schwächung des Signals durch längere Lagerung auszuschließen. Die Deckgläschen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erreichen, wurde die Bildaufnahme standardisiert. So wurde von jedem Quadranten eines jeden der vier angefärbten Schnitte pro Maus ein Foto erstellt. Pro Maus ergaben sich damit 16 Fotos, die gleichwertig in die Auswertung mit einbezogen

wurden. Gleichzeitig wurde jeweils vermerkt, ob das Foto das Infarktgebiet oder die Peri-Infarktzone abbildete, um später genauere Ergebnisse darstellen zu können. Die Belichtungszeit war in dem jeweiligen Kanal für alle Fotos einer Färbung einheitlich.

Zur Auswertung der Färbung wurden nur solche Zellen/Zellkerne quantifiziert, welche „doppelt positiv“ waren, bei denen sich also sowohl ein positives Signal des zweiten Antikörpers fand, als auch sich ein zugehöriger Zellkern mittels DAPI im Fluoreszenzlicht anfärben ließ. Dies schloss aus, dass eventuelle falsch positive Signale mit in die Wertung einbezogen wurden. Die Zellen wurden ausgezählt, die Anzahl (pro Gesichtsfeld) wurde mit dem entsprechenden Faktor (6,7 für 200x) multipliziert, um die Anzahl der doppelt positiven Zellen pro mm^2 zu ermitteln. Außerdem erfolgte die Auswertung getrennt für Infarktgebiet und Periinfarktzone.

Um die Zellgröße der Kardiomyozyten vergleichen zu können, waren im Zuge der anti-CD31-Färbung zusätzlich die Zellgrenzen angefärbt worden. Auf den angefertigten Fotos wurden später jeweils zehn zufällig gewählte Einzelkardiomyozyten pro Bild manuell umfahren, mit Hilfe des Programms *Image Pro Plus* wurden der kleinste Zelldurchmesser (sog. Kurzachsen-Durchmesser), der größte Zelldurchmesser (sog. Längsachsen-Durchmesser) und die Zellfläche berechnet. Diese wurden für jede Maus gemittelt und zwischen den Gruppen verglichen.

2.5 Proteinnachweis

Um die Expression bzw. Phosphorylierung von Proteinen im Herzgewebe nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zunächst wurden die Proteine mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entlang eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine im Western Blot von diesem Gel auf eine Membran übertragen, um dort später mit speziellen Antikörpern detektiert zu werden.

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.5.1.1 Proteinvorbereitung

Das Protein wurde aus den bei -80 °C gelagerten Herzen gewonnen. Mit einem Hammer wurden die Proben grob zerkleinert, mit 1 ml Lysepuffer in ein Eppendorfgefäß gefüllt und dann in einem Homogenisator aufgespalten. Auf Eis wurden die Proben 20 Min weiter lysiert.

Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamtproteinmenge mittels des *Bicinchoninic Acid* (BCA) - Assays wurden 25 µl einer 1:10 in aqua dest. verdünnten Probe – genau wie eine Standard-Albumin-Reihe (2000 – 3,9 µg/ml) – jeweils mit dem BCA-Reagenz auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 30 Min bei 37 °C. Im Anschluss wurde der Proteingehalt bei 562 nm im Plattenfotometer gemessen und als Konzentration (µg/ml) notiert.

2.5.1.2 Vorbereitung und Gießen der Gele

Nachdem die zwei Glasplatten in die vorgesehene Halterung eingesetzt worden waren, wurde das Trenngel zwischen die Platten gegossen und vorsichtig mit 1 ml Isopropanol überschichtet, damit sich eine gerade obere Kante bildete. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde Isopropanol abgegossen und die Kante mit aqua dest. gespült. Das vorbereitete Sammelgel wurde luftblasenfrei über das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesteckt. Das Gel härtete über weitere 20 Min aus.

2.5.1.3 Probenvorbereitung

Während dieser Zeit wurden die Proben vorbereitet. Ziel war es, in jede Geltasche sowohl äquivalente Volumina als auch äquivalente Proteinmengen zu pipettieren. Hierfür wurden äquivalente Proteinmengen aller Proben (50 µg) jeweils mit aqua dest. auf das gleiche Volumen aufgefüllt und danach mit dem gleichen Volumen 2x Lämmli-Puffer versetzt. Pro Gel wurde ebenfalls eine Markerprobe (*Precision Plus Protein Standard*) mitgeführt, um später bei der Auswertung des Blots die Größe der Banden bestimmen zu können. Alle Proben wurden bei 100 °C für 5 Min erhitzt und damit denaturiert, für 2 Min auf Eis gestellt und zum Abschluss kurz abzentrifugiert.

2.5.1.4 Gelbeladung und Lauf

Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Nachdem die Box mit Laufpuffer befüllt war, wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen wurden kontrolliert. Zum Aufstellen der Stege konnte mit Puffer gespült werden. Es folgte das Auftragen des Markers (links) und der Proben.

An die mit dem Deckel verschlossene Kammer wurde nun Strom angelegt. Die Elektrophorese begann mit einer Spannung von 140 V. Sobald sich die Proben am Übergang

zwischen Sammel- und Trenngel vereinigt hatten, wurde die Spannung auf 200 V gesteigert. Der Lauf wurde durch Abschalten der Stromquelle gestoppt, sobald sich der für die entsprechenden Proteine erwartete Größenbereich sauber aufgetrennt hatte. Die Glasplatten wurden vorsichtig aus der Halterung entfernt und voneinander getrennt.

2.5.2 Western Blot

Das Gel wurde sauber von der Glasplatte geschnitten und in 1x Transferpuffer geschwenkt. Des Weiteren wurden auch zwei Schwämmchen, zwei Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in 1x Transferpuffer getränkt. Die Beladung des Halters erfolgte in nachstehender Reihenfolge: Schwämmchen, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Schwämmchen. Eventuelle Luftblasen wurden vorsichtig ausgestrichen. Der Halter wurde in die Blotapparatur (*Mini Protean III*) eingehängt, ein Kühlelement eingesetzt und 1x Transferpuffer bis zum oberen Rand eingefüllt. Unter Beachtung der Farbmarkierung wurde der Deckel aufgesetzt und die Apparatur erneut an Strom angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgte über 60 Min bei 100 V. Nach diesem sog. Blot wurde die Membran aus dem Halter entfernt und kurz in *Ponceau S* geschwenkt, um einen erfolgreichen und gleichmäßigen Proteintransfer zu überprüfen. Die rote Färbung wurde durch Waschen in aqua dest. wieder entfernt.

2.5.3 Antigen-Detektion

Zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran für 2 Std in Blockpuffer geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 1x TBS-T + 1% BSA über Nacht auf einem Wippschüttler (22 osc/ min) bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimalig mit 1x TBS-T + 1% BSA gewaschen, danach mit dem Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung für 1 Std bei RT inkubiert. Abschließend folgten drei weitere gründliche Waschschritte in 1x TBS-T.

2.5.4 Entwicklung

Für die Entwicklung der Membran wurde das *SuperSignal Chemiluminescent Substrate* genutzt. Hierzu wurden gleiche Teile der beiden Kit-Reagenzien kurz vor ihrer Verwendung gemischt, auf die Membran gegeben und dort für 5 Min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelagert, eventuell verbliebene Lösung wurde mithilfe von Filterpapier vorsichtig entfernt. In der Dunkelkammer wurden Membran und ein

Röntgenfilm in die Expositionskassette eingelegt und lichtundurchlässig verschlossen. Nach entsprechender Expositionszeit wurde der Film in der Entwicklungsmaschine entwickelt. Verschiedene Expositionszeiten ermöglichten die Variation der Bandenstärke und damit ein optimales Ergebnis.

2.5.5 Stripping

Um die Proben optimal auszunutzen, erfolgte anschließend ein Stripping der Membran. Hierbei wurden – nach einem 4-minütigen Waschgang in aqua dest. – die gebundenen Antikörper durch 4-minütige Inkubation in 0,2 M NaOH von der Membran gewaschen, gefolgt von einem weiteren Waschgang in aqua dest.. Hiernach konnte das oben beschriebene Protokoll mit der 2-stündigen Inkubation des Blockpuffers wieder aufgenommen werden.

2.5.6 Immunpräzipitation

Zur Anreicherung gering konzentrierter Proteine wurde für den Nachweis des phosphorylierten IRS-1 vor der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine Immunpräzipitation durchgeführt.

Mit dieser Methode gelingt es, das entsprechende Protein in geringem Volumen anzureichern und damit seine Konzentration zu erhöhen, um innerhalb des Western Blot das Ergebnis zu optimieren. Die zu analysierende Probe wird zunächst mit einem Antikörper versetzt, um eine Antikörper-Antigen-Bindung zu erzeugen. Weiterhin werden mit Protein A versetzte Sepharose-Beads hinzugefügt, die an den F_c-Teil des Antikörpers – und damit im weiteren Sinn an das Antigen – binden. Die Isolierung dieser Komplexe erfolgt über Zentrifugation und mehrere Waschschritte, um unspezifische Proteine zu entfernen. Die isolierten Proteine werden durch Denaturierung von den Beads gelöst und über einen Western Blot nachgewiesen.

Zunächst wurden jeweils alle Proben einer Gruppe gepoolt und die entstandene Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (s. Kapitel 2.5.1.1) gemessen. Im Anschluss wurde für jede Gruppe 4 mg Protein mit 10 µl Antikörper versetzt, mit Lysepuffer auf 1 ml aufgefüllt und bei 4 °C auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach 2 Std wurden 100 µl der Beads *(nProtein A Sepharose 4)* hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Im Anschluss folgte eine kurze Zentrifugation (max. 1 Min) zur Anreicherung der Komplexe in der unteren Phase. Der Überstand mit unspezifischem Protein wurde abpipettiert und durch neuen Lysepuffer ersetzt. Zentrifugation und Waschgang wurden dreimal wiederholt. Die Komplexe wurden mit 50 µl

2x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Min auf 95 °C erhitzt, um die Proteine durch Denaturierung von den Beads zu lösen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das in der Lämmli-Phase vorliegende Protein in die Taschen des SDS-Gels transferiert, der Proteinnachweis wurde wie oben beschrieben fortgeführt.

2.5.7 Verwendete Antikörper

Antikörper	Art.-Nummer	Proteingröße	Firma
p-AKT (Ser473)	9271	60 kDa	Cell Signaling Technology, Inc.
p-AKT (Thr308)	4056	60 kDa	Cell Signaling Technology, Inc.
AKT	9272	60 kDa	Cell Signaling Technology, Inc.
p-PI3K p85(Tyr458)/ p55(Tyr199)	4228	60, 85 kDa	Cell Signaling Technology, Inc.
PI3K p85	4257	85 kDa	Cell Signaling Technology, Inc.
p-IRS-1(Ser307)	05-1087	185 kDa	Millipore, Schwalbach,Ts, D
IRS-1	05-1085	185 kDa	Millipore, Schwalbach,Ts, D
IRS-1 (IP)	16-146	165 kDa	Millipore, Schwalbach,Ts, D
GAPDH	5G4	36 kDa	Hy Test Ltd., Turku, Finland
ECL Rabbit IgG	NA9340		GE Healthcare Bio Sciences Corp. München, D
ECL Mouse IgG	NA9310		GE Healthcare Bio Sciences Corp. München, D

Tab. 2.7 Antikörper des Western Blot. Die Antikörper der Firma *Cell Signaling Technology, Inc.* wurden über *New England Biolabs GmbH* (Frankfurt a.M., D) bezogen.

Die Verdünnung der ersten Antikörper betrug 1:1000 in 1x TBS-T + 1% BSA. Die zweiten Antikörper wurden im Verhältnis 1:3000 in 1x TBS-T + 1% BSA verdünnt.

Für den GAPDH-Nachweis wurden sowohl erster als auch zweiter Antikörper 1:20000 in 1x TBS-T + 1% BSA verdünnt, die Inkubationszeit der Antikörper betrug jeweils 1 Std bei RT.

2.5.8 Auswertung

Der entwickelte Film wurde passend über die Membran gelegt. Mithilfe des Markers konnte so eine Aussage über die Größe der Proteine in den nachgewiesenen Banden getroffen werden. Es folgte eine densitometrische Quantifizierung der Proteinexpression aller benötigten Banden.

Zum Beweis der äquivalenten Proteinmengen der eingesetzten Proben wurde für jede Membran auch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen, um

jedes Protein gegen GAPDH abgleichen zu können. Nach Abgleich der spezifischen Signale gegen die Proteinmenge der Probe (gemessen durch die GAPDH-Expression), wurde der Phosphorylierungsgrad aller Proteine als Quotient des phosphorylierten zu unphosphoryliertem Protein bestimmt.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Die statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden bei zwei zu vergleichenden Gruppen mittels *paired* (für verbundene Proben, z. B. Vergleich des Echo nach Infarktinduktion mit dem vor Infarktinduktion) oder *unpaired* (für unverbundene Proben, z. B. Vergleich Echo Gruppe HFD mit Gruppe KD) *student´s t-test* verglichen. Waren mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde der ANOVA-Test, gefolgt von *Bonferroni´s Multiple Comparison Test*, verwendet. Unterschiede galten ab einem Wahrscheinlichkeitswert von $P<0,05$ als signifikant. Angegeben sind jeweils arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler (SEM).

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswirkungen von Übergewicht auf die kardiale Hypertrophie der Maus

Ziel des ersten Versuchsabschnittes war die Untersuchung des Einflusses von Übergewicht auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei der Maus.

Es sei erwähnt, dass alle auf invasiven Methoden beruhenden Ergebnisse (wie histologische Analysen, Serumparameter, Western-Blot-Analysen) aufgrund des Versuchsaufbaus nicht wie die nicht-invasiven Daten (echokardiographische Untersuchung, Körpergewicht) nach neun Wochen Hochfettdiät, sondern erst nach zwölf Wochen Hochfettdiät und zusätzlich drei Wochen nach einer *sham*-OP gewonnen wurden. Der Zeitpunkt der Datengewinnung ist jeweils beschrieben.

3.1.1 Einfluss von Hochfettdiät auf Körpergewicht und metabolische Serumparameter der Maus

3.1.1.1 Körper- und Fettgewicht

Zur Beobachtung der Veränderung des Körpergewichts unter Hochfettdiät wurden die Mäuse einmal wöchentlich gewogen. Die Entwicklung des Körpergewichts in den ersten neun Wochen (prä-MI) ist in Abb. 3.1 dargestellt.

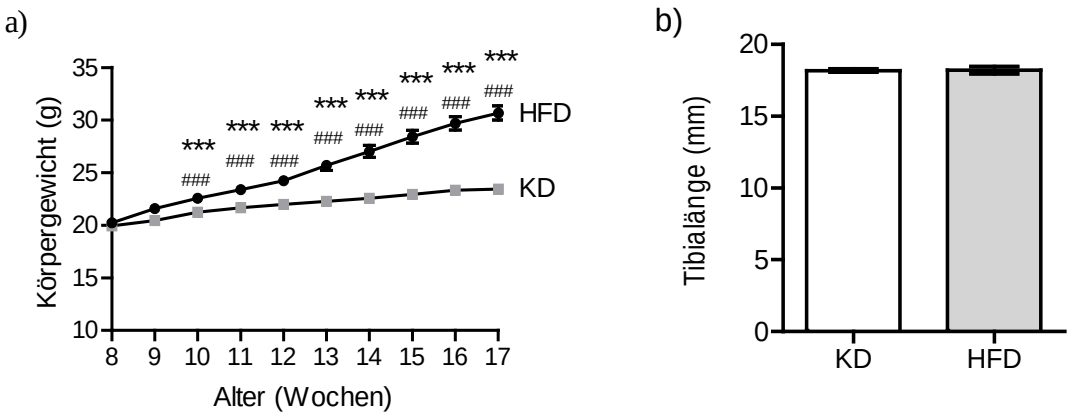

Abb. 3.1 a) Entwicklung des Körpergewichts. Bereits nach einer Woche Hochfettdiät bestand ein signifikanter Gewichtsunterschied sowohl zwischen Versuchs- (HFD) und Kontrollgruppe (KD) (P^{***}<0,001) als auch zum Ausgangsgewicht ($P^{###}$ <0,001). **b) Vergleich der Tibialänge.** Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Tibialänge der Mäuse (bei Versuchsende).

Fütterung mit Hochfettdiät führte bereits nach einer Woche zu signifikanter Gewichtszunahme der Mäuse (21,6 ± 0,20 g) sowohl im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (20,4 ± 0,15 g, $P<0{,}001$), als auch im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht (20,2 ± 0,16 g, $P<0{,}001$). Im Verlauf von neun Wochen entwickelten die Hochfettdiät-gefütterten Mäuse ein Gewicht von 30,7 ± 0,68 g. Die Kontrolldiät-gefütterten Mäuse wogen dagegen neun Wochen nach Beginn des Versuchs 23,4 ± 0,19 g.

Die fehlende Differenz der Tibialängen spricht dafür, dass die Gewichtszunahme ausschließlich auf eine Zunahme des Körperumfangs, nicht jedoch auf eine unterschiedliche Körperlänge der Maus zurückzuführen ist.

Die intraabdominellen Fettdepots der Hochfettdiät-gefütterten Tiere (1569 ± 204 mg) waren nach zwölf Wochen Diät signifikant ($P<0{,}001$) schwerer als die der Kontrolltiere (252 ± 34,2 mg).

3.1.1.2 Messungen im Serum

Im Serum der *sham*-operierten Mäuse wurden nach zwölf Wochen Diät Nüchtern-Glukose-, -Insulin- und -Leptinspiegel gemessen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 3.2 zusammengefasst.

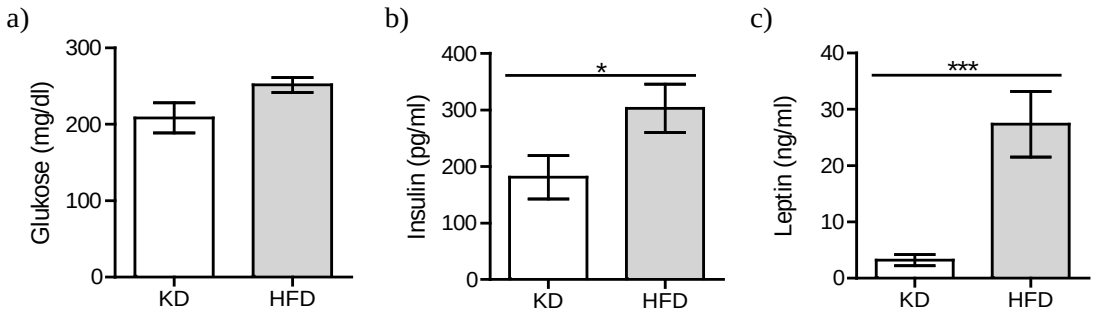

Abb. 3.2 Serumwerte der *sham*-operierten Mäuse nach zwölf Wochen Diät. Die Werte für **b) Insulin** und **c) Leptin** waren signifikant verändert, die Änderung des **a) Glukosespiegels** war statistisch nicht signifikant ($P^{*}<0{,}05$; $P^{***}<0{,}001$).

Die Hochfettdiät-gefütterten Mäuse zeigten in ihren Blutwerten leicht, jedoch nicht signifikant erhöhte Glukosespiegel (251 ± 9,7 vs. 208 ± 19,7 mg/dl, $P=0{,}065$). Dagegen war der Insulinspiegel der Tiere signifikant (303 ± 42,9 vs. 181 ± 38,3 pg/ml, $P<0{,}05$) erhöht, passend zu einer beginnenden Insulinresistenz.

Die Serumleptinwerte der Hochfettdiät-gefütterten Mäuse waren ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe nach zwölf Wochen Diät signifikant (27,4 ± 5,8 vs. 3,2 ± 0,99 ng/ml,

P<0,001) erhöht. Dies steht im Einklang mit der erhöhten abdominellen Körperfettmasse der Hochfettdiät-gefütterten Tiere.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Induktion des Modells einer übergewichtigen Maus gelungen ist.

3.1.2 Einfluss von Übergewicht auf kardiale Parameter der Maus

3.1.2.1 Echokardiographie

Nach neun Wochen Hochfettdiät wurden echokardiographisch die Entwicklung einer Myokardhypertrophie, der Kammergrößen und der linksventrikulären Pumpfunktion dokumentiert. Die gemessenen bzw. berechneten Parameter sind in Tab. 3.1 dargestellt.

		vor Diät	***P***	**HFD**	***P***	**NC**
		9 Wochen	**← →**	**17 Wochen**	**← →**	**17 Wochen**
B-Mode	**HR,** */min*	524,3 ± 9,2	0,069	502 ± 6,0	0,870	503 ± 6,1
	HW, *mg*	86,1 ± 1,8	**0,007**	94,7 ± 1,6	**0,033**	89,2 ± 2,0
	EF,%	44,6 ± 1,8	0,183	41,8 ± 1,00	0,298	40,4 ± 0,96
	FAS,%	40,1 ± 1,6	0,120	37,0 ± 0,98	0,202	35,2 ± 0,95
	FS,%	22,0 ± 1,4	0,375	20,6 ± 0,73	0,667	20,2 ± 0,66
	long axis s, *mm*	7,2 ± 0,13	0,351	7,3 ± 0,06	0,681	7,4 ± 0,06
	long axis d, *mm*	7,8 ± 0,08	0,205	8,0 ± 0,06	0,457	8,0 ± 0,05
	Area s, mm^2	6,7 ± 0,29	0,084	7,2 ± 0,13	**0,003**	7,9 ± 0,20
	Area d, mm^2	11,1 ± 0,34	0,399	11,4 ± 0,14	**0,001**	12,2 ± 0,19
	Epi s, mm^2	18,0 ± 0,31	**0,002**	19,4 ± 0,20	0,955	19,4 ± 0,31
	Vol s, mm^3	40,2 ± 2,2	0,088	43,9 ± 0,95	**0,006**	48,9 ± 1,5
	Vol d, mm^3	72,3 ± 2,6	0,211	75,6 ± 1,2	**0,003**	81,5 ± 1,6
	LVIDs, *mm*	3,1 ± 0,08	0,104	3,2 ± 0,04	**0,023**	3,4 ± 0,05
	LVIDd, *mm*	4,0 ± 0,07	0,148	4,1 ± 0,03	**0,004**	4,2 ± 0,04
	AWThs, *mm*	0,93 ± 0,02	0,117	0,97 ± 0,01	**<0,001**	0,89 ± 0,02
	PWThs, *mm*	0,91 ± 0,03	0,387	0,93 ± 0,01	**0,002**	0,86 ± 0,02
	AWThd, *mm*	0,66 ± 0,01	0,051	0,70 ± 0,01	**<0,001**	0,65 ± 0,01
	PWThd, *mm*	0,65 ± 0,01	0,172	0,68 ± 0,01	**<0,001**	0,62 ± 0,01
	AWThF,%	28,5 ± 1,5	0,546	27,4 ± 0,88	0,936	27,3 ± 0,77
	PWThF,%	27,2 ± 2,6	0,747	26,5 ± 0,94	0,792	26,9 ± 1,3
M-Mode	**FS,%**	27,1 ± 1,3	0,076	24,1 ± 0,82	0,787	24,4 ± 0,70
	LVIDs, *mm*	2,9 ± 0,09	0,159	3,0 ± 0,04	0,106	3,1 ± 0,05
	LVIDd, *mm*	3,9 ± 0,06	0,844	4,0 ± 0,03	**0,007**	4,1 ± 0,04
	AWThs, *mm*	0,96 ± 0,03	**0,001**	1,1 ± 0,02	0,052	1,0 ± 0,03
	PWThs, *mm*	0,96 ± 0,03	0,840	0,95 ± 0,02	0,151	0,91 ± 0,02
	AWThd, *mm*	0,66 ± 0,03	**0,003**	0,77 ± 0,02	0,062	0,72 ± 0,02
	PWThd, *mm*	0,62 ± 0,02	**0,005**	0,71 ± 0,01	**0,001**	0,64 ± 0,01

AWThF,%	30,8	±	1,6	0,643	29,7	±	1,1	0,845	30,0	±	1,1
PWThF,%	35,2	±	1,7	**<0,001**	25,6	±	1,3	**0,011**	29,8	±	0,97

Tab. 3.1 Darstellung der echokardiographischen Ergebnisse vor sowie neun Wochen nach Beginn der Hochfettdiät. Verglichen mit der Kontrollgruppe waren nach neun Wochen Fütterung mit Hochfettdiät im B-Mode vordere und hintere Wanddicke (AWTh, PWTh) sowie der linksventrikuläre Durchmesser (LViD) und die das Endokard umschreibende Fläche (Area) signifikant verändert. In Bezug auf die Herzfunktion waren keine signifikanten Veränderungen zu finden. Abkürzungen siehe **Tab. 2.2**.

Übergewicht führte zu statistisch signifikanten Veränderungen am Herzen. So waren z. B. im B-Mode die Vorder- und Hinterwanddicke sowie das Herzgewicht bei den Hochfettdiät-gefütterten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dabei waren der linksventrikuläre Durchmesser sowie die das Endokard umschreibende Fläche, genau wie das Volumen des linken Ventrikels, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt.

3.1.2.2 Größenveränderungen des Kardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob Übergewicht auch eine Hypertrophie auf Ebene der Kardiomyozyten auslöste, wurden mit Hilfe von WGA-Lectin an einigen Gewebeschnitten die Zellgrenzen der Kardiomyozyten angefärbt. Ausgemessen wurden jeweils der Kurzachsen-Durchmesser, der Längsachsen-Durchmesser, sowie die zweidimensionale Zellfläche. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3 dargestellt.

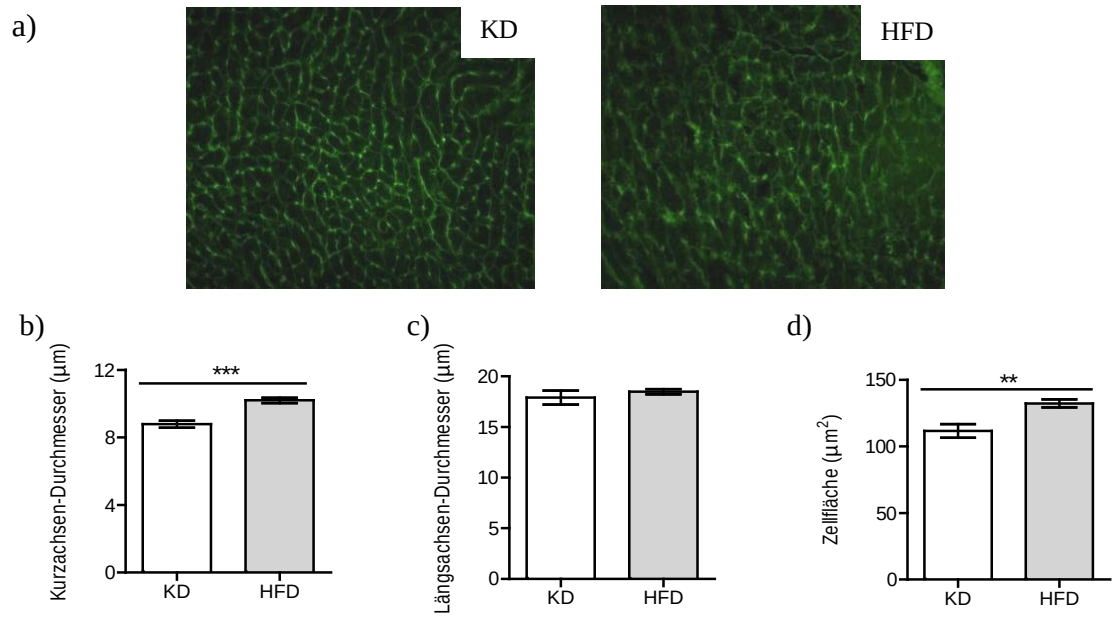

Abb. 3.3 a) Repräsentative Fotos der WGA-Schnitte einer Kontrolldiät- und einer Hochfettdiät-gefütterten Maus. **b) Kurzachsen-Durchmesser, c) Längsachsen-Durchmesser, d) Zellfläche** der Kardiomyozyten (*P***<0,01; *P****<0,001).

Hochfettdiät führte zu einer hoch signifikanten Größenzunahme einzelner Kardiomyozyten im Kurzachsen-Durchmesser (10,2 ± 0,16 vs. 8,8 ± 0,21 µm, *P*<0,001) sowie zu einer signifikant

erhöhten Zellfläche (132 ± 7,99 vs. 111 ± 14,48 µm^2, P<0,01). Bei der Messung des Längsachsen-Durchmessers konnten keine Unterschiede beobachtet werden.

3.1.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Nach zwölf Wochen Hochfettdiät wurde den Mäusen für molekularbiologische Untersuchungen das Herz entnommen. Mittels Proteinanalysen wurde die Aktivierung der Signaltransduktion unterhalb des Insulinrezeptors untersucht. Die Western-Blot-Analysen führten zu den nachstehenden Ergebnissen.

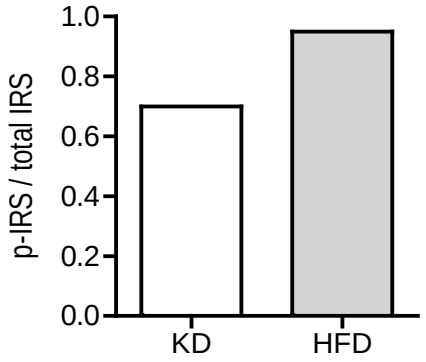

Abb. 3.4 Phosphorylierung von IRS.

Abb. 3.4 zeigt eine vermehrte Serin-Phosphorylierung von IRS nach neunwöchiger Fütterung von Kontroll- bzw. Hochfettdiät. Die Messung erfolgte an gepooltem Protein mehrerer Mäuse. Da somit die Proben aller Mäuse in einer Messung zusammengefasst worden waren, war eine Signifikanzermittlung nicht möglich.

Im Anschluss wurde die Phosphorylierung der als direktes Effektormolekül der verschiedenen Membranrezeptoren dienenden PI3K1A untersucht. Dabei wurden die phosphorylierten regulatorischen Untereinheiten p85 und p55 nachgewiesen. Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse des Western Blot.

Zwischen den Gruppen KD und HFD waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Tendenziell fiel die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheiten der PI3K1A durch Übergewicht eher ab.

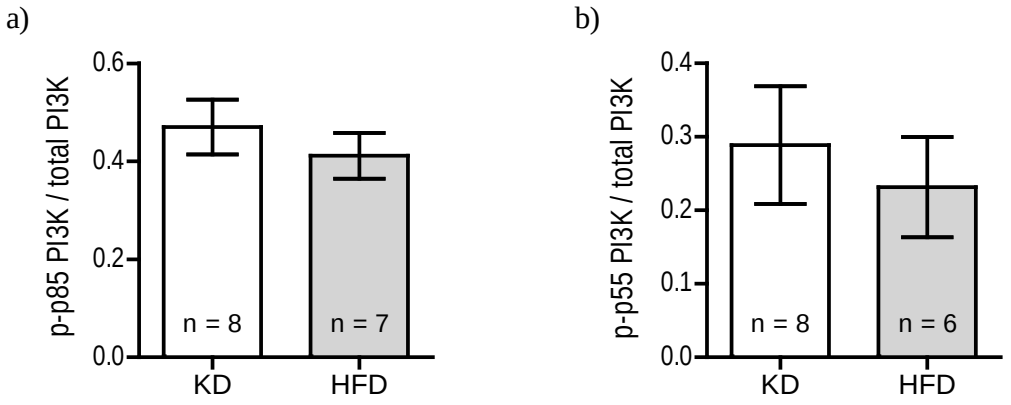

Abb. 3.5 Kardiale PI3K1A-Phosphorylierung bei Übergewicht. Es ergab sich keine statistische Signifikanz.

Im Folgenden sollten diese Ergebnisse durch einen Blot der AKT (s. Abb. 3.6), welche unter anderem von PI3K1A aktiviert wird, unterstützt und bestätigt werden.

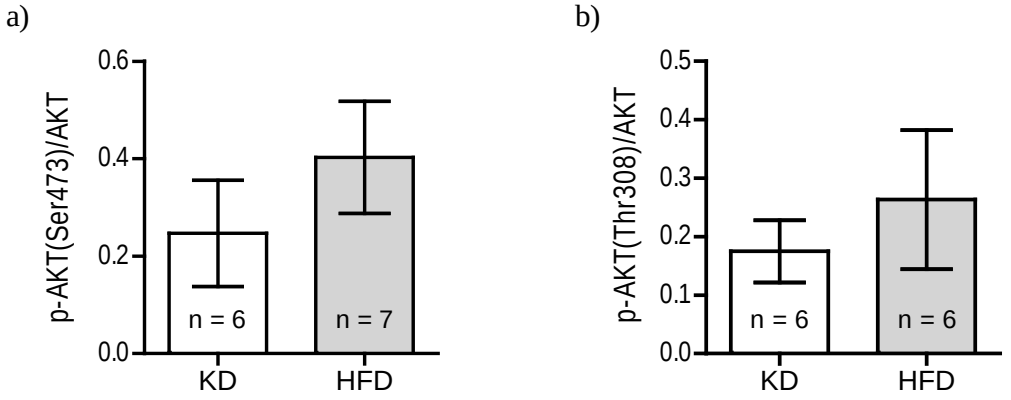

Abb. 3.6 Kardiale AKT-Phosphorylierung bei Übergewicht. Es fanden sich keine statistischen Signifikanzen.

Auch bei der AKT-Phosphorylierung fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, auch wenn Tendenzen zu einer erhöhten AKT-Phosphorylierung in HFD-Tieren zu erkennen waren.

Somit schien ein durch zwölf Wochen Hochfettdiät erzeugtes Übergewicht keinen signifikanten Einfluss auf die kardiale Phosphorylierung der PI3K1A- oder AKT-Aktivität zu haben, obwohl eine tendenzielle Zunahme zu einer vermehrten AKT-Phosphorylierung bei HFD-gefütterten Mäusen zu erkennen war.

Um zu überprüfen, ob die tendenziell erhöhte AKT-Phosphorylierung eventuell über andere Wege vermittelt wurde, wurde im Folgenden die Phosphorylierung der PI3K1B untersucht (s. Abb. 3.7).

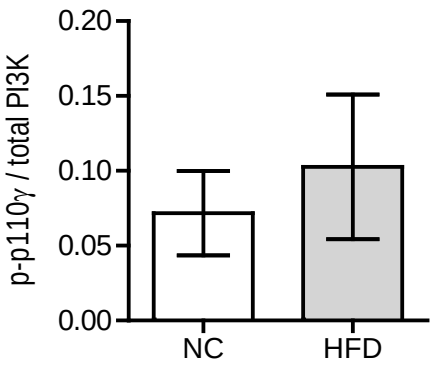

Abb. 3.7 Kardiale Phosphorylierung der PI3K1B bei Übergewicht. Es fanden sich keine statistischen Signifikanzen.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings schien Hochfettdiät die Phosphorylierung der PI3K1B tendenziell zu erhöhen.

3.2 Auswirkungen von Übergewicht auf die myokardialen Umbauvorgänge nach Ischämie

Um den Effekt des Übergewichts auf die Regeneration des Herzens nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde neun Wochen nach Beginn der Hochfettdiät bei 45 von 80 Mäusen ein experimenteller Myokardinfarkt induziert. Drei Wochen später folgte die Gewebeentnahme für histologische und molekularbiologische Untersuchungen.

3.2.1 Sterblichkeit

Intraoperativ verstarben insgesamt sechs von 80 Mäusen: jeweils zwei aus den Gruppen Kontrolldiät/*sham*-OP (KD S), Kontrolldiät/Myokardinfarkt (KD MI), Hochfettdiät/Myokardinfarkt (HFD MI). Aus der Gruppe Hochfettdiät/*sham*-OP (HFD S) verstarb keine Maus während der Operation. Die postoperative Überlebenskurve ist in Abb. 3.8 dargestellt.

Das postoperative Überleben unterschied sich in den einzelnen Gruppen nicht.

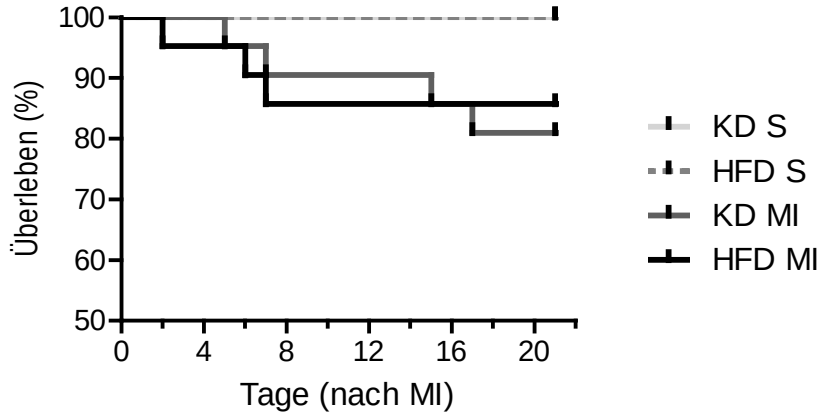

Abb. 3.8 Kaplan-Meier-Kurve (postoperativ). Keine der Kontrolldiät/- und Hochfettdiät/*sham*-operierten Mäuse (KD S/HFD S) verstarb in den der Operation folgenden drei Wochen. In der Gruppe Kontrolldiät/Myokardinfarkt (KD MI) verstarben postoperativ vier von 22 Mäusen (18,2%), von den 21 Tieren der Gruppe Hochfettdiät/Myokardinfarkt (HFD MI) verstarben postoperativ drei Tiere (14,3%).

Der Gewichtsverlauf über den gesamten Versuch hinweg ist in Abb. 3.9 dargestellt.

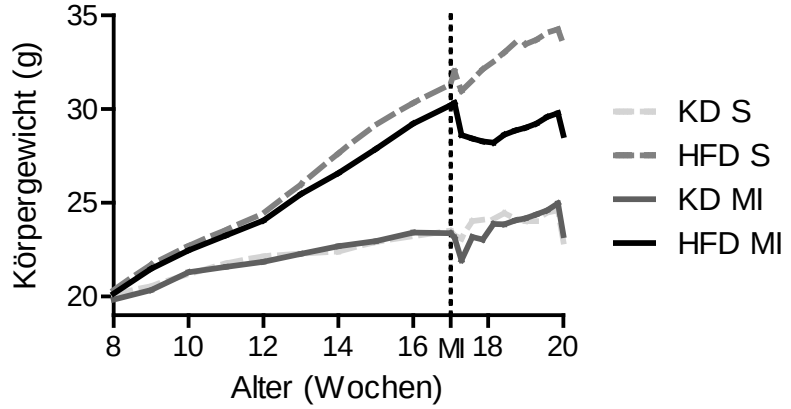

Abb. 3.9 Gewichtsverlauf aller Gruppen über den Zeitraum des gesamten Tierversuchs.

Das Gewicht der Tiere stagnierte kurz nach der Operation für bis zu zwei Tage, die Myokardinfarkt-operierten Tiere verloren in dieser Zeit bis zu 2 g an Gewicht. Ab dem dritten postoperativen Tag nahmen die Tiere vergleichbar zu den präoperativen Raten weiter an Gewicht zu. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme erreichten die Tiere aller Gruppen ihr Maximalgewicht (KD S: 24,6 ± 1,6 g, HFD S: 34,3 ± 6,1 g, KD MI: 25,0 ± 1,4 g, HFD MI: 29,8 ± 5,3 g).

3.2.2 Herzgewicht und Infarktgröße

Das Herzgewicht der Myokardinfarkt-operierten Mäuse war signifikant höher als das der *sham*-operierten Mäuse (nicht gezeigt). Um durch Größenunterschiede der Mäuse verursachte

Schwankungen auszugleichen, wurde der Quotient aus Herzgewicht und Tibialänge gebildet (s. Abb. 3.10).

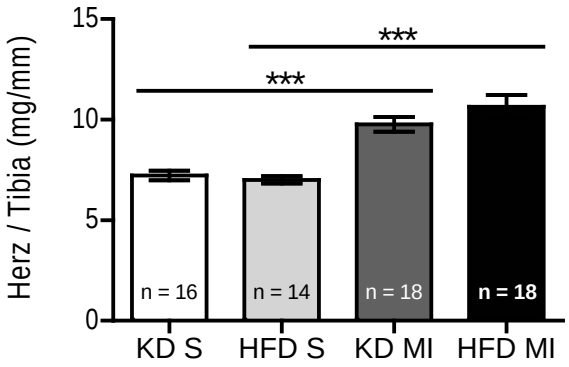

Abb. 3.10 Herzgewicht / Tibialänge. Die infarzierten Herzen waren unter Berücksichtigung der Mausgröße signifikant schwerer als die der *sham*-operierten Mäuse (*P****<0,001).

Es zeigte sich, dass dieser Quotient unabhängig vom Fettgehalt des Futters bei den Infarkt-operierten Mäusen signifikant höher als bei den *sham*-operierten Mäusen war (HFD MI: 10,6 ± 0,58 mg/mm vs. HFD S: 7,0 ± 0,18 mg/mm, *P*<0,001; KD MI: 9,8 ± 0,37 mg/mm vs. KD S: 7,2 ± 0,24 mg/mm; *P*<0,001).

Zur Beurteilung der Infarktgröße wurde die nach Masson-Trichrom blau angefärbte Infarktnarbe ausgemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 dargestellt.

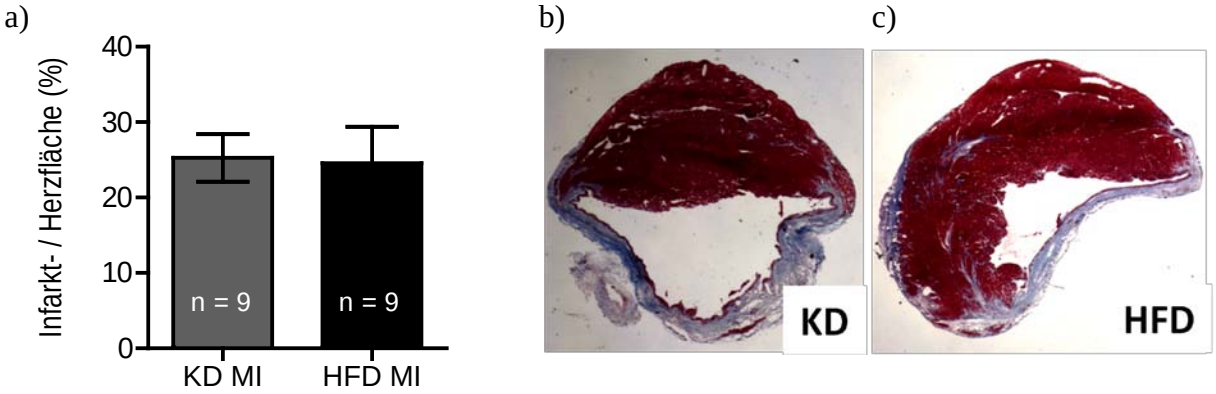

Abb. 3.11 Fibroseanteil der Herzen, nachgewiesen durch Masson-Trichrom-Färbung. Der Infarktanteil am Herzgewebe war in beiden Gruppen etwa gleich groß. Repräsentative Bilder einer **b) Kontrolldiät-** und einer **c) Hochfettdiät**-gefütterten Maus.

Die Größe der Infarktnarbe der beiden Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied (KD MI: 25,3 ± 3,2% vs. HFD MI: 24,5 ± 4,8%). Es waren hiermit gleiche Ausgangsbedingungen für alle folgenden Untersuchungen geschaffen.

3.2.3 Echokardiographie

Die Ergebnisse der Echokardiographie drei Wochen *post infarctionem* sind in Abb. 3.12 dargestellt. Die während der Diastole (und Systole, hier nicht gezeigt) gemessene Fläche der infarzierten Herzen war signifikant größer als die der *sham*-operierten Herzen (HFD MI: 24,3 ± 0,96 mm^2 vs. HFD S: 11,5 ± 0,41 mm^2, P<0,001; KD MI: 25,6 ± 1,3 mm^2 vs. KD S: 11,9 ± 0,35 mm^2, P<0,001). Darüber hinaus wiesen die Herzen ein signifikant erhöhtes Volumen sowohl in Diastole als auch Systole (nicht gezeigt) auf (HFD MI: 182 ± 8,6 mm^3 vs. HFD S: 74,9 ± 2,9 mm^3, P<0,001; KD MI: 190 ± 10,9 mm^3 vs. KD S: 78,3 ± 2,6 mm^3, P<0,001). Aus beiden Parametern lässt sich die Dilatation der Ventrikel ableiten. Die reduzierte Flächenverkürzungsfraktion wies eine Funktionsminderung der infarzierten Herzen nach (HFD MI: 17,7 ± 1,2% vs. HFD S: 39,8 ± 1,7%, P<0,001; KD MI: 19,7 ± 1,3% vs. KD S: 33,9 ± 1,3%, P<0,001).

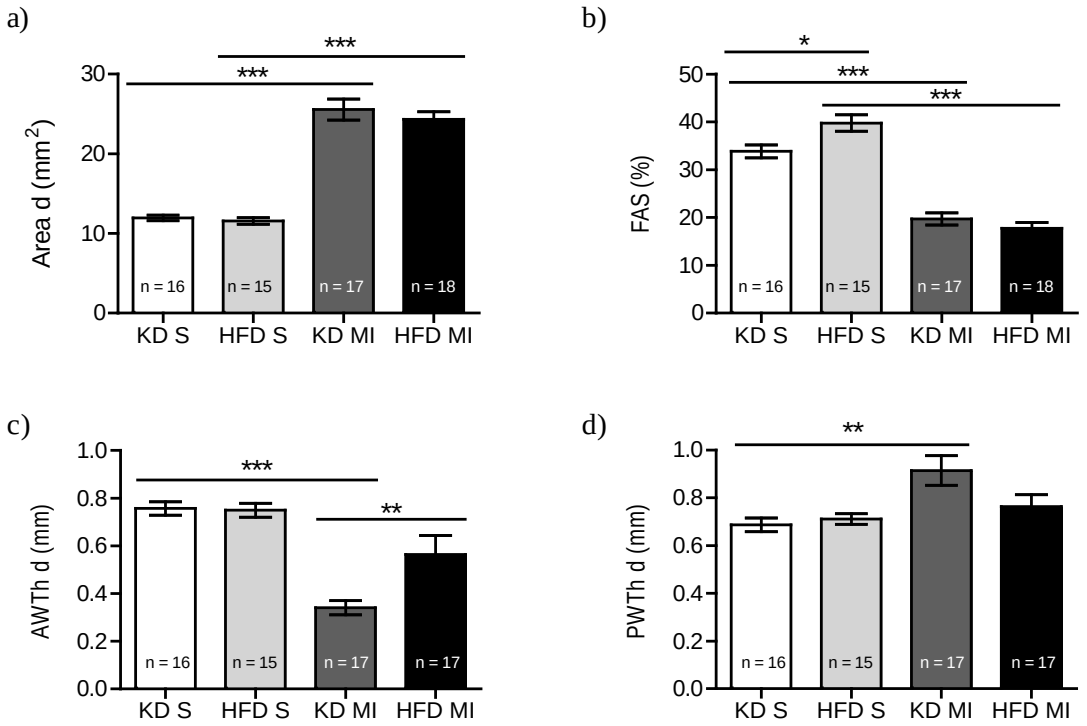

Abb. 3.12 a) Fläche des linken Ventrikels in Diastole. b) linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion. c) Vorderwanddicke in Diastole, M-Mode. **d) Hinterwanddicke in Diastole,** M-Mode (P*<0,05; P**<0,01; P***<0,001).

Der induzierte Vorderwandinfarkt konnte über die Vorderwanddicke dargestellt werden. So ließ sich bei den Kontrolldiät-gefütterten Mäusen eine signifikante Schmälerung der Vorderwand beobachten (KD MI: 0,34 ± 0,03 mm vs. KD S: 0,76 ± 0,03 mm, P<0,001; M-Mode), bei den Hochfettdiät-gefütterten Mäusen erreichte diese Wandverschmälerung kein Signifikanzniveau. Die Kontrolldiät-gefütterten Mäuse reagierten hierauf mit einer

Hypertrophie der Hinterwand (KD MI: 0,91 ± 0,06 mm vs. KD S: 0,69 ± 0,03 mm, $P<0{,}01$; M-Mode), während diese Wanddickenzunahme bei den Hochfettdiät-gefütterten Mäusen ausblieb (HFD MI: 0,76 ± 0,05 mm vs. HFD S: 0,71 ± 0,02 mm, $P>0{,}05$; M-Mode). Alle genannten Parameter sind in Abb. 3.12 gezeigt. Die kompensatorische Hinterwandhypertrophie ist jedoch der einzige untersuchte Parameter, in dem sich durch Übergewicht induzierte Unterschiede nach Ischämie nachweisen ließen. Bei einem Vergleich der Hochfettdiät- und Kontrolldiät-gefütterten *sham*-operierten Tiere lässt sich bemerken, dass nach zwölf Wochen Hochfettdiät eine signifikante Funktionssteigerung – nachgewiesen anhand einer erhöhten FAS – zu dokumentieren war.

3.2.4 Messungen im Serum

Um Aussagen über die Glukoseverwertung der Maus treffen zu können, wurden aus dem Nüchternserum der Mäuse die Nüchtern-Glukose- und -Insulinwerte bestimmt.

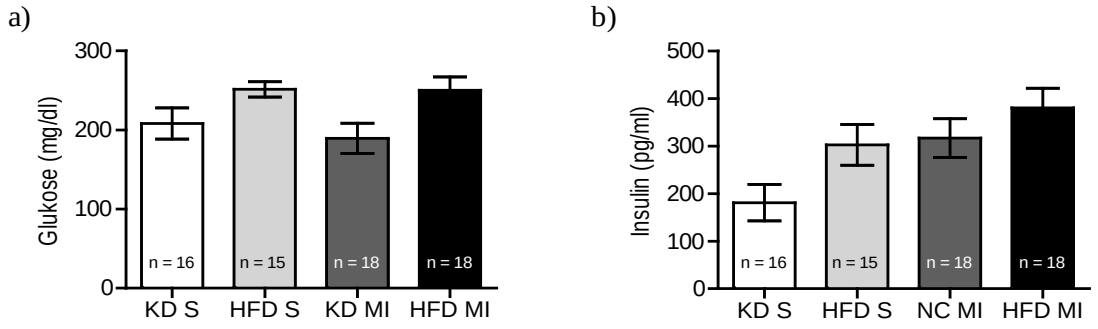

Abb. 3.13 Serumwerte der Mäuse nach zwölf Wochen Diät. Die Werte für **a) Glukose** und **b) Insulin** waren statistisch nicht signifikant.

Die Induktion eines Myokardinfarkts hatte keinen signifikanten Einfluss auf Glukose- und Insulinspiegel. Es ließ sich jedoch eine Tendenz erkennen, nach welcher der Insulinspiegel sowohl durch Hochfettdiät als auch durch Induktion eines Myokardinfarktes gesteigert wurde (KD S: 181 ± 38,3 pg/ml; HFD S: 303 ± 42,9 pg/ml; KD MI: 317 ± 40,7 pg/ml; HFD MI: 380 ± 41,8 pg/ml).

3.2.5 Histologische Untersuchungen

3.2.5.1 Intrazelluläre Fetteinlagerung des Kardiomyozyten

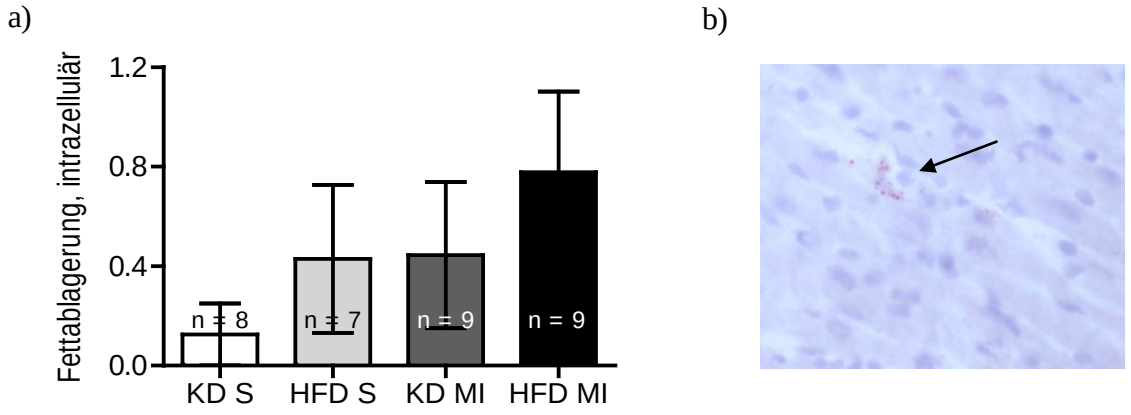

Abb. 3.14 Intrazelluläre Fetteinlagerung des Kardiomyozyten a) im Vergleich der Gruppen, b) Beispiel der Fetteinlagerung. Sowohl Übergewicht als auch Myokardinfarkt vermehrten die intrazelluläre Fetteinlagerung.

Abb. 3.14 zeigt die durch Öl-Rot-O-Färbung nachgewiesene intrazelluläre Fetteinlagerung der Versuchstiere.

Sowohl Infarktinduktion als auch Übergewicht steigerten die intrazelluläre Fetteinlagerung. Allerdings waren diese Unterschiede minimal und nicht signifikant.

3.2.5.2 Kardiale Kollagenablagerung

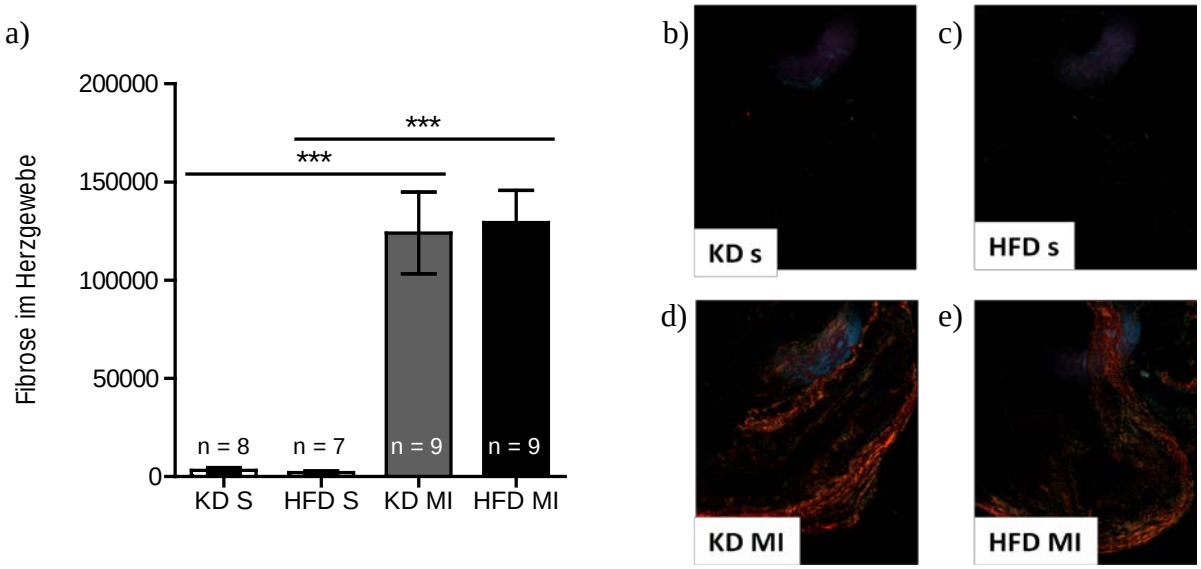

Abb. 3.15 Kollagenanfärbung mit Pikro-Sirius-Rot-Färbung. a) Quantitativer Vergleich der Gruppen. b) – e) Repräsentative Fotos der einzelnen Gruppen (*P****<0,001).

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, konnte in den infarzierten Herzen eine Zunahme der Fibrose dokumentiert werden. Mithilfe der Pikro-Sirius-Rot-Färbung konnte gezeigt werden, dass der Kollagenanteil im infarzierten Herzen hoch signifikant (P<0,001) vermehrt war. Dies galt sowohl für übergewichtige als auch für normgewichtige Mäuse.

3.2.5.3 Zahl inflammatorischer Zellen

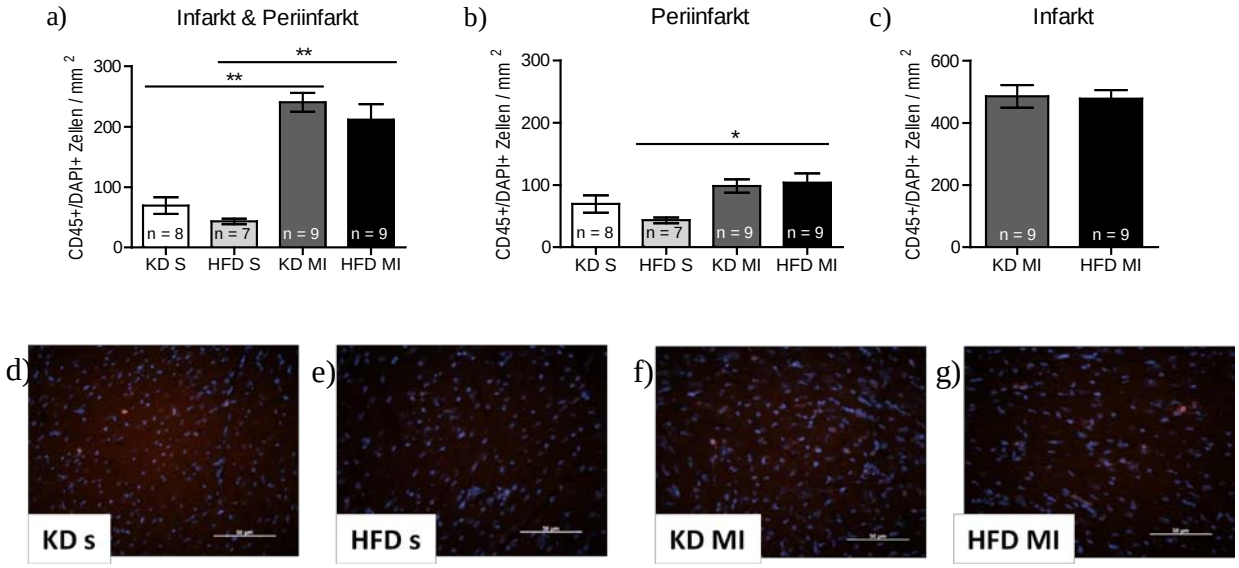

Abb. 3.16 CD45+/DAPI+ Zellen / mm^2 im **a) Infarkt- und Periinfarktgebiet b) Periinfarktgebiet c) Infarktgebiet. d) – g) Repräsentative Fotos der jeweiligen Gruppen.** In den infarzierten Herzen konnte erhöhte Inflammationsaktivität nachgewiesen werden (P*<0,05; P**<0,01).

Die Zahl CD45-positiver Zellen (Marker für Leukozyten allgemein) war in den infarzierten Herzen signifikant erhöht (HFD MI: 31,6 ± 3,8 / mm^2 vs. HFD S: 6,5 ± 0,68 / mm^2, P<0,01; KD MI: 35,9 ± 2,3 / mm^2 vs. KD S: 10,4 ± 2,1 / mm^2, P<0,01). Dabei war die Inflammation hauptsächlich in der Infarktzone erhöht. Bei einer getrennten Betrachtung der Periinfarktzone war eine signifikante Erhöhung der inflammatorischen Zellzahl nur bei den Hochfettdiät-gefütterten Tieren zu beobachten. Zwischen den Hochfettdiät- und Kontrolldiätgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Eine zusätzlich durchgeführte Anfärbung CD68-positiver Zellen (Makrophagen) erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5.4 Kardiale Apoptose

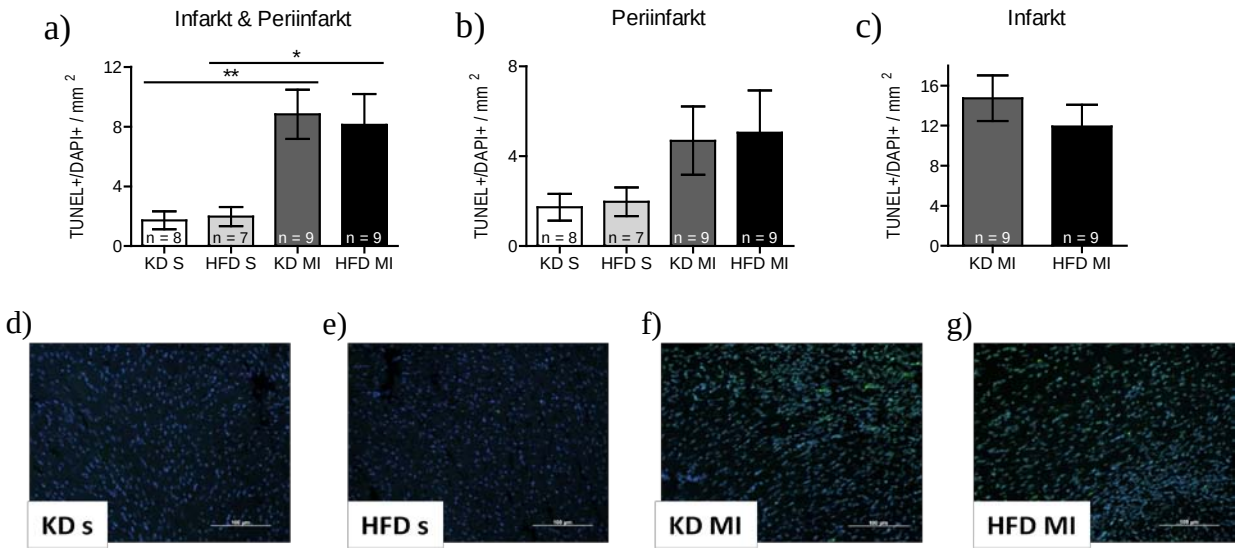

Abb. 3.17 TUNEL+/DAPI+ Zellen / mm^2 im **a) Infarkt- und Periinfarktgebiet b) Periinfarktgebiet c) Infarktgebiet. d) – g) Repräsentative Fotos der jeweiligen Gruppen.** Infarzierte Herzen wiesen signifikant höhere Zellzahlen auf (*P**<0,05; *P***<0,01).

Die Induktion des Myokardinfarktes führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen, vor allem im infarzierten Areal. Dies ließ sich an übergewichtigen, insbesondere aber auch an normgewichtigen Mäusen beobachten (HFD MI: 1,2 ± 0,31 / mm^2 vs. HFD S: 0,29 ± 0,10 / mm^2, $P<0{,}05$; KD MI: 1,3 ± 0,25 / mm^2 vs. KD S: 0,26 ± 0,09 / mm^2, $P<0{,}01$).

3.2.5.5 Kardiale Angiogenese

Es zeigten sich höhere doppelt-positive Zellzahlen in den infarzierten Herzen (HFD MI: 1,5 ± 0,10 / Muskelfaser vs. HFD S: 0,95 ± 0,10 / Muskelfaser, $P<0{,}01$; KD MI: 1,7 ± 0,14 / Muskelfaser vs. KD S: 1,2 ± 0,06 / Muskelfaser, $P<0{,}05$). Myokardinfarkt führte somit zu einer gesteigerten kardialen Angiogenese, welche im Infarkt- und Periinfarktgebiet gleichermaßen ausgeprägt war. Diese Veränderung war sowohl bei übergewichtigen als auch bei normgewichtigen Mäusen zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den Hochfettdiät- und Kontrollgruppen konnten nicht festgestellt werden.

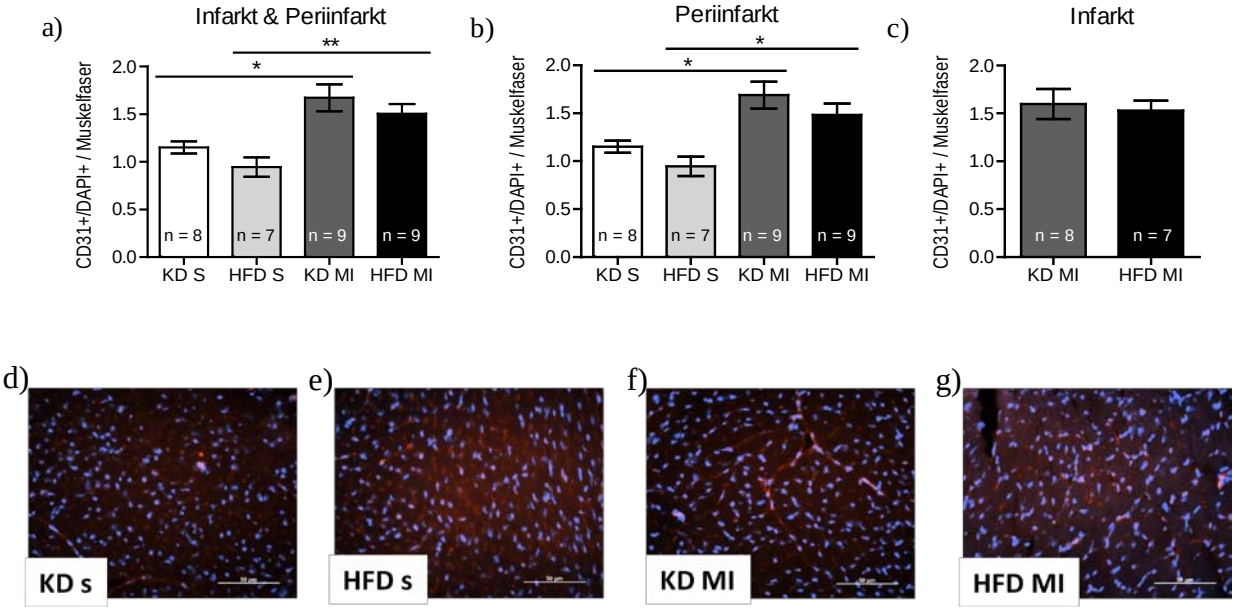

Abb. 3.18 CD31+/DAPI+ Zellen / Muskelfaser in a) Infarkt- und Periinfarktgebiet, b) Periinfarktgebiet, c) Infarktgebiet. d) – g) Repräsentative Fotos der jeweiligen Gruppen. Infarzierte Herzen wiesen höhere Zellzahlen pro Muskelfaser auf (*P**<0,05; *P***<0,01).

3.2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.6.1 Phosphorylierung des IRS-1

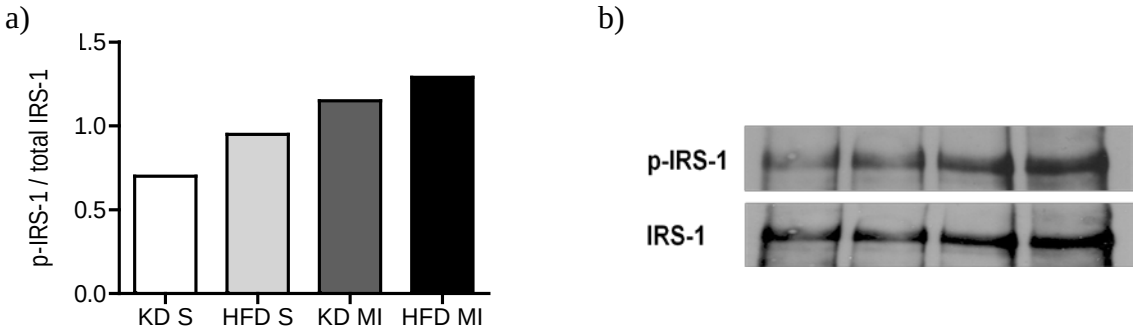

Abb. 3.19 Phosphorylierung von IRS-1. Gepoolte Daten, nach Immunpräzipitation.

Sowohl Hochfettdiät als auch Infarktinduktion führten zu einer gesteigerten Phosphorylierung des Insulin-Rezeptor-Substrats am Serin 307. Wie schon in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben, war auch hier aufgrund von gepooltem Probenmaterial weder eine Angabe von Standardabweichungen noch eine Signifikanzermittlung möglich.

3.2.6.2 Phosphorylierung der PI3K1A

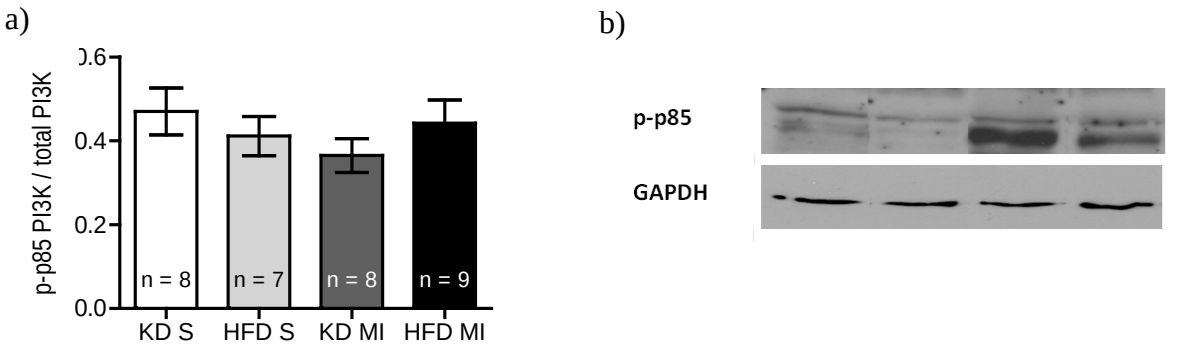

Abb. 3.20 Phosphorylierung der PI3K1A. a) Übersicht der Gruppen. b) repräsentative Membran.

Die Ergebnisse des Western Blot (dargestellt in Abb. 3.20) zeigten keine signifikanten Veränderungen der Aktivität der PI3K1A.

3.2.6.3 Phosphorylierung der AKT

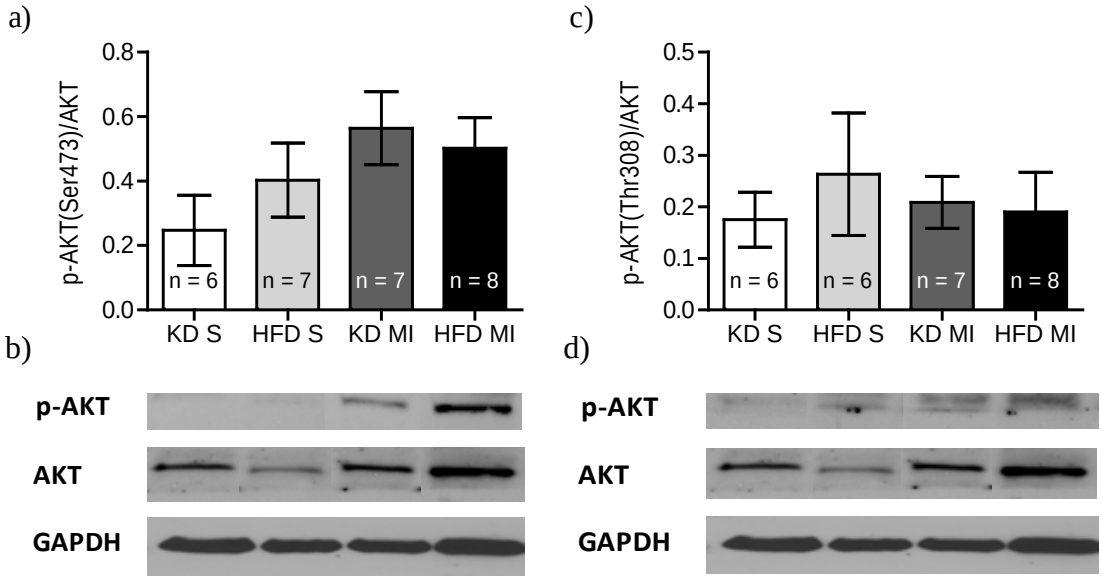

Abb. 3.21 Phosphorylierung der AKT. Übersicht der Gruppen für **a) Serin473-phosphorylierte AKT** bzw. **c) Thr308-phosphorylierte AKT.** Die jeweiligen repräsentativen Membranen sind in **b)** für **Ser473-phosphorylierte AKT** sowie in **d)** für **Thr308-phosphorylierte AKT** abgebildet.

Der Western-Blot-Nachweis der AKT-Phosphorylierung zeigte einen (nicht signifikanten) Anstieg der am Serin473 phosphorylierten AKT nach Induktion eines Myokardinfarktes. Die am Threonin308 phosphorylierte Form lag weder bei Übergewicht noch nach Induktion eines Myokardinfarkts in veränderter Menge vor.

4 DISKUSSION

Adipositas ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor (STEVENS et al. 2002) und ist beim Menschen eng mit dem Vorliegen einer kardialen Hypertrophie, linksventrikulären Dilatation und – oftmals nur subklinischen – Minderung der linksventrikulären Funktion verknüpft (KLEIN S et al. 2004; WONG et al. 2004). Klinische Studien legen einen direkten, von Begleiterkrankungen wie Hypertonie oder Diabetes mellitus unabhängigen Einfluss von Adipositas auf die kardiale Funktionsfähigkeit nahe (LAUER et al. 1991; KENCHAIAH et al. 2002), allerdings sind die exakten Pathomechanismen der übergewichtinduzierten kardialen Hypertrophie nicht genau bekannt. Als wichtiger Mediator vermittelt die AKT – aktiviert über die PI3K – kardiales Wachstum. Eine akute Aktivierung der AKT mündet in kompensierter kardialer Hypertrophie, wohingegen eine chronische AKT-Aktivierung zu pathologischer Hypertrophie führen kann (SHIOJIMA et al. 2005; TANIYAMA et al. 2005). Diese Einteilung ist jedoch umstritten, da Studien existieren, die auch bei chronischer Aktivierung eine physiologische Form nachweisen konnten (CONDORELLI et al. 2002). Bei Adipositas sind verschiedene im Blut zirkulierende Mediatoren erhöht, welche zum einem über Rezeptortyrosinkinasen (z. B. Insulin, IGF-1, Leptin oder TNFα) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z. B. IL-8, Angiotensin II) zu einer Aktivierung des kardialen PI3K-AKT-Signalwegs führen könnten. So konnte in Hochfettdiät-gefütterten Mäusen bereits eine Steigerung der basalen AKT-Phosphorylierung nachgewiesen werden (FANG et al. 2008). Andere Studien zeigen eine nach Insulinstimulation verminderte AKT-Phosphorylierung (PARK et al. 2005; LEE J et al. 2009), möglicherweise aufgrund einer chronischen AKT-Aktivierung und kardialer Insulinresistenz.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Übergewicht auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und den Ablauf kardialer Umbauprozesse nach Ischämie untersucht. Zunächst wurde mithilfe einer hochkalorischen Diät ein Mausmodell für Übergewicht und Insulinresistenz geschaffen. Bei diesen Mäusen zeigten sich nach zwölf Wochen Fütterung erhöhte Nüchtern-Leptin- und Insulinblutspiegel im Vergleich zur normgewichtigen Kontrollgruppe. Obwohl damit mögliche Aktivatoren des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs in höherem Maße zur Verfügung standen (PANDINI et al. 2002), zeigten sich im Herzen jedoch lediglich Tendenzen einer verstärkten Aktivierung dieses Signalwegs. Die übergewichtigen Mäuse zeigten außerdem eine milde konzentrische Hypertrophie bei unveränderter systolischer Funktion. Die vorliegende Hypertrophie wies hauptsächlich Merkmale einer physiologischen Hypertrophie wie erhaltene kontraktile Funktion und fehlende veränderte

interstitielle Fibrose auf, Zeichen einer pathologischen Hypertrophie wie Dilatation wurden nicht beobachtet (SHIOJIMA et al. 2005). Zur Untersuchung des Einflusses von Adipositas auf das kardiale *Remodeling* nach einer ischämischen Episode wurde sowohl bei über- als auch bei normgewichtigen Mäusen die linke deszendierende Herzkranzarterie (LAD) dauerhaft mithilfe einer Ligatur verschlossen. Beide Infarktgruppen, Hochfettdiät-gefütterte und Kontrolldiät-gefütterte Tiere, wiesen gleich große Infarktnarben auf. Drei Wochen nach Infarktinduktion waren die infarzierten Herzen beider Gruppen deutlich dilatiert. Ein Einfluss der Infarktinduktion auf eine veränderte Aktivierung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT konnte nur bedingt gezeigt werden. So erhöhte sich die basale AKT-Aktivierung sowohl durch Fettfütterung als auch durch Infarktinduktion tendenziell. Analog hierzu zeigten sich die Nüchtern-Insulinspiegel sowohl durch Fettfütterung als auch durch Infarktinduktion tendenziell erhöht. Der Myokardinfarkt führte zu gesteigerter kardialer Fibrose, Inflammation, Apoptose und Angiogenese, allerdings zeigten sich zwischen den Infarktgruppen (Hochfettdiät und Kontrolldiät) keine signifikanten Unterschiede. Das histologische *Remodeling* unterschied sich damit zwischen übergewichtigen und normgewichtigen Tieren nicht. Dessen ungeachtet bildeten die übergewichtigen im Gegensatz zu den normgewichtigen Mäusen keine kompensatorische Hinterwandhypertrophie als Reaktion auf den Vorderwandinfarkt aus.

Diese Ergebnisse werden im Folgenden detailliert diskutiert.

4.1 Einfluss von Übergewicht auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie

4.1.1 Induktion von Übergewicht am Modell der weiblichen C57BL/6-Maus

Zur Induktion von Übergewicht wurden weibliche C57BL/6-Mäuse über mehrere Wochen ausschließlich mit einer hochkalorischen Hochfettdiät ernährt, in der 60% der Kalorien aus Fett bereitgestellt wurden. Das Körpergewicht der Hochfettdiät-gefütterten Mäuse war bereits nach einer Woche signifikant erhöht. Wie schon in Kap. 3.1.1.1 (S. 38) beschrieben, lassen die gleichmäßigen Längen der Tibiae darauf schließen, dass diese Gewichtszunahme ausschließlich auf einer Zunahme des Körperumfangs und damit der Fettleibigkeit beruht und nicht auf Größenunterschiede der Mäuse zurückzuführen ist.

Dieses Mausmodell stellte die Grundlage für alle weiteren Versuche dar. Auf die Verwendung von leptindefizienten Tieren wurde bewusst verzichtet, um die im Menschen hauptsächlich

durch Fehlernährung und Bewegungsmangel ausgelöste Adipositas, welche mit erhöhten Leptinspiegeln im Blut und einer Leptinresistenz einhergeht, möglichst realistisch abzubilden.

4.1.2 Übergewicht führt zu Leptin- und Insulinresistenz

Nach zwölf Wochen Hochfettdiät zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe zweifach erhöhte Insulinspiegel. Diese ist Hinweis für eine beginnende Insulinresistenz. Auch PARK et al. konnten bei männlichen C57BL/6-Mäusen, die mit einer Hochfettdiät (55% der Kalorien aus Fett) gefüttert wurden, bereits nach drei Wochen Diät eine Verdopplung der basalen Insulinwerte zeigen, diese Spiegel waren auch nach sechs Wochen konstant. Nach 20 Wochen waren die Werte nahezu auf das Niveau der Kontrollgruppe abgesunken (PARK et al. 2005). PARK et al. erklärten dies damit, dass die Funktion der insulinproduzierenden pankreatischen β-Zellen allmählich im Rahmen einer Dekompensation nachlasse. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass diese Dekompensation nach zwölf Wochen einer 60% Hochfettdiät mit hoher Wahrscheinlichkeit noch nicht eingetreten war, da die Insulinspiegel weiterhin zweifache Werte im Vergleich zu den Kontrolltiere aufwiesen. In Experimenten mit Ratten, die mit einer 45% hochkalorischen Diät gefüttert wurden, konnte nach zwölf Wochen Fütterung ebenfalls eine Hyperinsulinämie nachgewiesen werden (RELLING et al. 2006). WANG et al. konnten auch bei männlichen C57BL/6-Mäusen, die analog zur vorliegenden Studie über zwölf Wochen mit einer 60% hochkalorischen Diät gefüttert wurden, signifikant erhöhte Insulinspiegel nachweisen (WANG et al. 2009).

Die Glukosespiegel der übergewichtigen Tiere zeigten sich dagegen nur tendenziell erhöht. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Resultate von PARK et al., die nach drei und sechs Wochen Hochfettdiät ebenfalls eine Tendenz zur Hyperglykämie feststellten, welche jedoch erst nach 20 Wochen Signifikanz erreichte (PARK et al. 2005). Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass die noch funktionsfähigen pankreatischen β-Zellen über eine Hyperinsulinämie die erhöhten Blutglukosespiegel noch effektiv kompensieren können. Erst bei Nachlassen der Funktionsfähigkeit der β-Zellen bzw. einer stärkeren Resistenz der Insulinrezeptoren würde Glukose im Blut akkumulieren und höhere Blutglukosespiegel hervorrufen. Um diesen Prozess beobachten und einschätzen zu können, müssten die Mäuse vermutlich für längere Zeit übergewichtig sein.

Dagegen konnten WANG et al. in ihren ähnlich aufgebauten Experimenten – gleiche Diät und gleiche Versuchsdauer – an männlichen C57BL/6-Mäusen erhöhte Glukosespiegel nachweisen (WANG et al. 2009). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ergebnissen der

vorliegenden Studie, lässt sich möglicherweise jedoch mit dem unterschiedlichen Geschlecht der verwendeten Mäuse erklären. So konnten THAKKER et al. bei einer 42% Hochfettdiät und einer Experimentdauer von sechs Monaten Unterschiede in Bezug auf die Nüchtern-Glukosewerte der Mäuse ebenfalls nur bei männlichen Mäusen nachweisen, während bei weiblichen Mäusen keine signifikanten Unterschiede der Nüchtern-Glukosespiegel beobachtet wurden (THAKKER et al. 2006).

Die Leptinspiegel der übergewichtigen Tiere waren nach 12 Wochen stark angestiegen, was sich auf die erhöhte Körperfettmasse der Tiere – nachgewiesen über das signifikant vergrößerte abdominelle Fettdepot – zurückführen lässt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Studien (PARK et al. 2005; RELLING et al. 2006). Zusammen mit den ebenfalls veränderten Insulinspiegeln ist diese Beobachtung ein Hinweis darauf, dass Übergewicht in Mäusen bereits nach zwölf Wochen Einfluss auf Stoffwechselwege nimmt.

4.1.3 Übergewicht führt zu konzentrischer kardialer Hypertrophie

Mithilfe von echokardiographischen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Herzen von Mäusen nach neunwöchiger Fütterung einer 60% hochkalorischen Diät eine konzentrische Form der kardialen Hypertrophie ausbilden. Bei Zunahme von Vorder- und Hinterwanddicke waren linksventrikulärer Durchmesser, Fläche und Volumen signifikant erniedrigt. Damit liegt eine konzentrische Hypertrophie vor. Betrachtet man die morphologische Veränderung des einzelnen Kardiomyozyten, lässt sich nach zwölf Wochen Hochfettdiät auch dort eine Hypertrophie erkennen. Diese Entwicklung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (MATSUI et al. 2002). Der fehlende Unterschied zwischen Hochfett- und Kontrollgruppe in Bezug auf den Längsachsen-Durchmesser der Kardiomyozyten (s. Kap. 3.1.2.2, S. 41) steht im Einklang mit den Ergebnissen der Echokardiographie, nach denen eine konzentrische Hypertrophieform vorliegt. Die Verbreiterung der Kardiomyozyten zeugt von parallel angeordneten neuen Sarkomeren, wodurch sich die Wanddicke verbreitert.

Da Übergewicht über eine chronische Volumenbelastung des Herzens zunächst mit exzentrischer Hypertrophie in Zusammenhang gebracht wird (PASCUAL et al. 2003) und sich KUCH et al. zufolge eine konzentrische Hypertrophie erst bei dem Vorliegen weiterer Komorbiditäten entwickelt (KUCH et al. 1998), stimmt dieses Ergebnis nicht mit der aktuellen Studienlage überein. Eventuell lässt sich dies darauf zurückführen, dass sich kardiale Hypertrophie bei Maus und Mensch auf verschiedene Arten entwickeln. Alternativ

wäre es möglich, dass auch die Mäuse der vorliegenden Studie bereits Komorbiditäten wie beispielsweise einen arteriellen Hypertonus entwickelt hatten.

Eine kardiale Funktionsminderung ließ sich auch nach neun Wochen Hochfettdiät in den verwendeten weiblichen Tieren nicht beobachten. Im Gegensatz dazu konnten PARK et al. bei männlichen Mäusen nach einer zehnwöchigen Hochfettdiät echokardiographisch eine tendenzielle Funktionsminderung in Form einer erniedrigten linksventrikulären Verkürzungsfraktion (FS) beobachten, die jedoch erst nach einer Versuchsdauer von 20 Wochen statistische Signifikanz erreichte (PARK et al. 2005). Diese Tendenz ließ sich in der vorliegenden Studie nicht reproduzieren. Dies könnte sowohl auf die kürzere Versuchsdauer, als auch auf das unterschiedliche Geschlecht der Mäuse zurückzuführen sein. Stattdessen ließ sich nach zwölf Wochen Hochfettdiät (und damit drei Wochen nach einer *sham*-OP) eine bei den übergewichtigen Tieren signifikant erhöhte linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS) nachweisen, sprechend für eine kardiale Funktionssteigerung der übergewichtigen Mäuse. Es wird zu zeigen sein, ob auch die Mäuse der vorliegenden Studie bei einer längeren Versuchsdauer eine kardiale Funktionsminderung aufgewiesen hätten.

Die vorliegende Hypertrophieform weist Zeichen einer physiologischen kardialen Hypertrophie auf, da zum einen mithilfe echokardiographischer Messungen eine eher gesteigerte Funktion nachgewiesen wurde, zum anderen aber weder die interstitielle Fibrose, noch die Apoptose vermehrt war.

Bei der Untersuchung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT konnten keine signifikanten Unterschiede der Phosphorylierungsraten nachgewiesen werden. Die beobachteten Tendenzen waren inkonsistent. Die IRS-Phosphorylierung am Serin stieg durch Übergewicht tendenziell an, welches als Ausdruck der beginnenden Insulinresistenz gewertet werden kann. Während die Phosphorylierungsrate der PI3K durch Übergewicht eher sank, stieg die AKT-Phosphorylierung tendenziell an. Durch die inhibitorische Wirkung der Serin-Phosphorylierung des IRS ist erklärlich, dass die PI3K1A als ein direktes Effektormolekül nicht vermehrt phosphoryliert und damit aktiviert ist. Die erhöhte Serinphosphorylierung am IRS sowie die eher gesunkenen Phosphorylierungsraten der PI3K1A sprechen für eine über andere Signalwege vermittelte Hypertrophie. Die tendenziell erhöhte AKT-Phosphorylierung ist im Zusammenhang mit der ebenfalls tendenziell erhöhten Phosphorylierung der PI3K1B als Indiz dafür zu werten, dass die beobachtete kardiale Hypertrophie eventuell über G-Proteine und PI3K1B vermittelt wurde.

FANG et al. konnten bei männlichen Mäusen nach einer Diätdauer von sechs Monaten eine erhöhte AKT-Phosphorylierung nachweisen (FANG et al. 2008). Eventuell war demnach die Zeit, in der die Mäuse eine durch erhöhte AKT-Level ausgelöste kardiale Hypertrophie entwickeln konnten, zu kurz. Dagegen spricht jedoch, dass der Zeitraum ausreichte, um eine kardiale Hypertrophie zu erzeugen. Diese wurde demnach entweder über andere Signalwege vermittelt, oder aber die Phosphorylierungsgrade sanken kurz vor der Gewebeentnahme bzw. konnten nicht korrekt nachgewiesen werden. Darüber hinaus könnte eventuell der im Rahmen der Gewinnung der Nüchtern-Blutwerte durchgeführte Futterentzug vor der Blut- und Gewebeentnahme zu einem rapiden Abfall der AKT-Phosphorylierungsgrade geführt haben (SHIOJIMA et al. 2002). Angesichts der immensen Bedeutung der AKT im Glukosestoffwechsel scheint dies die naheliegendste Erklärung zu sein. Die Induktion der die AKT-aktivierende Signalkaskade erfolgt an der Zellmembran durch IGF und Insulin über die entsprechenden Rezeptoren (s. Kap. 1.4, S. 8). Ein durch Futterentzug abfallender Insulinspiegel könnte also durchaus ursächlich für die verminderte Aktivierung dieses Signalwegs und damit für eine Senkung der Phosphorylierungsrate sein. Dies konnte auch von SHIOJIMA et al. beobachtet werden (SHIOJIMA et al. 2002). Weiterhin gilt es zu bedenken, dass die AKT-Level erst nach zwölf Wochen Diät bestimmt wurden, demnach also auch ein Einfluss der drei Wochen zuvor durchgeführten *sham*-Operation eine Rolle spielen könnte. Dafür spräche, dass sich zum Zeitpunkt der Organentnahme – und damit drei Wochen nach *sham*-Operation – auch die echokardiographischen Unterschiede zwischen KD S und HFD S minimiert hatten. Fraglich ist demnach, ob die *sham*-Operation einen so großen Stress auf die Herzen ausgeübt haben könnte, dass die eventuell bereits vorher durch Übergewicht entstandenen Unterschiede der Phosphorylierungsraten des IRS, der PI3K, oder der AKT überlagert wurden und somit nicht mehr bzw. nur in geringerem Ausmaß zu erkennen waren. Möglicherweise war auch die Zahl der untersuchten Mäuse zu gering, um Unterschiede bezüglich der Phosphorylierungsraten aufzudecken.

4.2 Einfluss von Übergewicht auf die kardialen Umbauvorgänge nach Ischämie

4.2.1 Induktion eines Myokardinfarkts am Modell der weiblichen C57BL/6-Maus

Nach erfolgter Anwendung eines Myokardinfarktmodells der C57BL/6-Maus überlebten aus beiden Infarktgruppen (KD MI, HFD MI) jeweils zirka 80% der Mäuse. Für die Versuche waren bewusst nur weibliche Mäuse verwendet worden, da verschiedene vorangegangene

Studien bereits über einen Vorteil weiblicher Mäuse in Bezug auf das Kurzzeit-Überleben – verursacht durch eine geringere Rupturrate – berichtet hatten (CAVASIN et al. 2003; GAO et al. 2005) und eigene Erfahrungen der Abteilung dies bestätigten. Während GAO et al. über Überlebensraten von knapp 90% referierten, betrugen diese in der vorliegenden Studie ca. 80%. Allerdings war die Anzahl der operierten Mäuse in der vorliegenden Studie mit 22 (HFD MI) bzw. 23 (KD MI) Mäusen/Gruppe wesentlich geringer (GAO et al.: 54 weibliche C57BL/6-Mäuse), wodurch Überlebensraten weniger aussagekräftig sind. Davon abgesehen ließe sich die im Vergleich zu GAO et al. erhöhte Mortalität der HFD-MI-Gruppe mit dem Vorliegen der Komorbidität Adipositas erklären. Die in der vorliegenden Studie fehlende Differenz zwischen KD MI und HFD MI könnte wiederum durch die kleinen Studiengruppen zustande gekommen sein.

4.2.2 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die Infarktgröße

Auf den mithilfe der Masson-Trichrom-Färbung angefärbten Schnitten wurde die Infarktgröße ausgemessen und das Infarktareal auf dem jeweiligen Schnitt in ein Verhältnis mit der jeweiligen Gesamtfläche des Herzens gesetzt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Infarktgruppen (KD MI, HFD MI) festgestellt werden. Auch THIM et al. konnten in Ratten keine durch Übergewicht verursachten Unterschiede in Bezug auf die Infarktgröße nachweisen (THIM et al. 2006). Auf alternative Methoden zur Darstellung des infarzierten Myokardareals (z. B. mittels Evans-Blau-Perfusion oder Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)) wurde verzichtet, da das Gewebe damit für weitere histologische Analysen unbrauchbar gewesen wäre.

Allerdings konnten MATSUI et al. eine um 50% reduzierte Infarktgröße bei chronisch aktivierter kardialer AKT nachweisen (MATSUI et al. 2002). Das dabei genutzte Modell bestand abweichend vom vorliegenden Modell aus C57BL/6-Mäusen mit kardialer Überexpression eines mutierten konstitutiv aktiven AKT-Gens, deren linke deszendierende Herzkranzarterie nur für 30 Minuten verschlossen wurde. Nach anschließender 24-stündiger Reperfusion wurden die Herzen entnommen. Davon ausgehend, dass, wie in Kap. 4.1.3 (S. 3) argumentiert, in der vorliegenden Studie die AKT-Level nur tendenziell erhöht waren, diese aber aufgrund des Futterentzugs vor der Gewebeentnahme nicht nachgewiesen werden konnte, wäre eventuell auch in der vorliegenden Studie eine analog zu MATSUI et al. verminderte Infarktgröße zu erwarten gewesen. Fraglich ist jedoch, ob nicht das unterschiedliche Studiendesign – zum einen durch die konstitutiv aktivierte AKT und zum

anderen durch das eine Reperfusionszeit beinhaltende Infarktmodell – für die Unterschiede in Bezug auf die Ergebnisse der Infarktgröße verantwortlich sind.

Nichtsdestotrotz ist das vorliegende Modell in der Lage, weitere Unterschiede in der Anpassung auf die Reaktion auf die Myokardinfarktinduktion aufzuzeigen und auf das Übergewicht zurückzuführen, da eine Differenz der Infarktgröße als Ursache dieser Unterschiede aufgrund der oben genannten Gründe bereits ausgeschlossen werden kann.

4.2.3 Übergewicht und kardialer Insult führen zu beginnender Insulinresistenz

Nach zwölf Wochen Hochfettdiät wurden die Nüchtern-Insulin- und Glukosespiegel sowie die Leptinblutwerte gemessen, um einen Überblick über die metabolischen Folgen des Übergewichts zu erhalten. Die nachgewiesenen Änderungen der Nüchtern-Insulinblutspiegel erreichten dabei nicht das festgelegte Signifikanzniveau, jedoch zeigten sich Tendenzen, nach denen sowohl Übergewicht als auch die Induktion einer myokardialen Ischämie mit erhöhten Nüchtern-Insulinspiegeln im Blut einhergehen.

Dass Übergewicht die Nüchtern-Insulinwerte von Mäusen steigert, wurde bereits in Kap. 4.1.2 beschrieben, ebenso der Zusammenhang mit einer beginnenden Insulinresistenz.

Auch die Induktion eines Myokardinfarkts scheint die Nüchtern-Insulinspiegel zu steigern. Die beobachteten Spiegel waren sowohl in übergewichtigen als auch in normgewichtigen myokardinfarzierten Tieren im Vergleich zu den *sham*-operierten Tieren deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöht. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Insulinproduktion als direkte Folge der Myokardinfarktinduktion. Möglicherweise könnte die Infarktinduktion aber auch in einer Insulinresistenz bestimmter Gewebe, beispielsweise des Herzens, münden. Bei ausgeprägter Resistenz könnten die pankreatischen β-Zellen mit einer gesteigerten Insulinproduktion reagieren, welche wiederum die erhöhten Blutspiegel erklären würde. Die beobachtete gesteigerte Phosphorylierung des IRS an Serinresten, die einer Inaktivierung des IRS entspricht, fügt sich konsistent in dieses Bild ein. Sowohl Übergewicht als auch Infarktinduktion scheinen demnach zu einer Insulinresistenz zu führen.

4.2.4 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die kardiale Inflammation nach Myokardinfarkt

In den infarzierten Herzen konnte mithilfe der signifikanten Erhöhung der CD45-positiven Zellen eine erhöhte Inflammation nachgewiesen werden. Ein Einfluss des Übergewichts auf

die Inflammation konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, jedoch scheint bei einer reinen Betrachtung der Periinfarktzone der Infarkt nur in übergewichtigen Tieren eine erhöhte Inflammation auszulösen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper für bestimmte Immunzellsubpopulationen konnten THAKKER et al. jedoch in einem übergewichtigen Mausmodell mit Infarktsetzung (nach sechs Monaten einer Hochfettdiät) eine signifikante Erhöhung der Makrophagenzahl bei gleichzeitig signifikant erniedrigter Zahl der neutrophilen Granulozyten nachweisen (THAKKER et al. 2006). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse von THAKKER et al. insofern zu deuten, als dass die hier in der Studie mit Hilfe des allgemeinen Oberflächenmarkers CD45 gemessene Leukozytenzahl auch dann konstant bleiben kann, wenn sich einzelne Subpopulationen in ihren relativen Anteilen ändern. Dieser Punkt könnte in weiterführenden Studien näher untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Rahmen der Analyse der CD45-positiven Zellen kein Anhalt für einen Einfluss des Übergewichts auf die kardiale Inflammationsreaktion nach Myokardinfarkt.

4.2.5 Übergewicht hat keinen Einfluss auf kardiale Apoptoseraten nach Myokardinfarkt

Im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz spielt die Apoptose eine wesentliche Rolle. So ließen sich während des Übergangs von kardialer Hypertrophie zur Insuffizienz erhöhte Apoptoseraten nachweisen (LI Z et al. 1997). Nach Studien ist dieser Zusammenhang kausal begründet (WENCKER et al. 2003). Die Inhibition von Caspaseaktivität nach Myokardinfarkt dagegen führte durch vermindertes pathologisches *Remodeling* zu verbesserter Kontraktilität (YARBROUGH et al. 2003), das Auftreten einer Herzinsuffizienz wurde verzögert (CHANDRASHEKHAR et al. 2004). Apoptose scheint demnach ein entscheidender Faktor für die Ausbildung des pathologischen *Remodeling* zu sein. Im Rahmen der Untersuchungen bezüglich der Aktivierung des RISK-Signalwegs *post infarctionem* wurde dieser über seinen antiapoptotischen Effekt als kardioprotektiv beschrieben (HAUSENLOY und YELLON 2004). Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen scheint eine verstärkte AKT-Aktivierung – diese ist Teil des RISK-Signalwegs – das kardiale *Remodeling post infarctionem* über ihren anti-apoptotischen Effekt positiv zu beeinflussen. Über den Einfluss von Adipositas auf kardiale Apoptoseraten ist wenig bekannt. Laut RELLING et al. führt Adipositas zu kardiomyozytärer Dysfunktion, nimmt dabei jedoch keinen Einfluss auf Apoptoseraten (RELLING et al. 2006).

In der vorliegenden Studie konnten bei dem Vergleich der Herzen der übergewichtigen mit denen der normgewichtigen Mäuse keine veränderten kardialen Apoptoseraten nachgewiesen werden. Sowohl in der Infarkt-operierten als auch in der *sham*-operierten übergewichtigen Gruppe waren die Apoptoseraten gegenüber der jeweils normgewichtigen Gruppe nicht verändert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von RELLING et al. überein (RELLING et al. 2006).

In infarzierten Herzen ließ sich eine Erhöhung der Apoptoseraten sowohl bei normgewichtigen als auch bei übergewichtigen Herzen nachweisen, diese waren jedoch nur unter Einbeziehung des infarzierten Gewebeareals signifikant. Bei einem ausschließlichen Vergleich der Periinfarktzonen (bestehend aus *border zone* und nicht-infarziertem Gewebe) konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Dagegen konnten PALOJOKI et al. bei Ratten vier Wochen *post infarctionem* erhöhte Apoptoseraten sowohl in der *border zone* als auch in nicht-infarziertem Gewebe nachweisen, auch hier wurde die linke deszendierende Herzkranzarterie dauerhaft verschlossen (PALOJOKI et al. 2001). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, hier wurde bei einem Vergleich der einzelnen Zonen keine statistische Signifikanz erreicht. Möglicherweise liegt dem eine unterschiedliche Definition der sog. *border zone* zugrunde. Da die AKT-Phosphorylierung durch Übergewicht nicht signifikant beeinflusst wurde, ließ sich kein durch Übergewicht vermittelter Abfall der Apoptoseraten beobachten. Eventuell stellte der experimentelle Myokardinfarkt, wie später in Kap. 4.2.7 beschrieben, einen so starken Reiz dar, dass durch Übergewicht verursachte Unterschiede überlagert wurden.

Da pathologisches *Remodeling*, wie oben erwähnt, mit Apoptose einhergeht, verdeutlichen die bei Myokardinfarkt erhöhten Apoptoseraten der vorliegenden Studie, dass dem Myokardinfarkt im Infarktbereich eine pathologische Form des *Remodeling* folgt.

4.2.6 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die kardiale Angiogenese nach Myokardinfarkt

Angiogenese ist definiert als die Bildung von neuen Blutkapillaren aus existierenden Gefäßen. Sie ist bedeutsam für die Wundheilung, embryologische Entwicklung, den menstruellen Zyklus und Inflammation (ZHAO et al. 2010). Kardiale Hypertrophie wird begleitet von vermehrter Angiogenese. Verringert sich die Kapillardensität (und damit das Verhältnis der Kapillare zu den von ihr versorgten Myozyten), bildet dies die Grundlage für den Übergang der Hypertrophie in die Herzinsuffizienz. In einem Mausmodell mit chronisch aktiver AKT

wurde bei diesem Übergang in die Herzinsuffizienz eine verminderte Angiogenese beobachtet (SHIOJIMA et al. 2005). Gesteigerte kardiale Angiogenese kann selbst – in Abwesenheit anderer externer Stimulatoren wie beispielsweise Volumenbelastung – Ursache kardialer Hypertrophie sein. Auch in Herzen, deren Angiogenese während der experimentellen Induktion eines Myokardinfarkts stimuliert wurde, wurden vermehrte Angiogenese, kardiale Hypertrophie und verbesserte Funktion beobachtet (TIRZIU et al. 2007). Gesteigerte Angiogenese führte in einer Studie von BARANDON et al. zu verminderten Rupturraten und reduzierter Infarktgröße (BARANDON et al. 2003). Angiogenese hat damit einen protektiven Effekt auf das infarzierte Gewebe.

In der vorliegenden Studie führte die Induktion eines Myokardinfarkts zu signifikant gesteigerter Angiogenese. Damit wird die Bedeutung der Angiogenese in Bezug auf Wundheilung hervorgehoben. Diese gesteigerte Angiogenese wird nach heutigem Wissenstand über v*ascular endothelial growth factor* (VEGF), und im weiteren Verlauf über AKT, vermittelt. Ein zu der beobachteten gesteigerten Angiogenese passender Anstieg der AKT ließ sich jedoch in der vorliegenden Studie nur tendenziell beobachten (s. Kap. 3.2.6.3, S. 53). Dabei war dieser Anstieg in den normgewichtigen Tieren stärker ausgeprägt, was einen Funktionsvorteil der normgewichtigen Tiere vermuten lässt. Tatsächlich war der durch den Infarkt bedingte Abfall der Herzpumpfunktion in den übergewichtigen Tieren tendenziell stärker ausgeprägt, was die Bedeutung der Angiogenese in Bezug auf kardiale Funktion hervorhebt.

Differenzen zwischen den übergewichtigen und normgewichtigen Tieren waren nicht nachweisbar. Übergewicht scheint demzufolge keinen Einfluss auf kardiale Angiogenese nach Infarkt zu haben.

4.2.7 Übergewicht hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Proteine IRS, PI3K & AKT nach Induktion eines Myokardinfarkts

Der Signalweg IRS-PI3K1A-AKT reguliert Zellwachstum, Proliferation und Glukosestoffwechsel (BELLACOSA et al. 2004). Darüber hinaus ist er entscheidend im Rahmen der Vermittlung kardialer Hypertrophie (MCMULLEN et al. 2003). Außerdem scheint eine akute Aktivierung des Signalwegs nach Myokardinfarkt einen positiven Einfluss auf das myokardiale *Remodeling* zu haben. Dies konnte in einer Studie, die Patienten, die aufgrund eines Herzinfarktes einer Koronarangiographie unterzogen wurden, zusätzlich mit einer den Signalweg IRS-PI3K1A-AKT aktivierenden Glukose-Insulin-Kalium-Infusion

therapierte, gezeigt werden. Zusätzlich konnte unter dieser Therapie ein Rückgang der Komplikationen während der Hospitalisation beobachtet werden (DIAZ et al. 1998; LI Y et al. 2010). Die Mortalität der Patienten änderte sich dabei allerdings nicht (MAMAS et al. 2010). Der positive Einfluss scheint an niedrige Fettsäurekonzentrationen gebunden zu sein (FOLMES et al. 2006). Auch Postkonditionierung – ein festgelegtes Protokoll von induzierten kardialen Okklusions-/Reperfusionsabfolgen im Rahmen einer Koronarangiographie nach Myokardinfarkt – scheint einen protektiven Effekt unter anderem durch eine akute Aktivierung des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs zu vermitteln (ZHU et al. 2006). Im Rahmen der molekularbiologischen kardialen Reaktion auf einen Myokardinfarkt könnte demnach eine veränderte akute Aktivierung des Signalwegs vermutet werden.

Im Kontrast dazu scheint eine chronische kardiale AKT-Aktivierung die Umbauvorgänge im Herzen negativ zu beeinflussen. So resultierte in Versuchen mit mehreren transgenen Mausmodellen mit chronisch aktiver AKT unabhängig von der aktivierten Unterform bei längerer Versuchsdauer eine pathologische Form der Hypertrophie (SHIOJIMA et al. 2005; SCHIEKOFER et al. 2006). Eine chronische Aktivierung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT, beispielsweise durch Hyperinsulinämie, scheint demnach einen negativen Einfluss auf die Umbauprozesse des Herzens zu nehmen.

In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Änderungen, sondern lediglich Tendenzen in der Phosphorylierung der am IRS-PI3K1A-AKT–Signalweg beteiligten Proteine nachgewiesen werden. So war die Phosphorylierung von AKT am Serin 473 sowohl durch Übergewicht als auch durch Infarktinduktion eher erhöht, während die Phosphorylierungsrate der PI3K1A durch beide Interventionen unverändert war. Damit erscheint ein über die PI3K1A vermittelter Einfluss von Übergewicht oder Infarktinduktion auf diesen Signalweg im Herzen eher zweifelhaft. Von Interesse wäre die Phosphorylierung der PI3K1B, um eine PI3K1A-unabhängige Aktivierung der AKT zu untersuchen. Eventuell war jedoch auch der Reiz des experimentellen Myokardinfarkts so dominant, dass durch Übergewicht ausgelöste Unterschiede überdeckt wurden.

4.2.8 Übergewicht verhindert eine reaktive Hinterwandhypertrophie nach Vorderwandinfarkt

In den echokardiographischen Messungen drei Wochen *post infarctionem* konnte sowohl in übergewichtigen als auch in normgewichtigen myokardinfarzierten Tieren eine verminderte Vorderwanddicke detektiert werden. Diese ist in Form einer kardialen Narbe Ausdruck des

induzierten Vorderwandinfarkts. Die infarzierten Herzen waren dilatiert und wiesen eine Funktionsminderung, gemessen durch eine reduzierte linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion (FAS), auf. Die kompensatorische Reaktion des Herzens auf die verminderte Kontraktionskraft der Vorderwand geschieht im Normalfall durch eine reaktive Hinterwandhypertrophie. Diese kompensatorische Hinterwandhypertrophie war bei den übergewichtigen Tieren vermindert. Dies könnte auf einer chronischen und nicht mehr steigerbaren AKT-Aktivierung beruhen. Auch die echokardiographisch mithilfe der FAS quantifizierte kardiale Funktionsminderung war in den übergewichtigen Mäusen prozentuell stärker ausgeprägt. Übergewicht könnte demnach die kardialen Umbauprozesse *post infarctionem* vermindern. Allerdings konnten in allen gemessenen Parametern des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs keine durch Übergewicht verursachten signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden. Auch in den histologischen Untersuchungen konnten *post infarctionem* im Hinblick auf Angiogenese, Fibrose, Inflammation und Apoptose keine signifikanten Unterschiede zwischen übergewichtigen und normgewichtigen Tieren festgestellt werden. Die molekularbiologischen Ursachen der verminderten reaktiven Hinterwandhypertrophie bleiben damit weiterhin unklar.

Weiterhin wäre auch denkbar, dass dieses veränderte *Remodeling* über andere Signalwege vermittelt wird. Darüber hinaus könnten, wie in Kapitel 4.1.3 erläutert, die fehlenden Unterschiede in der Aktivierung der AKT unter anderem auf die rasche Abnahme der phosphorylierten AKT nach nächtlichem Fasten zurückzuführen sein. Auch könnte der durch Infarktsetzung und *sham*-OP induzierte Stress eventuelle Unterschiede in Phosphorylierungsraten der PI3K bzw. der AKT zunichtemachen. Außerdem wurden die Proteinproben aus rechtem und linkem Ventrikel gewonnen. Reine linksventrikuläre Veränderungen könnten durch dieses Vorgehen verwischt worden sein. Eventuell war auch die Anzahl der Mäuse zu gering, um signifikante Unterschiede zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Übergewicht zu vermindertem kardialen *Remodeling post infarctionem* führt. Es bleibt jedoch unklar, über welche Wege diese Veränderungen vermittelt werden.

4.3 Einfluss von Übergewicht auf das Überleben nach Myokardinfarkt

Klinische Studien, die den Einfluss von Adipositas auf das Auftreten eines Myokardinfarkts und die Erholung *post infarctionem* untersuchen, weisen widersprüchliche Daten auf. Viele Studien beschreiben einen protektiven Effekt, den Adipositas auf die Morbidität und

Mortalität nach diagnostizierter kardialer Erkrankung ausüben soll. So wurde bei der gepoolten Analyse von vier Studien ein erniedrigtes Infarktrisiko bei vorhandener kardialer Vorbelastung für adipöse Patienten ermittelt (GURM et al. 2002b). Auch nach erfolgtem Infarkt scheinen adipöse Patienten von ihrem Übergewicht zu profitieren: GURM et al. zeigten ein verbessertes kurzfristiges *outcome* (GURM et al. 2002a), und auch in einer Studie von Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI)–Patienten, die im Mittel über 17 Monate beobachtet wurden, konnte für übergewichtige Patienten dieser Trend einer geminderten Mortalität beobachtet werden (BUETTNER et al. 2007). In einer Studie, die die Behandlung mit Abciximab an Patienten mit instabiler Angina untersuchte, konnte gezeigt werden, dass die 1-Jahres-Mortalität bei Patienten mit einem höheren Körpergewicht niedriger war (OTTERVANGER et al. 2003). Auch herzinsuffiziente adipöse Patienten scheinen (je nach Studie jedoch nur tendenziell) von einer, im Vergleich zu normgewichtigen Patienten, niedrigeren Mortalität zu profitieren (HORWICH et al. 2001; CURTIS et al. 2005; HALL et al. 2005). Außerdem scheinen adipöse Patienten nach Herzkatheteruntersuchungen stationär weniger Komplikationen zu erleiden und weisen darüber hinaus eine im Vergleich zu normgewichtigen Patienten niedrigere 1-Jahres-Mortalität auf (GRUBERG et al. 2002). Eine andere Studie konstatiert adipösen Herzinfarkt-Patienten im Vergleich zu der normgewichtigen Kontrollgruppe ein besseres Kurzzeitüberleben bei vergleichbarer allgemeiner Langzeitmortalität (NIGAM et al. 2006). Begründet wird dieses höhere Kurzzeitüberleben von NIGAM et al. jedoch mit dem jüngeren Alter der Patienten zum Zeitpunkt des ersten kardialen Insults. Andererseits wird argumentiert, dass diese beschriebenen Vorteile der adipösen Patienten auf eine strengere Reglementierung der Behandlung sowohl in der Akutphase als auch während der Nachsorge zurückzuführen seien. Bei adipösen Patienten kämen aggressivere Behandlungsstrategien zum Einsatz, Studienergebnisse würden so eventuell verzerrt (DIERCKS et al. 2006).

In der vorliegenden Studie konnte kein Hinweis auf einen protektiven Effekt des Übergewichts – weder in Bezug auf kardiales *Remodeling* noch in Bezug auf das Überleben der Mäuse – nachgewiesen werden. Ebenso fanden sich kaum Hinweise für einen nachteiligen Effekt des Übergewichts. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine reaktive Hinterwandhypertrophie als Reaktion auf den Vorderwandinfarkt in den übergewichtigen Mäusen ausblieb, während die normgewichtigen Mäuse diese kompensatorische Hinderwandhypertrophie ausbildeten. Dementsprechend konnte ein negativer Effekt des Übergewichts in Bezug auf kardiales *Remodeling post infarctionem* dokumentiert werden. Die verminderte Hinterwandhypertrophie könnte ein Indiz für einen prognostisch negativen

Einfluss des Übergewichts darstellen. In Bezug auf die gemessenen Parameter des IRS-PI3K1A-AKT–Signalwegs konnten keine durch Übergewicht verursachten Veränderungen nachgewiesen werden. Auch in den histologischen Untersuchungen konnten *post infarctionem* keine signifikanten Unterschiede zwischen übergewichtigen und normgewichtigen Tieren festgestellt werden. Zur Identifizierung möglicher verantwortlicher Signalwege sollten weitere Studien folgen.

4.4 Limitationen der Arbeit

Adipositas gilt als Risikofaktor für viele kardiovaskuläre Erkrankungen und beeinflusst diese auf unterschiedliche Weise. Neue Erkenntnisse in Bezug auf die durch Übergewicht beeinflussten physiologischen Mechanismen sind unabdingbar für die Entwicklung von Therapien, die den möglichen Effekten von Übergewicht Rechnung tragen. Es sollte daher ein Versuchsmodell generiert werden, welches menschliches Übergewicht in möglichst vielen Aspekten nachbildete. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung leptindefizienter Tiere verzichtet. Stattdessen wurde ein Studiendesign gewählt, in dem Übergewicht durch eine vermehrte Aufnahme fettreicher Nahrung induziert wurde. Um sicherzustellen, dass die Tiere während der Versuchszeit an Gewicht zunahmen, wurde eine Diät, die 60% der Energie aus Fett bereithielt, ausgewählt. Diese Diät spiegelt allerdings in ihrer Zusammensetzung nicht die typische Diät wider, der die westliche Bevölkerung ausgesetzt ist. Hier beträgt der Fettanteil zirka 45%. Die gewonnenen Daten sind daher nur näherungsweise auf den Menschen übertragbar.

Weiterhin beruhen die Ergebnisse der biochemischen und immunhistologischen Analysen der Herzen übergewichtiger und normgewichtiger Mäuse auf Untersuchungen an Tieren, die zusätzlich eine *sham*-Operation durchlaufen hatten. Dies war nötig, um eine Vergleichbarkeit mit den Infarkt-operierten Tieren herzustellen und eventuelle Einflüsse des Operationsverfahrens oder der Narkose auszuschließen. So wurde jedoch die Datenerhebung des ersten Versuchsteils beeinflusst, da die Tiere nicht nur einer Fettfütterung (bzw. Kontrollfütterung), sondern zusätzlich einer Operation unterzogen wurden.

Darüber hinaus könnte die Versuchsdauer (neun bzw. zwölf Wochen) für die Beobachtung einer Herzinsuffizienzentwicklung zu kurz gewesen sein. PARK et al. konnten eine (aus kompensatorischer kardialer Hypertrophie als Anpassung an durch Adipositas erhöhte Anforderungen entstandene) Herzinsuffizienz erst nach 20 Wochen nachweisen (PARK et al. 2005). Die vorliegende Studie sah die Infarktinduktion bereits nach neun Wochen

Fettfütterung vor, weswegen sich die Tiere hier noch im Stadium einer kompensatorischen Hypertrophie befanden. Eine Insuffizienz konnte zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden.

Nicht zuletzt ist die Anzahl der Tiere in den jeweiligen Gruppen durch die vielen verschiedenen Untersuchungen mit den daraus resultierenden Gruppenaufteilungen auf teilweise sieben Tiere gesunken. Für die Erhebung von statistisch signifikanten Daten mag diese Zahl zu gering gewesen sein.

4.5 Ausblick

Um aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich der Veränderungen durch Übergewicht treffen zu können, sind bereits weitere Studien geplant, die eine längere Versuchsdauer und höhere Anzahl an Versuchstieren pro Gruppe vorsehen. Mithilfe von echokardiographischen Untersuchungen soll beobachtet werden, zu welchem Zeitpunkt bei den Versuchstieren der Übergang von einer kompensatorischen kardialen Hypertrophie zur Insuffizienz eintritt. Darauffolgend sollen die in der vorliegenden Studie gemessenen Parameter erneut untersucht werden, um eine Beteiligung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT sowie der PI3K1B auf die Herzinsuffizienzentwicklung zu untersuchen. Diese Studie wird nur den Einfluss von Übergewicht auf kardiale Hypertrophie – unabhängig von einem weiteren kardialen Ereignis – untersuchen. Damit soll ein unbeabsichtigter Einfluss durch die *sham*-Operation ausgeschlossen werden, da diese als Distraktor wirken könnte.

Im weiteren Verlauf soll die Bedeutung der in Frage kommenden Proteine durch Studien an Mäusen mit spezifischer Deletion der entsprechenden Proteine demonstriert werden. So soll ein definitiver Einfluss der entsprechenden Proteine bewiesen werden.

In anderen Experimenten soll der Einfluss von Übergewicht auf die kardialen Umbauvorgänge nach Ischämie weiter untersucht werden. Hierbei soll der Zeitraum zwischen Ischämie und Gewebeentnahme verlängert werden, um zu sehen, ob sich eventuelle, durch Übergewicht verursachte Unterschiede nach längerer Zeit besser herausbilden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Signalweg IRS-PI3K1A-AKT induziert bei kurzfristiger Aktivierung eine physiologische kardiale Hypertrophie. Bei dauerhafter Aktivierung kann er sowohl pathologische als auch physiologische kardiale Hypertrophie induzieren. Dabei ist unklar, welcher Stimulus welcher Hypertrophieform zugrunde liegt. Bei der Adipositas stehen verschiedene Induktoren des Signalwegs vermehrt zur Verfügung, was zu einer verstärkten Aktivierung des Signalwegs führen kann. So lässt sich bei Übergewicht eine erhöhte basale AKT-Phosphorylierung beobachten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Übergewicht auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sowie auf die kardialen Umbauprozesse nach Myokardischämie näher untersucht. Dazu wurde zunächst ein übergewichtiges Wildtypmausmodell geschaffen. In diesem ließen sich vorwiegend Anzeichen physiologischer (erhaltene kontraktile Funktion, fehlende Dilatation) Hypertrophie nachweisen. Es zeigte sich eine unter Übergewicht tendenziell erhöhte AKT-Phosphorylierung und, analog dazu, eine erhöhte Phosphorylierung der PI3K1B. In den Phosphorylierungsraten der PI3K1A waren dagegen keine Unterschiede erkennbar, was für eine insulin- und leptinunabhängige AKT-Phosphorylierung über G-Proteine und PI3K1B spricht. Dazu passend wurden in den übergewichtigen Mäusen signifikant erhöhte Nüchtern-Insulin- und -Leptinspiegel sowie eine vermehrte inhibitorische Serinphosphorylierung des IRS im Myokard detektiert, die auf eine Resistenz der Gewebe für die entsprechenden Mediatoren schließen lassen. In einem zweiten Versuchsteil wurden übergewichtige und normgewichtige Mäuse durch einen dauerhaften Verschluss der LAD einer chronischen Myokardischämie ausgesetzt. Die Gewebeanalyse erfolgte drei Wochen *post infarctionem*. Dabei zeigte sich, dass Übergewicht keinen Einfluss auf die Infarktgröße nahm. Echokardiographisch konnte unabhängig vom Mausgewicht eine Dilatation des infarzierten Herzens dokumentiert werden. Die Funktionsminderung fiel bei den übergewichtigen Mäusen stärker aus, da eine kompensatorische Hinterwandhypertrophie in diesen Mäusen ausblieb. Der Infarkt führte ungeachtet des Mausgewichts zu gesteigerter Fibrose, Angiogenese, Inflammation und Apoptose. Auch zeigte sich keine vom Mausgewicht abhängige veränderte Aktivierung des Signalwegs IRS-PI3K1A-AKT. Die Ursache für das Ausbleiben der kompensatorischen Hinterwandhypertrophie in den übergewichtigen Mäusen bleibt demnach offen. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die kardiale Hypertrophie bei Übergewicht vermutlich über G-Proteine, PI3K1B und AKT vermittelt wird. Sie weist Merkmale einer physiologischen Hypertrophie auf. Nach Infarkt konnten neben der in den übergewichtigen Tieren ausbleibenden kompensatorischen Hinterwandhypertrophie keine weiteren durch Übergewicht verursachten Differenzen detektiert werden, was auf eine Nivellierung eventuell vorhandener Unterschiede zwischen Übergewicht und Normgewicht durch die Auswirkungen des Infarkts zurückzuführen sein könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Aizawa-Abe M, Ogawa Y, Masuzaki H, Ebihara K, Satoh N, Iwai H, Matsuoka N, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, et al. (2000): Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. J Clin Invest 105, 1243-52.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997): Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol 7, 261-9.

Alexander JK, Dennis EW, Smith WG, Amad KH, Duncan WC, Austin RC (1962): Blood volume, cardiac output, and distribution of systemic blood flow in extreme obesity. Cardiovasc Res Cent Bull 1, 39-44.

Alpert MA (2001): Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. Am J Med Sci 321, 225-36.

Aronow WS, Epstein S, Koenigsberg M, Schwartz KS (1988): Usefulness of echocardiographic left ventricular hypertrophy, ventricular tachycardia and complex ventricular arrhythmias in predicting ventricular fibrillation or sudden cardiac death in elderly patients. Am J Cardiol 62, 1124-5.

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, et al. (2002): Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. Nat Med 8, 35-40.

Ashrafian H, Athanasiou T, le Roux CW (2011): Heart remodelling and obesity: the complexities and variation of cardiac geometry. Heart 97, 171-2.

Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC, et al. (2007): Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. Hypertension 49, 34-9.

Barandon L, Couffinhal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Dare D, Duplaa C (2003): Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. Circulation 108, 2282-9.

Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L (2004): A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. Cancer Biol Ther 3, 268-75.

Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA (2005): Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? Am J Physiol Heart Circ Physiol 289, H8-H16.

Bourassa MG, Gurne O, Bangdiwala SI, Ghali JK, Young JB, Rousseau M, Johnstone DE, Yusuf S (1993): Natural history and patterns of current practice in heart failure. The Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) Investigators. J Am Coll Cardiol 22, 14A-19A.

Buettner HJ, Mueller C, Gick M, Ferenc M, Allgeier J, Comberg T, Werner KD, Schindler C, Neumann FJ (2007): The impact of obesity on mortality in UA/non-ST-segment elevation myocardial infarction. Eur Heart J 28, 1694-701.

Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE (2003): Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. J Biol Chem 278, 25323-30.

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. (1999): Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. N Engl J Med 341, 1097-105.

Carabello BA (2002): Concentric versus eccentric remodeling. J Card Fail 8, S258-63.

Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP (2003): Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 284, H1560-9.

Chan TO, Tsichlis PN (2001): PDK2: a complex tail in one Akt. Sci STKE 2001, 1-5.

Chandrashekhar Y, Sen S, Anway R, Shuros A, Anand I (2004): Long-term caspase inhibition ameliorates apoptosis, reduces myocardial troponin-I cleavage, protects left ventricular function, and attenuates remodeling in rats with myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 43, 295-301.

Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, et al. (2001): Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. Genes Dev 15, 2203-8.

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ (2001): Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). Science 292, 1728-31.

Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, et al. (2002): Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 12333-8.

Cooper R, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T (1997): ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. J Hum Hypertens 11, 107-11.

Cooper RS, Simmons BE, Castaner A, Santhanam V, Ghali J, Mar M (1990): Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. Am J Cardiol 65, 441-5.

Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, et al. (2002): Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. Cell 110, 737-49.

Curtis JP, Selter JG, Wang Y, Rathore SS, Jovin IS, Jadbabaie F, Kosiborod M, Portnay EL, Sokol SI, Bader F, et al. (2005): The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. Arch Intern Med 165, 55-61.

De Bosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ (2006): Akt1 is required for physiological cardiac growth. Circulation 113, 2097-104.

de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH (1994): Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. Hypertension 23, 600-6.

Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R, Isea JE, Romero G (1998): Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiologicos Latinoamerica) Collaborative Group. Circulation 98, 2227-34.

Diercks DB, Roe MT, Mulgund J, Pollack CV, Jr., Kirk JD, Gibler WB, Ohman EM, Smith SC, Jr., Boden WE, Peterson ED (2006): The obesity paradox in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: results from the Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the

American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines Quality Improvement Initiative. Am Heart J 152, 140-8.

Doll S, Paccaud F, Bovet P, Burnier M, Wietlisbach V (2002): Body mass index, abdominal adiposity and blood pressure: consistency of their association across developing and developed countries. Int J Obes Relat Metab Disord 26, 48-57.

Du J, Sperling LS, Marrero MB, Phillips L, Delafontaine P (1996): G-protein and tyrosine kinase receptor cross-talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor 1 receptor. Biochem Biophys Res Commun 218, 934-9.

Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, et al. (2005): Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. Mol Cell Biol 25, 1869-78.

Emdin M, Gastaldelli A, Muscelli E, Macerata A, Natali A, Camastra S, Ferrannini E (2001): Hyperinsulinemia and autonomic nervous system dysfunction in obesity: effects of weight loss. Circulation 103, 513-9.

Eumorphia / Europhenome. "Cold temperature adaptation in 4 inbred strains of mice. MPD:26601." Mouse Phenome Database web site. Zugriff am 20.11.2010, http://phenome.jax.org.

Fang CX, Dong F, Thomas DP, Ma H, He L, Ren J (2008): Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. Am J Physiol Heart Circ Physiol 295, H1206-H1215.

Folmes CD, Clanachan AS, Lopaschuk GD (2006): Fatty acids attenuate insulin regulation of 5'-AMP-activated protein kinase and insulin cardioprotection after ischemia. Circ Res 99, 61-8.

Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan MJ, Marcus M, Massie B, et al. (1992): The heart in hypertension. N Engl J Med 327, 998-1008.

Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, Dart AM, Du XJ (2005): Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. Cardiovasc Res 65, 469-77.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119, 493-501.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem 273, 30336-43.

Goldberg RJ, Ciampa J, Lessard D, Meyer TE, Spencer FA (2007): Long-term survival after heart failure: a contemporary population-based perspective. Arch Intern Med 167, 490-6.

Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest 56, 56-64.

Gruberg L, Weissman NJ, Waksman R, Fuchs S, Deible R, Pinnow EE, Ahmed LM, Kent KM, Pichard AD, Suddath WO, et al. (2002): The impact of obesity on the short-term and long-term outcomes after percutaneous coronary intervention: the obesity paradox? J Am Coll Cardiol 39, 578-84.

Gurm HS, Whitlow PL, Kip KE (2002a): The impact of body mass index on short- and long-term outcomes inpatients undergoing coronary revascularization. Insights from the bypass angioplasty revascularization investigation (BARI). J Am Coll Cardiol 39, 834-40.

Gurm HS, Brennan DM, Booth J, Tcheng JE, Lincoff AM, Topol EJ (2002b): Impact of body mass index on outcome after percutaneous coronary intervention (the obesity paradox). Am J Cardiol 90, 42-5.

Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D (1998): Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. J Am Coll Cardiol 32, 1454-9.

Hall JA, French TK, Rasmusson KD, Vesty JC, Roberts CA, Rimmasch HL, Kfoury AG, Renlund DG (2005): The paradox of obesity in patients with heart failure. J Am Acad Nurse Pract 17, 542-6.

Hausenloy DJ, Yellon DM (2004): New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. Cardiovasc Res 61, 448-60.

Hawkins PT, Stephens LR (2007): PI3Kgamma is a key regulator of inflammatory responses and cardiovascular homeostasis. Science 318, 64-6.

Herbst JJ, Andrews G, Contillo L, Lamphere L, Gardner J, Lienhard GE, Gibbs EM (1994): Potent activation of phosphatidylinositol 3'-kinase by simple phosphotyrosine peptides derived from insulin receptor substrate 1 containing two YMXM motifs for binding SH2 domains. Biochemistry 33, 9376-81.

Herold G: Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung. Selbstverl., Köln 2009.

Horwich TB, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH (2001): The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. J Am Coll Cardiol 38, 789-95.

Hunt SA (2005): ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J Am Coll Cardiol 46, e1-82.

Hunter JJ, Chien KR (1999): Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N Engl J Med 341, 1276-83.

Kannel WB (2000): Vital epidemiologic clues in heart failure. J Clin Epidemiol 53, 229-35.

Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS (2002): Obesity and the risk of heart failure. N Engl J Med 347, 305-13.

Klein L, O'Connor CM, Gattis WA, Zampino M, de Luca L, Vitarelli A, Fedele F, Gheorghiade M (2003): Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. Am J Cardiol 91, 18F-40F.

Klein S, Burke LE, Bray GA, Blair S, Allison DB, Pi-Sunyer X, Hong Y, Eckel RH (2004): Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. Circulation 110, 2952-67.

Kuch B, Muscholl M, Luchner A, Doring A, Riegger GA, Schunkert H, Hense HW (1998): Gender specific differences in left ventricular adaptation to obesity and hypertension. J Hum Hypertens 12, 685-91.

Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D (1991): The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. JAMA 266, 231-6.

Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE (1997a): The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272, 11439-43.

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE (1997b): A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272, 21403-7.

Lee J, Xu Y, Lu L, Bergman B, Leitner JW, Greyson C, Draznin B, Schwartz GG (2009): Multiple abnormalities of myocardial insulin signaling in a porcine model of diet-induced obesity. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298, H310-9.

Lee YH, Pratley RE (2005): The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. Curr Diab Rep 5, 70-5.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990): Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med 322, 1561-6.

Li Y, Zhang L, Zhang H, Zhang N, Yang Z, Gao M, Yang X, Cui L (2010): High-dose glucose-insulin-potassium has hemodynamic benefits and can improve cardiac remodeling in acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention: From a randomized controlled study. J Cardiovasc Dis Res 1, 104-9.

Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG (1997): Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. Am J Physiol 272, H2313-9.

Libby P (2002): Inflammation in atherosclerosis. Nature 420, 868-74.

Lorell BH, Carabello BA (2000): Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. Circulation 102, 470-9.

Luo J, McMullen JR, Sobkiw CL, Zhang L, Dorfman AL, Sherwood MC, Logsdon MN, Horner JW, DePinho RA, Izumo S, et al. (2005): Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. Mol Cell Biol 25, 9491-502.

Maier LS, Brandes R, Pieske B, Bers DM (1998): Effects of left ventricular hypertrophy on force and Ca2+ handling in isolated rat myocardium. Am J Physiol 274, H1361-70.

Mamas MA, Neyses L, Fath-Ordoubadi F (2010): A meta-analysis of glucose-insulin-potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction. Exp Clin Cardiol 15, e20-4.

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH (1990): A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 322, 882-9.

Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML (2000): Weight gain-induced blood pressure elevation. Hypertension 35, 1135-40.

Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A (2002): Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. J Biol Chem 277, 22896-901.

Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T (1998): Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. Hypertension 31, 1324-30.

McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S (2003): Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12355-60.

Medugorac I (1980): Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. Cardiovasc Res 14, 551-4.

Miller TD, Christian TF, Hopfenspirger MR, Hodge DO, Gersh BJ, Gibbons RJ (1995): Infarct size after acute myocardial infarction measured by quantitative tomographic 99mTc sestamibi imaging predicts subsequent mortality. Circulation 92, 334-41.

Nigam A, Wright RS, Allison TG, Williams BA, Kopecky SL, Reeder GS, Murphy JG, Jaffe AS (2006): Excess weight at time of presentation of myocardial infarction is associated with lower initial mortality risks but higher long-term risks including recurrent re-infarction and cardiac death. Int J Cardiol 110, 153-9.

O'Neill BT, Abel ED (2005): Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? J Clin Invest 115, 2059-64.

Ottervanger JP, Armstrong P, Barnathan ES, Boersma E, Cooper JS, Ohman EM, James S, Topol E, Wallentin L, Simoons ML (2003): Long-term results after the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor abciximab in unstable angina: one-year survival in the GUSTO IV-ACS (Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries IV--Acute Coronary Syndrome) Trial. Circulation 107, 437-42.

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I (2001): Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280, H2726-31.

Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A (2002): Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. J Biol Chem 277, 39684-95.

Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, Lee MK, Dey A, Rothermel B, Kim YB, Kalinowski A, et al. (2005): Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. Diabetes 54, 3530-40.

Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernandez AM, Tebar FJ, Valdes M (2003): Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. Heart 89, 1152-6.

Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, et al. (2004): PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. Cell 118, 375-87.

Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA (1998): Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. Am J Physiol 274, H1812-20.

Pickup JC, Crook MA (1998): Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? Diabetologia 41, 1241-8.

Rassow J: Biochemie. 2., aktualisierte Aufl., Thieme, Stuttgart 2008.

Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Saari JT, Ren J (2006): High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. J Hypertens 24, 549-61.

Schiekofer S, Shiojima I, Sato K, Galasso G, Oshima Y, Walsh K (2006): Microarray analysis of Akt1 activation in transgenic mouse hearts reveals transcript expression profiles associated with compensatory hypertrophy and failure. Physiol Genomics 27, 156-70.

Schorr U, Blaschke K, Turan S, Distler A, Sharma AM (1998): Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. J Hypertens 16, 1475-80.

Selmer R, Tverdal A (1995): Body mass index and cardiovascular mortality at different levels of blood pressure: a prospective study of Norwegian men and women. J Epidemiol Community Health 49, 265-70.

Sen S, Tarazi RC (1983): Regression of myocardial hypertrophy and influence of adrenergic system. Am J Physiol 244, H97-101.

Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S (2000): The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. EMBO J 19, 2537-48.

Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S (2002): Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. Mol Cell Biol 22, 2799-809.

Shiojima I, Walsh K (2006): Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. Genes Dev 20, 3347-65.

Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Takahashi A, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED, Walsh K (2002): Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. J Biol Chem 277, 37670-7.

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K (2005): Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. J Clin Invest 115, 2108-18.

Singh PN, Lindsted KD, Fraser GE (1999): Body weight and mortality among adults who never smoked. Am J Epidemiol 150, 1152-64.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995): A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 92, 1355-74.

Statistisches Bundesamt (2004). "Lebenszeitprävalenzen von Herz-Kreislauferkrankungen." Zugriff am 02.04.2011, http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=9779&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TAB&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=83&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gastd&p_aid=50716256&hlp_nr=2&p_janein=J.

Statistisches Bundesamt (2010a, 02.06.2010). "Mikrozensus 2009 - Fragen zur Gesundheit: Verteilung der Bevölkerung auf Body-Mass-Index-Gruppen in Prozent." Zugriff am 04.01.2011, http://www.gbe-bund.de.

Statistisches Bundesamt (2010b, 25.10.2010). "Sterbefälle in Deutschland." Zugriff am 04.01.2011, http://www.gbe-bund.de.

Statistisches Bundesamt (2010c, 18.10.2010). "Pressemitteilung Nr.371 vom 18.10.2010: Herz-/Kreislauferkrankungen nach wie vor häufigste Todesursache." Zugriff am 02.04.2011, http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/10/PD10__371__232.psml.

Stevens J, Cai J, Evenson KR, Thomas R (2002): Fitness and fatness as predictors of mortality from all causes and from cardiovascular disease in men and women in the lipid research clinics study. Am J Epidemiol 156, 832-41.

Suire S, Coadwell J, Ferguson GJ, Davidson K, Hawkins P, Stephens L (2005): p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. Curr Biol 15, 566-70.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF (1991): Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature 352, 73-7.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF (1995): Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. Nature 377, 173-7.

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD (2000): Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 1196-201.

Taniyama Y, Ito M, Sato K, Kuester C, Veit K, Tremp G, Liao R, Colucci WS, Ivashchenko Y, Walsh K, et al. (2005): Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. J Mol Cell Cardiol 38, 375-85.

Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, Taffet G, Michael LH, Entman ML, Ballantyne CM (2006): Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291, H2504-14.

Thim T, Bentzon JF, Kristiansen SB, Simonsen U, Andersen HL, Wassermann K, Falk E (2006): Size of myocardial infarction induced by ischaemia/reperfusion is unaltered in rats with metabolic syndrome. Clin Sci (Lond) 110, 665-71.

Tirziu D, Chorianopoulos E, Moodie KL, Palac RT, Zhuang ZW, Tjwa M, Roncal C, Eriksson U, Fu Q, Elfenbein A, et al. (2007): Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice. J Clin Invest 117, 3188-97.

UniProt (1988). "P06213 (INSR_HUMAN)." Zugriff am 20.11.2010, http://www.uniprot.org/uniprot/P06213#section_general.

UniProt (1994, 05.10.2010). "P35568 (IRS1_HUMAN)." Zugriff am 20.11.2010, http://www.uniprot.org/uniprot/P35568.html.

Vanhaesebroeck B, Waterfield MD (1999): Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. Exp Cell Res 253, 239-54.

Voigt P, Dorner MB, Schaefer M (2006): Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. J Biol Chem 281, 9977-86.

Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE (2001): Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. Obes Res 9, 414-7.

Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, Sawada N, Salomone S, Benjamin LE, Walsh K, Moskowitz MA, Liao JK (2009): Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. Sci Signal 2, ra11.

Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN (2003): A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. J Clin Invest 111, 1497-504.

White MF (2003): Insulin signaling in health and disease. Science 302, 1710-1.

WHO (2010). "Body mass index - BMI." Zugriff am 17.10.2010, http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi.

Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH (2004): Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. Circulation 110, 3081-7.

Workman P, Clarke PA, Guillard S, Raynaud FI (2006): Drugging the PI3 kinome. Nat Biotechnol 24, 794-6.

Yarbrough WM, Mukherjee R, Escobar GP, Sample JA, McLean JE, Dowdy KB, Hendrick JW, Gibson WC, Hardin AE, Mingoia JT, et al. (2003): Pharmacologic inhibition of intracellular caspases after myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling: a potentially novel pathway. J Thorac Cardiovasc Surg 126, 1892-9.

Zeidan A, Javadov S, Chakrabarti S, Karmazyn M (2008): Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. Cardiovasc Res 77, 64-72.

Zhao T, Zhao W, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y (2010): Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. Microvasc Res 80, 188-94.

Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, Schaub MC, Zaugg M (2006): Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. Cardiovasc Res 72, 152-62.

Zugck C, Muller A, Helms TM, Wildau HJ, Becks T, Hacker J, Haag S, Goldhagen K, Schwab JO (2010): [Health economic impact of heart failure: An analysis of the nationwide German database]. Dtsch Med Wochenschr 135, 633-8.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Katrin Schäfer für die Bereitstellung des Themas sowie für die umfassende, kompetente und engagierte Betreuung. Sie stand mir immer mit Fachwissen und vielen wertvollen Hinweisen zur Seite und hat mich über den gesamten Zeitraum sehr gut betreut und unterstützt.

Herrn Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen. Auch EUGeneHeart möchte ich für die Möglichkeit, eine Arbeit im Zusammenhang eines umfassenderen Projekts anfertigen zu können, danken, nicht zuletzt auch für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Herrn Dr. med. Bernhard Unsöld danke ich im Besonderen für die Durchführung der Myokardinfarktoperationen, genau wie Herrn Dr. med. Michael Didié, der die Durchführung der echokardiographischen Messungen an den Mäusen übernahm.

Ausdrücklich und von Herzen möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, in der mir jeder Einzelne stets hilfsbereiter Ansprechpartner war. Ganz besonders möchte ich dabei Frau Dr. rer. nat. Maren Leifheit-Nestler und Frau Sarah Barke für die ausgezeichnete Einarbeitung und für die großartige Hilfe bei den Western Blots sowie für die unermüdliche Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen danken.